

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ - ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ: ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ



Βιοενεργητική στρατηγική βιοαποικοδόμησης της 3,4-διχλωροφαινόλης και παραγωγής H₂ από το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus* σε συνθήκες έλλειψης αζώτου.

Κορελίδου Άννα

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τμήμα Βιολογίας

ΠΜΣ: Μοριακή Βιολογία και Βιοτεχνολογία Φυτών

<u>Επιβλέπων</u>: Καθηγητής Κυριάκος Κοτζαμπάσης

Τριμελής Εξετασική Επιτροπή:

Κυριάκος Κοτζαμπάσης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας

Δημήτριος Γανωτάκης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης, Τμήμα Χημείας

Στέργιος Πυρίντσος, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας Αφιερώνεται

στην οικογένειά μου

Ρουφίνα,

Φώτης,

Μελίντα

Πρόλογος

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας, του Τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Κρήτης για το μεταπτυχιακό κύκλο σπουδών με τίτλο "Μοριακή Βιολογία και Βιοτεχνολογία Φυτών".

Με τη διεκπεραίωση αυτής της εργασίας αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά, αρχικά, τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Καθηγητή Κυριάκο Κοτζαμπάση, για την ευκαιρία που μου έδωσε με την ανάθεση αυτού του θέματος. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την υπομονή του, την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της δουλειάς μου.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Στέργιο Πυρίντσο και τον Καθηγητή Δημήτριο Γανωτάκη, που συμφώνησαν να συμμετάσχουν στην τριμελή εξεταστική επιτροπή της εργασίας μου.

Ακόμη ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στην Αικατερίνη Παπαζή, μεταδιδάκτορα του εργαστηρίου, για την ουσιαστική βοήθεια και καθοδήγηση που μου πρόσφερε από την αρχή μέχρι το τέλος της εργασίας με συνέπεια, υπομονή και υπευθυνότητα. Επιπλέον ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου και προπάντων τον μεταδιδάκτορα Νίκο Ιωαννίδη για την βοήθεια και υπομονή του.

Εν κατακλείδι, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου που με την πολύτιμη συμπαράσταση και εμψύχωσή τους και την κατανόησή τους, συνέβαλαν στην επιτυχή εκτέλεση της εργασίας.

Περίληψη

Πρόσφατες δημοσιεύσεις του Εργαστηρίου μας έδειξαν ότι το μονοκύτταρο χλωροφύκος Scenedesmus obliquus για την βιοαποικοδόμηση μίας συγκεκριμένης κατηγορίας φαινολικών ενώσεων (meta-υποκατεστημένες διχλωροφαινόλες, dcp), επενδύει όλα τα ενεργειακά του αποθέματα στην βιοδιάσπαση των εν λόγω ενώσεων και όχι στην ανάπτυξη. Ταυτόχρονα ο συνδυασμός τριών βασικών μεταβολικών μονοπατιών [dcp-βιοαποικοδόμηση / φωτοσυνθετική παραγωγή H₂ / αναπνευστική διαδικασία] εγκαθιδρύει σε ένα κλειστό σύστημα ανοξικές συνθήκες, επάγει την υδρογενάση και ενισχύει την φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων προς την υδρογενάση παράγωντας μεγάλες ποσότητες H₂ (Papazi et al., 2012; Papazi and Kotzabasis, 2013). Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην καταγραφή της διαφοροποίησης του παραπάνω μηχανισμού σε συνθήκες έλλειψης αζώτου από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Οι χειρισμοί που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: Η καλλιέργεια μάρτυρας (Control), η καλλιέργεια σε θρεπτικό χωρίς άζωτο ("-N"), η καλλιέργεια με προσθήκη dcp ("dcp") και η καλλιέργεια χωρίς άζωτο παρουσία dcp ("dcp-N").

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της dep βιοαποικοδόμησης και της παραγωγής H₂, φαίνεται πως κατά τον "dep-N" χειρισμό, σε σχέση με τον αντίστοιχο "dep" χειρισμό, το μονοκύτταρο χλωροφύκος αφιερώνει περισσότερη ενέργεια στην dep βιοαποικοδόμηση και λιγότερη στην παραγωγή H₂, όμως και γι αυτή την σχετικά μικρή παραγωγή H₂ σίγουρα απαιτείται και η παρουσία της dep. Στον "dep" χειρισμό γίνεται ακριβώς το αντίθετο. Έχουμε σαφώς μεγαλύτερη παραγωγή H₂ και σαφώς μικρότερη dep βιοαποικοδόμηση.

Αυτό που φαίνεται να διαφοροποιεί καθοριστικά το τελικό προϊόν αυτών των δύο χειρισμών είναι τα μειωμένα επίπεδα του Cytf και κατ' επέκταση του συμπλόκου Cytbsf στον "dcp-N" χειρισμό. Αυτό περιορίζει την εν δυνάμει ροή ηλεκτρονίων από τις ανηγμένες dcp μέσω PQ και PSI στην υδρογενάση με αποτέλεσμα τον περιορισμό της παραγωγής H₂. Αυτή η παρεμπόδιση δίνει διέξοδο στην ανηγμένη dcp να επιλέξει το μονοπάτι της βιοαποικοδόμησης της (βλ. απλοποιημένο μοντέλο).

Η μέτρηση των λιπαρών στους 4 χειρισμούς δείχνουν πως σε συνθήκες έλλειψης αζώτου ("-N"- και "dcp-N"-χειρισμός), έχουμε περισσότερα λιπαρά. Αυτό συμβαίνει διότι το χλωροφύκος δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει σε άλλα μονοπάτια τον C που έχει στην καλλιέργεια και συνεπώς βιοσυνθέτει λιπαρά.

Η ποσοτικοποίηση του αμύλου από την άλλη, έδειξε ότι τα επίπεδα αμύλου ήταν μεγαλύτερα στον "-N"-χειρισμό, λόγω του ότι η παρεμπόδιση σύνθεσης πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων οδηγεί στην διοχέτευση όλου του μεταβολικού δυναμικού στην βιοσύνθεση αμύλου, όπως και λιπιδίων, που δεν απαιτούν άζωτο. Στο "dcp-N"-χειρισμό σημειώνεται ποσοτικά το λιγότερο άμυλο, ίσως λόγω της σημαντικής ενίσχυσης του μονοπατιού της dcp-βιοαποικοδόμησης, όπου ένα μεγάλο μέρος του αμύλου υπό μορφή γλυκόζης είναι πιθανόν να χρησιμοποιείται στα πλαίσια της απαιτούμενης γλυκοζυλίωσης της dcp. Το χαμηλότερο επίπεδο του Cytb₆f στον "dcp-N" χειρισμό σε σχέση με τον "dcp" χειρισμό, περιορίζει την ροή ηλεκτρονίων από τον καταβολισμό της βιοαποικοδόμηση και την PSII-ανεξάρτητη παραγωγή H₂ και ενισχύει την dcp-βιοαποικοδόμηση και την παραγωγή λιπαρών (βλ. απλοποιημένο μοντέλο).

Το σχετικά «παράδοξο» που αναδεικνύεται στο απλουστευμένο λειτουργικό μοντέλο λειτουργίας των βασικών μεταβολικών διαδικασιών του μονοκύτταρου χλωροφύκους Scenedesmus obliquus στους 4 χειρισμούς, είναι το γεγονός ότι στον "-N" χειρισμό έχουμε δραματική μείωση του Cytb₆f, αναστέλλοντας επί της ουσίας όλη την φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων και ως εκ τούτου και την παραγωγή H₂, ενώ στον "dcp-N" χειρισμό έχουμε σημαντικά υψηλό επίπεδο του Cytb₆f (σε σχέση με τον "-N" χειρισμό). Η προτεινόμενη διαφοροποίηση μεταξύ των δύο χειρισμών έγκειται στην πρόσφατη αποκωδικοποίηση της βιοενεργητικής στρατηγικής των μικροφυκών (Papazi et al., 2013), σύμφωνα με την οποία το χλωροφύκος που έχει να αντιμετωπίσει το τοξικό dcp ("dcp-N" χειρισμός), χρειάζεται μεγάλα ενεργειακά αποθέματα και ως εκ τούτου πιθανόν να προβαίνει σε καταβολισμό δευτερογενών (και όχι μόνο) ουσιών και μέσα από αυτή την διαδικασία να κερδίζει μαζί με την απαιτούμενη ενέργεια (ATP) και άζωτο. Αυτός είναι και ο λόγος που στον εν λόγω χειρισμό έχουμε υψηλότερα επίπεδα χλωροφυλλών κάτι που δεν μπορεί να κάνει ο "-Ν" χειρισμός.

Όλα τα παραπάνω αναδεικνύουν μεταξύ άλλων συγκεκριμένες βιοενεργητικές στρατηγικές των μικροφυκών, η κατανόηση των οποίων θα θέσει στο μέλλον τις βάσεις για μία νέα βιοτεχνολογική προσέγγιση.



Abstract

Recent publications from our laboratory showed that the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus* invests all its energy reserves in the biodegradation of a particular class of phenolic compounds (one *meta*-substituted dichlorophenols, dcp) rather than its development. The simultaneous combination of three key metabolic pathways [dcp-biodegradation / photosynthetic H₂ production / respiratory procedure] establishes anoxic conditions in a closed system, induces the hydrogenase enzyme and enhances photosynthetic electron flow to hydrogenase yielding large amounts of H₂ (Papazi et al., 2012; Papazi and Kotzabasis, 2013). The present work aims to study the distinction of the above mentioned mechanism in nitrogen deficiency conditions. We used 4 treatments: the control cultures (Control), algal cultures in free nitrogen medium ("-N"), algal cultures with dcp ("dcp") and algal cultures in free nitrogen medium with dcp ("dcp-N").

The results from dcp biodegradation and H₂ production analyses in "dcp-N" treatment, compared to the corresponding "dcp" treatment, showed that the unicellular green alga gives more energy into biodegradation procedure of dcp and less into hydrogen production, nevertheless dcp is needed even for this relatively low H₂ production. To the contrary, "dcp" treatment shows a greater hydrogen production and clearly less quantity of dcp is biodegraded. What appears to be differentiating the final products of these two treatments are the reduced levels of Cyt*f* and thus of the Cyt*b*₆*f* complex in "dcp-N" treatment. This limits the potential flow of electrons from the reduced dcp through PQ and PSI to the hydrogenase enzyme, thereby restricting H₂ production. Such restriction gives the possibility to the reduced dcp to choose its biodegradation path (see simplified model).

The results of lipid measurements in all treatments indicate that nitrogen deficiency ("-N" and "dcp-N" treatments) leads to increased lipid production. This is because the alga can not use the carbon source available in culture to other paths, therefore triggers lipid biosynthesis.

On the other hand, starch quantitation results reveal maximum increase in the "-N" treatment because the inhibition of protein and other macromolecule synthesis leads to the metabolic potential shifting in starch and lipid biosynthesis, where nitrogen is not required. The least starch quantity is noted in "dcp-N" treatment probably because of the considerably enhanced dcp-biodegradation pathway, whereby a big amount of starch in the form of glucose is likely to be used in the required glycosylation of dcp. The lower levels of $Cytb_{6}f$ noted in "dcp-N" treatment, compared to those in "dcp" treatment, restrict the flow of electrons from the glucose catabolism to PQ and the PSII-independent hydrogen production and enhance dcp-biodegradation and lipid synthesis (see simplified model).

The relatively "paradox" fact that emerges from the simplified functional model of basic metabolic processes of the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus* in all 4 treatments is that the levels of $Cytb_{o}f$ are dramatically reduced in the "-N" treatment, inhibiting significantly the photosynthetic electron flow and hence H₂ production, whereas significantly high levels of $Cytb_{o}f$ (compared to "-N" treatment) are noted in the "dcp-N" treatment. The proposed differentiation between the two treatments could be explained by the recent decoding of bioenergetic strategy of microalgae (Papazi et al., 2013). When thethe green alga has to face the toxic dcp ("dcp-N" treatment) needs large energy reserves, hence possibly proceeds to catabolism of secondary (and not only) substances. Through this process the alga gains nitrogen along with the required energy (ATP), and that is why in "dcp-N" treatment (compared to "-N" treatment) higher levels of chlorophyll are presented indicated in this treatment, as opposed to the "-N" handling.

All the above highlight specific bioenergetic strategies of microalgae, the understanding of which will set the bases for a new biotechnological approach in the future.



Περιεχόμενα

1 Εισαγωγή	11
1.1Βιοαποικοδόμηση	11
1.1.1Φαινόλες	12
1.1.2Χλωροφαινολες	12
1.1.3 Βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων	13
1.2 Βιοαποικοδόμηση meta-υποκατεστημένων διχλωροφαινολών (m-dcps) από το)
χλωροφύκος Scenedesmus obliquus και παραγωγή υδρογόνου	15
1.3 Παραγωγή Υδρογόνου από χλωροφύκη μέσω του φωτοσυνθετικού μηχανισμού	σε
ανοξικές συνθήκες	17
1.3.1 Υδρογενάσες	21
1.4 Επίδραση της έλειψης αζώτου	22
1.4.1 Έλλειψη αζώτου και παραγωγή τριακυλγλυκερόλης (TAGs)	24
2. Υλικά και Μέθοδοι	27
2.1 Οργανισμός	27
2.2 Συνθήκες ανάπτυξης	27
2.3 Υπολογισμός κυτταρικής συγκέντρωσης	30
2.4 Επαγωγικός Φθορισμός-Φυσικοχημικές Αναλύσεις της Μοριακής Δομής και	
Λειτουργίας του Φωτοσυνθετικού Μηχανισμού	30
2.5 Εκχύλιση Πρωτεϊνών – Ποσοτική Ανάλυση Πρωτεϊνών – Ηλεκτροφορητικός	
Διαχωρισμός	34
2.6 Ανοσοεντοπισμός – Western Blot των Πρωτεϊνών Rubisco, Hydrogenase, PSa,	
D1,COX, AOX και PTOX	35
2.7 Ποιοτική και Ποσοτική Ανάλυση Φαινολικών Ενώσεων με HPLC	36
2.8 Απομόνωση, Ποιοτικός Χαρακτηρισμός και Ποσοτική Ανάλυση ΑΤΡ και ADP	με
HPLC	36
2.9 Ποιοτική και Ποσοτική Ανάλυση Υδρογόνου (H2) και Οξυγόνου με Αέρια	
Χρωματογραφία Θερμικής Αγωγιμότητας (GC-TCD)	37
2.10 Λυοφιλοποίηση κυττάρων	38
2.11 Εκχύλιση λιπαρών	38
2.12 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση χλωροφυλλών	39
2.13 Καταγραφή λιπαρών σταγονιδίων	39
2.14 Εκχύλιση και ποσοτικοποίηση αμύλου	39

3. Αποτελέσματα	40
4. Συζήτηση	59
Βιβλιογραφία	68

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιοαποικοδόμηση

Η βιοαποικοδόμηση ή βιοτική αποικοδόμηση είναι χημική αποικοδόμηση που γίνεται από τη δράση φυσικών μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, μύκητες ή μικροφύκη. Η βιοαποικοδόμηση γενικά θεωρείται ότι περιλαμβάνει ενζυμικές και μη ενζυμικές υδρολύσεις. Η ενζυμική αποικοδόμηση γίνεται είτε από την παρουσία εξωκυτταρικών ενζύμων στο περιβάλλον των μικροοργανισμών ή από ενδοκυτταρικά ένζυμα.

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την βιοαποικοδόμηση είναι η θερμοκρασία, τα επίπεδα της υγρασίας, η ατμοσφαιρική πίεση, η πίεση του οξυγόνου, η συγκέντρωση οξέων και μετάλλων και ο βαθμός έκθεσης στο φως. Επίσης υπάρχουν παράγοντες που σχετίζονται με τους μικροοργανισμούς και περιλαμβάνουν την συγκέντρωσή τους, τη συγκέντρωση των ενζύμων, τη παρουσία θρεπτικών υλικών για τους μικροοργανισμούς και την παρουσία παρεμποδιστών ή ανταγωνιστών ("Biodegradability Webster's Timeline History 1965-2007" by professor Philip Parker).

1.1.1 Φαινόλες

Οι φαινόλες είναι ενώσεις που φέρουν μια ομάδα υδροξυλίου (-OH) απευθείας συνδεδεμένη σε έναν αρωματικό δακτύλιο (ArOH). Η απλούστερη φαινολική ένωση είναι η φαινόλη, της οποίας η δομή φαίνεται στην Εικόνα 1. Πρόκειται για μια αρωματική αλκοόλη που παρουσιάζει αδύναμες όξινες ιδιότητες και είναι διαβρωτική και δηλητηριώδης. Αυτή η φαινολική ένωση μερικές φορές ονομάζεται και καρβολικό οξύ, ειδικά όταν σε διάλυμα νερού αντιδρά με ισχυρές βάσεις για το σχηματισμό αλάτων που ονομάζονται φαινολάτες.



Εικόνα Ι. Φαινόλες

Είναι σημαντική για τη βιομηχανία στην παραγωγή ορισμένων συνθετικών ρητίνων, π.χ. βακελίτη και στη σύνθεση πολλών φάρμακων, βαφών, ζιζανιοκτόνων, εντομοκτόνων και εκρηκτικών (π.χ., πικρικό οξύ). Είναι το πιο απλό μέλος μιας κατηγορίας από υδροξυ- παράγωγα βενζολίου, τα οποία περιέχουν μια ομάδα υδροξυλίου που συνδέεται με ένα βενζολικό δακτύλιο. Αυτές οι ενώσεις μπορούν να θεωρηθούν ως παράγωγα φαινόλης και γενικά λέγονται φαινόλες.

Για την ονοματολογία των μονο-υποκατεστημένων φαινολικών ενώσεων πολλές φορές χρησιμοποιούνται τα προθέματα ortho (o), meta (m) ή para (p), για να υποδηλώσουν την ακριβή θέση που καταλαμβάνει ο υποκαταστάτης στο φαινολικό δακτύλιο. Το 70% της βιομηχανικά παραγόμενης φαινόλης χρησιμοποιείται για παρασκευή πολυανθρακικών ρητινών, ενώ το υπόλοιπο 30% για εκρηκτικά, χρώματα, μελάνια, αρώματα, συντηρητικά ξύλων, υφάσματα, φάρμακα, αντιβακτηριακά, αντιμυκητιακά, αντισηπτικά και αναισθητικά (van Schie and Young, 2000). Όλες οι βιομηχανίες που παράγουν ή χρησιμοποιούν φαινόλη είναι υπεύθυνες για την απελευθέρωση αυτής της ουσίας στο περιβάλλον. Η Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος (EPA) της Αμερικής για να προστατεύσει τη ζωή των οργανισμών στα γλυκά νερά έχει θεσπίσει ως όριο τα 600 μg/L, ενώ στο πόσιμο νερό η τιμή αυτή μεταπίπτει στο 1μg/L (van Schie and Young, 2000).

1.1.2 Χλωροφαινόλες

Οι χλωροφαινόλες ανήκουν στην κατηγορία των αλογονοφαινολών και αποτελούν ενώσεις, που έχουν ευρύτατα μελετηθεί όσον αφορά στη βιοαποικοδόμησή τους. Η αποδόμησή τους πραγματοποιείται είτε αερόβια, είτε με αναγωγική αφαλογόνωση. Όμως η τελευταία οδηγεί σε συσσώρευση μεταβολικών προϊόντων και όχι σε πλήρη αποδόμηση. Οι χλωροφαινόλες με ένα και δύο άτομα χλωρίου βιοαποικοδομούνται με υδροξυλίωση προς χλωροκατεχόλες, που με τη σειρά τους αποδομούνται μέσω του *ortho* μονοπατιού. Στις περισσότερο χλωριωμένες φαινόλες η υδροξυλίωση λαμβάνει χώρα στην *para* θέση (Rehm et. al., 2000).

Οι διχλωροφαινόλες (dcps) με ένα *meta* υποκατεστημένο χλώριο στο φαινολικό δακτύλιο, όπως η 3,4-διχλωροφαινόλη, βρίσκονται ευρέως στο περιβάλλον και κυρίως στα λύματα των χημικών, αγροχημικών και φαρμακευτικών εργοστασίων και είναι

τοξικές. Κάποιες από αυτές πιθανόν να προκαλούν δυσμενείς επιπτώσεις στον άνθρωπο και άλλους οργανισμούς στο φυσικό οικοσύστημα.

Η τοξικότητα και η βιοσυσσωρευτική ικανότητα των χλωροφαινολών αυξάνεται με την αύξηση του αριθμού των υποκαταστατών στο φαινολικό δακτύλιο και της λιποφιλικότητας των χλωροφαινολών (Annachhatre and Gheewala, 1996). Οι τοξικές επιδράσεις των χλωροφαινολών στους μικροοργανισμούς σχετίζονται με τη διακοπή της διαδικασίας παραγωγής ενέργειας, είτε παρεμποδίζοντας την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων είτε αποσυνδέοντας (uncoupling) την οξειδωτική και τη φωτοσυνθετική φωσφορυλίωση, παρεμποδίζοντας την παραγωγή του ATP (Yang et al., 2002). Οι αλογονοφαινόλες είναι ενώσεις στις οποίες δίνεται ιδιαίτερη σημασία στη βιοαποικοδομησιμότητά τους λόγω των καρκινογόνων και τοξικών ιδιοτήτων τους αλλά και γιατί συχνά αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για το σχηματισμό των διοξινών (Boyd and Shelton, 1984).

1.1.3 Βιοαποικοδόμηση Φαινολικών Ενώσεων.

Η αερόβια βιοαποικοδόμηση της φαινόλης άρχισε να ερευνάται από το 1900. Υπάρχουν μικροοργανισμοί (αερόβιοι και αναερόβιοι) σε διάφορα περιβάλλοντα που έχουν τη δυνατότητα να τη χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα και ενέργειας (van Schie and Young, 2000). Πολλοί αερόβιοι μικροοργανισμοί που αποικοδομούν τη φαινόλη απομονώθηκαν και έτσι τα μονοπάτια αποικοδόμησής της είναι πλέον γνωστά, ενώ τα τελευταία χρόνια αρκετά γονίδια που εμπλέκονται στην αερόβια αποικοδόμησή της έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί (van Schie and Young, 2000).



Εικόνα 2.Οι ενδιάμεσοι μεταβολίτες του κύκλου του κιτρικού οξέος (κύκλος του Krebs).

Στο αερόβιο μονοπάτι αποικοδόμησης της φαινόλης χρησιμοποιείται μοριακό οξυγόνο από το ένζυμο υδροξυλάση της φαινόλης με σκοπό την προσθήκη ενός δεύτερου υδροξυλίου στο φαινολικό δακτύλιο στην *ortho* θέση ως προς αυτό που ήδη υπάρχει. Η αντίδραση απαιτεί ένα μόριο NADH₂. Η σχηματιζόμενη κατεχόλη (1,2-διυδροξυβενζόλιο) μπορεί να αποικοδομηθεί μέσω δύο εναλλακτικών μονοπατιών ανάλογα με τον εκάστοτε οργανισμό. Στο *ortho* ή αλλιώς β-ketoadipate μονοπάτι, υπάρχει σχάση του αρωματικού δακτυλίου ανάμεσα στα δύο υδροξύλια της κατεχόλης από μια 1,2-διοξυγενάση (intradiol fission), οπότε και σχηματίζεται cis, cis μουκονικό οξύ, το οποίο περαιτέρω μεταβολίζεται μέσω του κύκλου του Krebs (Εικόνα 2).





Στο meta μονοπάτι (Εικόνα 3) η σχάση του φαινολικού δακτυλίου λαμβάνει χώρα στο δεσμό που πρόσκειται στα δύο υδροξύλια της κατεχόλης, με τη βοήθεια του ενζύμου 2,3-διοξυγενάση (extradiol fission), οπότε και σχηματίζεται μια ημιαλδεΰδη, που ακολούθως μεταβολίζεται μέσω του κύκλου του Krebs (van Schie and Young, 2000). Όλες οι παραπάνω πληροφορίες σχετικά με τα μονοπάτια αποικοδόμησης της φαινόλης αναφέρονται σε βακτήρια. Το μοναδικό μονοπάτι που υπάρχει στη διεθνή βιβλιογραφία και αναφέρεται σε φύκη είναι αυτό των Semple and Cain (1996), όπου το φύκος Ochromonas danica, χρησιμοποιώντας το meta μονοπάτι (όμοιο με εκείνο που προαναφέρθηκε για τα βακτήρια) διασπά τη φαινόλη παράγοντας διοξείδιο του άνθρακα, πυροσταφυλικό και φορμαλδεΰδη.

1.2 Βιοαποικοδόμηση meta-υποκατεστημένων διχλωροφαινολών (dcps) από το χλωροφύκος Scenedesmus obliquus και παραγωγή υδρογόνου

Η χρήση βακτηρίων στη βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων ήταν μονόδρομος μέχρι πριν από λίγα χρόνια. Η ιδέα για την χρησιμοποίηση των μικροφυκών σε διαδικασίες βιοαποικοδόμησης ενώ προτάθηκε το 1957 από τους Oswald and Gotaas, απέκτησε ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια (Papazi and Kotzabasis, 2007; 2008). Η **βιοαποικοδόμηση τοξικών ενώσεων από μικροφύκη**. Τα μικροφύκη σε αντίθεση με τα βακτήρια και τους μύκητες διαθέτουν ένα εξαιρετικό πλεονέκτημα σχετικά με τη διαδικασία της βιοαποικοδόμησης, που είναι η ικανότητά τους να φωτοσυνθέτουν χρησιμοποιώντας έτσι την απεριόριστη φωτονιακή ακτινοβολία ως πηγή ενέργειας. Την ίδια ικανότητα έχουν και τα φυτά. Όμως σε αντίθεση με αυτά, τα φύκη εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στις αντίζοες περιβαλλοντικές συνθήκες, αναπτύσσονται γρηγορότερα, είναι πολύ μικρότερα και είναι ευκολότερα στο χειρισμό τους. Τα φύκη έχουν επιδείξει σημαντικά πλεονεκτήματα στο ερευνητικό πεδίο της βιοαποικοδόμησης, λόγω του γεγονότος ότι χρησιμοποιούν φτηνή και άφθονη πηγή ενέργειας (ηλιακή ακτινοβολία) που μπορούν να την επενδύσουν στη βιοαποικοδόμηση.

Οι meta-υποκατεστημένες διχλωροφαινόλες εισέρχονται στο κύτταρο και ξεκινάει η βιοαποικοδόμηση τους, επηρεάζοντας την φωτοσυνθετική και αναπνευστική δραστηριότητα. Αναλυτικά σύμφωνα με το μοντέλο που προτείνουν οι Papazi et al. (2012, 2014) φαίνεται πως το πρώτο βήμα της βιοαποικοδόμησής τους είναι η αναγωγή τους. Οι ανηγμένες dcps λόγω του οξειδοαναγωγικού τους δυναμικού μπορούν να δώσουν τα ηλεκτρόνια τους και στη φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, πιθανότατα στη δεξαμενή της πλαστοκινόνης (PQ), μπλοκάροντας ταυτόχρονα το ενεργό

15

κέντρο του PS II (οπότε και την παραγωγή O₂). Κάτω από αυτές τις συνθήκες μέσα σε ένα κλειστό σύστημα έχουμε: (1) μία γρήγορη εγκαθίδρυση ανοξικών συνθηκών και ενεργοποίηση της υδρογενάσης, (2) μία πολύ αυξημένη ροή ηλεκτρονίων μέσω του PS I που καταλήγουν στην υδρογενάση και στην παραγωγή H₂, (3) λόγω αυτής της ιδιότυπης φωτοσυνθετικής ροής ηλεκτρονίων αλλά και της ενεργοποίησης της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, έχουμε αύξηση παραγωγής ενέργειας (ATP) που επενδύεται για το μονοπάτι της βιοαποικοδόμησης των *meta*-υποκατεστημένων dcps.

Οι δύο αυτοί μηχανισμοί (βιοαποικοδόμηση *meta*-υποκατεστημένων διχλωροφαινολών και φωτοσυνθετική παραγωγή H₂) δρουν συνεργιστικά και ανοίγουν ένα νέο δρόμο συνδυασμού βιοχημικών μονοπατιών *in vivo* στα πλαίσια μίας έξυπνης βιοτεχνολογικής προσέγγισης. Μέσα σε αυτά τα πλαίσια έχουμε συνεχή φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου από μικροφύκη, που ως «καύσιμο» χρησιμοποιεί τη βιοαποικοδόμηση τοξικών διχλωροφαινολών και την ηλιακή ακτινοβολία (Papazi et al.2012, 2014).



Εικόνα 4. Συνδυασμός κεντρικών βιοχημικών μονοπατιών όπου έχουμε βιοαποικοδόμηση metaυποκατεστημένων διχλωροφαινολών (dcps) από το χλωροφύκος Scenedesmus obliquus και συνεχή φωτοσυνθετική παραγωγή H₂ από χλωροφύκη (Papazi and Kotzabasis 2013).

Η δυνατότητα των διχλωροφαινολών να έλκουν ηλεκτρόνια και να ανάγονται κατά την διαδικασία της βιοαποικοδόμησης τους, καθώς επίσης και η πιθανή συμμετοχή τους ως δότες ηλεκτρονίων στην φωτοσυνθετική αλυσίδα, αποδείχθηκε πειραματικά με αναστολείς, τεχνητούς δότες και δέκτες της φωτοσυνθετικής αλυσίδας (Papazi and Kotzabasis, 2007). Οι δύο αυτοί μηχανισμοί δρουν συνεργιστικά και αρχίζουν με την βιοποικοδόμηση μέρους της φαινολικής ένωσης έπεται η έναρξη της παραγωγής υδρογόνου.Με αυτό τον τρόπο το χλωροφύκος παράγει 100 φορές περισσότερο H₂ από ότι με την κλασική ανοξία (χωρίς προσθήκη dcp).

1.3 Παραγωγή Υδρογόνου από χλωροφύκη μέσω του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε ανοξικές συνθήκες.

Τα γλωροφύκη, όπως και οι υπόλοιποι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί, έχουν τη δυνατότητα να παράγουν αέριο υδρογόνο σε ανοξικές συνθήκες (Gaffron and Rubin, 1942). Στην φωτοσύνθεση, η φωτονιακή ενέργεια συλλέγεται από τις γλωροφύλλες με αποτέλεσμα το διαχωρισμό φορτίου στο PS ΙΙ και την απελευθέρωση οξυγόνου από τη φωτόλυση του νερού. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται μέσω της φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στην πλαστοκινόνη, το κυτόχρωμα b₆f, την πλαστοκυανίνη, το PS Ι και τη φερρεδοξίνη. Η ανηγμένη φερρεδοξίνη χρησιμοποιείται για τη μετατροπή του NADP⁺ σε NADPH, χάρη στη Fe-NADP⁺αναγωγάση (Εικόνα 5). Έπειτα η NADPH χρησιμοποιείται στον κύκλο του Calvin για την παραγωγή υδατανθράκων. Όμως, κάτω από αναερόβιες συνθήκες τα κύτταρα ενεργοποιούν μια Fe-υδρογενάση (Happe and Naber, 1993), που καταλύει την αντίστροφη αναγωγή των πρωτονίων σε μοριακό υδρογόνο (H2). Στα χλωροφύκη, η υδρογενάση εδράζεται στο χλωροπλάστη και λαμβάνει ηλεκτρόνια κατευθείαν από την ανηγμένη φερρεδοξίνη για τη παραγωγή υδρογόνου (Florin et al., 2001). Επειδή η υδρογενάση παρεμποδίζεται ισχυρά από την παρουσία του οξυγόνου, η παραγωγή υδρογόνου συντηρείται μόνο σε ανοξία (Benemann et al., 1973).



Εικόνα 5. Κυκλική και μη κυκλική φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων.

Η παραγωγή υδρογόνου από χλωροφύκη παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τον Hans Gaffron και τους συνεργάτες τους (Gaffron 1935; Gaffron and Rubin 1942), στο μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquuus*. Σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου εκφράζεται το γονίδιο μιας υδρογενάσης, η οποία καταλύει την φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου. Τα ηλεκτρόνια προέρχονται είτε από την οξείδωση του νερού από το φωτοσύστημα II (PS II), το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την ταυτόχρονη απελευθέρωση μοριακού οξυγόνου, είτε από τον καταβολισμό ενδογενών υποστρωμάτων με την ταυτόχρονη παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα (Melis and Happe 2001).

Η φωτοσυνθετική παραγωγή του υδρογόνου μπορεί να είναι το αποτέλεσμα τριών διαφορετικών μονοπατιών αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων: 1) το εξαρτώμενο από το PS II και εμπλέκει τη φωτόλυση του νερού ως τη μοναδική πηγή ηλεκτρονίων για το PS I, τη φερρεδοξίνη και τη Fe-υδρογενάση, 2) το ανεξάρτητο του PS II και χρησιμοποιεί τον καταβολισμό των ενδογενών οργανικών υποστρωμάτων ως αναγωγική πηγή ενέργειας (Melis and Happe, 2001) και 3) το φωτοανεξάρτητο μονοπάτι (dark fermentation, Εικόνα 6) **PSII εξαρτώμενο μονοπάτι:** Το PSII καταλύει την φωτόλυση του νερού από την οποία παράγεται μοριακό οξυγόνο και ηλεκτρόνια, τα οποία μεταφέρονται μέσω του P680 στη φωτοσυνθετική γραμμική ροή ηλεκτρονίων και καταλήγουν στην φερρεδοξίνη. Η φερρεδοξίνη μπορεί να μεταβιβάσει τα ηλεκτρόνια είτε στην οξειδωαναγωγάση φερρεδοξίνης FNR), η οποία ανάγει το NADP⁺ σε NADPH, είτε στην υδρογενάση, η οποία χρησιμοποιώντας τα ηλεκτρόνια αυτά και πρωτόνια μπορεί να συνθέσει μοριακό υδρογόνο (Florin et al. 2001).

ΡSII ανεξάρτητο μονοπάτι: Η ροή ηλεκτρονίων προέρχεται από τον καταβολισμό ενδογενών υποστρωμάτων στο φως (π.χ. άμυλο), εισέρχονται στην φωτοσυνθετική αλυσίδα στο σημείο της πλαστοκινόνης (PQ) μέσω μιας διαμεμβρανικής αναγωγάσης του NAD(P)H. Ακολουθούν έπειτα την φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς και καταλήγουν στην φερρεδοξίνη μέσω του PSI. Η ανηγμένη φερρεδοξίνη μπορεί έπειτα να χρησιμοποιηθεί από την υδρογενάση για τη σύνθεση μοριακού υδρογόνου. Σε αυτήν την περίπτωση το PSII παραλείπεται όμως επειδή και πάλι η όλη διαδικασία λαμβάνει χώρα στο φως, οξυγόνο εξακολουθεί να παράγεται από το PSII ως παραπροϊόν και η δράση της υδρογενάσης αναστέλλεται. Ο μόνος τρόπος να παρακαμφθεί η ανασταλτική δράση του οξυγόνου είναι αυτό να καταναλώνεται γρήγορα μέσω της αναπνοής.

Ο καταβολισμός οργανικών υποστρωμάτων εξασφαλίζει ηλεκτρόνια για τη φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο επίπεδο της πλαστοκινόνης, κυρίως από το μονοπάτι της χλωροαναπνοής (Melis et al., 2000; Hemschemeier et al., 2009). Μια NAD(P)Η οξειδοαναγωγάση της πλαστοκινόνης είναι υπεύθυνη για την παροχή ηλεκτρονίων από δότες ηλεκτρονίων που βρίσκονται στο στρώμα του χλωροπλάστη προς τη δεξαμενή της πλαστοκινόνης. Και στα δύο αυτά μονοπάτια (PS II εξαρτώμενο και PS II ανεξάρτητο), η απελευθέρωση αερίου υδρογόνου θα μπορούσε να συνεισφέρει στο να διατηρηθεί η φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων μερικά οξειδωμένη υπό συνθήκες ανοξίας και επομένως να διατηρηθεί η ελάχιστη δυνατή δραστηριότητα χλωροπλαστικής και μιτοχονδριακής μεταφοράς ηλεκτρονίων για τη δημιουργία του ATP που απαιτείται για την επιβίωση του μικροοργανισμού (Melis and Happe, 2001). Θεωρητικά το PSII-εξαρτώμενο μονοπάτι είναι το πιο αποδοτικό όσον αφορά την σύνθεση υδρογόνου (παράγεται Η₂ και Ο₂ σε αναλογία 2:1), όμως επειδή το

οξυγόνο είναι ισχυρός αναστολέας των [Fe-Fe] υδρογενασών, η παραγωγή υδρογόνου σταματά όταν τα επίπεδα οξυγόνου είναι υψηλά.

Φωτοανεξάρτητη ζύμωση: Σε αναερόβιες συνθήκες (σκοτάδι) αποθηκευμένοι πολυσακχαρίτες μεταβολίζονται για να παραχθεί το απαραίτητο ΑΤΡ. Παράλληλα παράγεται NADH το οποίο πρέπει να επανοξειδωθεί ώστε να ανακυκλωθεί. Τα τελικά προϊόντα της ζύμωσης στα γλωροφύκη διαφέρουν μεταξύ των διαφορετικών ειδών και μπορεί να περιλαμβάνουν αιθανόλη, φορμικό οξύ, γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, γλυκερόλη, διοξείδιο του άνθρακα και μοριακό υδρογόνο (Catalanotti et al. 2013). Οι πληροφορίες που υπάρχουν σχετικά με την φωτοανεξάρητη ζύμωση στα χλωροφύκη προέρχονται κυρίως από το γένος Chlamydomonas. Στο Chlamydomonas το πυροσταφυλικό που προκύπτει από τον καταβολισμό ενδογενών υποστρωμάτων μπορεί να μεταβολιστεί σε ακέτυλο-συνένζυμο A είτε από το ένζυμο pyruvate: formate lyase (PFL) με την ταυτόχρονη παραγωγή φορμικού οξέος, είτε από το ένζυμο pyruvate: ferredoxin oxidoreductase (PFOR) με την ταυτόχρονη παραγωγή ακέτυλου-συνενζύμου Α και διοξειδίου του άνθρακα και τη μεταφορά ηλεκτρονίων στη φερρεδοξίνη (Catalanotti et al. 2013). Η ανηγμένη φερρεδοξίνη, σε ανοξικές συνθήκες, μπορεί να δώσει τα ηλεκτρόνια στην υδρογενάση για την παραγωγή μοριακού υδρογόνου (Catalanotti et al. 2013).



Εικόνα 6. PSII-εξαρτόμενο, PSII-ανεξάρτητο και φωτοανεξάρτητο μονοπάτι για την παραγωγή H2.

1.3.1 Υδρογενάσες.

Οι υδρογενάσες είναι μεταλλο-ένζυμα που καταλύουν την οξείδωση του μοριακού υδρογόνου: 2H⁺ + 2e⁻ \le H₂. Η αντίδραση είναι αντιστρέψιμη και εξαρτάται από το οξειδοαναγωγικό δυναμικό των υποστρωμάτων του ενζύμου. Όταν υπάρχει δέκτης ηλεκτρονίου καταναλώνουν μοριακό υδρογόνο, ενώ όταν υπάρχει δότης ηλεκτρονίου παράγουν μοριακό υδρογόνο. Οι υδρογενάσες εντοπίζονται κυρίως σε αναερόβιους προκαρυωτικούς οργανισμούς όμως έχουν βρεθεί και σε φωτοσυνθετικά μικροφύκη. Ο πρωταρχικός τους ρόλος είναι η διατήρηση των μεταβολικών οδών σε συνθήκες απουσίας οξυγόνου ώστε να διατηρείται η παραγωγή ATP και να διασφαλίζεται η επιβίωση του οργανισμού.

Οι υδρογενάσες χωρίζεται σε τρεις κύριες ομάδες με βάση τη δομή των συμπλόκων μετάλλου-θείου που σχηματίζονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Vignais 2001). Το ενεργό κέντρο μπορεί να περιέχει είτε ένα άτομο νικελίου και ένα άτομο σιδήρου ([Ni-Fe] υδρογενάσες), είτε δύο άτομα σιδήρου ([Fe-Fe] υδρογενάσες). Η τρίτη ομάδα υδρογενασών, οι λεγόμενες [Fe] υδρογενάσες, των οποίων το ενεργό κέντρο δεν περιέχει συμπλοκο μετάλλου-θείου αλλά έναν συμπαράγοντα σιδήρου, εντοπίζονται σε κάποια μεθανογενή αρχαία (Dasgupta et al. 2010).

Οι [Ni-Fe] υδρογενάσες απαντώνται σε όλες τις οικογένειες βακτηρίων και αναστέλλονται αντιστρεπτά από το οξυγόνο. Οι [Fe-Fe] υδρογενάσες, ή αλλιώς Fe-only υδρογενάσες, χαρακτηρίστηκαν αρχικά σε αναερόβια βακτήρια και πρωτόζωα, πλέον όμως γνωρίζουμε ότι απαντώνται και σε ευκαριωτικούς οργανισμούς, όπως τα χλωροφύκη *Chlamydomonas reinhardtii,Chlamydomonas moewussi, Chlamydomonas noctigama, Scenedesmus obliquus, Scenedesmus vacuolatis, Lobochlamys segnis, Chlorella fusca* (Winkler et al. 2002). Οι [Fe-Fe] υδρογενάσες αποτελούνται από μια έως τέσσερις υπομονάδες και είναι 100 φορές αποδοτικότερες από τις [Ni-Fe] υδρογενάσες, Η κατηγορία των [Fe] υδρογενασών φαίνεται να μην εμπλέκεται στην παραγωγή υδρογόνου. Καταλύουν την αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα σε μεθάνιο χρησιμοποιώντας υδρογόνο γι' αυτό και απαντώνται σε μεθανογενείς οργανισμούς (Dasgupta et al. 2010).

Ο μοναδικός τύπος υδρογενασών που έχει βρεθεί σε ευκαρυώτες είναι οι [Fe-Fe] υδρογενάσες, οι οποίες εντοπίζονται αποκλειστικά σε μεμβρανώδη οργανίδια όπως οι

χλωροπλάστες (Vignais 2007). Η έκφραση του γονιδίου της [Fe-Fe] υδρογενάσης επάγεται αποκλειστικά σε συνθήκες ανοξίας καθώς το οξυγόνο την αναστέλλει μη αντιστρεπτά.

Οι πλαστιδιακές [Fe-Fe] υδρογενάσες φαίνεται να μην έχουν προέλθει από τα κυανοβακτήρια καθώς τα τελευταία περιέχουν μόνο [Ni-Fe] υδρογενάσες. Οι [Fe-Fe] υδρογενάσες που έχουν βρεθεί στα μικροφύκη είναι μονομερείς, μεγέθους 45-50 kDa και παρουσιάζουν μια ελαφρώς διαφορετική δομή από τις υπόλοιπες [Fe-Fe] υδρογενάσες, υποδεικνύοντας ίσως έναν νέο τρόπο καταλυτικής λειτουργίας. Ενώ το καρβοξυτελικό τους άκρο, που περιέχει το καταλυτικό κέντρο, είναι αρκετά συντηρημένο και όμοιο με αυτό των υπόλοιπων [Fe-Fe] υδρογενασών, το αμινοτελικό τους άκρο είναι αρκετά μικρότερο και δεν περιέχει το σύμπλοκο F. Όμως, οι αλληλουχίες των μικροφυκών περιέχουν επιπλέον 16 έως 45 αμινοξέα τα οποία απουσιάζουν από τις βακτηριακές [Fe-Fe] υδρογενάσες. Τα επιπλέον αυτά αμινοξέα δημιουργούν μια εξωτερική θηλιά όταν η πρωτεΐνη παίρνει την τελική της στερεοδιαμόρφωση. Η θηλιά αυτή μπορεί με κάποιο τρόπο να αντικαθιστά το σύμπλοκο F, υποβοηθώντας την υδρογενάση να προσδέσει μέσω ηλεκτροστατικών δεσμών τη φερρεδοξίνη που αποτελεί τον δότη ηλεκτρονίων (Melis and Happe 2001).

Στο χλωροφύκος Scenedesmus obliquus, η πρωτεΐνη της υδρογενάσης απομονώθηκε αφού επεβλήθησαν τα κύτταρα σε ανοξικές συνθήκες. Παρουσιάζει παρόμοια δομή με τις υπόλοιπες υδρογενάσες μικροφυκών και εκφράζεται μόνο υπό ανοξικές συνθήκες. Η υδρογενάση αυτή ανήκει στις [Fe-Fe] υδρογενάσες, είναι μονομερής με υπολογιζόμενο μέγεθος 44.5 kDa, γεγονός που την καθιστά την μικρότερη υδρογενάση που έχει απομονωθεί μέχρι σήμερα. Το γονίδιο της υδρογενάσης του Scenedesmus obliquus (hydA) παρουσιάζει υψηλή συγγένεια με αυτό της Chlamydomonas reinhardtti. Το hydA γονίδιο μεταγράφεται στον πυρήνα και η πρωτεΐνη HydA μεταφέρεται μέσω ενός πεπτιδίου οδηγού στο στρώμα του χλωροπλάστη (Florin et al. 2001).

1.4 Επιδράσεις της έλειψης αζώτου.

Η έλλειψη αζώτου είναι μια σοβαρή καταπόνηση για όλους τους οργανισμούς, αφού το άζωτο είναι ένα κύριο συστατικό των πρωτεϊνών και των νουκλεικών οξέων (A. Hemschemeier et al., 2012). Το άζωτο το χρησιμοποιεί ο οργανισμός για την παραγωγή νουκλεϊκών οξέων, πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων, συστατικά που παίζουν καταλυτικό ρόλο στην ανάπτυξη του χλωροφύκους.

Οι βιοχημικές αλλαγές που προκαλούνται από την έλλειψη του αζώτου είναι η συσσώρευση λιπαρών οξέων και υδατανθράκων (Zhilaet al.,2005). Επιπρόσθετες μεταβολές αφορούν στην αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης, τη μείωση των χρωστικών και ιδιαίτερα των χλωροφυλλών (Allen et al., 1990), μείωση της φωτοσύνθεσης μέσω της απενεργοποίησης του PS II (Peltier and Schmidt,1991), μείωση της παραγωγής O₂ και της δέσμευσης CO₂ (Huang et al., 2004).

Σε καταστάσεις περιβαλλοντικού στρες, όταν τα θρεπτικά στοιχεία περιορίζονται, πάντοτε προκαλείται μια σταθερά πτωτική πορεία του ρυθμού της κυτταρικής διαίρεσης. Παραδόξως, η ενεργοβόρα βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων διατηρείται σε μερικά είδη φυκών υπό αυτές τις συνθήκες, υπό την προϋπόθεση ότι υπάρχει αρκετό φως και CO₂ διαθέσιμα για φωτοσύνθεση. Όταν η ανάπτυξη φυκών (όπως μετράται με τις κυτταρικές διαιρέσεις) επιβραδύνεται και δεν υπάρχει απαίτηση για σύνθεση νέων μεμβρανικών ενώσεων, τα κύτταρα ανταυτού μετατρέπουν τα λιπαρά οξέα σε τριακυλγλυκερόλη (TAGs).

Το άζωτο είναι το πιο κρίσιμο θρεπτικό συστατικό που επηρεάζει τον μεταβολισμό των λιπιδίων στα φύκη. Μια γενική τάση προς συσσώρευση λιπιδίων, κυρίως TAGs, ως απόκριση στην ανεπάρκεια του αζώτου παρατηρήθηκε σε πολυάριθμα είδη ή στελέχη διαφόρων μικροφυκών. Οι Hu et al (2008) διεξήγαν μελέτη σχετικά με τις αποκρίσεις πολλών χλωροφυκών, διατόμων και κυανοβακτηρίων στο στρες από το άζωτο, όπου και δείχθηκε σημαντική αύξηση παραγωγής των λιπιδίων. Στο είδος Scenedesmus sp. όταν περιορίστηκε το άζωτο ή ο φώσφορος, σημειώθηκε αύξηση λιπιδίων μέχρι και 30% και 53%, αντίστοιχα. Η έλλειψη αζώτου στα μικροφύκη δεν επηρεάζει μόνο το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, αλλά επίσης επηρεάζει και τη σύνθεση των γρωστικών (σημαντική αύξηση αναλογία στην των καροτενοειδών/χλωροφύλλες) (Εικόνα 7).

23



Εικόνα 7. Κυτταρική κατανομή του άνθρακα. Η φωτοσύνθετική μονάδα παρέχει τον φωτοσυνθετικό ρυθμό, που εκφράζεται ως η ποσότητα της απορροφηθείσας φωτονιακής ενέργειας που θα αποσβεστεί φωτοχημικά (φωτοσύνθεση) (κόμβος PE). Στη συνέχεια, ο φωτοσυνθετικός ρυθμός χρησιμοποιείται για την συντήρηση του κυττάρου (κόμβος 1). Υπό συνθήκες κορεσμένου αζώτου η φωτοσυνθετική ικανότητα χρησιμοποιείται για την παραγωγή βιομάζας και της ανάπτυξης (κόμβος 2). Υπό συνθήκες έλλειψης αζώτου ένα μέρος των διαθέσιμων φωτονίων χρησιμοποιείται για τη σύνθεση της υπόλοιπης βιομάζας (CHO), έτσι ώστε η περιεκτικότητα σε CHO να παραμένει σταθερη (κόμβος 3). Το υπόλοιπο κατανέμεται μεταξύ TAG και αμύλου (κόμβος 4). Αυτός ο διαχωρισμός της αναλογίας εξαρτάται από το κυτταρική περιεκτικότητα σε άζωτο. Τέλος, το άμυλο μετατρέπεται σε TAG, όταν η κυτταρική περιεκτικότητα σε άζωτο μειώνεται κάτω από μια κρίσιμη τιμή (κόμβος 5) (Sharma et al.2012).

Από βιοενεργητική σκοπιά, μελέτες των Work et al (2010) δείχνουν ότι η στέρηση αζώτου είναι πλεονεκτική καθώς αντιπροσωπεύει αποτελεσματικό μέσο για την οργάνωση των κυτταρικών μεταβολιτών σε δύο βασικές πρώτες ύλες βιοκαυσίμων, το άμυλο και τα TAGs. Αλλά, ως σημαντικό μειονέκτημα σημειώνεται η εξασθενημένη φωτοσύνθεση καθώς και η μείωση των συνολικών αναβολικών διεργασιών.

1.4.1 Έλλειψη αζώτου και παραγωγή τριακυλγλυκερόλης (TAGs)

Τα Μικροφύκη είναι μια πολλά υποσχόμενη πλατφόρμα για την παραγωγή ουδέτερων λιπιδίων, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία βιοκαυσίμων ή εμπορευμάτων στον τομέα των ζωοτροφών και των τροφίμων. Μια πολλά υποσχόμενη πρόταση αποτελεί το πράσινο μικροφύκος *Scenedesmus obliquus*, γιατί συσσωρεύει έως και 45% w/w τριακυλγλυκερόλη (TAG) σε συνθήκες έλλειψης αζώτου (Wang et al. 2009). Ένα μόριο τριακυλογλυκερόλης (η κύρια μορφή αποθήκευσης λιπιδίων σε ευκαρυωτικά κύτταρα) συντίθεται συνήθως από τρία διαφορετικά λιπαρά οξέα τα οποία είναι εστεροποιημένα στην 3-υδροξυλομάδα μιας γλυκερίνης. Υπό αυτές τις συνθήκες, συσσωρεύεται επιπλέον και άμυλο. Το άμυλο μπορεί να ανέλθει έως και στο 38% w/w κατά την έλλειψη αζώτου, το οποίο αποτελεί σημαντικό μέρος του συνολικού άνθρακα που παράγεται και αποθηκεύεται (Lenny de Jaeger1 et al., 2014). Γίνεται στοχευόμενη βελτιστοποίηση παραγωγής των TAGs, εμποδίζοντας το σχηματισμό του αμύλου.

Πολλά είδη μικροφυκών παράγουν σημαντικά αυξημένες ποσότητες TAGs, προϊόν-κλειδί για την παραγωγή βιοντίζελ, αποκρινόμενα σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Η βελτίωση της παραγωγής των TAG από μικροφυκη μέσω της βελτιστοποίησης των συστημάτων ανάπτυξης έχει μεγάλο ενδιαφέρον. Αυτό βασίζεται στην κατανόηση του μεταβολισμού των λιπιδίων των μικροφυκών σε σχέση με την απόκρισή τους στο στρες, ιδίως κατά τη στέρηση των θρεπτικών ουσιών που μπορούν να προκαλέσουν αυξημένη σύνθεση των TAGs. Έγινε μια λεπτομερής έρευνα για τις αλλαγές στη σύνθεση λιπιδίων στη Chlorella sp. και στο Nannochloropsis sp. σε συνθήκες στέρησης αζώτου παρέχοντας νέες γνώσεις σχετικά με το λιπιδιακό προφίλ (lipidome) κατά τη διάρκεια του στρες. Όπως ήταν αναμενόμενο, παρατηρήθηκε αύξηση στα TAGs και μείωση στα συνολικα πολικά λιπίδια. Ωστόσο, ενώ οι περισσότερες κατηγορίες μεμβρανικών λιπιδίων (φωσφογλυκερολιπίδια και γλυκολιπίδια) βρέθηκαν να μειώνονται, τα επίπεδα φωσφατιδυλογλυκερόλης (μη-αζωτούχες ενώσεις) αυξήθηκαν σημαντικά και στους δυο οργανισμούς σε σχέση με τα αρχικά χαμηλά επίπεδα(Martin et al., 2014).

Λόγω του αυξανόμενου ενδιαφέροντος για την παραγωγή ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές όπως τα μικροφύκη, ο μεταβολισμός τους για παραγωγή βιοντίζελ υποβάλλεται σε εντατικές έρευνες (Merchant et al. 2012; Liu και Benning το 2013). Όλα τα ευκαρυωτικά μικροφύκη που έχουν εξεταστεί μέχρι τώρα μπορούν να παράγουν λιπαρά είτε ως αποθήκη ενέργειας, είτε όταν υποβάλλονται σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες (Hu et al. 2008). Δεδομένου ότι τα λιπαρά είναι μακρομόρια άνθρακα και είναι μη-πολικά, αποθηκεύονται στις υδρόφοβες υποκυτταρικές δομές που ονομάζονται σταγονίδια λιπιδίων (lipid droplets, LD) ή αλλιώς φορείς λιπιδίων, λιποσώματα, ολεοσώματα (Huang 1996; Murphy 2001). Σε κύτταρα του *C. reinhardtii* που απομονώθηκαν και στερούνταν άζωτο, παρατηρήθηκε ότι τα LDs, περιείχαν 80-90% TAGs, μερικά ελεύθερα λιπαρά οξέα και γύρω στο 5-10% PLs (Wang et al. 2009; Nguyen et al. 2011). Οι λειτουργίες των LDS στα μικροφύκη εξαρτώνται από τις εκάστοτε κυτταρικές ανάγκες. Ο αριθμός τους ανά κύτταρο ποικίλει ανάλογα με την κυτταρικό τύπο, το αναπτυξιακό στάδιο και τις συνθήκες ανάπτυξης.

25

Τα βιολογικά λιπαρά είναι πρόδρομα για την παραγωγή του ντίζελ, που μπορούν να μετατραπούν σε βιοντίζελ μέσω μια απλή διαδικασίας, της μετεστεροποίησης. Τα λιπαρά οξέα που παράγονται από μικροφύκη αντιπροσωπεύουν μια πιθανή εναλλακτική λύση όχι μόνο για τα ορυκτά καύσιμα, αλλά και σε άλλα παράγωγα του πετρελαίου (πράσινη χημεία) (Li-Beissona and Peltier, 2013).

Έτσι λοιπόν, σύμφωνα με τα ανωτέρω και με βάση αποτελέσματα προηγούμενων πειραματικών μελετών του εργαστηρίου Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας, **σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας** είναι η μελέτη της βιοενεργητικής στρατηγικής βιοαποικοδόμησης της 3,4-dcp από το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* με στοχευόμενη έλλειψη αζώτου από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Με στόχο την κατανόηση του μηχανισμού της βιοαποικοδόμησης των χλωροφαινολών από το χλωροφύκος, καθώς αυτό βρίσκεται σε στρες υπό έλλειψη πηγής αζώτου, αλλά και την κατανόηση των διαφόρων μονοπατιών που ενεργοποιεί ο οργανισμός αυτός ώστε να ανταπεξέλθει στο συγκεκριμένο στρες.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Οργανισμός

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus*. Είναι ένας μονοκύτταρος ευκαρυωτικός οργανισμός μήκους περίπου 5-10 μm με ελλειψοειδή μορφή κυττάρων (Εικ.8). Ο κύκλος ζωής του διαρκεί γύρω στις 20 ώρες. Στη διάρκεια αυτή, διαιρείται μια φορά δίνοντας 4-8 θυγατρικά κύτταρα, τα οποία μόλις σχηματιστούν πλήρως, συνήθως αποκόπτονται μεταξύ τους. Εξελικτικά βρίσκεται πολύ κοντά στα άλλα δυο γνωστά στο ερευνητικό πεδίο φύκη, τη Χλαμυδομονάδα (*Chlamydomonas*) και τη Χλωρέλλα (*Chlorella*).

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



10μm Εικόνα 8.Κύτταρα Scenedesmus obliquus σε οπτικό μικροσκόπιο.

Πρόκειται για φωτοσυνθετικό μικροοργανισμό, που παράγει οξυγόνο κατά τη φωτοσύνθεσή του. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά της φωτοσυνθετικής του δραστηριότητας μοιάζει με τα γυμνόσπερμα φυτά. Έχει την ικανότητα βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης και στο σκοτάδι, όπως και στο φως. Δηλαδή, ακόμα και σε ετερότροφες συνθήκες έχει διαμορφωμένους χλωροπλάστες και ενεργά φωτοσυστήματα Ι και ΙΙ, εφ' όσον του παρέχεται κάποια πηγή οργανικού άνθρακα στο θρεπτικό μέσο.

2.2 Συνθήκες ανάπτυξης

Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε ενυδρείο σταθερής θερμοκρασίας 30°C, μπροστά από λάμπες λευκού φωτισμού με ένταση 200 μmol m⁻²s⁻¹ (Εικ. 9) Η ανάπτυξη των

οργανισμών έγινε σε επιμήκεις γυάλινους σωλήνες (διαμέτρου 5cm και ύψους 50cm) με ειδικό στόμιο στο κάτω μέρος του σωλήνα, που επιτρέπει τον αερισμό της καλλιέργειας. Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε αυτές τις συνθήκες για 4 μέρες, έπειτα ανακαλλιεργήθηκαν προσθέτοντας νέο μέσο καλλιέργειας (Bishop and Senger, 1971) (Πίνακας 1) και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν ως μητρική καλλιέργεια για τη διεξαγωγή του εκάστοτε πειράματος.



Εικόνα 9.Σύστημα προκαλλιέργειας του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus.

Όλα τα πειράματα έλαβαν χώρα σε ερμητικά κλειστά μπουκαλάκια με septa, των 125 mL (Εικ.10). Η δειγματοληψία γινόταν καθημερινά την ίδια ώρα με αποστειρωμένες σύριγγες, ενώ η διάρκεια διεξαγωγής του κάθε πειράματος ήταν 5 ημέρες. Η διάρκεια των 5 ημερών επιλέχθηκε ως η ιδανικότερη για την αποφυγή του προβλήματος της έλλειψης θρεπτικών, μετά από προκαταρκτικά πειράματα αναφορικά με την καμπύλη ανάπτυξης του χλωροφύκους στις συγκεκριμένες συνθήκες.



Εικόνα 10. Μπουκαλάκια των 125 mL, με καλλιέγεια του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus, ερμητικά κλειστά με septa.

Ο τελικός όγκος της καλλιέργειας στο κάθε μπουκάλι ήταν 50 mL ενώ ο υπόλοιπος όγκος αποτελούνταν απο αέρα στην αρχή κάθε πειράματος. Η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων ήταν 1μL PCV (Packed Cell Vollume–Όγκος

πακεταρισμένων κυττάρων) ανά mL καλλιέργειας, ενώ η τελική συγκέντρωση της φαινολικής ένωσης στο μπουκάλι ήταν 0,15 mM. Σημειώνεται ότι η φαινολική ένωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν διαλυμένες σε μεθανόλη, η ίδια μικροποσότητα της μεθανόλης προστέθηκε και στις καλλιέργειες του μάρτυρα, ώστε να είναι απολύτως συγκρίσιμα τα αποτελέσματα. Τα μπουκαλάκια αυτά βρίσκονταν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (30°C), ενώ το φως που έφτανε στην επιφάνεια της καλλιέργειας ήταν 50-60 μmol m⁻²s⁻¹. Κατά τη διενέργεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο των Bishop and Senger (1971) εμπλουτισμένο με 5gr γλυκόζης ανά λίτρο θρεπτικού.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (g/L)	Πεοιεκτικότητα (σε Μ)	Πεοιεκτικότητα (σε
	····· (g.2)	Πλήρες θρεπτικό	Μ) θρεπτικό -Ν
KCl	0,6	-	8*10^-3
CaCl2 x 2H2O	0,015	1*10^-4	1*10^-4
KNO3	0,81	8*10^-3	-
MgSO4 x7H2O	0,25	1*10^-3	1*10^-3
NaCl	0,47	8*10^-3	8*10^-3
Na2HPO4 x2H2O	0,14	9.86*10^-4	9.86*10^-4
NaH2PO4 x1H2O	0,36	3*10^-3	3*10^-3
Fe2(SO4)3 x7H2O	3,9	1*10^-5	1*10^-5
Fe(III)citrate	0,24	9.8*10^-4	9.8*10^-4
НЗВОЗ	2,8	4.5*10^-2	4.5*10^-2
MnCl2 x4H2O	0,0016	8*10^-3	8*10^-3
ZnSO4 x7H2O	0,2	7*10^-4	7*10^-4
CuSO4 x5H2O	0,075	3*10^-4	3*10^-4
MoO3 (85%-99.5%)	0,014	1*10^-4	1*10^-4

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

Στη διάρκεια της παρούσας εργασίας δοκιμάστηκαν 4 διαφορετικοί χειρισμοί. Ο πρώτος (Control) αναφέρεται στην καλλιέργεια μάρτυρα. Ο δεύτερος στην καλλιέργεια όπου υπάρχει έλλειψη αζώτου από το θρεπτικό μέσο ("-N"). Ο τρίτος ("dcp") αφορά την καλλιέργεια στην οποία έχει γίνει προσθήκη 0,15mM 3,4-διχλωροφαινόλης και ο τέταρτος χειρισμός ("dcp-N") αφορά τη συνδυασμένη παρουσία της 3,4-διχλωροφαινόλης με την απουσία πηγής αζώτου στο μέσο καλλιέργειας.

Για την προετοιμασία των καλλιεργειών για τους "-N" "dcp-N" χειρισμούς, δείγματα από τις μητρικές καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν στα 1300g για 2min και το ίζημα (κύτταρα) επαναδυαλήθηκε σε "-N" θρεπτικό μέσο (βλέπε Πίνακα 1). Πρέπει να σημειωθεί ότι οι δύο αυτοί χειρισμοί αφορούν κύτταρα που αναπτύσσονται σε θρεπτικό που δεν περιέχει άζωτο και το μόνο άζωτο που έχουν στη διάθεση τους, κατά την έναρξη της καλλιέργειας, είναι τα κυτταρικά τους αποθέματα σε άζωτο.

2.3 Υπολογισμός κυτταρικής συγκέντρωσης

Δείγματα των 5 mL από τις καλλιέργειες των φυκών φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά σε 1500g προκειμένου να καθιζήσουν σε βαθμονομημένο τριχοειδή υαλοσωλήνα (Logothetis et al., 2004). Η εκτίμηση της κυτταρικής συγκέντρωσης παρουσιάζεται ως όγκος καθιζαμένων κυττάρων (Packed Cell Volume: PCV) ανά mL καλλιέργειας (μL PCV/mL καλλιέργειας). Ως εναλλακτικός τρόπος μέτρησης της κυτταρικής πυκνότητας – εξοικονόμηση ποσότητας δείγματος και χρόνου για χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική καταγραφή της θολερότητας του μέσου καλλιέργειας στα 550 nm (Φωτόμετρο UV/VIS Ocean Optics, USB4000) (Dellagreca et al. 2001), ενώ παράλληλα συσχετίστηκαν οι δύο τρόποι εκτίμησης της κυτταρικής συγκέντρωσης με βάση την ακόλουθη καμπύλη αναφοράς: PCV (μ L/mL) = 2,7733 · A_{550nm} , R² = 0,9973.

2.4 Αναλύσεις της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού με τη χρήση επαγωγικού φθορισμού

Μόνο ένα μέρος της ενέργειας που απορροφάται από τις χρωστικές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού χρησιμοποιείται για τη φωτοχημεία της φωτοσύνθεσης. Το υπόλοιπο εκπέμπεται είτε ως θερμότητα είτε ως φθορισμός. Η επαγωγή του φθορισμού από φωτοσυνθετικούς οργανισμούς παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τους Kautsky and Hirsch (1931). Η επαγωγή του φθορισμού από τα φυτικούς οργανισμούς πραγματοποιείται σε δύο φάσεις, εκ των οποίων η πρώτη είναι ταχεία και η δεύτερη αργή. Σήμερα, η μελέτη της καμπύλης του επαγωγικού φθορισμού –ιδιαίτερα της ταχείας φάσης έχει εξελιχθεί σε πολύτιμο ερευνητικό μέσο για τη μελέτη της μοριακής δομής και λειτουργίας, αλλά και της απόδοσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Βάσει της μεθόδου των Strasser and Strasser (1995), μπορεί να εκτιμηθεί, εκτός των άλλων, το μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυνθετικής κεραίας, η πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης και μια σειρά από παραμέτρους, που αφορούν τη δομή και τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Πίνακας 2).

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



Εικόνα 11. Τυπική καμπύλη επαγωγικού φθορισμού.

Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού έγιναν με τη φορητή συσκευή Plant Efficiency Analyser (Handy PEA, Hansatech Instruments) και ακολούθησε επεξεργασία των δεδομένων με χρήση εξειδικευμένου λογισμικού εφαρμογής του JIP-test (Biolyzer HP 4.0), σύμφωνα με τη μέθοδο των Strasser and Strasser (1995). Όλες οι μετρήσεις έγιναν σε δείγματα καλλιεργειών όγκου 1 mL, τα οποία προτού διεγερθούν είχαν παραμείνει στο σκοτάδι για 10 min, προκειμένου να «αδειάσουν» τα κέντρα αντίδρασης από ηλεκτρόνια. Από τις μετρήσεις υπολογίστηκε ο λόγος Fv/Fm, που συνδέεται άμεσα με τη φωτοσυνθετική απόδοση (Strasser and Strasser, 1995). Επίσης με εφαρμογή του JIP-test για τιμές φθορισμού, που αντιστοιχούν σε καθορισμένα στάδια [J, I και P] (Εικ.11) υπολογίστηκαν τα επιμέρους χαρακτηριστικά του φωτοσυνθετικού μηχανισμού: λόγος ABS/RC, που συνδέεται με το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PS II, ο λόγος RC/CSo, που συνδέεται με την ενέργεια που χάνεται με τη μορφή θερμότητας και ο λόγος RC/CSo, που συνδέεται με την πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης του PS ΙΙ καθώς και το PI_{ABS} που εκφράζει τις επιδόσεις ανά απορροφώμενη φωτονιακή ενέργεια (Πίνακας 2). Η μέθοδος βασίζεται σε μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού με ανάλυση 10 μs σε χρονικό διάστημα 1 δευτερολέπτου. Ο φθορισμός μετρήθηκε με 12-bit ανάλυση και η διέγερση έγινε από 3 διόδους φωτισμού (LEDs) με ένταση ακτινοβολίας μέχρι 3000 μmol m⁻²s⁻¹ ερυθρού φωτός (650nm). Η μελέτη της κατάστασης ισορροπίας έγινε με τη βοήθεια πάλι του επαγωγικού φθορισμού χρησιμοποιώντας κατάλληλο πρωτόκολλο στο Handy-PEA που επιτρέπει τον προσδιορισμό της λειτουργικής κβαντικής απόδοσης του PSII (ΦPSII). Το δείγμα διεγειρόταν με 12 παλμούς κορεσμένου φωτός (3000 μmol m⁻²s⁻¹) διάρκειας ενός δευτερολέπτου ο καθένας. Το διάστημα που μεσολαβούσε ανάμεσα στους παλμούς είναι 40s. Για τους πρώτους οχτώ παλμούς υπήρχε ταυτόχρονα διαρκές ακτινικό φως εντάσεως 500 μmol m⁻²s⁻¹.

Παράμετροι JIP-test	
Fo	Ελάχιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί σε «ανοιχτά» κέντρα (open PSII RCs, t = 0)
Fm	Μέγιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί στο χρόνο όπου όλα τα κέντρα είναι «κλειστά» (closed PSII RCs, t = tFm)
Fv	Μεταβλητή τιμή φθορισμού τη χρονική στιγμή t
$\mathbf{F}\mathbf{v} = \mathbf{F}\mathbf{m} - \mathbf{F}\mathbf{o}$	Μέγιστη τιμή μεταβλητής τιμής φθορισμού
Vt = (Ft - Fo)(Fm - Fo)	Σχετική μεταβολή φθορισμού τη χρονική στιγμή t
VJ = (FJ - Fo)(Fm - Fo)	Σχετική μεταβολή φθορισμού στο βήμα J
$Mo = (\Delta V / \Delta t)o = = 4(F300 \ \mu s - Fo)/(Fm - Fo)$	Αρχική κλίση σε ms της καμπύλης V = f(t)
Sm = (Area)/(Fm - Fo)	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης ΟJIP (Area), ομαλοποιούμενο ως προς Fv (αποτελεί μέτρο του αριθμού των οξειδοαναγωγικών κύκλων της QA)
Ss = VJ/Mo	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης ΟJIP που αντιστοιχεί μόνο στην ΟJ φάση (διάστημα όπου η QA των RC ανάγεται μία φορά)
N = Sm/Ss = SmMo(1/VJ)	Μέτρο αριθμού κύκλων αναγωγής της QA στο διάστημα tFm

in ana 21 Daomoy napaporpor 100 on 120	Πίνακας 2	2. Βασικές	παράμετροι	του JIP-1	TEST
--	-----------	------------	------------	-----------	------

Ειδικές ροες ενεργείας (ανά κεντρο που ανάγει QA)			
$ABS/RC = Mo (1/VJ)(1/\Phi Po)$	Μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας		
TRo/RC = Mo (1/VJ)	Ενέργεια που παγιδεύεται ανά κέντρο αντίδρασης (για t = 0)		
$\mathbf{ETo}/\mathbf{RC} = \mathbf{Mo} \ (1/\mathbf{VJ}) \mathbf{\Psi o}$	Ροή ηλεκτρονίων ανά κέντρο αντίδρασης (για t = 0)		
DIo/RC = (ABS/RC) - (TRo/RC)	Διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης (για t = 0)		

Αποδόσεις ή	λόγοι επι	ιμέρους ροών	
-------------	-----------	--------------	--

$\Phi Po = TRo/ABS = [1-(Fo/Fm)]$	Μέγιστη κβαντική απόδοση της πρωτογενούς φωτοχημείας (για t = 0)
$\Psi o = ETo/TRo = 1 - VJ$	Πιθανότητα να προκαλέσει μια διέγερση (exciton) τη μετακίνηση ενός ηλεκτρονίου κατά μήκος της αλυσίδας πέρα από την QA (για t = 0)
$\Phi Eo = ETo/ABS = [1-(Fo/Fm)]\Psi o$	Κβαντική απόδοση της μεταφοράς ηλεκτρονίων(για t = 0)
$\Phi Do = 1 - \Phi Po = Fo/Fm$	Κβαντική απόδοση της διάχυσης ηλεκτρονίων (για t=0)

Εκτιμώμενες ροές ενέργειας ανά διεγερμένη περιοχή			
ABS/CSo	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το Fo		
ABS/CSm	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το Fm		
$TRo/CSo = \Phi Po(ABS/CSo)$	Παγιδευμένη ενέργεια ανά διεγερόμενη περιοχή της μεμβράνης (για t = 0)		
$ETo/CSo = \Phi Eo(ABS/CSo)$	Ροή ηλεκτρονίων ανά περιοχή διέγερσης (για t = 0)		
$\mathbf{DIo}/\mathbf{CSo} = (\mathbf{ABS}/\mathbf{CSo}) - (\mathbf{TR}_0/\mathbf{CS}_0)$	Διαχεόμενη ενέργεια ανά περιοχή διέγερσης (για t = 0)		

Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης	
RC/CS _o	Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης

Δείκτες επίδοσης	
$\mathbf{PI}_{ABS} = (\mathbf{RC}/\mathbf{ABS}) \ (\mathbf{\Phi Po}/1 - \mathbf{\Phi Po})(\mathbf{\Psi o}/1 - \mathbf{\Psi o})$	Δείκτης επίδόσης ανά απορροφώμενη ενέργεια
$PI_{CS0} = (RC/CS0) (ΦP0/1-ΦP0)(Ψ0/1-Ψ0)$	Δείκτης επίδόσης ανά περιοχή διέγερσης (t = 0)
$\mathbf{PI}_{\mathrm{CSm}} = (\mathbf{RC}/\mathbf{CSm}) \ (\mathbf{\Phi Po}/1 \cdot \mathbf{\Phi Po})(\mathbf{\Psi o}/1 \cdot \mathbf{\Psi o})$	Δείκτης επίδόσης ανά περιοχή διέγερσης (t = tFm)
$\mathbf{SFI}_{abs} = (1 - \mathbf{\Phi} \mathbf{P} 0)(1 - \mathbf{\Psi} 0)$	Δείκτης λειτουργικότητας
Ικανότητα παραγωγής έργου	
$\mathbf{DF}_{ABS} = \log(\mathbf{PI}_{ABS})$	Εκτιμώμενη παραγωγή έργου ανά απορροφώμενη ενέργεια

2.5 Εκχύλιση πρωτεϊνών – Ποσοτική ανάλυση πρωτεϊνών –
Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός

Για την εκχύλιση ολικών πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των καλλιεργειών για 5min στα 1500g και τοποθετήθηκαν στο λυοφιλοποιητή για να αφαιρεθεί κάθε ίχνος υγρασίας. Τα κύτταρα στη συνέχεια ομογενοποιήθηκαν με υγρό άζωτο ώστε να επιτευχθεί η ρήξη των κυττάρων και έπειτα προστέθηκε η απαιτούμενη ποσότητα από το διάλυμα A [200 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 200 mM NaCl, 200 mM MgCl₂, 0,5 mM PMSF, 5 mM DDT, 10 μM Leupeptin, 10% (v/v) γλυκερόλη, 0,25% Triton X- 100 και ελάχιστη ποσότητα του διαλύματος A για κάθε 500 μL PCV). Τα δείγματα αφού επαναδιαλυθούν στην απαιτούμενη ποσότητα του διαλύματος A, αφήνονται overnight στους 4°C. Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται για 30min στα 18000g σε θερμοκρασία 4°C και γίνεται συλλογή του υπερκείμενου.

Για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Lowry et al. (1951). Συγκεκριμένα, 10 μL πρωτεϊνικού εκχυλίσματος κατακρημνίσθηκαν με την προσθήκη ίσου όγκου 20% (v/v) TCA και την παραμονή των δειγμάτων στους 4°C για τουλάχιστον 30 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 min στα 17000 g, απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος με προσθήκη 100 μL διαλύματος A [10 g Na₂CO₃, 0,1 g K-Na Tartrate, 2 g NaOH ανά 500 mL νερού]. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 1 ml διαλύματος Γ [10 mL A και 0,2 mL B [0,5 g CuSO₄.5H₂O ανά 100 mL νερού] και γίνεται επώαση για 10min. Κατόπιν, προστέθηκαν 100 μL διαλύματος Δ το οποίο περιείχε το αντιδραστήριο φαινόλης Folin Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Germany) αραιωμένο 1:1 (v/v) με dH₂O. Τα δείγματα επωάστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 min και φωτομετρήθηκαν στα 625 nm. Λαμβάνοντας υπ' όψη την οπτική πυκνότητα ποσοτικοποιήθηκαν, βάσει πρότυπης καμπύλης κατασκευασμένης με bovine serum albumin (BSA). Ως αρνητικό πείραμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε δείγμα χωρίς πρωτεΐνες.

Η σχετική συγκέντρωση των πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε με χρώση πηκτώματος SDS-PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) με Coomasie brilliant blue R-250. Οι πρωτεΐνες αναμίχθηκαν με sample buffer, σε αναλογία 1:6 αντίστοιχα, (sample buffer: 25 mL από 20% (v/v) SDS, 13 mL Tris/HCl 1M pH 6,8, 0,24 g bromphenol blue και συμπληρώνεται με γλυκερόλη μέχρι τα 50 mL) στο οποίο έχει προστεθεί η απαιτούμενη ποσότητα σε μερκαπτοαιθανόλη λίγο πριν τη χρήση του (7 μL μερκαπτοαιθανόλη για κάθε mL sample buffer) (Mattoo et al. 1981). Ακολούθως τα δείγματα βράζονται για 5 min, ενώ μετά τοποθετούνται απευθείας σε πάγο.

Πήκτωμα 10% ακρυλαμίδης φορτώθηκε σύμφωνα με την προσδιορισμένη συγκέντρωση πρωτεϊνών μέσω της μεθόδου Lowry, ώστε για όλα τα δείγματα να φορτωθεί θεωρητικά ίση ποσότητα πρωτεΐνης. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πεδίο 80 mV για την πηκτή συγκέντρωσης [stacking gel 4% - 4,5 mL dH₂O, 1,85 mL upper tris (6,06 g Trisma base pH 6,8 με πυκνό HCl), 1 mL Acrylamide:Bis (58,4 g acrylamide και 1,6 g bis σε 200 mL dH₂O), 26 μL ammonium persulfate 10% (v/v), 11 μL TEMED] και 120 mV για την πηκτή διαχωρισμού [resolving gel 10% - 5,9 mL dH₂O, 3,75 mL lower tris (36,3 g Trisma base pH 8,8 με πυκνό HCl), 5 mL Acrylamide:Bis (58,4 g acrylamide και 1,6 g bis σε 200 mL dH₂O), 0,29 mL γλυκερόλη 50% (v/v), 64 μ L ammonium persulfate 10% (v/v), 5 μL TEMED]. Η πηκτή, μετά τη λήξη της ηλεκτροφόρησης, τοποθετήθηκε σε διάλυμα Coomasie brilliant blue R-250 (διάλυμα 50 % μεθανόλης, 10 % οξικό οξύ, 40% dH₂O και 2,5g Coomasie brilliant blue R-250) με ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 min και ακολούθησε αποχρωματισμός με διάλυμα 50% (v/v) μεθανόλης, 10% οξικού οξέος και 40% dH₂O (v/v). Το πήκτωμα ξεπλύθηκε με dH2O και φωτογραφήθηκε με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή κάνοντας χρήση του λογισμικού Kodak Digital Science v1.9.

2.6 Ανοσοεντοπισμός – western blot χλωροπλαστικών (PSaA, D1, Cytf, PTOX, Rubisco, Hydrogenase) και μιτοχονδριακών (COX, AOX) πρωτεϊνών

Τα εκχυλίσματα ολικών πρωτεϊνών διαχωρίστηκαν με 12% SDS-PAGE, όπως ακριβώς περιγράφηκε παραπάνω. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν ηλεκροφορητικά (western blot) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Porablot, 0,45 μm, Machelrey-Nagel GmbH&Co.KG.Duren) (Towbin et al., 1979). Το διάλυμα μεταφοράς περιείχε 3 g Trisma base και 14,4 g γλυκίνης ανά λίτρο dH₂O. Η μεταφορά έγινε στα 80V για 1 h. Τα αντισώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ήταν εναντίον της πρωτεΐνης PSaA, που εδράζεται στο κέντρο αντίδρασης του PS I, της πρωτεΐνης D1, που εδράζεται στο κέντρο αντίδρασης του PS II, του κυτοχρώματος f (Cytf), της πλαστιδιακής τελικής οξειδάσης PTOX, κεντρικό ένζυμο της χλωροαναπνοής, της κυτοχρωμικής οξειδάσης COX και της εναλλακτικής οξειδάσης AOX που εδράζεται στα μιτοχόνδρια. Τα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν στην καταλληλότερη για την κάθε περίπτωση αραίωση, η οποία βρέθηκε μετά από προκαταρκτικές δοκιμές του εκάστοτε αντισώματος σε διάφορες αραιώσεις. Για την πραγματοποίηση των western blots ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της Agrisera σύμφωνα με το οποίο οι μεμβράνες αρχικά βρέχονται για 10 min σε PBS (8g NaCl, 0,2g KH₂PO₄, 1,15g Na₂HPO₄, 0,2g KCl, pH 7,4 με HCl σε 1 λίτρο dH₂O). Ακολουθεί blocking για 1h με 4% σκόνη γάλακτος σε PBS-T (διάλυμα PBS με 0,05% Tween 20) και πλυσίματα 2x10 min σε PBS-T και 2x5 min με PBS, πριν γίνει επώαση στο αντίσωμα για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν πλυσίματα 2x10 min PBS-T και 2x5 min με PBS, ώστε να αποφευχθούν τυχόν αλληλεπιδράσεις του Tween με τα διαλύματα ECL τα οποία προστίθενται ακολούθως, αφού στεγνώσει ελαφρά η μεμβράνη που θα προκαλούσαν έντονο background στην εμφάνιση του φιλμ, που θα ακολουθήσει. Οι πρωτεϊνικές ζώνες που προέκυψαν από το western blot ποσοτικοποιήθηκαν με image J και εκφράστηκαν ως ποσοστό συγκριτικά με την ένταση της ζώνης του εκάστοτε μάρτυρα.

2.7 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση φαινολικών ενώσεων με HPLC

Τα δείγματα καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στα 1500 g (Heraeus SEPATECH, Biofuge 13), με απώτερο σκοπό την καθίζηση των κυττάρων, ενώ το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιήθηκε για την ποιοτική και την ποσοτική ανάλυση των φαινολικών ενώσεων με την χρήση ενός diode array – narrow bore – HPLC συστήματος (Shimadzu, SPD-M10A, VP).

Για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε μία narrow bore χρωματογραφική στήλη (Hewlett Packard, 2.1X200 mm, C-18 Hypersil, 5 μm particle size). Για το διαχωρισμό της 3,4-dcp χρησιμοποιήθηκε διαλύτης έκλουσης, ο οποίος περιείχε υπερκάθαρο νερό (H2O), μεθανόλη (CH3OH) και οξικό οξύ (CH3COOH) σε αναλογία όγκων 49:50:1 αντίστοιχα, σταθερή ροή 0,2 mL/min θερμοκρασία uε και διαχωρισμού τους 25°C (Lovell et al., 2002). Η ποιοτική ανάλυση έγινε βάσει του φάσματος απορρόφησης των επιμέρους μεγίστων του HPLC-προφίλ, ενώ η ποσοτική εκτίμηση έγινε με την βοήθεια γνωστών συγκεντρώσεων 3,4-dcp.

2.8 Απομόνωση, ποιοτικός χαρακτηρισμός και ποσοτική ανάλυση ΑΤΡ και ADP με HPLC

Περίπου 0,2g φυγοκεντρημένων κυττάρων (1500g για 5min) κονιοτροποιήθηκαν σε υγρό άζωτο. Ο κονιορτοποιημένος ιστός αναμείχθηκε με 1 mL 2,5% (v/v) TCA. Ακολουθεί ανάδευση, παραμονή στον πάγο για 20min και φυγοκέντρηση στα 15000g για 20 λεπτά στους 40 C. Το υπερκείμενο συλλέγεται και αποθηκεύεται στην κατάψυξη για την αποφυγή αλληλομετατροπής του ATP σε ADP και ακολούθως σε AMP (Rappaport et al., 1999). Από τα εκχυλισμένα δείγματα παίρνουμε 20 μL και τα αραιώνουμε με 380 μL Tris-Cl σε pH 7,1. Για την ποιοτική και την ποσοτική ανάλυση των ποσοτήτων των ATP και ADP έγινε χρήση ενός diode array – narrow bore – HPLC συστήματος (Shimadzu, SPD-M10A, VP), ενώ για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε μία χρωματογραφική στήλη (Hewlett Packard, 4.6 x 250 mm, C-18 Hypersil, 5 μm particle size). Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν A: ακετονιτρίλιο ACN και B: buffer φωσφορικών (pH 7,0, 60 mM K₂HPO₄ και 40 mM KH₂PO₄) ακολουθώντας την παρακάτω κλίση έκλουσης: 0 min, 100% B, 4 min, 98% B, 5 min, 97% B, 8 min, 96% B, 15 min, 96% B, 15.01 min, 100% B, με σταθερή ροή και θερμοκρασία διαχωρισμού 25°C. Η κλίση που περιγράφηκε παραπάνω για τον διαχωρισμό των ATP και ADP προέρχεται από τα πρωτόκολλα της Kromasil 13. Η ποιοτική ανάλυση έγινε βάσει του φάσματος απορρόφησης των επιμέρους μεγίστων του HPLC-προφίλ, ενώ η ποσοτική εκτίμηση έγινε με την βοήθεια γνωστών συγκεντρώσεων ATP και ADP (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO).

2.9 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση υδρογόνου (H₂) και οξυγόνου (O₂) με Αέρια Χρωματογραφία Θερμικής Αγωγιμότητας (GC-TCD)

Για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του οξυγόνου και του παραγόμενου υδρογόνου χρησιμοποιήθηκε Αέρια Χρωματογραφία Θερμικής Αγωγιμότητας GC-TCD (Shimadzu GC 2010 Plus, Kyoto, Japan)(Εικόνα 13), με φέρον αέριο Αργό (5bar Πίεση - 23.5 mL min⁻¹). 1mL αέριου δείγματος εγχεόταν στην GC-TCD μέσω αυτόματου δειγματολήπτη, όπου και ο διαχωρισμός του H₂ και του O₂ γινόταν με βάση τη θερμική αγωγιμότητα των αερίων. Η θερμική αγωγικόμητα του Αργού είναι 0.0001772 Wcm K⁻¹, του Οξυγόνου 0.0002674 W cm K⁻¹ και του Υδρογόνου 0.001815 W cm K⁻¹. Για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε μια τριχοειδής στήλη μήκους 30 m, διαμέτρου 0,53 mm



και πάχους 20 μm (Vici Metronics MC Poulsbo,USA) με τη θερμοκρασία του φούρνου στους 120°C. Η θερμοκρασία του TCD ανιχνευτή ήταν 200°C και του σημείου εισόδου της ένεσης ήταν 180°C. Η ποσοτικοποίηση των H₂ και O₂ έγινε χρησιμοποιώντας καμπύλη αναφοράς για γνωστές ποσότητες των αερίων.

Εικόνα 13. Αέριος Χρωματογράφος Θερμικής Αγωγιμότητας GC-TCD.

2.10 Λυοφιλοποίηση κυττάρων

Η λυοφιλοποίηση των κυττάρων για τον υπολογισμό του ξηρού βάρους, αλλά και για την περαιτέρω χρήση τους για την εκχύλιση των λιπαρών ουσιών, μετά από φυγοκέντρηση των καλλιεργειών λάμβανε χώρα σε λυοφιλοποιητή (Heto, MAXI dry lyo) για 10-12 ώρες (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Speedvac (Heto, MAXI dry lyo)

2.11 Εκχύλιση λιπαρών

Για την εκχύλιση των λιπαρών οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν (5min στα 1500g) και στην συνέχεια λυοφιλοποιήθηκαν για περίπου 10 με 12 ώρες. Το ξηρό βάρος κάθε δείγματος ζυγίστηκε και προστέθηκαν οι ανάλογες ποσότητες χλωροφορμίου και μεθανόλης με αναλογία 2:1 (για κάθε 1g ξηρής βιομάζας προστέθηκαν 14 mL χλωροφόρμιο και 7mL μεθανόλη). Μετά την προσθήκη των διαλυτών το κάθε δείγμα ομογενοποιήθηκε με την γρήση ειδικού μίζερ (Ultra Turrax T25, IKA Labortechinik) για 1,5 λεπτό. Το ομογενοποιημένο δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 5min στις 1500g και κρατήθηκε το υπερκείμενο και σο ίζημα προστέθηκε ξανά η ίδια ποσότητα CHCl3 και CH₃OH που είχε υπολογιστεί αρχικά για το κάθε δείγμα. Ακολούθως τοποθετήθηκε για 20min σε υπέρηχους για καλύτερο σπάσιμο των κυττάρων. Από την φυγοκέντρηση που ακολούθησε (5min στα 1500g) συλλέχθηκε το υπερκείμενο. Στη συνέχεια προστίθεται για τρίτη φορά στο ίζημα ίδια ποσότητα n CHCl₃ και CH₃OH και αφήνεται σε συνεχή ανάδευση για 20min, μετά φυγοκεντρήθηκε για 5 min στις 1500g και κρατήθηκε το υπερκείμενο. Μετά το τέλος της διαδικασίας τα υπερκείμενα που έχουν κρατηθεί (μετά από κάθε φυγοκέντριση) από κάθε δείγμα τοποθετούνται σε μια διαχωριστική χοάνη και με την προσθήκη NaCl 1% (v/w) και



υπάρχει διαχωρισμός φάσεων. Η κάτω φάση που περιλαμβάνει τα λιπαρά διαλυμένα στο χλωροφόρμιο συλλέγεται προσεκτικά και οδηγείται για εξάτμιση. Η εξάτμιση έγινε σε περιστρεφόμενο αποστακτήρα της BUCHI παρουσία κενού και σε θερμοκρασία υδατόλουτρου 70°C, ενώ το σύστημα ψύξης λειτουργούσε με νερό σε θερμοκρασία δωματίου (Εικόνα 15).

Εικόνα 15. Περιστρεφόμενος αποστακτήρας της BUCHI.

2.12 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση χλωροφυλλών

Συγκεκριμένη ποσότητα καλλιέργειας (2mL) φυγοκεντρείται για 5min(ή 3min) σε 1500g. Συλλέγεται το ίζημα και απορρίπτεται το υπεκέιμενο (θρεπτικό). Απο το σημείο αυτό και έπειτα εργαζόμαστε με green light για να αποφευχθεί η οξείδωση των χλωροφυλλών. Προστίθεται CH₃OH στο δείγμα (2-5mL), ακολουθεί ανάδευση και εκχύλιση στους 70°C. Φυγοκεντρούνται τα δείγματα για 3min σε 1500g. Συλλέγεται το υπερκείμενο και επανεκχυλίζεται το ίζημα (προηγούμενα δύο βήματα) έως ότου αποχρωματιστεί και γίνει άσπρο. Αφού τελειώσουν όλες οι εκχυλίσεις ογκομετρείται η CH₃OH με τις χλωροφύλλες που συλλέχθησαν. Η ποσοτικοποίηση των χλωροφυλλών γίνεται φασματοφωτομετρικά με βάση τις εξισώσεις των Holden (1976):

Oλική Chl (μ g/mL) = 25,5 x A650+4 x A665.

Chl a (μ g/mL) = 16,5 x A665 - 8,3 x A650.

Chl b (μ g/mL) = 33,8 x A650 - 12,5 x A665

2.13 Καταγραφή λιπαρών σταγονιδίων

Για την καταγραφή των λιπαρών σταγονιδίων χρησιμοποιήθηκε το Lipid Droplets Fluorescence Assay Kit, Cayman, Item No.500001. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι οτι ο πράσινος φθορισμός της Nile red χρωστικής είναι πολύ ευαίσθητος και ειδικός για τα lipid droplets. Σε ποικίλους τύπους κυττάρων, οι διαφορές στη βιογένεση των lipid droplets μπορούν να μετρηθούν και ποιοτικά και ποσοτικά με μικροσκόπιο φθορισμού ή με κυτταρομετρία ροής και φασματοφωτόμετρο φθορισμού. Στο φασματοφωτόμετρο φθορισμού μετράται ο φθορισμός των lipid droplets σε excitation/emission 475/510-600nm. Επιπλέον στο μικροσκόπιο φθορισμού παρατηρούνται τα lipid droplets στο 20X (excitation/emission 475/510-600) όπου βάφονται πράσινα.

2.14 Εκχύλιση και ποσοτικοποίηση αμύλου

Για την ποσοτικοποίηση του αμύλου χρησιμοποιήθηκε το Starch Assay Kit (Catalog No. KA0862, Abnova). Με την παρούσα μέθοδο, το άμυλο υδρολύεται σε γλυκόζη η οποία οξειδώνεται για να δημιουργήσει χρώμα (λmax = 570 nm) και φθορισμού (Ex/Em= 535/587 nm). Η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει άμυλο απο 0,0004 έως 2 mg / mL.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η βιοαποικοδόμηση φαινολών από το μονοκύτταρο χλωροφύκος Scenedesmus obliquus έχει μελετηθεί σε προηγούμενες ερευνητικές εργασίες που διεξήχθησαν στο εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας (Papazi and Kotzabasis 2007; Papazi et al., 2012). Η παρουσία των dcps στο μέσο καλλιέργειας του χλωροφύκους που αναπτύσσεται σε ερμητικά κλειστά δοχεία αναστέλλει την λειτουργία του PS II (και κατ' επέκταση τη φωτόλυση του νερού και την παραγωγή οξυγόνου), ενώ ταυτόχρονα αυξάνει την αναπνευστική λειτουργία των κυττάρων, δημιουργώντας έτσι πολύ γρήγορα ανοξικές συνθήκες με επακόλουθη επαγωγή της υδρογενάσης και παραγωγή H₂.

Οι deps κατά την διαδικασία της βιοδιάσπασής τους έχουν την δυνατότητα να μεταφέρουν ηλεκτρόνια στο PSI, αφού φαίνεται λαμβάνουν θέση μεταφορέα να ηλεκτρονίων στην περιοχή των κινονών της φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, με τις οποίες εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια τόσο στη δομή όσο και στο PSII οξειδοαναγωγικό δυναμικό. Η αναστολή του που θα οδηγούσε, κάτω από άλλες συνθήκες σε κατάρρευση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού αλλά και του γλωροφύκους, αναπληρώνεται από ένα πομπό ηλεκτρονίων (dcps) προς το PSI, το οποίο και υπερεπάγεται. Έτσι, οι συνθήκες αυτές είναι οι πλέον κατάλληλες για αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου της υδρογενάσης και την συνεγή (όσο συντηρούμε την καλλιέργεια) παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων υδρογόνου (Papazi et al., 2012).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο μηχανισμός βιοδιάσπασης των dcps από χλωροφύκος Scenedesmus obliquus και της βιοενεργητικής στρατηγικής που το ακολουθεί ο οργανισμός όταν βρίσκεται σε μέσο καλλιέργειας όπου υπάρχει έλλειψη του στοιχείου του αζώτου (Ν). Πραγματοποιήθηκε σειρά πειραμάτων σε μικτότροφες καλλιέργειες Scenedesmus obliquus απουσία αζώτου (-N) από το μέσο ανάπτυξης του χλωροφύκους και παρουσία της Για τις ανάγκες dcp. των πειραμάτων, από τις διάφορες dcps επιλέχθηκε η 3,4-dcp στη συγκέντρωση των 0,15mM, δεδομένου ότι ενεργειακά βιοδιάσπασή είναι η περισσότερο απαιτητική για τη και επομένως η περισσότερο τοξική (Papazi and Kotzabasis 2007).

Στην παρούσα μελέτη οι καθορισμένες συνθήκες ανάπτυξης ήταν 50 mL υγρής καλλιέργειας σε ερμητικά κλειστά μπουκαλάκια συνολικού όγκου 125 mL, με αρχική κυτταρική συγκέντρωση 1 μL PCV/mL και προσθήκη 5 g/L γλυκόζης ως πηγή άνθρακα. Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε ένταση φωτισμού 50-60 μmol m⁻²s⁻¹, στους 30°C.

40

Είναι γνωστό από προηγούμενες εργασίες του εργαστηρίου ότι χωρίς την προσθήκη γλυκόζης ως εξωγενή πηγή άνθρακα, η συγκεκριμένη διχλωροφαινόλη δεν μπορεί να βιοαποικοδομηθεί (Papazi and Kotzabasis 2013).

Σε κάθε πείραμα υπήρχαν τέσσερις διαφορετικοί χειρισμοί. Ο πρώτος ήταν ο μάρτυρας (control), μικτότροφη καλλιέργεια *Scenedesmus obliquus* με πλήρες θρεπτικό. Ο δεύτερος ήταν καλλιέργεια με έλλειψη αζώτου στο θρεπτικό μέσο ("-N"). Ο τρίτος ήταν καλλιέργεια με πλήρες θρεπτικό και παρουσία της dcp ("dcp"). Τέλος, ο τέταρτος χειρισμός αφορούσε καλλιέργεια στην οποία υπήρχε έλλειψη αζώτου αλλά και παρουσία της dcp ("dcp-N").

Για να επιτευχθεί η έλλειψη αζώτου στις καλλιέργειες των "-N" και "dcp-N" χειρισμών, δείγματα από τις μητρικές καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν στα 1300g για 2min και το ίζημα (κύτταρα) επαναδυαλήθηκε σε "-N" θρεπτικό μέσο (βλέπε Πίνακα 1). Για να αποφευχθούν τυχόν διαφοροποιήσεις μεταξύ του μάρτυρα και του χειρισμού σε έλλειψη αζώτου λόγω της φυγοκέντρησης των κυττάρων, για τον μάρτυρα χρησιμοποιήθηκε η ίδια διαδικασία: αρχική καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε, στις ίδιες συνθήκες, και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε νέο πλήρες θρεπτικό. Συνήθως, η αφαίρεση ενός στοιχείου από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας συνεπάγεται και ταυτόχρονη αναγκαστική έλλειψη κάποιου άλλου ιόντος. Από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας αφαιρέθηκε το KNO₃, ώστε να επιτευχθεί η ιοντική έλλειψη -NO₃, αντικαταστήθηκε όμως με ισομοριακή ποσότητα KCl, για να μην υπάρχει αναγκαστική παράλληλη έλλειψη του ιόντος καλίου (K).

Η ικανότητα του μικροφύκους Scenedesmus obliquus να βιοδιασπά την dcp έχει ήδη αποδειχθεί. Η αποικοδόμηση είναι μία ενεργοβόρα διεργασία, ιδιαίτερα για την περίπτωση της συγκεκριμένης κατηγορίας φαινολικών ενώσεων (meta υποκατεστημένες διγλωροφαινόλες), οπότε το μικροφύκος πρέπει να διαχειριστεί τη διαθέσιμη ενέργεια μοιράζοντάς την ανάμεσα στην αποτοξικοποίηση του περιβάλλοντός του και στην ανάπτυξή του, ακολουθώντας πάντα την πιο συμφέρουσα ενεργειακά διαδρομή (Papazi and Kotzabasis 2013). Για την dcp έχει αποδειχθεί ότι η περισσότερη ενέργεια αποδίδεται στη βιοαποικοδόμησή της, σε αντίθεση με την ενέργεια που προορίζεται για την ανάπτυξη του μικροφύκους, η οποία εμφάνισε παρεμποδιστικές τάσεις σε σύγκριση με την περίπτωση του μάρτυρα (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Κινητική ανάπτυξης του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus σε μικτότροφες συνθήκες, σε ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 μmol m⁻² s⁻¹ και σε θερμοκρασία 30°C. Control: καλλιέργεια μάρτυρας. -Ν:καλλιέργεια με έλλειψη αζώτου. dcp: καλλιέργεια με dcp. dcp-N: καλλιέργεια με έλλειψη αζώτου παρουσία dcp.

Στην Εικόνα 16 φαίνεται καθαρά ότι έλλειψη αζώτου από το θρεπτικό περιορίζει σημαντικά την ανάπτυξη. Ο λόγος που παρατηρείται αυτή η εικόνα είναι διότι ο ρόλος του αζώτου στην ανάπτυξη του φυτικού οργανισμού είναι σημαντικός και καθοριστικός. Είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και χλωροφυλλών. Αυτός είναι και ο λόγος που η έλλειψη αζώτου οδηγεί σε περιορισμό της ανάπτυξής του σε σχέση με τον μάρτυρα. Παρόμοια εικόνα φαίνεται να υπάρχει και στον χειρισμό όπου υπάρχει στο μέσον καλλιέργειας η dcp, λόγω της τοξικότητάς της. Στην περίπτωση όπου έχουμε την συνύπαρξη και των δυο δυσμενών συνθηκών, παρατηρούμε τη μεγαλύτερη παρεμπόδιση.

Ακολούθησαν μετρήσεις των χλωροφυλλών ανά κυτταρικό όγκο, όπου παρουσιάστηκαν οι χαμηλότερες τιμές στις συνθήκες έλλειψης αζώτου. Τα εν λόγω αποτελέσματα ουσιαστικά μπορούν να δικαιολογηθούν από το ότι το άζωτο αποτελεί κύριο δομικό στοιχείο των τετραπυρρολών. Αντιθέτως, ο χειρισμός "dcp-N" παρουσίασε σημαντικά μεγαλύτερες τιμές (Εικόνα 17). Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ξεκάθαρα οτι η πίο ευαίσθητη στην αποδόμηση είναι η chla γι' αυτό σε όλους τους χειρισμούς έχουμε μείωση της σχέσης chla/chlb κατά τη διάρκεια της επώασης.



Εικόνα 17. Μέτρηση χλωροφυλλών του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus σε μικτότροφες συνθήκες, σε ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 μmol m⁻² s⁻¹ και σε θερμοκρασία 30°C. Control: καλλιέργεια μάρτυρας. -Ν:καλλιέργεια με έλλειψη αζώτου. dcp:καλλιέργεια με dcp. dcp-Ν:καλλιέργεια με έλλειψη αζώτου παρουσία dcp.

Η παρεμποδιστική δράση της dcp δεν αντικατοπτρίζεται μόνο στις καμπύλες ανάπτυξης, αλλά και στη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού όπως αυτή αποδίδεται μέσω μετρήσεων επαγωγικού φθορισμού. Η τοξικότητα της dcp είναι τόσο έντονη, ώστε οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού ήταν ανέφικτο να πραγματοποιηθούν πέραν της δεύτερης ημέρας διεξαγωγής του πειράματος, αφού ακολούθως απενεργοποιείται το PSII.

Η παρουσία της dcp από την πρώτη μέρα επώασης μειώνει δραστικά τη φωτοσυνθετική απόδοση (Fv/Fm) στους χειρισμούς σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Επιπλέον φαίνεται πως ενεργοποιείται ένας μηχανισμός απόσβεσης ενέργειας, ως απόκριση στην έντονη καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, γεγονός που αντικατοπτρίζεται με την αύξηση του μεγέθους των λειτουργικών κεραιών (ABS/RC), με άμεση συνέπεια την αύξηση της ενέργειας που διαχέεται μη φωτοχημικά (DIo/RC) και τη μείωση της πυκνότητας των ενεργών κέντρων (RC/CSo) και της πρωτογενούς φωτοχημικής απόσβεσης (PSIo) (Εικόνα 18). Η έλλειψη αζώτου παρουσιάζει, τουλάχιστον την πρώτη μέρα επώασης, παρόμοιες διαφοροποιήσεις με τον "dcp" χειρισμό, όμως πολύ πιό ήπιες Στην περίπτωση που υπάρχει έλλειψη αζώτου και παράλληλη παρουσία της dcp, οι παράμετροι αυτοί παρουσιάζουν αντίστοιχη εικόνα με αυτήν της επίδρασης dcp.



Εικόνα 18: Διαφοροποιήσεις της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus σε τέσσερις διαφορετικούς χειρισμούς κατά την πρώτη μέρα επώασης (Control, -N, dcp και dcp-N).

Fv/Fm:φωτοσυνθετική απόδοση, ABS/RC: μέγεθος λειτουργικής φωτοσυνθετικής κεραίας,

DI_o/RC: ενέργεια που διαχέεται με την μορφή θερμότητας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης,

RC/CS_o: πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης, PSIo: πρωτογενούς φωτοχημικής απόσβεσης, ΦPSII: λειτουργική κβαντική απόδοση του PSII, PI(abs): επιδόσεις ανά απορροφώμενη φωτονιακή ενέργεια.

Γίνεται σαφές πως τόσο η διγλωροφαινόλη, όσο και η απουσία του αζώτου δημιουργούν αλλαγές στη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηγανισμού. Τα μέγρι τώρα αποτελέσματα καθιστούν τη δράση της φαινολικής πολύ ισχυρότερη σύγκριση ένωσης σε τη δράση με της απουσίας θρεπτικών συστατικών από το μέσο καλλιέργειας, δεδομένου ότι παρατηρείται ουσιαστική διαφορά μεταξύ των γειρισμών, όσον αφορά την ανάπτυξη και τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Για καλύτερη διαφοροποίησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού επιχειρήθηκε εκτίμηση της καταγραφή του επιπέδου των κέντρων αντίδρασης PSI και PSII με Western blot αναλύσεις. Από αναλύσεις Western blot των ανοσοενεργών πρωτεϊνών των κέντρων αντίδρασης των φωτοσυστημάτων PSI (PSaA) και PSII (D1), έδειξαν ξεκάθαρα σε αύξηση της έκφρασης του PSI σε σχέση με ότι η παρουσία της dcp οδηγεί τον μάρτυρα, αλλά και σε μείωση της έκφρασης του PSII όπου υποεκφράζεται. Στην καλλιέργεια χωρίς πηγή αζώτου, παρατηρείται υπερέκφραση του PSI, ενώ το PSII είναι σχεδόν στα ίδια επίπεδα με τον μάρτυρα. Στον συνδυασμό των δυο πιο πάνω συνθηκών ("dcp-N"), η έκφραση του PSI είναι αυξημένη σε σχέση με το control, αλλά παρουσιάζει την μικρότερη αύξηση σε σχέση με τους υπόλοιπους δυο χειρισμούς (-N και "dcp"), ενώ το PSII έχει σχεδόν μηδενική έκφραση. Επιπρόσθετες αναλύσεις Western blot των ανοσοενεργών πρωτεϊνών της Rubisco, έδειξαν ότι υπάρχει μια υποβάθμιση της Rubisco σε όλους τους χειρισμούς σε σχέση με το control, με την μεγαλύτερη να σημειώνεται στο -Ν, σε σύγκριση με τους υπόλοιπους γειρισμούς (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Ανάλυση κατά western των ανοσοενεργών πρωτεϊνών PSI (PSaA), PSII (D1), Cytochrome f και Rubisco του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus κατά την 2^{η} ημέρα της επώασης σε 4 διαφορετικούς χειρισμούς (Control, -N, dcp και dcp-N).

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα πολαρογραφικά δεδομένα τα οποία λήφθησαν από μετρήσεις αεροχρωματογραφίας θερμικής αγωγιμότητας (GC-TCD) σε κλειστό μπουκάλι (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Επίπεδα οζυγόνου σε κλειστά συστήματα καλλιέργειας του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus σε διαφορετικούς χειρισμούς (control, -N, dcp και dcp-N).

Όταν είναι παρούσα η dcp ("dcp" και "dcp-N" χειρισμοί), υπάρχει λιγότερο οξυγόνο στον αέριο όγκο της καλλιέργειας, κάτι το οποίο συμφωνεί με τα αποτελέσματα του JIP-test, διότι φαίνεται να στοχεύουν οι διχλωροφαινόλες το PS II, όπως άλλωστε ξέρουμε από τα αποτελέσματα οξυγόνο από το control. Η Εικόνα 20 δείχνει σε όλους τους χειρισμούς μείωση του επιπέδου του οξυγόνου σε όλη την διάρκεια της επώασης και αυτό επιβεβαιώνεται από την αυξημένη αναπνευστική δραστηριότητα όλων των χειρισμών (ιδιαίτερα του -Ν χειρισμού) κατά την διάρκεια της επώασης σε σύγκριση με τις τιμές πρίν την έναρξη της επώασης (Εικόνα 20). Πρέπει να τονιστεί ότι τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου στην αέρια φάση των "-Ν" και "dcp-N" χειρισμών (Εικόνα 20), ενώ δεν αποτελούν χαρακτηριστηκό για ανοξικές συνθήκες, σε προηγούμενη εργασία (Papazi et al., 2014) δείχθηκε ότι στην κυτταρική φάση που βρίσκεται στο βάθος του μπουκαλιού (οι καλλιέργειες δεν αναδεύονται) επικρατούν ανοξικές συνθήκες.

Ενισχυμένη αναπνοή παρατηρήθηκε και από τους Papazi et al., (2012) σε πειράματα βιοαποικοδόμησης meta-υποκατεστημένων διχλωροφαινολών από το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus* σε καλλιέργειες. Η παρουσία της dcp όμως, δε φάνηκε να ενισχύει συγκεκριμένα την χλωροαναπνοή, αλλά άλλες οξειδάσες, την εναλλακτική οξειδάση (AOX) και την κυτοχρωμική οξειδάση (COX), με συνέπεια την αύξηση της συνολικής κατανάλωσης οξυγόνου. Ακολούθως μελετήθηκε και στην παρούσα εργασία η προέλευση αυτής της τόσο έντονης αναπνευστικής δραστηριότητας (μιτοχόνδριο ή/και χλωροπλάστης).

Για να εξετάσουμε ποιός είναι ο μηχανισμός κατανάλωσης οξυγόνου ελέγχθηκαν όλες οι πιθανοί αναπνευστικοί μηχανισμοί σε μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες. Το κυτοχρωματικό μονοπάτι των μιτοχονδρίων (πρωτεΐνη κυτοχρωμικής οξειδάσης, COX), το εναλλακτικό αναπνευστικό μονοπάτι των μιτοχονδρίων (πρωτεΐνη εναλλακτικής οξειδάσης, AOX) και η χλωροαναπνοή των χλωροπλαστών (πρωτεΐνη πλαστιδιακής τελικής οξειδάσης, PTOX) (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Ανάλυση κατά western των ανοσοενεργών πρωτεϊνών COX, PTOX και AOX του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus κατά τη δεύτερη μέρα επώασης στους χειρισμούς Control, -N, dcp και dcp-N. Η ένταση του σήματος έκφρασης της πρωτεινης είναι εκφρασμένη σε σχετικές τιμές.

Οι Western blot αναλύσεις δείχνουν υποέκφραση της πρωτεΐνης της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COX) στις καλλιέργειες με τις διχλωροφαινόλες και χωρίς το άζωτο (σε σύγκριση με το μάρτυρα). Αντίστοιχα δεδομένα παρατηρήθηκαν και από τους Papazi et al.(2012), όπου μετρήθηκε η μέγιστη ενεργότητα της COX, και φάνηκε οτι το κυτοχρωματικό μονοπάτι υπολειτουργεί στις συνθήκες παρουσίας φαινολών. Ενδεχομένως λοιπόν να λειτουργεί το εναλλακτικό μιτοχονδριακό μονοπάτι αναπνοής (AOX), που λαμβάνει χώρα μέσω της εναλλακτικής οξειδάσης και ενεργοποιείται μόνο σε καταστάσεις καταπόνησης (Siedow and Umbach, 1995).

Αυτό το μονοπάτι δεν προσφέρει τόση μεγάλη ποσότητα ATP (4 ATP έναντι των 30 ATP που προσφέρει το κυτοχρωμικό μονοπάτι για κάθε μόριο γλυκόζης που οξειδώνεται), αλλά ενεργοποιείται για να αποτρέψει τη δημιουργία ενεργών μορφών οξυγόνου (Robson and Vanlerberghe, 2002). Τα αποτελέσματα της Εικόνας 21, δείχνουν ξεκάθαρα υπερέκφραση της AOX, όταν υπάρχει παρουσία της dcp στην καλλιέργεια (σε σύγκριση πάντα με το μάρτυρα), αλλά όταν συνυπάρχει και η έλλειψη αζώτου η έκφραση της είναι χαμηλότερη σε σημείο να είναι πολύ πιό μειωμένη και από το control (Εικόνα 23).

Είναι φανερό λοιπόν ότι το μικροφύκος επιλέγει να ενεργοποιήσει ένα μιτοχονδριακό μονοπάτι αναπνοής (εναλλακτική αναπνοή) που του προσφέρει πολύ λιγότερο ATP, αλλά αποτρέπει τη δημιουργία των ΕΜΟ που πιθανόν να προκαλεί η παρουσία της συγκεκριμένης διχλωροφαινόλης στο μέσο της καλλιέργειας. Ένας άλλος μηχανισμός με παρόμοια λειτουργία (αποτροπή δημιουργίας ΕΜΟ) είναι η χλωροαναπνοή, η οποία όμως δε σχετίζεται με τα μιτοχόνδρια αλλά με το χλωροπλάστη και έχει ως τελική οξειδάση την πλαστιδιακή τελική οξειδάση (PTOX). Η πλαστιδιακή τελική οξειδάση (PTOX) εκφράζεται στο μάρτυρα και κατά την παρουσία dcp, ενώ υπερεκφράζεται στον χειρισμό "dcp-N". Άρα φαίνεται λοιπόν ότι λειτουργεί η χλωροαναπνοή σε όλες τις μεταχειρίσεις εκτός από το -Ν όπου εκφράζεται ελάχιστα η PTOX. Έτσι λοιπόν παρατηρήθηκε πως σε συνθήκες έλλειψης αζώτου, οι AOX, COX και PTOX υποεκφράζονται και γι αυτό ενδεχομένως έχουμε υψηλότερα επίπεδα οξυγόνου σε κλειστά συστήματα με τον χειρισμό -Ν (Εικόνα 21).

Είναι σημαντικός ο ρόλος της χλωραναπνοής σε όλους τους χειρισμούς (εκτός του -N), όπως φάνηκε και από τα αποτελέσματά μας (Εικόνα 21), καθώς συμφωνούν και με τους Rumeau et al (2007), οι οποίοι ισχυρίζονται ότι είναι υπεύθυνη για δύο κυρίως μηχανισμούς σε καταστάσεις καταπόνησης. Ο πρώτος μηχανισμός είναι η παραγωγή ATP και η διάχυση της δεσμευμένης ενέργειας μέσω της κυκλικής ροής ηλεκτρονίων. Το κύτταρο χρειάζεται περισσότερο ATP σε συνθήκες καταπόνησης, το οποίο μπορεί να συμπληρωθεί διαμέσου της κυκλικής ροής ηλεκτρονίων στο PSI. Το NADH σύμπλοκο, μέσω της εμπλοκής του στην κυκλική ροή ηλεκτρονίων, συμμετέχει στη διάχυση της ενέργειας και την παροχή του ATP, ενώ η PTOX μπορεί να λειτουργήσει ως «αποθήκη» ηλεκτρονίων, βοηθώντας στην αριστοποίηση της λειτουργίας της κυκλικής ροής ηλεκτρονίων (Joet et al., 2002). Ο δεύτερος μηχανισμός είναι ότι η PTOX λειτουργεί ως βαλβίδα ασφαλείας για να αποφευχθεί η υπερβολική αναγωγή των ηλεκτρονιοδεκτών του PSI εναντι του PSI.

Ο κύριος μηχανισμός παραγωγής H₂ από το χλωροφύκος Scenedesmus obliquus κατά τη βιοαποικοδόμηση της dcp, που οδηγεί σε μαζικές ποσότητες παραγόμενου αερίου, αναπτύχθηκε από τους Papazi et al. (2012). Η ανοξία που δημιουργείται είναι απαραίτητη και απαιτείται για τη δράση της υδρογενάσης, ενισχύεται από την παρουσία της γλυκόζης στο μέσο της καλλιέργειας, η οποία αυξάνει την αναπνευστική δραστηριότητα, όπως επίσης ενισχύεται και από την αδυναμία παραγωγής οξυγόνου, λόγω απενεργοποίησης του PSII και κατά συνέπεια αναστολής της φωτόλυσης του νερού. Το μικροφύκος υπό αυτές τις συνθήκες παράγει ως και 150 φορές περισσότερο αέριο υδρογόνο σε σχέση με τον ανοξικό μάρτυρα απουσίας της dcp (Papazi et al., 2012).

μοριακή δομή Ενώ ανάπτυξη και λειτουργία στην και στη του φωτοσυνθετικού μηχανισμού οι ελλείψεις ιόντων δεν έχουν σπουδαίες διαφοροποιήσεις, στην παραγωγή του υδρογόνου η απουσία μερικών ιόντων πέραν του βιβλιογραφικά μελετημένου θείου (S) (Melis et al., 2014) παίζει σημαντικό ρόλο, αφού οδηγεί σε ακόμα υψηλότερες τιμές παραγόμενου Η2. Πιο συγκεκριμένα ελλείψεις ΝΟ-3, Mg^{+2} παρατηρήθηκε ότι K^+ και επάγουν την 01 παραγωγή υψηλότερων συγκεντρώσεων Η2 σε σύγκριση με την καλλιέργεια μάρτυρα ή ακόμη και με το βιβλιογραφικά μελετημένο γειρισμό όπου απουσιάζει το ιόν SO4-2 (Papazi et al., 2014).



Εικόνα 22. Κινητική παραγωγής υδρογόνου από το χλωροφύκος Scenedesmus obliquus, καθώς και εμφάνιση των επιπέδων έκφρασης του ενζύμου της υδρογενάσης από ανάλυση western blot και στους 4 χειρισμούς (Control, -N, dcp και dcp-N).

Όσον αφορά την παραγωγή του H_2 στα δικά μας αποτελέσματα (Εικόνα 22) διακρίνονται δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα συνιστάται από τους χειρισμούς που δεν έχουν dcp, το control και το -Ν στους οποίους η παραγωγή του υδρογόνου δεν ξεπερνά τα 0,3L/LPCV, ενώ η δεύτερη ομάδα αποτελείται από τους χειρισμούς που περιλαμβάνουν dcp ("dcp" και "dcp-N") οι οποίοι παρουσιάζουν εξαιρετικά μεγάλες τιμές παραγόμενου υδρογόνου (>3 L/L PCV).

Το περισσότερο H₂ παράγεται στον χειρισμό "dcp", είτε ανά PCV είτε ανά καλλιέργεια. Πάντα σημειώνεται αυξημένη παραγωγή H₂ στη καλλιέργεια όπου υπάρχει παρουσία dcp. Στον χειρισμό "dcp-N" ναι μεν σημειώνεται παραγωγή H₂ όχι όμως στα ίδια επίπεδα με τον χειρισμό "dcp". Εν αντιθέσει, στον χειρισμό -N, δεν παρατηρείται καθόλου παραγωγή H₂, γεγονός που αποδεικνύει τον σημαντικό ρόλο των dcp στην παραγωγή H₂ και τον ανασταλτικό ρόλο της έλλειψης αζώτου στην παραγωγή H₂. Δεν πρόκειται δηλαδή μόνο περί ανοξίας γιατί και στο control παρατηρείται μικρή παραγωγή H₂. Η ανοξία όμως σίγουρα συμβάλλει για να ξεκινήσει ταχύτερα η παραγωγή H₂ και να δώσει μεγαλύτερη τελική τιμή.

Στον "dcp-N" χειρισμό παράγεται λιγότερο H₂, γιατί δεν εκφράζεται αρκετή υδρογενάση (Εικόνα 22). Ίσως να παίζει ρόλο ο λόγος παρουσίας /απουσίας οξυγόνου και της ικανότητας σύνθεσης της υδρογενάσης. Μπορεί επιπλέον να παίζει ρόλο και η διαφορετική βιοαποικοδομητικότητα στους χειρισμούς "dcp" και "dcp-N" στην διαφορά παραγωγής H₂.

Αφού εξετάσαμε διάφορες παραμέτρους της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας του οραγανισμού μελέτης καθώς και μετρήσεις ανάπτυξης και του μεταβολισμού, στη συνέχεια **εξετάσαμε την ικανότητα του χλωροφύκους** *Scenedesmus obliquus* va βιοαποικοδομεί την dcp (3,4-διχλωροφαινόλη) σε συγκεκριμένες πάντα συνθήκες (βλ. Υλικά και Μεθόδους) καθώς αυτός ήταν ο σκοπός της παρούσας μελέτης. Χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες σε δυο διαφορετικές συνθήκες, στις οποίες έγινε μελέτη της ικανότητας βιοαποικοδόμησης της dcp (0,15mM). Η πρώτη ήταν κύτταρα σε θρεπτικό μέσο παρουσία πηγής αζώτου ενώ η δεύτερη σε έλλειψη αζώτου.



Εικόνα 23. Βιοαποικοδόμηση της dcp (0,15 mM) ανά καλλιέργεια και ανά κυτταρικό όγκο του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus, από την 1η έως την 5η ημέρα διεξαγωγής του πειράματος, στους χειρισμούς "dcp" και "dcp-N", σε ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 μmol $m^{-2} s^{-1}$



Εικόνα 24. Παραγωγή 2-chl και φαινόλης κατά τη διάρκεια της βιοαποικοδόμησης της 3,4 dcp (0,15 mM) ανά καλλιέργεια και ανά κυτταρικό όγκο του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus, από lη έως 5η ημέρα διεξαγωγής του πειράματος, στους χειρισμούς dcp και dcp-N, σε ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 μmol m⁻² s⁻¹

Από τα δεδομένα της βιοαποικοδόμησης, που απεικονίζονται στην Εικόνα 23, αποδεικνύεται ότι υφίσταται έντονη βιοαποικοδομησιμότητα της dcp. Σημειώνεται πως σε συνθήκες έλλειψης αζώτου η βιοαποικοδόμηση είναι μεγαλύτερη (κατά 33%) από τον χειρισμό όπου το άζωτο είναι παρόν, είτε ανά καλλιέργεια είτε ανά κυτταρικό όγκο. Το γεγονός αυτό μπορεί πιθανόν να εξηγηθεί (τουλάχιστον εν μέρει) με βάση την λιπόφιλη φύση της dcp και άρα μπορεί να διαλύεται σε λιπαρά σταγονίδια, αφού ο χειρισμός "dcp-N", αναμένουμε να περιέχει περισσότερα λιπαρά από τον "dcp" χειρισμό (λόγω έλλειψης αζώτου) (βλ.παρακάτω). Παράλληλα με την βιοαποικοδόμηση της dcp, από τα γραφήματα της HPLC εμφανίστηκαν και οι κορυφές που αντιστοιχούν στην 2χλωροφαινόλη (2-cp) και στην φαινόλη (σύμφωνα με πρότυπες καμπύλες φαινολών, Εικόνα 24), αφού είναι γνωστό πως κατά την βιοδιάσπαση της dcp παράγονται ως ενδιάμεσα η 2-cp και ακολούθως η απλή φαινόλη. Αντίστοιχα, οι τιμές της 2-cp και της φαινόλης είναι μεγαλύτερες στον "dcp-N" χειρισμό, σε σχέση με τον χειρισμό "dcp", αφού υπάρχει μεγαλύτερη βιοαποικοδόμηση. Η ποσότητα της 2-cp είναι πολύ μεγαλύτερη από της φαινόλης. Όμως, και οι δύο έχουν πολύ λιγότερη ποσότητα από την αρχική της dep.

Κατά την 2η ημέρα σταματάει ουσιαστικά η βιοαποικοδόμηση της dcp όπου και σταθεροποιείται και η παραγωγή της 2-cp και της φαινόλης. Επίσης, παρατηρείται ότι η συσσώρευση της φαινόλης είναι πολύ μεγαλύτερη στον "dcp-N" χειρισμό (~8 φορές). Αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι αφού απουσίαζει το N, το χλωροφύκος δεν μπορεί να παράγει κάτι με το περισσότερο υπάρχον άνθρακα (C), και έτσι απλά τον συσσωρεύει, μιας και η απλή φαινόλη δεν είναι τόσο τοξική για τα κύτταρα (Papazi and Kotzabasis 2007). Αυτό όμως μπορεί να εξηγηθεί και λόγω της μεγαλύτερης ικανότητας βιοαποικοδόμησης. Φαίνεται ότι η βιοαποικοδόμηση έχει αρχίσει ήδη από την 1η ημέρα, εξού και η παρουσία της 2-cp και της φαινόλης από το πρώτο 24ωρο. Η βιοαποικοδόμηση και στους δυο χειρισμούς λαμβάνει χώρα σε μεγαλύτερο ποσοστό κατά την πρώτη ημέρα διεξαγωγής του πειράματος, ενώ στην πορεία διακόπτεται, πιθανόν λόγω μείωσης του επιπέδου του οξυγόνου (απαραίτητο για τη βιοαποικοδόμηση) στη κυτταρική φάση.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της βιοαποικοδόμησης της dcp και της παραγωγής H₂, φαίνεται πως κατά τον χειρισμό "dcp-N" το μονοκύτταρο χλωροφύκος αφιερώνει περισσότερη ενέργεια στην βιοαποικοδόμηση και λιγότερη στην παραγωγή H₂, όμως και γι αυτή την σχετικά μικρή παραγωγή H₂ σίγουρα απαιτείται και η παρουσία της dcp. Στον χειρισμό "dcp" τόσο η βιοαποικοδόμηση, όσο και η παραγωγή H₂ ξεκινούν από το πρώτο 24ωρο. Αντίθετα, στον "dcp-N" χειρισμό η παραγωγή H₂ ξεκινάει μετά το πρώτο 24ωρο, ενώ η βιοαποικοδόμηση συμβαίνει νωρίτερα, μέσα στο πρώτο 24ωρο, όπως και στον "dcp" χειρισμό, αλλά είναι μεγαλύτερη (Εικόνα 23).

Η παρεμπόδιση ανάπτυξης του μικροφύκους (Εικόνα 16) και η κατάρρευση του φωτοσυνθετικού του μηχανισμού (Εικόνα 18), μέσω της απενεργοποίησης του PSII, δε φαίνεται να επηρεάζουν αρνητικά την παραγωγή του υδρογόνου, δεδομένου ότι η αδυναμία παραγωγής Ο2 (ισχυρός αναστολέας της υδρογενάσης), ενεργοποιεί την υδρογενάση και την παραγωγή του αερίου Η2. Η διακεκομμένη φαινομενικά, λόγω της καταστροφής του PSII, αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων επανατίθεται σε λειτουργία, αφού η ανηγμένη dcp (ενδιάμεσο της dcp βιοαποικοδόμησης) φαίνεται να λειτουργεί ως εναλλακτικός δότης ηλεκτρονίων, ενισχύοντας τη ροή ηλεκτρονίων πρός το PSI και την υδρογενάση, όπως έχει αποδειχτεί (Papazi et al. 2012, 2014).

Έχει αποδειχθεί ότι σε συνθήκες έλλειψης αζώτου υπάρχει δραματική αύξηση των λιπαρών (Richardson et al., 1969; Zhila et al., 2005) αλλά και αύξηση του αμύλου, όπως αποδεικνύεται και από την παρούσα εργασία. Αυτό σε συνδυασμό με την λιπόφιλη φύση των φαινολικών ενώσεων γεννά τις υποψίες για είσοδο μεγαλύτερης ποσότητας φαινόλης στον χειρισμό "dcp-N", σε σύγκριση με τον "dcp" χειρισμό, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει και τη μεγαλύτερη βιοαποικοδομησιμότητα στον "dcp-N" χειρισμό σε σύγκριση με τον "dcp" χειρισμό. Επειδή η βιοαποικοδόμηση είναι μια διαδικασία που απαιτεί ενέργεια επιχειρήθηκε η καταγραφή του επιπέδου του ATP, ADP και AMP σε όλους τους χειρισμούς.



Εικόνα 25. Συγκέντρωση ATP και ADP και AMP (αριστερά) και τιμές της σχέσης του ενεργειακού φορτίου (Energy Charge Ratio, δεξιά) σε κύτταρα του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus κατά την 2η ημέρα διεξαγωγής του πειράματος σε όλους τους χειρισμούς (Control, -N, dcp και dcp-N).

Για αποφυγή τυχόν λαθών στον υπολογισμό της ενέργειας, λάβαμε υπόψη τις τιμές της σχέσης ενεργειακού φορτίου (Energy Charge Ratio) (Εικόνα 25), όπου εμπεριέχει τις τιμές των ATP, ADP και AMP και επιπλέον διορθώνει ως προς την αναγωγή στην ποσότητα κυττάρων. Παρατηρείται ότι την 2η ημέρα (όπου γίνεται ακόμα η βιοαποικοδόμηση και η παραγωγή H₂ στους χειρισμούς "dcp"), ο "dcp" και ο "dcp-N" χειρισμός παρουσιάζουν ελάχιστα λιγότερη ενέργεια σε σχέση με το control, ενώ πολύ λιγότερη ενέργεια παρουσιάζεται στον χειρισμό "-N". Φαίνεται ότι η προσθήκη dcp στον "dcp-N" χειρισμό αποκαθιστά ενεργειακά την υποβάθμιση που υπέστει η καλλιέργεια στον "-N" χειρισμό.

Για να κατανοήσουμε καλύτερα το μεταβολικό προφίλ των κυττάρων από όλους τους χειρισμούς, μετρήθηκαν στη συνέχεια τα επίπεδα των λιπαρών και των υδατανθράκων.

Σύμφωνα με τον Redfield (1963), η βέλτιστη αναλογία που απαιτείται για την σωστή κυτταρική λειτουργία είναι C:N:P = 106:16:1. Όταν αυτή αναλογία δεν είναι επαρκής, δηλαδή σε συνθήκες έλλειψης αζώτου, τότε ο άνθρακας πιθανόν να αποθηκεύεται ως άμυλο ή λιπαρά στα κύτταρα (Jermyn1963; Redfield 1963). Ωστόσο η αναλογία αυτή ποικίλλει σημαντικά, ανάλογα με τα είδη των φυκών και των περιβαλλοντικών συνθηκών (Redfield 1963).



Εικόνα 26. Μέτρηση λιπαρών (lipid droplets) του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus σε όλους τους χειρισμούς (Control, -N, dcp και dcp-N) εκφρασμένη σε σχετικές με το μάρτυρα τιμές.

Η μέτρηση των λιπαρών στις καλλιέργειες σε συνθήκες έλλειψης αζώτου (-Ν και "dcp-N"), δείχνουν πως έχουμε περισσότερα λιπαρά. Αυτό συμβαίνει διότι το χλωροφύκος δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει σε άλλα μονοπάτια τον C που έχει στην καλλιέργεια και συνεπώς βιοσυνθέτει λιπαρά (Εικόνα 26). Επιπρόσθετα για να έχουμε καλύτερη εικόνα σχετικά με το ποσοστό των λιπαρών, παρατηρήθηκαν οι καλλιέργειες αυτές σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Τα σταγονίδια λιπαρών σε κυτταρικό επίπεδο εντοπίστηκαν με τη χρήση της χρωστικής Nile Red και καταγράφηκε ο πράσινος φθορισμός τους (Εικόνα 27).



Εικόνα 27. Εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού (Confocal laser scanning microscopy, CLSM) από το χλωροφύκος Scenedesmus obliquus κατά την 2^η ημέρα επώασηςκαι στους 4 χειρισμούς (Control, -N, dcp, dcp-N). Τα ορατά με πράσινο φθορισμό σημεία υποδηλώνουν λιπαρά (lipid droplets) τα οποία βάφονται με Nile Red χρωστική. Η χλωροφύλλη έχει κόκκινο αυτοφθορισμό. Όλες οι μπάρες κλίμακας αντιπροσωπεύουν 20 μm.



Εικόνα 28. Ποσοστιαία διαφοροποίηση του επιπέδου του αμύλου σε σχέση με τον μάρτυρα (Control) από κύτταρα του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus και στους τρεις χειρισμούς (-N, dcp και dcp-N).

Η ποσοτικοποίηση του αμύλου από την άλλη, έδειξε ότι οι τιμές των καλλιεργειών ήταν οι μεγαλύτερες στον χειρισμό -Ν, λόγω του ότι η παρεμπόδιση σύνθεσης πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων που απαιτούν άζωτο για την σύνθεση τους, οδηγεί στην διοχέτευση όλου του μεταβολικού δυναμικού στην βιοσύνθεση αμύλου, όπως και λιπιδίων (Εικόνα 28), που δεν απαιτούν άζωτο. Στο "dcp" χειρισμό σημειώνεται μείωση στα επίπεδα αμύλου σε σύγκριση με τους υπόλοιπους χειρισμούς. Στο "dcp-N" χειρισμό σημειώνεται ποσοτικά το λιγότερο άμυλο ίσως λόγω της μεγαλύτερης βιοαποικοδόμησης που συμβαίνει σε σχέση με τον "dcp" χειρισμό.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι γνωστό από πρόσφατες δημοσιεύσεις του Εργαστηρίου μας, ότι η βιοδιάσπαση των φαινολικών ενώσεων από τα μικροφύκη είναι μια εξαρτώμενη από το φώς βιοενεργητική διαδικασία που επηρεάζεται από τις συνθήκες ανάπτυξης, ιδιαίτερα από το επίπεδο της εξωγενούς παρεγόμενης ενέργειας ως οργανικού άνθρακα ή το φως για την φωτοσυνθετική παραγωγή ενέργειας (Papazi and Kotzabasis 2007, 2008). Στα πλαίσια της καλλιέργειας παρουσιάζεται ένα ενεργειακό ισοζύγιο, μεταξύ ανάπτυξης του χλωροφύκους και τοξικότητας της βιοδιασπώμενης ένωσης. Εάν η ένωση είναι πολύ τοξική τότε το μικροφύκος αποδίδει το μεγαλύτερο μέρος της διαθέσιμης ενέργειάς του στη βιοαποκοδόμηση και απλώς συντηρεί την ανάπτυξη (άμεση αποτοξικοποίηση). Όμως, όταν η ένωση δεν εμφανίζει έντονη τοξικότητα, τότε το μικροφύκος αποδίδει ένα μικρότερο μέρος στην αποικοδόμηση, ώστε να έχει αποθέματα να βελτιώσει κυρίως την ανάπτυξή του. Με αυτό τον τρόπο μέσα σε λίγες ώρες/μέρες θα μειωθεί δραματικά η ποσότητα της φαινολικής ένωσης που αντιστοιχεί σε κάθε κύτταρο και έτσι πολύ πιο εύκολα σε μία δεύτερη φάση θα την βιοαποικοδομήσει (έμμεση αποτοξικοποίηση) (Papazi et al., 2012; 2013). Όλα τα παραπάνω δείχνουν σαφώς ότι τα μικροφυκη φαίνεται να είναι μικρές και «έξυπνες βιοενεργειακές μηχανές», που έχουν την ικανότητα να «υπολογίζουν» συνεχώς τα αποθέματα ενέργειάς τους αλλά και την απαιτούμενη ενέργεια για την διάσπαση του ξενοβιώτη και χρησιμοποιούν την πιο συμφέρουσα ενεργειακά στρατηγική βιοαποικοδόμησης (Papazi and Kotzabasis 2007, 2008, 2013; Papazi et al., 2012;).

Οι Papazi et al., (2012) έδειξαν ότι το μονοκύτταρο χλωροφύκος Scenedesmus obliquus για την βιοαποικοδόμηση μίας συγκεκριμένης κατηγορία φαινολικών ενώσεων (meta-υποκατεστημένες διχλωροφαινόλες: 2,3-, 2,5- και 3,4διχλωροφαινόλες), ακολουθεί την άμεση αποτοξικοποίηση, επενδύοντας όλα τα αποθέματα ενέργειας στην βιοδιάσπαση των εν λόγω ενώσεων, σταματώντας ταυτόχρονα την ανάπτυξη (βλ. Εικόνα 16).

Το πρώτο βήμα της βιοαποικοδόμησης των διχλωροφαινολών είναι η αναγωγή τους. Η ανηγμένη μορφή των 2,3-, 2,5- και 3,4-διχλωροφαινολών, βάσει του οξειδοαναγωγικού τους δυναμικού, μπορεί να ενσωματωθεί στην αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, στη θέση της ουμπικινόνης, επάγοντας μεγάλη αναπνευστική δραστηριότητα (επαγωγή κυτοχρωμικού και εναλλακτικού μονοπατιού των μιτοχονδρίων

– καθώς και της χλωροαναπνοής που εδράζει στο χλωροπλάστη) και κατ' επέκταση να δημιουργήσει συνθήκες ανοξίας (σε ένα κλειστό σύστημα) μέσα σε διάστημα λιγότερο από 24 ώρες. Παράλληλα η ανηγμένη μορφή των συγκεκριμένων διχλωροφαινολών ενσωματώνεται και στη φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων πριν από τη δεξαμενή της πλαστοκινόνης (PQ), τροφοδοτώντας με ηλεκτρόνια - ως δότης ηλεκτρονίων - το PSI, παρεμποδίζοντας ολοκληρωτικά την ενεργότητα του PSII και κατ' επέκταση την παραγωγή O₂. Η μοναδική συγκυρία της συνδυαστικής δράσης ανοξίας και αποκλειστικής ενεργοποίησης του PSI, επάγει την υδρογενάση και την παραγωγή μεγάλων σε σύγκριση με τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα, H₂ (έως και 100 φορές υψηλότερες) (Papazi, et al. 2012). Πρόκειται για μία βιοενεργητική στρατηγική του χλωροφύκους για τη βιοαποικοδόμηση των εν λόγω διχλωροφαινολών που δημιουργεί τις μοναδικές εκείνες συνθήκες που επιτρέπουν μία «πράσινη» βιοαποικοδόμηση τοξικών ενώσεων με την ταυτόχρονη παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων βιο-υδρογόνου (H₂) για περαιτέρω βιοτεχνολογική εκμετάλλευση (βλ. απλοποιημένο μοντέλο λειτουργίας στην Εικόνα 29).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η καταγραφή της διαφοροποίησης του παραπάνω μηχανισμού [βιοενεργητική στρατηγική βιοαποικοδόμησης της dcp και παραγωγή H₂ από το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus*] σε συνθήκες έλλειψης αζώτου από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρουσιάζονται επιγραμματικά στον Πίνακα 4, όπου οι κεντρικές διαφοροποιήσεις μεταξύ "dcp-N"- και "dcp"-χειρισμού είναι οι εξής:

1. Όσον αφορά τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό στον "dcp-N"- χειρισμό η κομβική διαφοροποίηση σε σχέση με τον "dcp"-χειρισμό, είναι η μείωση του επιπέδου του Cytf, από το σύμπλοκο Cytb₆f. Οι ανοσοαναλύσεις υπέδειζαν υπερέκφρασή του Cytf στους χειρισμούς που περιείχαν dcp (λόγω της πίεσης για τη διαχείριση της μεγάλης ροής ηλεκτρονίων που έρχονται από τις ανηγμένες dcp μέσω PQ), αλλά ιδιαίτερα μειωμένη έκφραση στον "-N" χειρισμό, σε σχέση με το control (βλ. Εικόνα 19), καθώς γνωρίζουμε ότι η έλλειψη αζώτου μπλοκάρει το κυτόχρωμα b₆f (Simionato et al., 2013; Lili Wei et al.,2014). Ο συνδυασμός αυτών των δύο χειρισμών ("dcp-N"- χειρισμός) έδειξε ενδιάμεσο φαινότυπο, όπου όμως τα επίπεδα του Cytf στον "dcp-N"- χειρισμό είναι σαφώς χαμηλότερα από τα αντίστοιχα του "dcp"- χειρισμού (Εικόνα 19).

2. Στον "dcp-N"-χειρισμό παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της δραστηρότητας του μονοπατιού της κυτοχρωματικής οξειδάσης (COX), αλλά και της εναλλακτικής οξειδάσης (AOX) στα μιτοχόνδρια σε σχέση με τον "dcp"-χειρισμό (Εικόνα 21). Δηλαδή τα κύρια αναπνευστικά μονοπάτια στον "dcp-N"-χειρισμό υποβαθμίστηκαν.

3. Τα παραπάνω οδήγησαν τις καλλιέργειες του "dcp-N"- χειρισμού να παράγουν υψηλότερα επίπεδα λιπαρών (Εικόνα 26), σαφώς μικρότερες ποσότητες μοριακού υδρογόνου (H₂) (Εικόνα 22) και μεγαλύτερη βιοαποικοδομησιμότητα των dcp (Εικόνα 23) σε σχέση με τον "dcp"- χειρισμό.

Πίνακας 4. Επιγραμματικά τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας με τις κεντρικές διαφοροποιήσεις στους διάφορους χειρισμούς σε σχέση με τον μάρτυρα. Χ: εκφράζει την τιμή του μάρτυρα, ενώ τα βελάκια υποδηλώνουν την ένταση της αυζομείωσης του εν λόγω παράγοντα σε σχέση με τον μάρτυρα.

		Χειρισμοί			
	Παράμετροι	control	-N	Dcp	dcp-N
	PSII	X	\downarrow	$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$
ງະວາ	PSI	X	$\downarrow\downarrow$	$\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$	↑ ↑
οσύν(Cytb ₆ f	X	$\downarrow\downarrow$	$\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$	↑ ↑
Φωτ	Rubisco	X	$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$
	Φωτοσυνθετική παραγωγή Ο2	X	Х	$\downarrow \downarrow \downarrow \downarrow \downarrow$	$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$
'n	COX	X	$\downarrow \downarrow \downarrow \downarrow \downarrow$	\rightarrow	$\downarrow\downarrow$
ναπνο	AOX	X	$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$	$\uparrow \uparrow$	$\downarrow\downarrow$
A	РТОХ	X	$\downarrow\downarrow$	$\uparrow \uparrow \uparrow$	$\uparrow \uparrow \uparrow \uparrow$
	dcp-Βιοαποικοδόμηση			$\uparrow \uparrow$	↑ ↑↑↑
εχνολογία	Παραγωγή Η2	X	$\downarrow\downarrow$	$\uparrow \uparrow \uparrow \uparrow$	↑
	Η2-άση	X	\downarrow	$\uparrow \uparrow \uparrow$	<u> </u>
Βιοτ	Λιπαρά	X	$\uparrow \uparrow \uparrow$	1	$\uparrow \uparrow \uparrow \uparrow$
	Άμυλο	X	1	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$

Από τα δεδομένα της βιοαποικοδόμησης, που απεικονίζονται στην Εικόνα 23, αποδεικνύεται ότι στον "dcp" γειρισμό υφίσταται έντονη βιοαποικοδομησιμότητα η dcp, ενώ σε συνθήκες έλλειψης αζώτου ("dcp-N" χειρισμός) η βιοαποικοδόμηση είναι ακόμη μεγαλύτερη (κατά 33%). Το γεγονός αυτό μπορεί πιθανόν να εξηγηθεί (τουλάχιστον εν μέρει) με βάση την λιπόφιλη φύση της dcp και άρα μπορεί να διαλύεται σε λιπαρά σταγονίδια, αφού τα κύτταρα στον "dcp-N"-χειρισμό περιέχουν περισσότερα λιπαρά από στον "dcp"-χειρισμό (βλ. Εικ.23 και Εικ. 24). Παράλληλα με την dcp ότι βιοαποικοδόμηση, στα HPLC γραφήματα εμφανίστηκαν και οι κορυφές που αντιστοιχούν στην 2-χλωροφαινόλη (2-cp) και στην φαινόλη (Εικόνα 24), αφού είναι γνωστό πως κατά την βιοδιάσπαση της dep παράγονται ως ενδιάμεσα η 2-cp και φαινόλη. Η συσσώρευση της φαινόλης είναι πολύ μεγαλύτερη στον "dcp-N" χειρισμό (~8 φορές) σε σχέση με τον "dcp" χειρισμό. Αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι αφού απουσιάζει το άζωτο, το χλωροφύκος δεν μπορεί να μεταβολήσει περαιτέρω την φαινόλη και έτσι απλά την συσσωρεύει, μιας και η απλή φαινόλη δεν είναι τόσο τοξική για τα κύτταρα (Papazi and Kotzabasis 2007).

Με την παρούσα εργασία, στον "dcp" χειρισμό κάνοντας χρήση ενός εναλλακτικού μηχανισμού παραγωγής υδρογόνου από το χλωροφύκος Scenedesmus obliquus μέσω βιοαποικοδόμησης meta-υποκατεστημένων διχλωροφαινολών, επιτεύχθηκε μια υψηλή παραγωγή υδρογόνου (3LH₂/LPCV). Στον "dcp-N" χειρισμό, ναι μεν σημειώνεται παραγωγή H₂ όμως πολύ χαμηλότερη από τα αντίστοιχα επίπεδα του "dcp" χειρισμού, παρότι έχουμε υψηλά επίπεδα υδρογενάσης (Εικόνα 22). Εν αντιθέσει με τα παραπάνω, στον "-N" χειρισμό δεν παρατηρείται καθόλου παραγωγή H₂, γεγονός που αποδεικνύει τον σημαντικό ρόλο των dcp στην παραγωγή H₂ και τον ανασταλτικό ρόλο της έλλειψης αζώτου στην εν λόγω διαδικασία.



Εικόνα 29. Απλουστευμένο λειτουργικό μοντέλο λειτουργίας του συνδυαστικού μηχανισμού [dcpβιοαποικοδόμηση / φωτοσυνθετική παραγωγή H₂ / αναπνευστική διαδικασία] για τον "dcp" και τον "dcp-N"-χειρισμό. Για περισσότερες πληροφορίες βλ. στο κείμενο της συζήτησης.

Η παρεμπόδιση ανάπτυξης του μικροφύκους στον "dcp-N" χειρισμό (Εικόνα 16) και η κατάρρευση του φωτοσυνθετικού του μηχανισμού (Εικόνα 18), μέσω της απενεργοποίησης του PSII, αλλά και ο παρεμποδισμός των κύριων αναπνευστικών μονοπατιών COX, AOX, δε φαίνεται να επηρεάζουν καθοριστικά την παραγωγή του υδρογόνου, δεδομένου ότι η μείωση του επιπέδου του O₂ σε ένα κλειστό σύστημα (ισχυρός αναστολέας της υδρογενάσης), ενεργοποιεί την υδρογενάση και την παραγωγή του μοριακού H₂. Η διακεκομμένη φαινομενικά, λόγω απενεργοποίησης του PSII, αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων επανατίθεται σε λειτουργία, αφού η ανηγμένη dcp (ενδιάμεσο του μονοπατιού της dcp βιοαποικοδόμησης) φαίνεται να λειτουργεί ως εναλλακτικός δότης ηλεκτρονίων, ενισχύοντας τη ροή ηλεκτρονίων πρός το PSI και την υδρογενάση, όπως έχει αποδειχτεί από τους Papazi et al. (2012, 2014).

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της βιοαποικοδόμησης της dcp και της παραγωγής H₂, φαίνεται πως κατά τον "dcp-N" χειρισμό το μονοκύτταρο χλωροφύκος αφιερώνει περισσότερη ενέργεια στην βιοαποικοδόμηση και λιγότερη στην παραγωγή H₂, όμως και γι αυτή την σχετικά μικρή παραγωγή H₂ σίγουρα απαιτείται και η παρουσία της dcp. Στον "dcp" χειρισμό γίνεται ακριβώς το αντίθετο. Έχουμε σαφώς μεγαλύτερη παραγωγή H₂ και σαφώς μικρότερη βιοαποικοδόμηση της dcp (Εικόνα 23 και Εικόνα 24).

Αυτό που φαίνεται να διαφοροποιεί καθοριστικά το τελικό προϊόν αυτών των δύο χειρισμών είναι τα μειωμένα επίπεδα του Cytf και κατά επέκταση του συμπλόκου Cytb₆f στον "dcp-N" χειρισμό. Αυτό περιορίζει την εν δυνάμει ροή ηλεκτρονίων από τις ανηγμένες dcp μέσω PQ και PSI στην υδρογενάση (HydA) με αποτέλεσμα τον περιορισμό της παραγωγής H₂. Αυτή η παρεμπόδιση δίνει διέξοδο στην ανηγμένη dcp να επιλέξει το μονοπάτι της βιοαποικοδόμησης της [βλ. μοντέλο λειτουργίας για τον "dcp"- και τον "dcp-N"-χειρισμό (Εικόνα 29)].

Έχει αποδειχθεί ότι σε συνθήκες έλλειψης αζώτου υπάρχει δραματική αύξηση των λιπαρών (Richardson et al., 1969; Zhila et al., 2005), αλλά και αύξηση του αμύλου, όπως αποδεικνύεται και από την παρούσα εργασία (Εικόνα 26 και 27).

Σύμφωνα με τον Redfield (1963), η βέλτιστη αναλογία που απαιτείται για την σωστή κυτταρική λειτουργία είναι C:N:P = 106:16:1. Όταν αυτή αναλογία δεν είναι επαρκής, δηλαδή σε συνθήκες έλλειψης αζώτου, τότε ο άνθρακας πιθανόν να αποθηκεύεται ως άμυλο ή λιπαρά στα κύτταρα (Jermyn1963; Redfield 1963). Ωστόσο, η αναλογία αυτή ποικίλλει σημαντικά, ανάλογα με τα είδη των φυκών και των περιβαλλοντικών συνθηκών (Redfield 1963).

Η μέτρηση των λιπαρών στους 4 χειρισμούς δείχνουν πως σε συνθήκες έλλειψης αζώτου ("-N"- και "dcp-N"-χειρισμός), έχουμε περισσότερα λιπαρά (Εικόνα 26). Αυτό συμβαίνει διότι το χλωροφύκος δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει σε άλλα μονοπάτια τον C που έχει στην καλλιέργεια και συνεπώς βιοσυνθέτει λιπαρά (Εικόνα 27). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, πρόσφατες εργασίες έδειξαν ότι η έλλειψη αζώτου σε καλλιέργειες του μικροφύκους *Chlamydomonas reinhardtii* περιορίζει την ανάπτυξη του (Kenesi et al. 2009), αυξάνει τα λιπαρά του σε επίπεδο κυττάρου (Wang et al. 2009) και οδηγεί στη σύνθεση διαφορετικών μορφών λιπιδίων και ειδικά τριγλυκεριδίων καθώς και τριακυλογλυκερολών.

Η ποσοτικοποίηση του αμύλου από την άλλη, έδειξε ότι τα επίπεδα αμύλου ήταν τα μεγαλύτερα στον "-Ν"-χειρισμό (Εικόνα 28), λόγω του ότι η παρεμπόδιση σύνθεσης πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων οδηγεί στην διοχέτευση όλου του μεταβολικού δυναμικού στην βιοσύνθεση αμύλου, όπως και λιπιδίων (Εικόνα 7), που δεν απαιτούν άζωτο. Στο "dcp-N"-χειρισμό σημειώνεται ποσοτικά το λιγότερο άμυλο ίσως λόγω της σημαντικής ενίσχυσης του μονοπατιού της dcp-βιοαποικοδόμησης, όπου ένα μεγάλο μέρος του αμύλου υπό μορφή γλυκόζης είναι πιθανόν να χρησιμοποιείται στα πλαίσια της απαιτούμενης γλυκοζυλίωσης της dcp (Petroutsos et al.,2008; Papazi and Kotzabasis 2013). Το χαμηλότερο επίπεδο του Cytb₆f στον "dcp-N" χειρισμό σης το μογογή Η₂ και ενισχύει την dcp-βιοαποικοδόμηση και την παραγωγή λιπαρών (Εικόνα 30).

Το σχετικά «παράδοξο» που αναδεικνύεται στο απλουστευμένο λειτουργικό μοντέλο λειτουργίας των βασικών μεταβολικών διαδικασιών του μονοκύτταρου χλωροφύκους Scenedesmus obliquus στους 4 χειρισμούς, είναι το γεγονός ότι στον "-N" χειρισμό έχουμε δραματική μείωση του Cytb₆f, αναστέλοντας επί της ουσίας όλη την φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων και ως εκ τούτου και την παραγωγή H₂, ενώ στον "dcp-N" χειρισμό έχουμε σημαντικά υψηλό επίπεδο του Cytb₆f. Αυτό δεν μπορεί να δικαιολογηθεί τόσο εύκολα, τη στιγμή που και οι δύο χειρισμοί έχουν έλλειψη αζώτου. Η προτεινόμενη διαφοροποίηση μεταξύ των δύο χειρισμών έγκειται στην πρόσφατη αποκωδικοποίηση της βιοενεργητικής στρατηγικής των μικροφυκών (Papazi et al., 2013), σύμφωνα με την οποία το χλωροφύκος που έχει να αντιμετωπίσει το τοξικό dcp ("dcp-N" χειρισμό), χρειάζεται μεγάλα ενεργειακά αποθέματα και ως εκ τούτου πιθανόν να προβαίνει σε καταβολισμό δευτερογενών (και όχι μόνον) ουσιών και μέσα από αυτή την διαδικασία να κερδίζει μαζί με την απαιτούμενη ενέργεια (Εικόνα 25) και άζωτο. Αυτός είναι και ο λόγος που ο εν λόγω χειρισμός μπορεί να συνθέτει και χλωροφύλλες (Εικόνα 17) κάτι που δεν μπορεί να κάνει ο "-N" χειρισμός.



Εικόνα 30. Απλουστευμένο λειτουργικό μοντέλο λειτουργίας των βασικών μεταβολικών διαδικασιών του μονοκύτταρου χλωροφύκους Scenedesmus obliquus και στους 4 χειρισμούς (από επάνω προς τα κάτω: Control, -N, dcp, dcp-N). Το πάχος των γραμμών και το μέγεθος των σχημάτων υποδηλώνουν την ένταση και την ποσότητα των αντίστοιχων παραμέτρων και διαδικασιών.

Όλα τα παραπάνω αναδεικνύουν μεταξύ άλλων συγκεκριμένες βιοενεργητικές στρατηγικές των μικροφυκών, η κατανόηση των οποίων θα θέσει στο μέλλον τις βάσεις για μία νέα βιοτεχνολογική προσέγγιση.

Βιβλιογραφία

Bishop NI. and Senger H. (1971). Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of Scenedesmus. Methods in Enzymology 23: 53–66

Boyd S. and Shelton D. (1984). Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimate sludge. Appl. Environ. Microbiol. 47: 272-277

Catalanotti C., Yang W., Posewitz MC. and Grossman AR. (2013). Fermentation metabolism and its evolution in algae. Front. Plant Sci. 4: 150

Chandra R., Goswami D. and Kalita MC. (2011). *Scenedesmus dimorphus* and *Scenedesmus quadricauda* : two potent indigenous microalgae strains for biomass production and CO₂ mitigation - A study on their growth behavior and lipid productivity under different concentration of urea as nitrogen source. J.Algal Biomass Utln.4: 42–49

Dasgupta CN., Gilbert JJ., Lindblad P., Heidorn T., Borgvang SA., Skjanes K. and Das D. (2010). Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production.International Journal of Hydrogen Energy. 35:10218-10238

Florin L., Tsokoglou A. and Happe T. (2001). A novel type of iron hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetic electron transport chain. The Journal of biological chemistry. 9: 6125–6132

Gaffron H. and Rubin J. (1942). Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. The Journal of general physiology. 2: 19–40

Golueke CG., Oswald WJ. and Gottas HB. (1957). Anaerobic digestion of Algae. Appl Microbiol. 5: 47-55.

Gaffron H. and Rubin J.(1942). Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae.JGP. 26: 219-240

Happe T. and Naber JD. (1993). Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Eur J Biochem. 214: 475-481

Happe T., Mosler B. and Naber JD. (1994). Induction, localization and metal content of hydrogenase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Eur J Biochem 222: 769-774

Hemschemeier A., Melis A. and Happe T. (2009.) Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae. Photosynth Res. 102: 523–540

Holden M. (1965). Chlorophylls in:Chemistry and biochemistry of plant pigment (T.W. Goodwin,ed) Academic Press, London pp.461-488

Huang CY. and Ferrell JE Jr. (1996). Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. Proc Natl Acad Sci. 19: 10078-10083

Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M. and Darzins A.(2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. Plant J. 54: 621-39 Julia R., Barkay T. and Ören SJ. (2001). Enhanced degradation of phenoxyacetic acid in soil by horizontal transfer of the tfdA gene encoding a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dioxygenase. FEMS Microbiology Ecology. 35: 75-84

Kenesi G., Shafik HM., Kovács AW., Herodek S. and Présing M.(2009).Effect of nitrogen forms on growth, cell composition and N₂ fixation of *Cylindrospermopsis raciborskii* in phosphorus-limited chemostat cultures. Hydrobiologia. 623: 191-202

Logothetis K., Dakanali S., Ioannidis N. and Kotzabasis K. (2004). The impact of high CO₂ concentrations on the structure and function of the photosynthetic apparatus and the role of polyamines. J. Plant Physiol. 161: 715-724

Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL. and Randal RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193: 265-75

Melis A. and Happe T. (2001). Hydrogen Production .Green algae as a aource of anergy. Plant physiology. 127: 740–748

Mitchell P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society. 41: 445–502

Nguyen DA., Datar J., Lepine F., Bauerle E., Olakanmi O., Beer K., McKay G., Siehnel R., Schafhauser J., Wang Y., Britigan BE. and Singh PK. (2011). Antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. Science. 334: 982-986

Papazi A. and Kotzabasis K. (2007). Bioenergetic strategy of microalgae for the biodegradation of phenolic compounds: exogenously supplied energy and carbon sources adjust the level of biodegradation. J.Biotechnol. 129: 706-716

Papazi A. and Kotzabasis K. (2008). Inductive and resonance effects of substituents adjust the microalgal biodegradation of toxical phenolic compounds. J.Biotechnol. 135: 366-373

Papazi A., Andronis E., Ioannidis NE., Chaniotakis N. and Kotzabasis K. (2012). High yields of hydrogen production induced by meta-substituted dichlorophenols biodegradation from the green alga *Scenedesmus obliquus*. PLoS ONE 7(11): e49037

Papazi A. and Kotzabasis K. (2013). Rational management of dichlorophenols biodegradation by the microalga *Scenedesmus obliquus*. PLoS ONE 8(4): e61682

Perin G., Segalla A., Basso S., Simionato D., Meneghesso A., Sforza E., Bertucco A. and Morosinotto T. (2014). Biotechnological optimization of light use efficiency in nannochloropsis cultures for biodiesel production. Chemical Engineering Transactions. 37: 763-768

Petroutsos D., Katapodis P., Samiotaki M., Panayotou G. and Kekos D. (2008). Detoxification of 2,4-dichlorophenol by the marine microalga *Tetraselmis marina*. Phytochemistry 69: 707-714

Robson CA. and Vanlerberghe GC. (2002). Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondriadependent and -independent pathways of programmed cell death. Plant Physiol. 129: 1908-1920

Rumeau D., Peltier G. and Cournac L. (2007). Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. Plant Cell Environ. 30: 1041-1051

Semple KT. and Cain RB. (1996). Biodegradation of phenols by the alga *Ochromonas danica*. Appl Environ Microbiol. 62: 1265–1273

Sharma KK, Schuhmann H. and Schenk PM. (2012). High Lipid Induction in microalgae for biodiesel production. Energies. 5:1532-1553

Siedow JN. and Umbach AL. (1995). Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology. Plant Cell. 7: 821-831

Strasser B. and Strasser R. (1995). Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test. In P Mathis, ed, Photosynthesis: from Light to Biosphere, Kluwer Academic Press, The Netherlands,V., pp.997–980

Van Schie PM. and Young LY. (2000). Biodegradation of phenol: Mechanisms and applications. J.Bioremediat. 4: 1-18

Vignais PM., Billoud B. and Meyer J. (2001). Classification and phylogeny of hydrogenases. FEMS microbiology reviews. 25: 455–501

Wang X. and Chapman KD. (2013). Lipid signaling in plants. Front Plant Sci.4:216

Winkler M., Hemsehemeier A., Gotor C., Melis A. and Happe T. (2002).Hydrogenase in green algae: photofermentation and hydrogen evolution under sulfur deprivation. Int J Hyd Ener.27:1431–1439

Yang S., Wu RS. and Kong RY. (2002). Biodegradation and enzymatic responses in the marine diatom *Skeletonema costatum* upon exposure to 2,4-dichlorophenol. Aquat Toxicol. 59: 191-200