ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Χαρακτηρισμός ενός στελέχους Chlorella που απομονώθηκε από ποταμό στην Κρήτη και πιθανές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και διαχείριση αποβλήτων

Στρατηγάκης Ναπολέων-Χριστόφορος

Επιβλέπων Καθηγητής: Δημήτριος Γανωτάκης

Ηράκλειο 2020

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

GENERAL POSTGRADUATE PROGRAMME

LABORATORY OF BIOCHEMISTRY

Master Thesis

Characterization of a Chlorella strain isolated from a river in Crete and possible applications in food industry and waste management

Stratigakis Napoleon-Christoforos

Thesis Supervisor: Demetrios Ghanotakis

Heraklion 2020

Στην οικογένειά μου, και σε όλους όσους με στήριξαν και στάθηκαν δίπλα μου σαν μια δεύτερη οικογένεια...

Εξεταστική Επιτροπή (αλφαβητικά)

Γανωτάκης Δημήτριος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης (Επιβλέπων)

Κοτζαμπάσης Κυριάκος

Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Παυλίδης Ιωάννης

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας τις μεταπτυχιακές μου σπουδές και φτάνοντας στο τέλος της συγγραφής της διατριβής, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους ανθρώπους με τους οποίους είχα την τύχη να συνεργαστώ κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για τις υψηλού επιπέδου σπουδές που μου προσέφερε τόσο σε προπτυχιακό αλλά και σε μεταπτυχιακό επίπεδο καθώς και για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε για να μπορέσω να φέρω εις πέρας την Μεταπτυχιακή μου Διατριβή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή μου Δημήτριο Γανωτάκη, καθώς μου έδωσε τη δυνατότητα να εργαστώ στο εργαστήριό του, τόσο για την εκπόνηση της διπλωματικής, όσο και της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Υπήρξε πάντα διαθέσιμος στο να προσφέρει βοήθεια και συμβουλές, για επιστημονικά ή όχι θέματα, όποτε το είχα ανάγκη. Η εμπειρία του στο πεδίο της φωτοσύνθεσης και οι συμβουλές του καθ' ολη τη διάρκεια της συνεργασίας μας υπήρξαν καταλυτικές για τη βελτίωση και την ωρίμανσή μου ως επιστήμονας. Τα θέματα με τα οποία ασχολήθηκα κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο με έκαναν να γνωρίσω και να αγαπήσω ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον κομμάτι της επιστήμης. Επιπλεόν, θέλω να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αναθέτοντας μου ένα αρκετά σημαντικό και καινούριο για το εργαστήριο θέμα για τη διατριβή μου. Η καθοδήγησή του υπήρξε καθοριστική για την ολοκλήρωση της διατριβής μου.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής μου Επιτροπής, Καθηγητές Κυριάκο Κοτζαμπάση και Ιωάννη Παυλίδη, που δέχθηκαν να διαβάσουν και να αξιολογήσουν την παρούσα διατριβή. Οι παρατηρήσεις και τα σχόλιά τους συνέβαλαν σημαντικά στη διαμόρφωση της τελικής μορφής του κειμένου. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Ιωάννη Παυλίδη για τη διάθεσή του να με συμβουλέψει σε διάφορα σημεία της διατριβής μου, και ειδικά στο κομμάτι που αφορούσε το γενετικό χαρακτηρισμό του στελέχους. Επιπλέον οφείλω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Γεώργιο Τσιώτη, καθώς και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Απόστολο Σπύρο για τον προσωπικό χρόνο που αφιέρωσαν και για πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχαν. Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Πόπη Καβελάκη και την κυρία Μαρία Φουσκάκη για τη βοήθεια και την τεχνική καθοδήγηση σε διάφορα κομμάτια της εργασίας.

Στη συνέχεια θα ήθελα να δώσω και ένα εγκάρδιο ευχαριστώ στα μέλη της ομάδας του εργαστηρίου με τα οποία συνεργαστήκαμε εξαιρετικά σε ένα πολύ ευχάριστο περιβάλλον, και πολύ ιδιαίτερα στα άτομα με τα οποία είχα την τύχη να δουλέψω πιο στενά, περνώντας αρκετές ώρες μαζί εντός και εκτός του εργαστηρίου. Πέρα από τα μέλη του δικού μου εργαστηρίου, θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω και τα μέλη του εργαστηρίου του κυρίου Τσιώτη και του κυρίου Παυλίδη για τη συνεργασία, το ζεστό και ευχάριστο κλιμα που διαμορφώθηκε, και για το ότι ένιωσα το εργαστήριο σαν δεύτερο σπίτι μου.

Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διδάκτωρ Θεοχάρη Νάζο, ο οποίος υπήρξε κάτι κάτι παραπάνω από μέντοράς μου. Με υπομονή και πολλή όρεξη με έκανε να γνωρίσω ένα άγνωστο και τόσο ενδιαφέρον κομμάτι της επιστήμης, από τη διπλωματική μου εργασία, μέχρι και να ολοκληρώσω την παρούσα διατριβή. Η υποστήριξη, μαζί με τις συμβουλές και τις γνώσεις που μου μετέδωσε σε πολλά και διαφορετικά θέματα τα τρια χρόνια που συνεργαστήκαμε ήταν καθοριστικές όχι μόνο για την ολοκληρωση της εργασίας, αλλά και για την ουσιαστική πρόοδό μου ως επιστήμονας. Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Διδάκτωρ Ελευθερία Βαλσαμή και τον Υποψήφιο Διδάκτορα Γιώργο Σφενδουράκη για τη διάθεση και το χρόνο που αφιέρωσαν να με διδάξουν νέα πράγματα και καινούργιες τεχνικές, για την άψογη συνεργασία μας όποια φορά δουλέψαμε μαζί, αλλά και για την υποστήριξή τους όποτε αυτό χρειάστηκε. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Μανώλη Κοκαράκη για τις αμέτρητες ώρες που περάσαμε μαζί, για τα ξενύχτια και για τη στήριξη που δείξαμε ο ένας στον άλλο όταν υπήρξε αυτή η ανάγκη. Δουλεύοντας και περνώντας πολλές δυσκολίες μαζί του, δεν απέκτησα απλά έναν καλό και αξιόπιστο συνεργάτη, αλλά έναν πολύ κοντινό φίλο, και είμαι σίγουρα τυχερός που είχα την ευκαιρία να τον έχω στο πλευρό μου στα εύκολα και στα δύσκολα. Παράλληλα θα ήθελα δώσω ένα μεγάλο ευχαριστώ και στην Ελένη Πολωνιατάκη, με την οποία συνεργάστηκα από προπτυχιακός φοιτητής, μέχρι και να τελειώσω τις μεταπτυχιακές μου σπουδές. Ζήσαμε στο εργαστήριο όμορφες στιγμές, αλλά και ξεπεράσαμε μαζί δύσκολες και απαιτητικές καταστάσεις. Επιπλέον, θα ήθελα να πω ένα ευχαριστώ στη Σοφία Λιουδάκη, τη διπλωματικό που δουλέψαμε μαζί σε πολύ απαιτητικά ωράρια το τελευταίο εξάμηνο του μεταπτυχακού μου. Η όρεξη της για δουλεία και η διάθεσή της να μάθει νέα πράγματα αποτέλεσε κίνητρο και για εμένα, ενώ η βοήθειά της στο πειραματικό μέρος ήταν κρίσιμη για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Θα ήθελα ακόμα να αποδώσω ένα ευχαριστώ και στον Παναγιώτη Κελεφιώτη-Στρατιδάκη από το εργαστήριο του κύριου Παυλίδη, με τον οποίο μοιράστηκαμε πολλές ευχάριστες εμπειρίες, ανταλλάξαμε απόψεις αλλά και στηρίξαμε ο ένας τον άλλο στις δυσκολίες που παρουσιάστηκαν.

Φύσικα θα ήταν λάθος να μην ευχαριστήσω θερμά τους καλούς μου φιλους και κοντινούς μου ανθρώπους, τόσο εντός, όσο και εκτός του Ηρακλείου, που με στηρίξαν με την αγάπη τους και έκαναν ομορφότερες τις καλές στιγμές, αλλά και με ενθάρρυναν στις δύσκολες στιγμές σε όλα τα χρόνια των σπουδών μου! Ένα μεγάλο ευχαριστώ φυσικά θα ήθελα να αποδώσω και στην οικογένειά μου, και ιδιαίτερα στους γονείς και στον αδερφό μου, οι οποίοι με πολλή αγάπη και υπομονή με βοήθησαν να φτάσω σήμερα εδώ και κάθε μέρα να γίνομαι καλύτερος!

Είναι ο χρόνος που έχεις ξοδέψει για το τριαντάφυλλό σου

που κάνει το τριαντάφυλλό σου τόσο σημαντικό.

[Antoine de Saint-Exupéry – «Ο Μικρός Πρίγκηπας», 1943]

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Ναπολέων-Χριστόφορος Στρατηγάκης

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Ημερομηνία γέννησης: 15/06/1994

Διεύθυνση: Ηράκλειο Κρήτης, 71409, Ελλάδα

Τηλέφωνο: (+30) 6949255400

Διεύθυνση ηλεκτρονικού ταχυδρομείου: napoleonstr@gmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

09/2017 – Σήμερα: Γενικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Χημείας με Κατεύθυνση στη Βιοχημεία

Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο (Ελλάδα)

Μέσος όρος μεταπτυχιακών μαθημάτων: 8,92 "Άριστα"

Τίτλος μεταπτυχιακής διατριβής: *Χαρακτηρισμός ενός στελέχους Chlorella που απομονώθηκε από ποταμό στην Κρήτη και πιθανές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και διαχείριση αποβλήτων*. (Επιβλέπων Καθηγητής: Δημήτριος Γανωτάκης)

09/2012 – 09/2017: Πτυχίο Χημείας

Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο (Ελλάδα)

Βαθμός Πτυχίου: 7.2 "Λίαν Καλως"

Διπλωματική εργασία: *Μελέτη της επίδρασης μιας σειράς αιθέριων ελαίων στην ανάπτυξη φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών.* (Επιβλέπων Καθηγητής: Δημήτριος Γανωτάκης)

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

09/2019 – Σήμερα: **Επιστημονικός Συνεργάτης** στο Ερευνητικό Πρόγραμμα "*Κατεργασία αποβλήτων τυροκομείου με φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς με σκοπό την παραγωγή εμπλουτισμένων ζωοτροφών*".
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, Επιστημονικά υπεύθυνος: Καθ. Δημήτριος Γανωτάκης

09/2018–10/2019: **Επιστημονικός Συνεργάτης** στο Ερευνητικό Πρόγραμμα "*Χαρακτηρισμός ενός φωτοσυνθετικού μικροοργανισμού με ικανότητα παραγωγής εξωπολυσακχαριτών*".
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, Επιστημονικά υπεύθυνος: Καθ. Δημήτριος Γανωτάκης

07/2015–09/2015: **Πρακτική άσκηση** στο Γενικό Χημείο του Κράτους, Χημική Υπηρεσία Ηρακλείου Κρήτης, Ηράκλειο (Ελλάδα).
Ανάλυση και ποιοτικός έλεγχος σε δείγματα αλκοολούχων ποτών, οίνων, ελαίων και μελιών, χρησιμοποιώντας μεθόδους τιτλοδότησης, υγρής χρωματογραφίας HPLC, αγωγιμομετρίας και φασματοφωτομετρίας.

ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Μητρική Γλώσσα: Ελληνικά

Ξένες Γλώσσες: Αγγλικά: ECCE (Examination for the Certificate of Competency in English) B2

Γερμανικά: Goethe-Zertifikat B1

Ψηφιακή δεξιότητα: ECDL Progress Certificate:

- *Χρήση του Η/Υ και Διαχείριση αρχείων*
- *Επεξεργασία κειμένου*
- *Υπολογιστικά φύλλα*
- *Βάσεις δεδομένων*
- *Παρουσιάσεις*
- *Υπηρεσίες Διαδικτύου*

Οργανωτικές δεξιότητες: Μέλος της Οργανωτικής Επιτροπής του 21ου Συνεδρίου Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Ελλάδα (15-17 Μάϊου 2019).

Τεχνικές δεξιότητες: Καλλιέργειες βακτηρίων, μυκήτων, καρκινικών κυττάρων, χλωροφυκών και κυανοβακτηρίων, φυγοκέντριση, φθορισμομετρία, φωτομετρία UV-Vis, τεχνικές υγρής χρωματογραφίας (HPLC), πολαρογραφία, απομόνωση και χαρακτηρισμός φυσικών προϊόντων από φυτικούς οργανισμούς, προσδιορισμός αντιμικροβιακών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων, τεχνικές ηλεκτροφόρησης, κοινές τεχνικές κλωνοποίησης, PCR, προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων για μελέτη οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.

ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Δημοσιεύσεις: Nazos, T. T., Kokarakis, E. J., Valsami, E. A., **Stratigakis N. C.**, Poloniataki E. G., Sfendourakis, G. P., Ghanotakis, D. F. Characterization of a novel herbicide and antibiotic-resistant *Chlorella* sp. with an extensive extracellular matrix. *Photosynth Res* **143,** 315–334 (2020). https://doi.org/10.1007/s11120-020-00710-5

Συνέδρια: **7η Ημερίδα Χημείας στη μνήμη της Δρ Μαρίας Χατζημαρινάκη**, Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα, 30 Νοεμβρίου 2019. "*Χαρακτηρισμός ενός στελέχους Chlorella που απομονώθηκε από ποταμό στην Κρήτη και πιθανές εφαρμογές του*" (Προφορική παρουσίαση).

20ό Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας. Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα, 25-27 Ιουνίου 2018. "*Μελέτη της επίδρασης μιας σειράς αιθέριων ελαίων στην ανάπτυξη φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών*" Θεοχάρης Νάζος, **Ναπολέων Χριστόφορος Στρατηγάκης**, Αριστείδης Μίχογλου-Σεργίου και Δημήτριος Γανωτάκης (Προφορική ομιλία).

Πιστοποιήσεις: Certificate of Scientific Writing Workshop, Department of Chemistry, School of Sciences and Engineering, University of Crete, Greece, Heraklion, Greece (2019).

CURRICULUM VITAE

Napoleon-Christoforos Stratigakis

PERSONAL INFORMATION

Date of birth: 15/06/1994

Address: Heraklion, Crete, 71409, Greece

Phone number: (+30) 6949255400

E-mail: napoleonstr@gmail.com

EDUCATION AND TRAINING

09/2017 – Today: Master of Science (MSc): General Postgraduate Program in Chemistry (Biochemistry)

Department of Chemistry, School of Sciences and Engineering, University of Crete, Heraklion (Greece)

Average Grade of Examined Subjects: 8.92/10 "Excellent"

Master Thesis title: *Characterization of a Chlorella strain isolated from a river in Crete and possible applications in food industry and waste management*. (Thesis Supervisor: Professor Demetrios Ghanotakis)

09/2012 – 09/2017: Degree in Chemistry

Department of Chemistry, School of Sciences and Engineering, University of Crete, Heraklion (Greece)

Grade: 7.2/10 "Very good"

Bachelor Thesis title: *A study of the effects of essential oils on the growth of photosynthetic microorganisms.* (Thesis Supervisor: Professor Demetrios Ghanotakis)

WORK AND RESEARCH EXPERIENCE

09/2019 – Today: **Research Associate** in the research program *"Treatment of dairy waste with photosynthetic microorganisms for the production of enriched animal feed"*.
University of Crete, Department of Chemistry, P.I.: Professor Demetrios Ghanotakis

09/2018–10/2019: **Research Associate** in the research program *"Characterization of a photosynthetic microorganism capable of producing extracellular polysaccharides"*.
University of Crete, Department of Chemistry, P.I.: Professor Demetrios Ghanotakis

07/2015–09/2015: **Internship** at the General Chemical State Laboratory, Heraklion (Greece).
Analysis and quality control of samples of alcoholic beverages, wine, oil and honey using titration, conductivity, liquid chromatography (HPLC) and spectrophotometric methods.

PERSONAL SKILLS

Mother Tongue: Greek

Foreign Languages: English: ECCE (Examination for the Certificate of Competency in English) B2

German: Goethe-Zertifikat B1

Digital competence: ECDL Progress Certificate:

- *Computer Usage and File Management*
- *Word processing*
- *Spreadsheets*
- *Databases*
- *Presentations*
- *Internet services*

Organisational/ managerial skills: Member of the Organizing Committee of the 21st Postgraduates' Conference on Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece, (May 15-17 2019).

Job related skills: Culture methods for bacteria, fungi, tumor cells, microalgae and cyanobacteria, centrifugation, UV-Vis and fluorescence spectroscopy, chromatographic techniques (HPLC), polarography, isolation and characterization of natural products from plants, determination of antimicrobial and antioxidant properties, electophoresis, common cloning techniques, PCR, preparation of biological samples for optical and electron microscopy studies.

ADDITIONAL INFORMATION

Publications: Nazos, T. T., Kokarakis, E. J., Valsami, E. A., **Stratigakis N. C.**, Poloniataki E. G., Sfendourakis, G. P., Ghanotakis, D. F. Characterization of a novel herbicide and antibiotic-resistant *Chlorella* sp. with an extensive extracellular matrix. *Photosynth Res* **143,** 315–334 (2020). https://doi.org/10.1007/s11120-020-00710-5

Conferences & Seminars: **7th Seminar of the Chemistry Department in the memory of Dr. Maria Chatzimarinaki.** Heraklion, Crete, Greece, November 30, 2019. Oral presentation entitled: "*Characterization of a Chlorella strain isolated from a river in Crete and its possible applications*".

20th Postgraduates' Conference on Chemistry, Heraklion, Crete, Greece, June 25-27 2018.. "*A study of the effects of essential oils on the growth of photosynthetic microorganisms*" Theocharis Nazos, **Napoleon Christoforos Stratigakis**, Aristeidis Michoglou-Sergiou and Demetrios Ghanotakis (Oral Presentation).

Certifications: Certificate of Scientific Writing Workshop, Department of Chemistry, School of Sciences and Engineering, University of Crete, Greece, Heraklion, Greece (2019).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός ενός στελέχους φωτοσυνθετικού μικροοργανισμού που ανήκει στο γένος *Chlorella*, το οποίο απομονώθηκε από ευτροφικό σημείο του ποταμού Γιόφυρου στο Ηράκλειο Κρήτης, στα πλαίσια προηγούμενης διατριβής του εργαστηρίου. Ο σκοπός ήταν να αξιολογηθεί ως υποψήφιο στέλεχος για εφαρμογές στη βιοαποκατάσταση υγρών βιομηχανικών λυμάτων με υψηλό οργανικό φορτίο.

Στο πρώτο μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε γενετικός χαρακτηρισμός του μικροφύκους, μελέτη ιδιοτήτων που αφορούν την κυτταρική ανάπτυξη, καθώς και η ανθεκτικότητά του ενάντια σε χημικούς αναστολείς. Η αλληλούχιση περιοχής του 18S rRNA γονιδίου και η φυλογενετική ταξινόμηση του μικροοργανισμού έδειξαν ότι ανήκει στο γένος *Chlorella*. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ανάπτυξη του στελέχους σε φωτοαυτότροφες και φωτοετερότροφες συνθήκες. Το μικροφύκος εμφάνισε υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης σε χαμηλές συνθήκες φωτισμού κατά την ετερότροφη ανάπτυξη. Παράλληλα, αξιολογήθηκε και η φωτοσυνθετική ικανότητα του μικροοργανισμού, σε διάφορες εντάσεις φωτισμού. Από τη μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν αυτότροφα, παρουσίασαν υψηλότερη φωτοσυνθετική δραστηριότητα, ενώ αντίθετα ο φωτοκορεσμός σημειώθηκε σε υψηλότερες εντάσεις φωτισμού για τις φωτοετερότροφες καλλιέργειες του στελέχους. Το μικροφύκος εμφάνισε παρόμοια περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και στις δύο συνθήκες. Η βιομάζα των κυττάρων που αναπτύχθηκαν φωτοαυτότροφα περιείχε υψηλότερο περιεχόμενο σε υδατάνθρακες και χρωστικές και χαμηλότερο ποσοστό λιπιδίων σε σχέση με αυτά που αναπτύχθηκαν φωτοετερότροφα. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι το στέλεχος *Chlorella* ήταν ικανό να αναπτυχθεί παρουσία μιας σειράς χημικών αναστολέων (ζιζανιοκτόνα και αντιβιοτικά) που μελετήθηκαν σε συγκεντρώσεις πολύ υψηλότερες από εκείνες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Η ανθεκτικότητα αυτή αποδόθηκε στην παρουσία μιας προστατευτικής εξωκυττάριας μήτρας πολυσακχαρίτη.

Στο δεύτερο μέρος μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης της *Chlorella* σε θρεπτικά μέσα με βάση γαλακτοκομικά απόβλητα. Διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να προσαρμοστούν στα υγρά απόβλητα, με την ανάπτυξη να περιορίζεται από την έλλειψη κάποιων θρεπτικών στοιχείων. Έτσι, ο εμπλουτισμός των αποβλήτων με μικρές ποσότητες άλλων θρεπτικών συστατικών επέτρεψε την ανάπτυξη σε βαθμό συγκρίσιμο με εκείνο που παρατηρείται σε τυπικές εργαστηριακές συνθήκες. Παράλληλα, αξιολογήθηκε η ικανότητα

βιοαποκατάστασης των αποβλήτων από το στέλεχος, με τη μελέτη απομάκρυνσης σακχάρων με υψηλό ρυπαντικό φορτίο από αυτά. Τέλος, προσδιορίστηκε το βιοχημικό περιεχόμενο των κυττάρων που αναπτύχθηκαν στα απόβλητα, το οποίο ήταν παρόμοιο με εκείνο που βρέθηκε για τα φωτοαυτότροφα κύτταρα.

Λέξεις κλειδιά: Φωτοσύνθεση, μικροφύκη, *Chlorella*, γονίδιο 18S rRNA, ανάπτυξη, φωτοσυνθετική ικανότητα, βιοαποκατάσταση, γαλακτοκομικά απόβλητα

ABSTRACT

The present study focuses on the characterization of a novel *Chlorella* strain isolated from a eutrophic site at Giofyros River (Heraklion, Crete, Greece). The aim of this study was to evaluate this microalga for applications in the bioremediation of rich in organic matter industrial waste waters.

The first part of this thesis focuses on the genetic characterization of the strain, the study of a broad range of properties related to cell growth rate, as well as its resistance to common chemical inhibitors. 18S rRNA gene analysis as well as the Neighbor- joining phylogenetic tree inferred from partial 18S rRNA gene sequence, showed that this microalga belongs to the *Chlorella* genus. Photoheterotrophically grown cells achieved remarkably high growth rates, despite the low light intensities used in the experiments; the photosynthetic rate under variouslight conditions was assessed as well. Higher levels of photosynthetic activity were observed for photoautotrophic cells, while photoheterotrophic cells were more tolerant to higher light intensities. Photoautotrophic cells were found to contain higher amounts of carbohydrates and photosynthetic pigments, while their photoheterotrophic counterparts showed a slightly elevated lipid content. Under both growth conditions, the cells did contain similar protein levels. Furthermore, the strain was found to be particularly resistant to the deleterious effects of chemical inhibitors, even at the relatively high concentrations tested. This ability was attributed to an extensive extracellular polysaccharide matrix, which seems to play a protective role for cell homeostasis maintenance.

In the second part of this thesis, the ability of the isolated *Chlorella* strain to grow in dairy waste-waters was investigated. The cells were able to acclimate to the wastewater media; however the growth was limited due to the lack of appropriate nutrients. Thus, the enrichment of dairy waste-waters with low amounts of nutrients allowed higher cell growth rates. Moreover, the bioremediation of the waste-waters by the microalga was evaluated through the removal of sugars in the media. *Chlorella* cells grown in media supplemented with dairy waste were found to have biochemical content similar to the one observed with photoautotrophic grown cells.

Keywords: Photosynthesis, microalgae, *Chlorella*, 18S rRNA gene, growth, photosynthetic activity, bioremediation, dairy wastewaters

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....19
ABSTRACT.....21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....29
1.1 Φωτοσύνθεση.....31
1.2 Φθορισμός χλωροφύλλης.....32
1.3 Μικροφύκη.....34
1.4 Μικροφύκη του γένους *Chlorella*.....35
1.5 Μικροφύκη του γένους *Chlorella* στην παραγωγή τροφίμων.....36
1.6 Μικροοργανισμοί από επιβαρυμένα περιβάλλοντα και βιοαποκατάσταση.....38
1.7 Μικροφύκη του γένους *Chlorella* στη βιοαποκατάσταση.....39
1.8 Αναστολείς της φωτοσύνθεσης και αντιβιοτικά.....41
1.9 Σκοπός της διατριβής.....43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΥΣ.45
2.1 Εισαγωγή.....47
2.2 Σκοπός.....48
2.3 Πειραματικό μέρος.....49
2.3.1 Οργανισμός και συνθήκες ανάπτυξης.....49
2.3.2 Μελέτη της ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε φωτοαυτότροφες και φωτοετερότροφες συνθήκες.....50
2.3.3 Μετρήσεις ξηρής βιομάζας κυττάρων.....52
2.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών.....52
2.3.5 Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού.....53
2.3.6 Πολαρογραφικός προσδιορισμός ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου 53
2.3.7 Προσδιορισμός βιοχημικού περιεχομένου του μικροφύκους.....56
2.3.8 Παρασκευή πειραματικών καλλιεργειών για τη μελέτη της ανάπτυξης και της ανθεκτικότητας του στελέχους *Chlorella* παρουσία ζιζανιοκτόνων και αντιβιοτικών....58
2.3.8 Παρασκευή χημειοδεκτικών βακτηριακών κυττάρων.....60
2.3.9 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* με πλασμιδιακό DNA.....61
2.3.10 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....62
2.3.11 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....62
2.3.12 Απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα του απομονωμένου μικροφύκους....65
2.3.13 Πολλαπλασιασμός με PCR, κλωνοποίηση και αλληλούχιση περιοχής του 18S rDNA γονιδίου.....65

2.3.14 Ανάλυση της αλληλουχίας και φυλογενετική ταξινόμηση του απομονονωμένου μικροοργανισμού 67
2.4 Αποτελέσματα και συζήτηση 68
2.4.1 Ταυτοποίηση, γενετικός και φυλογενετικός χαρακτηρισμός του απομονωμένου στελέχους *Chlorella*. 68
2.4.2 Μελέτη ανάπτυξης του απομονωμένου στελέχους *Chlorella*. 71
2.4.3 Μελέτη της φωτοσυνθετικής ικανότητας του απομονωμένου στελέχους *Chlorella*. 73
2.4.4 Προσδιορισμός βιοχημικού περιεχομένου του στελέχους *Chlorella*. 75
2.4.5 Μελέτη ανθεκτικότητας του στελέχους *Chlorella* ενάντια σε αναστολείς της φωτοσύνθεσης και αντιβιοτικά. 77
2.5 Συμπεράσματα 84
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *CHLORELLA* ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ 87
3.1 Εισαγωγή 89
3.2 Σκοπός 90
3.3 Πειραματικό μέρος 91
3.3.1 Δείγμα υγρών γαλακτοκομικών αποβλήτων και πρωτογενής κατεργασία τους. 91
3.3.2 Προσδιορισμός ολικών στερεών στα απόβλητα. 91
3.3.3 Προσδιορισμός σακχάρων στα απόβλητα με τη μέθοδο θυμόλης-θειικού 92
3.3.4 Οργανισμός και συνθήκες ανάπτυξης 92
3.3.5 Παρασκευή πειραματικών καλλιεργειών για την ανάπτυξη του στελέχους *Chlorella* sp.σε θρεπτικά μέσα με βάση γαλακτοκομικά απόβλητα 92
3.3.6 Ποσοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών 94
3.3.7 Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού 94
3.3.8 Πολαρογραφικός προσδιορισμός ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου 94
3.3.9 Προσδιορισμός βιοχημικού περιεχομένου του μικροφύκους ανεπτυγμένο σε θρεπτικά μέσα με βάση γαλακτοβιομηχανικά απόβλητα 94
3.4 Αποτελέσματα και συζήτηση 96
3.4.1 Πρωτογενής κατεργασία και προσδιορισμός φυσικοχημικών παραμέτρων στα υγρά γαλακτοκομικά απόβλητα 96
3.4.2 Γαλακτοκομικά απόβλητα ως βάση για μέσο καλλιέργειας του στελέχους *Chlorella* sp.: Σχεδιασμός θρεπτικού μέσου και επιλογή συνθήκης ανάπτυξης 97
3.4.3 Γαλακτοκομικά απόβλητα ως βάση για μέσο καλλιέργειας του στελέχους *Chlorella* sp.: Βελτιστοποίηση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας 100
3.4.4 Γαλακτοκομικά απόβλητα ως βάση για μέσο καλλιέργειας του στελέχους *Chlorella* sp.: Μελέτη απομάκρυνσης σακχάρων από τα απόβλητα 103

3.4.5 Γαλακτοκομικά απόβλητα ως βάση για μέσο καλλιέργειας του στελέχους *Chlorella* sp.: Προσδιορισμός βιοχημικού περιεχομένου των κυττάρων 105
3.5 Συμπεράσματα 107
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ 109
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΠΕΡΙΟΧΗΣ 18S rRNA ΓΟΝΙΔΙΟΥ 115
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 117

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

a:	Η κλίση της αρχικής γραμμικής αύξησης των καμπυλών κατά τον φωτοκορεσμό
BOD:	Βιοχημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (Biochemical Oxygen Demand)
bp:	Ζεύγη βάσεων (Base Pairs)
BSA:	Αλβουμίνη βόειου ορού (Bovine Serum Albumin)
C_a:	Συγκέντρωση χλωροφύλλης-a
C_b:	Συγκέντρωση χλωροφύλλης-b
C_{x+c}:	Συγκέντρωση ολικών καροτενοειδών και ξανθοφυλλών
Chl_a:	Χλωροφύλλη-a
COD:	Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand)
DCMU:	3-(3,4-διχλωροφαινυλο)-1,1-διμεθυλο-ουρία [(3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea)]
DCW:	Ξηρή βιομάζα κυττάρων (Dry Cell Weight)
DW:	Γαλακτοκομικά απόβλητα (Dairy Waste)
F_{max}:	Μέγιστη εκπομπή φθορισμού
F_o:	Εκπομπή φθορισμού τη χρονική στιγμή t=0
F_v:	F_{max}-F_o
F_v/F_{max}:	Μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση
Fw:	Πρόσθιος Εκκινητής (Forward Primer)
I_s:	Η ένταση του φωτός κατά τη μετάβαση στη φωτοκορεσμένη φωτοσύνθεση
K_I:	Η σταθερά για το ήμισυ του κορεσμού
OD:	Οπτική πυκνότητα καλλιέργειας (Optical Density)
PCR:	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)
P_{max}:	Ο ρυθμός της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας υπό φωτοκορεσμό

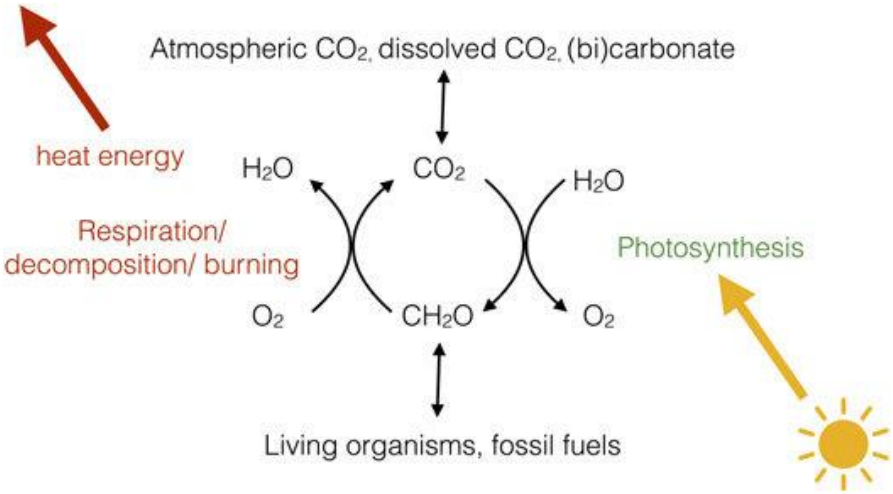
PMSF:	Φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλο φθορίδιο (Phenylmethylsulfonyl fluoride)
Rv:	Ανάστροφος Εκκινητής (Reverse primer)
SDS:	Δωδεκανοθειϊκό νάτριο (Sodium dodecyl sulfate)
t_o:	Το κέντρο της σιγμοειδούς καμπύλης Boltzmann
t:	Χρόνος μετρημένος σε ημέρες
TAP:	Θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη μικροφυκών (Tris-Acetate-Phosphate)
TAP-C:	Τροποιημένο θρεπτικό μέσο TAP, χωρίς την προσθήκη οξικού οξέος
X_t:	Ξηρό βάρος των κυττάρων σε χρόνο t
μ:	Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φωτοσύνθεση

Η φωτοσύνθεση ορίζεται ως η φυσικοχημική διαδικασία μέσω της οποίας οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί χρησιμοποιούν την φωτεινή ενέργεια για να συνθέσουν οργανικές ενώσεις [1]. Η διαδικασία επιτελείται από οργανισμούς που ονομάζονται φωτοαυτότροφοι. Η φωτοσύνθεση χωρίζεται σε οξυγονική και μη- οξυγονική. Κατά την οξυγονική φωτοσύνθεση παράγεται οξυγόνο ως παραπροϊόν της διαδικασίας. Στους οργανισμούς που πραγματοποιούν οξυγονική φωτοσύνθεση περιλαμβάνονται τα ανώτερα φυτά, τα μικροφύκη και τα κυανοβακτήρια.

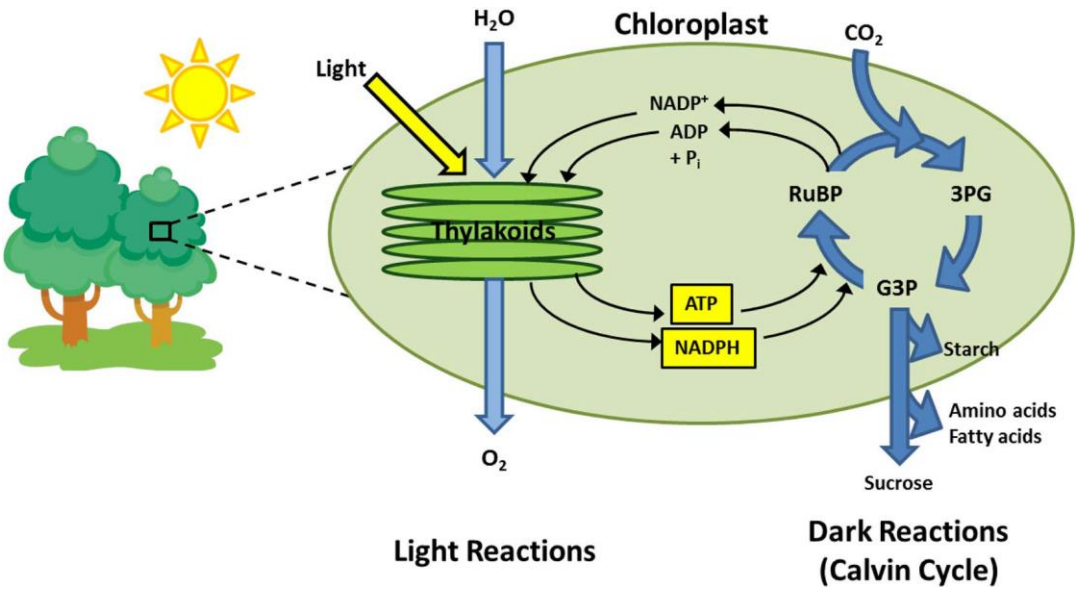
Μέσω της φωτοσύνθεσης δεσμεύεται η ηλιακή ενέργεια και μετατρέπεται σε χημική και έτσι επιτυγχάνεται η διαρκής τροφοδοσία της ζωής στη βιόσφαιρα με ενέργεια. Κατά τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης πραγματοποιείται η μετατροπή του ανόργανου άνθρακα (CO_2) σε οργανικό (υδατάνθρακες και οργανικές ενώσεις). Η φωτοσύνθεση είναι μια από τις σημαντικότερες βιολογικές διεργασίες στον πλανήτη, καθώς μέσω αυτής εξασφαλίζεται η ύπαρξη και η διατήρηση της ζωής.



Εικόνα 1: Ο παγκόσμιος κύκλος του άνθρακα. Διακρίνεται η σχέση των διαδικασιών της φωτοσύνθεσης και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [2].

Η φωτοσύνθεση (στα μικροφύκη και στα ανώτερα φυτά) λαμβάνει χώρα στις θηλακοειδείς μεμβράνες των χλωροπλαστών. Εκεί οι φωτοσυνθετικές χρωστικές απορροφούν ενέργεια υπό μορφή φωτονίων και τη διοχετεύουν στα κέντρα αντίδρασης. Η φωτοσύνθεση περιλαμβάνει δύο διακριτά στάδια: τις φωτεινές (φωτοεξαρτώμενες) και τις σκοτεινές (φωτοανεξάρτητες) αντιδράσεις. Στις φωτεινές αντιδράσεις λαμβάνει χώρα η

οξείδωση του νερού με τη βοήθεια του ηλιακού φωτός και τα προϊόντα των αντιδράσεων αυτών είναι χημική ενέργεια ως ATP και αναγωγική ισχύς ως NADPH. Οι σκοτεινές αντιδράσεις (κύκλος του Calvin) είναι ανεξάρτητες από την παρουσία φωτός και αξιοποιούν τα προϊόντα των φωτεινών αντιδράσεων για τη σύνθεση μεταβολιτών από CO_2 [1, 3].



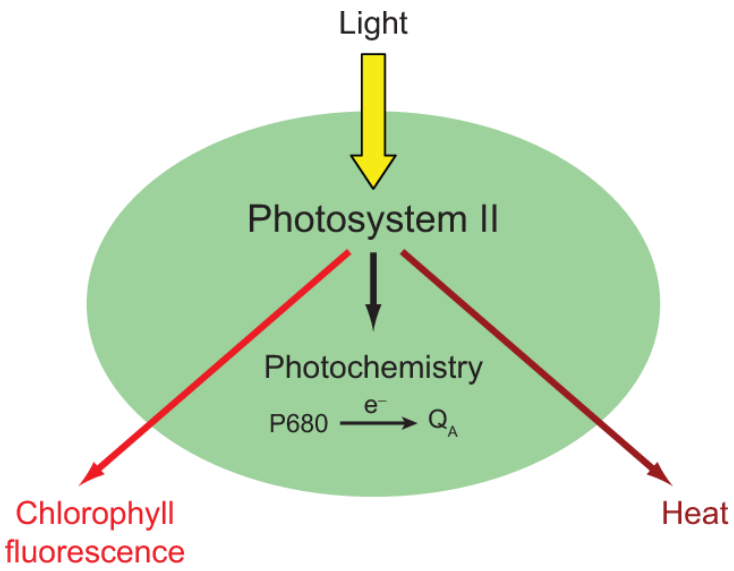
Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση των φωτεινών και των σκοτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [4].

1.2 Φθορισμός χλωροφύλλης

Από το σύνολο της φωτονιακής ενέργειας που απορροφάται από τις χλωροφύλλες, ένα μόνο μέρος χρησιμοποιείται για τη φωτοσύνθεση με σκοπό την παραγωγή ATP και NADPH (φωτοχημική απόσβεση), ενώ το υπόλοιπο μέρος διαχέεται με τη μορφή θερμότητας ή φθορισμού (μη φωτοχημική απόσβεση) [5]. Αυτή η διαχείριση γίνεται από το φωτοσυνθετικό μηχανισμό με σκοπό την καλύτερη διαχείριση της ηλιακής ενέργειας και ταυτόχρονα την προστασία του από μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η επαγωγή φθορισμού πραγματοποιείται σε δύο φάσεις, την ταχεία και την αργή. Η μελέτη του επαγωγικού φθορισμού στην ταχεία φάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της δομής, λειτουργίας και απόδοσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Ο φθορισμός χλωροφύλλης είναι από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές για μελέτες φυσιολογίας φυτικών οργανισμών, καθώς παρέχει με ευκολία και με σχετικά χαμηλό κόστος

μια πληθώρα πληροφοριών σε πραγματικό χρόνο για την κατάσταση του φωτοσυστήματος II, ενώ ταυτόχρονα είναι μη καταστροφική μέθοδος [6].

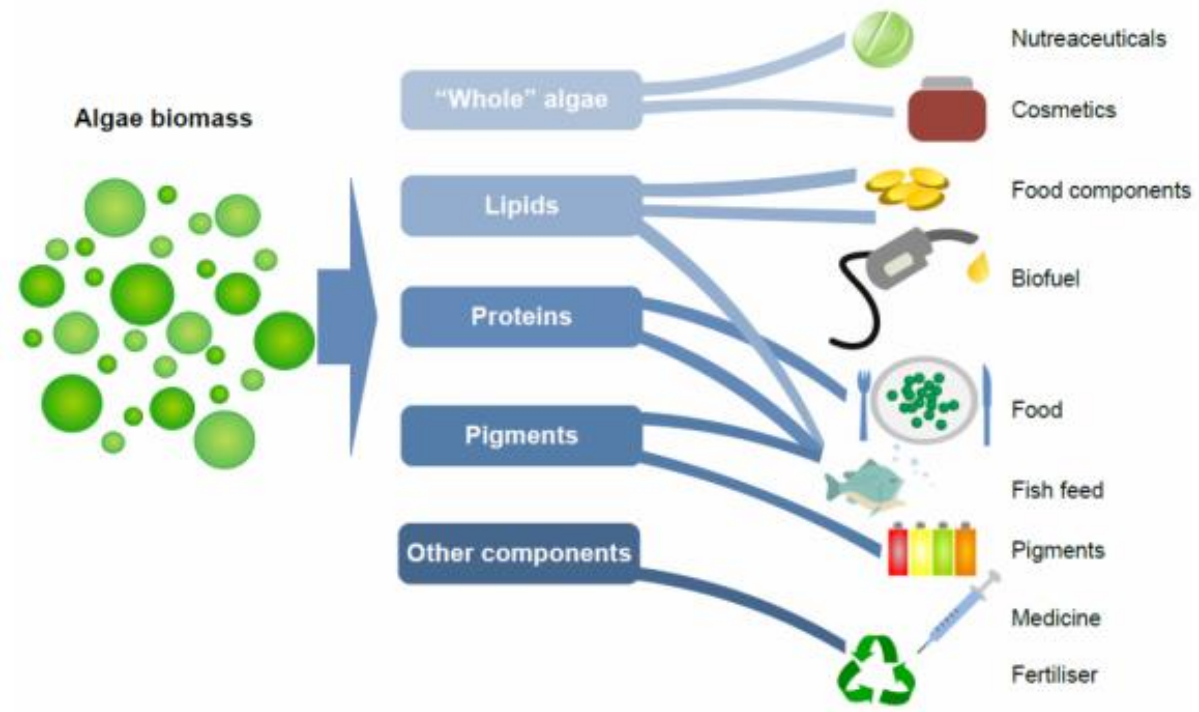


Εικόνα 3: Διαχείριση της φωτεινής ενέργειας που απορροφάται από το φωτοσύστημα II. Η ενέργεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί φωτοχημικά για τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από την χλωροφύλλη στο κέντρο αντίδρασης (P680) στον αποδέκτη κινόνης (Q_A). Μη-φωτοχημικά, η ενέργεια μπορεί να φύγει από σύστημα μέσω φθορισμού χλωροφύλλης ή θερμότητας. Αναλόγως με τις συνθήκες, η ροή ενέργειας θα ευνοηθεί περισσότερο προς μια συγκεκριμένη διαδρομή, μειώνοντας την ενέργεια που θα καταλήξει στις άλλες δύο. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [5].

Κατά τις μετρήσεις φθορισμού, ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός αρχικά προσαρμόζεται στο σκοτάδι, έτσι ώστε να αδειάσουν από ενέργεια τα διαθέσιμα κέντρα αντίδρασης. Έπειτα δέχεται την επίδραση συνεχούς φωτισμού, και τότε ο φθορισμός του αυξάνεται από το αρχικό του επίπεδο (F_o) σε ένα μέγιστο επίπεδο (F_m) και στη συνέχεια μειώνεται βαθμιαία μέχρι ένα σταθερό επίπεδο (F_s). Η διαφορά ανάμεσα στη μέγιστη και την αρχική τιμή του φθορισμού συμβολίζεται ως $F_v = F_m - F_o$. Ως ένδειξη της μέγιστης κβαντικής απόδοσης του φωτοσυστήματος II χρησιμοποιείται ο λόγος F_v/F_m ο οποίος αναφέρεται στη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση [5, 7, 8]. Οι φυσιολογικές τιμές του λόγου F_v/F_m κυμαίνονται ανέμεσα σε 0,7 - 0,8 για καλλιέργειες μικροφυκών [8], ενώ η μείωσή του είναι ενδεικτική για την καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού [6, 9, 10]. Η καταπόνηση αυτή μπορεί να οφείλεται σε μη ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως για παράδειγμα ακραίες θερμοκρασίες, διαλυτότητα οξυγόνου και διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών [8].

1.3 Μικροφύκη

Τα μικροφύκη είναι ευκαρυωτικοί φωτοσυνθετικοί μικροργανισμοί που έχουν προσελκύσει τα τελευταία χρόνια ερευνητικό και εμπορικό ενδιαφέρον για την παραγωγή πολύτιμων φυσικών προϊόντων με εφαρμογές στη βιομηχανία φαρμάκων, τροφίμων, βιοκαυσίμων, λιπασμάτων και καλλυντικών [11, 12]. Η βιοχημική τους σύσταση, καθώς και το ποιοτικό και ποσοτικό περιεχόμενο των δευτερογενών μεταβολιτών τους, μπορεί να επηρεαστεί από τις συνθήκες στις οποίες αναπτύσσονται (π.χ. φωτεινότητα, θερμοκρασία, αλατότητα, διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών) καθώς και από βιοτικούς παράγοντες [13]. Πέρα από τεχνικές μεταβολικής μηχανικής, εφαρμόζονται και τεχνικές γενετικής μηχανικής στους μικροοργανισμούς αυτούς, με σκοπό την παραγωγή φυσικών προϊόντων που ακολουθεί τα πρότυπα της αειφόρου ανάπτυξης [14].



Εικόνα 4: Εμπορικές εφαρμογές των μικροφυκών. Η εικόνα λήφθηκε από [I].

Οι κυριότεροι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί που καλλιεργούνται για εμπορικούς σκοπούς (κυρίως για χρήση ως διατροφικά συμπληρώματα, πηγές χρωστικών και προσθέτων ζωοτροφών), περιλαμβάνουν πράσινα μικροφύκη από τα γένη *Chlorella, Dunalliela, Haematococcus*, καθώς και κυανοβακτήρια του γένους *Arthrospira* (*Spirulina*) [15].

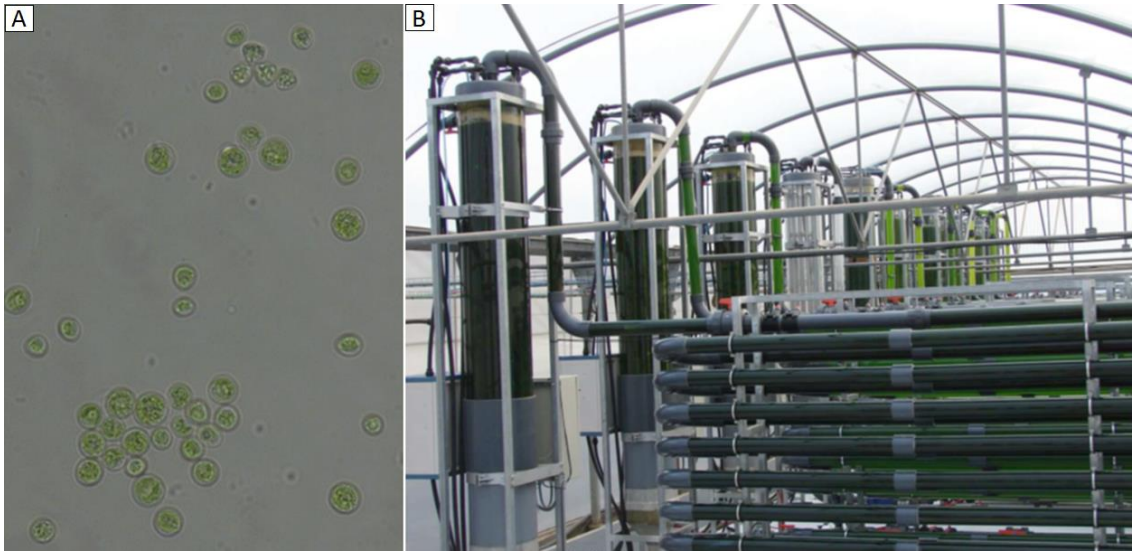
Η καλλιέργειά τους εμφανίζει μια σειρά οικονομικών και οικολογικών πλεονεκτημάτων έναντι των συμβατικών καλλιεργειών ανώτερων φυτών. Αναπτύσσονται με

ταχύτερους ρυθμούς από ότι τα χερσαία και υδρόβια φυτά και δεν απαιτείται γόνιμη γη για την καλλιέργειά τους, συνεπώς, δεν υπάρχει ο κίνδυνος εκτοπισμού καλλιεργειών που προορίζονται για τροφή ή βιοκαύσιμα [12]. Επίσης, για την καλλιέργειά τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί και αλμυρό νερό, ή ακόμα και αγροτικά ή βιομηχανικά υδατικά απόβλητα [11, 16, 17]. Με τη χρήση αποβλήτων ως μέσα καλλιέργειας επιτυγχάνεται ταυτόχρονα η εξοικονόνομηση πολύτιμου νερού, η ανακύκλωση θρεπτικών συστατικών (όπως ενώσεων αζώτου ή φωσφόρου και οργανικών υποστρωμάτων), η επεξεργασία των λυμάτων και η ταυτόχρονη παραγωγή πολύτιμης βιομάζας [18]. Επιπλέον, η καθήλωση CO_2 από τα μικροφύκη είναι 10-50 φορές περισσότερο αποδοτική σε σχέση με τα χερσαία φυτά, συνεισφέροντας έτσι, μέσω της φωτοσύνθεσης, στη μείωση των αερίων του θερμοκηπίου [19, 20].

1.4 Μικροφύκη του γένους *Chlorella*

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε ένα στέλεχος φωτοσυνθετικού μικροργανισμού το οποίο βρέθηκε ότι ανήκει στο γένος *Chlorella* και θα αναφέρεται ως *Chlorella sp.*. Η *Chlorella* είναι ένα γένος σφαιρικών μικροφυκών χωρίς μαστίγια με διάμετρο 2-10 μm [21], και συναντάται σε υδατικά και χερσαία περιβάλλοντα. Το στέλεχος αυτό απομονώθηκε από τον ποταμό Γιόφυρο στην πόλη του Ηρακλείου σε προηγούμενη εργασία από την ομάδα του εργαστηρίου και έχει ήδη πραγματοποιηθεί μερικός χαρακτηρισμός του [22, 23]. Τα αποτελέσματα των προηγούμενων μελετών έδειξαν ότι πρόκειται για ένα στέλεχος με μορφολογικά χαρακτηριστικά μονοκύτταρου πράσινου μικροφύκους της οικογένειας των *Chlorellaceae*. Επιπλέον, βρέθηκε ότι διαθέτει μια εκτενή εξωκυττάρια μήτρα πολυσακχαρίτη, μέσα στην οποία αναπαράγεται μέσω αυτοσπορυλίωσης, ο οποίος είναι και ένας συνήθης τρόπος αναπαραγωγής για τη *Chlorella*.

Τα μικροφύκη αυτά αναπτύσσονται με ταχείς ρυθμούς αυτότροφα, δηλαδή αξιοποιώντας φωτεινή ενέργεια και ανόργανα άλατα, αλλά και ετερότροφα, καταναλώνοντας οργανικά υποστρώματα (όπως σάκχαρα ή οργανικά οξέα) για την ανάπτυξή τους. Η *Chlorella* καλλιεργείται σε μεγάλη κλίμακα τόσο σε ανοιχτά συστήματα, όσο και σε σωληνοειδείς φωτοβιοαντιδραστήρες και αποτελεί το περισσότερα εμπορικά καλλιεργούμενο πράσινο μικροφύκος, με την ετήσια παραγωγή να ανέρχεται στους 5000 τόνους [24].



Εικόνα 5: Α) Κύτταρα *Chlorella* στο οπτικό μικροσκόπιο. Β) Σωληνωτοί φωτοβιοαντιδραστήρες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία για την καλλιέργεια μικροφυκών σε μεγάλη κλίμακα. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [25].

1.5 Μικροφύκη του γένους *Chlorella* στην παραγωγή τροφίμων

Σύμφωνα με διάφορες έρευνες, οι πληθυσμιακές και οικονομικές αλλαγές μέχρι το έτος 2050 θα οδηγήσουν σε αύξηση της ζήτησης τροφίμων, ιδιαίτερα σε προϊόντα ζωικής προέλευσης [26]. Κατ' επέκταση, αυτό θα φέρει επιπτώσεις και στη γεωργία, καθώς η κτηνοτροφία καταλαμβάνει επιπλέον εδαφικούς πόρους, λόγω των ζωοτροφών που χρειάζονται, όπως για παράδειγμα τη σόγια και το καλαμπόκι [27]. Πέρα από τους εδαφολογικούς περιορισμούς, η αυξημένη απαίτηση για τρόφιμα και προϊόντα από ζώα θα έχει και περιβαλλοντικές επιπτώσεις· αυξημένες απαιτήσεις για νερό και επιδείνωση του φαινομένου του θερμοκηπίου. Καινοτόμες τεχνολογίες τροφίμων μπορούν να αποτελέσουν εργαλείο στη μείωση της επιβάρυνσης του περιβάλλοντος από παραπροϊόντα κατά την παραγωγή τροφίμων. Μία πιθανή λύση είναι η χρήση της βιομάζας επιλεγμένων στελεχών φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών ως συμπλήρωμα σε συστατικά τροφίμων και κατ' επέκταση ζωοτροφών. Εξαιτίας του βιοχημικού τους περιεχομένου, η βιομάζα των μικροφυκών μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως εναλλακτική πηγή για παραγωγή βιοκαυσίμων, αποδεσμεύοντας έτσι καλλιεργήσιμη γη για την καλλιέργεια ανώτερων φυτών που προορίζεται για τον ίδιο σκοπό [28].

Η υψηλή διατροφική αξία κυττάρων του γένους *Chlorella* έγκειται στο γεγονός ότι τα κύτταρα αυτά είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, λιπίδια, ιδιαίτερα τα πολυακόρεστα ω-3 λιπαρά οξέα (ω-3 PUFA), πολυσακχαρίτες και αντιοξειδωτικά (όπως καροτενοειδή και φαινολικές

ενώσεις) [29]. Τα πολλαπλά οφέλη των φυσικών προϊόντων της *Chlorella* στην υγεία, και ιδιαίτερα των ω-3 λιπαρών οξέων (τα οποία συγκαταλέγονται στα PUFA) και των καροτενοειδών είναι ευρέως αναγνωρισμένα [30, 31]. Καροτενοειδή όπως η λουτεΐνη και η ζεαξανθίνη είναι καλά μελετημένα στη βιβλιογραφία για τα πολλαπλά οφέλη τους για την υγεία, όπως για παράδειγμα στην υγεία των οφθαλμών, καθώς και προστασία ενάντια σε καρδιαγγειακές νόσους [32-35]. Στα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα περιλαμβάνονται το α-λινολενικό (ALA), το εικοσαπεντανοϊκό (EPA) και το δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA) και οι ευεγερτικές τους επιδράσεις -κυρίως καρδιοπροστατευικές και νευροπροστατευτικές- είναι γνωστές και ευρέως μελετημένες στη βιβλιογραφία [36-42]. Μέχρι σήμερα τα PUFA προέρχονται κυρίως από ιχθυέλαιο, το οποίο είναι σχετικά φθηνό ακατέργαστο υλικό, αλλά μπορεί να μην είναι ιδανική η χρήση του στη βιομηχανία τροφίμων λόγω της δυσάρεστης οσμής τους. Επιπλέον, δεδομένης της προέλευσής του, η συμβατική παραγωγή φέρει τον κίνδυνο υπεραλίευσης. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, η *Chlorella* μπορεί να αποτελέσει μια εναλλακτική πηγή ω-3 λιπαρών οξέων [43, 44].

Η κατανάλωση *Chlorella* σε μορφή συμπληρώματος διατροφής κερδίζει όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον των καταναλωτών τα τελευταία χρόνια. Οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της βιομηχανίας τροφίμων για την προσθήκη, όχι μόνο προϊόντων τους, αλλά και ολόκληρης της βιομάζας των μικροοργανισμών σε καινοτόμα και εναλλακτικά τρόφιμα με σημαντικά οφέλη για την υγεία. Έτσι, μπορεί να επιτευχθεί η ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων με επιθυμητά χαρακτηριστικά, με τη δυνατότητα να διατηρηθούν οι οργανοληπτικές τους [45, 46].

Εικόνα 6: Α) *Chlorella* διατίθεται εμπορικά σε μορφή σκόνης ή δισκίων. Β) Μπισκότα με κομμάτια σοκολάτας, εμπλουτισμένα με σκόνη από τσάι μάτσα (matcha) και σκόνη βιομάζας *Chlorella*. Οι εικόνες ελήφθησαν από [II] και [III] για Α) και Β) αντίστοιχα.

Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί η χρήση βιομάζας κυττάρων *Chlorella* ως φυσική χρωστική σε τρόφιμα (ζυμαρικά, μπισκότα) καθώς και για την αύξηση της διατροφικής αξίας

[47-49]. Αντίστοιχες μελέτες σε γαλακτοκομικά προϊόντα έδειξαν βελτίωση στο προβιοτικό περιεχόμενο με ταυτόχρονη αύξηση της διατροφικής αξίας [50, 51].

Τα μικροφύκη του γένους *Chlorella* αποτελούν ιδανικούς υποψήφιους για τον εμπλουτισμό των ζωοτροφών και ιχθυοτροφών με βιοδραστικά θρεπτικά συστατικά [52]. Ο εμπλουτισμός των ζωοτροφών με πρωτεϊνες, υδατάνθρακες, PUFA και αντιοξειδωτικά μπορεί να επηρεάσει θετικά όχι μόνο την υγεία των ζώων, αλλά και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων ζωικών προϊόντων. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι σε πουλερικά που χρησιμοποιήθηκαν τροφές εμπλουτισμένες με *Chlorella* οδήγησε στην ενίσχυση του χρώματος στον κρόκο των αυγών τους [53, 54]. Ο χρωματισμός των αυγών αποδίδεται σε υψηλότερο περιεχόμενο καροτενοειδών [54], προσδίδοντας υψηλότερη διατροφική αξία στο προϊόν, λόγω των πολλαπλών οφελών των καροτενοειδών για την υγεία. Αντίστοιχες μελέτες σε ψάρια έδειξαν ότι η προσθήκη *Chlorella* σε ιχθυοτροφές είχε θετικό αποτέλεσμα στον χρωματισμό του δέρματος [55], καθώς και στην ανάπτυξη και παραγωγικότητά τους [56-58]. Ακόμα, έχει βρεθεί ότι η προσθήκη *Chlorella* στα διαιτολόγια μηρυκαστικών (αγελάδες και αίγες) είχε ως συνέπεια τη βελτίωση της θρεπτικής αξίας του γάλακτός τους [59-62].

1.6 Μικροοργανισμοί από επιβαρυμένα περιβάλλοντα και βιοαποκατάσταση

Η εξέλιξη προκύπτει ως απόρροια των απαιτητικών συνθηκών του περιβάλλοντος, οδηγώντας στην ανάπτυξη ειδών που μπορούν τόσο να προσαρμοστούν σε συνθήκες απαγορευτικές για κοινά είδη, όσο και να αξιοποιήσουν ως υποστρώματα, ουσίες ξένες για τα φυσικά περιβάλλοντα [63-65]. Λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας στους μεταβολικούς μηχανισμούς, αλλά και στην ανάπτυξη νέων προστατευτικών μηχανισμών, οι μικροοργανισμοί αποκτούν μια προσαρμοστικότητα που τους επιτρέπει να επιβιώνουν σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών και να εκμεταλλεύονται συνθήκες και πόρους που για άλλους μικροοργανισμούς δεν είναι εφικτό [66].

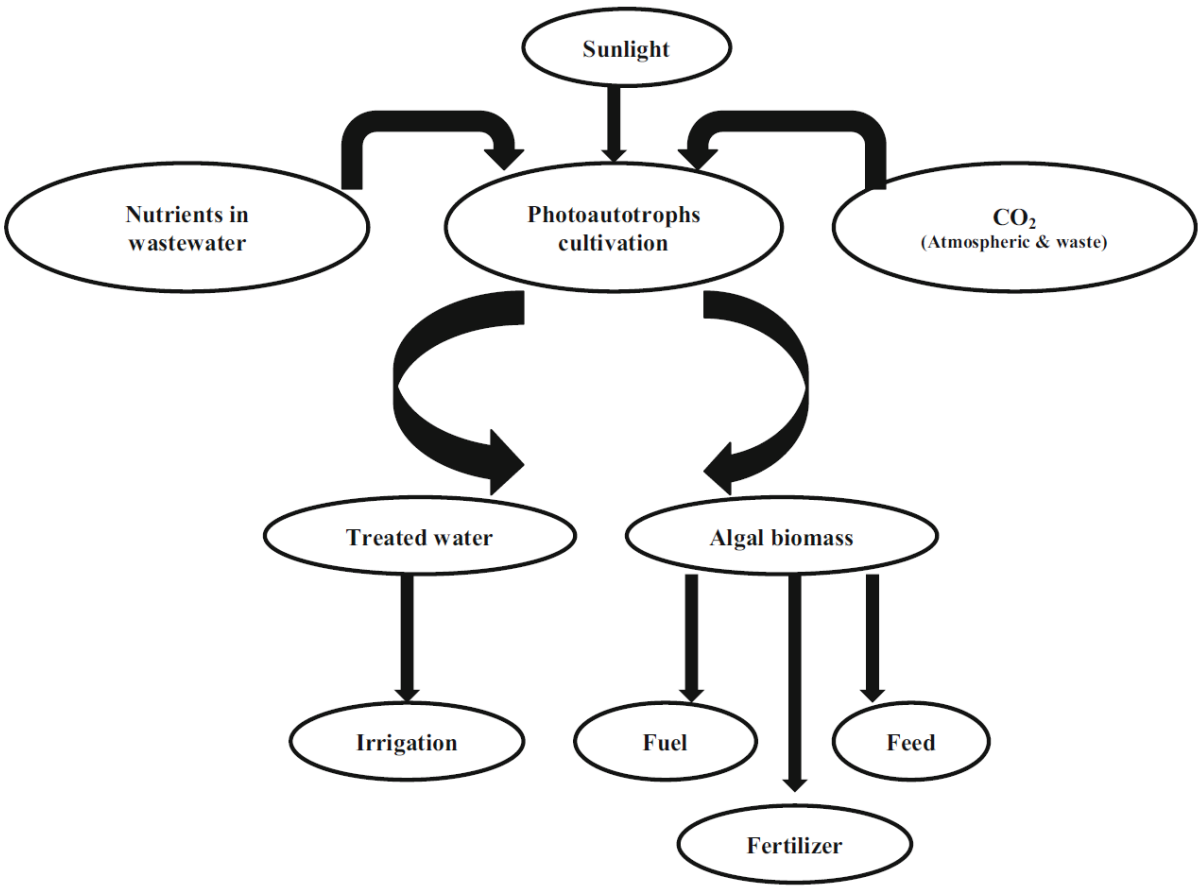
Τα μικροφύκη είναι μικροοργανισμοί που προσαρμόζονται και επιβιώνουν ακόμα και σε ακραία φυσικά ή επιβαρυμένα περιβάλλοντα [12]. Τα επιβαρυμένα περιβάλλοντα περιλαμβάνουν και εκείνα που προέρχονται από ανθρωπογενή δραστηριότητα, όπως για παράδειγμα αστικά, αγροτικά και βιομηχανικά υδατικά λύματα. Αυτοί οι οργανισμοί είναι κατάλληλοι υποψήφιοι για εφαρμογές στη βιοαποκατάσταση.

Η βιοαποκατάσταση είναι η διαδικασία στην οποία, ζωντανοί οργανισμοί (κατά κανόνα μικροοργανισμοί) ή ένζυμα αυτών χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση ρυπαντών με σκοπό τη μείωση των επιπέδων τους σε επιτρεπτά όρια, για την αποκατάση ρυπασμένων περιοχών και υποβαθμισμένων οικοσυστημάτων [67-70]. Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται μακροφύκη, μικροφύκη και κυανοβακτήρια, τότε η διαδικασία ονομάζεται φυκοαποκατάσταση και φέρει το σημαντικό πλεονέκτημα ότι η απομάκρυνση θρεπτικών συστατικών ή ξενοβιοτικών ουσιών συνδυάζεται με την καθήλωση του διοξειδίου του άνθρακα από την ατμόσφαιρα [71]. Επιπλέον, το παραγόμενο O_2 συμβάλει στην κατεργασία των ρύπων [72].

Η βιοαποκατάσταση είναι μια φυσική διαδικασία, καθώς βασίζεται στον φυσικό μεταβολισμό των οργανισμών και φέρει μια σειρά πλεονεκτημάτων σε σχέση με άλλες μεθόδους αποκατάστασης. Θεωρείται ότι έχει κατά κανόνα χαμηλότερο οικονομικό κόστος, απαιτεί μικρότερη παροχή ενέργειας και δυνητικά έχει μικρότερο περιβαλλοντικό αντίκτυπο από αντίστοιχες φυσικές ή χημικές μεθόδους. Σημαντικό πλεονέκτημα είναι ότι μπορεί να λάβει χώρα *in situ*, κάτι που μειώνει σημαντικά το κόστος εφαρμογής [73-75]. Η αποδοτικότητα της μεθόδου μπορεί να αυξηθεί με την παροχή συμπληρωματικών θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και τη χρήση στελεχών με κατάλληλα χαρακτηριστικά για τη διαχείριση των ρυπαντών [76].

1.7 Μικροφύκη του γένους *Chlorella* στη βιοαποκατάσταση

Φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί που έχουν μελετηθεί για εφαρμογές στη φυκοαποκατάσταση υδατικών αποβλήτων περιλαμβάνουν μικροφύκη από τα γένη *Chlorella, Chlamydomonas, Scenedesmus* και *Botryococcus* όπως και κυανοβακτήρια από τα γένη *Oscillatoria, Synechococcus, Nodularia, Nostoc* και *Cyanothece* [77, 78]. *Η Chlorella* θεωρείται από τα καλύτερα προσαρμοζόμενα μικροφύκη στις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες [79]. Δεδομένης της ικανότητάς της να προσλαμβάνει με ταχείς ρυθμούς θρεπτικά συστατικά - ρυπαντές από τα μέσα που αναπτύσσεται, είναι ιδανική για εφαρμογές στη βιοαποκατάσταση [80]. Στο πλαίσιο αυτό, έχει αναφερθεί η χρήση αποβλήτων από γαλακτοβιομηχανίες, κτηνοτροφεία, υφαντουργεία, καθώς και αγροτικών απόβλητων και αστικών λύματων [81-87]. Η *Chlorella* έχει τη δυνατότητα να απομακρύνει αποδοτικά τόσο ανόργανες ενώσεις (κυρίως αζώτου και φωσφόρου), όσο και οργανικούς ρυπαντές από υδατικά απόβλητα [85, 86, 88, 89]. Επιπλέον, έχει αναφερθεί η χρήση τέτοιων στελεχών για την απορρόφηση βαρέων μετάλλων από υδατικά μέσα [90-92].



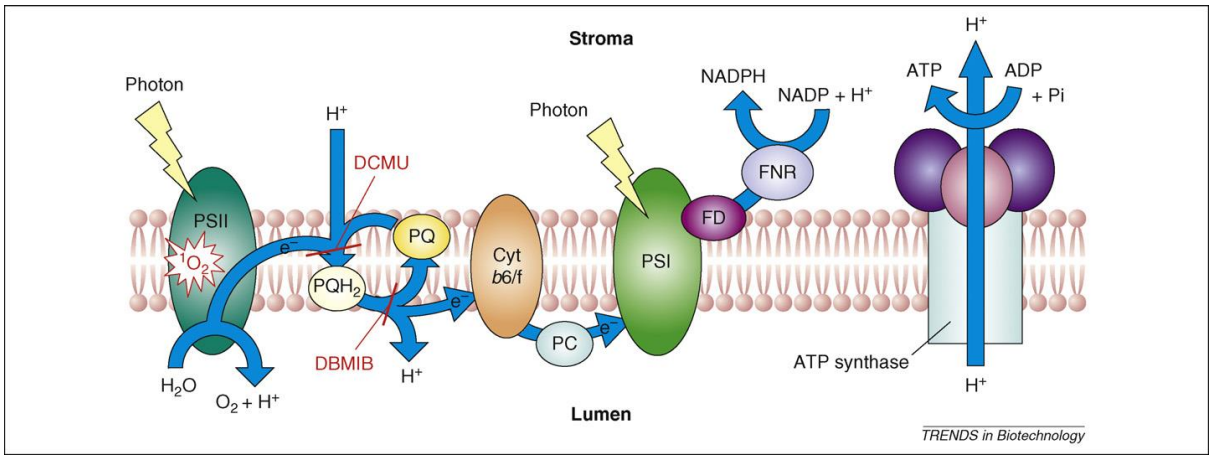
Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της φυκοαποκατάστασης συδυασμένης με την παραγωγή αξιοποιήσιμης βιομάζας. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [93].

Για να είναι αποδοτική και προσοδοφόρα η παραγωγή φυσικών προϊόντων από μικροοργανισμούς, οι πρώτες ύλες που θα χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξή τους είναι παράγοντες με καθοριστικό ρόλο. Στους παράγοντες αυτούς περιλαμβάνονται η πηγή νερού, τα ανόργανα θρεπτικά και η πηγή άνθρακα [72]. Ταυτόχρονα, για την κατεργασία των αποβλήτων, οι κύριοι περιοριστικοί παράγοντες για την εφαρμογή μιας τεχνικής είναι το οικονομικό κόστος και η αποδοτικότητα της μεθόδου. Δεδομένου ότι τα υδατικά απόβλητα είναι πλούσια σε χρήσιμα υποστρώματα, μια οικονομικά και περιβαλλοντικά βιώσιμη στρατηγική είναι η χρήση τους ως βάση για θρεπτικά μέσα για την ανάπτυξη στελεχών *Chlorella* σε μεγάλη κλίμακα [72]. Ο συνδυασμός της ταυτόχρονης βιοαποκατάστασης των υδάτων και της καθήλωσης CO_2 από την ατμόσφαιρα με στόχο την παραγωγή εμπορικά αξιοποιήσιμης βιομάζας [94, 95] καθιστά τη συνολική διαδικασία φιλική προς το περιβάλλον και αποδοτική. Αφενός πραγματοποιείται ανακύκλωση του νερού και αφετέρου δεν παράγονται επιπλέον ρύποι, μιας που τα κύτταρα που αναπτύσσονται αποτελούν επιθυμητό προϊόν [94, 96, 97].

1.8 Αναστολείς της φωτοσύνθεσης και αντιβιοτικά

Τα ζιζανιοκτόνα είναι χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται για τον περιορισμό της ανάπτυξης ανεπιθύμητων φυτών. Οι ουσίες αυτές κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους, με μια κύρια κατηγορία να αποτελεί τους αναστολείς της φωτοσύνθεσης. Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται οι αναστολείς του φωτοσυστήματος ΙΙ, οι οποίοι παρεμποδίζουν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και οι αναστολείς του φωτοσυστήματος Ι που παρεκκλίνουν τα ηλεκτρόνια από την κανονική πορεία τους προς τους τελικούς αποδέκτες μέσω παρακαμπτηρίων διαδρομών. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν τα ζιζανιοκτόνα diuron (3-(3,4-διχλωροφαινυλο)-1,1-διμεθυλο-ουρία, DMCU) και ατραζίνη (1-χλωρο-3-αιθυλαμινο-5-ισοπροπυλαμινο-2,4,6-τριαζίνη) που λειτουργούν ως αναστολείς του φωτοσυστήματος ΙΙ και αποτελούν ευρέως χρησιμοποιούμενα ζιζανιοκτόνα [98, 99]. Η DCMU αποτελεί παράγωγο της ουρίας και η ατραζίνη κατατάσεται στις τριαζίνες. Οι ενώσεις αυτές δρουν ως αναστολείς της φωτοσύνθεσης με την πρόσδεσή τους στη θέση Q_B της υπομονάδας D1 του φωτοσυστήματος ΙΙ, παρεμποδίζοντας έτσι το σχηματισμό πλαστοκινόλης [3, 100].

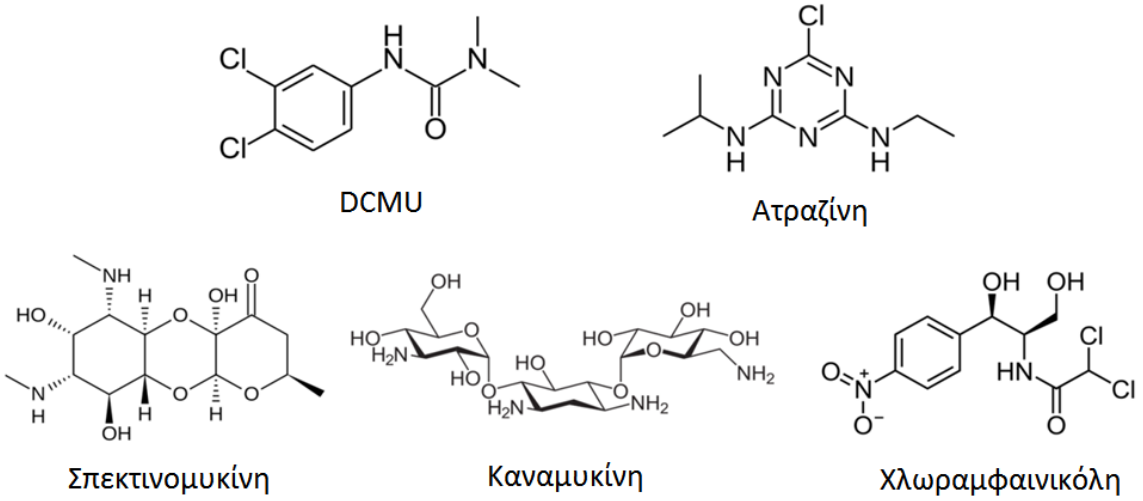
Λόγω του μηχανισμού δράσης της, η DCMU χρησιμοποιείται σε ερευνητικό επίπεδο και στη μελέτη του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, καθώς μπορούν να ληφθούν σημαντικά δεδομένα για τη μεταφορά ηλεκτρονίων, το φθορισμό και την ενεργειακή μεταφορά στους χλωροπλάστες [101].



Εικόνα 8: Η ροή των ηλεκτρονίων στις φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης. Σημειώνεται το σημείο που παρεμποδίζεται η αλυσίδα από τους αναστολείς. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [102].

Τα αντιβιοτικά μπορούν να οριστούν με τη γενική έννοια των χημειοθεραπευτικών ουσιών με αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή και αντιπαρασιτική δράση. Είναι ουσίες που μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σύμφωνα με το μηχανισμό δράσης, τη χημική δομή ή το φάσμα δραστικότητάς τους [103]. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται σήμερα περιλαμβάνουν δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς ως μηχανισμοί άμυνας, απομονώνονται και τροποιούνται κατάλληλα, είτε συντίθενται τεχνητά [104, 105]. Όσον αφορά τα αντιβιοτικά που στοχεύουν βακτήρια, εκείνα είτε αναστέλλουν την ανάπτυξή τους (βακτηριοστατικά), είτε προκαλούν άμεσα το θάνατό τους (βακτηριοκτόνα). Στους τρόπους δράσης της κατηγορίας αυτής περιλαμβάνονται η επίδραση σε κυτταρικά τοιχώματα ή μεμβράνες, όπως και η αναστολή της λειτουργίας ενζύμων και της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Στα πλαίσια της διατριβής αυτής μελετήθηκε η ανθεκτικότητα του απομονωμένου μικροφύκους ενάντια στη σπεκτινομυκίνη, στην καναμυκίνη και στη χλωραμφαινικόλης, τα οποία είναι αντιβιοτικά που λειτουργούν ως αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης. Η σπεκτινομυκίνη ανήκει στην οικογένεια των αμινοκυκλιτολών, η οποία είναι αρκετά συγγενική με τις αμινογλυκοσίδες, στις οποίες ανήκει η καναμυκίνη. Αυτά τα δυο αντιβιοτικά έχουν παρόμοιο τρόπο δράσης· συνδέονται στην περιοχή πρόσδεσης του tRNA (A-θέση) του 16S rRNA στην 30S ριβοσωμική υπομονάδα, αλλά σε διαφορετικά κατάλοιπα, παρεμποδίζοντας έτσι την ανάγνωση κωδικονίων και κατ' επέκταση και την πρωτεϊνοσύνθεση [106, 107]. Η χλωραμφαινικόλη ανήκει στις αμφαινικόλες, οι οποίες λειτουργούν ως αναστολείς του ενζύμου πεπτιδιλοτρανσφεράση. Πιο συγκεκριμένα, ο μηχανισμός δράσης της περιλαμβάνει την πρόσδεση στην A θέση της μεγάλης 50S ριβοσωμικής υπομονάδας και επάγει μετατόπιση του mRNA [106, 108].



Εικόνα 9: Δομές των ζιζανιοκτόνων και των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία.

1.9 Σκοπός της διατριβής

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη ενός μικροφύκος που απομονώθηκε από ευτροφικό ποταμό σε εφαρμογές βιοαποκατάστασης υγρών βιομηχανικών αποβλήτων, σε συνδυασμό με την παραγωγή υψηλών ποσοτήτων εμπορικά αξιοποιήσιμης βιομάζας. Για το σκοπό αυτό, η εργασία χωρίστηκε σε δυο μέρη.

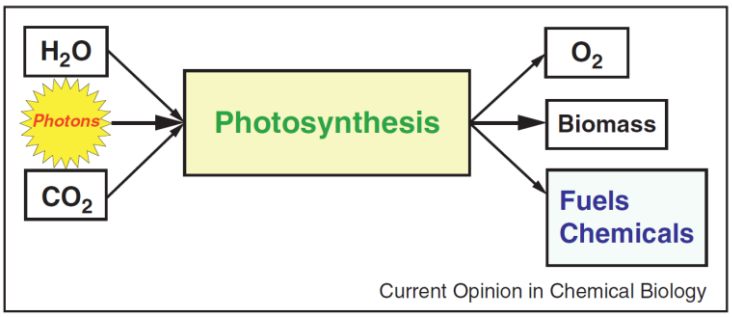
Στο πρώτο μέρος της διατριβής, ο σκοπός ήταν η ταυτοποίηση και ο προσδιορισμός μιας σειράς ιδιοτήτων για τον απομονωμένο φωτοσυνθετικό μικροοργανισμό. Αρχικά, στόχος ήταν η γενετική ταυτοποίηση του απομονωμένου στελέχους. Παράλληλα, ήταν και η μελέτη της επίδρασης δυο συνθηκών καλλίεργειας στην ανάπτυξη, στη δομή και τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, καθώς και στο βιοχημικό περιεχόμενο των κυττάρων. Επιπλέον εκτιμήθηκε η ανθεκτικότητα του στελέχους σε ουσίες που αναστέλλουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών.

Στο δεύτερο μέρος ο σκοπός ήταν να επιτευχθεί η καλλιέργεια του μικροφύκους θρεπτικά μέσα που βασίζονται σε υγρά γαλακτοκομικά απόβλητα. Αρχικά μελετήθηκε μια σειρά φυσικοχημικών παραμέτρων στα απόβλητα, με στόχο τον ορθολογικό σχεδιασμό των θρεπτικών μέσων. Έπειτα πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών καλλιέργειας και βελτιστοποίηση των θρεπτικών μέσων, με σκοπό την μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας. Ταυτόχρονα αξιολογήθηκε η μέθοδος κατεργασίας των αποβλήτων, καθώς και εκτιμήθηκε το βιοχημικό περιεχόμενο των κυττάρων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΥΣ

2.1 Εισαγωγή

Οι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί, όπως τα μικροφύκη, βρίσκουν ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών στην παραγωγή φυσικών προϊόντων μέσω φιλικών προς περιβάλλον μεθόδων. Τα μικροφύκη έχουν την ικανότητα να αξιοποιούν αποκλειστικά τη φωτεινή ενέργεια και απλά θρεπτικά συστατικά μέσω της φωτοσύνθεσης για την ανάπτυξή τους (φωτοαυτότροφη ανάπτυξη). Παράλληλα, πολλά στελέχη έχουν την ικανότητα να καταναλώνουν και οργανικά υποστρώματα, επιτυγχάνοντας υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης (φωτοετερότροφη ανάπτυξη). Σε κάθε περίπτωση, οι μικροοργανισμοί αυτοί θεωρούνται μια εναλλακτική και οικολογικά βιώσιμη λύση σε προβλήματα της σύγχρονης εποχής, αποτελώντας πλούσια πηγή τροφίμων και βιοκαυσίμων, αλλά και για τον μετριασμό του φαινομένου του θερμοκηπίου.



Εικόνα 10: Η φωτοσύνθεση είναι μια διαδικασία που φέρει μια πληθώρα περιβαλλοντικών πλεονεκτημάτων. Αξιοποιώντας αναεώσιμους πόρους, όπως CO_2 και ηλιακή ενέργεια, γίνεται δυνατή η παραγωγή πολύτιμων φυσικών προϊόντων. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [109].

Οι μικροοργανισμοί που επιβιώνουν σε επιβαρυμένα περιβάλλοντα τείνουν να φέρουν μοναδικά χαρακτηριστικά και ιδιοτητες, λόγω της προσαρμογής τους σε αυτά, όπως για παράδειγμα ταχεία ανάπτυξη και ανθεκτικότητα σε ακραίες συνθήκες. Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε μορφολογικά ένα τέτοιο στέλεχος φωτοσυνθετικού μονοκύτταρού μικροοργανισμού που με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του κατατάσσεται στην οικογένεια των *Chlorellaceae* και οι ενδείξεις οδήγησαν στην υπόθεση ότι πιθανώς ανήκει στο γένος *Chlorella*. Η *Chlorella* είναι ένα καλά μελετημένο γένος μικροφυκών και μελετάται για εφαρμογές στην παραγωγή βιοκαυσίμων, τροφίμων και διαχείριση ύδατικών αστικών και βιομηχανικών αποβλήτων.

2.2 Σκοπός

Η συγκεκριμένη πειραματική σειρά είχε σκοπό το γενετικό χαρακτηρισμό και μελέτη μιας ευρείας σειράς ιδιοτήτων του απομονωμένου μικροφύκους.

Οι στόχοι του κεφαλαίου συνοψίζονται ως εξής:

Γενετικός χαρακτηρισμός του στελέχους.

- Αλληλούχιση περιοχής 18S rRNA γονιδίου.
- Σύγκριση αλληλουχίας γονιδίου 18S rRNA με βιβλιογραφικά ευρήματα και βάσεις δεδομένων.
- Κατασκευή φυλογενετικού δέντρου.

Μελέτη ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε φωτοαυτότροφες και φωτοετερότροφες συνθήκες.

- Κατασκευή καμπυλών ανάπτυξης.
- Εκτίμηση κινητικών παραμέτρων ανάπτυξης.

Μελέτη φωτοσυνθετικής ικανότητας και κατασκευή καμπύλης φωτοσύνθεσης-ακτινοβολίας σε φωτοαυτότροφες και φωτοετερότροφες συνθήκες.

- Κατασκευή καμπύλης απόκρισης φωτοσύνθεσης – ακτινοβολίας.
- Εκτίμηση φωτοσυνθετικών παραμέτρων.

Προσδιορισμός βιοχημικού περιεχομένου των κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε φωτοαυτότροφες και φωτοετερότροφες συνθήκες.

- Υδατάνθρακες.
- Πρωτεϊνες.
- Λιπίδια.
- Φωτοσυνθετικές χρωστικές (χλωροφύλλες και καροτενοειδή).

Μελέτη ανθεκτικότητας του μικροφύκους ενάντια σε χημικούς αναστολείς. Μελέτη της επίδρασής των αναστολέων στην:

- Ανάπτυξη.
- Μέγιστη φωτοσυνθετική ικανότητα.
- Περιεχόμενο χλωροφύλλης.

2.3 Πειραματικό μέρος

2.3.1 Οργανισμός και συνθήκες ανάπτυξης

Για τη διαξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες από το απομονωμένο στέλεχος *Chlorella sp.*. Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε φωτοετερότροφες συνθήκες σε υγρό θρεπτικό μέσο TAP (Tris-Acetate-Phosphate) σε κωνικές φιάλες και υπό συνεχή ανάδευση [110]. Η ανάπτυξη των καλλιεργειών πραγματοποιήθηκε σε δωμάτιο με σταθερή θερμοκρασία 25 ± 1°C και υπό φωτισμό με ένταση ακτινοβολίας 30-40 μmol φωτονίων $m^{-2} \cdot s^{-1}$ με τη χρήση λευκών (cool white) λαμπτήρων φθορισμού. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων τα κύτταρα συλλέχθηκαν από τις μητρικές καλλιέργειες στο τέλος της εκθετικής φάσης.

Πίνακας 1: Συστατικά υγρού θρεπτικού μέσου TAP

Διαλύματα	**Ποσότητα**
Trizma – base	2,42 g/L
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών I (Phosphate buffer I)	1 mL/L
Διάλυμα ιχνοστοιχείων (Hutner's Trace Metals)	1 mL/L
Τροποποιημένο διάλυμα του Beijerink (Solution A)	10 mL/L
Οξικό οξύ	1,048 mL/L

Τα stock υδατικά διαλύματα για το θρεπτικό TAP παρασκευάζονται ως εξής:

Phosphate buffer I:

1. K_2HPO_4: 104,4 g/L
2. KH_2PO_4: 54,4 g/L

Solution A:

1. NH_4Cl: 40,0 g/L
2. $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$: 10,0 g/L
3. $CaCl_2 \cdot H_2O$: 5,0 g/L

Hutner's trace metals:

1. EDTA: 50,00 g/L
2. $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$: 4,99 g/L
3. $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$: 22,00 g/L
4. H_3BO_3: 11,40 g/L
5. $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$: 5,06 g/L
6. $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$: 1,57 g/L
7. $Mo_7O_{24}(NH_4)_6 \cdot 4\ H_2O$: 1,10 g/L
8. $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$: 1,61 g/L

Το pH ρυθμιζόταν κάθε φορά με HCl ώστε να είναι σταθερό και ίσο με 7,2. Για την παρασκευή στερεής καλλιέργειας σε αποστειρωμένα τρυβλία γινόταν προσθήκη υγρού θρεπτικού TAP με επιπλέον 1,5 % w/v agar.

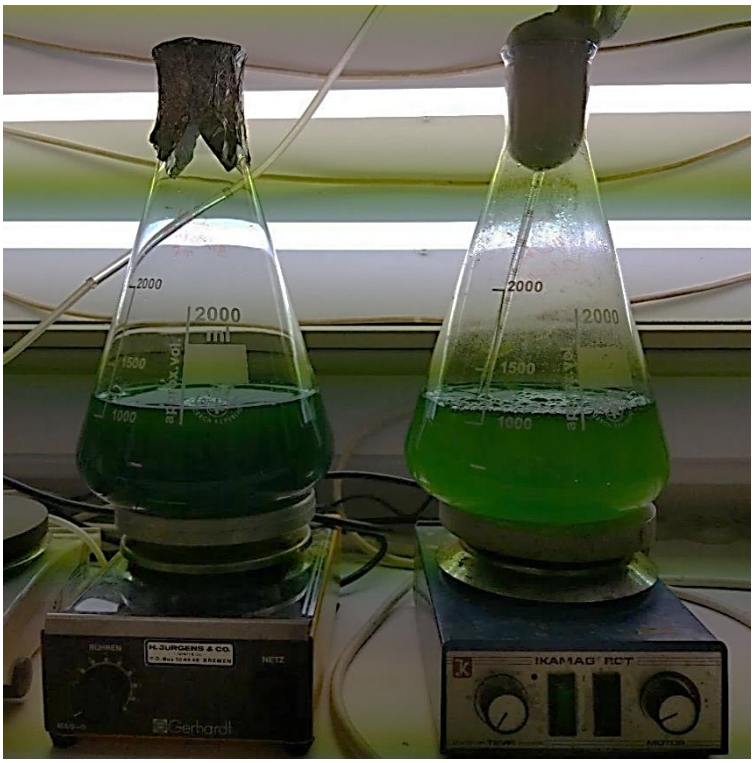
Εικόνα 11: Καλλιέργειες του στελέχους *Chlorella sp.* σε στερεό (αριστερά) και υγρό (δεξιό) θρεπτικό μέσο ανάπτυξης.

Όλα τα θρεπτικά μέσα και τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο στους 120°C για 20-30 min για την αποφυγή μολύνσεων από άλλους μικροοργανισμούς. Όλα τα πειράματα παρασκευής καλλιεργειών διεξήχθησαν σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow hood), ο οποίος είχε προηγουμένως απολυμανθεί με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας και αιθανόλη. Τα πειράματα έλαβαν χώρα παρουσία φλόγας.

2.3.2 Μελέτη της ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε φωτοαυτότροφες και φωτοετερότροφες συνθήκες

Για τη μελέτη της ανάπτυξης, καλλιέργειες του μικροοργανισμού αναπτύχθηκαν φωτοαυτότροφα και φωτοετερότροφα σε κωνικές φιάλες των 2000 mL που περιείχαν 1000 mL θρεπτικού μέσου, με συνεχή ένταση φωτισμού 30-40 μmol φωτονίων$\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την φωτοετερότροφη καλλιέργεια ήταν το TAP, ενώ για την φωτοαυτότροφη ήταν TAP χωρίς την προσθήκη οξικού οξέος (το οποίο θα αναφέρεται από εδώ και στο εξής ως TAP-C). Στη φωτοαυτότροφη συνθήκη εφαρμόστηκε

συνεχής αερισμός της καλλίεργειας με χρήση αντλίας αέρα που διέρχονταν μέσω ενός φίλτρου 0,22 μm, για την αποφυγή μολύνσεων. Σε κάθε περίπτωση, οι καλλιέργειες παρασκευάστηκαν με τη μεταφορά μιας μικρής ποσότητας ώριμης καλλιέργειας σε νέο θρεπτικό μέσο, και η συνεχής ήπια ανάδευση των κυττάρων επιτεύχθηκε με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα.



Εικόνα 12: Η πειραματική διάταξη με τις κωνικές φιάλες που χρησιμοποιήθηκαν ως φωτοβιοαντιδραστήρες κατά τη μελέτη ανάπτυξης του μικροφύκους.

Ως ένδειξη της ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε η μέτρηση της ξηρής βιομάζας των κυττάρων (dry cell weight, DCW) της καλλιέργειας. Η αρχική κυτταρική βιομάζα ρυθμίστηκε στα $7{,}00 \cdot 10^{-4}$ mg DCW·mL^{-1}.

Τα δεδομένα από τις μετρήσεις ανάπτυξης προσαρμόστηκαν σε σιγμοειδή καμπύλη με χρήση της εξίσωσης Boltzmann (Εξίσωση 1). Οι παράμετροι που υπολογίστηκαν ήταν το κέντρο της σιγμοειδούς καμπύλης (t_o) και η κλίση της εφαπτομένης στο σημείο t_o (m).

$$CDW = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + exp\left(\frac{t - t_o}{dt}\right)} \qquad \text{(Εξίσωση 1)}$$

Παράλληλα, υπολογίστηκε και ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης *(μ)* κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης, σύμφωνα με την Εξίσωση 2.

$$\mu = \frac{lnX_2 - lnX_1}{t_2 - t_1} \qquad \text{(Εξίσωση 2)}$$

Όπου X_1 είναι η ποσότητα της ξηρής βιομάζας των κυττάρων της καλλιέργειας στην αρχή (t_1) της εκθετικής φάσης και X_2 είναι η ποσότητα της ξηρής βιομάζας των κυττάρων της καλλιέργειας στο τέλος (t_2) της εκθετικής φάσης.

2.3.3 Μετρήσεις ξηρής βιομάζας κυττάρων

Για τη μέτρηση της ξηρής βιομάζας των κυττάρων της καλλιέργειας γινόταν λήψη γνωστού όγκου καλλιέργειας και έπειτα από φυγοκέντριση στα 6000 rpm για 10 min και την απομάκρυνση του υπερκειμένου, το ίζημα με τα κύτταρα εκπλύθηκε με απιονισμένο νέρο για την απομάκρυνση αλάτων από το θρεπτικό μέσο. Έπειτα το ίζημα επαναιωρήθηκε σε μικρό όγκο νερού και μεταφέρθηκε σε προζυγισμένα αλουμινένια πιατάκια. Τα δείγματα αφέθηκαν για ξήρανση σε φούρνο σε θερμοκαρασία 70°C για τουλάχιστον 14 h, και έπειτα μετρήθηκε η ξηρή βιομάζα με χρήση αναλυτικού ζυγού τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων.

2.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών

Για την ποσοτικοποίηση των φωτοσυνθετικών χρωστικών, γνωστή ποσότητα καλλιέργειας φυγοκεντρίθηκε για 5 min σε φυγόκεντρο *Eppendorf* και έπειτα από την απόρριψη του υπερκειμένου, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 mL θερμής (55°C) μεθανόλης. Τα δείγματα αναδεύτηκαν και αφέθηκαν 5 min για επώαση στους 55°C στο σκοτάδι. Μετά την επώαση, τα δείγματα επέστρεψαν σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε φυγοκέντριση για την απομάκρυνση των ιζημάτων. Έπειτα μετρήθηκε η απορρόφηση του μεθανολικού εκχυλίσματος σε συγκεκριμένα μήκη κύματος (470,0 nm, 652,4 nm και 665,2 nm) με χρήση ενός φασματοφωτομέτρου υπεριώδους-ορατού (Shimadzu UV-2700). Ο υπολογισμός έγινε με βάση γνωστές εξισώσεις από τη βιβλιογραφία [111], οι οποίες παρουσιάζονται παρακάτω:

$$C_a(\mu g/ml) = 16.72 \cdot A_{665.2} - 9.16 \cdot A_{652.4}$$

$$C_b(\mu g/ml) = 34.09 \cdot A_{652.4} - 15.28 \cdot A_{665.2}$$

$$C_{x+c}(\mu g/ml) = \frac{1000 \cdot A_{470.0} - 1.63 \cdot C_a - 104.96 \cdot C_b}{221}$$

2.3.5 Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού

Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού έγιναν με τη φορητή συσκευή Handy Plant Efficiency Analyser (Hansatech Instruments, Kings' Lynn, Norfolk, UK), σύμφωνα με τη μέθοδο των Strasser & Strasser [112]. Για τις μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού τα δείγματα τοποθετήθηκαν αρχικά σε σκοτεινό θάλαμο για 10 min, έτσι ώστε τα μόρια της χλωροφύλλης *a* στα κέντρα αντίδρασης, να επιστρέψουν στη θεμελιώδη κατάσταση, και γίνει δυνατή η εκτίμηση της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης. Η μέθοδος βασίζεται σε μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού με ανάλυση 10 μs σε χρονικό διάστημα 1 s. Ο φθορισμός μετρήθηκε με 12-bit ανάλυση και η διέγερση πραγματοποιήθηκε από 3 διόδους φωτισμού (LEDs) με ένταση ακτινοβολίας 3000 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ερυθρού φωτός (650 nm). Από τις μετρήσεις υπολογίστηκε ο λόγος Fv/Fm, που αποτελεί τη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση του φωτοσυστήματος II.

2.3.6 Πολαρογραφικός προσδιορισμός ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου

Η μέτρηση του ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου πραγματοποιήθηκε πολαρογραφικά με χρήση ενός επιλεκτικού ηλεκτροδίου οξυγόνου τύπου Clark (YSI model 5300 Biological Oxygen Monitor) [113]. Η διάταξη του ηλεκτροδίου αποτελείται από μια άνοδο αργύρου και μια κάθοδο πλατίνας, σε διάλυμα ηλεκτρολύτη KCl, όπου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Για τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ ανόδου και καθόδου χρησιμοποιείται οξυγόνο, το οποίο εισέρχεται επιλεκτικά στον ηλεκτρολύτη από το δείγμα μέσω μιας ημιπερατής μεμβράνης, και ανάγεται στην κάθοδο σύμφωνα με την ημιαντίδραση:

$$O_2 + 4e^- + 2H_2O \rightarrow 4OH^-$$

Οι μητρήσεις φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο των των Delieu και Walker σε κορεσμένη ατμόσφαιρα CO_2 [114]. Η παροχή φωτός για τη διεξαγωγή των μετρήσεων πραγματοποιήθηκε με μια λάμπα βολφραμίου ισχύος 250 Watt, σε ένα έυρος έντασης φωτονιακής ακτινοβολίας 5-3000 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1}. Στις μετρήσεις μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας η ακτινοβόληση των δειγμάτων είναι αρκετή, έτσι ώστε το φως να μην είναι πλέον περιοριστικός παράγοντας για τη μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα. Ο άλλος περιοριστικός παράγοντας, η ύπαρξη CO_2, αποφεύγεται με την προσθήκη $NaHCO_3$ στο διάλυμα επαιναιώρησης των δειγμάτων. Για τις μετρήσεις συλλέχθηκαν δείγματα καλλιεργειών και φυγοκεντρίθηκαν για 5 min στα 1500 x*g*. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 4 mL ρυθμιστικού διαλύματος με το οποίο είχε προηγουμένως σταθεροποιηθεί το ηλεκτρόδιο (διάλυμα Tricine 0,896% w/v και $NaHCO_3$ 0,034% w/v, με ρύθμιση σε pH=7,6). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε υδρόψυκτη γυάλινη κυψελίδα σε θερμοκρασία 25°C η οποία ρυθμίστηκε με τη χρήση θερμοστάτη με κυκλοφορητή νερού. Για την αποφυγή θέρμανσης του δείγματος, το φως πριν φτάσει στο δείγμα διήλθε από κυψελίδα με αραιό διάλυμα $CuSO_4$ που απορροφούσε την υπέρυθρη ακτινοβολία. Τέλος, το φως διήλθε από ένα κόκκινο φίλτρο, επιτρέποντας μόνο τα επιθυμητά μήκη κύματος να φτάσουν στο δείγμα [114].

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν για χρονικό διάστημα 60-90 s. Η μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα καταγράφτηκε σε ένταση φωτισμού 500 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1} και τελικά εκφράστηκε σε mmol O_2 (mol Chl)$^{-1}$·min^{-1}.

Για την κατασκευή των καμπυλών φωτοσύνθεσης-ακτινοβολίας (Photosynthesis-Irradiance curves), τα δεδομένα για τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα για αυτότροφες και ετερότροφες καλλιέργειες *Chlorella* προσαρμόστηκαν κατά μοντέλο Michaelis–Menten σύμφωνα με την εξίσωση:

$$P = (P_{max} I)/(K_I + I)$$

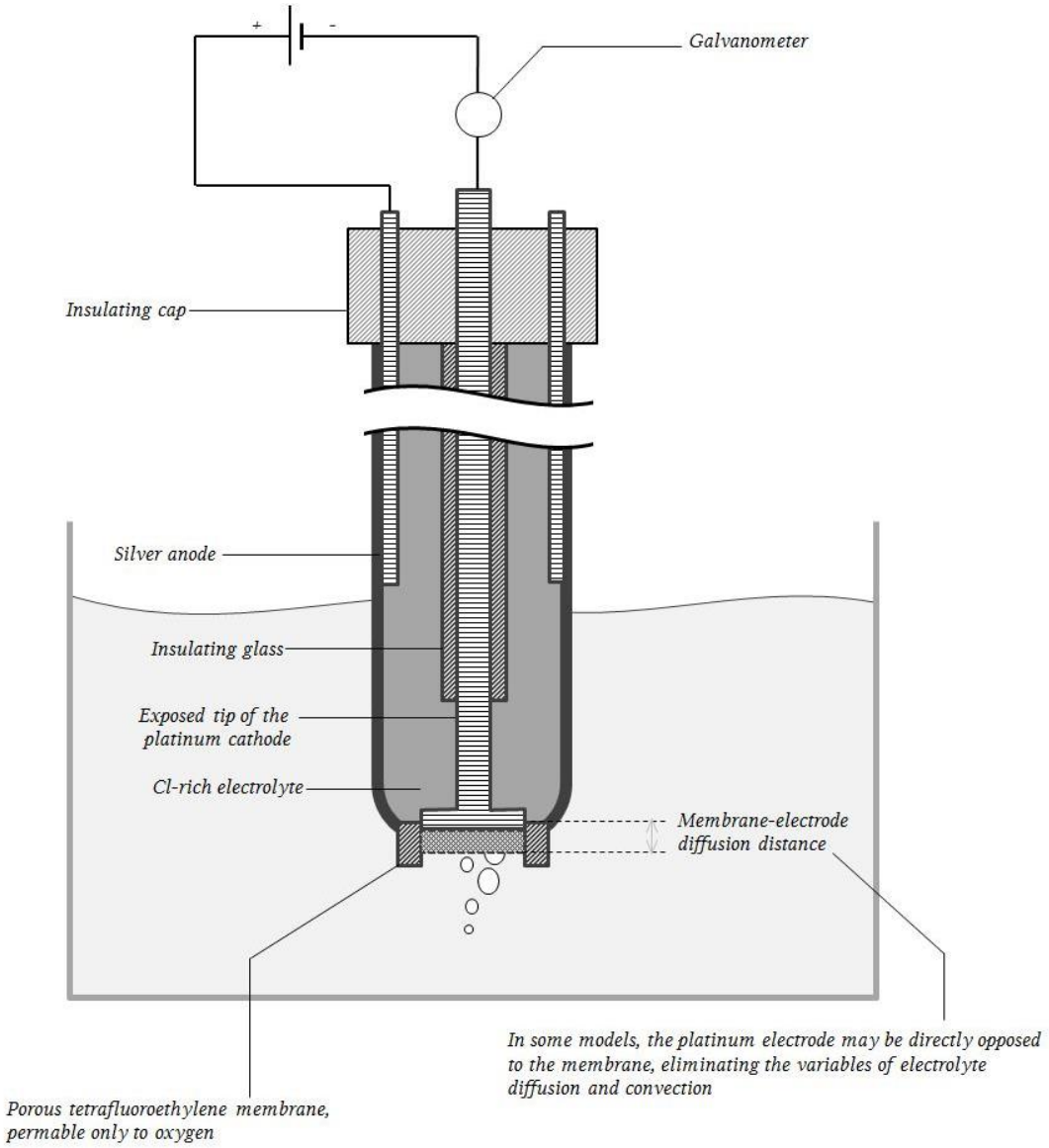
Όπου:

P: η μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα (ρυθμός παραγωγής οξυγόνου) σε συγκεκριμένη ένταση φωτισμού I. Εκφράζεται σε μονάδες mmol O^2·(mol Chl)$^{-1}$·min^{-1}.

P_{max}: ο ρυθμός της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας υπό κορεσμένη ένταση φωτισμού.

K_I: η σταθερά για το ήμισυ του κορεσμού, η οποία αναφέρεται στην ένταση φωτισμού όπου η φωτοσυνθετική δραστηριότητα ισούται με $P_{max}/2$.

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε ως παράμετρος η κλίση (α) της αρχικής γραμμικής αύξησης των καμπυλών για τον υπολογισμό της έντασης του φωτός κατά τη μετάβαση από τη φωτο-περιορισμένη (light-limited) στη φωτοκορεσμένη (light-saturated) φωτοσύνθεση, σύμφωνα με τον τύπο $I_s = P_{max}/a$.



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση ενός ηλεκτροδίου οξυγόνου τύπου Clark, με τα βασικά του στοιχεία να επισημαίνονται. Η εικόνα λήφθηκε από [IV].

2.3.7 Προσδιορισμός βιοχημικού περιεχομένου του μικροφύκους

Για τον προσδιορισμό του βιοχημικού περιεχομένου, συλλέχθηκαν κύτταρα ανεπτυγμένα σε φωτοαυτότροφες και φωτοετερότροφες συνθήκες (παράγραφος 2.3.2), στο τέλος της εκθετικής φάσης και λυοφιλοποιήθηκαν. Οι υδατάνθρακες προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο θυμόλης-θειικού, οι πρωτεϊνες με τη μέθοδο Lowry, και τα λιπίδια μέσω της μεθόδου θειικού-φωσφορικού-βανιλλίνης. Οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή ποσοτικοποιήθηκαν σύμφωνα με την παράγραφο 2.3.4. Οι μέθοδοι αυτές είναι φωτομετρικές και για κάθε περίπτωση οι απορροφήσεις μετρήθηκαν μέσω ενός φασματοφωτομέτρου υπεριώδους-ορατού (Shimadzu UV-2700).

Προσδιορισμός σακχάρων στα κύτταρα με τη μέθοδο θυμόλης-θειικού

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό σακχάρων στα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος θυμόλης-θειικού (thymol-sulfuric acid method) [115], τροποποιημένη κατά Schulze *et al.* [116]. Αρχικά πραγματοποιήθηκε υδρόλυση των λυοφυλιωμένων κυττάρων, με την με την προσθήκη 1 mL HCl 2 N σε ποσότητα γνωστή βιομάζας και επώαση στους 100°C για 2 h. Το υδρόλυμα των κυττάρων υπέστη φιλτράρισμα με φίλτρο 0,22 μm και αραιώθηκε κατάλληλα. Έπειτα, σε 100 μL αραιωμένου υδρολύματος προστέθηκαν 300 μL αντιδραστηρίου θυμόλης (1 mg/mL θυμόλης σε θειικό οξύ). Πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση του δείγματος με τη βοήθεια vortex και επώαση στους 110°C για 30 min. Έπειτα μετρήθηκε η απορρόφηση στα 509 nm. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 100 μL απιονισμένο νερό, αντί για υδρόλυμα σε 300 μL αντιδραστηρίου θυμόλης.

Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη ως πρότυπη ουσία. Παρασκευάστηκε αρχικό διάλυμα γλυκόζης συγκέντρωσης 1 mg/mL και ακολούθησαν αραιώσεις για την παρασκευή δειγμάτων σε εύρος συγκεντρώσεων 0,01 - 0,1 mg/mL.

Προσδιορισμός λιπιδίων στα κύτταρα με τη μέθοδο θειικού-φωσφορικού-βανιλλίνης

Για την ποσοτικοποίηση του λιπιδικού περιεχομένου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος θειικού-φωσφορικού-βανιλλίνης (sulfo-phospho-vanillin method) [117], σύμφωνα με ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο από Jeon *et al.* [62]. Σε γνωστή ποσότητα λυοφυλιωμένων κυττάρων προστέθηκαν 3 mL μείγματος χλωροφόρμιο:μεθανόλη (2:1 v/v). Στη συνέχεια προστέθηκαν υάλινα σφαιρίδια (glass beads) και εφαρμόστηκε έντονη ανάδευση για την εκχύλιση των λιπιδίων. Εν συνεχεία προστέθηκε 1,5 mL υδατικού διαλύματος 0,9% w/v

NaCl και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση στα 3500 rpm για 15 s. Από τις δύο φάσεις που σχηματίστηκαν απορρίφθηκε η υδατική που βρισκόταν στο επάνω μέρος και αποτελούνταν από μεθανόλη και νερό. Από την οργανική φάση στο κατώτερο μέρος του σωλήνα (χλωροφόρμιο + λιπίδια) μεταφέρθηκαν ποσότητες γνωστού όγκου σε γυάλινα δοχεία και τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 90°C για την εξάτμιση του χλωροφορμίου. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 100 μL θειικού οξέος και τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 90°C για 15 min. Ακολούθησε ψήξη των δειγμάτων έως ότου φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου και προστέθηκαν 2,4 mL από το αντιδραστηρίο φωσφορικού-βανιλλίνης (1,2 mg βανιλίνης/mL φωσφορικού οξέος 68%). Τα δείγματα επωάστηκαν για 10 min και απέκτησαν ιώδες χρώμα. Για τον προσδιορισμό μετρήθηκε η απορρόφηση στα 530 nm. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 100 μL θειικού οξέος σε 2,4 mL αντιδραστηρίου φωσφορικού-βανιλλίνης.

Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε κραμβέλαιο (canola oil) ως πρότυπη ουσία. Παρασκευάστηκε αρχικό διάλυμα διαλύοντας το έλαιο σε χλωροφόρμιο (1 mg ελαίου /mL χλωροφόρμιο). Ποσότητες σε έυρος 10-150 μL από το αρχικό διάλυμα μεταφέρθηκαν σε γυάλινα δοχεία, και τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 90°C για την εξάτμιση του χλωροφορμίου. Η διαδικασία συνεχίστηκε με τη μέθοδο που αναλύθηκε στην προηγούμενη παράγραφο.

Προσδιορισμός πρωτεϊνών στα κύτταρα με τη μέθοδο Lowry

Για την ποσοτικοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Lowry [118], ακολουθώντας το τροποποιημένο πρωτόκολλο από González López και συνεργάτες [119]. Σε γνωστή ποσότητα λυοφυλιωμένης βιομάζας προστέθηκαν 10 mL διαλύματος λύσης κυττάρων (lysis buffer) και το δείγμα επωάστηκε για 20 min για την εκχύλιση των πρωτεϊνών. Το δείγμα αραιώθηκε κατάλληλα με το διάλυμα λύσης. 100 μL από το αραιωμένο διάλυμα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδιο *Eppendorf* και προστέθηκαν 100 μL από το διάλυμα SDS. Το δείγμα αναδεύτηκε σε vortex και μετά προστέθηκε 1 mL από το reagent C. Ακολούθησε έντονη ανάδευση για 10 min και προστέθηκαν 100 μL από το αντιδραστήριο Folin-Denis και αμέσως ακολούθησε μια σύντομη ανάδευση σε vortex. Τα δείγματα αφέθηκαν για επώαση για 30 min και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 750 nm. Η κατεργασία των δειγμάτων έλαβε χώρα απουσία φωτός. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε δείγμα που υπέστη την ίδια κατεργασία, χωρίς όμως την προσθήκη του διαλύματος που περιείχε πρωτεΐνες.

Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε αλβουμίνη βόειου ορού (bovine serum albumin, BSA) διαλυμένη σε διάλυμα λύσης ως πρότυπη ουσία. Παρασκευάστηκε αρχικό διάλυμα BSA συγκέντρωσης 2 mg/mL και ακολούθησαν αραιώσεις για την παρασκευή δειγμάτων σε εύρος 0,125 – 0,875 mg/mL.

Διαλύματα:

Διαλύμα λύσης κυττάρων (lysis buffer):

1. Triton X-100: 5 mL/L
2. Na_2EDTA: 0,3722 g/L
3. PMSF: 0,0348 g/L

Διάλυμα BSA:

1. 0,1g BSA /50 mL διαλύματος λύσης κυττάρων

Διάλυμα SDS:

1. Sodium dodecyl sulfate salt: 0,05 g/L

Αντιδραστήριο Folin–Denis:

1. Folin reagent σε αραίωση 1:1 v/v με απιονισμένο H_2O

Reagent A:

1. NaOH: 4,0 g/L
2. Na_2CO_3: 20,0 g/L

Reagent B_1:

1. $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 0,001 g/L

Reagent B_2:

1. Potassium sodium tartrate tetrahydrate: 0,002 g/L

Reagent C:

1. Reagent A: 20 mL
2. Reagent B_1: 0,2 mL
3. Reagent B_2: 0,2 mL

2.3.8 Παρασκευή πειραματικών καλλιεργειών για τη μελέτη της ανάπτυξης και της ανθεκτικότητας του στελέχους Chlorella παρουσία ζιζανιοκτόνων και αντιβιοτικών

Οι ουσίες που μελετήθηκαν σε αυτή την πειραματική σειρά περιλαμβάνουν δυο ζιζανοκτόνα που λειτουργούν ως αναστολείς της φωτοσύνθεσης (DCMU και ατραζίνη) και τρια αντιβιοτικά που λειτουργούν ως αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης (σπεκτινομυκίνη, χλωραμφαινικόλη και καναμυκίνη).

Για την παρασκευή των πειραματικών καλλιεργειών, συλλέχθηκαν κύτταρα από μητρική καλλιέργεια *Chlorella* στο τέλος της εκθετικής φάσης, φυγοκεντρίθηκαν στα 1000 x*g* για 5 min και επαναιωρήθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό μέσο TAP. Η θυγατρική καλλιέργεια μοιράστηκε σε κωνικές φιάλες χωρητικότητας 100 mL, με τελικό όγκο καλλιέργειας 50 mL και χαμηλή αρχική κυτταρική συγκέντρωση ίση με 0,025 ± 0,003 mg DCW·mL^{-1}.

Οι αναστολείς DCMU και ατραζίνη προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο σε εύρος 0,25-2,00 ppm, σε τέσσερις τιμές συγκεντρώσεων. Τα αρχικά διαλύματα αναστολέων παρασκευάστηκαν με τη διάλυση καθαρής ουσίας αναστολέα σε μεθανόλη με τελική συγκέντρωση 2500 ppm και ακολούθησε φιλτράρισμα μέσω ενός φίλτρου σύριγγας 0,22 μm. Πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες αραιώσεις στα αρχικά διαλύματα. Για τα πειράματα με τους αναστολείς, στις καλλιέργειες του μάρτυρα προστέθηκε η αντίστοιχη ποσότητα καθαρής μεθανόλης.

Τα αντιβιοτικά προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο σε τελικές συγκεντρώσεις 25 ppm και 50 ppm. Για την παρασκευή αρχικών διαλύμάτων των αντιβιοτικών η σπεκτινομυκίνη και η καναμυκίνη διαλύθηκαν σε υπερκάθαρο νερό, ενώ η χλωραμφαινικόλη διαλύθηκε σε αιθανόλη. Έπειτα τα διαλύματα υπέστησαν φιλτράρισμα μέσω ενός φίλτρου σύριγγας 0,22 μm. Η αρχική συγκέντρωση για τη σπεκτινομυκίνη ήταν 100 mg/mL (10^5 ppm), για την καναμυκίνη 50 mg/mL ($5\cdot10^4$ ppm) και για τη χλωραμφενικόλη 30 mg/mL ($3\cdot10^4$ ppm). Πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες αραιώσεις στα αρχικά διαλύματα. Στα πειράματα με τη χλωραμφαινικόλη, στις καλλιέργειες του μάρτυρα προστέθηκε η αντίστοιχη ποσότητα καθαρής αιθανόλης.

Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό αναδευτήρα (shaker) και αναδεύονταν κατά τη διάρκεια του πειράματος με συχνότητα 140 rpm. Τα πειράματα έλαβαν χώρα σε δωμάτιο σταθερής θερμοκρασίας 25 ± 1°C υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1}.

Η διάρκεια των πειραμάτων ήταν 72 h (3 ημέρες). Καθημερινά λάμβάνονται μετρήσεις ανάπτυξης μέσω περιεχόμενου χλωροφύλλης, μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού, καθώς και μετρήσεις ξηρής βιομάζας την ημέρα έναρξης και την τελευταία ημέρα. Η παρασκευή των αρχικών διαλυμάτων, οι αραιώσεις αυτών, καθώς και οι καθημερινές δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο νηματική ροής αέρα παρουσία φλόγας.

2.3.8 Παρασκευή χημειοδεκτικών βακτηριακών κυττάρων

Το βακτηριακό στέλεχος *E. coli* DH5a χρησιμοποιήθηκε για τον πολλαπλασιασμό των πλασμιδίων. Η παρασκευή των χημειοδεκτικών κυττάρων έγινε με τη χρήση χλωριούχου ρουβιδίου ($RbCl_2$) [120].

Διαλύματα και θρεπτικά μέσα:

Υγρό θρεπτικό μέσο LB

1. 1% w/v NaCl
2. 1% w/v πεπτόνη
3. 0.5% w/v Yeast extract

Το διάλυμα αποστειρώθηκε για 20 min σε αυτόκαυστο μετά την παρασκευή του.

Διάλυμα RF1

1. 100 mM RbCl
2. 50 mM $MnCl_2$
3. 30 Mm CH_3COOK
4. 10 mM $CaCl_2$
5. 15% v/v Glycerol

Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε με 0,2 M CH_3COOH σε τιμή pH 5,8 και αποστειρώθηκε με φίλτρο 0,22 μm.

Διάλυμα RF2

1. 10 mM RbCl
2. 75 mM $CaCl_2$
3. 10 mM MOPS
4. 15% v/v Glycerol

Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε με NaOH σε τιμή pH 7 και αποστειρώθηκε με φίλτρο 0,22 μm.

Ποσότητα 100 mL θρεπτικού LB εμβολιάστηκε με *E. coli* DH5a και επωάστηκε στους 30°C για περίπου 16 h υπό ανάδευση έως ότου η οπτική πυκνότητα τους στα 600 nm (OD_{600}) να αποκτήσει τιμή μεταξύ 0,3 και 0,5. Έπειτα η καλλιέργεια επωάστηκε στον πάγο για 15 min και φυγοκεντρίθηκε για 20 min στα 3112 x*g* στους 4°C. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 20 mL διαλύματος RF1. Τα κύτταρα επωάστηκαν στον πάγο για 15 min και φυγοκεντρίθηκαν στις παραπάνω συνθήκες. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 4 mL διαλύματος RF2 και επωάστηκε για 15 min στον πάγο. Τέλος τα κύτταρα μοιράστηκαν σε παγωμένα φιαλίδια *Eppendorf*, ψύχθηκαν σε υγρό άζωτο και φυλάχθηκαν στους -80 °C.

2.3.9 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων E. coli με πλασμιδιακό DNA

Ο μετασχηματισμός του πλασμιδιακού DNA σε κατάλληλα επεξεργασμένα δεκτικά κύτταρα έγινε με την μέθοδο του θερμικού σοκ (heat shock). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη βαθμιαία διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος με την απότομη αύξηση της θερμοκρασίας. Η αύξηση της θερμοκρασίας δημιουργεί πόρους στο κυτταρικό τοίχωμα, οι οποίοι επιτρέπουν στο ξένο DNA να εισέλθει μέσα στο κύτταρο. Έπειτα, με τη μείωση της θερμοκρασίας το κυτταρικό τοίχωμα επαναφέρεται και οι πόροι που έχουν δημιουργηθεί κλείνουν [121].

Διαλύματα και θρεπτικά μέσα:

Υγρό θρεπτικό LB

1. 1% w/v NaCl
2. 1% w/v πεπτόνη
3. 0,5% w/v Yeast extract

Το διάλυμα αποστειρώθηκε για 20 min σε αυτόκαυστο έπειτα από την παρασκευή του.

Διάλυμα LB-SOC

Στο διάλυμα LB προστέθηκαν τα παρακάτω:

1. 2,5 mM KCl
2. 10 mM $MgCl_2$
3. 10 mM $MgSO_4$
4. 20 mM Glucose

Το διάλυμα αποστειρώθηκε για 20 min σε αυτόκαυστο έπειτα από την παρασκευή του

Φιαλίδιο *Eppendorf* που περιέχει 50 μL δεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5α μεταφέρθηκε από τους -80°C σε πάγο και αφέθηκε να ξεπαγώσει για 10 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 1-5 μL που περιείχαν ποσότητα μεταξύ 1 pg και 100 ng πλασμιδιακού DNA και πραγματοποιήθηκε ήπια ανάδευση. Το μίγμα επωάστηκε στον πάγο για 30 min. Έπειτα μεταφέρθηκε στους 42°C για 30 s και αμέσως μετά στον πάγο για 2 min. Στη συνέχεια προστέθηκε 1 mL διαλύματος LB-SOC και το μίγμα επωάστηκε στους 37°C για 1 h υπό ανάδευση. Τα κύτταρα φυγοκεντρίθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε 70 mL θρεπτικού μέσου. Το εναιώρημα βακτηρίων επιστρώθηκε σε τρυβλίο Petri με 100 μg/mL αμπικιλλίνης και το τρυβλίο τοποθετήθηκε σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 16 h.

2.3.10 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Για το διαχωρισμό, την απομόνωση και καθαρισμό μορίων DNA χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Διάλυμα 10x TE buffer

1. 100 mM Trizma base, pH 8
2. 10 mM EDTA

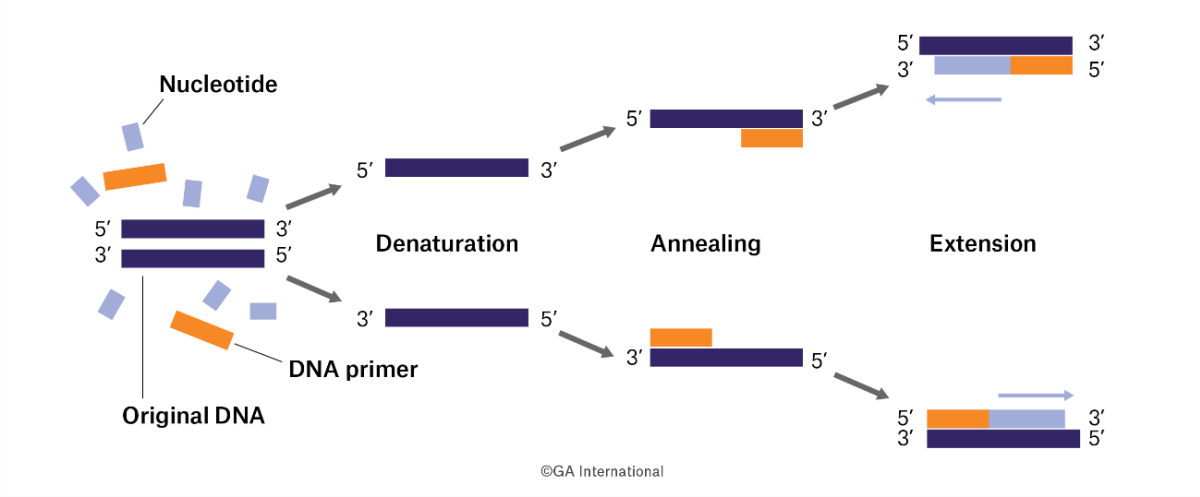
Παρασκευάστηκε διάλυμα αγαρόζης 0,8-1 % w/v σε ρυθμιστικό TE 1x, και προστέθηκε μικρή ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου. Το ποσοστό αγαρόζης είναι αντιστρόφως ανάλογο του μεγέθους του προς ανάλυση δείγματος DNA. Στην πηκτή αγαρόζης εφαρμόστηκε ρεύμα 120 V και η ηλεκτροφόρηση διήρκεσε περίπου 20 min. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης η παρατήρηση έγινε σε λάμπα υπεριώδους.

2.3.11 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια *in vitro* διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιείται πολλαπλασιασμός μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που οριοθετείται από δύο εκκινητές (primers) που βρίσκονται εκατέρωθεν της, με τη χρήση μίας πολυμεράσης DNA. Η αντίδραση συνήθως περιλαμβάνει 25-35 κύκλους κάθε ένας από τους οποίους αποτελείται από τα εξής στάδια [122]:

1. Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (Denaturation): Λαμβάνει χώρα σε υψηλή θερμοκρασία (94 °C-98 °C) ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός της δίκλωνης έλικας.
2. Υβριδισμός εκκινητών (Annealing): Λαμβάνει χώρα σε χαμηλότερη θερμοκρασία (50°C-65°C) ώστε να επιτρέψει στους ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές να υβριδοποιηθούν ειδικά στις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες σε κάθε κλώνο-στόχο, δημιουργώντας ιοντικούς δεσμούς.
3. Επιμήκυνση των εκκινητών (Extension): Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C και η DNA πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία ως εκμαγείο.

Η διαδικασία λαμβάνει χώρα στους θερμοκυκλοποιητές (thermal cycler).



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση με τα στάδια που λαμβάνουν χώρα σε μια PCR. Η εικόνα λήφθηκε από [V].

Στην παρούσα διατριβή στις τεχνικές κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε η Minotech Pol HF DNA Polymerase της εταιρίας Minotech. Για όλα τα υπόλοιπα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η DreamTaq Green DNA Polymerase της εταιρίας Thermo Fisher Scientific. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε θερμοκυκλοποιητής της εταιρίας Thermo Fisher Scientific (μοντέλο SimpliAmp™ Thermal Cycler). Οι ποσότητες και τα προγράμματα της PCR για κάθε DNA πολυμεράση παρουσιάζονται στους Πίνακες 2-5.

Εικόνα 15: Ο θερμοκυκλοποιητής (SimpliAmp™ Thermal Cycler) που χρησιμοποιήθηκε κατά τις διαδικασίες PCR.

Πίνακας 2: Συστατικά μείγματος PCR με την DreamTaq Green DNA Polymerase.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΌΓΚΟΣ (μL)
10X DreamTaq Green Buffer	2,5
10 mM dNTPs	0,5
10 μM Πρόσθιος Εκκινητής (Forward primer)	0,5
10 μM Ανάστροφος Εκκινητής (Reverse primer)	0,5
Υπόστρωμα DNA	10 pg -1 μg
DreamTaq DNA Polymerase	0,125
H_2O	≤25

Πίνακας 3: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα PCR με την DreamTaq Green DNA Polymerase

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ PCR			
Στάδιο	**Κύκλοι**	**Θερμοκρασία**	**Χρόνος**
Αποδιάταξη	1	95 °C	3 min
Αποδιάταξη	30	95 °C	30 s
Υβριδισμός		Tm-5	30 s
Πολυμερισμός		72 °C	1 min για προϊόντα PCR μέχρι 2 kb. Για μεγαλύτερα προϊόντα 1 min/kb
Πολυμερισμός	1	72 °C	15 min
Διατήρηση	-	15 °C	∞

Πίνακας 4: Συστατικά μείγματος PCR με High Fidelity DNA Polymerase

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΌΓΚΟΣ (μL)
5X Phusion HF Reaction Buffer	4,0
10mM dNTPs	0,4
10μM Πρόσθιος Εκκινητής (Forward primer)	1,0
10 μM Ανάστροφος Εκκινητής (Reverse primer)	1,0
Υπόστρωμα DNA	<250 ng
Minotech Pol HF DNA Polymerase	0,2
H_2O	≤25

Πίνακας 5: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα PCR με High Fidelity DNA Polymerase.

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ PCR			
Στάδιο	**Κύκλοι**	**Θερμοκρασία**	**Χρόνος**
Αποδιάταξη	1	98 °C	30 s
Αποδιάταξη	30	98 °C	10 s
Υβριδισμός		60 °C	30 s
Πολυμερισμός		72 °C	30 s/kb
Πολυμερισμός	1	72 °C	10 min
Διατήρηση	-	15 °C	∞

Πίνακας 6: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Εκκινητής	**Αλληλουχία εκκινητή** (5΄προς 3΄)	**Tm (°C)**
SSU_Fw	CCT GGT TGA TCC TGC CAG	56
SSU_Rv	CAC CAG ACT TGC CCT CCA	58
pJET1.2_Fw	CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GC	63
pJET1.2_Rv	AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG	59

2.3.12 Απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα του απομονωμένου μικροφύκους

Κατά το γενετικό χαρακτηρισμό του απομονωμένου στελέχους, για την απομόνωση DNA χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένο πρωτόκολλο της βιβλιογραφίας [123]. Αρχικά λήφθηκαν κύτταρα από στερεή καλλιέργεια και επαναιωρήθηκαν σε 20 μL αποστειρωμένου νερού. Έπειτα, προστέθηκε ίσος όγκος καθαρής αιθανόλης και το μείγμα αναδεύθηκε με τη βοήθεια vortex. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 200 μL διαλύματος 10% w/v Chelex®100Resin (Biorad), και το μείγμα αναδεύτηκε και θερμάνθηκε στους 98°C για 15 min, με σκοπό τη λύση των κυττάρων. Ακολούθησε φυγοκέντριση στις 13400 rpm για 10 min για την απομάκρυνση των κυτταρικών θραυσμάτων. Ποσότητα 5 μL του υπερκειμένου χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο DNA σε αντίδραση PCR 25 μL.

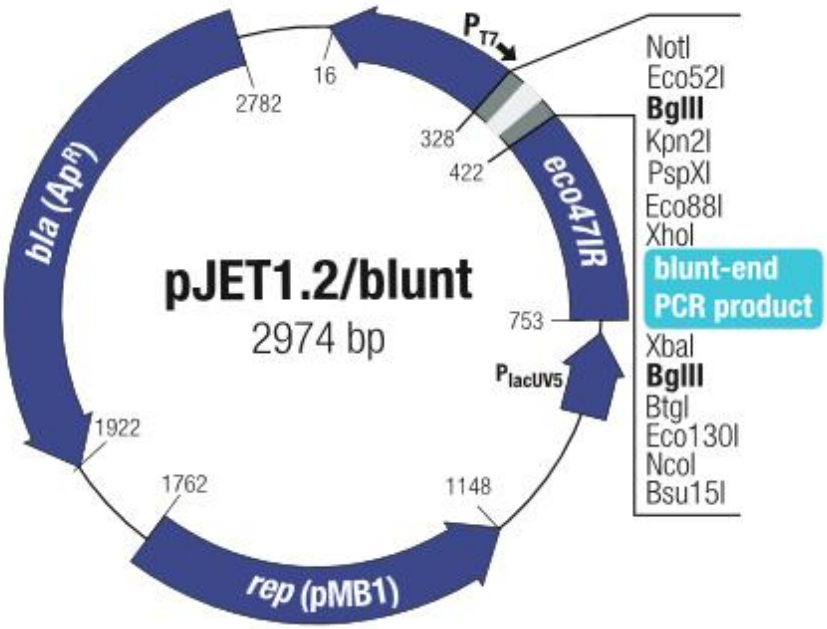
2.3.13 Πολλαπλασιασμός με PCR, κλωνοποίηση και αλληλούχιση περιοχής του 18S rDNA γονιδίου.

Στη συνέχεια, μερική αλληλουχία της συντηρημένης περιοχής του 18S rDNA γονιδίου πολλαπλασιάστηκε με PCR, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το γενωμικό DNA που αναφέρεται παραπάνω, και το ζεύγος εκκινητών SSU_Fw και SSU_Rv (Πίνακας 6).

Αρχικά πραγματοποιήθηκε PCR με τη χαμηλής πιστότητας DreamTaq Green DNA πολυμεράση, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η παραγωγή προϊόντος και η λειτουργικότητα των

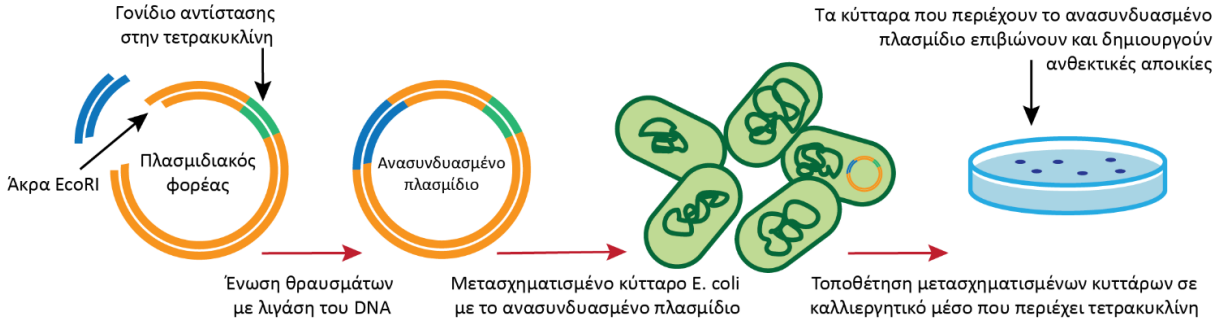
εκκινητών. Τα συστατικά του μείγματος και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα παρουσιάζονται στους πίνακες 2 και 3 αντίστοιχα. Το προϊόν της συγκεκριμένης PCR φορτώθηκε σε πηκτή αγαρόζης.

Μετά την επιβεβαίωση του προϊόντος, πραγματοποιήθηκε PCR με την υψηλής πιστότητας Minotech Pol HF πολυμεράση, με σκοπό την παραγωγή προϊόντος για την ένθεσή του σε πλασμιδικό φορέα. Το προϊόν της PCR εισήχθη σε έναν pJET1.2/blunt πλασμιδικό φορέα (CloneJET PCR Cloning Kit -Thermo Fisher Scientific), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή [VI]. Ο συγκεκριμένος πλασμιδικός φορέας φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλλίνη, συνεπώς οι αποικίες που θα αναπτυχθούν παρουσία αυτού του αντιβιοτικού θα προέρχονται από μετασχηματισμένα βακτήρια.



Εικόνα 16: Ο πλασμιδικός φορέας κλωνοποίησης pJET1.2/blunt. Σημειώνεται η θέση αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης BglII και το γονίδιο ανθεντικότητας στην αμπικιλλίνη (bla (Ap^R)). Η εικόνα λήφθηκε από [VII].

Έπειτα ακολούθησε μετασχηματισμός του παραπάνω φορέα σε δεκτικά κύτταρα DH5a, και τα μετασχηματισμένα κύτταρα μεταφέρονται σε στερεό θρεπτικό μέσο LB με 50 μg/mL αμπικιλλίνη. Επιλέχθηκαν αποικίες από το στερεό μέσο και αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό παρουσία αντιβιοτικού αμπικιλλίνης. Μετά την ανάπτυξη των υγρών καλλιεργειών, απομονώθηκαν πλασμίδια χρησιμοποιώντας το GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή [VIII].



Εικόνα 17: Σχηματική αναπαράσταση μιας τυπικής κλωνοποίησης DNA σε βακτήρια. Η εικόνα λήφθηκε από [IX].

Ακολούθησε πέψη του pJET1.2/blunt φορέα που φέρει το ένθεμα με 1 U περιοριστικής ενδονουκλεάσης BglII για 1 h στους 37°C. Τα προϊόντα της πέψης φορτώθηκαν σε πηκτή αγαρόζης και παρουσιάζονται στην Εικόνα 18. Αφού επιβεβαιώθηκε το επιθυμητό προϊόν από την πέψη, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση της επιθυμητής περιοχής από τα πλασμίδια χρησιμοποιώντας τους εκκινητές SSU_Fw, SSU_Rv και τους εκκινητές από το CloneJET PCR Cloning Kit (PJET_Fw και PJET_Rv). Η αλληλούχιση του παραπάνω φορέα έγινε από την Cemia SA (Λάρισα, Ελλάδα).

2.3.14 Ανάλυση της αλληλουχίας και φυλογενετική ταξινόμηση του απομονονωμένου μικροοργανισμού

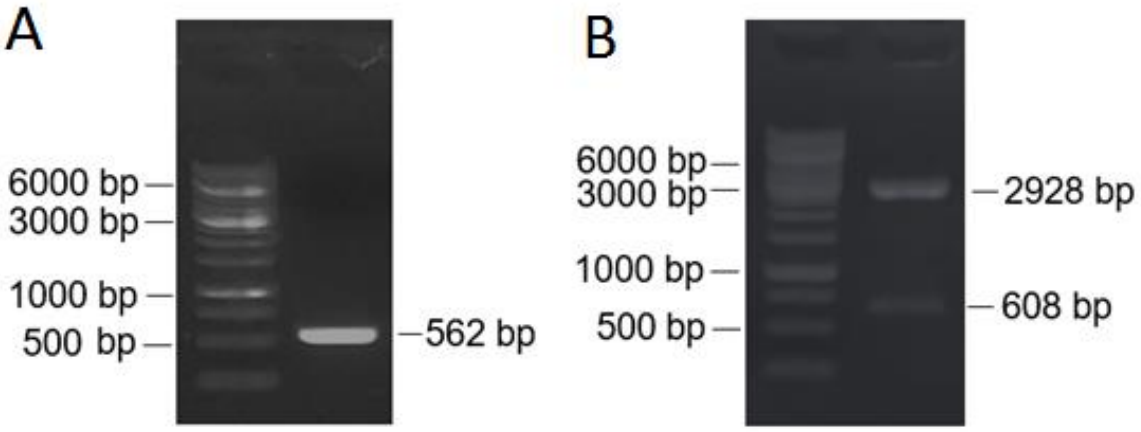
Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης για το 18S rDNA γονίδιο αρχικά μελετήθηκαν με την συγκρισή τους στη βάση δεδομένων GenBank (NCBI) με τη χρήση του αλγορίθμου BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Για την εύρεση της φυλογενετικής θέσης του απομονωμένου στελέχους, συγκρίθηκαν οι αλληλουχίες 29 αντιπροσωπευτικών στελεχών της οικογένειας των *Chlorellaceae*. Η πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών και η κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis - ν 7.0.26). Η στοίχιση των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με τον αλγόριθμο MUSCLE. Το φυλογενετικό δέντρο συνήχθηκε μέσω της μεθόδου neighbor-joining (NJ) και οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν μέσω της μεθόδου Kimura 2-parameter. Η αξιοπιστία του δέντρου αξιολογήθηκε με αναλύσεις εκκίνησης (Bootstrap analyses) με 1000 επαναλήψεις. Οι οργανισμοί *Closteriopsis acicularis* και *Parachlorella kessleri* χρησιμοποιήθηκαν ως έξω-ομάδα (outgroups) για τον ορισμό της ρίζας του φυλογενετικού δέντρου.

2.4 Αποτελέσματα και συζήτηση

2.4.1 Ταυτοποίηση, γενετικός και φυλογενετικός χαρακτηρισμός του απομονωμένου στελέχους Chlorella.

Ο γενετικός χαρακτηρισμός του απομονωμένου στελέχους πραγματοποιήθηκε μέσω αλληλούχισης περιοχής του 18S rDNA (18S rRNA γονιδίο). Η αλληλούχηση του 16S rDNA για τους προκαρυωτικούς και του 18S rDNA για τους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς είναι οι πιο συνηθισμένες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη φυλογενετική ταξινόμηση οργανισμών [124]. Η τεχνική αλληλούχισης του γονιδίου που κωδικοποιεί την 18S υπομονάδα του ριβοσώματος έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για το γενετικό χαρακτηρισμό μικροφυκών, με κάποια παραδείγματα να περιλαμβάνουν χλωροφύκη από τα γένη *Chlamydomonas, Chlorella, Dunaliella, Haematococcus* και *Nannochloris* [125-128]. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την 18S υπομονάδα του ριβοσώματος περιέχει συντηρημένες γονιδιακές περιοχές που αποτελούν μοριακούς δείκτες για τη συστηματική κατάταξη οργανισμών από επίπεδο γένους έως και επίπεδο είδους [129].

Όσον αφορά το γενετικό χαρακτηρισμό του μικροφύκους, αρχικά απομονώθηκε το γενωμικό DNA (Παράγραφος 2.3.12) του και η επιθυμητή γονιδιακή αλληλουχία πολλαπλασιάστηκε με χρήση μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Σε κάθε PCR χρησιμοποιήθηκε ζεύγος εκκινητών (primers), βάσει της συντηρημένης περιοχής του 18S rDNA, αποφεύγοντας περιοχές με εσώνια (introns) [126, 130]. Από τη συγκεκριμένη PCR, χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών SSU_Fw και SSU_Rv (Πίνακας 6) λήφθηκε προϊόν DNA με μήκος 562 bp (Εικόνα 18Α).

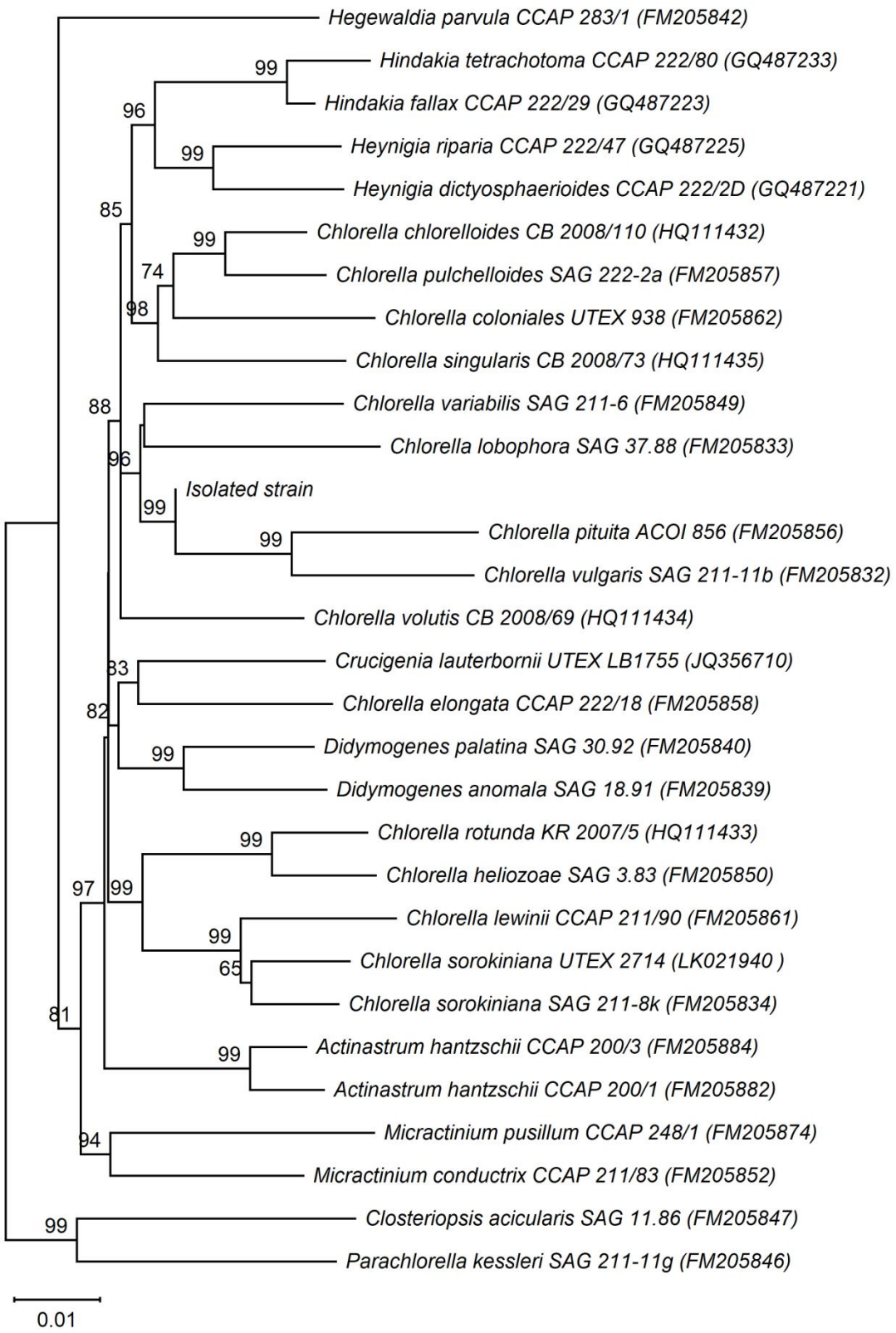


Εικόνα 18: Α) Προϊόν PCR για περιοχή του18S rDNA του απομονωμένου μικροφύκους (562 bp). Β) Προϊόν της πέψης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου με την περιοριστική ενδονουκλεάση BglII. Στα 2974 bp είναι ο γραμμικός πλασμιδικός φορέας και στα 614 bp το προϊόν της PCR, το οποίο φέρει 52 bp επιπλέον από το πλασμίδιο.

Για την αλληλούχιση της επιθυμητής περιοχής, το προϊόν της PCR εντέθηκε σε πλασμιδικό φορέα (pJET1.2/blunt plasmid vector) μήκους 2974 bp, με τον οποίο μετασχηματίστηκαν επιδεκτικά βακτήρια *E. coli*. Ο ανασυνδυασμός επιβεβαιώθηκε με την πέψη του πλασμιδίου με την περιοριστική ενδονουκλεάση BglII, η οποία αναγνωρίζει δυο περιοχές στο πλασμίδιο, συνεπώς δίνοντας 2 προϊόντα. Από την πέψη προέκυψαν τα προϊόντα με μήκος 2928 bp και 608 bp, τα οποία έτρεξαν σε πηκτή αγαρόζης και παρουσιάζονται στην Εικόνα 18Β.

Άφότου επιβεβαιώθηκε ο ανασυνδυασμός, ακολούθησε η αλληλούχιση του πλασμιδίου που φέρει το ένθεμα. Όμως, η ποιότητα της αλληλούχισης είναι χαμηλότερη για 50 βάσεις μετά το σημείο που προσδένεται ο εκκινητής. Συνεπώς, για την προστασία των άκρων πραγματοποιήθηκε συνδυαστικά η αλληλούχιση, όχι μόνο στην περιοχή ενδιαφέροντος, αλλά και στο υπόλοιπο πλασμίδιο, χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών (Πίνακας 6: SSU_Fw με SSU_Rv και PJET_Fw με PJET_Rv). Οι ειδικοί εκκινητές που επιλέχθηκαν προσδένονται στο πλασμίδιο και έξω από την περιοχή ενδιαφέροντος.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης παρουσιάζονται στο Παράρτημα Ι. Η αλληλουχία του γονιδίου κατατέθηκε στη βάση δεδομένων GenBank (NCBI) με αριθμό ένταξης (accession number) **MN733823**. Χρησιμοποιώντας την αλληλουχία του 18S γονιδίου, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση στη GenBank χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο BLAST. Τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλή ομοιότητα της αλληλουχίας του απομονωμένου στελέχους (> 99.8%) με γνωστά στελέχη του γένους *Chlorella*. Επιπλέον, βάσει των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης, κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο βάσει μερικών αλληλουχιών 18S DNA, χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους που αναφέρονται στην Παράγραφο 2.3.14. Από το φυλογενετικό δέντρο που συνήχθηκε προκύπτει, με υψηλή αξιοπιστία, ότι το απομονωμένο στέλεχος μικροφύκους ανήκει στον ίδιο κλάδο (clade) με τα στελέχη *C. variabilis*, *C. lobophora*, *C. pituita*, και *C. vulgaris*.



Εικόνα 19: Φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε βάσει αλληλουχιών του 18S rRNA γονιδίου μέσω μεθόδου Neighbor-joining. Στους κόμβους (nodes) αναγράφονται αναλύσεις εκκίνησης με αξιοπιστία άνω του 50% για 1000 επαναλήψεις. Το δέντρο έχει σχεδιαστεί σε κλίμακα, έτσι ώστε τα μήκη των κλάδων να είναι ανάλογα των εξελικτικών αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη συναγωγή του δέντρου. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις δίπλα σε κάθε είδος αναφέρονται στους αριθμούς ένταξης από τη GenBank για τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν.

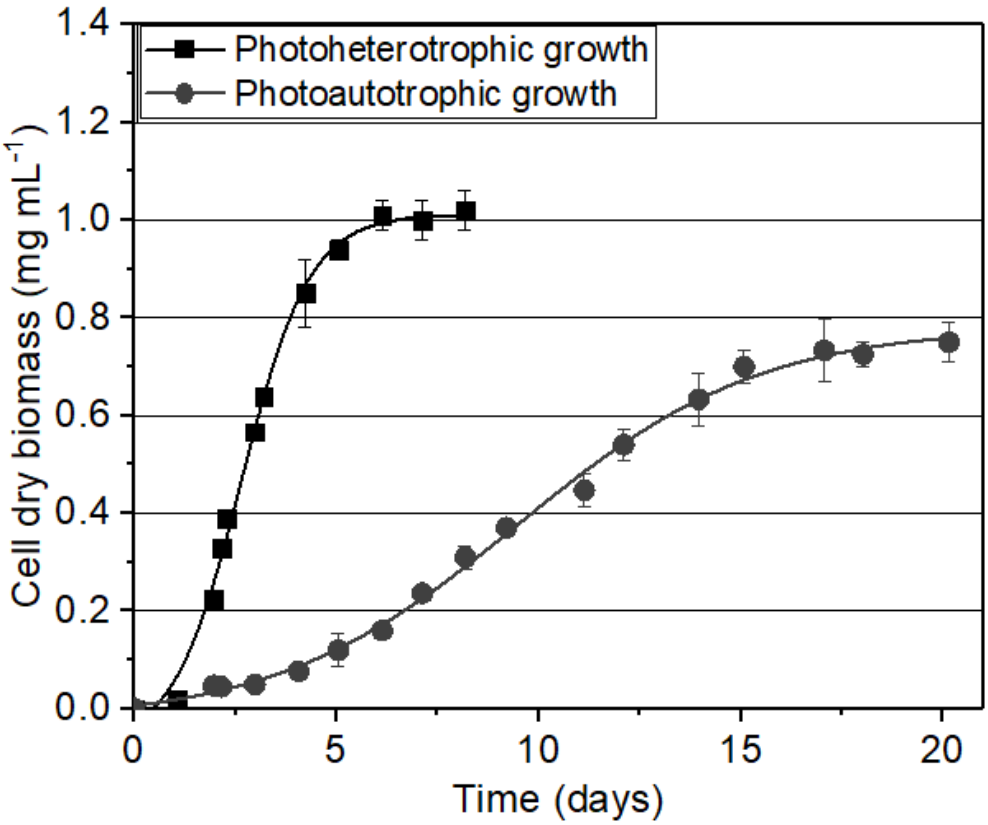
2.4.2 Μελέτη ανάπτυξης του απομονωμένου στελέχους Chlorella.

Στη συγκεκριμένη πειραματική σειρά μελετήθηκε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε φωτοαυτότροφες και φωτοετερότροφες συνθήκες μετρώντας καθημερινά την ξηρή βιομάζα των κυττάρων. Από τα δεδομένα των μετρήσεων κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης του στελέχους *Chlorella* στα θρεπτικά μέσα TAP για τη φωτοετερότροφη και TAP-C για τη φωτοαυτότροφη καλλιέργεια σε ένταση φωτισμού 30-40 μmol φωτονίων$\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Οι καμπύλες παρουσιάζονται στην Εικόνα 20 και οι παράμετροι που υπολογίστηκαν για την ανάπτυξη παρουσιάζονται στον Πίνακα 7. Οι καμπύλες εμφανίζουν τις τυπικές φάσεις ανάπτυξης ενός μικροοργανισμου (λανθάνουσα, εκθετική και στατική φάση). Στις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν κάτω από φωτοετερότροφες συνθήκες, η λανθάνουσα φάση διήρκησε περίπου 25 h και η εκθετική φάση περίπου 96 h. Αντίθετα στις φωτοαυτότροφες συνθήκες, οι φάσεις αυτές είχαν περίπου την τριπλάσια διάρκεια. Σε κάθε περίπτωση, μετά το πέρας της εκθετικής φάσης, τα κύτταρα εισήλθαν και παρέμειναν στη στατική φάση μέχρι το πέρας των μετρήσεων.

Από τη μορφή των καμπυλών είναι εμφανές ότι τα κύτταρα αναπτύσσονται με διαφορετικούς ρυθμούς, όπως φαίνεται από τη αύξηση της βιομάζας συναρτήσει του χρόνου στις δυο αυτές συνθήκες. Κατά τη φωτοετερότροφη ανάπτυξη η βιομάζα της καλλιέργειας αυξάνεται με ταχύτερο ρυθμό σε σχέση με τη φωτοαυτότροφη συνθήκη ανάπτυξης. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί και με τις υψηλότερες τιμές του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ), καθώς και της κλίσης της εφαπτομένης στο κέντρο της σιγμοειδούς καμπύλης (m) στη φωτοετερότροφη ανάπτυξη.

Πίνακας 7: Παράμετροι που υπολογίστηκαν από τα δεδομένα των μετρήσεων ανάπτυξης του μικροοργανισμού. μ: ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, t_o: το κέντρο της σιγμοειδούς καμπύλης και m: η κλίση της εφαπτομένης στο t_o.

Παράμετρος ανάπτυξης	Φωτοετερότροφη καλλιέργεια	Φωτοαυτότροφη καλλιέργεια
Λανθάνουσα φάση (days)	1,04	2,94
Εκθετική φάση (days)	3,99	12,14
μ ($days^{-1}$)	0,964 ± 0,005	0,218 ± 0,004
t_o (days)	2,646 ± 0,085	9,493 ± 0,210
m	0,323 ± 0,029	0,067 ± 0,005
R^2 της σιγμοειδούς καμπύλης που προσαρμόστηκε κατά μοντέλο Boltzmann	0,996	0,997



Εικόνα 20: Καμπύλες ανάπτυξης του στελέχους *Chlorella* που απομονώθηκε από τον ποταμό Γιόφυρο σε φωτοαυτότροφες (●) και φωτοετερότροφες (■) συνθήκες.

Η ταχύτερη αύξηση βιομάζας στις φωτοετερότροφες συνθήκες, συγκριτικά με τις φωτοαυτότροφες, είναι αναμενόμενη. Επιπλέον, στην ίδια συνθήκη επιτεύχθηκε η παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας βιομάζας στο τέλος της εκθετικής φάσης. Τα μικροφύκη του γένους *Chlorella* μπορούν να αναπτύσσονται ταχύτερα και αποδοτικά αξιοποιώντας οργανικά υποστρώματα, όπως σάκχαρα, ή στην περίπτωση αυτή οργανικά οξέα [131, 132]. Είναι όμως αξιοσημείωτο ότι παρουσία οργανικού υποστρώματος, οι ρυθμοί αύξησης της βιομάζας παραμένουν υψηλοί, παρά τη χαμηλή ένταση φωτισμού του πειράματος. Στη φωτοαυτότροφη συνθήκη, η ανάπτυξη των κυττάρων καθορίζεται από τη φωτοσύνθεση. Κατ' επέκταση, ο φωτισμός, αλλά και η παροχή CO_2 είναι οι περιοριστικοί παράγοντες στην περίπτωση αυτή. Όσο αυξάνεται ο αριθμός των κυττάρων, τόσο εντονότερη είναι και η επίδραση φαινομένων σκίασης (shading effects) μεταξύ τους. Συνεπώς, θα είναι πιο δύσκολο να διεισδύσει αποδοτικά το φως σε όλο τον όγκο του θρεπτικού μέσου, άρα και η χαμηλή ένταση του φωτισμού δε θα είναι επαρκής για την ανάπτυξη των κυττάρων [131]. Ταυτόχρονα, η μόνη πηγή άνθρακα για τα φωτοαυτότροφα κύτταρα είναι το CO_2 που προστίθεται στην καλλιέργεια με το διαρκή αερισμό του θρεπτικού μέσου με ατμοσφαιρικό

αέρα. Λόγω της αποδοτικότητάς τους να καθηλώνουν άνθρακα κατά τη φωτοσύνθεση, τα μικροφύκη έχουν υψηλές απαιτήσεις σε CO_2 [133]. Η αύξηση του αριθμού των κυττάρων οδηγεί και σε αύξηση της ανάγκης για τροφοδοσία του μέσου με ανόργανο άνθρακα. Συνεπώς, ο απλός αερισμός με ατμοσφαιρικό αέρα δε θεωρείται επαρκής για το σκοπό αυτό. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι η παροχή αέρα εμπλουτισμένου με CO_2 σε αυτότροφες καλλιέργειες *Chlorella* είχε θετικό αποτέλεσμα όσον αφορά την αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων [134].

2.4.3 Μελέτη της φωτοσυνθετικής ικανότητας του απομονωμένου στελέχους Chlorella.

Σε αυτήν την παράγραφο μελετήθηκε η φωτοσυνθετική δραστηριότητα του απομονωμένου στελέχους κατά τη φωτοαυτότροφη και φωτοετερότροφη ανάπτυξη. Από τα δεδομένα των μετρήσεων του ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου σε διάφορες εντάσεις φωτισμού κατασκευάστηκαν οι καμπύλες φωτοσύνθεσης-ακτινοβολίας για τις δυο συνθήκες ανάπτυξης και παρουσιάζονται στην Εικόνα 21. Οι παράμετροι που υπολογίστηκαν από τα δεδομένα και την καμπύλη παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

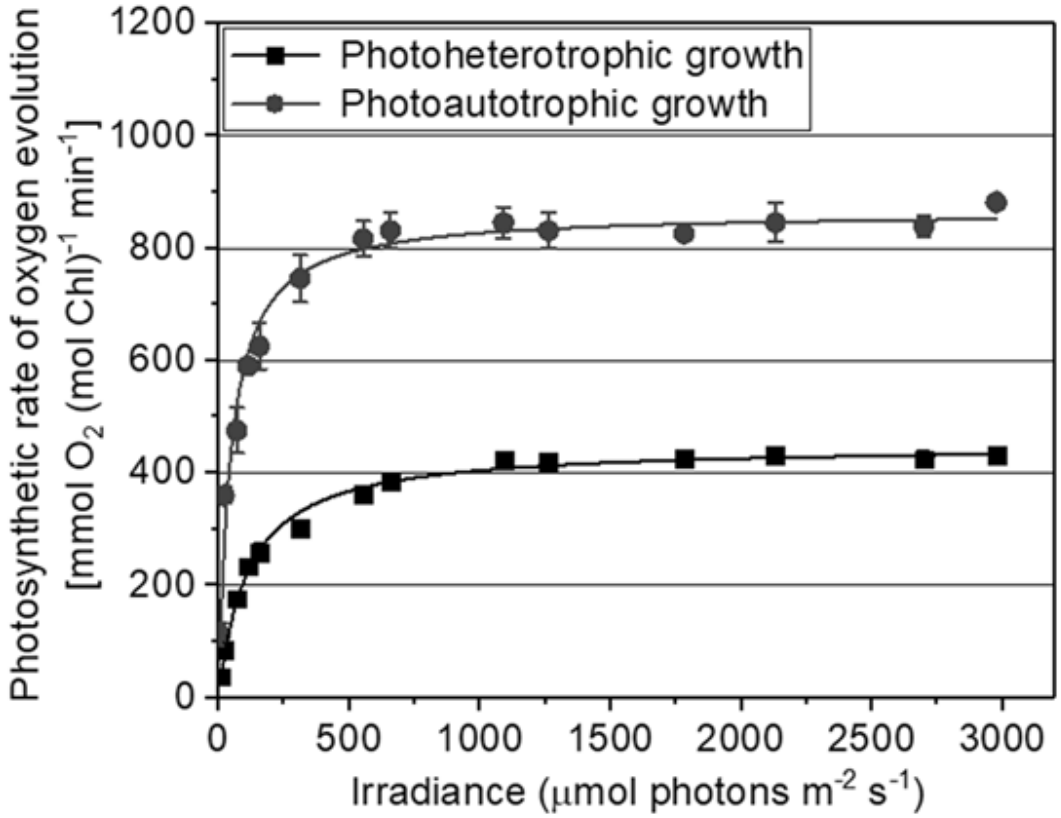
Από τη μορφή των καμπυλών, γίνεται διακριτό ότι τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν αυτότροφα εμφάνισαν εντονότερη φωτοσυνθετική δραστηριότητα σε ίδιες εντάσεις φωτισμού, σε σχέση με τα φωτοετερότροφα, όπως φαίνεται από την υψηλότερη παραγωγή οξυγόνου στις συνθήκες αυτές. Δεδομένου ότι κατά τη φωτοαυτότροφη ανάπτυξη η φωτοσύνθεση είναι απαραίτητη για την επιβίωση του μικροοργανισμού, είναι αναμενόμενη η εντονότερη φωτοσυνθετική δραστηριότητα. Αυτό διαπιστώνεται και από την υψηλότερη τιμή της παραμέτρου P_{max}. Πιο συγκεκριμένα, η τιμή αυτή ήταν περίπου 1,9 φορές για τη *Chlorella* κάτω από φωτοαυτότροφες συνθήκες σε σχέση με τις φωτοετερότροφες. Η τιμή της P_{max} για την αυτότροφη συνθήκη μπορεί να συσχετιστεί και με τα ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά των φωτοσυνθετικών χρωστικών. Στη συνέχεια, κατά την προσαρμογή των φυτών στις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες παρατηρούνται δομικές και λειτουργικές αλλαγές στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό [135]. Η αύξηση του περιεχομένου των χλωροφυλλών και των καροτενοειδών (Πίνακας 9) μαζί με τη μείωση του λόγου χλωροφύλλης a/b μπορεί να αποδωθεί στην αύξηση του μεγέθους της λειτουργικής φωτοσυνθετικής κεραίας, με σκοπό τη βελτίωση της ικανότητας συλλογής φωτός.

Παράλληλα, οι τιμές των παραμέτρων K_I και I_s βρέθηκαν υψηλότερες για τα φωτοετερότροφα κύτταρα, υποδηλώνοντας ότι επιτεύχθηκε φωτοκορεσμός σε υψηλότερη ένταση φωτισμού. Αυτή η ανθεκτικότητα του στελέχους στη συνθήκη αυτή μπορεί να

αποδοθεί στα φαινόμενα σκίασης μεταξύ των κυττάρων, τα οποία προκαλούνται λόγω της ταχείας αύξησης της βιομάζας στην καλλιέργεια, όπως παρουσιάζεται στην παράγραφο 2.4.2. Η απότομη αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας εμποδίζει τον αποτελεσματικό φωτισμό του μέσου καλλιέργειας. Έτσι, η αποδοτική ανάπτυξη του στελέχους κατά την φωτοετερότροφη ανάπτυξη μπορεί να αποδοθεί στην προσαρμοστικότητά του ακόμα και στις χαμηλές συνθήκες φωτισμού των πειραμάτων.

Πίνακας 8: Παράμετροι που υπολογίστηκαν από τα δεδομένα των μετρήσεων φωτοσυνθετικής δραστηριότας του μικροοργανισμού. P_{max}: ο ρυθμός της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας υπό φωτοκορεσμό, K_I: η σταθερά για το ήμισυ του κορεσμού, *a*: η κλίση της αρχικής γραμμικής αύξησης των καμπυλών κατά τον φωτοκορεσμό, I_s: η ένταση του φωτός κατά τη μετάβαση στη φωτοκορεσμένη φωτοσύνθεση, Chl *a*/ Chl *b*: ο λόγος χλωροφύλλης a προς χλωροφύλλη b.

Παράμετρος φωτοσύνθεσης	Φωτοετερότροφη καλλιέργεια	Φωτοαυτότροφη καλλιέργεια
P_{max} [mmol O_2· (mol Chl)$^{-1}$·min^{-1}]	449,08 ± 6,26	864,53 ± 14,21
K_I (μmol photons· m^{-2}·s^{-1})	111,42 ± 8,17	45,85 ± 5,09
R^2 της καμπύλης που προσαρμόστηκε κατά μοντέλο Michaelis- Menten	0,992	0,978
a	1,838 ± 0,173	3,943 ± 1,194
I_s (μmol photons· m^{-2}·s^{-1})	249,18 ± 16,22	187,96 ± 27,03
R^2 για τη γραμμική σχέση του αρχικού ρυθμού φωτοσύνθεσης προς την ακτινοβολία	0,991	0,919
Chl *a* / Chl *b*	2,55 ± 0,15	2,19 ± 0,05



Εικόνα 21: Καμπύλες φωτοσύνθεσης-ακτινοβολίας του στελέχους *Chlorella* που απομονώθηκε από τον ποταμό Γιόφυρο σε φωτοαυτότροφες (●) και φωτοετερότροφες (■) συνθήκες.

2.4.4 Προσδιορισμός βιοχημικού περιεχομένου του στελέχους Chlorella.

Στην παράγραφο αυτή πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του βιοχημικού περιεχομένου των κυττάρων *Chlorella*, ανεπτυγμένα σε φωτοαυτότροφες και φωτοετερότροφες συνθήκες. Σε κάθε περίπτωση τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό της ξηρής βιομάζας των κυττάρων και παρουσιάζονται στον Πίνακα 9. Για τα κύτταρα που μεγάλωσαν αυτότροφα βρέθηκε ότι η ξηρή βιομάζα τους αποτελείται από 34,91 (± 3,91)% πρωτεΐνες, 41,88 (± 3,99)% υδατάνθρακες, 8,11 (± 0,61)% λιπίδια, 3,38 (± 0,09) χλωροφύλλες και 0,59 (± 0,03)% καροτενοειδή. Αντίστοιχα, για τη φωτοετερότροφη *Chlorella*, η ξηρή βιομάζα αποτελούνταν από 39,09 (± 2,61)% πρωτεΐνες, 26,87 (± 2,29)% υδατάνθρακες, 12,94 (± 1,41) λιπίδια, 4,30 (± 0,08)% χλωροφύλλες, και 0,73 (± 0,02)% καροτενοειδή.

Και στις δυο συνθήκες τα κύτταρα εμφάνισαν παρόμοιο πρωτεΐνικο περιεχόμενο, με μικρή αύξηση να παρατηρείται στα φωτοετερότροφα κύτταρα. Ταυτόχρονα, υψηλότερα κατά περίπου 63% ήταν η τιμή που υπολογίστηκε για τα λιπίδια στη φωτοετερότροφη *Chlorella*. Αυτή η τάση μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι το οξικό προσφέρει την απαραίτητη

ενέργεια και τα υποστρώματα που χρειάζεται για τη βιοσύνθεση αυτών των βιομορίων [136]. Παρουσία οξικού ο μεταβολισμός των κυττάρων ρυθμίζεται κατάλληλα, ευνοώντας τη σύνθεση αμινοξέων και τη μετάφραση πρωτεϊνών [137]. Επιπλέον, το οξικό, ως πηγή ακέτυλο-CoA, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή λιπαρών οξέων στον χλωροπλάστη [138, 139]. Όσον αφορά τη φωτοαυτότροφη συνθήκη, τα κύτταρα περιείχαν κατά βάρος περισσότερους υδατάνθρακες. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, όπου στο θρεπτικό μέσο δεν υπάρχουν οργανικά υποστρώματα, τα κύτταρα επιτελούν φωτοσύνθεση για την καθήλωση του CO_2 και τη μετατροπή του σε υδατάνθρακες. Συνεπώς, το αυξημένο ποσοστό υδατανθράκων έρχεται ως απόρροια της αυξημένης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας που παρουσιάζουν τα κύτταρα στις συνθήκες αυτές [140]. Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα έδειξαν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φωτοσυνθετικές χρωστικές για τα μικροφύκη που αναπτύχθηκαν φωτοαυτότροφα.

Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές περιλαμβάνουν τις χλωροφύλλες μαζί με τα καροτενοειδή και συναντώνται στα σύμπλοκα συλλογής φωτός των χλωροπλαστών. Ο κυριότερος ρόλος τους αποτελεί τη συλλογή της φωτεινής ενέργειας που είναι απαραίτητη για τη φωτοσύνθεση. Τα καροτενοειδή επίσης συμμετέχουν στην προστασία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού από επιβλαβείς παράγοντες. Αποσβαίνουν την περίσσεια φωτεινής ενέργειας που απορροφάται μέσω μη φωτοχημικής απόσβεσης, εξουδετερώνουν δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species) και μετριάζουν τις επιπτώσεις από ακραίες θερμοκρασίες [141, 142]. Όπως αναφέρεται και στην παραπάνω παράγραφο, κατά τη φωτοαυτότροφη ανάπτυξη, το στέλεχος *Chlorella* εμφανίζει εντονότερη φωτοσυνθετική δραστηριότητα, συνεπώς είναι λογική η υψηλότερη συγκέντρωση των φωτοσυνθετικών χρωστικών. Το μειωμένο ποσοστό των χλωροφυλλών έχει επίσης παρατηρηθεί στη βιβλιογραφία για κύτταρα *Chlorella* που αναπτύχθηκαν παρουσία υποστρώματος οξικού οξέος [137].

Πίνακας 9: Η βιοχημική σύσταση του στελέχους *Chlorella*.

Βιοχημικό περιεχόμενο (% DCW)	Φωτοετερότροφη *Chlorella*	Φωτοαυτότροφη *Chlorella*
Πρωτεΐνες	39,09 ± 2,61	34,91 ± 3,91
Υδατάνθρακες	26,87 ± 2,29	41,88 ± 3,99
Λιπίδια	12,94 ± 1,41	8,11 ± 0,61
Χλωροφύλλες	2,88 ± 0,50	3,38 ± 0,09
Καροτενοειδή	0,43 ± 0,10	0,59 ± 0,03

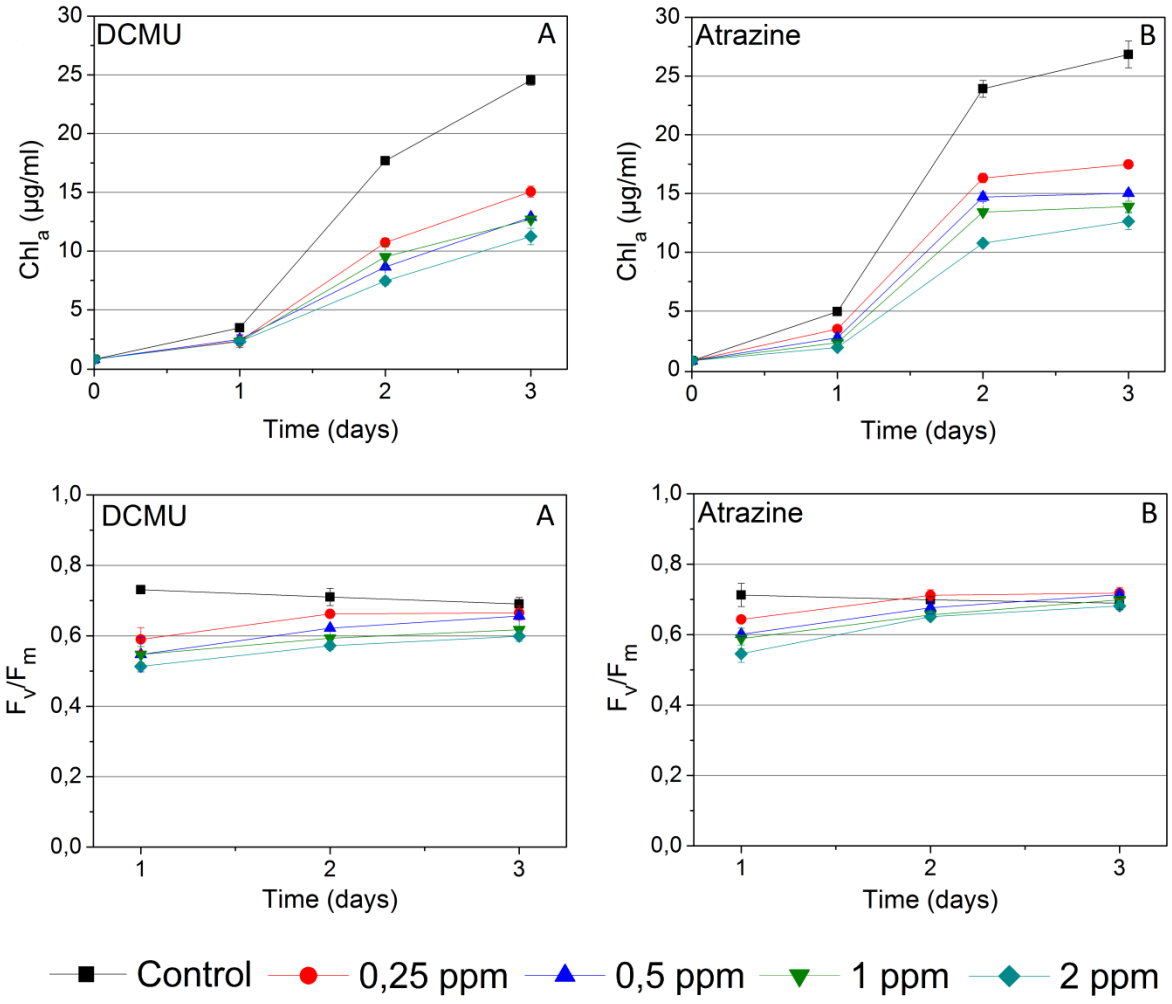
2.4.5 Μελέτη ανθεκτικότητας του στελέχους Chlorella ενάντια σε αναστολείς της φωτοσύνθεσης και αντιβιοτικά.

Στην παράγραφο αυτή μελετήθηκε η ανθεκτικότητα του στελέχους *Chlorella* ενάντια σε χημικές ουσίες που λειτουργούν ως αναστολείς της ανάπτυξης μικροοργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση των ουσιών στην ανάπτυξη του και στη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε χρονικό διάστημα 3 ημερών. Σε κάθε συνθήκη η ανάπτυξη μετρήθηκε μέσω περιεχομένου χλωροφύλλης a και ξηρής βιομάζας κυττάρων, ενώ η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση μέσω επαγωγικού φθορισμού χλωροφύλλης.

Τα ζιζανιοκτόνα που μελετήθηκαν στην παρούσα πειραματική σειρά είναι ισχυροί αναστολείς της φωτοσύνθεσης, με τα χλωροφύκη να είναι ιδιαίτερα ευάλωτα στις επιδράσεις τους [143, 144]. Για παράδειγμα έχει αναφερθεί ότι η ατραζίνη εμφάνισε τοξικότητα με τιμές EC_{50} 0,0465 ppm για στέλεχος *Chlamydomonas*, 0,0729 ppm σε στέλεχος *Chlorella* και 0,171 ppm στο *Scenedesmus quadricauda* σε διάστημα 7 ημερών [144]. Παράλληλα, η DCMU έχει βρεθεί να έχει ανασταλτική δράστη στην ανάπτυξη μικροφυκών σε συγκέντρωση 0,14 ppm στο *Chlamydomonas reinhardtii*, σε εύρος 0,1 - 1 ppm στο *Nannochloris oculata* και 0,023 ppm στη *Chlorella sorokiniana* [145-147]. Παρότι τα αντιβιοτικά είναι ισχυροί αναστολείς της βακτηριακής ανάπτυξης, εμφανίζουν δραστικότητα και σε φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς [103]. Όσον αφορά τα πράσινα μικροφύκη, αυτή η δραστικότητα μπορεί να αποδοθεί στην επίδραση των ουσιών αυτών στους χλωροπλάστες, αναστέλλοντας έτσι λειτουργίες σχετικά με τη φωτοσυνθετική διαδικασία και επιδρώντας τελικά και στην κυτταρική ανάπτυξη [148-150]. Τα αντιβιοτικά είναι κατά κανόνα σχεδιασμένα να αλληλεπιδρούν με βακτηριακούς υποδοχείς. Δεδομένης της προκαρυωτικής φύσης των χλωροπλαστών, παρόμοιοι υποδοχείς συναντώνται και εκεί, αιτιολογόντας έτσι την ευπάθεια στα αντιβιοτικά [151, 152]. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι οι τιμές IC_{50} για την αναστολή της ανάπτυξης μικροφυκών από αντιβιοτικά κυμαίνονται κοντά στα 20 ppm [153]. Έτσι, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι συγκεντρώσεις των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική σειρά είναι αρκετά μεγαλύτερες από εκείνες που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία να αναστέλλουν (>50%) την ανάπτυξη στελεχών *Chlorella* [154-157]. Επιπλέον, σε όλα τα πειράματα η αρχική κυτταρική συγκέντρωση είναι σημαντικά χαμηλή.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 22 δείχουν ότι το στέλεχος *Chlorella* εμφάνισε μειωμένη ανάπτυξη σε όλες τις συγκεντρώσεις των ζιζανιοκτόνων που

δοκιμάστηκαν, χωρίς όμως να σημειωθεί πλήρης αναστολή. Η κυτταρική ανάπτυξη μειώνεται για αυξανόμενες συγκεντρώσεις αναστολέα και σε κάθε περίπτωση τα κύτταρα που επωάστηκαν με ζιζανιοκτόνο εμφάνισαν τις ίδιες φάσεις ανάπτυξης σε σχέση με το μάρτυρα. Παράλληλα, για κάθε ζιζανιοκτόνο, τα κύτταρα στις ίδιες συνθήκες εμφάνισαν μια μικρή μείωση στη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση την πρώτη ημέρα. Όμως, μέχρι την τρίτη ημέρα, οι τιμές αυτές αυξάνουν και τείνουν προς τις τιμές του μάρτυρα κατά τη διάρκεια του πειράματος.



Εικόνα 22: Η επίδραση των ζιζανιοκτόνων (A: DCMU, B: ατραζίνη) στην ανάπτυξη (πάνω) καιι στη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση (κάτω) καλλιεργειών του στελέχους *Chlorella* σε χρονικό διάστημα 3 ημερών. Η ανάπτυξη προσδιορίζεται μέσω περιεχομένου χλωροφύλλης a και η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση εκφράζεται μέσω του λόγου F_v/F_m. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση για κάθε μέτρηση και προέρχονται από τουλάχιστον τριπλέτα δειγμάτων.

.

Όσον αφορά τις μετρήσεις που έλαβαν χώρα την 3η πειραματική ημέρα -72 ώρες επώασης- (Πίνακες 10 - 11), σε όλες τις συγκεντρώσεις των αναστολέων που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκε συγκριτικά μειωμένη παραγωγή βιομάζας, χωρίς αυτή όμως να υπερβαίνει το 50% σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Επίσης, στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αναστολέα οι τιμές της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης δεν παρουσίασαν μείωση μεγαλύτερη από 10% στα κύτταρα που επωάστηκαν με DCMU σε σχέση με το μάρτυρα. Στην αντίστοιχη συνθήκη για την ατραζίνη, οι τιμές του φθορισμού την 3η ημέρα ήταν σχεδόν ίδιες με του μάρτυρα. Κατά την αύξηση των συγκεντρώσεων του αναστολέα τα κύτταρα εμφάνισαν μικρότερο περιεχόμενο χλωροφύλλης a ως προς την κυτταρική βιομάζα. Σε καμία περίπτωση όμως δεν παρατηρήθηκε μείωση άνω του 20% στην τιμή του λόγου αυτού.

Πίνακας 10: Μετρήσεις βιομάζας, μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης και χλωροφύλλης-a του μικροφύκους *Chlorella*, έπειτα από επώαση 3 ημερών παρουσία DCMU.

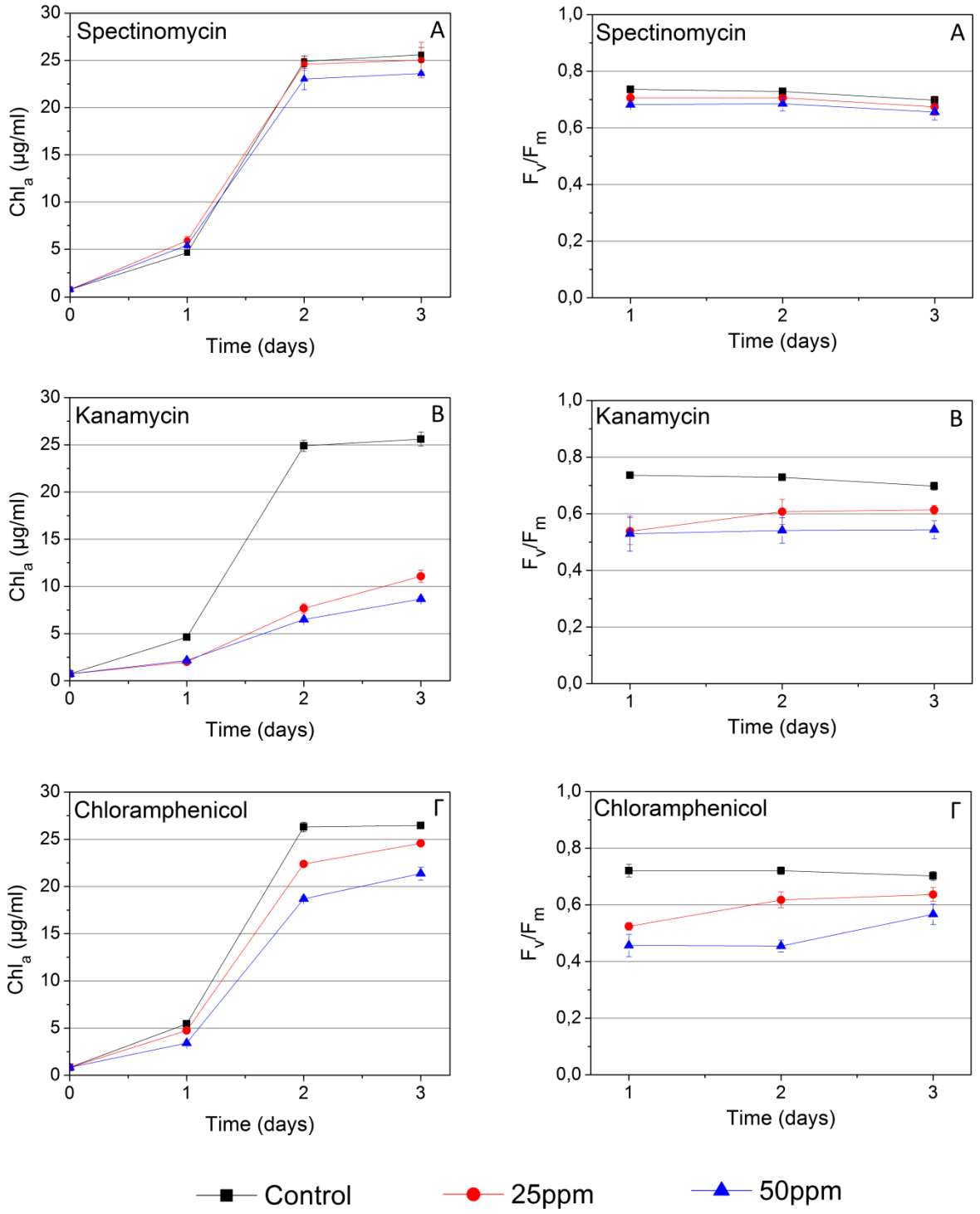
DCMU			
	Βιομάζα [(mg DCW)•mL^{-1}]	F_v/F_{max}	Chl a [μg• (mg DCW)$^{-1}$]
Control	0,770 ± 0,026	0,713 ± 0,013	34,51 ± 1,36
0,25 ppm	0,530 ± 0,026	0,712 ± 0,008	32,36 ± 0,96
0,50 ppm	0,473 ± 0,012	0,695 ± 0,003	31,50 ± 0,86
1,00 ppm	0,463 ± 0,025	0,667 ± 0,012	30,67 ± 0,26
2,00 ppm	0,460 ± 0,001	0,648 ± 0,007	27,93 ± 0,02

Πίνακας 11: Μετρήσεις βιομάζας, μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης και χλωροφύλλης-a του μικροφύκους *Chlorella*, έπειτα από επώαση 3 ημερών παρουσία ατραζίνης.

Ατραζίνη			
	Βιομάζα [(mg DCW)•mL^{-1}]	F_v/F_{max}	Chl a [μg• (mg DCW)$^{-1}$]
Control	0,773 ± 0,025	0,699 ± 0,009	34,70 ± 1,47
0,25 ppm	0,543 ± 0,025	0,715 ± 0,013	32,16 ± 0,60
0,50 ppm	0,483 ± 0,032	0,713 ± 0,009	31,07 ± 0,46
1,00 ppm	0,463 ± 0,015	0,699 ± 0,006	29,97 ± 0,99
2,00 ppm	0,433 ± 0,031	0,680 ± 0,012	28,21 ± 0,40

Η επίδραση των αντιβιοτικών στην ανάπτυξη και στη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού παρουσιάζονται στην Εικόνα 23. Στην περίπτωση της σπεκτινομυκίνης, παρατηρείται αμελητέα αναστολή της ανάπτυξης, αφού οι τιμές για το περιεχόμενο χλωροφύλλης a των δειγμάτων βρίσκονται πολύ κοντά με τις τιμές του μάρτυρα. Αντίστοχη συμπεριφορά εμφανίζεται και από τη μελέτη του επαγωγικού φθορισμού, όπου ουσιαστικά δεν υπάρχει καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Από τα αντιβιοτικά που μελετήθηκαν, η καναμυκίνη αποδείχθηκε ότι προκαλεί τη μεγαλύτερη αναστολή στην ανάπτυξη του στελέχους. Σε κάθε πειραματική ημέρα, οι κυτταρικές συγκεντρώσεις, εκφρασμένες ως συγκέντρωση χλωροφύλλης a, ήταν χαμηλότερες από το 50% των αντίστοιχων τιμών του μάρτυρα. Όμως, και για τις δυο συγκεντρώσεις καναμυκίνης που μελετήθηκαν, η αναστολή στην ανάπτυξη και στη φωτοσυνθετική λειτουργία ήταν παρόμοια, όπως φαίνεται και από τις πολύ κοντινές τιμές χλωροφύλλης και επαγωγικού φθορισμού. Τα αποτελέσματα για τη χλωραμφαινικόλη δείχνουν μικρή αναστολή της ανάπτυξης και της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης.

Την τελευταία πειραματική ημέρα (Πίνακες 12 - 13), η βιομάζα των κυττάρων ήταν ελάχιστα μειωμένη σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα, για όλες τις συγκεντρώσεις της σπεκτινομυκίνης και της χλωραμφαινικόλης. Αντίθετα, σημειώθηκε σημαντική μείωση της κυτταρικής βιομάζας όταν το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν η καναμυκίνη. Πιο συγκεκριμένα, ήταν μειωμένη κατά 57% και 62% για συγκεντρώσεις 25 και 50 ppm αντίστοιχα. Έπειτα, κατά την τρίτη ημέρα, η σπεκτινομυκίνη πρακτικά δεν προκάλεσε καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε καμία συγκέντρωση. Αυτό συμφωνεί και με τις παρόμοιες τιμές του λόγου χλωροφύλλης προς βιομάζα για το μάρτυρα και τα δείγματα. Παράλληλα, τα άλλα δυο αντιβιοτικά είχαν παρόμοια συμπεριφόρα στις μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού, προκαλώντας μείωση της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης, περίπου 10% και 20%, για 25 και 50 ppm αντιβιοτικού αντίστοιχα. Και στην περίπτωση αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με τη μείωση του λόγου χλωροφύλλης ανά μονάδα βιομάζας κυττάρων για τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά.



Εικόνα 23: Η επίδραση των αντιβιοτικών (Α: σπεκτινομυκίνη Β: καναμυκίνη, Γ: χλωραμφαινικόλη) στην ανάπτυξη (αριστερά) καιι στη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση (δεξιά) καλλιεργειών του στελέχους *Chlorella* σε χρονικό διάστημα 3 ημερών. Η ανάπτυξη προσδιορίζεται μέσω περιεχομένου χλωροφύλλης a και η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση εκφράζεται μέσω του λόγου F_v/F_m. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση για κάθε μέτρηση και προέρχονται από τουλάχιστον τριπλέτα δειγμάτων.

Πίνακας 12: Μετρήσεις βιομάζας, μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης και χλωροφύλλης a του μικροφύκους *Chlorella*, έπειτα από επώαση 3 ημερών παρουσία σπεκτινομυκίνης.

Σπεκτινομυκίνη			
	Βιομάζα [(mg DCW)•mL^{-1}]	F_v/F_{max}	Chl a [μg• (mg DCW)$^{-1}$]
Control	0,890 ± 0,020	0,705 ± 0,011	29,16 ± 0,70
25 ppm	0,870 ± 0,036	0,684 ± 0,022	29,79 ± 2,23
50 ppm	0,813 ± 0,025	0,656 ± 0,028	29,89 ± 0,19

Πίνακας 13: Μετρήσεις βιομάζας, μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης και χλωροφύλλης a του μικροφύκους *Chlorella*, έπειτα από επώαση 3 ημερών παρουσία καναμυκίνης.

Καναμυκίνη			
	Βιομάζα [(mg DCW)•mL^{-1}]	F_v/F_{max}	Chl a [μg• (mg DCW)$^{-1}$]
Control	0,890 ± 0,020	0,705 ± 0,011	29,16 ± 0,70
25 ppm	0,383 ± 0,068	0,614 ± 0,016	28,84 ± 1,23
50 ppm	0,337 ± 0,006	0,568 ± 0,026	25,72 ± 0,67

Πίνακας 14: Μετρήσεις βιομάζας, μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης και χλωροφύλλης a του μικροφύκους *Chlorella*, έπειτα από επώαση 3 ημερών παρουσία χλωραμφαινικόλης.

Χλωραμφαινικόλη			
	Βιομάζα [(mg DCW)•mL^{-1}]	F_v/F_{max}	Chl a [μg• (mg DCW)$^{-1}$]
Control	0,875 ± 0,025	0,702 ± 0,016	30,24 ± 0,17
25 ppm	0,865 ± 0,007	0,637 ± 0,024	28,22 ± 0,39
50 ppm	0,770 ± 0,040	0,567 ± 0,037	26,39 ± 1,44

Από την παρούσα μελέτη προκύπτει το συμπέρασμα ότι το στέλεχος *Chlorella* που απομονώθηκε από τον ποταμό Γιόφυρο έμφανίζει ανθεκτικότητα σε μια σειρά αναστολέων της φωτοσύνθεσης και αντιβιοτικών. Σε καμία συνθήκη για οποιαδήποτε ουσία που μελετήθηκε δεν παρουσιάστηκε πλήρης αναστολή της ανάπτυξης ή της φωτοσυνθετικής λειτουργίας. Η σημαντικότερη αναστολή της ανάπτυξης (>50%) σημειώθηκε στην περίπτωση της καναμυκίνης, σε κάθε συγκέντρωση που μελετήθηκε. Επίσης, σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε στα δείγματα μείωση άνω του 20% στη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση σε σχέση με τις αντίστοιχες καλλιέργειες του μάρτυρα.

Οι μικροοργανισμοί μπορεί να φέρουν ανθεκτικότητα στην τοξική επίδραση ουσιών, όπως αυτές που μελετώνται στην παράγραφο αυτή, με διάφορους τρόπους. Για παράδειγμα,

έχει αναφερθεί η ανθεκτικότητα σε ζιζαντιοκτόνα της τάξης των τριαζινών να οφείλεται σε αλλαγές σε κατάλοιπα αμινοξέων, εμποδίζοντας έτσι την πρόσδεση του ανστολέα στην D1 υπομονάδα του φωτοσυστήματος ΙΙ [100]. Σε άλλη περίπτωση έχει αναφερθεί μικρυφύκη *Chlamydomonas* να φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, αδρανοποιώντας τα, είτε να φέρουν μεταλλάξεις σε rRNA γονίδια, εμποδίζοντας την επίδραση των αντιβιοτικών στα ριβοσώματα [158]. Ένα διαφορετικό παράδειγμα μηχανισμού προστασίας οργανισμών που αναπτύσσονται σε επιβαρυμένα και τοξικά περιβάλλοντα αποτελούν οι εξωκυττάριες μήτρες [159, 160]. Τα πολυμερή αυτά λειτουργούν ως ένας επιπλέον φραγμός προστασίας επιτρέποντας ή αποτρέποντας επιλεκτικά την είσοδο ωφέλιμων ή επιβλαβών αντίστοιχα ουσιών εντός του κυττάρου [161]. Η ανθεκτικότητα του στελέχους μπορεί να οφείλεται, είτε σε γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στον συγκεκριμένο μηχανισμό δράσης σε κάποια συγκεριμένη ουσία, είτε πιο γενικευμένα στην παρεμπόδιση της διάχυσης των ουσιών προς το εσωτερικό των κυττάρων. Σαφώς και δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα να έχουν αναπτυχθεί ταυτόχρονα μηχανισμοί ανθεκτικότητας σε όλες τις ενώσεις που δοκιμάστηκαν. Δεδομένου ότι όλες οι παραπάνω είναι ουσίες που στοχεύουν διαφορετικά σημεία, θεωρείται περισσότερο πιθανό ότι η εξωκυττάρια μήτρα εμποδίζει την είσοδο των ουσιών προς το κύτταρο. Έτσι, λόγω διαφορετικής μοριακής δομής, κάποιες ουσίες πρακτικά δεν διεισδύουν καθόλου, κάποιες διέρχονται σε μικρό βαθμό και κάποιες διαπερνούν αρκετά ευκολότερα την εξωκυττάρια, κάτι που θα δικαιολογούσε τη διαφορετική δραστικότητα των χημικών αναστολέων. Ένα στοιχείο το οποίο συνηγορεί στο γεγονός ότι οι ουσίες αυτές δε διαπερνούν την εξωκυττάρια μήτρα είναι ότι ο βαθμός επίδρασης της ουσίας στην ανάπτυξη και τη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού είναι ανεξάρτητος από τη συγκέντρωσή της στο θρεπτικό μέσο. Πιθανότατα αυτή η ανθεκτικότητα να οφείλεται στην προστασία που προσφέρει η εξωκυττάρια μήτρα.

2.5 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση και η μελέτη μιας σειράς ιδιοτήτων και χαρακτηριστικών του μικροφύκους που απομονώθηκε από τον Γιόφυρο ποταμό στην πόλη του Ηρακλείου Κρήτης.

Αρχικά, μέσω μέσω αλληλούχισης μιας συντηρημένης περιοχής του 18S rRNA γονιδίου και φυλογενετικής πραγματοποιήθηκε ο γενετικός χαρακτηρισμός του στελέχους. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με αλληλουχίες από γενετικές βάσεις δεδομένων, συμπεραίνεται το στέλεχος αυτό βρέθηκε ότι ανήκει στο γένος *Chlorella*. Επιπρόσθετα, κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο, και από τη θέση που τοποθετήθηκε το στέλεχος επιβεβαιώνεται η μεγάλη συγγένειά του με στελέχη *Chlorella*. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν και τις παρατηρήσεις προηγούμενων μελετών του εργαστηρίου, όπου είχε πραγματοποιηθεί μορφολογικός χαρακτηρισμός του συγκεκριμένου στελέχους [22, 23].

Έπειτα, ακολούθησε η μελέτη της ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε φωτοαυτότροφες και φωτοετερότροφες συνθήκες. Τα αποτελέσματα αυτής της πειραματικής σειράς έδειξαν ότι το στέλεχος *Chlorella* μπορεί να αναπτύσσεται με υψηλό ρυθμό παρουσία οργανικού υποστρώματος οξικού οξέος, εμφανίζοντας υψηλή παραγωγικότητα βιομάζας. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα πειράματα αυτά έλαβαν χώρα σε χαμηλές συνθήκες φωτισμού, κάτι που κατά κανόνα δυσκολεύει την ανάπτυξη φωτοσυνθετικών οργανισμών.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η φωτοσυνθετική ικανότητα του στελέχους στις δυο συνθήκες ανάπτυξης που αναφέρθηκαν παραπάνω, σε ένα μεγάλο εύρος έντασης φωτονιακής ακτινοβολίας. Από τα δεδομένα των μετρήσεων κατασκευάστηκαν καμπύλες απόκρισης της φωτοσύνθεσης προς την ακτινοβολία, καθώς και υπολογίστηκαν παράμετροι που σχετίζονται με τη φωτοσυνθετική λειτουργία. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα φωτοαυτότροφα κύτταρα έδειξαν εντονότερη φωτοσυνθετική δραστηριότητα, καθώς η φωτοσύνθεση στην περίπτωση αυτή είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την επιβίωσή τους. Από την άλλη, τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν φωτοετερότροφα εμφάνισαν φωτοκορεσμό της φωτοσύνθεσής τους σε υψηλότερες εντάσεις ακτινοβολίας. Αυτή η παρατήρηση οφείλεται στο γεγονός ότι, λόγω απότομης αύξησης της κυτταρικής πυκνότητας, μειώνεται η διαπερατήτα του φωτός στο μέσο καλλιέργειας. Ως αποτέλεσμα, τα κύτταρα είναι προσαρμοσμένα να αναπτύσσονται αποδοτικά και σε χαμηλότερο φωτισμό.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του βιοχημικού περιεχομένου των κυττάρων, όταν αυτά αναπτύχθηκαν φωτοαυτότροφα και φωτοετερότροφα. Τα φωτοαυτότροφα κύτταρα ήταν περιεκτικότερα σε υδατάνθρακες και φωτοσυνθετικές

χρωστικές, κάτι που αποδίδεται στην αυξημένη φωτοσυνθετική δραστηριότητα που εμφανίζουν. Αντίθετα, η φωτοετερότροφη συνθήκη ευνοήσε περισσότερο την παραγωγή λιπιδίων.

Στα πλαίσια του χαρακτηρισμού του μικροοργανισμού, μελετήθηκε η ανθεκτικότητά του ενάντια σε κοινούς αναστολείς της φωτοσύνθεσης και αντιβιοτικά που λειτουργούν ως αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το στέλεχος έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται ακόμα και παρουσία των μεγαλύτερων συγκεντρώσεων των παραπάνω ουσιών. Σε κάθε περίπτωση δε σημειώθηκε σημαντική καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, ενώ η ανάπτυξη δεν αναστάλθηκε σημαντικά, με εξαίρεση τα δείγματα που επωάστηκαν με καναμυκίνη. Οι μικροοργανισμοί που επιβιώνουν σε επιβαρυμένα περιβάλλοντα, όπως το στέλεχος που μελετάται στην παρούσα διατριβή, έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που τους προσδίδουν ανθεκτικότητα ενάντι σε τοξικές επιδράσεις από το περιβάλλον τους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, αυτή η ανθεκτικότητα θεωρείται ότι οφείλεται σε μια εξωκυττάρια μήτρα πολυσακχαρίτη που εμποδίζει τη διάχυση των ουσιών αυτών εντός του κυττάρου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *CHLORELLA* ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ

3.1 Εισαγωγή

Τα βιομηχανικά απόβλητα αποτελούν ένα σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα και η διαχείρισή τους φέρει και οικονομικές προεκτάσεις. Ιδιαίτερα πλούσια σε οργανικό ρυπαντικό φορτίο είναι τα υγρά γαλακτοκομικά απόβλητα από γαλακτοβιομηχανίες και τυροκομεία [162, 163]. Αυτά χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά υψηλές τιμές Χημικά Απαιτούμενου Οξυγόνου (COD = 40-80 g/L) και Βιοχημικά Απαιτούμενου Οξυγόνου (BOD = 30-50 g/L) [81, 164]. Ένα από τα κυριότερα συστατικά των αποβλήτων αποτελεί η λακτόζη, ένας δισακχαρίτης που εξαιτίας της συγκέντρωσής της συνεισφέρει σε μεγάλο βαθμό στο ρυπαντικό χαρακτήρα των αποβλήτων. Εκτός από τη λακτόζη, περιέχονται και πρωτεΐνες, λιπίδια και άλατα (>50% NaCl και KCl) [165]. Η ακριβής σύσταση των αποβλήτων εμφανίζει διακυμάνσεις και εξαρτάται από παράγοντες όπως η εποχή ή το στάδιο παραγωγής [166]. Επειδή τα απόβλητα των τυροκομείων εξακολουθούν να περιέχουν μεγάλες ποσότητες θρεπτικών συστατικών, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως υγρά μέσα για την ανάπτυξη πολύτιμων μικροοργανισμών [81, 164].

Κατά τη μεικτότροφη ανάπτυξη των μικροφυκών, αξιοποιούνται τόσο η διαδικασία της φωτοσύνθεσης, όσο και οργανικά υποστρώματα για την ανάπτυξη των κυττάρων. Για τις ετερότροφες και μεικτότροφες καλλιέργειες απαιτείται η παροχή οργανικού υποστρώματος, κάτι που αυξάνει σημαντικά το κόστος καλλιέργειας [167]. Με τη χρήση υδατικών αποβλήτων ως πηγή θρεπτικών συστατικών για μέσα καλλιέργειας μπορεί να επιτευχθούν υψηλοί ρυθμοί παραγωγής βιομάζας, λόγω της ύπαρξης απαραίτητων συστατικών με ταυτόχρονη κατεργασία τους για να μειωθεί το οργανικό και ανόργανο φορτίο τους. Εκτός από τους αυξημένους ρυθμούς ανάπτυξης, ο μεικτότροφος τρόπος καλλιέργειας προσφέρει το επιπλέον πλεονέκτημα της καθήλωσης CO_2 από την ατμόσφαιρα, συνδυάζοντας την αποκατάσταση των υγρών αποβλήτων με την ταυτόχρονη εκμετάλλευση ενός αερίου που συνεισφέρει στο φαινόμενο του θερμοκηπίου.

Δεδομένου ότι τα μικροφύκη είναι μια κατηγορία φωτοσυνθετικών οργανισμών οι οποίοι αναπτύσσονται μέσω διαδικασιών χαμηλού περιβαλλοντικού αποτυπωματος, η κατεργασία των αποβλήτων με αυτά φέρει περαιτέρω οικολογικά πλεονεκτήματα. Ταυτόχρονα, η βιομάζα που προκύπτει απο την επεξεργασία των αποβλήτων με μικροφύκη έχει εμπορική αξία και μπορεί να μετριάσει το κόστος της διαδικασίας βιοαποκατάστασης. Ως αποτέλεσμα, η φυκοαποκατάσταση αποτελεί έναν από τους ιδανικότερους τρόπους διαχείρισης υγρών βιομηχανικών αποβλήτων.

3.2 Σκοπός

Η συγκεκριμένη πειραματική σειρά είχε σκοπό τη χρήση γαλακτοκομικών αποβλήτων ως θρεπτικά μέσα καλλιέργειας του απομονωμένου στελέχους *Chlorella*. Ο στόχος είναι ο συνδυασμός της υψηλής παραγωγής βιομάζας με την αποκατάσταση των αποβλήτων.

Οι στόχοι του κεφαλαίου συνοψίζονται ως εξής:

Πρωτογενής κατεργασία των αποβλήτων - Χαρακτηρισμός φυσικοχημικών παραμέτρων.

- Τυπικές παράμετροι: pH, αγωγιμότητα, ολικά στερεά.
- Προσδιορισμός ολικών σακχάρων.

Εύρεση βέλτιστων συνθηκών ανάπτυξης του μικροφύκους σε θρεπτικά με βάση το τυρόγαλα.

- Επιλογή τρόπου ανάπτυξης.
- Επιλογή περιεκτικότητας σε απόβλητα.
- Βελτιστοποίηση θρεπτικού μέσου.

Αξιολόγηση μεθόδου αποκατάστασης αποβλήτων με το στέλεχος Chlorella sp.

- Μελέτη απομάκρυνσης σακχάρων από τα απόβλητα.

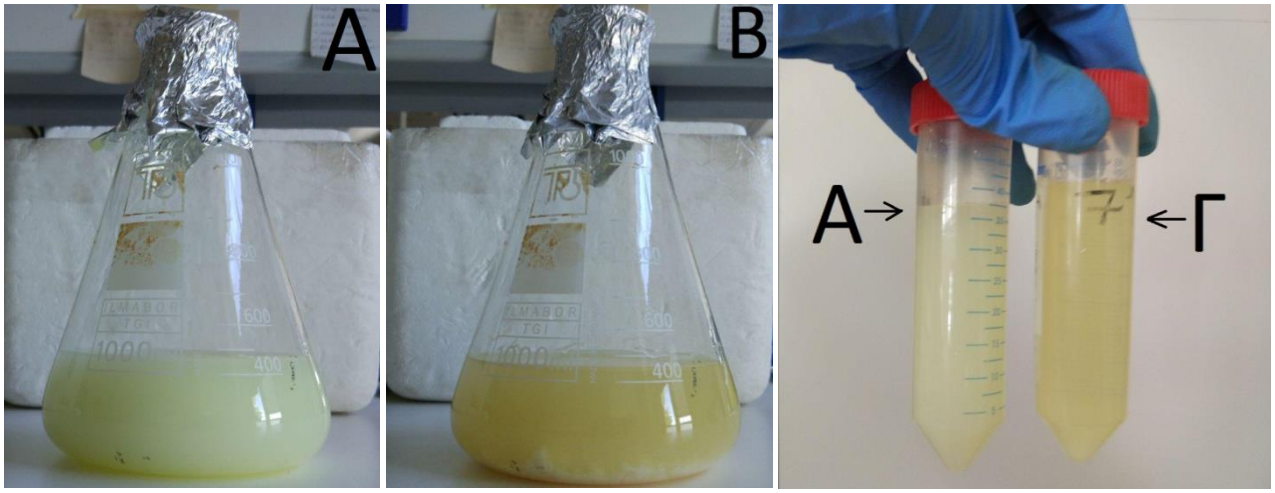
Προσδιορισμός βιοχημικού περιεχομένου των κυττάρων που αναπτύχθηκαν μεικτότροφα σε γαλακτοκομικά απόβλητα.

- Υδατάνθρακες.
- Πρωτεΐνες.
- Λιπίδια.
- Φωτοσυνθετικές χρωστικές (χλωροφύλλες και καροτενοειδή).

3.3 Πειραματικό μέρος

3.3.1 Δείγμα υγρών γαλακτοκομικών αποβλήτων και πρωτογενής κατεργασία τους.

Τα υγρά γαλακτοκομικά απόβλητα προμηθεύτηκαν από τυροκομικές μονάδες στο βόρειο τμήμα του νομού Χανίων στην Κρήτη, κατά την όψιμη περίοδο της τυροκόμησης. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C. Πριν τη χρήση τους στα μέσα καλλιέργειας, τα απόβλητα αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο για 20-30 min. Μετά την αποστείρωση, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός συσσωματωμάτων στο υγρό. Ακολούθησε ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου και τα απόβλητα φυγοκεντρήθηκαν στα 5000 rpm για την καθίζηση των στερεών. Συλλέχθηκε το υπερκείμενο μέσω απόχυσης. Μετά την αποστείρωση, ο χειρισμός των αποβλήτων για όλα τα πειράματα έλαβε χώρα σε θάλαμο νηματικής ροής αέρα παρουσία φλόγας.



Εικόνα 24: Τα απόβλητα πριν (Α) την πρωτογενή κατεργασία, μετά την αποστείρωση (Β) και μετά την πρωτογενή κατεργασία τους (Γ). Διακρίνονται τα συσσωματώματα που εμφανίζονται μετά την αποστείρωση.

3.3.2 Προσδιορισμός ολικών στερεών στα απόβλητα.

Για τον προσδιορισμό των ολικών στερεών χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο της βιβλιογραφίας [168]. Ποσότητα δειγμάτων γνωστού όγκου μεταφέρθηκε σε προζυγισμένα αλουμινένια πιατάκια. Πριν από κάθε μεταφόρα πραγματοποιούνταν vortex για την ομογενοποίηση των δειγμάτων. Τα δείγματα αφέθηκαν για ξήρανση σε φούρνο σε θερμοκρασία 70°C για τουλάχιστον 14 h, και έπειτα αφέθηκαν ξανά για ξήρανση σε φούρνο

στους 103-105°C για 1 h. Τέλος, μετρήθηκε η ξηρή βιομάζα με χρήση αναλυτικού ζυγού τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων.

3.3.3 Προσδιορισμός σακχάρων στα απόβλητα με τη μέθοδο θυμόλης-θειικού

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό σακχάρων στα απόβλητα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος θυμόλης-θειικού [115], τροποποιημένη κατά Schulze *et al.* [116]. Αρχικά πραγματοποιήθηκε υδρόλυση των σακχάρων στο δείγμα με την προσθήκη 0,5 mL 4 N HCl σε 0,5 mL αποβλήτων και ακολούθησε επώαση για 2 h στους 100°C. Το υδρόλυμα φυγοκεντρήθηκε για την απομάκρυνση στερεών και αραιώθηκε κατάλληλα. Σε 100 μL αραιωμένου υδρολύματος προστέθηκαν 300 μL αντιδραστηρίου θυμόλης (1 mg/mL θυμόλης σε θειικό οξύ). Πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση του δείγματος με τη βοήθεια vortex και επώαση στους 110°C για 30 min. Έπειτα μετρήθηκε η απορρόφηση στα 509 nm. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 100 μL απιονισμένο νερό αντί για υδρόλυμα σε 300 μL αντιδραστηρίου θυμόλης.

Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη ως πρότυπη ουσία. Παρασκευάστηκε αρχικό διάλυμα γλυκόζης συγκέντρωσης 1 mg/mL, και ακολούθησαν αραιώσεις για την παρασκευή δειγμάτων σε εύρος συγκεντρώσεων 0,01 - 0,1 mg/mL.

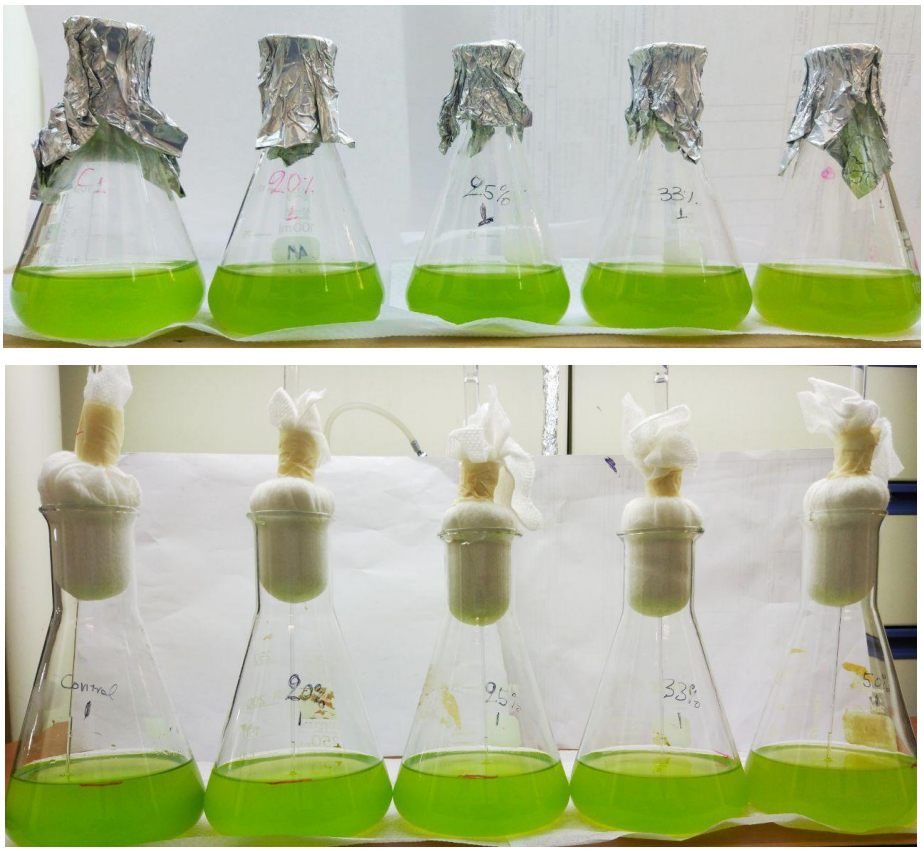
3.3.4 Οργανισμός και συνθήκες ανάπτυξης

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες από το απομονωμένο στέλεχος *Chlorella sp*., όπως αναφέρεται στην Παράγραφο 2.3.1.

3.3.5 Παρασκευή πειραματικών καλλιεργειών για την ανάπτυξη του στελέχους Chlorella sp.σε θρεπτικά μέσα με βάση γαλακτοκομικά απόβλητα

Για την παρασκευή των πειραματικών καλλιεργειών, συλλέχθηκαν κύτταρα από μητρική καλλιέργεια *Chlorella* στο τέλος της εκθετικής φάσης, φυγοκεντρήθηκαν στα 1000g για 5 min και επαναιωρήθηκαν στα αντίστοιχα θρεπτικά μέσα· είτε σε TAP, είτε σε θρεπτικό μέσο από αραιωμένα απόβλητα. Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν στις δυο πειραματικές σειρές παρουσιάζονται στους Πίνακες 16 και 17.

Για τη φωτοετερότροφη συνθήκη ανάπτυξης, τα κύτταρα από τη θυγατρική καλλιέργεια μοιράστηκαν σε κωνικές φιάλες χωρητικότητας 100 mL, με τελικό όγκο καλλιέργειας 50 mL. Οι κωνικές φιάλες είχαν κλειστεί με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό αναδευτήρα (shaker) και αναδεύονταν κατά τη διάρκεια του πειράματος με συχνότητα 140 rpm. Στην περίπτωση των μεικτότροφων καλλιεργειών, τα κύτταρα από τη θυγατρική καλλιέργεια μοιράστηκαν σε κωνικές φιάλες χωρητικότητας 250 mL, με τελικό όγκο καλλιέργειας 120 mL. Οι κωνικές φιάλες κλείστηκαν με πώμα από βαμβάκι (cotton plug), μέσα από το οποίο διερχόταν μια πιπέτα Pasteur για τον συνεχή αερισμό των καλλιεργειών. Η πιπέτα περιείχε βαμβάκι, φιλτράροντας τον αέρα που διερχόνταν με σκοπό την αποφυγή επιμόλυνσης των καλλιεργειών. Σε κάθε περίπτωση, η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ορίστηκε ίση με 3,00 ± 0,26 μg $Chl_a \cdot mL^{-1}$. Επιπλέον, για όλα τα πειράματα ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε καλλιέργεια του μικροφύκους σε θρεπτικό TAP. Τα πειράματα έλαβαν χώρα σε δωμάτιο σταθερής θερμοκρασίας 25 ± 1°C υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 30-40 μmol φωτονίων$\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.



Εικόνα 25: Οι κωνικές φιάλες που χρησιμοποιήθηκαν ως φωτοβιοαντιδραστήρες για την ανάπτυξη του στελέχους *Chlorella* στα απόβλητα. Παρουσιάζονται οι καλλιέργειες από τη φωτοετρότροφη (πάνω) και τη μεικτότροφη (κάτω) συνθήκη.

Η διάρκεια των πειραμάτων ήταν 144 h (6 ημέρες). Κάθε δυο ημέρες πραγματοποιούνταν μετρήσεις ανάπτυξης μέσω υπολογισμού του περιεχόμενου χλωροφύλλης, καθώς και μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού. Για τη μελέτη απομάκρυνσης οργανικών ρυπαντών από τα θρεπτικά μέσα, γινόταν παράλληλη δειγματοληψία από καλλιέργεια όγκου 1 mL και υπέστη φυγοκέντρηση στα 1000g για 5 λεπτά για την απομάκρυνση των κυττάρων. Το υπερκείμενο που συλλέγονταν αποθηκεύτηκε στους -20°C. Οι αραιώσεις των αποβλήτων, καθώς και οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής αέρα παρουσία φλόγας.

3.3.6 Ποσοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών

Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές ποσοτικοποιήθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρεται στην Παράγραφο 2.3.4.

3.3.7 Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού

Οι μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρεται στην Παράγραφο 2.3.5.

3.3.8 Πολαρογραφικός προσδιορισμός ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου

Οι μετρήσεις ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρεται στην Παράγραφο 2.3.6.

3.3.9 Προσδιορισμός βιοχημικού περιεχομένου του μικροφύκους ανεπτυγμένο σε θρεπτικά μέσα με βάση γαλακτοβιομηχανικά απόβλητα

Για τον προσδιορισμό του βιοχημικού περιεχομένου, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε κωνικές φιάλες των 2000 mL που περιείχαν 1200 mL θρεπτικού μέσου 33% DW + 10% TAP-C (Παράγραφος 2.3.2), με συνεχή ένταση φωτισμού 30-40 μmol φωτονίων$\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Στην καλλιέργεια εφαρμόστηκε συνεχής αερισμός με χρήση αντλίας αέρα που διέρχονταν μέσω ενός φίλτρου 0,22 μm, για την αποφυγή μολύνσεων. Η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ορίστηκε αντίστοιχα με εκείνη που αναφέρεται στην Παράγραφο 3.3.6. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από 6 ημέρες καλλιέργειας και ξεπλύθηκαν μέσω διαδοχικών φυγοκεντρήσεων και επαναιωρήσεων σε απιονισμένο νερό. Αυτό ήταν αναγκαίο για την

απομάκρυνση συστατικών του θρεπτικού της αρχικής καλλιέργειας. Τέλος, η κυτταρική βιομάζα λυοφιλοποιήθηκε. Οι υδατάνθρακες προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο θυμόλης-θειϊκού, οι πρωτεΐνες με τη μέθοδο Lowry, και τα λιπίδια μέσω της μεθόδου θειικού-φωσφορικού-βανιλίνης και σε κάθε περίπτωση με βάση τα πρωτόκολλα της Παραγράφου 2.3.7.

3.4 Αποτελέσματα και συζήτηση

3.4.1 Πρωτογενής κατεργασία και προσδιορισμός φυσικοχημικών παραμέτρων στα υγρά γαλακτοκομικά απόβλητα

Ο προσδιορισμός των παραμέτρων πραγματοποιήθηκε στα ακατέργαστα και στα κατεργασμένα απόβλητα και οι διάφοροι παράμετροι που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15: Φυσικοχημικές παράμετροι που προσδιορίστηκαν πριν και μετά την πρωτογενή κατεργασία των γαλακτοκομικών αποβλήτων.

	Ακατέργαστα απόβλητα	Κατεργασμένα απόβλητα	Θρεπτικό TAP	Θρεπτικό TAP-C
pH	5,94 ± 0,08	5,82 ± 0,06	7,2	7,2
Αγωγιμότητα (μS)	$2{,}01 \cdot 10^4$	$1{,}91 \cdot 10^4$	$2{,}22 \cdot 10^2$	$3{,}19 \cdot 10^2$
Ολικά στερεά (mg/mL)	746,77 ± 10,58	347,30 ± 28,84		
Ολικά σάκχαρα (mg/mL)	39,26 ± 1,99	39,58 ± 2,42		

Το γάλα, και κατ' επέκταση τα απόβλητα από τις διαδικασίες παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων, χαρακτηρίζεται από υψηλή διατροφική αξία, καθώς είναι πλούσιο σε υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατοδιαλυτές βιταμίνες και ιχνοστοιχεία [165]. Έτσι, τα απόβλητα αποτελούν μέσο που ευνοεί την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Για την αποφυγή της παράλληλης ανάπτυξης επιμολύνσεων, στο στάδιο αυτό κρίθηκε ως αναγκαία η αποστείρωσή τους. Μετά την αποστείρωση παρατηρήθηκε η παρουσία μεγάλης ποσότητας στερεών στα απόβλητα. Αυτό οφείλεται στις ακραίες θερμοκρασίες κατά τη διαδικασία αυτή, κάτι που οδηγεί στη μετουσίωση και καθίζηση των πρωτεϊνών του γάλακτος. Τα κομμάτια αυτά θα είχαν ανασταλτική δράση τόσο στη διείσδυση του φωτός, όσο και στο σχηματισμό μικροαποικιών του στελέχους και συνεπώς ήταν αναγκαία η απομάκρυνσή τους.

Το pH των αποβλήτων, πριν και μετά την κατεργασία βρέθηκε να είναι ελαφρώς όξινο και περίπου μια μονάδα χαμηλότερη από την τιμή του θρεπτικού TAP. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι τα στέλεχος *Chlorella* έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται ακόμα και σε ένα εύρος τιμών pH 4-10 [169]. Οι υπόλοιπες συνθήκες της ανάπτυξης, όπως η θερμοκρασία και ο τρόπος ανάπτυξης καθορίζουν το βέλτιστες τιμές pH για κάθε στέλεχος.

Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί το στέλεχος *Chlorella vulgaris* να παρουσιάζει βέλτιστη ανάπτυξη σε ελαφρώς όξινα περιβάλλοντα (εύρος pH 6,31 - 6,84) [170], και σε άλλη περίπτωση σε αλκαλικά (εύρος pH 9 - 10) [169]. Στα πλαίσια της μελέτης της παρούσας διατριβής επιλέχθηκε να διατηρηθεί η τιμή pH των αποβλήτων, με σκοπό τον περιορισμό των βημάτων κατά την κατεργασία.

Τα απόβλητα εμφανίζουν σημαντικά υψηλές τιμές αλατότητας και συγκέντρωσης σακχάρων σε κάθε περίπτωση. Δεδομένου ότι το στέλεχος *Chlorella sp.* απομονώθηκε από ποτάμι (δηλαδή από περιβάλλον με γλυκά νερά), η υψηλή αλατότητα αναμένεται να είναι ένας παράγοντας που θα λειτουργήσει ανασταλτικά στην ανάπτυξη των καλλιεργειών. Τα απόβλητα, ακόμα και μετά την πρωτογενή τους κατεργασία διατηρούν σημαντικά υψηλές τιμές αγωγιμότητας. Μάλιστα, σε κάθε περίπτωση οι αντίστοιχες τιμές τους είναι περίπου 100 φορές μεγαλύτερες από εκείνη του θρεπτικού TAP. Παρότι τα σάκχαρα (π.χ. γλυκόζη) αποτελούν από τα αποδοτικότερα υποστρώματα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών, η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεών τους ενδέχεται να αναστείλει την ανάπτυξή τους μέσω οσμωτικών φαινομένων (οσμωτικό σοκ) [171]. Συνεπώς κρίνεται απαραίτητη η αραίωση των αποβλήτων πριν τη χρήση τους στα θρεπτικά μέσα, για τη μείωση της συγκέντρωσης των ρυπαντών και την εξομάλυνση των φυσικοχημικών παραμέτρων που ενδέχεται να επηρεάσουν αρνητικά την ανάπτυξη των κυττάρων. Σε προηγούμενες μελέτες, η αραίωση αποτελεί συνήθη τακτική πριν τη χρήση υγρών αποβλήτων ως υπόστρωμα σε καλλιέργεια φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών [82, 172, 173].

3.4.2 Γαλακτοκομικά απόβλητα ως βάση για μέσο καλλιέργειας του στελέχους Chlorella sp.: Σχεδιασμός θρεπτικού μέσου και επιλογή συνθήκης ανάπτυξης

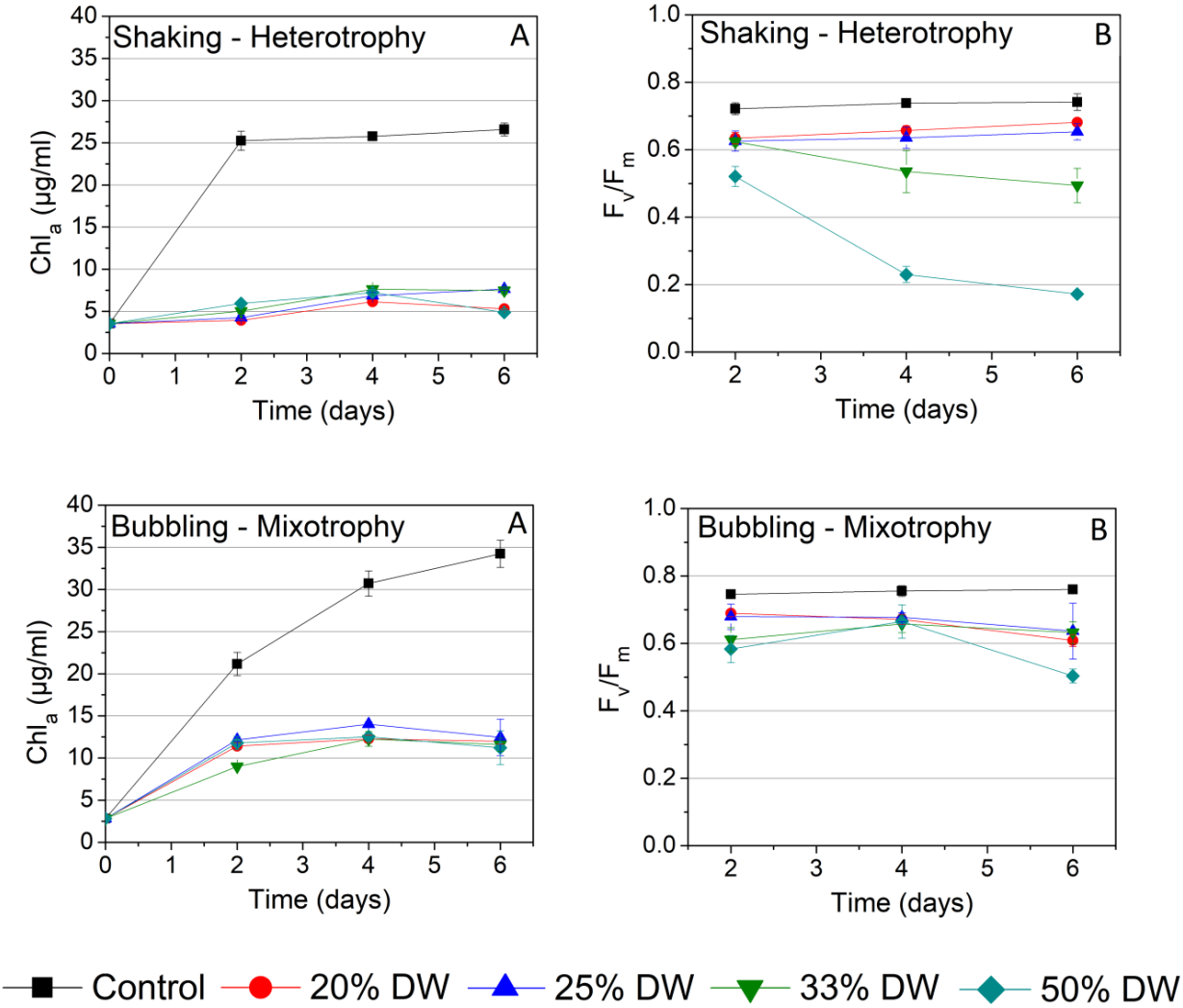
Στην παράγραφο αυτή μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης του στελέχους σε ένα εύρος περιεκτικότητας αποβλήτων 20-50%. Παράλληλα, συγκρίθηκε η ανάπτυξη και η απόδοση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στις ίδιες συνθήκες σε φωτοετερότροφες και μεικτότροφες καλλιέργειες. Ως δείκτης της ανάπτυξης ορίστηκε το περιεχόμενο χλωροφύλλης a των κυττάρων, ενώ πραγματοποιήθηκε και εκτίμηση της απόδοσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού με μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού. Σκοπός ήταν να επιτευχθεί η μεγαλύτερη δυνατή περιεκτικότητα σε απόβλητα, σε μια συγκέντρωση που δε θα λειτουργούσε ανασταλτικά στην ανάπτυξη του μικροφύκους. Τα θρεπτικά μέσα από αραιωμένα απόβλητα που δοκιμάστηκαν στην παρούσα πειραματική σειρά παρουσιάζονται στον Πίνακα 16. Σε κάθε περίπτωση, οι αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν με απιονισμένο νερό.

Πίνακας 16: Οι συνθήκες που δοκιμάστηκαν στην παρούσα πειραματική σειρά.

Συνθήκη - % Περιεκτικότητα σε απόβλητα (v/v)	Λόγος απόβλητα : νερό (v/v)
20% DW	1:4
25% DW	1:3
33% DW	1:2
50% DW	1:1

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 26. Από τα γραφήματα της Εικόνας 26 γίνεται διακριτό ότι το στέλεχος *Chlorella* επιτυγχάνει μεγαλύτερη ανάπτυξη, εκφρασμένης ως περιεχόμενο χλωροφύλλης a, στις μεικτότροφες καλλιέργειες, για όλες τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις αποβλήτων. Η αντίστοιχη συμπεριφορά παρατηρήθηκε και για τις καλλιέργειες του μάρτυρα, καθώς η συγκέντρωση της χλωροφύλλης a είναι εμφανώς υψηλότερη από εκείνη στη φωτοετερότροφη καλλιέργεια. Για τις περιεκτικότητες 20% και 50% καταγράφηκε μειωμένη ανάπτυξη, σε σχέση με 25% και 33% στην φωτοετερότροφη ανάπτυξη, το οποίο μπορεί να αποδοθεί στις σχετικά λιγότερο ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης· πιο συγκεκριμένα, στη χαμηλότερη περιεκτικότητα θρεπτικών συστατικών ή στην υψηλότερη αλατότητα και συγκέντρωση σακχάρων. Όσο αφορά τις μεικτότροφες καλλιέργειες, η τιμή της χλωροφύλλης a δεν εμφάνισε διακυμάνσεις για όλες τις περιεκτικότητες σε απόβλητα.

Σημαντική ήταν και η μείωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης για τα δυο πυκνότερα (33% και 50%) θρεπτικά σε απόβλητα. Και για τους δυο τρόπους ανάπτυξης παρατηρείται μείωση του λόγου F_v/F_m στα κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά με περιεκτικότητα 50% σε απόβλητα, υποδηλώνοντας καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, η οποία γίνεται εντονότερη στην ετερότροφη συνθήκη.



Εικόνα 26: Καλλιέργεια του στελέχους *Chlorella* σε αραιωμένα απόβλητα με εύρος συγκεντρώσεων 20-50%. Μελετήθηκε η ανάπτυξη (A) και η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση (B). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν είτε φωτοετερότροφα (πάνω), είτε μεικτότροφα (κάτω) για 6 ημέρες. Σε κάθε περίπτωση ο μάρτυρας ήταν καλλιέργεια *Chlorella* σε θρεπτικό μέσο TAP, στον αντίστοιχο τρόπο ανάπτυξης. Η ανάπτυξη προσδιορίζεται μέσω περιεχομένου χλωροφύλλης a και η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση εκφράζεται μέσω του λόγου F_v/F_m. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση για κάθε μέτρηση και προέρχονται από τουλάχιστον τριπλέτα δειγμάτων.

Ακόμα και μετά την πρωτογενή κατεργασία των αποβλήτων, το θρεπτικό μέσο διατηρεί τη θολερότητά του (Εικόνα 24 στα υλικά), η οποία γίνεται περισσότερο σημαντική για τα θρεπτικά που είναι πλουσιότερα σε απόβλητα. Έτσι, το φως λιγότερο ικανό να διεισδύσει αποδοτικά σε όλη την έκταση του θρεπτικού μέσου, κάτι που αιτιολογεί τη μειωμένη φωτοσυνθετική απόδοση για την 50% περιεκτικότητα σε απόβλητα. Οι κυριότεροι περιοριστικοί παράγοντες για τη φωτοσύνθεση είναι η ένταση φωτεινής ακτινοβολίας και η συγκέντρωση CO_2 [174]. Η επαρκής ανάδευση των καλλιεργειών στους φωτοβιοαντιδραστήρες είναι απαραίτητη για τον αποδοτικό φωτισμό των κυττάρων που θα

επιτελέσουν φωτοσύνθεση [175]. Ο αερισμός των μεικτότροφων καλλιεργειών, πέρα από την παροχή του απαραίτητου CO_2, επιτρέπει και την αποδοτικότερη ανάδευση των κυττάρων, οδηγώντας τελικά σε αποδοτικότερη φωτοσυνθετική δραστηριότητα.

Τα κύτταρα εμφανίζουν υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης στις μεικτότροφες καλλιέργειες, κάτι που συμφωνεί και με παρατηρήσεις της βιβλιογραφίας για στελέχη *Chlorella* [137, 176, 177]. Σύμφωνα με την παρούσα πειραματική σειρά, η καταλληλότερη συνθήκη ανάπτυξης του στελέχους *Chlorella* ήταν σε θρεπτικά μέσα με περιεκτικότητα αποβλήτων 33% κατά όγκο, με μεικτότροφο τρόπο ανάπτυξης.

3.4.3 Γαλακτοκομικά απόβλητα ως βάση για μέσο καλλιέργειας του στελέχους Chlorella sp.: Βελτιστοποίηση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας

Σε αυτή την πειραματική σειρά έγινε προσπάθεια για τη βελτιστοποίηση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού στα απόβλητα. Τα γαλακτοκομικά απόβλητα, όπως και το γάλα, είναι πλούσια πηγή σε οργανικά θρεπτικά συστατικά, όπως υδατάνθρακες και λιπίδια, καθώς και σε πρωτεΐνες. Επίσης, η καλλιέργεια μικροφυκών εμφανίζει μεγάλες απαιτήσεις σε άζωτο και φώσφορο, και συνεπώς αυτό αποτελεί μια αναγκαία συνθήκη για την αυξημένη παραγωγή βιομάζας [178]. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για την πηγή αζώτου, μιας οι μικροοργανισμοί αυτοί εμφανίζουν υψηλή παραγωγικότητα σε πρωτεΐνες.

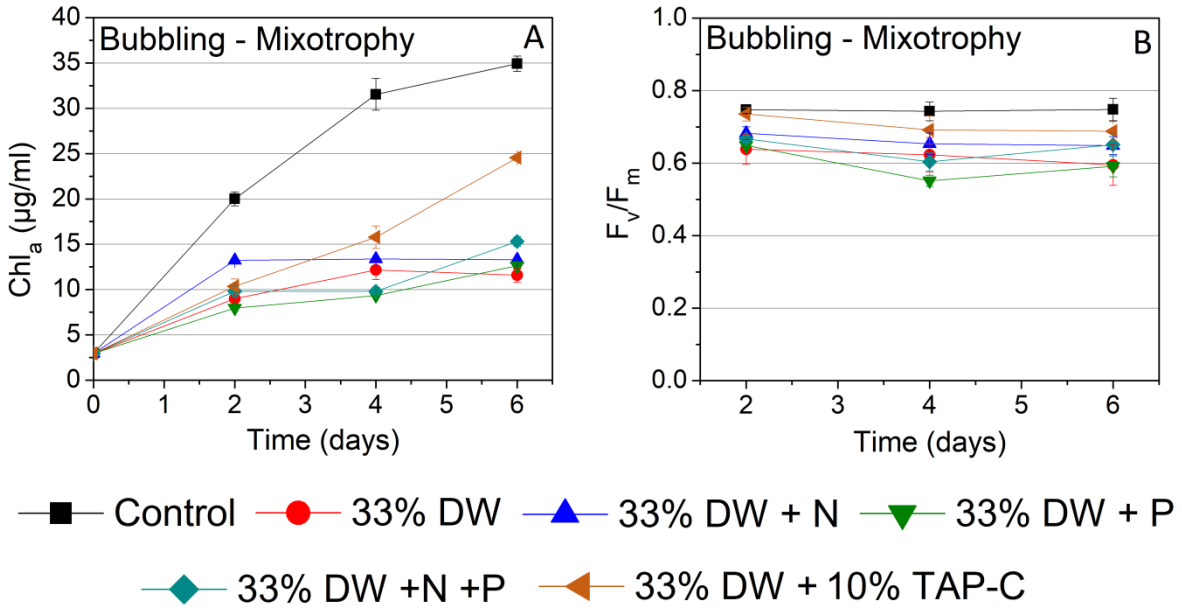
Στην προηγούμενη παράγραφο συμπεράθηκε ότι το στέλεχος *Chlorella*, παρότι δεν εμφανίζει υψηλή παραγωγικότητα στα μέσα με βάση τα απόβλητα, παρουσιάζει μικρή καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Συνεπώς, η περιορισμένη ανάπτυξη ενδέχεται να οφείλεται περισσότερο στην έλλειψη θρεπτικών συστατικών απαραίτητων για τα μικροφύκη στα απόβλητα, παρά στην καταπόνηση που υφίστανται τα κύτταρα. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε προσθήκη μιας σειράς θρεπτικών συστατικών στα μέσα καλλιέργειας, με τις αντίστοιχες συνθήκες να παρουσιάζονται στον πίνακα 17. Για να διαπιστωθεί εάν υπάρχει έλλειψη σε κάποιο θρεπτικά συστατικά, μια συνθήκη περιελάμβανε την προσθήκη μικρής κατ' όγκο ποσότητας θρεπτικού TAP-C. Δεδομένου ότι τα απόβλητα είναι πλούσια σε ενώσεις που θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως οργανικά υποστρώματα, επιλέχθηκε η χρήση του θρεπτικού TAP-C, στο οποίο δεν περιέχεται οξικό οξύ. Η αποδοτικότητα των θρεπτικών μέσων αξιολογήθηκε μέσω της ανάπτυξης και της φωτοσυνθετικής ικανότητας του στελέχους *Chlorella* σε αυτά. Έπειτα, για τη βέλτιστη συνθήκη ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε και μελέτη φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου για την τελευταία πειραματική ημέρα.

Πίνακας 17: Οι συνθήκες που μελετήθηκαν στην παρούσα πειραματική σειρά. Στις συνθήκες +N, +P, και +N +P, οι συγκεντρώσεις των ενώσεων του αζώτου και του φωσφόρου είναι ίσες με εκείνες του θρεπτικού TAP.

Συνθήκη	Περιγραφή θρεπτικού μέσου
Control	Θρεπτικό μέσο TAP
33% DW	Θρεπτικό μέσο με 33% v/v περιεκτικότητα σε απόβλητα
33% DW + N	Θρεπτικό μέσο με 33% v/v περιεκτικότητα σε απόβλητα + 0,40 g NH_4Cl/L
33% DW + P	Θρεπτικό μέσο με 33% v/v περιεκτικότητα σε απόβλητα + 1 mL Phosphate buffer I/L
33% DW +N +P	Θρεπτικό μέσο με 33% v/v περιεκτικότητα σε απόβλητα + 0,40 g NH_4Cl/L + 1 mL Phosphate buffer I/L
33% DW+ 10% TAP-C	Θρεπτικό μέσο με περιεκτικότητα σε απόβλητα: 33% v/v + 10% v/v θρεπτικό TAP-C

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα γραφήματα της Εικόνας 27. Αρχικά, παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη πηγής αζώτου ή φωσφόρου (συνθήκες 33% DW +N και 33% DW +P αντίστοιχα) δεν ήταν επαρκής για την ουσιαστική αύξηση της παραγωγής βιομάζας, καθώς οι τιμές χλωροφύλλης για τα συγκεκριμένα θρεπτικά πλησιάζουν εκείνες για τη συνθήκη 33% DW. Στη συνέχεια, η ταυτόχρονη προσθήκη πηγής αζώτου και φωσφόρου ευνόησε σε μικρό βαθμό την ανάπτυξη των κυττάρων, όπως φαίνεται από την ελάχιστα αυξημένη ανάπτυξη. Ο εμπλουτισμός των αποβλήτων με μικρή ποσότητα TAP-C ήταν επαρκής για την αισθητή ενίσχυση της ανάπτυξης των κυττάρων.

Σχετικά με τις μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού, για όλες τις συνθήκες που μελετήθηκαν δεν παρουσιάστηκε έντονη καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, όπως φαίνεται και από τις τιμές του λόγου F_v/F_m. Η προσθήκη πηγής αζώτου στα θρεπτικά μέσα βελτίωσε ελαφρώς τη μέγιστη φωτοσυνθετική ικανότητα την τελευταία πειραματική ημέρα. Σημαντικότερη αύξηση της τιμή του λόγου F_v/F_m παρουσιάστηκε στη συνθήκη 33% DW + 10% TAP-C, δείχνοντας την καλύτερη προσαρμογή των κυττάρων στη συνθήκη αυτή.



Εικόνα 27: Καλλιέργεια του στελέχους *Chlorella* μέσα καλλιέργειας ενισχυμένα με θρεπτικά συστατικά και περιεκτικότητα αποβλήτων 33% v/v. Μελετήθηκε η ανάπτυξη (A) και η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση (B). Τα κύτταρα μεγάλωσαν μεικτότροφα για 6 ημέρες και ο μάρτυρας ήταν μεικτότροφη καλλιέργεια *Chlorella* σε θρεπτικό μέσο TAP. Η ανάπτυξη προσδιορίζεται μέσω περιεχομένου χλωροφύλλης a και η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση εκφράζεται μέσω του λόγου F_v/F_m. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση για κάθε μέτρηση και προέρχονται από τουλάχιστον τριπλέτα δειγμάτων.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων χλωροφύλλης, επαγωγικού φθορισμού και φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου για την τελευταία πειραματική ημέρα παρουσιάζονται στον Πίνακα 18. Οι καλλιέργειες του μάρτυρα είχαν 2-3 φορές υψηλότερη ανάπτυξη σε σύγκριση με τις συνθήκες 33% DW, 33% DW + N, 33% DW + P και 33% DW +N +P. Επίσης, αυξημένη είναι και η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση των κυττάρων του μάρτυρα, σε σχέση με τις υπόλοιπες συνθήκες. Οι καλλιέργειες στις οποίες είχε προστεθεί πηγή αζώτου, παρουσίασαν πολύ κοντινές τιμές του λόγου F_v/F_m. Η ίδια παρατήρηση ισχύει και για τα κύτταρα του απλούστερου μέσου της πειραματικής σειράς (33% DW) με τα κύτταρα που είχαν συμπλήρωμα φώσφορου. Όσον αφορά το θρεπτικό που εμπλουτίστηκε με TAP-C, εκεί η ανάπτυξη ήταν περίπου δύο φορές υψηλότερη από το θρεπτικό που δεν γίνει προσθήκη άλλων συστατικών (33% DW). Σε αυτή την περίπτωση, συγκριτικά με το μάρτυρα, τα κύτταρα εμφάνισαν περίπου 30% μειωμένη ανάπτυξη σε σχέση με το μάρτυρα.

Όσο αφορά τη φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου, τα αποτελέσματα συμφωνούν με τις παρατηρήσεις από τη μελέτη του επαγωγικού φθορισμού. Στις συνθήκες 33% DW, 33% DW + N, 33% DW + P η παραγωγή οξυγόνου εμφάνισε κοντινές τιμές, ενώ για τη συνθήκη

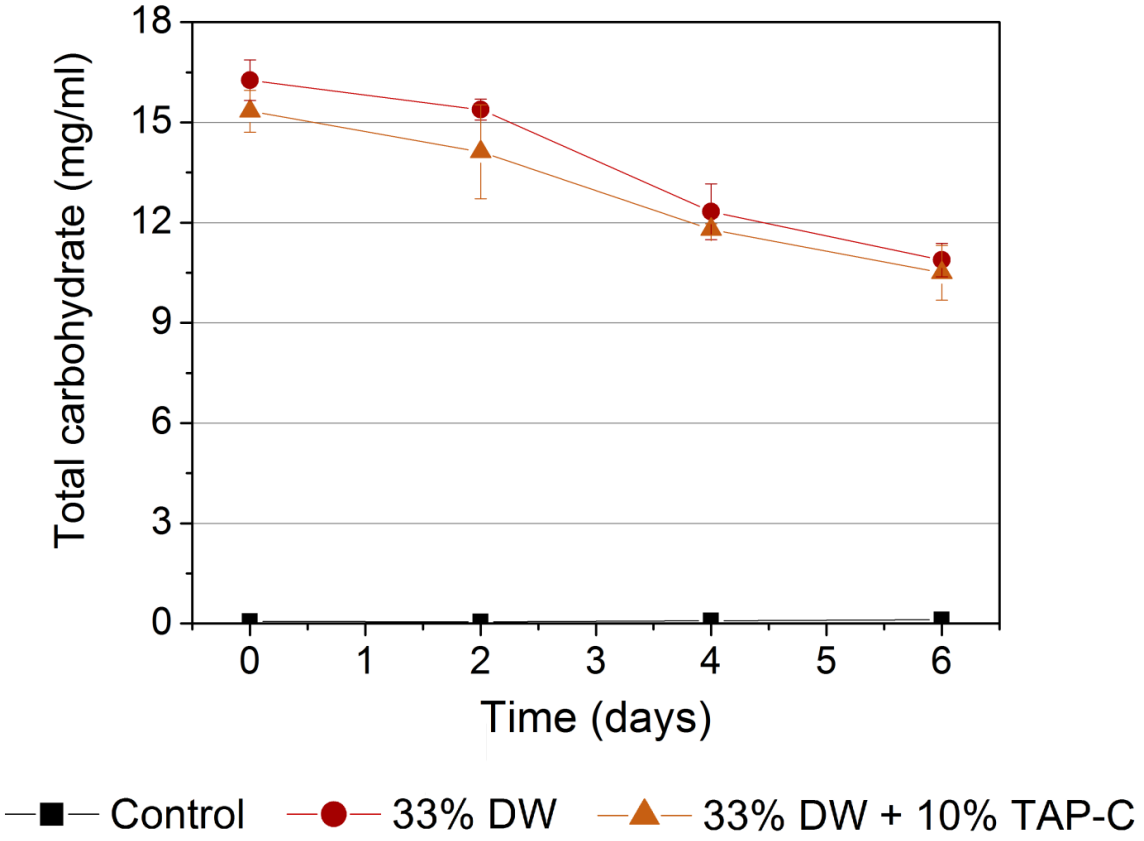
που είχε γίνει προσθήκη πηγής αζώτου και φωσφόρου η παραγωγή ήταν αυξημένη, και πλησίασε το 60% της τιμής για την ομάδα του μάρτυρα. Αυτή η πειραματική σειρά απέδειξε ξανά την καλύτερη προσαρμογή των κυττάρων στο θρεπτικό που είχε γίνει προσθήκη ποσότητας TAP-C, καθώς η φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου ήταν διπλάσια σε σχέση με το απλό θρεπτικό (33% DW) και έφτασε λίγο πάνω από το 80% της αντίστοιχης τιμής για το μάρτυρα.

Πίνακας 18: Μετρήσεις περιεχομένου χλωροφύλλης a, μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης και ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου για τα κύτταρα *Chlorella* μετά από 6 ημέρες καλλιέργειας σε θρεπτικά μέσα με βάση απόβλητα.

Συνθήκη	Chl a ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	F_v/F_{max}	Ρυθμός παραγωγής οξυγόνου [mmol O_2• (mol Chl min)$^{-1}$]
Control	34,92 ± 0,85	0,750 ± 0,030	1511,60 ± 66,05
33% DW	11,58 ± 0,78	0,600 ± 0,060	657,06 ± 63,53
33% DW + N	13,30 ± 0,12	0,649 ± 0,025	660,63 ± 15,59
33% DW + P	12,64 ± 0,39	0,592 ± 0,029	556,53 ± 44,20
33% DW +N +P	15,31± 0,52	0,651 ± 0,031	980,30 ± 59,70
33% DW + 10% TAP-C	24,54± 0,28	0,688 ± 0,027	1252,71 ± 31,82

3.4.4 Γαλακτοκομικά απόβλητα ως βάση για μέσο καλλιέργειας του στελέχους Chlorella sp.: Μελέτη απομάκρυνσης σακχάρων από τα απόβλητα

Τα μικροφύκη μπορούν να αξιοποιήσουν οργανικά υποστρώματα για την ανάπτυξή τους, επιτυγχάνοντας υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης και παραγωγής βιομάζας. Το είδος της πηγής οργανικού άνθρακα καθορίζει και την παραγωγικότητα των κυττάρων, καθώς και το βιοχημικό περιεχόμενό τους [179]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία αποτελεί η χρήση γλυκόζης για καλλιέργειες *Chlorella* [180, 181]. Η λακτόζη αποτελεί από τους σημαντικότερους ρυπαντές στα υγρά γαλακτοκομικά απόβλητα, εφόσον συμβάλλει ιδιαίτερα στις υψηλές τιμές COD και BOD που αυτά εμφανίζουν [81]. Σε αυτή την παράγραφο μελετήθηκε η απομάκρυνση σακχάρων από το υπερκείμενο των μέσων καλλιέργειας από απόβλητα, μετά την ανάπτυξη του μικροφύκους, ως μια πρώτη εκτίμηση της βιοαποκατάστασης των αποβλήτων. Για το σκοπό μελετήθηκαν καλλιέργειες *Chlorella* σε θρεπτικά TAP (ως μάρτυρας), στη συνθήκη 33% DW, ως την απλή μορφή του θρεπτικού, και στη συνθήκη 33% DW + 10% TAP-C, κατά την οποία σημειώθηκε ο υψηλότερος ρυθμός ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 28.



Εικόνα 28: Μελέτη απομάκρυνσης σακχάρων από τα απόβλητα κατά την ανάπτυξη του στελέχους *Chlorella* σε αυτά. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση για κάθε μέτρηση και προέρχονται από τουλάχιστον τριπλέτα δειγμάτων.

Τα αποτελέσματα δείχνουν μείωση περίπου 30% των σακχάρων και στις δυο συνθήκες που μελετήθηκαν. Παρουσιάζεται παρόμοια μορφή των καμπύλων ανάμεσα στις δυο συνθήκες, όπου στο θρεπτικό 33% DW + 10% TAP-C, η απομάκρυνση ήταν ελαφρώς αυξημένη. Η χαμηλή απομάκρυνση της λακτόζης, σε σχέση με τους μονοσακχαρίτες, από τα μέσα καλλιέργειας έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία για το στέλεχος *Chlorella zofingiensis* σε συνθήκες ετερότροφης ανάπτυξής του [182]. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι μονοσακχαρίτες είχαν θετικό αποτέλεσμα στην ενίσχυση της ανάπτυξης του στελέχους *Chlorella pyrenoidosa*, με τη σημαντικότερη επίδραση να εμφανίζεται για τη γλυκόζη και τη γαλακτόζη. Αντίθετα, στην ίδια μελέτη, οι δισακχαρίτες, όπως η λακτόζη δε βελτίωσαν την ανάπτυξη στον ίδιο βαθμό [176]. Οι μηχανισμοί με τους οποίους η αξιοποιούνται οι δισακχαρίτες από τη *Chlorella* δεν έχουν πλήρως εξακριβωθεί. Θεωρείται ότι είτε οι δισακχαρίτες υδρολύονται ενζυμικά εξωκυτταρικά, είτε μεταφέρονται άμεσα προς το εσωτερικό του κυττάρου μέσω κάποιου μεταφορέα σακχάρων [176].

3.4.5 Γαλακτοκομικά απόβλητα ως βάση για μέσο καλλιέργειας του στελέχους Chlorella sp.: Προσδιορισμός βιοχημικού περιεχομένου των κυττάρων

Στην παράγραφο αυτή πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός του βιοχημικού περιεχομένου των κυττάρων *Chlorella,* ανεπτυγμένα σε μεικτότροφες συνθήκες, σε θρεπτικό μέσο από γαλακτοκομικά απόβλητα. Ως θρεπτικό μέσο επιλέχθηκε το 33% DW + 10% TAP-C, καθώς όπως βρέθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, στη συνθήκη αυτή μπορεί να επιτευχθεί η παραγωγή υψηλής ποσότητας βιομάζας. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό της ξηρής βιομάζας των κυττάρων και παρουσιάζονται στον πίνακα 19. Παράλληλα, παρατίθενται και οι αντίστοιχες τιμές για φωτοαυτότροφα και φωτοετερότροφα κύτταρα. Έτσι, βρέθηκε ότι τα κύτταρα που μεγάλωσαν στα απόβλητα αποτελούνται κατά βάρος από 36,25 (± 1,92)% πρωτεΐνες, 38,59 (± 0,79)% υδατάνθρακες, 10,44 (± 0,41)% λιπίδια, 3,12 (± 0,09)% χλωροφύλλες και 0,53 (± 0,05)% καροτενοειδή.

Πίνακας 19: Η βιοχημική σύσταση του στελέχους *Chlorella* ανεπτυγμένο σε θρεπτικό μέσο με βάση γαλακτοκομικά απόβλητα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκριτικά με εκείνα της παραγράφου 2.4.4.

Βιοχημικό περιεχόμενο (% DCW)	Φωτοετερότροφη *Chlorella* (TAP)	Φωτοαυτότροφη *Chlorella* (TAP-C)	Μεικτότροφη *Chlorella* (33% DW + 10% TAP-C)
Πρωτεΐνες	39,09 ± 2,61	34,91 ± 3,91	36,25 ± 1,92
Υδατάνθρακες	26,87 ± 2,29	41,88 ± 3,99	38,59 ± 0,79
Λιπίδια	12,94 ± 1,41	8,11 ± 0,61	10,44 ± 0,41
Χλωροφύλλες	2,88 ± 0,50	3,38 ± 0,09	3,12 ± 0,09
Καροτενοειδή	0,43 ± 0,10	0,59 ± 0,03	0,53 ± 0,05

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων δείχνουν ότι η σύσταση των μεικτότροφων κυττάρων τείνει σημαντικά προς εκείνη των φωτοαυτότροφων κυττάρων. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί και με αναφορές για μεικτότροφη ανάπτυξη κυττάρων *Chlorella* με υποστρώματα δισακχαριτών, όπως τη λακτόζη [176]. Τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε μεικτότροφες συνθήκες περιέχουν κατά βάρος ελαφρώς μειωμένο ποσοστό υδατανθράκων και φωτοσυνθετικών χρωστικών και λίγο αυξημένο ποσοστό πρωτεϊνών και λιπιδίων. Τα μεικτότροφα κύτταρα στα απόβλητα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παραγράφου 3.4.3,

εμφάνισαν φωτοσυνθετική ικανότητα που προσέγγιζε σημαντικά εκείνη των κυττάρων του αντίστοιχου μάρτυρα. Έτσι, η έντονη φωτοσυνθετική δραστηριότητα μπορεί να αιτιολογήσει το αυξημένο περιεχόμενο υδατανθράκων και φωτοσυνθετικών χρωστικών (βλ. παράγραφο 2.2.4). Παράλληλα, η λακτόζη, η οποία είναι το κύριο σάκχαρο στο γάλα, και κατ' επέκταση και στα απόβλητα, δεν αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη *Chlorella,* αντίθεση με άλλες οργανικές πηγές άνθρακα, όπως τη γλυκόζη και το οξικό. Παρόλα αυτά, υπάρχει μερική αξιοποίησή της, κάτι που θα μπορούσε να δικαιολογήσει τα ελαφρώς αυξημένα ποσοστά πρωτεϊνών και λιπιδίων (βλ. παράγραφο 2.2.4). Έτσι, η μικρή κατανάλωση οργανικού υποστρώματος, σε συνδυασμό με την έντονη φωτοσυνθετική δραστηριότητα μπορεί να οδηγήσει σε κύτταρα με βιοχημικά χαρακτηριστικά, σε μεγάλο βαθμό επηρεασμένα από την αυτότροφη ανάπτυξη, αλλά και με μικρή επιρροή από την ετερότροφη συμπεριφορά.

3.5 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό μελετήθηκε η χρήση γαλακτοκομικών αποβλήτων ως μέσα καλλιέργειας του απομονωμένου στελέχους *Chlorella*, και ο στόχος της μελέτης αποτελούσε την αποκατάσταση των αποβλήτων και ταυτόχρονα την παραγωγή ικανοποιητικής ποσότητας βιομάζας.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε μια πρώτη κατεργασία, πριν τη χρήση των αποβλήτων ως θρεπτικά μέσα. Η κατεργασία περιλάμβανε την αποστείρωση με αυτόκαυστο και την απομάκρυνση των καθιζαμένων στερεών από το υγρό. Έπειτα μελετήθηκαν διάφορες φυσικοχημικές παράμετροι στα απόβλητα, όπου και καταγράφηκαν υψηλές τιμές αλατότητας, και συγκέντρωσης σακχάρων. Ως αποτέλεσμα, κρίνεται απαραίτητη η αραίωση των αποβλήτων για τη χρήση τους ως θρεπτικά μέσα.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε μελέτη της ανάπτυξης σε ένα εύρος αραιωμένων αποβλήτων. Ο στόχος ήταν η χρήση της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας αποβλήτων. Ταυτόχρονα, συγκρίθηκε ο ετερότροφος με τον μεικτότροφο τρόπο ανάπτυξης. Ως καταλληλότερη συνθήκη αναδείχθηκε το θρεπτικό μέσο με περιεκτικότητα 33% κατ' όγκο σε απόβλητα (λόγος αραίωσης αποβλήτων προς νερό 1:2), με την μεικτότροφη ανάπτυξη των κυττάρων.

Ενώ τα κύτταρα επιβιώνουν στα απόβλητα, παρουσιάζουν χαμηλούς ρυθμούς ανάπτυξης. Θεωρήθηκε ότι η διαθεσιμότητα /έλλειψη θρεπτικών συστατικών στο μέσο είναι ο παράγοντας που περιορίζει την ανάπτυξη του μικροφύκους. Για το λόγο αυτό έγινε εμπλουτισμός των αποβλήτων με, είτε με μια σειρά θρεπτικών συστατικών, είτε με την προσθήκη μικρού όγκου από το θρεπτικό TAP. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι η μεμονωμένη προσθήκη πηγής αζώτου ή φωσφόρου δεν ήταν επαρκής, ενώ η ταυτόχρονη προσθήκη τους βελτίωσε ελάχιστα την ανάπτυξη. Στην περίπτωση του εμπλουτισμού των αποβλήτων με το θρεπτικό TAP, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης.

Εν συνεχεία αξιολογήθηκε η μέθοδος βιοαποκατάστασης των αποβλήτων μετά την κατεργασία τους από το μικροφύκος. Ως μέτρο της βιοαποκατάστασης ορίστηκε η απομάκρυνση των σακχάρων από το μέσο καλλιέργειας, όπου και σημειώθηκε περίπου 30% απομάκρυνση σε χρονικό διάστημα 6 ημερών.

Τέλος, για την αξιολόγηση της βιομάζας που παρήχθη, προσδιορίστηκε το βιοχημικό περιεχόμενο των κυττάρων που αναπτύχθηκαν στα απόβλητα, και βρέθηκε ότι παρουσιάζουν παρόμοιο περιεχόμενο με τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν φωτοαυτότροφα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στην παρούσα διατριβή αντικείμενο μελέτης υπήρξε ένα στέλεχος πράσινου μικροφύκους, το οποίο απομονώθηκε από την ομάδα του εργαστηρίου μας από περιβαλλοντικά επιβαρυμένο σημείο του ποταμού Γιόφυρου στο Ηράκλειο Κρήτης. Πιο συγκεκριμένα, αξιολογήθηκε μια σειρά ιδιοτήτων που ενδέχεται να επιτρέψουν την εφαρμογή του στη βιοαποκατάσταση βιομηχανικών υδατικών αποβλήτων. Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε τέτοια περιβάλλοντα φέρουν επιθυμητές ιδιότητες, όπως αυξημένους ρυθμούς ανάπτυξης, καθώς και ανθεκτικότητα σε ακραίες συνθήκες.

Βάσει των αποτελεσμάτων του γενετικού χαρακτηρισμού, το απομονωμένο στέλεχος βρέθηκε ότι ανήκει στο γένος *Chlorella.* Τα μικροφύκη αυτού του γένους είναι από περισσότερο μελετημένα στη βιβλιογραφία, και είναι από τα λίγα στελέχη που ήδη βρίσκουν εμπορικές εφαρμογές. Είναι πλούσια σε πρωτεΐνες και βιοδραστικά συστατικά, γεγονός που τους προσδίδει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την εφαρμογή σε συμπληρώματα διατροφής και συμπληρώματα ζωωοτροφών. Επιπλέον, εμφανίζουν υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης και είναι αποδοτικά στην απομάκρυνση θρεπτικών συστατικών, όπως ανόργανων και οργανικών ενώσεων από τα μέσα στα οποία αναπτύσσονται. Γι' αυτό το λόγο στελέχη *Chlorella* θεωρούνται κατάλληλοι υποψήφιοι για εφαρμογές στη βιοαποκατάσταση λυμάτων.

Τα μικροφύκη μπορούν να αναπτυχθούν αυτότροφα μέσω της φωτοσύνθεσης, αλλά και ετερότροφα, αξιοποιώντας οργανικές ενώσεις για την ανάπτυξή τους. Η φωτοαυτότροφη ανάπτυξη φέρει το πλεονέκτημα ότι καθηλώνεται το CO_2 και αξιοποιείται η ηλιακή ενέργεια, ενώ για στη φωτοετερότροφη ανάπτυξη τα κύτταρα αναπτύσσονται με ταχύτερους ρυθμούς. Αυτή η παρατήρηση ισχύει και για το στέλεχος της παρούσας διατριβής. Μάλιστα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα κύτταρα αναπτύσσονται φωτοετερότροφα με σημαντικά υψηλούς ρυθμούς, ακόμα και σε χαμηλές εντάσεις φωτισμού. Η ραγδαία αύξηση της βιομάζας των κυττάρων στη συγκεκριμένη συνθήκη προκαλεί φαινόμενα σκίασης στο μέσο καλλιέργειας, και τα κύτταρα είναι προσαρμοσμένα στη μειωμένη παροχή φωτός. Αυτό το έυρημα είναι σημαντικό, διότι σε φωτοβιοαντιδραστήρες μεγάλης κλίμακας, ο κύριος παράγοντας που περιορίζει την ανάπτυξη είναι ο ανεπαρκής φωτισμός των κυττάρων, λόγω της αυξανόμενης κυτταρικής πυκνότητας.

Επιπλέον, βρέθηκε ότι τα κύτταρα σε κάθε τρόπο ανάπτυξης που μελετήθηκε, περιέχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Αυτή είναι μια επιθυμητή ιδιότητα για τη χρήση βιομάζας *Chlorella* ως ενισχυτικά τροφίμων και ζωοτροφών. Επίσης, ο τρόπος ανάπτυξης επηρεάζει την περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, λιπίδια και φωτοσυνθετικές χρωστικές. Ανάμεσα στις σημαντικότερες βιοδραστικές ουσίες που έχει βρεθεί ότι περιέχει η *Chlorella*, περιλαμβάνονται τα καροτενοειδή και τα ω-3 λιπαρά οξέα. Συνεπώς, η

ταυτοποίηση τέτοιων ουσιών είναι αναγκαία για την καλύτερη μελέτη της διατροφικής αξίας του στελέχους *Chlorella*. Παράλληλα, τα μικροφύκη είναι μικροοργανισμοί που μπορούν να παράγουν υψηλές ποσότητες λιπιδίων, αναλόγως με τις συνθήκες καλλιέργειας, για εφαρμογές σε βιοκαύσιμα. Η μελέτη του βιοχημικού περιεχομένου του στελέχους υπό διάφορες συνθήκες καλλίεργειας θα επιτρέψει την ανάδειξη περισσότερων εφαρμογών που ενδέχεται να έχει το μικροφύκος.

Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι το μικροφύκος *Chlorella* εμφάνισε ιδιαίτερη ανθεκτικότητα στην ανασταλτική δράση αντιβιοτικών και ζιζανιοκτόνων. Μικροοργανισμοί που μπορούν να αναπτυχθούν σε τέτοιες ακραίες συνθήκες είναι ιδανικοί για εφαρμογή στη βιοαποκατάσταση διαφόρων βιομηχανικών αποβλήτων, τα οποία περιέχουν υψηλές ποσότητες οργανικών και ανόργανων ρυπαντών. Για την εφαρμογή μιας μεθόδου βιοαποκατάστασης σε βιομηχανικό επίπεδο, ο κύριος περιοριστικός παράγοντας είναι το οικονομικό κόστος της διαδικασίας. Συνεπώς, η φυκοαποκατάσταση αποβλήτων μέσω του στελέχους *Chlorella*, ενδέχεται να μειώσει το κόστος εφαρμογής μιας τέτοιας μεθόδου, λόγω της εμπορικά αξιοποιήσιμης βιομάζας που παράγεται παράλληλα.

Η μελέτη φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών για τη φυκοαποκατάσταση βιομηχανικών και αστικών λυμάτων είναι εκτενώς μελετημένη στη βιβλιογραφία. Εκτός από την αποκατάσταση των αποβλήτων, ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα είναι η ανακύκλωση του νερού και θρεπτικών συστατικών. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής μελετήθηκε η ανάπτυξη της *Chlorella* σε θρεπτικά μέσα, τα οποία βασίζονται σε γαλακτοκομικά απόβλητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το συγκεκριμένο στέλεχος έχει τη δυνατότητα να επιτύχει ανάπτυξη σε συγκρίσιμο βαθμό με τυπικά θρεπτικά μέσα ανάπτυξης μικροφυκών. Είναι σημαντικό στα πλαίσια μιας τέτοιας μελέτης να προσδιοριστούν επιπλέον παράμετροι που αφορούν το ρυπαντικό φορτίο στα απόβλητα (λ.χ. COD, BOD, ολικός άνθρακας, ολικό άζωτο και ολικός φώσφορος). Ακόμα, έχει αναφερθεί η ανάπτυξη μικροβιακών κοινοτήτων (consortia) με σκοπό την αποδοτικότερη κατεργασία των αποβλήτων. Για παράδειγμα, στην περίπτωση των γαλακτοκομικών αποβλήτων, θα ήταν δυνατόν να συνδυαστεί η καλλιέργεια βακτηριακών στελέχων που θα διασπάσουν περίπλοκες ενώσεις, οι οποίες μπορούν να αξιοποιηθούν από τα μικροφύκη. Ταυτόχρονα, τα μικροφύκη μπορούν να παρέχουν το απαραίτητο οξυγόνο για τις αναερόβιες διεργασίες, που θα μειώσουν αποδοτικότερα το ρυπαντικό φορτίο των αποβλήτων.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα διατριβή αποδείχθηκε πως τα μικροφύκη έχουν τη δυνατότητα να λειτουργήσουν ως *"καλοκουρδισμένες μηχανές"*, προσφέροντας ταυτόχρονα λύσεις σε μια σειρά διαφορετικών σύγχρονων προβλημάτων, όπως την παραγωγή τροφίμων

και τη διαχείριση υδατικών λυμάτων. Λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους, διαθέτουν μια προσαρμοστικότητα που τους επιτρέπει να αναπτύσσονται σε διαφορετικά περιβάλλοντα, καθώς και να παράγουν ένα ευρύ φάσμα φυσικών προϊόντων. Αυτή η ευελιξία τους, καθώς και το γεγονός η καλλιέργειά τους φέρει μικρό περιβαλλοντικό αποτύπωμα, τα καθιστά τους πλέον κατάλληλους υποψήφιους για βιοτεχνολογικές εφαρμογές στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας και της αειφόρου ανάπτυξης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΠΕΡΙΟΧΗΣ 18S rRNA ΓΟΝΙΔΙΟΥ

CCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGT
ATAAACTGCTTTATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGAT
GGTACCTACTACTCGGATACCCGTAGTAAATCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTT
CTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAGGCCGACCGGGCTCTGCCCGACTCGCGGTGAATC
ATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGTGCCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTA
TCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGT
TCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCA
AATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACTGGGCCTTTTCAGG
TCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAACCCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCT
GGTG

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Γαλάτης, Β., Δ. Γανωτάκης, Κ. Γκανή- Σπυροπούλου, Γ. Καραμπουρνιώτης, et al., *Φωτοσύνθεση Ι: Μετατροπή της ηλιακής ακτινοβολίας σε χημική ενέργεια*, in *Φυσιολογία Φυτών- Από το μόριο στο περιβάλλον*. **2014**, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης: Ηράκλειο.
2. Johnson, Matthew P., Photosynthesis. *Essays Biochem*, **2016**. 60: p. 255-273.
3. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Οι φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης*, in *Βιοχημεία*. **2014**, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης: Ηράκλειο.
4. Minteer, S. and M. Rasmussen, Photobioelectrochemistry: Solar Energy Conversion and Biofuel Production with Photosynthetic Catalysts. *J Electrochem Soc*, **2014**. 161: p. H647-H655.
5. Baker, N.R., Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu Rev Plant Biol*, **2008**. 59: p. 89-113.
6. Maxwell, K. and G.N. Johnson, Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J Exp Bot*, **2000**. 51(345): p. 659-668.
7. Butler, W.L., Energy Distribution in the Photochemical Apparatus of Photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol*, **1978**. 29(1): p. 345-378.
8. Malapascua, J.R.F., C. Jerez, M. Sergejevová, F. Lopez Figueroa, and J. Masojidek, Photosynthesis monitoring to optimize growth of microalgal mass cultures: Application of chlorophyll fluorescence techniques. *Aquat Biol*, **2014**. 22: p. 123-140.
9. Long, S.P., S.W. Humphries, and P. Falkowski, Photoinhibition of Photosynthesis in Nature. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **2003**. 45: p. 633-662.
10. Baker, N.R. and E. Rosenqvist, Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J Exp Bot*, **2004**. 55(403): p. 1607-1621.
11. van Iersel, S. and A. Flammini, Algae-based Biofuels: Applications and Co-products. *FAO Environmental and Natural Resources Service Series*, **2010**. 44.
12. Mata, T.M., A.A. Martins, and N.S. Caetano, Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sust Energ Rev*, **2010**. 14(1): p. 217-232.
13. Stengel, D.B., S. Connan, and Z.A. Popper, Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnol Adv*, **2011**. 29(5): p. 483-501.
14. Guihéneuf, F., A. Khan, and L.-S.P. Tran, Genetic Engineering: A Promising Tool to Engender Physiological, Biochemical, and Molecular Stress Resilience in Green Microalgae. *Front Plant Sci*, **2016**. 7: p. 400-400.
15. Priyadarshani, I. and B. Rath, Commercial and industrial applications of micro algae – A review. *J Algal Biomass Utln*, **2012**. 3: p. 89-100.

16. Guccione, A., N. Biondi, G. Sampietro, L. Rodolfi, et al., *Chlorella* for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a Green Wall Panel photobioreactor. *Biotechnol Biofuels*, **2014**. 7: p. 84.
17. Chiu, S.-Y., C.-Y. Kao, T.-Y. Chen, Y.-B. Chang, et al., Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. *Bioresour Technol*, **2015**. 184: p. 179-189.
18. Abdel-Raouf, N., A.A. Al-Homaidan, and I.B. Ibraheem, Microalgae and wastewater treatment. *Saudi J Biol Sci*, **2012**. 19(3): p. 257-75.
19. Chisti, Y., Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv*, **2007**. 25(3): p. 294-306.
20. Cheah, W.Y., P.L. Show, J.S. Chang, T.C. Ling, and J.C. Juan, Biosequestration of atmospheric CO^2 and flue gas-containing CO^2 by microalgae. *Bioresour Technol*, **2015**. 184: p. 190-201.
21. Liu, J., Z. Sun, and F. Chen, *Chapter 6 - Heterotrophic Production of Algal Oils*, in *Biofuels from Algae*, A. Pandey, et al., Editors. **2014**, Elsevier: Amsterdam. p. 111-142.
22. Νάζος, Θ., *Μελέτη της βιοαποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων από μικροοργανισμούς*. **2018**, Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας: Ηράκλειο.
23. Κοκαράκης, Ε., *Απομόνωση και χαραχτηρισμός φυσικών προϊόντων από φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς*. **2018**, Μεταπτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας: Ηράκλειο.
24. Masojídek, J. and G. Torzillo, *Mass Cultivation of Freshwater Microalgae*, in *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. **2014**, Elsevier.
25. Fernández, I., F.G. Acién, M. Berenguel, and J.L. Guzmán, First Principles Model of a Tubular Photobioreactor for Microalgal Production. *Ind Eng Chem Res*, **2014**. 53(27): p. 11121-11136.
26. FAO, *The State of Food and Agriculture*. FAO Agriculture Series. Vol. 38. **2007**, Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
27. FAO, *The State of Food Insecurity in the World*. **2011**, Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
28. Chew, K.W., J.Y. Yap, P.L. Show, N.H. Suan, et al., Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresour Technol*, **2017**. 229: p. 53-62.
29. Rani, K., N. Sandal, and P. Sahoo, A comprehensive review on *Chlorella*-its composition , health benefits , market and regulatory scenario. *J Pharm Innov*, **2018**. 7(7): p. 584-589.
30. Russell, F.D. and C.S. Burgin-Maunder, Distinguishing health benefits of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Mar Drugs*, **2012**. 10(11): p. 2535-59.
31. Chuyen, H.V. and J.B. Eun, Marine carotenoids: Bioactivities and potential benefits to human health. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **2017**. 57(12): p. 2600-2610.

32. Ribaya-Mercado, J. and J. Blumberg, Lutein and Zeaxanthin and Their Potential Roles in Disease Prevention. *J Am Coll Nutr*, **2005**. 23: p. 567S-587S.
33. Landrum, J.T., R.A. Bone, H. Joa, M.D. Kilburn, et al., A one year study of the macular pigment: the effect of 140 days of a lutein supplement. *Exp Eye Res*, **1997**. 65(1): p. 57-62.
34. Resnikoff, S., D. Pascolini, D. Etya'ale, I. Kocur, et al., Global data on visual impairment in the year 2002. *Bulletin of the World Health Organization*, **2004**. 82(11): p. 844-851.
35. Granado, F., B. Olmedilla, and I. Blanco, Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *Br J Nutr*, **2003**. 90(3): p. 487-502.
36. Balk, E.M., A.H. Lichtenstein, M. Chung, B. Kupelnick, et al., Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review. *Atherosclerosis*, **2006**. 189(1): p. 19-30.
37. Wei, J., R. Hou, Y. Xi, A. Kowalski, et al., The association and dose–response relationship between dietary intake of α-linolenic acid and risk of CHD: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Br J Nutr*, **2018**. 119(1): p. 83-89.
38. Lauritzen, I., N. Blondeau, C. Heurteaux, C. Widmann, et al., Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J*, **2000**. 19(8): p. 1784-93.
39. Cardoso, C., C. Afonso, and N.M. Bandarra, Dietary DHA, bioaccessibility, and neurobehavioral development in children. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **2018**. 58(15): p. 2617-2631.
40. Cardoso, C., C. Afonso, and N.M. Bandarra, Dietary DHA and health: cognitive function ageing. *Nutr Res Rev*, **2016**. 29(2): p. 281-294.
41. Dyerberg, J. and K.A. Jorgensen, Marine oils and thrombogenesis. *Prog Lipid Res*, **1982**. 21(4): p. 255-69.
42. Higgins, A.J., Eicosanoids in health and in disease: an appraisal. *Vet Q*, **1985**. 7(1): p. 44-59.
43. Adarme-Vega, T.C., D.K. Lim, M. Timmins, F. Vernen, et al., Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial cell factories*, **2012**. 11: p. 96.
44. Ferreira, S.P., J.C.P. Holz, C.R. Lisboa, and J.A.V. Costa, Fatty acid profile of *Chlorella* biomass obtained by fed batch heterotrophic cultivation. *IFRJ*, **2017**. 24(1): p. 284-291.
45. Caporgno, M.P. and A. Mathys, Trends in Microalgae Incorporation Into Innovative Food Products With Potential Health Benefits. *Front Nutr*, **2018**. 5: p. 58.
46. Gouveia, L., A. Raymundo, A.P. Batista, I. Sousa, and J. Empis, *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. *European Food Research and Technology*, **2006**. 222(3-4): p. 362-367.

47. Batista, A.P., A. Niccolai, P. Fradinho, S. Fragoso, et al., Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*, **2017**. 26: p. 161-171.
48. Gouveia, L., A.P. Batista, A. Miranda, J. Empis, and A. Raymundo, *Chlorella vulgaris* biomass used as colouring source in traditional butter cookies. *Innov Food Sci Emerg Technol*, **2007**. 8(3): p. 433-436.
49. Fradique, M., A.P. Batista, M.C. Nunes, L. Gouveia, et al., Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. *J Sci Food Agric*, **2010**. 90(10): p. 1656-64.
50. Tohamy, M., M. Ali, H. Shaaban, A. Mohamad, and A. Hassanain, Production of functional spreadable processed cheese using *Chlorella vulgaris. Acta scientiarum polonorum. Technologia alimentaria*, **2018**. 17: p. 347-358.
51. Beheshtipour, H., A.M. Mortazavian, R. Mohammadi, S. Sohrabvandi, and K. Khosravi-Darani, Supplementation of *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* Algae into Probiotic Fermented Milks. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, **2013**. 12(2): p. 144-154.
52. Kotrbáček, V., J. Doubek, and J. Doucha, The chlorococcalean alga *Chlorella* in animal nutrition: a review. *J Appl Phycol*, **2015**. 27(6): p. 2173-2180.
53. Gouveia, L., V. Veloso, A. Reis, H. Fernandes, et al., *Chlorella vulgaris* used to Colour Egg Yolk. *J Sci Food Agric*, **1996**. 70(2): p. 167-172.
54. Kotrbáček, V., S. M, K. J, P. O, et al., Retention of carotenoids in egg yolks of laying hens supplemented with heterophilic *Chlorella. Czech J Anim Sci*, **2012**. 58: p. 193-200.
55. Gouveia, L., P. Rema, O. Pereira, and J. Empis, Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. *Aquac Nutr*, **2003**. 9(2): p. 123-129.
56. Gouveia, L., E. Gomes, and J. Empis, Use of *Chlorella vulgaris* in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Diets to Enhance Muscle Pigmentation. *J Appl Aquaculture*, **1997**. 7(2): p. 61-70.
57. Kim, K.-W., S.C. Bai, J.-W. Koo, X. Wang, and S.-K. Kim, Effects of Dietary *Chlorella ellipsoidea* Supplementation on Growth, Blood Characteristics, and Whole-Body Composition in Juvenile Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus. J World Aquac Soc*, **2002**. 33(4): p. 425-431.
58. Badwy, T., E. Ibrahim, and M. Zeinhom, Partial replacement of fish meal with dried microalga (*Chlorella* spp. and *Scenedesmus* spp.) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diets. *From the Pharaohs to the Future: Proceedings of The 8th International Symposium On Tilapia In Aquaculture*, **2008**.

59. Novotná, K., M. Fantová, L. Nohejlová, M. Borková, et al., Effect of *Chlorella Vulgaris* and *Japonochytrium* sp. Microalgae Supplementation on Composition and Fatty Acid Profile of Goat Milk. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, **2017**. 65: p. 1585-1593.
60. Kouřimská, L., E. Vondráčková, M. Fantová, P. Novy, et al., Effect of Feeding with Algae on Fatty Acid Profile of Goat's Milk. *Sci Agric Bohem*, **2014**. 45.
61. Póti, P., F. Pajor, Á. Bodnár, K. Penksza, and P. Köles, Effect of micro-alga supplementation on goat and cow milk fatty acid composition. *Chil J Agric Res*, **2015**. 75: p. 259-263.
62. Jeon, J.-Y., K.-K. Park, K.-W. Lee, S.-W. Jang, et al., Dietary effects of lutein-fortified *Chlorella* on milk components of Holstein cows. *SpringerPlus*, **2016**. 5(1): p. 908-908.
63. Yoshida, S., K. Hiraga, T. Takehana, I. Taniguchi, et al., A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*, **2016**. 351(6278): p. 1196.
64. Lewin, R., Origin of Species in Stressed Environments: Data from marine and terrestrial communities unexpectedly reveal the preferential origin of evolutionary novelties in species-poor environments. *Science*, **1983**. 222(4628): p. 1112.
65. Wright, B.E., A biochemical mechanism for nonrandom mutations and evolution. *J Bacteriol*, **2000**. 182(11): p. 2993-3001.
66. Iranzo Rodenas, M., I. Sainz-Pardo, R. Boluda, J. Sánchez, and S. Mormeneo, The use of microorganisms in environmental remediation. *Ann Microbiol*, **2001**. 51.
67. Baba, U., S. Mudasir, and R. Nazir, Review on Bioremediation of Pesticides. *J Bioremediat Biodegrad*, **2016**. 7(343).
68. Ying, G.-G., *Chapter 14 - Remediation and Mitigation Strategies*, in *Integrated Analytical Approaches for Pesticide Management*, B. Maestroni and A. Cannavan, Editors. **2018**, Academic Press. p. 207-217.
69. Pointing, S.B., Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2001**. 57(1-2): p. 20-33.
70. Shishir, T.A., N. Mahbub, and N.E. kamal, Review on Bioremediation: A Tool to Resurrect the Polluted Rivers. *Pollution*, **2019**. 5(3): p. 555-568.
71. Olguín, E.J. and G. Sánchez-Galván, Heavy metal removal in phytofiltration and phycoremediation: the need to differentiate between bioadsorption and bioaccumulation. *New Biotechnol*, **2012**. 30(1): p. 3-8.
72. Ummalyma, S.B., D. Sahoo, and A. Pandey, *Bioremediation and Biofuel Production from Chlorella sp.: A Comprehensive Review*, in *Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment*, Springer, Editor. **2019**: Singapore. p. pp 635-655.
73. Vidali, M., Bioremediation An Overview. *Pure Appl Chem*, **2001**. 73: p. 1163-1172.

74. Höhener, P., D. Hunkeler, A. Hess, T. Bregnard, and J. Zeyer, Methodology for the evaluation of engineered in situ bioremediation: lessons from a case study. *J Microbiol Methods*, **1998**. 32(2): p. 179-192.
75. Zhang, J. and C. Qiao, Novel approaches for remediation of pesticide pollutants. *Int J Environ Pollution*, **2002**. 18.
76. Mackay, D. and A. Fraser, Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environ Pollut*, **2000**. 110(3): p. 375-91.
77. Rawat, I., R. Ranjith Kumar, T. Mutanda, and F. Bux, Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Appl Energy*, **2011**. 88(10): p. 3411-3424.
78. Dubey, J., S. Mehra, P. Tiwari, and A. Bishwas, Potential use of cyanobacterial species in bioremediation of industrial effluents. *Afr J Biotechnol*, **2011**. 10: p. 1125-1132.
79. Álvarez-Díaz, P.D., J. Ruiz, Z. Arbib, J. Barragán, et al., Freshwater microalgae selection for simultaneous wastewater nutrient removal and lipid production. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*, **2017**. 24: p. 477-485.
80. Liu, J. and Q. hu, *Chlorella: Industrial Production of Cell Mass and Chemicals*, in *Handbook of Microalgal Culture*. **2013**. p. 327-338.
81. Abreu, A.P., B. Fernandes, A.A. Vicente, J. Teixeira, and G. Dragone, Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresour Technol*, **2012**. 118: p. 61-66.
82. Huo, S., Z. Wang, S. Zhu, W. Zhou, et al., Cultivation of *Chlorella zofingiensis* in bench-scale outdoor ponds by regulation of pH using dairy wastewater in winter, South China. *Bioresour Technol*, **2012**. 121: p. 76-82.
83. Deng, X.-Y., K. Gao, M. Addy, D. Li, et al., Cultivation of *Chlorella vulgaris* on anaerobically digested swine manure with daily recycling of the post-harvest culture broth. *Bioresour Technol*, **2018**. 247: p. 716-723.
84. El-Kassas, H.Y. and L.A. Mohamed, Bioremediation of the textile waste effluent by *Chlorella vulgaris. Egypt J Aquat Res*, **2014**. 40(3): p. 301-308.
85. González, L.E., R.O. Cañizares, and S. Baena, Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus. Bioresour Technol*, **1997**. 60(3): p. 259-262.
86. Li, Y., Y.-F. Chen, P. Chen, M. Min, et al., Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresour Technol*, **2011**. 102(8): p. 5138-5144.
87. Wang, L., M. Min, Y. Li, P. Chen, et al., Cultivation of Green Algae *Chlorella* sp. in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant. *Appl Biochem Biotechnol*, **2010**. 162(4): p. 1174-1186.

88. Shi, J., B. Podola, and M. Melkonian, Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study. *J Appl Phycol*, **2007**. 19(5): p. 417-423.
89. Ruiz, J., P. Álvarez, Z. Arbib, C. Garrido, et al., Effect of Nitrogen and Phosphorus Concentration on Their Removal Kinetic in Treated Urban Wastewater by *Chlorella Vulgaris. Int J Phytoremediation*, **2011**. 13(9): p. 884-896.
90. Mehta, S.K. and J.P. Gaur, Characterization and optimization of Ni and Cu sorption from aqueous solution by *Chlorella vulgaris. Ecol Eng*, **2001**. 18(1): p. 1-13.
91. Ahluwalia, S.S. and D. Goyal, Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresour Technol*, **2007**. 98(12): p. 2243-57.
92. Zhou, G.J., F.Q. Peng, L.J. Zhang, and G.G. Ying, Biosorption of zinc and copper from aqueous solutions by two freshwater green microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus. Environ Sci Pollut Res Int*, **2011**. 19(7): p. 2918-29.
93. Brar, A., M. Kumar, V. Vivekanand, and N. Pareek, Photoautotrophic microorganisms and bioremediation of industrial effluents: current status and future prospects. *3 Biotech*, **2017**. 7(1): p. 18.
94. Mulbry, W., S. Kondrad, C. Pizarro, and E. Kebede-Westhead, Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: Algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. *Bioresour Technol*, **2008**. 99(17): p. 8137-8142.
95. Olguín, E.J., Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnol Adv*, **2003**. 22(1): p. 81-91.
96. Pizarro, C., W. Mulbry, D. Blersch, and P. Kangas, An economic assessment of algal turf scrubber technology for treatment of dairy manure effluent. *Ecol Eng*, **2006**. 26(4): p. 321-327.
97. Muñoz, R. and B. Guieysse, Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Res*, **2006**. 40(15): p. 2799-2815.
98. Cooper, R.L., S.C. Laws, P.C. Das, M.G. Narotsky, et al., Atrazine and reproductive function: mode and mechanism of action studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, **2007**. 80(2): p. 98-112.
99. Garmouma, M., M.J. Teil, M. Blanchard, and M. Chevreuil, Spatial and temporal variations of herbicide (triazines and phenylureas) concentrations in the catchment basin of the Marne river (France). *Sci Total Environ*, **1998**. 224(1): p. 93-107.
100. Trebst, A., *Chapter 8 - The Mode of Action of Triazine Herbicides in Plants*, in *The Triazine Herbicides*, H.M. LeBaron, J.E. McFarland, and O.C. Burnside, Editors. **2008**, Elsevier: San Diego. p. 101-110.
101. Ridley, S.M., Interaction of chloroplasts with inhibitors: induction of chlorosis by diuron during prolonged illumination in vitro. *Plant Physiol*, **1977**. 59(4): p. 724-732.

102. Lamers, P.P., M. Janssen, R.C. De Vos, R.J. Bino, and R.H. Wijffels, Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends Biotechnol*, **2008**. 26(11): p. 631-8.
103. Kummerer, K., Antibiotics in the aquatic environment -a review- part I. *Chemosphere*, **2009**. 75(4): p. 417-34.
104. von Nussbaum, F., M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, and D. Habich, Antibacterial natural products in medicinal chemistry--exodus or revival? *Angew Chem Int Ed Engl*, **2006**. 45(31): p. 5072-129.
105. Demain, A.L. and A. Fang, The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, **2000**. 69: p. 1-39.
106. Swayze, E.E., R.H. Griffey, and C.F. Bennett, *2.26 - Nucleic Acids (Deoxyribonucleic Acid and Ribonucleic Acid)*, in *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, J.B. Taylor and D.J. Triggle, Editors. **2007**, Elsevier: Oxford. p. 1037-1052.
107. Wright, G.D., A.M. Berghuis, and S. Mobashery, Aminoglycoside antibiotics. Structures, functions, and resistance. *Adv Exp Med Biol*, **1998**. 456: p. 27-69.
108. Ermolenko, D.N., P.V. Cornish, T. Ha, and H.F. Noller, Antibiotics that bind to the A site of the large ribosomal subunit can induce mRNA translocation. *Rna*, **2013**. 19(2): p. 158-66.
109. Melis, A., Carbon partitioning in photosynthesis. *Curr Opin Chem Biol*, **2013**. 17(3): p. 453-456.
110. Harris, E.H., *Introduction to Chlamydomonas and its laboratory use*, in *The Chlamydomonas Sourcebook*, E.H. Harris, D.B. Stern, and G.B. Witman, Editors. **2009**, Academic Press: London.
111. Wellburn, A.R., The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *J Plant Physiol*, **1994**. 144(3): p. 307-313.
112. Strasser, B. and R. Strasser, Measuring Fast Fluorescence Transients to Address Environmental Questions: The JIP-Test. *Photosyn Thesis: From Light to Biosphere*, **1995**: p. 977-980.
113. Clark, L.C., Jr., R. Wolf, D. Granger, and Z. Taylor, Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J Appl Physiol*, **1953**. 6(3): p. 189-93.
114. Delieu, T. and D.A. Walker, Polarographic Measurement of Photosynthetic Oxygen Evolution by Leaf Discs. *New Phytol*, **1981**. 89(2): p. 165-178.
115. Groger, W.K., Determination of sugars in biological media with thymol in sulphuric acid. *Clin Chim Acta*, **1961**. 6: p. 866-73.
116. Schulze, C., M. Wetzel, J. Reinhardt, M. Schmidt, et al., Screening of microalgae for primary metabolites including β-glucans and the influence of nitrate starvation and irradiance on β-glucan production. *J Appl Phycol*, **2016**. 28(5): p. 2719-2725.

117. Knight, J.A., S. Anderson, and J.M. Rawle, Chemical basis of the sulfo-phospho-vanillin reaction for estimating total serum lipids. *Clin Chem*, **1972**. 18(3): p. 199-202.
118. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **1951**. 193(1): p. 265-75.
119. González López, C.V., M.d.C.C. García, F.G.A. Fernández, C.S. Bustos, et al., Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresour Technol*, **2010**. 101(19): p. 7587-7591.
120. Hanahan, D., Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **1983**. 166(4): p. 557-580.
121. Guisbert, E., T. Yura, V.A. Rhodius, and C.A. Gross, Convergence of molecular, modeling, and systems approaches for an understanding of the *Escherichia coli* heat shock response. *Microbiol Mol Biol Rev*, **2008**. 72(3): p. 545-54.
122. Watson, J.D., A.A. Caudy, R.M. Myers, and J.A. Witkowski, *Recombinant DNA: Genes and genomes—A short course*. Third ed. **2007**, New York: John Wiley & Sons, Ltd.
123. Formighieri, C. and A. Melis, Regulation of beta-phellandrene synthase gene expression, recombinant protein accumulation, and monoterpene hydrocarbons production in *Synechocystis* transformants. *Planta*, **2014**. 240(2): p. 309-24.
124. Olsen, G.J., D.J. Lane, S.J. Giovannoni, N.R. Pace, and D.A. Stahl, Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu Rev Microbiol*, **1986**. 40: p. 337-65.
125. Jeon, S.M., J.H. Kim, T. Kim, A. Park, et al., Morphological, Molecular, and Biochemical Characterization of Monounsaturated Fatty Acids-Rich *Chlamydomonas* sp. KIOST-1 Isolated from Korea. *J Microbiol Biotechnol*, **2015**. 25(5): p. 723-31.
126. Haddad, R., E. Alemzadeh, A.-R. Ahmadi, R. Hosseini, and M. Moezzi, Identification of Chlorophyceae based on 18S rDNA sequences from Persian Gulf. *Iranian journal of microbiology*, **2014**. 6(6): p. 437-442.
127. Olmos, J., J. Paniagua, and R. Contreras, Molecular identification of *Dunaliella* sp. utilizing the 18S rDNA gene. *Lett Appl Microbiol*, **2000**. 30(1): p. 80-4.
128. Lin, G.-M., Y.-H. Lai, G. Audira, and C.-D. Hsiao, A Simple Method to Decode the Complete 18-5.8-28S rRNA Repeated Units of Green Algae by Genome Skimming. *Int J Mol Sci*, **2017**. 18(11): p. 2341.
129. Wu, S., J. Xiong, and Y. Yu, Taxonomic resolutions based on 18S rRNA genes: a case study of subclass copepoda. *PLoS One*, **2015**. 10(6): p. e0131498.
130. Lee, S.-R., J.H. Oak, I.K. Chung, and J.A. Lee, Effective molecular examination of eukaryotic plankton species diversity in environmental seawater using environmental PCR, PCR-RFLP, and sequencing. *J Appl Phycol*, **2010**. 22(6): p. 699-707.

131. Liang, Y.N., N. Sarkany, and Y. Cui, Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, **2009**. 31(7): p. 1043-1049.
132. Kim, S., J.E. Park, Y.B. Cho, and S.J. Hwang, Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresour Technol*, **2013**. 144: p. 8-13.
133. Maity, J., J. Bundschuh, c.-y. Chen, and P. Bhattacharya, Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives – A mini review. *Energy*, **2014**. 78.
134. Taher, H., S. Al-Zuhair, A. Al-Marzouqi, Y. Haik, and M. Farid, Growth of microalgae using CO^2 enriched air for biodiesel production in supercritical CO^2. *Renewable Energy*, **2015**. 82: p. 61-70.
135. Walters, R.G., Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *J Exp Bot*, **2005**. 56(411): p. 435-47.
136. Ren, L.J., H. Huang, A.H. Xiao, M. Lian, et al., Enhanced docosahexaenoic acid production by reinforcing acetyl-CoA and NADPH supply in *Schizochytrium* sp. HX-308. *Bioprocess Biosyst Eng*, **2009**. 32(6): p. 837-43.
137. Cecchin, M., S. Benfatto, F. Griggio, A. Mori, et al., Molecular basis of autotrophic vs mixotrophic growth in *Chlorella sorokiniana. Sci Rep*, **2018**. 8(1): p. 6465.
138. Li, J., D. Han, D. Wang, K. Ning, et al., Choreography of Transcriptomes and Lipidomes of Nannochloropsis Reveals the Mechanisms of Oil Synthesis in Microalgae. *Plant Cell*, **2014**. 26(4): p. 1645-1665.
139. Nichols, B.W., A.T. James, and J. Breuer, Interrelationships between fatty acid biosynthesis and acyl-lipid synthesis in *Chlorella vulgaris. Biochem J*, **1967**. 104(2): p. 486-96.
140. Santos-Sanchez, N.F., R. Valadez-Blanco, B. Hernandez-Carlos, A. Torres-Arino, et al., Lipids rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids from microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2016**. 100(20): p. 8667-84.
141. Strzałka, K., A. Kostecka-Gugała, and D. Latowski, Carotenoids and Environmental Stress in Plants: Significance of Carotenoid-Mediated Modulation of Membrane Physical Properties. *Russian Journal of Plant Physiology*, **2003**. 50(2): p. 168-173.
142. McElroy, S. and D. Kopsell, Physiological role of carotenoids and other antioxidants in plants and application to turfgrass stress management. *New Zeal J Crop Hort*, **2009**. 37: p. 327-333.
143. Lockert, C.K., K.D. Hoagland, and B.D. Siegfried, Comparative sensitivity of freshwater algae to atrazine. *Bull Environ Contam Toxicol*, **2006**. 76(1): p. 73-9.
144. Gonen-Zurgil, Y., Y. Carmeli-Schwartz, and A. Sukenik, Selective effect of the herbicide DCMU on unicellular algae — a potential tool to maintain monoalgal mass culture of *Nannochloropsis. J Appl Phycol*, **1996**. 8(4): p. 415-419.

145. Tellenbach, M., A. Gerber, and A. Boschetti, Herbicide-binding to thylakoid membranes of a DCMU-resistant mutant of *Chlamydomonas reinhardii. FEBS Letters*, **1983**. 158(1): p. 147-150.
146. Deng, l., S. Senseman, T.J. Gentry, D. Zuberer, et al., Effect of selected herbicides on growth and lipid content of *Nannochloris oculata. J Aquat Plant Manag*, **2015**. 53: p. 28-35.
147. St. John, J.B., Comparative Effects of Diuron and Chlorpropham on ATP Levels in *Chlorella. Weed Sci*, **1971**. 19(3): p. 274-276.
148. Liu, B.-y., X.-p. Nie, W.-q. Liu, P. Snoeijs, et al., Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole on photosynthetic apparatus in *Selenastrum capricornutum. Ecotoxicol Environ Saf*, **2011**. 74(4): p. 1027-1035.
149. Matsumoto, H., K. Takechi, H. Sato, S. Takio, and H. Takano, Treatment with Antibiotics that Interfere with Peptidoglycan Biosynthesis Inhibits Chloroplast Division in the Desmid *Closterium. PLoS One*, **2012**. 7(7): p. e40734.
150. Wang, X., D. Ryu, R.H. Houtkooper, and J. Auwerx, Antibiotic use and abuse: A threat to mitochondria and chloroplasts with impact on research, health, and environment. *BioEssays*, **2015**. 37(10): p. 1045-1053.
151. Boxall, A.B., The environmental side effects of medication. *EMBO Rep*, **2004**. 5(12): p. 1110-6.
152. Seoane, M., C. Rioboo, C. Herrero, and A. Cid, Toxicity induced by three antibiotics commonly used in aquaculture on the marine microalga *Tetraselmis suecica (Kylin) Butch. Mar Environ Res*, **2014**. 101: p. 1-7.
153. Valitalo, P., A. Kruglova, A. Mikola, and R. Vahala, Toxicological impacts of antibiotics on aquatic micro-organisms: A mini-review. *Int J Hyg Environ Health*, **2017**. 220(3): p. 558-569.
154. Camuel, A., B. Guieysse, C. Alcantara, and Q. Bechet, Fast algal eco-toxicity assessment: Influence of light intensity and exposure time on *Chlorella vulgaris* inhibition by atrazine and DCMU. *Ecotoxicol Environ Saf*, **2017**. 140: p. 141-147.
155. Ma, J., L. Xu, S. Wang, R. Zheng, et al., Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris. Ecotoxicol Environ Saf*, **2002**. 51(2): p. 128-32.
156. Lai, H.T., J.H. Hou, C.I. Su, and C.L. Chen, Effects of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chui. Ecotoxicol Environ Saf*, **2009**. 72(2): p. 329-34.
157. Bashir, K.M. and M.G. Cho, The Effect of Kanamycin and Tetracycline on Growth and Photosynthetic Activity of Two Chlorophyte Algae. *Biomed Res Int*, **2016**. 2016.
158. Day, A. and M. Goldschmidt-Clermont, The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal. *Plant Biotechnol J*, **2011**. 9(5): p. 540-53.
159. Angelis, S., A.C. Novak, E.B. Sydney, V.T. Soccol, et al., Co-culture of microalgae, cyanobacteria, and macromycetes for exopolysaccharides production: process

preliminary optimization and partial characterization. *Appl Biochem Biotechnol*, **2012**. 167(5): p. 1092-106.

160. Delattre, C., G. Pierre, C. Laroche, and P. Michaud, Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnol Adv*, **2016**. 34(7): p. 1159-1179.
161. Freire-Nordi, C.S., A.A.H. Vieira, and O.R. Nascimento, Selective permeability of the extracellular envelope of the microalga *Spondylodium Panduriforme* (Chlorophycae) as revealed by electron paramagnetic resonance. *J Phycol*, **1998**. 34(4): p. 631-637.
162. Dragone, G., S.I. Mussatto, J.M. Oliveira, and J.A. Teixeira, Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chem*, **2009**. 112(4): p. 929-935.
163. Kushwaha, J.P., V.C. Srivastava, and I.D. Mall, An overview of various technologies for the treatment of dairy wastewaters. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **2011**. 51(5): p. 442-52.
164. Gavala, H.N., H. Kopsinis, I.V. Skiadas, K. Stamatelatou, and G. Lyberatos, Treatment of Dairy Wastewater Using an Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor. *J Agr Eng Res*, **1999**. 73(1): p. 59-63.
165. Siso, M.I.G., The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresour Technol*, **1996**. 57(1): p. 1-11.
166. Khemka, A. and M. Saraf, Phycoremediation of dairy wastewater coupled with biomass production using *Leptolyngbya* sp. *Journal of environment science and water resources*, **2015**. 4.
167. Bhatnagar, A., S. Chinnasamy, M. Singh, and K.C. Das, Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Appl Energy*, **2011**. 88(10): p. 3425-3431.
168. APHA, AWWA, and WEF, *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater*. 23rd ed. **2017**, Washington, DC: American Public Health Association & American Water Works Association & Water Environment Federation.
169. Khalil, Z.I., M.M. Asker, S. El-Sayed, and I.A. Kobbia, Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. *World J Microbiol Biotechnol*, **2010**. 26(7): p. 1225-31.
170. Mayo, A.W., Effects of temperature and pH on the kinetic growth of unialga *Chlorella vulgaris* cultures containing bacteria. *Water Environ Res*, **1997**. 69(1): p. 64-72.
171. Mayo, A.W. and T. Noike, Effect of glucose loading on the growth behavior of *Chlorella vulgaris* and heterotrophic bacteria in mixed culture. *Water Res*, **1994**. 28(5): p. 1001-1008.

172. Chung, P., W.G. Pond, J.M. Kingsbury, E.F. Walker, Jr., and L. Krook, Production and Nutritive Value of *Arthrospira Platensis*, a Spiral Blue-Green Alga Grown on Swine Wastes. *J Anim Sci*, **1978**. 47(2): p. 319-330.
173. Kothari, R., V. Pathak, V. Kumar, and D.P. Singh, Experimental study for growth potential of unicellular alga *Chlorella pyrenoidosa* on dairy waste water: An integrated approach for treatment and biofuel production. *Bioresour Technol*, **2012**. 116: p. 466-70.
174. Smith, E.L., Limiting factors in photosynthesis: light and carbon dioxide. *The Journal of general physiology*, **1938**. 22(1): p. 21-35.
175. Khan, M.I., J.H. Shin, and J.D. Kim, The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial cell factories*, **2018**. 17(1): p. 36-36.
176. Zhang, W., P. Zhang, H. Sun, M. Chen, et al., Effects of various organic carbon sources on the growth and biochemical composition of *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresour Technol*, **2014**. 173: p. 52-58.
177. Heredia-Arroyo, T., W. Wei, R. Ruan, and B. Hu, Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass and Bioenergy*, **2011**. 35(5): p. 2245-2253.
178. Mostert, E.S. and J.U. Grobbelaar, The influence of nitrogen and phosphorus on algal growth and quality in outdoor mass algal cultures. *Biomass*, **1987**. 13(4): p. 219-233.
179. Gautam, K., A. Pareek, and D.K. Sharma, Biochemical composition of green alga *Chlorella minutissima* in mixotrophic cultures under the effect of different carbon sources. *J Biosci Bioeng*, **2013**. 116(5): p. 624-627.
180. Yeh, K.L. and J.S. Chang, Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresour Technol*, **2012**. 105: p. 120-7.
181. Cheirsilp, B. and S. Torpee, Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresour Technol*, **2012**. 110: p. 510-516.
182. Sun, N., Y. Wang, Y.-T. Li, J.-C. Huang, and F. Chen, Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Process Biochem*, **2008**. 43(11): p. 1288-1292.

URL links:

[I] https://www.bio.org/sites/default/files/legacy/bioorg/docs/1030AM-Rebecca%20White.pdf
(*συντομευμένο URL - https://bit.ly/2ULQbty*) - 3/3/2020.

[II] https://selfhacked.com/blog/chlorella-benefits/
(*συντομευμένο URL - https://bit.ly/2UpZ6ip*) - 7/3/2020.

[III] https://www.sunchlorellausa.com/blog/recipes-3/post/vegan-chocolate-chip-cookies-with-matcha-and-chlorella-281
(*συντομευμένο URL - https://bit.ly/2J1Vwpo*) - 7/3/2020.

[IV] https://derangedphysiology.com/main/cicm-primary-exam/required-reading/respiratory-system/Chapter%20422/principles-oxygen-measurement-clark-electrode
(*συντομευμένο URL - https://bit.ly/2TIAIs8*) - 3/3/2020.

[V] https://blog.labtag.com/a-brief-history-of-pcr-and-its-derivatives
(*συντομευμένο URL - https://bit.ly/38OXXqD*) - 3/3/2020.

[VI] https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012707_CloneJET_PCR_Cloning_20rxn_UG.pdf
(*συντομευμένο URL - https://bit.ly/2VF2ybf*) - 3/3/2020.

[VII] http://abo.com.pl/userdata/gfx/a75111ba440365334853b2c21bd69b0c.jpg
(*συντομευμένο URL - https://bit.ly/328ukhL*) - 3/3/2020.

[VIII] https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0013117_GeneJET_Plasmid_Miniprep_UG.pdf
(*συντομευμένο URL - https://bit.ly/2wlS2v9*) - 3/3/2020.

[IX] https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/649/1/chapter_9.pdf
(*συντομευμένο URL - https://bit.ly/2ucmcjy*) - 3/3/2020.