ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
Μοριακή και Εφαρμοσμένη Βιολογία Φυτών – Πράσινη Βιοτεχνολογία

Διατριβή Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης

Μεταβολική και λειτουργική διαφοροποίηση του χλωροφύκους *Chlorella vulgaris* σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού και διαφορετικές συγκεντρώσεις CO_2

Φανούριος Μουντουράκης

Εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας
Επιβλέπων Καθηγητής: Καθ. Κυριάκος Κοτζαμπάσης

Ηράκλειο Κρήτης – Φεβρουάριος 2021

UNIVERSITY OF CRETE

SCHOOL OF SCIENCES AND ENGINEERING

DEPARTMENT OF BIOLOGY

Post Graduate Program:
Molecular and Applied Plant Biology - Green Biotechnology

Master Thesis

Metabolic and functional differentiation of the green alga *Chlorella vulgaris* at different light intensities and different CO_2 concentrations

Fanourios Mountourakis

Plant Biochemistry and Photobiology Laboratory

Supervisor: Prof. Kiriakos Kotzabasis

Heraklion Crete, February 2021

Η εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο **Βιοχημείας Φυτών & Φωτοβιολογίας** του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστήμιου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Κυριάκου Κοτζαμπάση.

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Κυριάκος Κοτζαμπάσης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας

Στέργιος Πυρίντσος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας

Παναγιώτης Μόσχου, Αναπλ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας

Μεταβολική και λειτουργική διαφοροποίηση του χλωροφύκους Chlorella vulgaris σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού και διαφορετικές συγκεντρώσεις CO_2

Πειραματική προσέγγιση και συγγραφή: Φανούριος Μουντουράκης
Αριθμός Πανεπιστημιακού Μητρώου (Μεταπτυχιακές Σπουδές) : 937
Επιμέλεια και επίβλεψη: Καθηγητής Κυριάκος Κοτζαμπάσης
Εργαστήριο: Βιοχημείας Φυτών & Φωτοβιολογίας, Τμήματος Βιολογίας
Ηράκλειο Κρήτης - Φεβρουάριος 2021

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:

Πρώτον από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Κυριάκο Κοτζαμπάση που με την ενεργή συνεισφορά του βοήθησε να φέρω εις πέρας την παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή. Με την εργαστηριακή του εμπειρία και τις πρωτοπόρες ιδέες του πάνω στο αντικείμενο της πράσινης βιοτεχνολογίας με καθοδήγησε κατάλληλα έτσι ώστε να καταφέρουμε να προχωρήσουμε την επιστημονική γνώση ένα βήμα παραπέρα. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω ξεχωριστά για το χρόνο που αφιέρωσε στην αναλυτική επιμέλεια του συγγράμματος αυτού καθώς και της παρουσίασης που πραγματοποιήθηκαν κατά την ολοκλήρωση του μεταπτυχιακού προγράμματος «Μοριακή και Εφαρμοσμένη Βιολογία Φυτών - Πράσινη Βιοτεχνολογία» του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης στο οποίο φοιτούσα. Παράλληλα, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Αικατερίνη Παπαζή, προσφάτως ενεργό μέλος του εργαστηρίου «Βιοχημείας Φυτών & Φυτοβιολογίας» για την πολύτιμη βοήθεια της και κυρίως για το φιλικό και χαρούμενο κλίμα που επικρατούσε μέσα στο χώρο εργασίας μας τον τελευταίο καιρό. Συνάμα, οφείλω ένα ευχαριστώ στα τρία μέλη της εξεταστικής επιτροπής, Κυριάκο Κοτζαμπάση, Στέργιο Πυρίντσο και Παναγιώτη Μόσχου για το χρόνο που αφιέρωσαν στην άρτια αξιολόγηση της εργασίας μου. Εν κατακλείδι, μπορώ να πω με σιγουριά ότι η ανάμειξή μου στο εργαστήριο αυτό τα τελευταία δύο χρόνια άλλαξε πραγματικά τον τρόπο σκέψης μου και ελπίζω να είναι μόνο η αρχή για μια πλούσια επιστημονική πορεία…

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του έργου ΚΑ 10485 «Καινοτόμος καλλιέργεια του μονοκύτταρου χλωροφύκους Chlorella vulgaris σε «έξυπνο» φωτοβιοαντιδραστήρα με τη χρήση τεχνολογίας μικρο -φυσαλίδων στο πλαίσιο μιας «μπλε κυκλικής οικονομίας» - Smart-BioreAl» MIS 5056221 το οποίο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ) που συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ) την περίοδο 2020-2021.

Περιεχόμενα

	σελίδες
Περίληψη	7
Abstract	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Φωτοσυνθετική διαδικασία	8
1.1.1 Φωτεινές αντιδράσεις	10
1.1.2 Σκοτεινές αντιδράσεις	14
1.2 «Έξυπνες» βιοτεχνολογικές εφαρμογές μικροφυκών	16
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	18
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	19
2.1 Το μονοκύτταρο χλωροφύκος Chlorella vulgaris	19
2.1.1 Συνθήκες καλλιέργειας του μικροφύκους	22
2.2 Εκτίμηση κυτταρικού όγκου (PCV)	24
2.2.1 Μετατροπή μl PCV σε mg DW	25
2.3 Καταγραφή της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού – Τεχνικές επαγωγικού φθορισμού (OJIP-test)	25
2.4 Αέρια χρωματογραφία θερμικής αγωγιμότητας (GC-TCD)	29
2.5 Μετρήσεις φωτοσυνθετικής και αναπνευστικής δραστηριότητας	30
2.6 Εκχύλιση και ποσοτικοποίηση χλωροφυλλών a & b και καροτενοειδών	30
2.6 Εκχύλιση και ποσοτικοποίηση υδατανθράκων	31
2.7 Εκχύλιση και ποσοτικοποίηση λιπιδίων	32
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	33
3.1 Ανάπτυξη μικροφυκών σε απόλυτο σκοτάδι	35
3.2 Ανάπτυξη μικροφυκών σε πολύ χαμηλό φως (10 μmol m^{-2} s^{-1})	42
3.3 Ανάπτυξη μικροφυκών στο χαμηλό φως (50 μmol m^{-2} s^{-1})	50
3.4 Ανάπτυξη μικροφυκών στο μέτριο φως (100 μmol m^{-2} s^{-1})	57
3.5 Ανάπτυξη μικροφυκών στο υψηλό φως (200 μmol m^{-2} s^{-1})	64
3.6 Ανάπτυξη μικροφυκών στο πολύ υψηλό φως (400 μmol m^{-2} s^{-1})	70

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ 76
4.1 Επίδραση του φωτός στη λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού υπό συνθήκες ατμοσφαιρικού αέρα 76
4.2 Επίδραση του CO2 στη λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού υπό διαφορετικούς φωτισμούς 78
4.3 Φωτοσυνθετική δραστηριότητα κατά την έκθεση του μικροφύκους σε διαφορετικές συνθήκες φωτισμού και διαφορετικές συγκεντρώσεις CO2 82
4.4 Στρατηγική διαχείρισης ενεργειακών αποθεμάτων του μικροφύκους στην αύξηση βιομάζας 83
4.5 Ποιοτική σύσταση της παραγόμενης βιομάζας (υδατάνθρακες, λιπαρά & χρωστικές) 84
Τελικά Συμπεράσματα 85
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 86

Περίληψη

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η διαφοροποίηση στη μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μονοκύτταρου χλωροφύκους *Chlorella vulgaris* σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού και σε διαφορετικές ακραίες συγκεντρώσεις CO_2, σε απόλυτα αυτότροφες συνθήκες, αποσκοπώντας στον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών καλλιέργειας για την μέγιστη δέσμευση CO_2 και την παραγωγή βιομάζας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η *Chlorella vulgaris* φτάνει τη μέγιστη βιομάζα σε ένταση φωτισμού μεταξύ 50-100 μmol m^{-2} s^{-1} και 30% CO_2. Ο βέλτιστος χρόνος καλλιέργειας σε τέτοια συστήματα υπολογίζεται γύρω στις 5-6 ημέρες, όπου καταγράφουμε περίπου 400% αύξηση βιομάζας, δεσμεύοντας ακραίες συγκεντρώσεις CO_2. Στους χειρισμούς της παρούσας εργασίας δεν παρατηρήσαμε σημαντικές διαφοροποιήσεις λιπαρών και υδατανθράκων στη βιομάζα των μικροφυκών. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση της βιομάζας κατά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας, έδειξαν σε γενικές γραμμές ότι έχουμε αύξηση των λιπαρών όσο μειώνεται η ένταση φωτισμού (και στο απόλυτο σκοτάδι) και όσο αυξάνεται ταυτόχρονα η συγκέντρωση CO_2. Για τους υδατάνθρακες φαίνεται να έχουμε τις υψηλότερες τιμές σε συνθήκες υψηλού φωτισμού (200-400 μmol m^{-2} s^{-1}) και ακραίας συγκέντρωσης CO_2 (60% CO_2). Όλα τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι η *Chlorella vulgaris* όχι μόνο ανέχεται υψηλές έως και ακραίες συγκεντρώσεις CO_2, αλλά οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις CO_2 δρουν ευεργετικά στη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού της μηχανισμού και κατά επέκταση στην αύξηση της βιομάζας. Πρόκειται για το ιδανικό σύστημα δέσμευσης ακραίων συγκεντρώσεων CO_2 μετατρέποντας το σε βιομάζα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Ως εκ τούτου πρόκειται για ένα σύστημα με προοπτικές για βιοτεχνολογικές και περιβαλλοντικές εφαρμογές.

Abstract

In the context of the present work was studied the differentiation in the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus of the unicellular green alga *Chlorella vulgaris* at different light intensities and at different extreme CO_2 concentrations, in completely autotrophic conditions, aiming at the determination of optimal biomass production. The results showed that Chlorella vulgaris reaches its biomass maximum at light intensities between 50-100 μmol m^{-2} s^{-1} and a CO_2 concentration of 30%. The optimal cultivation time in such systems is estimated at around 5-6 days, where we record about 400% increase in microalgal biomass, capturing extreme CO_2 concentrations. In the treatments of the present work, we did not observe significant differences of lipids and carbohydrates in the biomass of the microalgae. However, the results obtained from the analysis of biomass at the end of the experimental process, showed in general an increase in lipids as the light intensity decreases (and in complete darkness) and as the CO_2 concentration increases simultaneously. Carbohydrates seems to have the highest values in high light conditions (200-400 μmol m^{-2} s^{-1}) and extreme CO_2 concentrations (60% CO_2). All of the above suggest that *Chlorella vulgaris* not only tolerates extreme high CO_2 concentrations, but the increasing CO_2 concentrations have a beneficial effect on the molecular structure and function of its photosynthetic mechanism and consequently on the increase of biomass. Therefore, it is a system with perspectives for future biotechnological and environmental applications.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Chlorella vulgaris* αποτελεί έναν από τους βασικότερους οργανισμούς που μελετήθηκε ιδιαίτερα για βιοτεχνολογικές εφαρμογές, που αφορούν κυρίως στην διατροφή, στην αποτοξικοποίηση περιβαλλοντικών ρύπων, στην καταπολέμηση του φαινομένου του θερμοκηπίου και στην παραγωγή βιοκαυσίμων 3ης (βιοαιθανόλη και βιοντίζελ) και 4ης (βιοϋδρογόνο) γενιάς. Ως εκ τούτου, ένα εύλογο ερώτημα της επιστημονικής κοινότητας, είναι η εύρεση των ιδανικών συνθηκών καλλιέργειάς του. Από τις αρχές του 20ου αιώνα έχουν παρουσιαστεί δεκάδες εργασίες που κινούνται σε τελείως διαφορετικούς άξονες με διαφορετικά αποτελέσματα, ωστόσο στην παρούσα μελέτη, παίρνοντας υπόψη όλα τα προηγούμενα, αναθεωρήσαμε λίγο τον τρόπο προσέγγισης του εν λόγω ερωτήματος. Με επίκεντρο την χρήση τεχνικών επαγωγικού φθορισμού μπορούμε μη επεμβατικά να προσδιορίζουμε τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού του μηχανισμού, αναζητώντας τις βέλτιστες συνθήκες συγκέντρωσης CO_2 και έντασης φωτισμού ως προς τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας υψηλής προστιθέμενης αξίας, προσπαθώντας παράλληλα να ερμηνεύσουμε την αλληλεπίδραση των συνθηκών καλλιέργειας και του λειτουργικού μεταβολισμού του κυττάρου.

1.1 Φωτοσυνθετική διαδικασία

Προτού περάσουμε στα αποτελέσματα της εργασίας μας είναι μείζονος σημασίας να κάνουμε μια σύντομη παρουσίαση των βασικών μερών του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (φωτεινές και σκοτεινές αντιδράσεις) έτσι ώστε να μπορέσουμε να διακρίνουμε με μια σαφή επιστημονική ματιά το πως δρα το μικροφύκος *Chlorella vulgaris* στις εκάστοτε συνθήκες. Έτσι, θα είναι ευκολότερο να κατανοήσουμε και ταυτόχρονα να αξιολογήσουμε τα δεδομένα που παρουσιάζουμε και αφορούν την λειτουργική διαφοροποίηση του χλωροφύκους *Chlorella vulgaris* σε διαφορετικές εντάσεις ακτινοβολίας και διαφορετικές συγκεντρώσεις CO_2.

Φωτοσύνθεση είναι η διαδικασία κατά την οποία τα ανώτερα φυτά και τα μικροφύκη μετασχηματίζουν τη φωτεινή ενέργεια σε χημική και στη συνέχεια την επενδύουν για τη μετατροπή της ανόργανης ύλης (CO_2) σε οργανική. Η φωτοσύνθεση είναι η μοναδική επίγεια βιοχημική διαδικασία η οποία εκμεταλλεύεται μια εξωγήινη μορφή ενέργειας (ηλιακή ακτινοβολία) κι ως εκ τούτου είναι ο μοναδικός τρόπος συνεχούς ενεργειακής παροχής στον πλανήτη μας. Εντούτοις, η φωτοσυνθετική αφομοίωση του άνθρακα τροφοδοτεί ολόκληρη τη βιόσφαιρα. Αξίζει απλά να σημειωθεί ότι σε έναν πλανήτη που χρονολογείται γύρω στα 4,54 δισεκατομμύρια έτη και η ζωή εμφανίζεται 4,28-3,5 δισεκατομμύρια χρόνια πριν από το σήμερα, υπάρχουν τεκμηριωμένα σημάδια φωτοσυνθετικών οργανισμών ήδη στα 3,5 δισεκατομμύρια χρόνια (Darlymple and Brent, 2001; Noffke et al., 2013; Dodd et al., 2017).

Η οξυγονική φωτοσύνθεση στα ανώτερα φυτά και στα μικροφύκη είναι μια αλληλουχία οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων που συνοψίζεται στην παρακάτω εξίσωση:

$CO_2 + H_2O$ + φως→→ → $[CH_2O] + O_2$

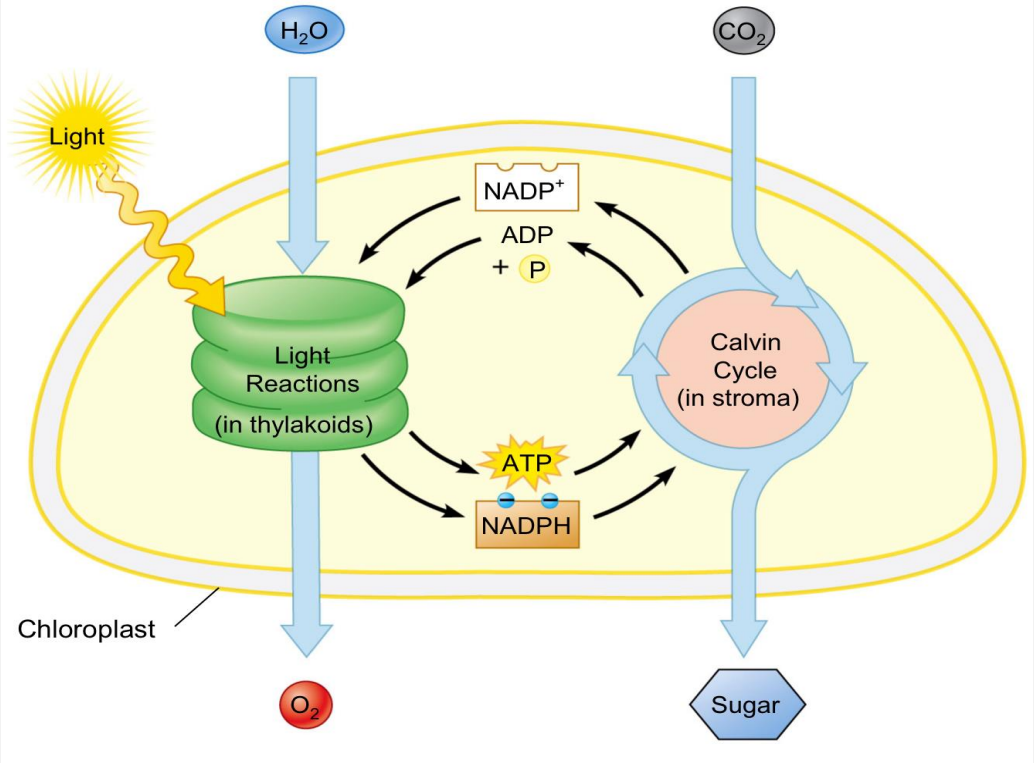
Η φωτοσύνθεση αποτελείται από δύο διακριτές αντιδράσεις, οι οποίες ονομάστηκαν φωτεινές και σκοτεινές αντιδράσεις. Οι φωτεινές αντιδράσεις εξαρτούνται άμεσα από το φως, ενώ οι σκοτεινές αντιδράσεις είναι τελείως φωτοανεξάρτητες και συχνά αποκαλούνται κύκλος Bassham-Benson-Calvin προς τιμήν των επιστημόνων που τις ανακάλυψαν. Οι αντιδράσεις αυτές ακολουθούν τις παρακάτω εξισώσεις (βλ. Εικόνα 1.1):

<u>Φωτεινές αντιδράσεις:</u>

$2H_2O + 2NADP^+ + 3ADP + 3Pi$ + photons → $O_2 + 2NADPH + 3ATP$*

<u>Σκοτεινές αντιδράσεις:</u>

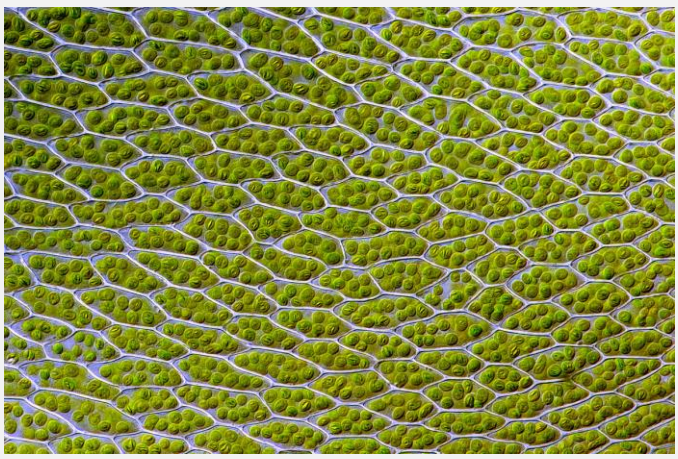
$3CO_2 + 6NADPH + 9ATP + 6H^+$→ $G3P + 6NADP^+ + 9ADP + 3H_2O + 8Pi$

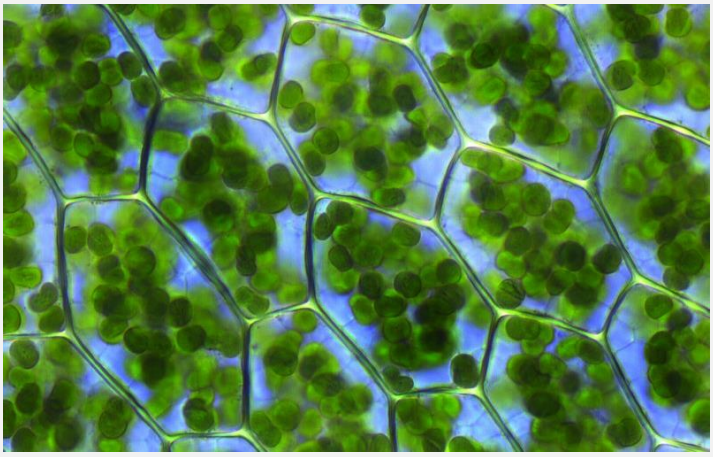


Εικόνα 1.1: Απλοποιημένη απεικόνιση των φωτεινών και των σκοτεινών αντιδράσεων της οξυγονικής φωτοσύνθεσης μέσα από την οποία διαφαίνεται η σύνδεσή τους (Pearsons education Inc., 2012)

1.1.1 Φωτεινές αντιδράσεις

Οι φωτεινές αντιδράσεις θα απασχολήσουν κατά κύριο λόγο το ενδιαφέρον μας στην εργασία αυτή μιας και είναι εκείνες που πραγματοποιούν τη μετατροπή της φωτεινής ενέργειας σε χημική, όπως είδαμε και παραπάνω (παραγωγή NADPH, ATP και O_2 ως παραπροϊόν). Η φωτοσύνθεση γίνεται ενδοκυτταρικά σε συγκεκριμένα οργανίδια που ονομάζονται χλωροπλάστες. Οι χλωροπλάστες είναι πλαστίδια το οποία προέκυψαν ενδοσυμβιωτικά, δηλαδή, προέκυψαν από τη συνεξέλιξη δισεκατομμυρίων χρόνων ενός μη φωτοσυνθετικού ευκαρυώτη και ενός εγκολπωμένου σε αυτόν κυανοβακτηρίου που κατάφερε να διατηρηθεί μεταβολικά ενεργό. Συνήθως, έχουν αρκετά μεγάλο μέγεθος 5-10 μm κι είναι πράσινου χρώματος, κάτι που τους καθιστά ιδιαίτερα ευδιάκριτους στο οπτικό μικροσκόπιο σε σχετικά μικρή μεγέθυνση, χωρίς χρώση (βλ. Εικόνα 1.2) (Becker, 2007).

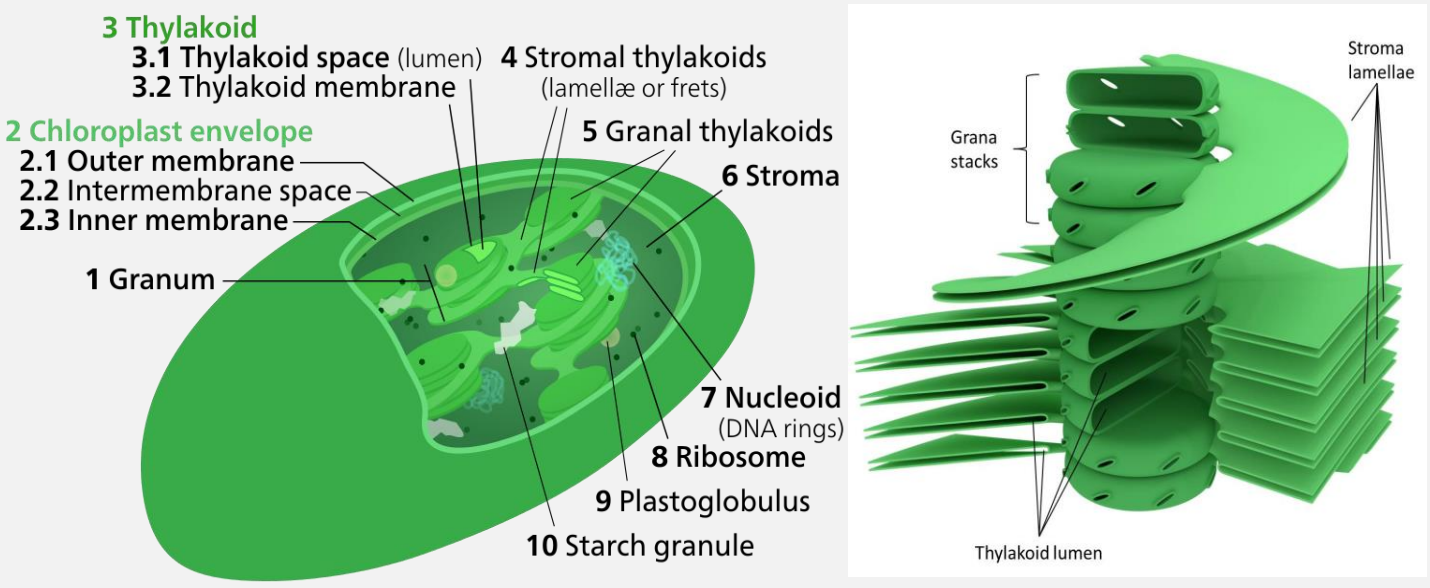




Εικόνα 1.2 : Εγκάρσια τομή φυλλαρίου γαμετόφυτου βρυόφυτου *Bryum capillare* (αριστερά) και *Plagiomnium affine* (δεξιά) όπου φαίνονται ξεκάθαρα οι άφθονοι πράσινοι χλωροπλάστες μέσα από οπτικό μικροσκόπιο χωρίς χρώση (Wikimedia commons by Callaghan, 2014 και Peters,2006).

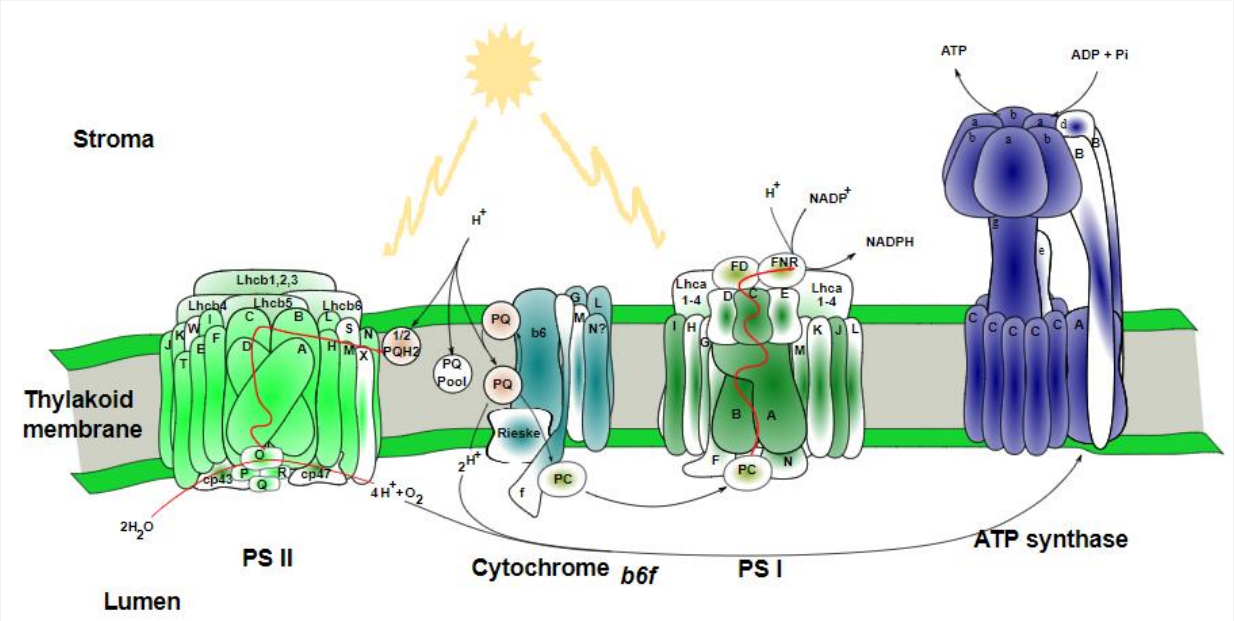
Οι χλωροπλάστες έχουν διατηρήσει ένα κομμάτι του γονιδιώματός τους γνωστό κι ως plastome ή cpDNA αλλά είναι άμεσα εξαρτώμενοι από τον πυρήνα και τον υπόλοιπο κυτταρικό μεταβολισμό στον οποίον έχουν σαφέστατα εξελικτικά συνδράμει πχ. περίπου το 18% του πυρηνικού DNA του *Arabidopsis thaliana* μπορεί να ιχνηλατηθεί πίσω στο χλωροπλάστη. Παρόλα αυτά, το 95% των χλωροπλαστικών πρωτεϊνών έχουν πυρηνική προέλευση (Archibald, 2006). Τα οργανίδια αυτά είναι κινητά, με πολύ υψηλή δυναμικότητα μέσα στο κύτταρο κι η συμπεριφορά τους εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Οι χλωροπλάστες έχουν δύο μεμβράνες. Ο χώρος του χλωροπλάστη που περικλείεται από την εσωτερική μεμβράνη ονομάζεται στρώμα (stroma) και μέσα του η μεμβράνη αυτή αναδιπλώνεται σχηματίζοντας δισκοειδείς, πεπλατυσμένες δομές που ονομάζονται θυλακοειδή (thylakoids). Εκ τούτου, οι χλωροπλάστες

χαρακτηρίζονται από ένα τρι-μεμβρανικό σύστημα. Οι αναδιπλώσεις που οδηγούν στα θυλακοειδή γίνονται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να μοιάζουν με ανεξάρτητες δομές που στοιχίζονται η μια πάνω στην άλλη σχηματίζοντας τα λεγόμενα γκράνα (grana). Παρόλα αυτά, ο εσωτερικός χώρος των θυλακοειδών, που ονομάζεται μικροχώρος (lumen) και είναι συνεχής τόσο ανάμεσα σε αυτά, όσο ανάμεσα και στα γειτονικά grana που συνδέονται με γέφυρες που ονομάζονται ελασμάτια (lamellae). Ο αριθμός των χλωροπλαστών και το μέγεθος που καταλαμβάνουν μέσα στο φυτικό κύτταρο συχνά ποικίλλει και μπορεί να είναι ένα χαρακτηριστικό διάκρισης του είδους (βλ. Εικόνα 1.3) (Jensen and Leister, 2014; Keeling, 2004).



Εικόνα 1.3: Αριστερά : Δομή και βασικά μέρη του χλωροπλάστη. Δεξιά: Αναπαράσταση των αναδιπλώσεων της μεμβράνης του θυλακοειδούς. (Wikimedia commons by Song, 2013)

Πάνω στις μεμβράνες του θυλακοειδούς βρίσκονται αγκυροβολημένα τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα μέσω των οποίων λαμβάνουν χώρα οι φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης. Τα βασικά σύμπλοκα είναι το Φωτοσύστημα ΙΙ (PSII) με τη φωτοσυλλεκτική κεραία, Light Harvesting Complex II (LHC II), το κυτόχρωμα b6f (Cytb6f), το Φωτοσύστημα Ι (PSI) με την αντίστοιχη φωτοσυλλεκτική κεραία, Light Harvesting Complex I (LHCI) και η ATPάση. Επίσης, σημαντικό ρόλο έχουν δύο κινητοί μεταφορείς ηλεκτρονίων, η πλαστοκινόνη (PQ) και η πλαστοκυανίνη (PC) . Η χωροταξική τοποθέτησή και η αλληλεπίδραση των διαφορετικών συμπλόκων είναι αυτή που δίνει σχήμα και λειτουργικότητα στα grana (Jensen and Leister, 2014; Keeling, 2004) (βλ. Εικόνα 1.4).



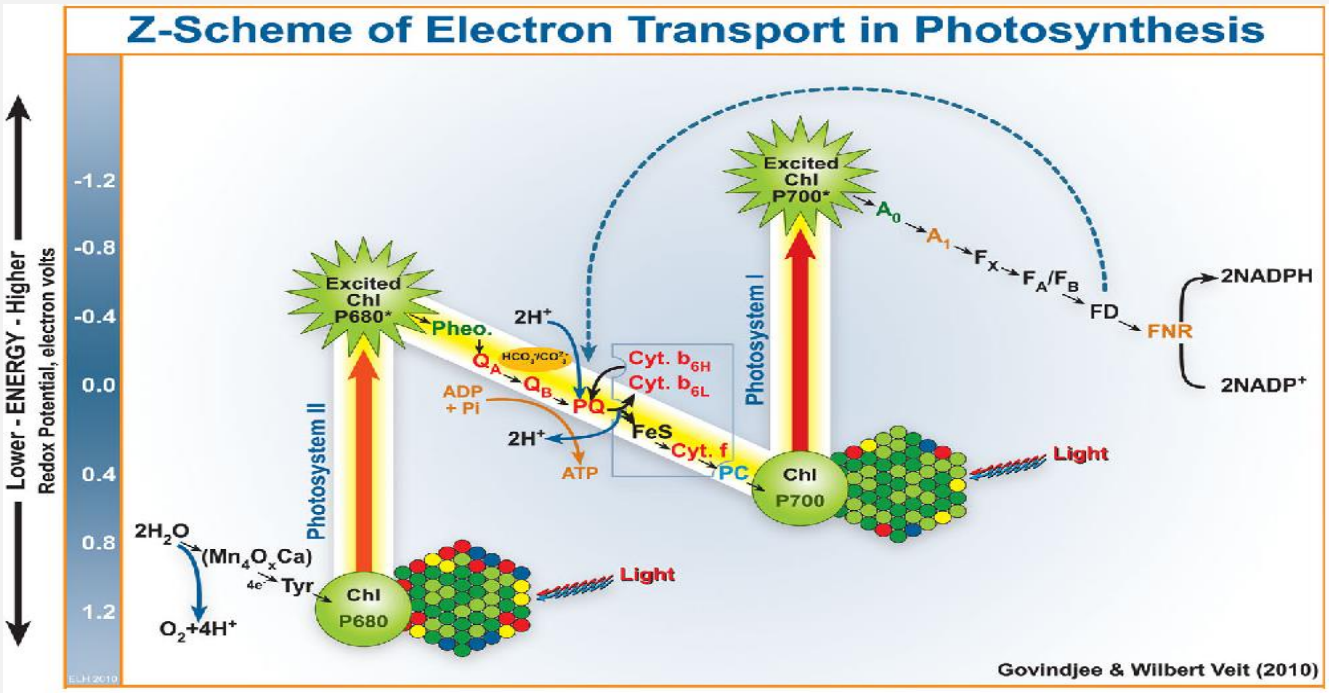
Εικόνα 1.4: Αρχιτεκτονική της φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στη μεμβράνη των θυλακοειδών (Wikimedia commons by Chandres, 2009)

Οι φωτοεξαρτώμενες αντιδράσεις έχουν δύο βασικές μορφές ή πιο σωστά δύο βασικές οδούς ροής ηλεκτρονίων, την μη κυκλική και την κυκλική ροή ηλεκτρονίων (Εικόνα 1.5). Στη μη κυκλική ροή ηλεκτρονίων συμμετέχουν και τα δυο φωτοσυστήματα, το PSII και το PSI. Οι χρωστικές του LHCII απορροφούν την φωτονιακή ενέργεια και διεγείρονται. Η διέγερση αυτή μεταφέρεται μέχρι το κέντρο αντίδρασης του PSII, στο διμερές χλωροφύλλης a, P_{680}. Η διεγερμένη μορφή του κέντρου αντίδρασης συμβολίζεται με P_{680}*. Εδώ ξεκινά ένα ταξίδι ηλεκτρονίου κατά μήκος της μεμβράνης του θυλακοειδούς. Το P_{680}* μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο στη φαιοφυτίνη (Pheo) το οποίο αναπληρώνεται μέσω της φωτόλυσης του νερού που πραγματοποιείται στη βάση του PSII στο Water-Oxidizing Complex (WOC). Η διαδικασία αυτή διασπά ελεγχόμενα το νερό απελευθερώνοντας ηλεκτρόνια, μοριακό οξυγόνο (O_2) και πρωτόνια (H^+) μέσα στο μικροχώρο. Πίσω στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, η ανηγμένη Pheo δίνει ένα ηλεκτρόνιο στην κινόνη A (QA) και αυτή με τη σειρά της στην κινόνη B (QB) μετατρέποντάς την σε ημικινόνη B (SQB). Μετά την απορρόφηση ενός δεύτερου ηλεκτρονίου και με τη λήψη δυο πρωτονίων (H^+) από το στρώμα, η SQB ανάγεται σε πλαστοκινόνη (PQH_2). Η ανηγμένη πλαστοκινόνη (PQH_2) οξειδώνεται σε PQ^+ και τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο κυτόχρωμα b6/f (Cytb6f) και τα πρωτόνια (H^+) καταλήγουν στο μικροχώρο. Στη συνέχεια ανάγεται η πλαστοκυανίνη (PC). Οι κεραίες του LHCI απορροφούν φως, διεγείρονται και με τη σειρά τους διεγείρουν ο κέντρο αντίδρασης P_{700} του PSI σε P_{700}*. Το γεγονός αυτό του επιτρέπει να αναχθεί από την PC και με τη σειρά του να ανάγει τη φερρεδοξίνη (FD). Η FD περνά τελικά τα ηλεκτρόνια της στο ένζυμο Ferredoxin—NADP($^+$) reductase (FNR) το οποίο παράγει NADPH. Η διαφορά πρωτονιακής συγκέντρωσης που δημιουργείται μεταξύ στρώματος και

μικροχώρου από τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, είναι η κινητήρια δύναμη Proton Motive Force (*pmf*) που θα ενεργοποιήσει την ATPάση και θα δημιουργήσει το ATP μεταφέροντας πρωτόνια (H^+) από το μικροχώρο στο στρώμα.

Στην κυκλική ροή ηλεκτρονίων χρησιμοποιείται μόνο ένα μέρος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονιών κι ο μηχανισμός δε συνθέτει NADPH παρά μόνο ATP. Πιο αναλυτικά, κεντρικό ρόλο έχει το PSI, ενώ το PSII δεν χρησιμοποιείται. Συγκεκριμένα τα ηλεκτρόνια που φτάνουν από το P_{700} στη Fd αντί να προωθηθούν στην FNR, επιστρέφουν στο κυτόχρωμα b6/f με τη βοήθεια της πλαστοκινόνης. Έτσι, περνάνε πρωτόνια (H^+) από το στρώμα στο μικροχώρο και τα ηλεκτρόνια μέσω της PC καταλήγουν πάλι στο κέντρο αντίδρασης του PSI σχηματίζοντας μια κυκλική πορεία.

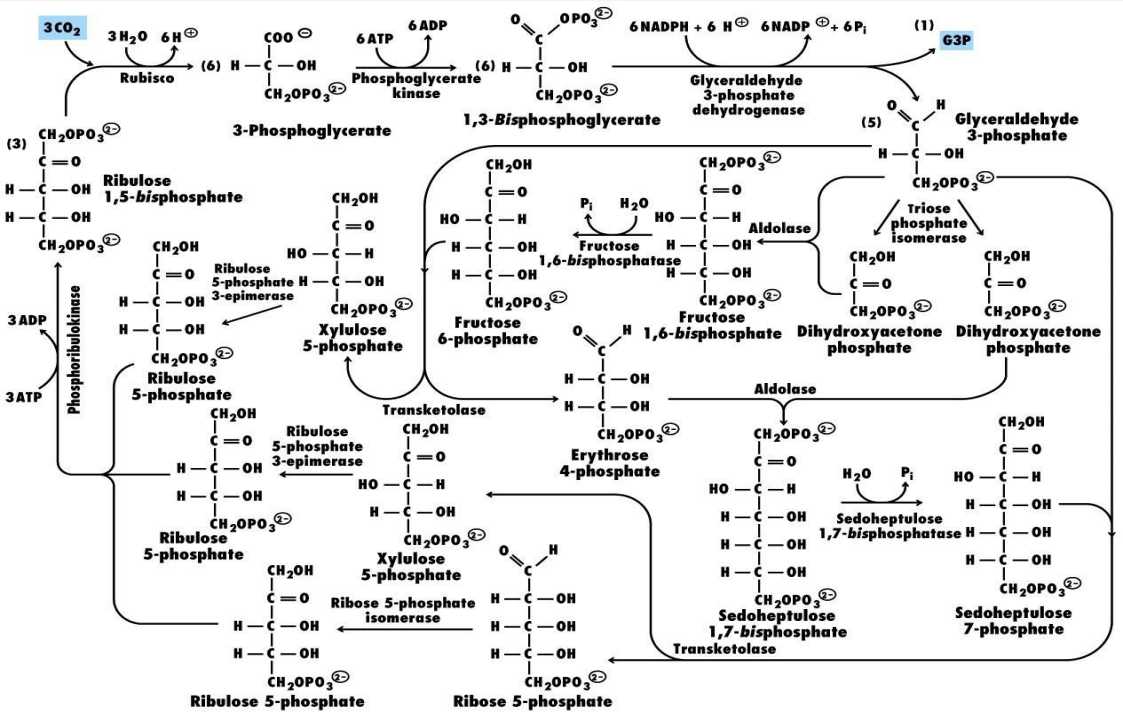
Σε γενικές γραμμές μπορούμε να περιγράψουμε τις φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσυνθετικής διαδικασίας ως ένα μηχανισμός που αξιοποιεί την απορροφηθείσα ηλιακή ενέργεια αυξάνοντας το ΔpH μεταξύ του στρώματος και του μικροχώρου του θυλακοειδούς, οξινίζοντας τον τελευταίο, ενώ η ATPάση είναι υπεύθυνη για τη μείωσή του. Αυτή η φαινομενικά απλή ανταλλαγή πρωτονίων παρέχει την απαιτούμενη ενέργεια για να στηρίξει ολόκληρο το οικοσύστημα του πλανήτη μας (Johnson, 2016; Walker 2002; Roach et al. 2014).



Εικόνα 1.5: Διαγραμματική αναπαράσταση (Z-scheme) της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων της φωτοσυνθετικής διαδικασίας με εμφανή την μη κυκλική και κυκλική ροή ηλεκτρονίων (Mohapatra and Singh, 2014).

1.1.2 Σκοτεινές αντιδράσεις

Ο φωτοσυνθετικός οργανισμός καταφέρνει μέσω των φωτεινών αντιδράσεων να μετατρέψει την ηλιακή ενέργεια σε χημική, παράγοντας ATP και NADPH. Επειδή όμως τα κύτταρα δεν είναι ικανά να αποθηκεύσουν μεγάλες ποσότητες των ενώσεων αυτών, λόγω των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων, οι φωτοσυνθέτες χρειάζονται μια περαιτέρω σειρά αντιδράσεων που ονομάζονται σκοτεινές αντιδράσεις για να τα μετατρέψουν σε μια πιο σταθερή μορφή αποθήκευσης ενέργειας. Το τελικό προϊόν της φωτοσύνθεσης είναι η βιοσύνθεση υδατανθράκων, όπως η γλυκόζη, πάνω στην οποία στηρίζεται ο μεταβολισμός των περισσότερων μορφών ζωής που γνωρίζουμε. Ακόμα όμως κι η γλυκόζη παράγεται σε περίσσεια από τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς κι ως εκ τούτου, αποθηκεύεται υπό τη μορφή πολυμερών όπως το άμυλο. Η διαδικασία των σκοτεινών ή φωτοανεξάρτητων αντιδράσεων δεν συμβαίνει στις μεμβράνες των θυλακοειδών όπως οι φωτεινές αντιδράσεις, αλλά στο στρώμα του χλωροπλάστη. Έχουν τη μορφή βιοχημικού κύκλου και καταλύονται από υδατοδιαλυτά ένζυμα τα οποία ενεργοποιούνται αλλά δεν αξιοποιούν το φως (Lonergan, 2000). Το όνομά τους λοιπόν μπορεί να οδηγήσει σε παρερμηνείες για αυτό του λόγο χρησιμοποιείται κυρίως το όνομα κύκλος του Calvin-Benson (Bassham et al., 1950).

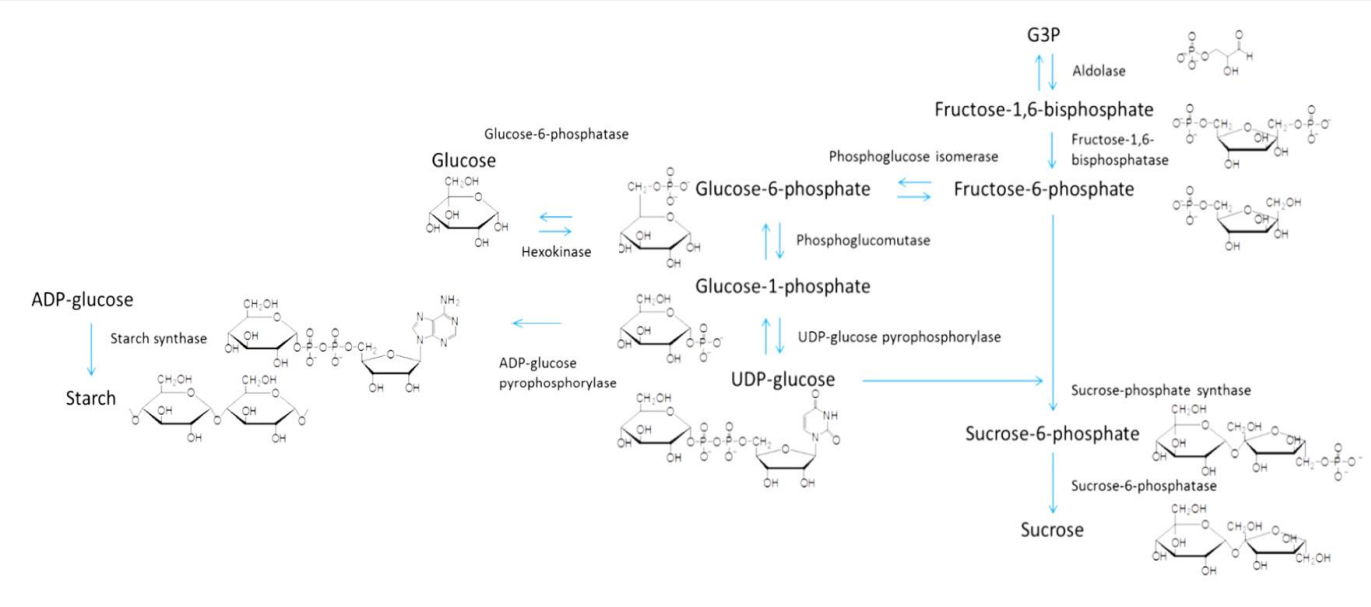


Εικόνα 1.6: Πλήρης αναπαράσταση του κύκλου του Calvin-Benson (Principles in Biochemistry 4th edition,2006)

Ο κύκλος του Calvin-Benson αποτελείται από 3 διαδοχικές φάσεις: τη φάση της καρβοξυλίωσης, τη φάση της αναγωγής και τη φάση της αναγέννησης και πρέπει να πραγματοποιηθεί 3 φορές έτσι ώστε να παραχθεί ένα τελικό προϊόν με 3 άνθρακες. Όλα ξεκινούν με τη φάση της καρβοξυλίωσης, όπου 3 μόρια διοξειδίου του άνθρακα (3 x CO_2 [1C]) ενώνονται με 3 μόρια 1,5-διφωρφορική ριβουλόζη (3 x RuBP [5C]). Σε αυτό το στάδιο δημιουργούνται 3 ασταθή μόρια με

6 άνθρακες τα οποία αμέσως σπάνε σε 6 μόρια με 3 άνθρακες που ονομάζονται 3-φωσφογλυκερικό οξύ (6 x 3-PGA [3C]). Η καρβοξυλίωση της RuBP καταλύεται από το ένζυμο καρβοξυλάση/οξυγενάση της 1,5-διφωρφορικής ριβουλόζης (RuBisCO), το πιο πολυπληθέστερο ένζυμο στον πλανήτη μας, όταν αυτό βρίσκεται στη φάση της καρβοξυλάσης. Μετά τη φάση της καρβοξυλίωσης ακολουθεί η φάση της αναγωγής, όπου τα 6 μόρια 3-PGA φωσφορυλιώνονται από 6 μόρια ATP σε 6 μόρια 1,3-διφωσφογλυκερικού οξέος (1,3-BPGA [3C]) από το ένζυμο Phosphoglycerate Kinase (PGK1). Εδώ έχουμε ως παραπροϊόν 6 μόρια ADP. Ακολούθως, 6 μόρια 1,3-BPGA ανάγονται από το ένζυμο NADP-dependent Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (nr-G3PDH) από 6 μόρια NADPH σε 6 μόρια 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (6 x G3P [3C]). Εδώ παράγονται 3 $NADP^+$ kai 3 Pi .Το 1 μόριο G3P είναι το τελικό προϊόν του κύκλου Calvin-Benson και τα άλλα 5 περνάνε στη φάση της αναγέννησης. Το πρώτο στάδιο της φάσης αυτής, δηλαδή η μετατροπή των 5 μορίων G3P σε 3 μόρια 5-φωσφορική ριβουλόζη (3 x Ru5P [5C]) είναι ιδιαίτερα πολύπλοκο και περιλαμβάνει τη συμμετοχή πολλών αντιδράσεων και ενζύμων που δεν αξίζει να αναλύσουμε στην παρούσα φάση. Τελικό στάδιο της αναγέννησης και του κύκλου του Calvin αποτελεί η μετατροπή των 3 μορίων Ru5P ξανά σε 3 μόρια 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη μέσω του ενζύμου Phosphoribulokinase (PRK) με την συμμετοχή επιπλέον 3 μορίων ATP (Bassham et al., 1950; Raines, 2003).

Συνοψίζοντας, μετά από 3 κύκλους του Calvin-Benson έχουμε την αφομοίωση 3 ανόργανων ανθράκων του CO_2 σε 1 μόριο G3P με κατανάλωση 9 μορίων ATP και 6 μορίων NADPH των οποίων τα παραπροϊόντα (ADP και $NADP^+$ αντίστοιχα) ανατροφοδοτούν τις φωτεινές αντιδράσεις (Bassham et al., 1950; Raines, 2003). Μια αναλυτική ματιά του συνόλου των αντιδράσεων βρίσκεται στην Εικόνα 1.12 όπου αναλύεται επαρκώς και η φάση της αναγέννησης, ενώ στην Εικόνα 1.13 φαίνεται η παραγωγή υδατανθράκων όπως η φρουκτόζη, η γλυκόζη, η σουκρόζη και το άμυλο από το G3P.



Εικόνα 1.7: Μετατροπή του G3P σε φρουκτόζη, γλυκόζη, σουκρόζη και άμυλο από το φυτικό μεταβολισμό (Choi and Montemagno, 2013)

1.2 «Έξυπνες» βιοτεχνολογικές εφαρμογές μικροφυκών

Αν θέλουμε να το θέσουμε πολύ συνοπτικά, οι αυτότροφοι οργανισμοί είναι απλές «βιολογικές μηχανές» που έχουν την ικανότητα να καταναλώσουν οργανικές ή/και ανόργανες πηγές άνθρακα (CO_2) προκειμένου να επιβιώσουν, να αναπτυχθούν και να αναπαραχθούν. Αυτή η πολύ σημαντική ιδιότητα βρίσκει πολυάριθμες εφαρμογές στη βιομηχανία που όχι μόνο μπορούν να βελτιώσουν την ανθρώπινη ζωή, αλλά και να δώσουν βιώσιμη λύση σε σημαντικότατα προβλήματα. Οι βασικότερες από αυτές τις εφαρμογές είναι η χρήση τους στη ανθρώπινη, ζωική και φυτική διατροφή, η αποτοξικοποίηση τοξικών ενώσεων, η δέσμευση μεγάλων ποσοτήτων CO_2 (αέριο θερμοκηπείου) και η παραγωγή βιοκαυσίμων 3^{ης} και 4^{ης} γενιάς. Οι παραπάνω επιμέρους εφαρμογές μπορούν να δράσουν αυτόνομα αλλά στην πραγματικότητα το οικονομικό και κοινωνικό κέρδος έρχεται όταν συνδυαστούν σε κάτι πρωτοπόρο και αποδοτικότερο.

Σαν πρώτη βασική χρήση της φωτοσυνθετικών μικροφυκών έχουμε την ανθρώπινη διατροφή. Ολοένα και περισσότεροι άνθρωποι τις τελευταίες δεκαετίες βάζουν στη διατροφή τους συμπληρώματα από χλωροφύκη όπως η *Spirullina* κι η *Chlorella*. Λόγω των υψηλών ποσοστών πρωτεΐνης, ω-3 λιπαρών, βιταμινών και μετάλλων αποτελούν ένα πολύ θρεπτικό συμπλήρωμα διατροφής για κάθε ηλικία. Αν λάβουμε δε υπόψιν και τις αντιοξειδωτικές του ικανότητες λόγω των χρωστικών κι ιδιαίτερα των καροτενοειδών καταλαβαίνουμε γιατί κατατάσσεται στην κατηγορία των «nutraceuticals» δηλαδή προϊόντων διατροφής με θετική επίδραση στην υγεία κάτι που στη χώρα μας ονομάζουμε γενικότερα «superfoods». Δεκάδες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί που καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι πιθανότατα βοηθά το ανοσοποιητικό , χαμηλώνει τη χοληστερόλη, μειώνει την αρτηριακή πίεση, βοηθά στην όραση, έχει ευεργετική δράση στη λειτουργία το ήπατος κλπ. Ωστόσο απαιτείται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να κατοχυρωθούν αυτές οι ιδιότητες και να περάσει στην κατηγορία των φαρμακευτικών προϊόντων. Για τους ίδιους λόγους χρησιμοποιείται με μεγάλη επιτυχία ως συμπληρωματική ζωοτροφή κυρίως στα πουλερικά και στις ιχθυοκαλλιέργειες χαρίζοντας εντονότερα χρώματα και ταχύτερη ανάπτυξη. Πέρα από αυτά, η βιομάζα των μικροφυκών μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα οικολογικό αλλά αποτελεσματικότατο λίπασμα στις αγροτικές καλλιέργειες. Έχει βρεθεί ότι τα βασικά συστατικά των κυττάρων, όσο και των εκκρινόμενων ουσιών που παράγουν, ευνοούν την ανάπτυξη πολλών φυτών όπως το σιτάρι ενώ προωθούν τη φύτρωση σε φυτά όπως το μαρούλι. Υπάρχουν ενδείξεις ακόμα και για προστατευτικό ρόλο έναντι σε φυτοπαθογόνα (Safi et al., 2014).

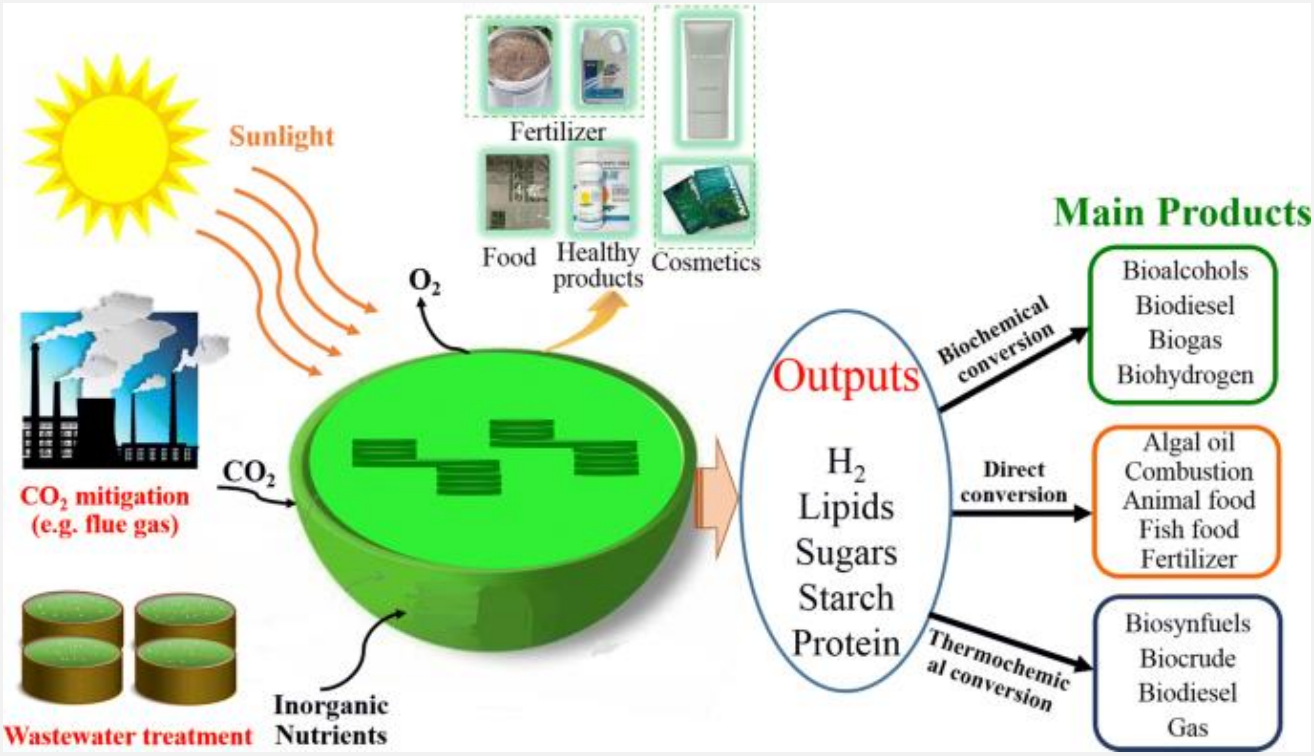
Πέρα από τη διατροφή, μικροφύκη μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την περιβαλλοντική αποτοξικοποίηση και τον καθαρισμό οικοσυστημάτων. Πιο αναλυτικά, έχει βρεθεί ότι καλλιέργειες διαφόρων ειδών όπως ο *Scenedesmus* και η *Chlorella* λόγω της ταχύτατης ανάπτυξης, μπορεί να απορροφήσει σχεδόν εξολοκλήρου το άζωτο και το φωσφόρο από λύματα σε ελεγχόμενές συνθήκες αποτρέποντας το φαινόμενο του ευτροφισμού που μπορεί να καταστρέψει καίρια σημεία του υδροφόρου ορίζοντα (Safi et al., 2014). Ταυτόχρονα, μπορούν να βιοαποικοδομήσουν μεγάλες ποσότητες οργανικών τοξικών ενώσεων όπως διάφορες φαινολικές ενώσεις και να τις χρησιμοποιήσουν ως πηγή ενέργειας

χρησιμοποιώντας τις άμεσα στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Papazi and Kotzabasis, 2013). Συνάμα, έχει βρεθεί ότι μπορούν να δράσουν απορροφώντας κι απομακρύνοντας τα βαρέα μέταλλα από υδάτινα οικοσυστήματα (Safi et al., 2014). Εκ τούτου, έχουμε ένα βιολογικό σύστημα που καθαρίζει το περιβάλλον με «δωρεάν» ενέργεια παρεχόμενη από τον ήλιο, ενώ ταυτόχρονα μας δίνει και τεράστιες ποσότητες βιομάζας για να εκμεταλλευτούμε.

Τα περιβαλλοντικά οφέλη των μικροφυκών δε σταματούν εκεί, αλλά φτάνουν μέχρι και το φαινόμενο του θερμοκηπίου. Σύμφωνα με το «National Oceanic and Atmospheric Administration» των Η.Π.Α., το CO_2 στην ατμόσφαιρα του πλανήτη μας έχει αυξηθεί από την απαρχή της Τεχνολογικής Επανάστασης στα τέλη του 19^{ου} αιώνα από 0,026% σε πάνω από 0,041% το 2020, με την δραματικότερη άνοδο να παρατηρείται τις τελευταίες δεκαετίες (Εικόνα 1.14). Μια τέτοια μεταβολή παρόλο που φαίνεται μηδαμινή έχει να παρατηρηθεί στον πλανήτη μας περίπου 1 εκατομμύριο χρόνια, δηλαδή πολύ πριν την εξέλιξη του ανθρώπινου είδους. Οι πιο αισιόδοξες προβλέψεις αποκαλύπτουν πως μέχρι το 2100, το CO_2 θα έχει σχεδόν διπλασιαστεί κάτι που θα φέρει αύξηση στη θερμοκρασία του πλανήτη μας κατά 3-4 ^{o}C, έχοντας καταστροφικές συνέπειες για την πλειονότητα των οικοσυστημάτων (Szulejko et al., 2017). Δυστυχώς, δεν υπάρχει καμία διαθέσιμη λύση στο πρόβλημα αυτό πέρα από συστάσεις για «καθαρότερη» ενέργεια και μείωση των εκπομπών CO_2 κάτι που προφανώς μπλοκάρεται από την οικονομία και δεν εφαρμόζεται σε μεγάλο βαθμό. Εδώ ίσως οι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί ήρθαν να ανατρέψουν τα δεδομένα. Έχει βρεθεί από πολυάριθμες έρευνες ότι τα περισσότερα χλωροφύκη είναι ιδιαίτερα απαιτητικά όσον αφορά τον παρεχόμενο ανόργανο άνθρακα. Ορισμένα μάλιστα όπως η *Chlorella vulgaris* όχι μόνο επιβιώνουν, αλλά φωτοσυνθέτουν αποδοτικότερα σε συγκεντρώσεις εκατοντάδες φορές μεγαλύτερη από της σημερινής ατμόσφαιράς, αφομοιώνοντας CO_2 σε μεγάλο βαθμό. (Singh & Singh, 2014). Εντούτοις, λόγω της ταχύτατης αύξησης και αναπαραγωγής, καλλιέργειες τέτοιων μικροφυκών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντίμετρα για την αντιμετώπιση της υπέρμετρης αύξησης του CO_2 , χωρίς να χρειάζεται εξωγενής παροχή ενέργειας από τον άνθρωπο καταλήγοντας σε τεράστιες ποσότητες φυτικής βιομάζας.

Τέλος φτάνουμε στο σημείο των βιοκαυσίμων, όπου πλέον μπορούμε να εκμεταλλευτούμε τη βιομάζα των μικροφυκών. Είναι γεγονός πως τα μικροφύκη, αλλάζουν τη βιοχημική τους σύσταση προσαρμοζόμενα στις εκάστοτε συνθήκες καλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα, όταν η ένταση του φωτισμού ή η θερμοκρσία είναι πολύ υψηλή, το CO_2 είναι σε αυξημένες ποσοστώσεις, υπάρχει έλλειψη βασικών θρεπτικών όπως N και P κ.α. , τα μικροφύκη συσσωρεύουν λιπαρά και άμυλο ενώ όταν οι συνθήκες καλλιέργειας είναι ευνοϊκές, συσσωρεύουν πρωτεΐνες και πολλαπλασιάζονται ταχύτατα. Εντούτοις, ρυθμίζοντας τις συνθήκες επώασης των φωτοσυνθετικών αυτών οργανισμών μας δίνεται η δυνατότητα να τα παράγουμε σε μεγάλες ποσότητες και στη συνέχεια να τα «αναγκάσουμε» να συσσωρεύσουν λιπαρά που μπορούν να μετατραπούν σε βιοντίζελ ή να συσσωρεύσουν σάκχαρα που μπορούν να οδηγηθούν σε βιοαιθανόλη, τα δύο επικρατέστερα βιοκαύσιμα 3^{ης} γενιάς στον πλανήτη μας. Έτσι συνδυάζουμε ταυτόχρονα το οικονομικό κέρδος, με

αρνητικό αποτύπωμα άνθρακα στον πλανήτη μας χωρίς τον τρομερό αρνητικό κοινωνικό και ανθρωπιστικό αντίκτυπο των βιοκαυσίμων προηγούμενων γενεών (Safi et al., 2014). Ωστόσο, μπορούμε ακόμα να χρησιμοποιήσουμε τα μικροφύκη μας χωρίς να τα καταστρέψουμε. Έχει βρεθεί πως κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες τα χλωροφύκη μπορούν να παράγουν βιοϋδρογόνο, ένα αποδοτικό και απολύτως «πράσινο» βιοκαύσιμο 4ης γενιάς που η καύση του έχει ως παραπροϊόν το νερό. Οι μέθοδοι αυτοί λόγω της αυξημένης τους σημασίας θα αναλυθούν περαιτέρω στην αμέσως επόμενη ενότητα. Μια σύντομη διαγραμματική απεικόνιση όλων των βιοτεχνολογικών εφαρμογών παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.8 .



Εικόνα 1.8 : Σύντομη διαγραμματική παρουσίαση των βιοτεχνολογικών εφαρμογών του μικροφύκους *Chlorella vulgaris (*Peng et al., 2020).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

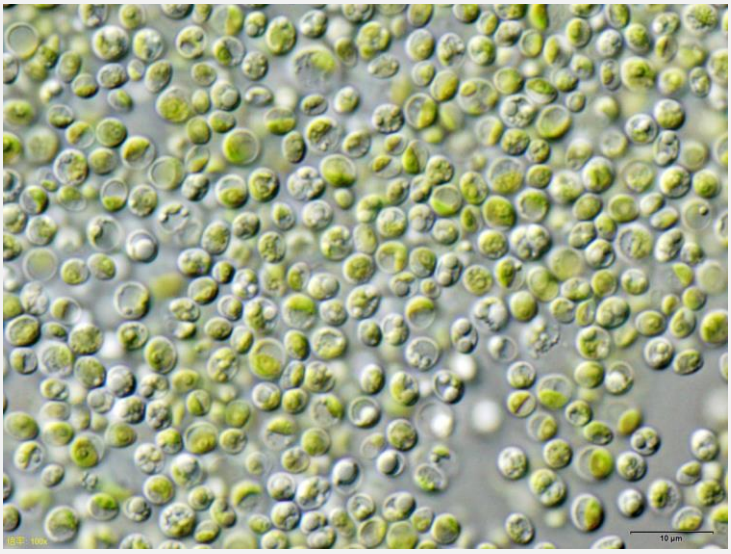
Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να διερευνήσουμε και να καταγράψουμε τη διαφοροποίηση στη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μονοκύτταρου χλωροφύκους *Chlorella vulgaris* σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού και σε διαφορετικές ακραίες συγκεντρώσεις CO_2, σε απόλυτα αυτότροφες συνθήκες. Εκ τούτου, θα προσδιορίσουμε τις βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας για την μέγιστη δέσμευση CO_2 και παραγωγή βιομάζας, ενώ παράλληλα θα ελέγξουμε την ποιότητα της παραγόμενης βιομάζας με βιοχημικές αναλύσεις σε υδατάνθρακες, λιπαρά και χρωστικές, ανοίγοντας το δρόμο για μελλοντικές περιβαλλοντικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Chlorella vulgaris*

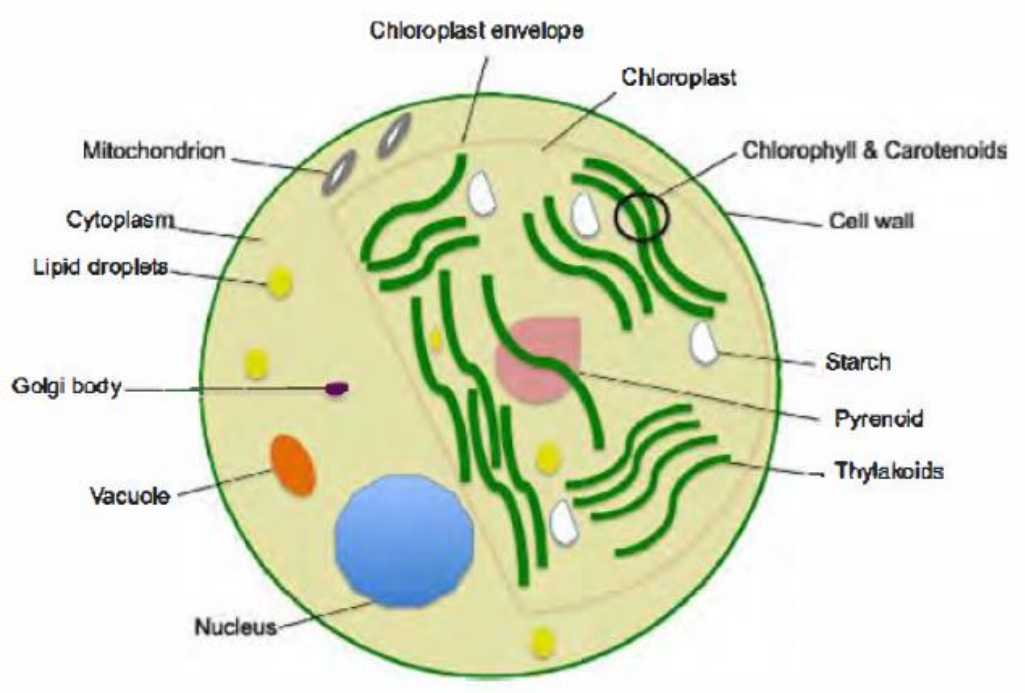
Η *Chlorella vulgaris* γνωστή στα ελληνικά με το όνομα χλωρέλλα είναι το σημαντικότερο και πιο μελετημένο είδος μικροφύκους στον πλανήτη μας. Ανακαλύφθηκε και ονοματίστηκε το 1890 από τον Γερμανό ερευνητή Martinus Beijerinck. Ο Beijerinck κατάφερε για πρώτη φορά να απομονώσει και να αναπτύξει σε καθαρή καλλιέργεια μικροφύκος στο οποίο μάλιστα παρατήρησε καλά ορισμένο και διακριτό πυρήνα. Το ονόμασε *Chlorella vulgaris* με το πρώτο συνθετικό του ονόματος να προκύπτει από το ελληνικό «Chloros / Χλωρός» που σημαίνει «ζωντανό πράσινο» και τη λατινική κατάληξη «-ella» από το μικροσκοπικό του μέγεθος, ενώ το δεύτερο συνθετικό από το λατινικό «vulgaris» που σημαίνει εξαιρετικά κοινός (Beijerinck, 1890). Η ακριβής επιστημονική του ταξινόμηση σύμφωνα με το Algaebase είναι:

Empire (Επικράτεια): Eykaryota
Kingdom (Βασίλειο): Plantae
Subkingdom (Υποβασίλειο): Viridiplantae
Phylum (Συνομοταξία): Chlorophyta
Class (Ομοταξία): Trebouxiophyceae
Order (Τάξη): Chlorellales
Family (Οικογένεια): Chlorellaceae
Genus (Γένος): *Chlorella*
Species (Είδος): *Chlorella vulgaris*



Εικόνα 2.1 : *Chlorella vulgaris* στο οπτικό μικροσκόπιο (Neon,2014). Στερεή καλλιέργεια *Chlorella vulgaris* σε ανόργανα θρεπτικά συστατικά συνταγής BBM με προσθήκη άγαρ.

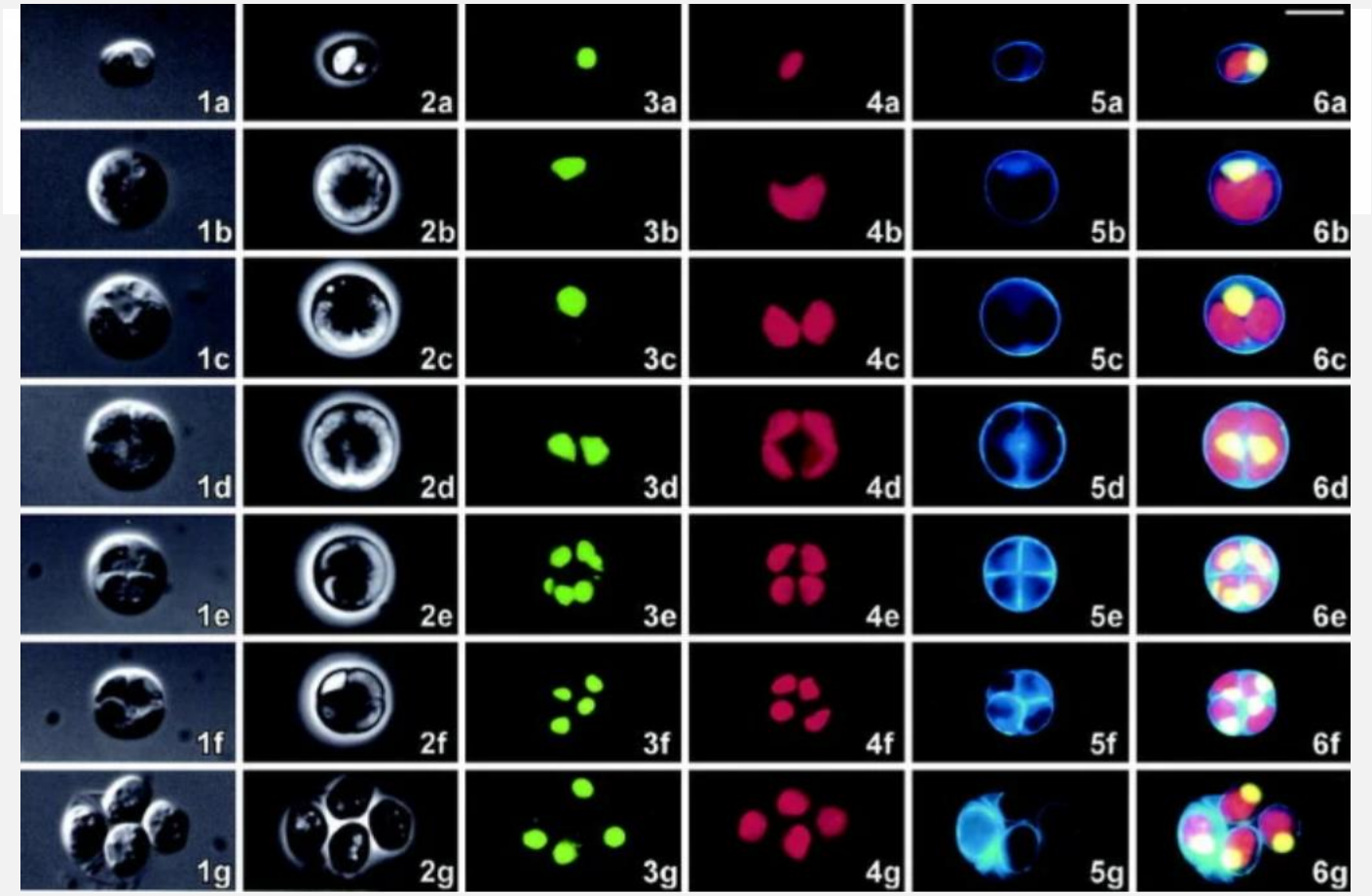
Η *Chlorella vulgaris* είναι ένα μονοκύτταρο ευκαρυωτικό χλωροφύκος που ζει σε διάφορα ενδιαιτήματα με κυριότερο το γλυκό νερό ποταμών και λιμνών, ενώ έχει βρεθεί σε θαλάσσια, όπως και σε χερσαία οικοσυστήματα. Έχει σφαιρικό ή σχετικά ελλειψοειδές σχήμα και το μέγεθός του κυττάρου κυμαίνεται μεταξύ 2-10 μm. Αισθητή είναι η απουσία μαστιγίου ή άλλης κινητικής δομής, που σημαίνει ότι το χλωροφύκος αυτό δεν έχει τη δυνατότητα ενεργητικής κίνησης. Από κυτταρικά γνωρίσματα αξίζει να επισημάνουμε ότι η *Chlorella vulgaris* διαθέτει ένα πολύ στιβαρό κυτταρικό τοίχωμα όταν ωριμάσει που κάνει τον οργανισμό ιδιαίτερα ανθεκτικό σε αντίξοες συνθήκες. Κάθε κύτταρο ενώ περιλαμβάνει αρκετά μιτοχόνδρια, έχει μονάχα έναν χλωροπλάστη που συχνά καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του κυτταροπλάσματος πράγμα που είναι ευδιάκριτο στο οπτικό μικροσκόπιο ακόμη και σε μικρή μεγέθυνση. Ο χλωροπλάστης περιβάλλεται από διπλή μεμβράνη ενώ ευδιάκριτη μπορεί να είναι και η δομή του πυρενοειδούς (pyrenoid) που υπάρχει σε ορισμένα μόνο είδη μικροφυκών. Το πυρενοειδές είναι μια δομή μέσα στο χλωροπλάστη η οποία περιβάλλεται από άμυλο και διάφορες πρωτεΐνες κι είναι γεμάτο με το ένζυμο RuBisCO. Εκεί παγιδεύεται ο ανόργανος άνθρακας υπό τη μορφή διαλυμένου CO_2 και HCO_3^- σε υψηλά επίπεδά και πραγματοποιείται η αφομοίωσή του. Η αποθήκευση της ενέργειας γίνεται υπό τη μορφή αμύλου μέσα στο χλωροπλάστη (Safi et al., 2014; Giordano et al., 2005). Μια σαφή εικόνα της *Chlorella vulgaris* δίνεται στις Εικόνες 2.1 - 2.2.



Εικόνα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση διατομής κυττάρου *Chlorella vulgaris* (αριστερά) (Safi et al., 2014).

Η *Chlorella vulgaris* είναι ένα ταχέως αναπτυσσόμενο και αναπαραγόμενο μικροφύκος που αναπαράγεται με μια διαδικασία που ονομάζεται αυτοσπορυλίωση (βλ. Εικόνα 2.3). Κατά τη διαδικασία αυτή στο μητρικό κύτταρο έχουμε τον ανεξάρτητο αλλά συγχρονισμένο διπλό διπλασιασμό του πυρήνα και του χλωροπλάστη έτσι ώστε τελικά να έχουμε

τέσσερα αντίγραφα από το κάθε μέρος. Στη συνέχεια, η κυτταρική μεμβράνη του μητρικού κυττάρου αρχίζει να εσωκλείει τα τέσσερα νέα κύτταρα που όταν ωριμάσουν σπάζουν το μητρικό κυτταρικό τοίχωμα κι απελευθερώνονται. Το κυτταρικό τοίχωμα ωριμάζει αφότου τα κύτταρα απελευθερωθούν ενώ παράλληλα τρέφονται με τα απομεινάρια του αρχικού κυττάρου. Όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές, η διαδικασία αυτή μπορεί να κρατήσει και λιγότερο από 24 ώρες (Yamamoto et al., 2004). Οι καλλιέργειες του μικροφύκους που επιλέξαμε, μπορούν να αναπτυχθούν με τρεις βασικούς τρόπους: καθαρά αυτότροφα που απαιτείται ο φωτισμός (η πηγή άνθρακα είναι ανόργανη - διοξείδιο του άνθρακα), καθαρά ετερότροφα που απαιτείται σκοτάδι (η πηγή άνθρακα είναι οργανική – συνήθως γλυκόζη) και μικτότροφα που απαιτείται φωτισμός (ταυτόχρονη παροχή ανόργανου και οργανικού άνθρακα). Όπως είναι φανερό, κάτι που επιβεβαιώνεται από μελέτες προηγούμενων ετών, η αυτότροφη καλλιέργεια προτιμάται καθώς είναι η πιο οικονομικά συμφέρουσα και αμέσως μετά η μικτότροφη καθώς δίνει τα μέγιστα αποτελέσματα στο συγκεκριμένο μικροφύκος (Safi et al., 2014).



Εικόνα 2.3 : Η αναπαραγωγή της *Chlorella vulgaris* με αυτοσπορυλίωση σε 7 διακριτούς χειρισμούς. 1) Differential interference, 2) Phase contrast, 3) SYBR Green I fluorescence, 4) Autofluorescence of chlorophyll, 5) Fluostain I fluorescence 6) 3+4+5 merged. DNA= πράσινο, κυτταρικό τοίχωμα= άσπρο, χλωροφύλλη= κόκκινο. (Yamamoto et al., 2004).

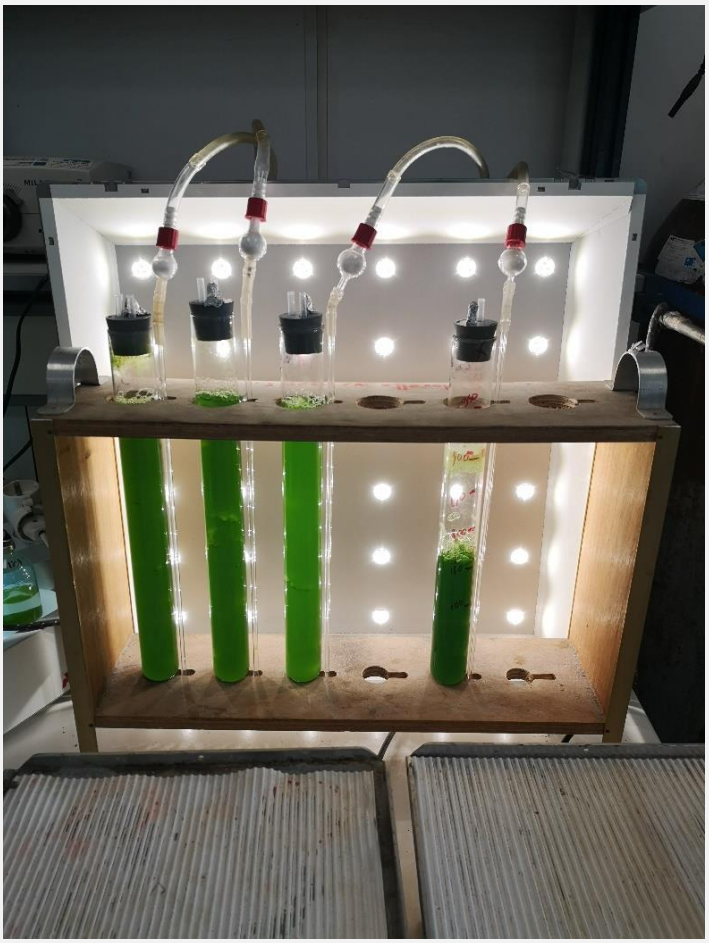
2.1.1 Συνθήκες καλλιέργειας του μικροφύκους

Η *Chlorella vulgaris* καλλιεργήθηκε σε στερεό θρεπτικό υλικό στο οποίο ακολουθήθηκε η συνταγή Bold Basal Medium (BBM) (Nicholds & Bold, 1965) με την προσθήκη 18g/L agar αφού είδαμε ότι συγκριτικά με άλλα θρεπτικά δίνει τα βέλτιστα αποτελέσματα (Wong et al., 2017).

Η συνταγή του θρεπτικού BBM που χρησιμοποιήσαμε είναι η εξής:

- **$NaNO_3$: 250 mg/L**
- **NaCl: 25 mg/L**
- **$MgSO_4$ $(H_2O)7$: 75 mg/L**
- **K_2HPO_4 $(H_2O)2$: 75 mg/L**
- **KH_2PO_4 $(H_2O)2$: 175 mg/L**
- **$CaCl_2$ $(H_2O)2$: 25 mg/L**
- **EDTA 50 mg/L**
- **KOH 31mg/L**
- **$FeSO_4$ $(H_2O)7$: 4,98 mg/L**
- **H_2SO_4 (97%): 1ml/L**
- **$MnCl_2$ $(H_2O)4$: 1,44mg/L**
- **$ZnSO_4$ $(H_2O)7$: 8,82mg/L**
- **Cu(II)SO_4 $(H_2O)5$: 1,57 mg/L**
- **MoO_3: 0,71 mg/L**
- **$Co(NO_3)_2$ $(H_2O)6$: 0,49 mg/L**

Η υγρή καλλιέργεια του μικροφύκους έγινε σε επιμήκεις γυάλινους σωλήνες (Ø 5cm X 50 cm) τύπου «σαξόφωνου». Τα «σαξόφωνα» έχουν ανοιχτό στόμιο στην πάνω μεριά (προστατευμένο με υδρόφοβο βαμβάκι) και με την βοήθεια μιας αντλίας μέσα από ένα σωληνάκι στο κάτω μέρος του σωλήνα, όπως αυτό που φαίνεται στην Εικόνα 2.4 υπάρχει συνεχής και σταθερή ροή αέρα (περίπου 50-60 L/h) επιτυγχάνοντας το βέλτιστο αερισμό και ανακάτεμα της καλλιέργειας. Ο αέρας αποστειρώνεται αφότου περάσει από ένα σύστημα φίλτρων 0.2μm τα οποία αλλάζονται τακτικά. Μια σειρά από σαξόφωνα τοποθετούνται σε ειδική βάση με σταθερή θερμοκρασία (25 ±1 °C) και φωτισμό (30-40 μmol m^{-2} s^{-1}). Τα κύτταρα αφήνονται να αναπτυχθούν συνήθως για περίπου 6 ημέρες σε σταθερές συνθήκες και στη συνέχεια απομονώνονται για τους πειραματικούς χειρισμούς.



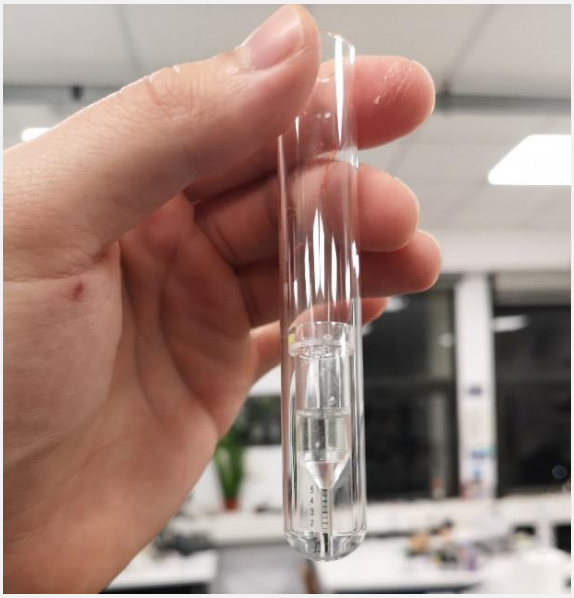
Εικόνα 2.4: Καλλιέργεια Chlorella vulgaris σε τρυβλίο (αριστερά). Υγρές καλλιέργειες σε «σαξόφωνα» (δεξιά). Με ανοιχτό πράσινο είναι νεαρές καλλιέργειες 4 ημερών ενώ ενδεικτικά αφέθηκε και μια παλαιότερη 8 ημερών σε πιο σκούρο πράσινο.

Όταν οι καλλιέργειες είναι έτοιμες, απομονώνονται τα κύτταρα με φυγοκέντριση και τοποθετούνται σε νέο αποστειρωμένο θρεπτικό, κλείνονται ερμητικά σε γυάλινα μπουκαλάκια των 120 ml και τοποθετούνται σε ειδικούς διαδρόμους ρυθμιζόμενης έντασης ακτινοβολίας και θερμοκρασίας όπως βλέπουμε στην Εικόνα 2.5. Σε αυτό το στάδιο ρυθμίζουμε τη βιομάζα με την οποία θα ξεκινήσουμε τα πειράματά μας έτσι ώστε να είναι σε όλα τα μπουκάλια η ίδια. Παράλληλα ρυθμίζουμε την αέρια φάση ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες του πειράματος. Σε όλους τους χειρισμούς ελέγχουμε τουλάχιστον τρεις φορές μέχρι τη λήξη του πειράματος (μια στην αρχή, μια στην μέση και μια στο τέλος) ένα μικρό δείγμα της καλλιέργειάς μας στο οπτικό μικροσκόπιο για να επιβεβαιώσουμε ότι όλες οι παραπάνω διαδικασίες λειτούργησαν άψογα κι ότι η καλλιέργειά μας δεν έχει μολυνθεί. Σε περίπτωση που υπάρχει έστω κι η παραμικρή υπόνοια ότι έχουμε μόλυνση στα μπουκαλάκια, τότε το πείραμα σταματάει και τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα απορρίπτονται.

Εικόνα 2.5: Μπουκαλάκια των 120 ml όπου τοποθετούνται οι καλλιέργειες και οι φωτεινοί «διάδρομοι» όπου πραγματοποιούνται οι πειραματικοί χειρισμοί σε σταθερές (ρυθμιζόμενες) συνθήκες θερμοκρασίας και έντασης ακτινοβολίας.

2.2 Εκτίμηση κυτταρικού όγκου (PCV)

Δείγματα του 1ml από τις καλλιέργειες του μικροφύκους αφού έχουν ληφθεί κάτω από στείρες συνθήκες φυγοκεντρούνται μέσα σε βαθμονομημένο τριχοειδή υαλοσωλήνα (Εικόνα 2.6) (TPP - Sigma Aldrich) για τουλάχιστον 5 λεπτά στα 1500 g, προκειμένου να καθιζήσουν τα κύτταρα (Logothetis et al., 2004). Η εκτίμηση της κυτταρικής συγκέντρωσης, παρουσιάζεται ως όγκος καθιζαμένων κυττάρων (Packed Cell Volume - PCV) ανά mL καλλιέργειας (μL PCV/mL καλλιέργειας). Η τεχνική αυτή αντικαθιστά την ζύγιση ξηρής μάζας (αδύνατη σε τόσο μικρούς όγκους) και τη μέτρηση της απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο (μερικώς λάνθασμένη καθώς το χρώμα της καλλιέργειας αλλάζει ανάλογα με τη φωτοσυνθετική κατάσταση κι όχι μόνο από την πυκνότητα των κυττάρων). Από κάθε χειρισμό μετριούνται τουλάχιστον 3 δείγματα και στη συνέχεια υπολογίζεται ο μέσος όρος με το τυπικό σφάλμα για αποφυγή πιθανού σφάλματος.



Εικόνα 2.6 : PCV tube πριν (αριστερά) και μετά από φυγοκέντρηση, όπου διαφαίνεται όγκος κυττάρων ίσος με 1μl PCV σε 500μl δείγματος (δεξιά).

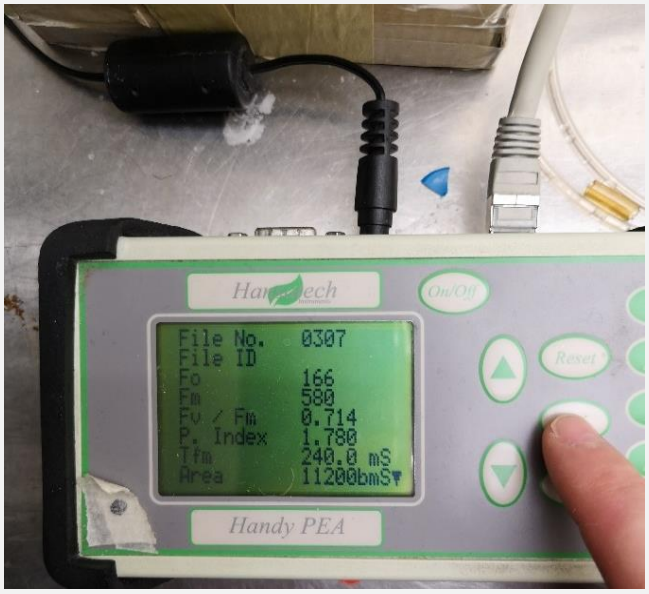
2.2.1 Μετατροπή μl PCV σε mg DW

Στον τομέα των μικροφυκών, η πλειοψηφία των εργαστηριακών ερευνητών χρησιμοποιεί ως μονάδα κυτταρικής ποσότητας τα mg ξηρού βάρους σε αντιδιαστολή με την εργασία μας όπου κρίναμε ορθότερη τη χρήση των μl πακεταρισμένων κυττάρων. Ωστόσο οφείλουμε να είμαστε σε θέση να συγκρίνουμε τα αποτελέσματά μας με την υπόλοιπη βιβιογραφία για αυτό και υπολογίσαμε την εξίσωση μετατροπής των μl PCV σε mg DW για την *Chlorella vulgaris* κάτω από φυσιολογικές συνθήκες καλλιέργειας (βλ. Ενότητα 2.Α). Αναλυτικότερα αφού συγκεντρώσαμε μεγάλη ποσότητα κυτταρικής καλλιέργειας την ομογενοποιήσαμε και μετρήσαμε σε τριπλέτα τα μl PCV . Έπειτα, συμπυκνώσαμε την καλλιέργειά μας με αλλεπάλληλες φυγκονετρήσεις στις 1500g για 10-15 λεπτά απορρίπτοντας κάθε φορά το υπερκείμενο και διατηρώντας το κυτταρικό ίζημα (Εικόνα 2.12). Έπειτα, το τοποθετήσαμε σε αφυγραντήρα στους 90 ^{o}C για 48 ώρες. Τέλος ζυγίσαμε ξανά και φτάσαμε στην εξίσωση: **mg DW = 4,9019607843 X (μl PCV) , R^2 = 0,98**

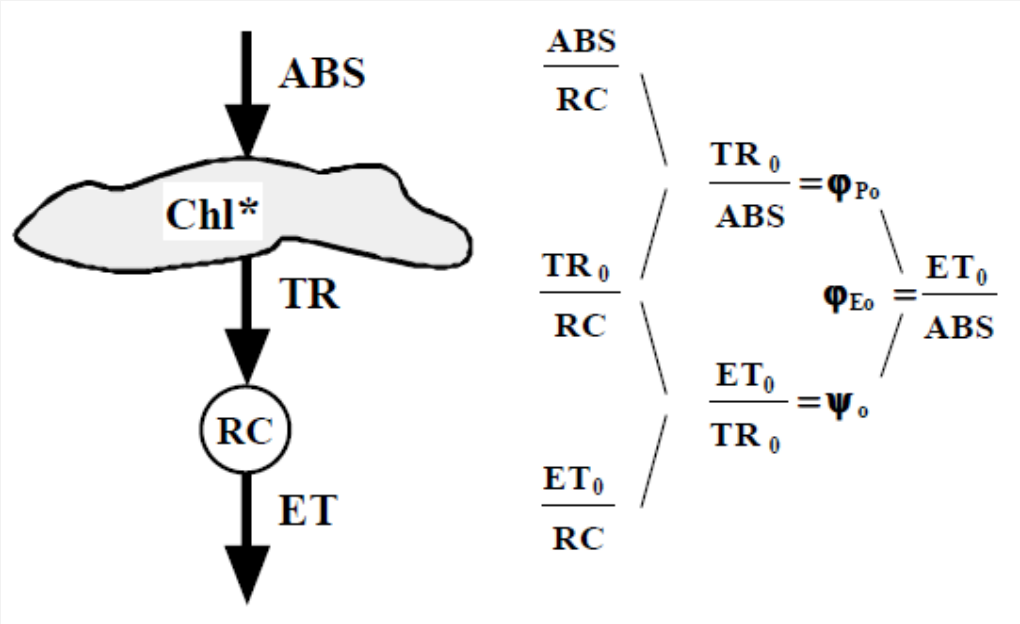
2.3 Καταγραφή της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού – Τεχνικές επαγωγικού φθορισμού (OJIP-test)

Για τη μέτρηση του επαγωγικού φθορισμού χρησιμοποιήθηκε το Handy Plant Efficiency Analyser, (Handy PEA, Hansatech Instruments, Εικόνα 2.7). Η συσκευή αυτή χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης μόνο ένα μέρος

της ενέργειας που απορροφάται από τις χρωστικές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού χρησιμοποιείται για τη φωτοχημεία της, ενώ το υπόλοιπο εκπέμπεται είτε ως θερμότητα είτε ως φθορισμός. Η διαδικασία της μέτρησης βασίζεται στο γεγονός ότι σε συνθήκες σκότους τα ενεργά κέντρα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού «αδειάζουν» από ηλεκτρόνια. Συνεπώς, όταν μετά το πέρας επαρκούς χρόνου που θα έχουν αδειάσει από ηλεκτρόνια βρεθούν σε κορεσμένο φωτονιακό περιβάλλον, τα επίπεδα φθορισμού μεταβαίνουν (στη διάρκεια ενός δευτερολέπτου) από ένα αρχικό επίπεδο (Fo) σε ένα μέγιστο επίπεδο (Fm) και έπειτα μειώνονται σταδιακά. Έτσι, μπορεί να εκτιμηθεί ο λόγος Fv/Fm, όπου Fv=Fm-Fo, ο οποίος σχετίζεται με τη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή (OJIP test, Strasser and Strasser, 1995) δίνει τη δυνατότητα μέτρησης και άλλων παραμέτρων που συνδέονται με τη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Εικόνα 2.8 α & β). Η μέτρηση του επαγωγικού φθορισμού πραγματοποιήθηκε αφού τα κύτταρα παρέμειναν στο σκοτάδι για 10 λεπτά, προκειμένου να αδειάσουν τα ενεργά κέντρα αντίδρασης και στη συνέχεια να γίνει η μέτρηση του OJIP Test (Strasser and Strasser, 1995). Οι μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού έγιναν με ανάλυση 10μs σε χρονικό διάστημα 1 δευτερολέπτου. Ο φθορισμός μετρήθηκε με 12-bit ανάλυση και η διέγερση έγινε από 3 διόδους φωτισμού (LEDs) με ένταση ακτινοβολίας 3000 μmol m^{-2} s^{-1} ερυθρού φωτός (650nm). Η επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από τις μετρήσεις έγινε με το λογισμικό Biolyser HP 4.0, σύμφωνα με τους Strasser and Strasser (1995).



Εικόνα **2.7 :** Handy PEA, το όργανο μέτρηση φωτοσυνθετικής δραστηριότητας με τεχνικές επαγωγικού φθορισμού (HansatechTM Instruments)



Εικόνα 2.8: Απλοποιημένη σχηματική αναπαράσταση της ενεργειακής ροής γύρω από ένα φωτοσύστημα II καθώς και των βασικών παραμέτρων του OJIP test που απορρέουν (Strasser et al., 2004)

Πίνακας 1: Βασικές παράμετροι του OJIP-test.

Μεταβλητή OJIP καμπύλης	
F_t	Τιμή φθορισμού σε χρόνο t μετά την ακτινοβόληση.
$F_{50\mu s}$	Ένταση φθορισμού στα 50 μs.
$F_{300\mu s}$	Ένταση φθορισμού στα 300 μs.
F_J	Ένταση φθορισμού στο βήμα J (2 ms) της καμπύλης OJIP.
FI	Ένταση φθορισμού στο βήμα I (30 ms) της καμπύλης OJIP.
F_P	Μέγιστη ένταση φθορισμού στο P της καμπύλης OJIP. $F_P = F_m$.
t_{Fm}	Χρόνος σε (ms) που απαιτείται για να μεγιστοποιηθεί η ένταση του φθορισμού F_m.
Area	Συνολική συμπληρωματική περιοχή ανάμεσα στην καμπύλη OJIP και την ευθεία που διέρχεται από το $F = F_m$.
Παράμετροι JIP-test	
F_0	Ελάχιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί σε «ανοιχτά» κέντρα (open PSII RCs, t = 0).
F_m	Μέγιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί στο χρόνο όπου όλα τα κέντρα είναι «κλειστά» (κλειστά PSII RCs, $t = t_{Fm}$).
F_v	Μεταβλητή τιμή φθορισμού τη χρονική στιγμή t.
$F_v = F_m - F_0$	Μέγιστη τιμή μεταβλητής τιμής φθορισμού.
V_t	Σχετική μεταβολή φθορισμού τη χρονική στιγμή t.$V_t = (F_t - F_0)(F_m - F_0)$
V_j	Σχετική μεταβολή φθορισμού στο βήμα J (2 ms). $V_j = (F_j - F_0)(F_m - F_0)$
V_I	Σχετική μεταβολή φθορισμού στο βήμα I (30 ms). $V_I = (F_I - F_0)(F_m - F_0)$
M_0	Αρχική κλίση σε ms της καμπύλης V = f(t). Αποτελεί μέτρο του

	ρυθμού της πρωτογενούς φωτοχημείας. $M_0 = (\Delta V/\Delta t)_0 = 4(F_{300\mu}-F_0)/(F_m - F_0)$
$S_m = (Area)/(F_m - F_0)$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης OJIP (Area), κανονικοποιημένο ως προς F_v (αποτελεί μέτρο του αριθμού των οξειδοαναγωγικών κύκλων της Q_A).
$S_s = V_j/M_0$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης OJIP που αντιστοιχεί μόνο στην OJ φάση (διάστημα όπου η Q_A των RC ανάγεται μία φορά). $S_m = (Area)/(F_m - F_0)$
N	Μέτρο αριθμού κύκλων αναγωγής της Q_A στο διάστημα t_{Fm}. $N = S_m/S_s = S_m M_0(1/V_j)$
Ειδικές ροές ενέργειας (ανά κέντρο που ανάγει Q_A)	
ABS/RC	Δραστικό μέγεθος της φωτοσυνθετικής κεραίας ενός ενεργού κέντρου (RC). Εκφράζει το συνολικό αριθμό φωτονίων που απορροφούνται από τα μόρια χλωροφύλλης όλων των RCs διαιρούμενο δια τον ολικό αριθμό των ενεργών RCs. ABS/RC = $(M_0/V_j)/\Phi_{P0}$
TR_0/RC	Μέγιστος ρυθμός παγίδευσης του PSII. Περιγράφει το μέγιστο ρυθμό με τον οποίο μια διέγερση παγιδεύεται από το RC. Πρόκειται για την ενέργεια που παγιδεύεται ανά κέντρο αντίδρασης (t = 0). $TR_0/RC = M_0(1/V_J)$
ET_0/RC	Ροή ηλεκτρονίων ανά κέντρο αντίδρασης (t = 0). $ET_0/RC=M_0(1/V_J)*\Psi_{Eo}$
DI_0/RC	Η μη φωτοχημικά διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης (t=0). $DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)$
Αποδόσεις ή λόγοι επιμέρους ροών	
Φ_{Po} or TR_0/ABS	Πιθανότητα παγίδευσης ή μέγιστη κβαντική απόδοση της πρωτογενούς φωτοχημείας (t = 0). Εκφράζει την πιθανότητα ένα απορροφημένο φωτόνιο να παγιδευτεί από το ενεργό κέντρο του PSII. $\Phi_{Po} = (F_m - F_0)/F_m$
Ψ_{Eo} or ET_0/TR_0	Πιθανότητα ένα φωτόνιο που έχει παγιδευτεί από το PSII να μεταφερθεί από την Q_A^- στην PQ (t = 0). $\Psi_{Eo} = 1 - V_J$
Φ_{Eo} or ET_0/ABS	Κβαντική απόδοση της μεταφοράς ηλεκτρονίων (t = 0). $\Phi_{Eo} = [1 -(F_0/F_M)] * \Psi_{Eo}$
Φ_{Do} or DI_0/ABS	Κβαντική απόδοση της διάχυσης της ενέργειας (t = 0). $\Phi_{Do} = 1 - \Phi_{Po} = F_0/F_m$
$\Phi_{Ro} = RE_0/ABS$	Κβαντική απόδοση ενός ηλεκτρονίου που φθάνει στον αποδέκτη. $\Phi_{Ro} = 1 - F_I/F_m$
$\delta_{Ro} = RE_0/ET_0$	Η πιθανότητα ένα ηλεκτρόνιο να μεταφερθεί από την ανηγμένη PQ στην πλευρά του PSI που αποτελεί το δέκτη ηλεκτρονίων. $\delta_{Ro} = (1 - V_I)/(1- V_j) = (F_m - F_I)/(F_m - F_j)$
Εκτιμώμενες ροές ενέργειας ανά διεγερμένη περιοχή	
ABS/CS	Απορρόφηση ενέργειας ανά διατομή (CS). ABS/CS = περιεχόμενο χλωροφύλλης
ABS/CS_0	Απορρόφηση ενέργειας ανά διεγερμένη διατομή με βάση το F_o
ABS/CS_m	Απορρόφηση ενέργειας ανά διεγερμένη διατομή βάση το F_m.
TR/CS	Παγίδευση ανά διατομή.
$TR_0/CS_0 = \Phi_{P0}(ABS/CS_0)$	Παγιδευμένη ενέργεια ανά διατομή του PSII (για t = 0).
ET/CS	Ροή ηλεκτρονίων ανά διατομή.

	$ET_0/CS_0 = (ABS/CS_0)$
DI/CS	Διαχεόμενη ενέργεια ανά διατομή. $DI_0/CS_0 = (ABS/CS_0) - (TR_0/CS_0)$
Πυκνότητα κέντρων αντίδρασης	
RC/CS_0	Δίνει τον αριθμό ενεργών κέντρων RCs προς ένα ανενεργό RC για μία διατομή του PSII.
Δείκτες επίδοσης	
$PI_{ABS} = (RC/ABS)(\Phi_{P0}/1-\Phi_{P0})(\Psi_0/1-\Psi_0)$	Επιδόσεις ανά απορροφώμενη ενέργεια. Η παράμετρος PI συνδυάζει τρεις παραμέτρους ευνοϊκές για την φωτοσυνθετική δραστηριότητα: την πυκνότητα των κέντρων αντίδρασης, την κβαντική απόδοση της πρωτογενούς φωτοχημείας και την ικανότητα για τροφοδοσία ηλεκτρονίων στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ PSII και PSI. $PI_{ABS} = (RC/ABS)\ [\Phi_{Po}/(1 - \Phi_{Po})]\ [\Psi_0/(1 - \Phi_{Po})]$
PI_{CS0}	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης (t = 0). $PI_{CS0} = (RC/CS_0)(\Phi_{P0}/1-\Phi_{P0})(\Psi_0/1-\Psi_0)$
$PI_{CSm} =(RC/CS_m)(\Phi_{P0}/1-\Phi_{P0})(\Psi_0/1-\Psi_0)$	Επιδόσεις ανά διατομή ($t = t_{Fm}$)
$SFI_{ABS} =(1-\Phi_{P0})(1-\Psi_0)$	Δείκτης λειτουργικότητας και δομής του PSII.

2.4 Αέρια χρωματογραφία θερμικής αγωγιμότητας (GC-TCD)

Για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του υδρογόνου, του οξυγόνου και του αζώτου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αέριας χρωματογραφίας θερμικής αγωγιμότητα ή όπως είναι κοινώς γνωστή ως GC-TCD (Gas Chromatography – Thermal Conductivity Detection, Shimadzu GC 2010 Plus, Εικόνα 2.9) με φέρον αέριο αργό υπό πίεση 5 bar. Πραγματοποιήθηκε εισαγωγή 250 μL αέριου δείγματος στην GC-TCD με ειδική gas tight σύριγγα, όπου και ο διαχωρισμός των αερίων (H_2, O_2 και N_2) έγινε με βάση τη διαφορά στη θερμική αγωγιμότητα των αερίων. Η θερμική αγωγιμότητα του αργού είναι 0.0001772 W/cmK, του αζώτου 0.0002598 W/cmK, του οξυγόνου 0.0002674 W/cmK και του υδρογόνου 0.001815 W/cmK. Για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε μια τριχοειδής στήλη μεγάλου μήκους (Ø 5Å), ενώ η θερμοκρασία του TCD ανιχνευτή ήταν 200°C, του φούρνου 120°C, και του σημείου εισόδου της ένεσης ήταν 180°C. Η ποσοτικοποίηση των αερίων έγινε με καμπύλες αναφοράς που σχηματίστηκαν με βάση γνωστές συγκεντρώσεις.

Η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των τριών αερίων που έγινε με βάση τις καμπύλες αναφοράς δίνεται από τις παρακάτω εξισώσεις:

- **H_2(%) = 0.0000001373*εμβαδόν 1ης κορυφής, R^2 = 0.975**
- **O_2(%) = 0.0000009649*εμβαδόν 2ης κορυφής, R^2 = 0.998**
- **N_2(%) = 0.0000012047 *εμβαδόν 3ης κορυφής, R^2 = 0.998**

Εικόνα 2.9: Αεριοχρωματογράφος Shimadzu GC 2010 Plus με τον ηλεκτρονικό του υπολογιστή κι ένα χρωματογράφημα με μετρήσεις αερίων υδρογόνου, οξυγόνου κι αζώτου.

2.5 Μετρήσεις φωτοσυνθετικής και αναπνευστικής δραστηριότητας

Για τις μετρήσεις της φωτοσυνθετικής και της αναπνευστικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες όλων των χειρισμών στο φως και στο σκοτάδι για ένα 24ωρο και μετρήθηκε με τη μέθοδο της αεριοχρωματογραφίας θερμικής αγωγιμότητας (GC-TCD) ο ρυθμός παραγωγής O_2 στις εκάστοτε φωτεινές συνθήκες (φωτοσυνθετική δραστηριότητα) και ο ρυθμός κατανάλωσης O_2 στο σκοτάδι (αναπνευστική δραστηριότητα) εκφρασμένος σε **μl O_2.h^{-1}.μl PCV^{-1}**.

2.6 Εκχύλιση και ποσοτικοποίηση χλωροφυλλών a & b και καροτενοειδών

Στην εκχύλιση των ολικών χρωστικών (χλωροφύλλες a & b και ολικά καροτενοειδή) επιλέξαμε τη μέθοδο εκχύλισης με θερμή μεθανόλης (Papazi et al., 2017). Πιο αναλυτικά, απομονώσαμε 2,5 μl πακεταρισμένων κυττάρων με φυγοκέντριση στις 1500g για 10 λεπτά από κάθε δείγμα. Στη συνέχεια, διαλύσαμε την κυτταρική πελέτα σε 2ml 100% μεθανόλη στους 70° C χρησιμοποιώντας vortex . Επωάσαμε τα δείγματά μας σε water bath που αγγίζει τους 70° C για 10 λεπτά. Έπειτα φυγοκεντρήσαμε ξανά για 5 λεπτά στις 1500g. Το καταπράσινο υπερκείμενο είναι το εκχύλισμα των χρωστικών ενώ τα κυτταρικά θραύσματα

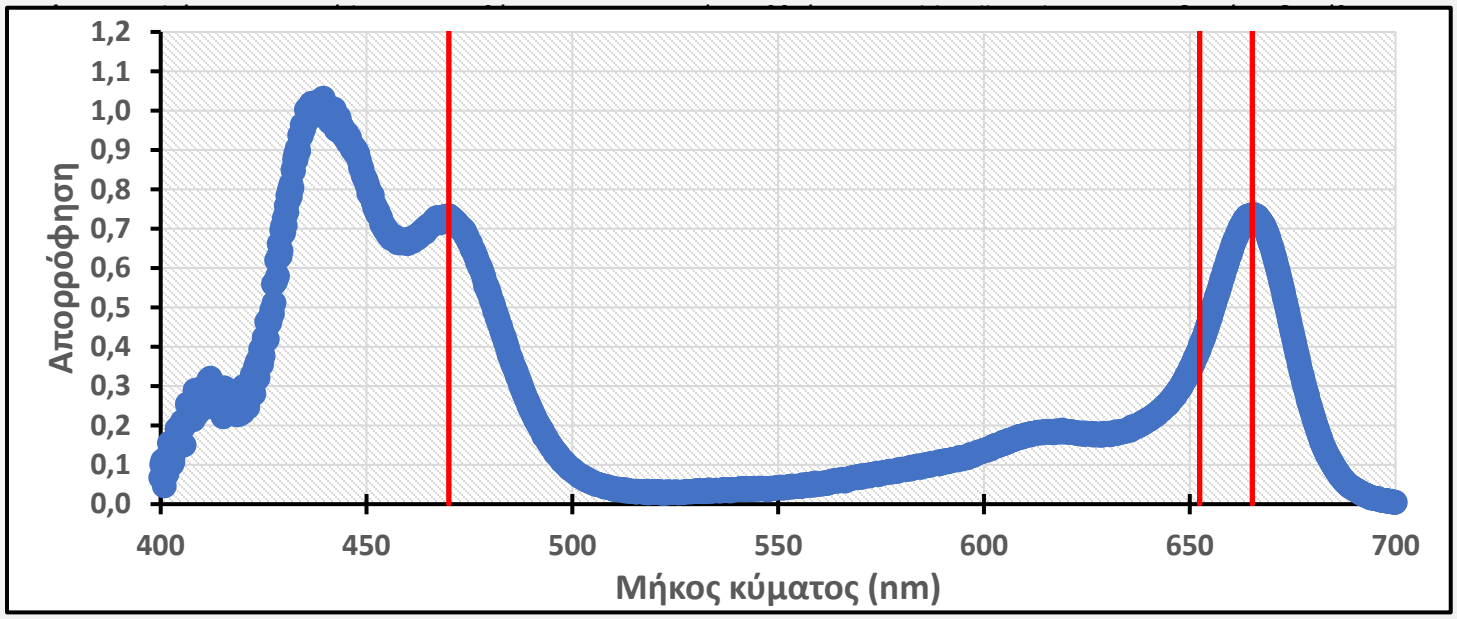
κατακρημνίζονται και απορρίπτονται. Εάν η πελέτα δεν έχει αποχρωματιστεί πλήρως επαναλαμβάνουμε την ίδια διαδικασία μέχρι να γίνει λευκή. Όλες οι διαδικασίες έγιναν σε σφραγισμένους θερμοανθεκτικούς γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες για να αποφευχθεί η εξάτμιση του οργανικού διαλύτη και να μην αλλάξει ο τελικός όγκος του δείγματος. Οι φασματομετρικές εξισώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των χρωστικών ήταν σύμφωνα με την μέθοδο των Lichtenthalet & Buschmann, 2001:

Για τη χλωροφύλλη a και τη χλωροφύλλη b και τις ολικές χλωροφύλλες αντίστοιχα:

Chl a (μg/ml) = 16.72 X A(665.2) – 9.16 X A(652.4)
Chl b (μg/ml) = 34.09 X A(652.4) – 15.28 X A(665.2)
Total chlorophylls (μg/ml) = Chl a + Chl b

Για τα ολικά καροτενοειδή:

Carotenoids (μg/ml) = (1000 X A(470) – 1.63 X [Chl a] – 104.96 X [Chl b]) / 221



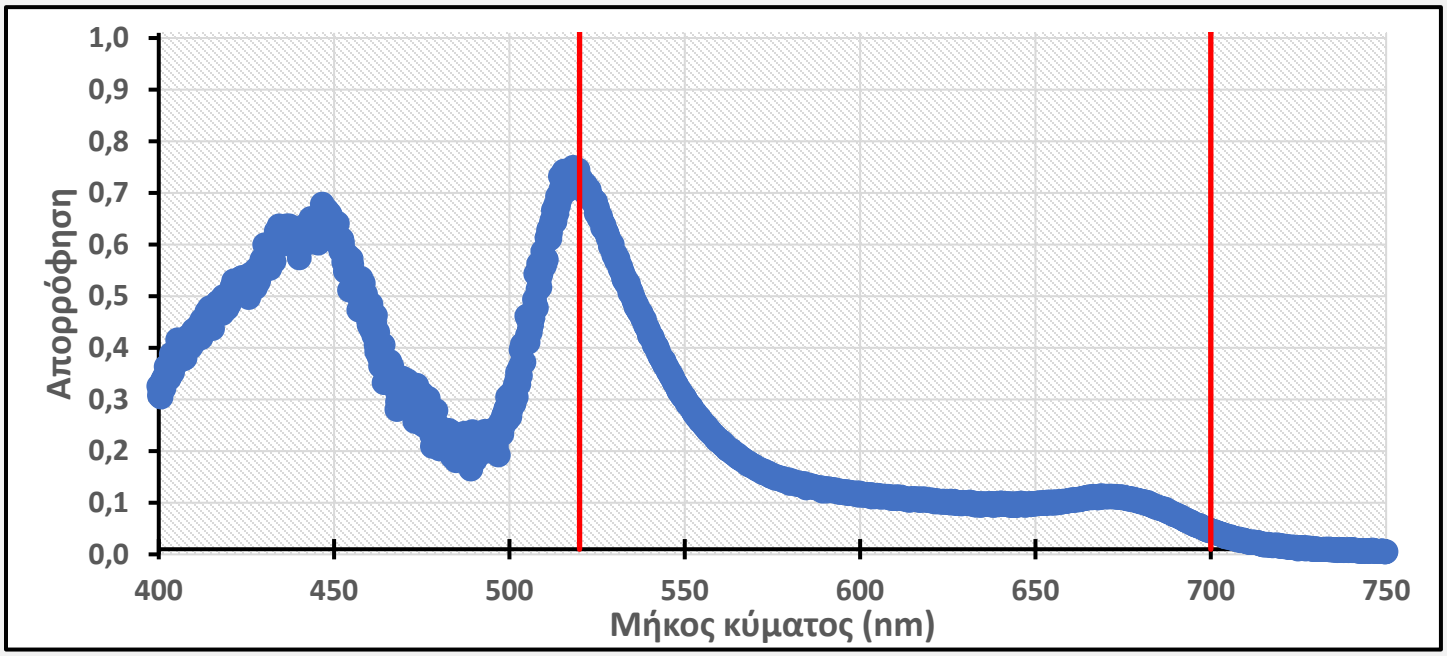
Εικόνα 2.10 : Φάσμα απορρόφησης εκχυλίσματος χρωστικών καλλιέργειας *Chlorella vulgaris* σε καθαρή μεθανόλη με τα μήκη κύματος 470nm, 652.4nm και 665.2nm από την εξίσωση ποσοτικοποίησης να τονίζονται με κόκκινο χρώμα.

2.6 Εκχύλιση και ποσοτικοποίηση υδατανθράκων

Για την εκχύλιση των υδατανθράκων και την ακριβή ποσοτικοποίησή τους χρησιμοποιήθηκε, με μικρές τροποποιήσεις, το πρωτόκολλο των Schulze et al., 2016 το οποίο βασίζεται στην όξινη υδρόλυση των κυττάρων με υδροχλωρικό οξύ και την ποσοτικοποίησή των ολικών σακχάρων με το αντιδραστήριο TSA (Thymol-Sulfuric Acid) σύμφωνα με τον Gröger, 1961. Για αρχή απομονώνουμε 2.5 μl πακεταρισμένων κυττάρων με φυγοκέντρηση στις 1500g για 10 λεπτά. Έπειτα διαλυτοποιούμε την κυτταρική πελέτα σε 1 ml HCl 37% με χρήση vortex και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου

για 30 λεπτά. Στη συνέχεια αραιώνουμε με την προσθήκη 5 ml διπλά απιονισμένου νερού (ddH_2O). Λίγες ημέρες πριν την διαδικασία ποσοτικοποίησης έχουμε φτιάξει το αντιδραστήριο TSA το οποίο αποτελείται από 100 ml θειικού οξέος (H_2SO_4) 99,99% και 0,1 g θυμόλης ($C_{10}H_{14}O$) και το έχουμε τοποθετήσει σε ένα μη διαφανές δοχείο μιας και είναι φωτοευαίσθητο. Σε ένα γυάλινο δοκιμαστικό τοποθετούμε 900 μl TSA και 400 μl από το δείγμα μας. Σφραγίζουμε και ανακατεύουμε καλά χρησιμοποιώντας vortex και στη συνέχεια επωάζουμε για 30 λεπτά σε water bath με βραστό νερό (100°C). Τέλος, ψύχουμε τα δείγματα μας σε θερμοκρασία δωματίου. Στο φασματοφωτόμετρο μηδενίζουμε με blank 900 μl TSA ,330 μl ddH_2O και 70 μl HCl και στη συνέχεια μετράμε την απορρόφηση στα 520nm και τα 700nm.Ο τύπος υπολογισμού της ποσότητας των ολικών υδατανθράκων όπως προέκυψε από καμπύλη ποσοτικοποίησης με γλυκόζη είναι :

Carbohydrates (μg/ml) = 103,235 X (A520 – A700), R^2 = 0,997



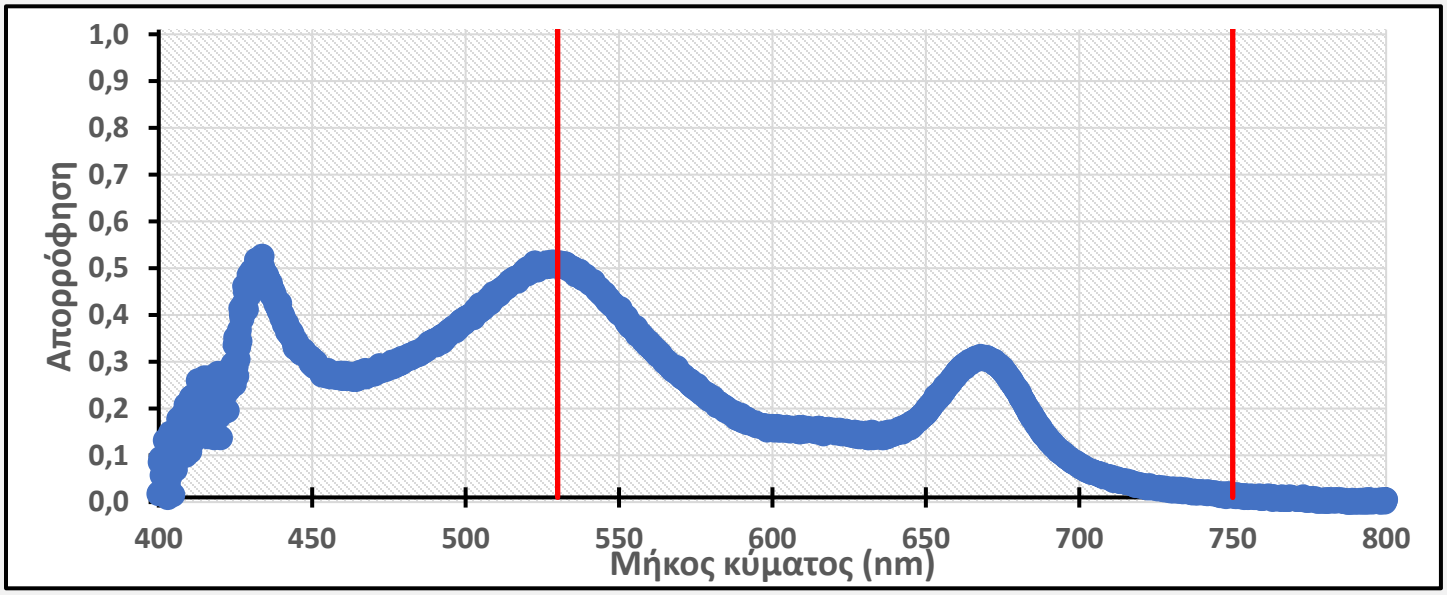
Εικόνα 2.11: Φάσμα απορρόφησης εκχυλίσματος ολικών υδατανθράκων καλλιέργειας *Chlorella vulgaris* σε αντιδραστήριο TSA με τα μήκη κύματος 520nm και 700nm από την εξίσωση ποσοτικοποίησης να τονίζονται με κόκκινο χρώμα.

2.7 Εκχύλιση και ποσοτικοποίηση λιπιδίων

Για την εκχύλιση των λιπαρών και την ακριβή ποσοτικοποίησή τους χρησιμοποιήθηκε, με μικρές τροποποιήσεις, το πρωτόκολλο των Sati et al., 2019 το οποίο βασίζεται στη μέθοδο του Folch & Stanley, 1957 και την ποσοτικοποίησή των ολικών σακχάρων με το αντιδραστήριο SPV (Sulpho-Phospho-Vanillin) σύμφωνα με τον Park & Jeong, 2016. Για αρχή, απομονώνουμε 2.5 μl πακεταρισμένων κυττάρων με φυγοκέντρηση στα 1500g για 10 λεπτά. Έπειτα διαλυτοποιούμε με χρήση vortex την κυτταρική πελέτα σε μείγμα 2:1 χλωροφορμίου ($CHCl_3$) – μεθανόλης (CH_3OH) τελικού όγκου 3ml.

Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και στη συνέχεια προσθέτουμε 1ml διαλύματος NaCl 0,74%. Φυγοκεντρούμε στα 1500g για 10 λεπτά έτσι ώστε να παρατηρήσουμε διαχωρισμό φάσεων. Τα λιπαρά βρίσκονται διαλυμένα στην κατώτερη φάση του χλωροφορμίου την οποία και απομονώνουμε. Στη συνέχεια θερμαίνουμε το δείγμα μας στους 90°C μέχρι να εξατμιστεί εντελώς το χλωροφόρμιο κι έχουμε απομονώσει τα λιπαρά. Στη συνέχεια επαναδιαλυτοποιούμε τα λιπαρά μας σε 100μl θειικού οξέος (H_2SO_4) 99,99% και επωάζουμε για 10 λεπτά στους 90°C. Ψύχουμε τα δείγματά μας σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια προσθέτουμε 2 ml από το αντιδραστήριο Φωσφοβανιλλίνης. Το αντιδραστήριο αυτό αποτελείται από 500ml φωσφορικού οξέος (H_3PO_4) 85%, 125ml ddH_2O και 0,75g βανιλλίνης ($C_8H_8O_3$). Επωάζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, απουσία έντονου φωτισμού και μετράμε την απορρόφηση στα 530nm και στα 750nm. Στο φασματοφωτόμετρο μηδενίζουμε με blank 100μl H_2SO_4 και 2 ml Φωσφοβανιλλίνης αφού περάσουν και τις 2 διαδικασίες επώασης. Ο τύπος υπολογισμού της ποσότητας των ολικών λιπαρών όπως προέκυψε από καμπύλη ποσοτικοποίησης με λάδι κανόλας είναι :

Lipids (μg) = 78,267 X (A530 – A750), R^2 = 0,998



Εικόνα 2.12: Φάσμα απορρόφησης εκχυλίσματος ολικών λιπιδίων καλλιέργειας *Chlorella vulgaris* σε αντιδραστήριο SPV με τα μήκη κύματος 530nm και 750nm από την εξίσωση ποσοτικοποίησης να τονίζονται με κόκκινο χρώμα.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της πειραματικής προσέγγισης της παρούσας εργασίας διερευνήσαμε διαφορετικές εντάσεις ακτινοβολίας και ποσοστώσεις CO_2 για καθαρά αυτότροφες καλλιέργειες του χλωροφύκους *Chlorella vulgaris* έτσι ώστε να προσδιορίσουμε την βέλτιστη αφομοίωση CO_2 προς τη παραγωγή βιομάζας. Σε κάθε μεταχείριση καταγράφουμε την πορεία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των κυττάρων καθημερινά με OJIP test, ενώ την 1η, τη 2η, την 4η και την 6η ημέρα ,μετρήσαμε τις ποσοστώσεις των αερίων με GC-TCD ενώ παράλληλα την 3η και την 6η ημέρα μετρήσαμε τη μεταβολή της βιομάζας με την τεχνική των PCV- tubes. Πιο συγκεκριμένα, από εντάσεις φωτισμού επιλέξαμε να δοκιμάσουμε:

- **0 μmol m^{-2} s^{-1} PAR (απόλυτο σκοτάδι)**
- **10 μmol (± 5) m^{-2} s^{-1} PAR (πολύ χαμηλός φωτισμός)**
- **50 μmol (± 10) m^{-2} s^{-1} PAR (χαμηλός φωτισμός)**
- **100 μmol (± 20) m^{-2} s^{-1} PAR (μέτριος φωτισμός)**
- **200 μmol (± 30) m^{-2} s^{-1} PAR (υψηλός φωτισμός)**
- **400 μmol (± 40) m^{-2} s^{-1} PAR (πολύ υψηλός φωτισμός)**

Ταυτόχρονα, δοκιμάσαμε ποικιλία συγκεντρώσεων CO_2 οι οποίες ξεκινούν με τη συγκέντρωση στην ατμόσφαιρα και αγγίζουν μέχρι και 1.500 φορές υψηλότερες τιμές από αυτήν. Πιο συγκεκριμένα, δοκιμάσαμε:

- **0.04% (± 0,2%) CO_2 (ατμόσφαιρα) – 1 x ατμοσφαιρικό CO_2 = 0,028 ml (± 0,14 ml) στο δοχείο**
- **1% (± 0,2%)CO_2 (υπόλοιπο ατμόσφαιρα) – 25 x ατμοσφαιρικό CO_2 = 0,7 ml (± 0,14 ml) στο δοχείο**
- **5% (± 1%) CO_2 (υπόλοιπο ατμόσφαιρα) – 125 x ατμοσφαιρικό CO_2 = 3,5 ml (± 0,7 ml) στο δοχείο**
- **10% (±1%) CO_2 (υπόλοιπο ατμόσφαιρα) –250 x ατμοσφαιρικό CO_2 = 7 ml (± 0,7 ml) στο δοχείο**
- **15% (± 2%) CO_2 (υπόλοιπο ατμόσφαιρα)–375 x ατμοσφαιρικό CO_2 = 10,5 ml (± 1,4 ml) στο δοχείο**
- **20% (± 2%) CO_2 (υπόλοιπο ατμόσφαιρα)–500 x ατμοσφαιρικό CO_2 = 14 ml (± 1,4 ml) στο δοχείο**
- **30% (έως -4%) CO_2 (υπόλοιπο ατμόσφαιρα)–750 x ατμοσφαιρικό CO_2 = 21 ml (έως - 2,8 ml) στο δοχείο**
- **40% (έως -4%) CO_2 (υπόλοιπο ατμόσφαιρα)–1000 x ατμοσφαιρικό CO_2 = 28 ml (έως - 2,8 ml) στο δοχείο**
- **60% (± 4%) CO_2 (υπόλοιπο ατμόσφαιρα)–1500 x ατμοσφαιρικό CO_2 = 42 ml (± 2,8 ml) στο δοχείο**

Επιλέξαμε μπουκάλια των 120ml με 50ml υγρή και 70ml αέρια φάση. Αποφασίσαμε να φέρνουμε τα κύτταρά μας σε μια πολύ καλή αρχική φωτοσυνθετική κατάσταση έτσι ώστε να έχουμε άριστη φωτοσυνθετική απόδοση (Fv/Fm: 0,6-0,7), ενώ ταυτόχρονα να αφήνουμε περιθώριο ανόδου στα κύτταρα όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές. Επίσης εδώ πρέπει να αναφέρουμε ότι εφαρμόσαμε κύκλο φωτοπεριόδου 16:8 ωρών αφού

διαπιστώσαμε πειραματικά ότι ο οργανισμός μας δεν μπορεί να ανταποκριθεί αποδοτικά σε συνεχές φως ανεξαρτήτου έντασης και χρειάζεται απαραίτητα σκοτάδι. Έτσι πλησιάζουμε όσο το δυνατόν πιο κοντά σε ρεαλιστικές συνθήκες καλλιέργειας. Οι μετρήσεις μας γίνονται αυστηρά κάθε φορά στη μέση της φωτοπεριόδου, καθώς ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός αλλάζει κατά τη διάρκεια του «τεχνητού» κύκλου ημέρας – νύχτας. Αφού είδαμε την πορεία ανάπτυξης των κυττάρων σε συνθήκες ανοικτής καλλιέργειας (συνεχής παροχή CO_2) και τη συσχέτισή τους με τη φωτοσυνθετική απόδοση αποφασίσαμε να ξεκινήσουμε τα πειράματά μας με καλλιέργειες που έχουν 1 μl πακεταρισμένα κύτταρα ανά 1 ml καλλιέργειας (1 μl PCV/ml) και να διαρκούν 6 ημέρες. Έτσι λαμβάνουν όλα τα κύτταρα τον ίδιο φωτισμό και η πυκνότητα των κυττάρων επιτρέπει περαιτέρω ανάπτυξη χωρίς πρόβλημα ενώ ο παράγοντας έλλειψης θρεπτικών δεν θα είναι πρόβλημα μέχρι τέλους. Η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή τόσο στη φάση της ανοικτής καλλιέργειας όσο και της κλειστής καλλιέργειας στους 25±1 ^{o}C. Το σύνολο των μετρήσεων έγινε στην ίδια θερμοκρασία για να μην υπάρξει θερμοκρασιακό «στρες» στα κύτταρα μας. Το pH με το οποίο ξεκινήσαμε ήταν το pH του θρεπτικού BBM αμέσως μετά τον κλιβανισμό δηλαδή 6,8±0,1 στο οποίο έχουμε δει ότι μεγαλώνει εξαιρετικά το συγκεκριμένο μικροφύκος. Μετρήθηκε το αρχικό pH κάθε μεταχείρισης CO_2 για να επιβεβαιώσουμε πως τυχόν διαφορές στην απόδοση του μικροφύκους δεν οφείλονται σε απότομη οξίνιση. Η πτώση δεν ξεπέρασε σε καμία περίπτωση τις 2 μονάδες κι ήταν ανάλογη της ποσόστωσης CO_2. Κάθε μεταχείριση επαναλήφθηκε τουλάχιστον 3 φορές και παρακάτω παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των επαναλήψεων μαζί με τα τυπικά σφάλματα για να μπορούμε να έχουμε μια κατανοητή και επαρκώς τεκμηριωμένη όψη των πραγμάτων. Τα πειράματα έγιναν σε ομάδες ανάλογα με το φωτισμό όπως ακριβώς θα παρουσιαστούν παρακάτω ενώ *in situ* έγιναν OJIP test, μετρήσεις GC-TCD, μέτρηση PCV. Τα μπουκαλάκια παρέμειναν σφραγισμένα κατά τη διάρκεια όλων των πειραματικών χειρισμών, ενώ την 3^{η} και 6^{η} μέρα ελήφθησαν δείγματα για τους τελευταίους δύο τύπους μετρήσεων. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν, απομονώθηκαν και καταψύχθηκαν και παρέμειναν στους -80 ^{o}C έως την πραγματοποίηση των βιοχημικών αναλύσεων που αφορούν την ποσοτική εκτίμηση των χρωστικών (χλωροφύλλη α &β, καροτενοειδή), πρωτεϊνών, υδατανθράκων και λιπαρών.

3.1 Ανάπτυξη μικροφυκών σε απόλυτο σκοτάδι

Η πρώτη πειραματική προσέγγιση αφορούσε στην επώαση των μικροφυκών σε απόλυτο σκοτάδι για να για να ελεγχθεί η απόκριση του φωτοσυνθετικού τους μηχανισμού. Επιλέξαμε να ελέγξουμε όλες τις συγκεντρώσεις CO_2 παρόλο που δεν μπορεί να αξιοποιηθεί σε καμία άλλη βιοχημική διαδικασία πέραν του κύκλου του Calvin της φωτοσύνθεσης. Λόγω σκοταδιού ο κύκλος αυτός δε λειτουργεί ωστόσο ελέγχουμε τυχόν «στρες» που ίσως δημιουργεί το CO_2 στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό του μικροφύκους. Τα κύτταρα της καλλιέργειας αφέθηκαν χωρίς καμία πηγή ενέργειας (η

φωτοσύνθεση δε λειτουργεί και δεν υπάρχει οργανικός άνθρακας στο θρεπτικό) πέραν των εσωτερικών τους αποθεμάτων. Στην Εικόνα 3.1, όπου παρουσιάζεται η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση (Fv/Fm), βλέπουμε ότι η καλλιέργειά μας ξεκινάει με μια πολύ καλή φωτοσυνθετική απόδοση γύρω στο 0,71. Παρατηρούμε ότι κάτω από την παντελή απουσία φωτισμού, όλες οι μεταχειρίσεις δείχνουν πτωτική τάση ως προς την μέγιστη φωτοσυνθετική τους απόδοσης κάτι που αυξάνεται όσο αυξάνεται και η συγκέντρωση του CO_2. Η ατμοσφαιρική συγκέντρωση CO_2 σημειώνει τη μικρότερη πτώση της παραμέτρου Fv/Fm, φτάνοντας την $6^{η}$ ημέρα γύρω στο 0,7 ακολουθούμενη από την αμέσως επόμενη συγκέντρωση του 1% CO_2 που καταλήγει στο 0,69. Έπειτα έρχεται το 5% CO_2 με 0,67 ενώ μετά ακολουθεί το 10% CO_2 με αρκετά μεγάλη πτώση στο 0,59. Τέλος έχουμε τις συγκεντρώσεις 15% CO_2 έως 60% CO_2 όπου το Fv/Fm φτάνει γύρω στο 0,4 την τελευταία μέρα επώασης. Συμπερασματικά, όταν δεν χρησιμοποιείται το CO_2 από το φωτοσυνθετικό μηχανισμό είναι ξεκάθαρο πως πιέζει έναν οργανισμό που με την αναπνοή του όχι μόνο δε μειώνει αλλά ενισχύει το στρεσογόνο παράγοντα με την πάροδο των ημερών.

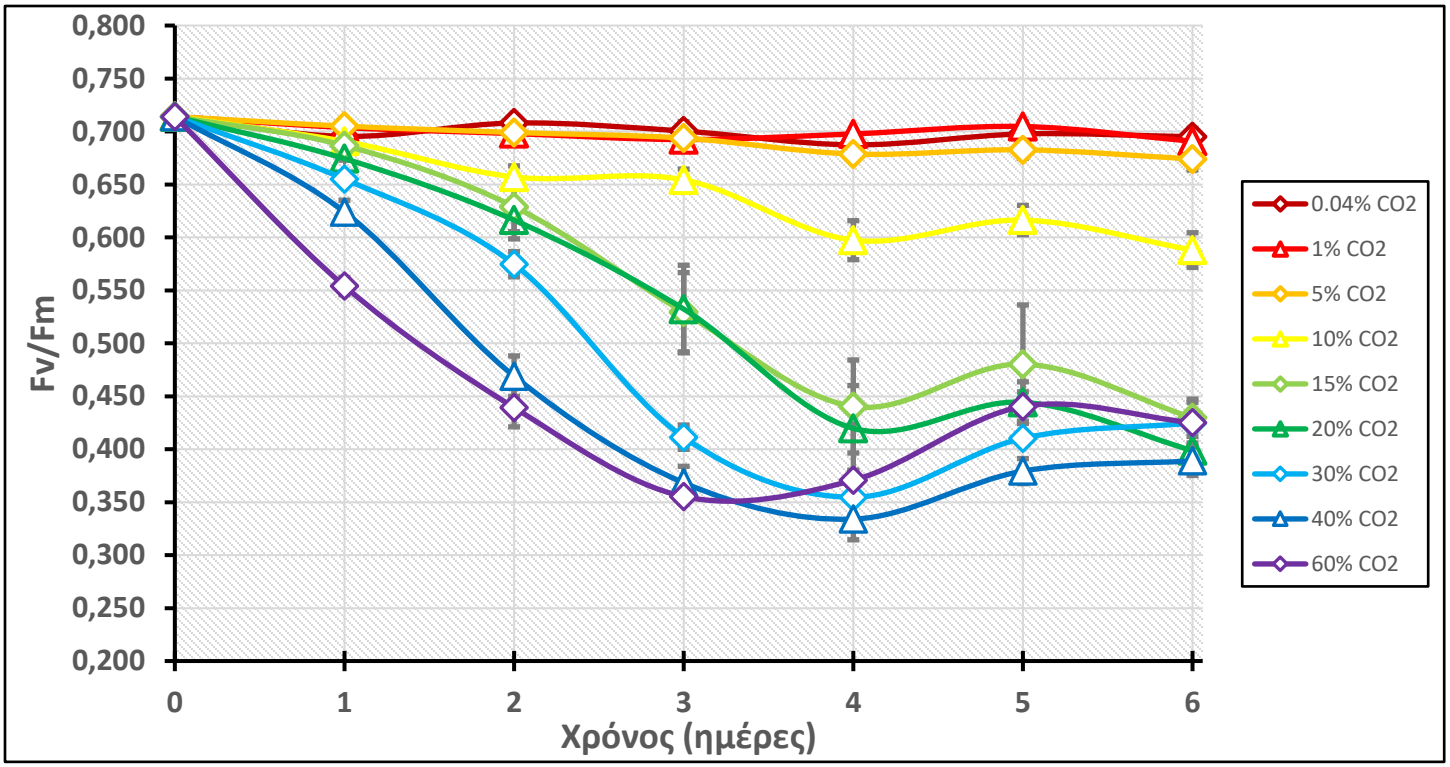
Στην Εικόνα 3.2 καταγράφεται η αναπνευστική δραστηριότητα των μικροφυκών σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων CO_2 που μελετήσαμε. Η τιμή της είναι κάτω από 1 μl O_2.μl $PCV^{-1}.h^{-1}$ σε όλες τις μεταχειρίσεις χωρίς καμία ουσιαστική διαφοροποίηση στους επιμέρους χειρισμούς.

Εξετάζοντας τις σημαντικότερες παραμέτρους του OJIP test στις Εικόνες 3.3 έχουμε μια πιο σαφή οπτική της κατάστασης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μικροφύκους. Πιο συγκεκριμένα, στην ατμοσφαιρική συγκέντρωση CO_2 βλέπουμε ότι το συνεχές σκοτάδι οδηγεί σε μια πολύ μικρή διαφοροποίηση του μηχανισμού από την πρώτη κιόλας μέρα η οποία περιγράφεται από την εξής εικόνα: RC/Cs↓, Abs/Rc↑, PSIo↓, DIo/RC↑ και PI(abs)↓ που υποδηλώνει καταπόνηση. Με την πάροδο των ημερών η κατάσταση αυτή χειροτερεύει σε μικρό βαθμό. Όσο αυξάνεται το CO_2 βλέπουμε ότι η καταπόνηση αυξάνεται δραματικά με χαρακτηριστικό παράδειγμα τις πολύ υψηλές συγκεντρώσεις CO_2 που φτάνουν στο χειρισμό με 40% CO_2 την $3^{η}$ ημέρα να παρουσιάζουν την εξής εικόνα RC/Cs ↓ 61% ± 1%, ABS/RC ↑ 265% ± 16%, PSIo↓ 62% ± 2%, DIo/RC↑ 574% ± 42% και PI(abs) ↓ 3% (οι ποσοστιαίες τιμές προκύπτουν από την σύγκριση με τις αντίστοιχες την ημέρα 0). Είναι σαφές λοιπόν πως το CO_2 δεν είναι τίποτα παραπάνω πέρα από στρες για τους χειρισμούς απουσία φωτισμού.

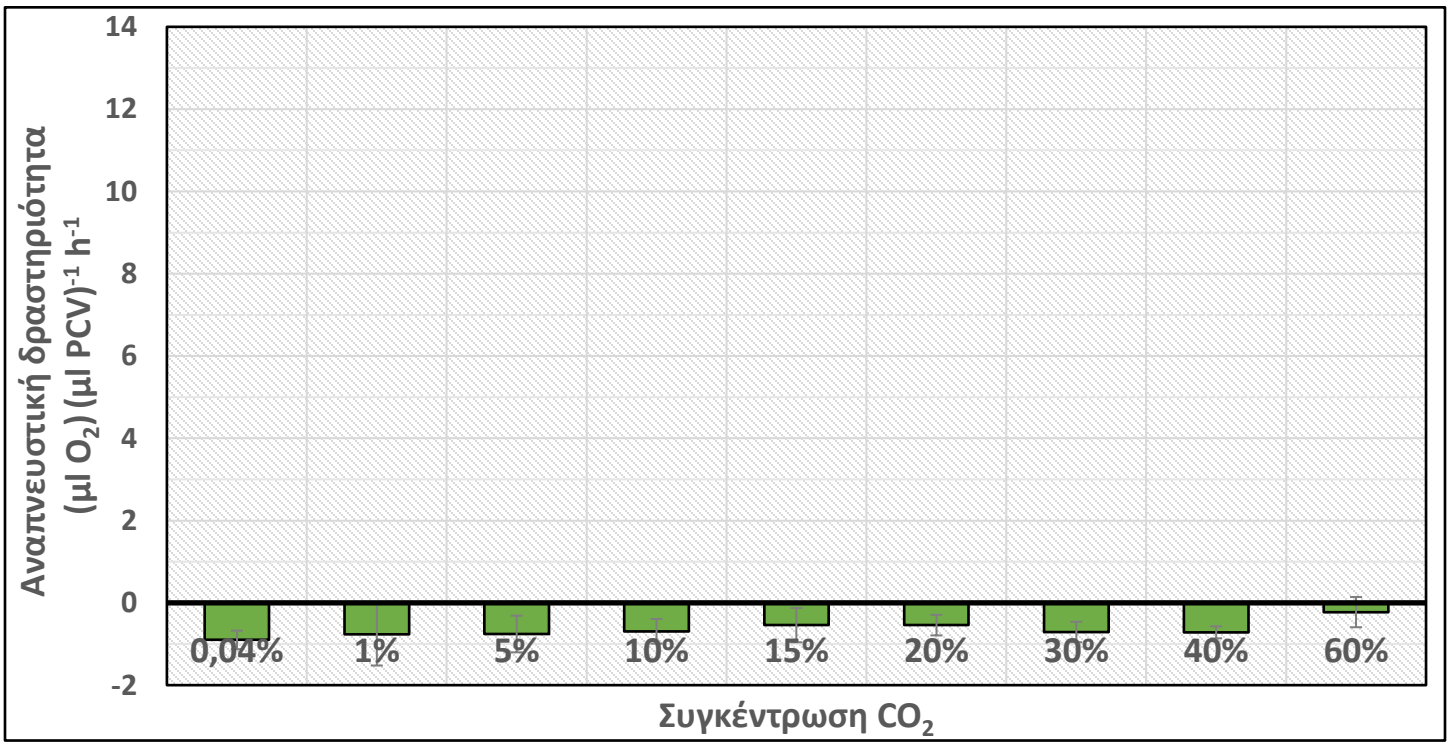
Στην Εικόνα 3.4 βλέπουμε την πορεία της αναπνευστικής κατανάλωσης O_2. Λόγω της πολύ μικρή κατανάλωσης και του εισαγόμενου σφάλματος κατά την δημιουργία των διάφορων ποσοστώσεων μπορούμε να πούμε ότι είχαμε κατά μέσο όρο μια κατανάλωση της τάξεως του 0,5 - 0,7 ml ανά ημέρα η οποία φθήνει με την πάροδο των ημερών και σαφέστατα με την αύξηση του CO_2 στην αέρια φάση.

Στην Εικόνα 3.5 παρατηρούμε ότι τα μικροφύκη μας δεν έδωσαν μετρήσιμη αύξηση βιομάζας καθώς μέχρι το τέλος του πειράματος δεν ξεπέρασαν το 1 μl PCV / ml καλλιέργειας.

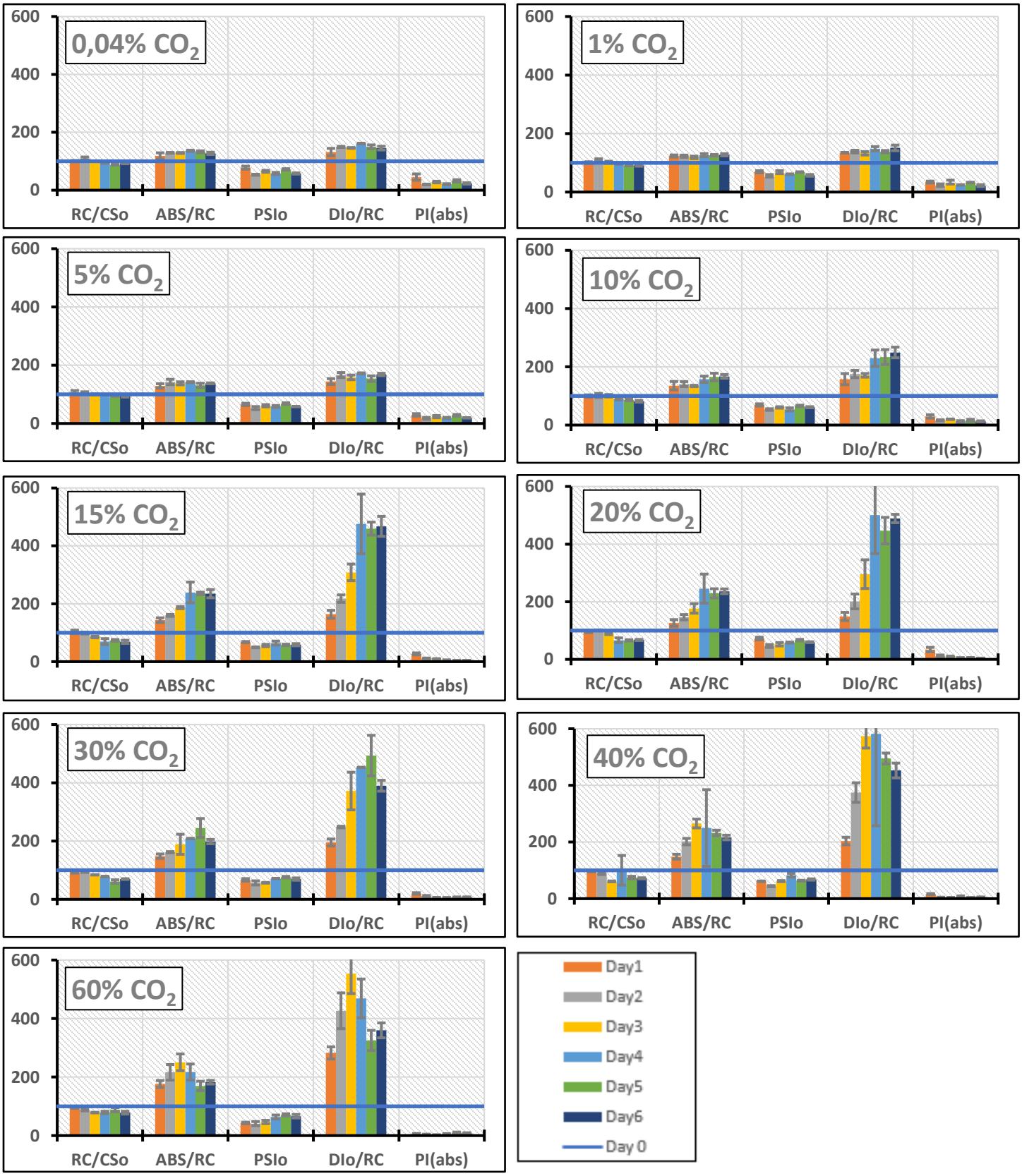
Οι βιοχημικές αναλύσεις της Εικόνας 3.6 αποκαλύπτουν πως σε διάστημα 6 ημερών στο απόλυτο σκοτάδι, τα κύτταρα ανεξαρτήτου ποσόστωσης CO_2, καταναλώνουν σάκχαρα φτάνοντάς τα από το αρχικό 30% DW (ξηρή βιομάζα) γύρω στο 22-26% DW. Τα λιπαρά, σε μια σχετική διαβάθμιση ανάλογη της συγκέντρωσης CO_2 διατηρούνται σε περίπου 6,5-8% DW . Αντίστοιχα οι ολικές χρωστικές (χλωροφύλλες και καροτενοειδή) διατηρούνται στο περίπου 4-6% DW και 0,7-1% DW. Παρατηρείτε μια μικρή διαφοροποίηση την τελευταία ημέρα με τον χειρισμό 0,04% CO_2 να έχει τα χαμηλότερα ποσοστά, το 30% CO_2 τα αμέσως επόμενα και το 60% CO_2 τα περισσότερα σε όλες τις βιοχημικές ομάδες που μελετήσαμε.



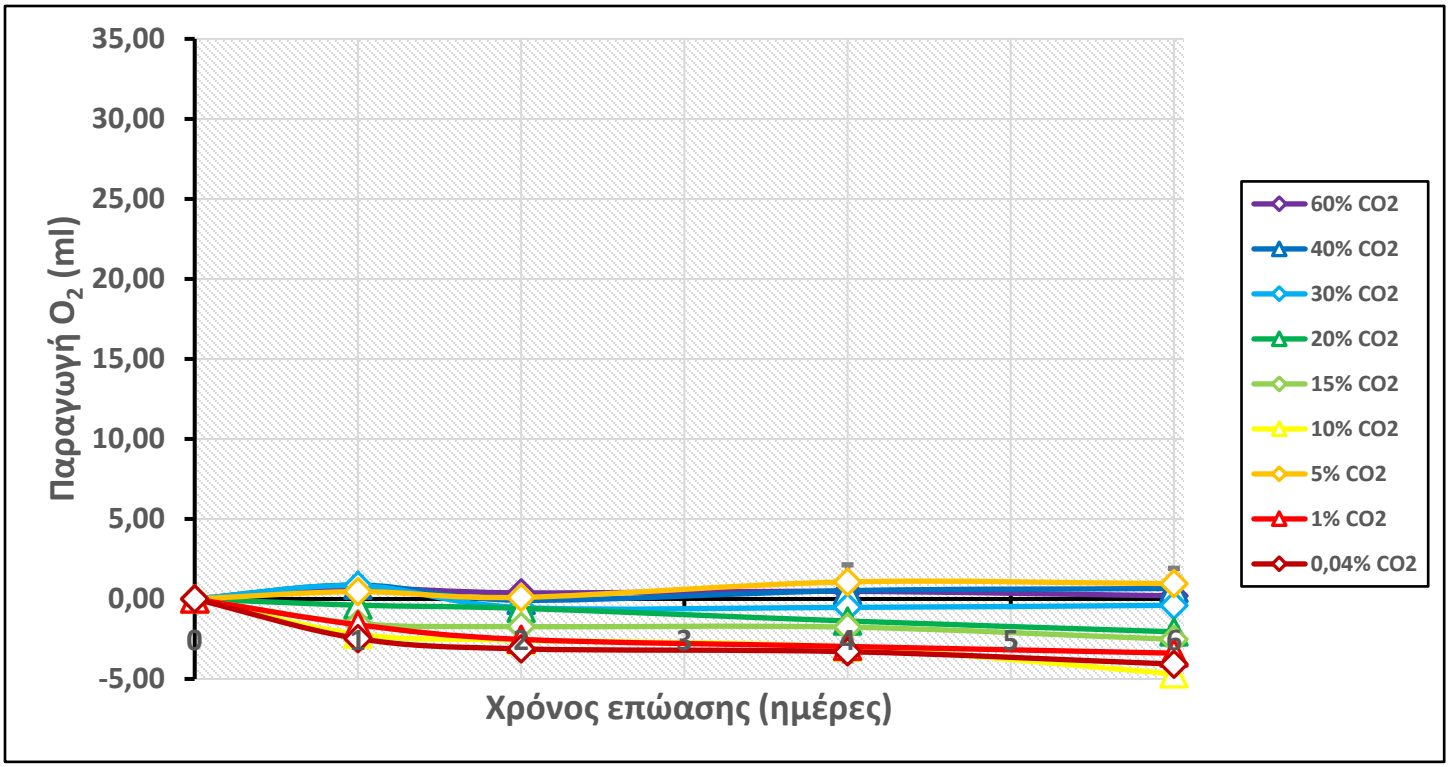
Εικόνα 3.1: Κινητική του λόγου Fv/Fm (OJIP test) ως δείκτης της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης κατά τη διάρκεια της επώασης. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες στο απόλυτο σκοτάδι (0 μmol m^{-2} s^{-1} PAR) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^{o}C. Στο διάγραμμα απεικονίζονται και τα τυπικά σφάλματα.



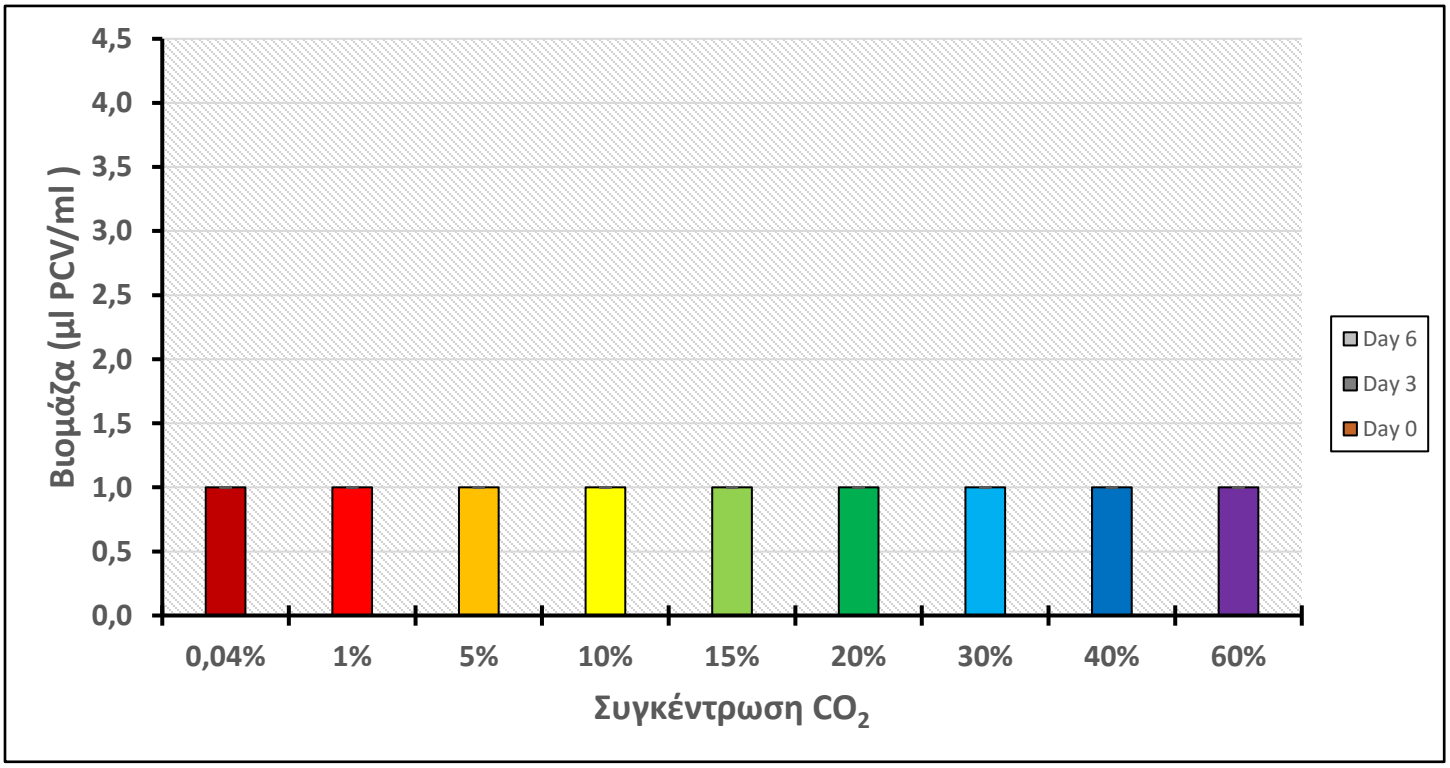
Εικόνα 3.2: Ρυθμός καθαρής αναπνευστικής δραστηριότητας για καλλιέργειες που επωάστηκαν στο απόλυτο σκοτάδι (0 μmol m^{-2} s^{-1} PAR) [24 ώρες σκοτάδι – 0 ώρες φως]. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^{o}C. Στο διάγραμμα απεικονίζονται και τα τυπικά σφάλματα.



Εικόνα 3.3: Αναλυτική παρουσίαση της ποσοστιαίας μεταβολής των σημαντικότερων παραμέτρων του OJIP Test κανονικοποιημένων ως προς την αρχική κατάσταση (Day 0). Όλες οι μεταχειρίσεις με την αναγραφόμενη ποσόστωση 0,04% - 60% CO_2 έγιναν σε τριπλέτες στο απόλυτο σκοτάδι (0 μmol m^{-2} s^{-1} PAR) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^{o}C. Στο διάγραμμα απεικονίζονται και τα τυπικά σφάλματα.



Εικόνα 3.4: Αναπνευστική κατανάλωση O_2 των κυττάρων ως προς το χρόνο σε ημέρες. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες στο απόλυτο σκοτάδι (0 μmol m^{-2} s^{-1} PAR) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^oC. Στο διάγραμμα απεικονίζονται και τα τυπικά σφάλματα.



Εικόνα 3.5: Μεταβολή της βιομάζας (μl PCV/ml καλλιέργειας) ως προς τη συγκέντρωση CO_2 στην αέρια φάση του δοχείου για τις ημέρες 0, 3 και 6 (χρώμα εκάστοτε μεταχείρησης, σκούρο γκρι και ανοικτό γκρι αντίστοιχα). Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες στο απόλυτο σκοτάδι (0 μmol m^{-2} s^{-1} PAR) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^oC. Στο διάγραμμα απεικονίζονται και τα τυπικά σφάλματα.

Για τα ολικά λιπαρά:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	62,18 ± 2,28	62,18 ± 2,28	62,18 ± 2,28
1η ημέρα	52,84 ± 2,29	71,05 ± 2,15	67,88 ± 2,83
3η ημέρα	77,60 ± 1,43	63,59 ± 2,43	66,81 ± 8,25
6η ημέρα	65,68 ± 0,32	73,66 ± 1,89	82,82 ± 4,81

Για τους ολικούς υδατάνθρακες:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	301,85 ± 13,08	301,85 ± 13,08	301,85 ± 13,08
1η ημέρα	286,64 ± 6,54	354,25 ± 46,47	313,05 ± 11,64
3η ημέρα	247,01 ± 18,17	342,52 ± 29,73	299,65 ± 9,27
6η ημέρα	223,35 ± 10,50	248,19 ± 8,72	260,02 ± 6,90

Για τις χλωροφύλλες a:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	41,01 ± 1,92	41,01 ± 1,92	41,01 ± 1,92
1η ημέρα	36,04 ± 1,38	38,88 ± 1,23	43,49 ± 3,98
3η ημέρα	43,46 ± 0,79	46,04 ± 1,09	35,98 ± 0,72
6η ημέρα	33,95 ± 1,22	39,38 ± 1,65	43,43 ± 1,16

Για τις χλωροφύλλες b:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	13,22 ± 5,16	13,22 ± 5,16	13,22 ± 5,16
1η ημέρα	15,32 ± 0,48	15,28 ± 0,98	16,67 ± 1,20
3η ημέρα	14,15 ± 2,05	11,74 ± 0,78	12,83 ± 0,72
6η ημέρα	8,41 ± 0,37	7,94 ± 1,39	12,85 ± 0,99

Για τις ολικές χλωροφύλλες:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	54,23 ± 7,08	54,23 ± 7,08	54,23 ± 7,08
1η ημέρα	51,36 ± 1,86	54,16 ± 2,21	60,16 ± 5,18
3η ημέρα	57,61 ± 2,84	57,78 ± 1,87	48,81 ± 1,44
6η ημέρα	42,36 ± 1,59	47,32 ± 3,03	56,28 ± 2,15

Για τα ολικά καροτενοειδή:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	11,27 ± 7,59	11,27 ± 7,60	11,27 ± 7,61
1η ημέρα	3,15 ± 1,39	3,99 ± 0,47	5,34 ± 3,31
3η ημέρα	4,64 ± 7,57	7,40 ± 4,13	3,35 ± 3,49
6η ημέρα	7,46 ± 2,02	9,77 ± 2,24	7,23 ± 3,01

Εικόνα 3.6: Ποιοτική βιοχημική ανάλυση καλλιεργειών 0,04%, 30% και 60% CO_2 στο απόλυτο σκοτάδι (0 μmol m^{-2} s^{-1} PAR) για τα ολικά λιπαρά, τους ολικούς υδατάνθρακες, χλωροφύλλες a & b,ολικές χλωροφύλλες και ολικά καροτενοειδή. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^{o}C. Ο υπολογισμός έγινε σε (μg)(μl PCV)$^{-1}$ και τροποποιήθηκε προσεγγιστικά σε (μg)(mg DW)$^{-1}$.

3.2 Ανάπτυξη μικροφυκών σε πολύ χαμηλό φως (10 μmol m^{-2} s^{-1})

Η μελέτη μας συνεχίστηκε με καλλιέργειες σε χαμηλό φωτισμό 10 μmol m^{-2} s^{-1} όπου στην αέρια φάση δοκιμάσαμε συγκεντρώσεις CO_2 οι οποίες κυμαίνονταν από την ατμοσφαιρική συγκέντρωση (0,04% CO_2) έως και 1500 φορές μεγαλύτερη (60% CO_2) στις διαβαθμίσεις που αναφέρουμε παραπάνω. Τα κύτταρά μας ξεκινούν από μια πολύ καλή φωτοσυνθετική κατάσταση με Fv/Fm≈0,65. Όπως βλέπουμε στην Εικόνα 3.7, κάτω από το συγκεκριμένο φωτισμό, σχεδόν όλες οι μεταχειρίσεις δείχνουν αυξητική τάση στην φωτοσυνθετική τους απόδοσης παρόλο που με την πάροδο των ημερών η εικόνα αλλάζει αισθητά. Αρχίζοντας από την ατμοσφαιρική συγκέντρωση του CO_2 βλέπουμε ότι το Fv/Fm κατά την $1^η$ μέρα ανεβαίνει στο 0,666 κι ενώ τη δεύτερη μέρα παραμένει σταθερό, στη συνέχεια αρχίζει να πέφτει φτάνοντας στην $6^η$ μέρα το 0,599. Παρόμοια πορεία ακολουθεί και ο χειρισμός με 1% CO2, όπου η απόδοση κορυφώνεται τη $2^η$ μέρα στο 0,705 ενώ έπειτα πέφτει περίπου στα ίδια επίπεδα με το παραπάνω στο πέρας του πειράματος. Πενταπλασιάζοντας την παρούσα συγκέντρωση στο 5% τα πράγματα αλλάζουν. Η κορύφωση έρχεται αργότερα με το Fv/Fm=0,741 δηλαδή να έχουμε αύξηση κατά 15%, αποτέλεσμα που κρίνεται κορυφαίο όσον αφορά τις φωτοσυνθετικές αποδόσεις αυτού του είδους. Τις επόμενες μέρες πέφτει κι αυτό στο 0,692. Στο χειρισμό με 10% CO_2 η μέγιστη τιμή Fv/Fm=0,735 φτάνει κατά τη μέση περίπου της επώασης, αλλά είναι άξιο αναφοράς ότι πτώση δεν παρατηρείται ή αυτή είναι πολύ μικρή για να σημειωθεί. Το 15% CO_2 δίνει παρόμοια εικόνα με μέγιστο Fv/Fm= 0,733 την 4η ημέρα αλλά μικρή πτώση στη συνέχεια. Έπειτα το 20% αγγίζει μόλις το Fv/Fm=0,729 στο ίδιο περίπου χρονικό διάστημα με τις παραπάνω 3 μεταχειρίσεις και έπειτα πέφτει στο 0,708 κατά την ολοκλήρωσή του πειράματος. Το 30% CO_2 δίνει το καλύτερο αποτέλεσμα κοντά στο 0,750 τις τελευταίες μέρες του πειράματος με το 40% να ακολουθεί με 0,740. Είναι σημαντικό ότι στις συγκεντρώσεις αυτές δε σημειώνεται κάποια πτώση. Τέλος, έχουμε το 60% CO_2 όπου πλέον έχουμε περάσει τα όρια που αντέχουν τα κύτταρά μας και το CO_2 γίνεται τοξικό με το φωτοσυνθετικό μηχανισμό να σημειώνει κατακόρυφη πτώση μέχρι το Fv/Fm=0,413. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης CO_2 λειτουργεί ευεργετικά στη φωτοσυνθετική απόδοση, ωστόσο σε ακραία υψηλές συγκεντρώσεις είναι ένας παράγοντας που επιφέρει ταυτόχρονα και καταπόνηση στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό όπως θα δούμε πιο αναλυτικά παρακάτω.

Η φωτοσυνθετική δραστηριότητα στις επικρατούσες συνθήκες, όπως έχει υπολογισθεί στην Εικόνα 3.8 δείχνει την δυναμική του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε σχέση με τον ανόργανο άνθρακα από μια άλλη οπτική. Σημαντική διαφοροποίηση στη φωτοσυνθετική δραστηριότητα συναντάμε στο 5% CO_2 γύρω στα 3 μlO_2.μl $PCV^{-1}.h^{-1}$, περίπου διπλάσια από το χειρισμό με ατμοσφαιρικό αέρα. Συνεχίζουμε στο 5%-20% CO_2 όπου ανιχνεύουμε γύρω στα 4 μlO_2.μl $PCV^{-1}.h^{-1}$. Η παρακάτω αυξητική τάση, ανάλογη της συγκέντρωσης CO_2, κορυφώνεται γύρω στο 30% CO_2 με περίπου 6 μlO_2.μl $PCV^{-1}.h^{-1}$. Στον χειρισμό 40% CO_2 περιορίζεται η

φωτοσυνθετική δραστηριότητα κοντά στα 5 μlO_2.μl $PCV^{-1}.h^{-1}$ ενώ στο χειρισμό 60% CO_2 έχουμε τιμές μόλις στα 3 μlO_2.μl $PCV^{-1}.h^{-1}$.

Τα αναλυτικά δεδομένα από τις σημαντικότερες μεταβλητές του OJIP test παρουσιάζονται στα διαγράμματα από την Εικόνα 3.9. Σε ένα γενικότερο πλαίσιο βλέπουμε ότι ο πολύ χαμηλός φωτισμός των 10 μmol m^{-2} s^{-1} είναι ιδανικός για το φωτοσυνθετικό μηχανισμό της *Chlorella vulgaris* μιας και δεν επιφέρει ιδιαίτερο στρες στην ατμοσφαιρική συγκέντρωση CO_2, ενώ επιτρέπει τη βελτιστοποίηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε υψηλότερες συγκεντρώσεις CO_2 (5% - 40%). Στη συγκέντρωση 60% CO_2, τα ευεργετικά αποτελέσματα του διοξειδίου του άνθρακα σταματούν καθώς πλέον έχει γίνει τοξικό για το φύκος κι ο φωτοσυνθετικός του μηχανισμός βρίσκεται σε καταπόνηση. Σε μια πιο συγκεκριμένη ανάλυση, ξεκινώντας από τη συγκέντρωση 0,04% CO_2 βλέπουμε ότι ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός παραμένει σχετικά σταθερός, με μια μικρή βελτίωση τις πρώτες μέρες. Έπειτα, σημειώνεται μια σταδιακή πτώση της επίδοσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού που περιγράφεται από την εξής εικόνα: RC/Cs↓, Abs/Rc↑, PSIo↓, DIo/RC↑ και PI(abs)↓, πιθανότατα από τη σταδιακή έλλειψη ανόργανου άνθρακα. Από το χειρισμό 1% CO_2, βλέπουμε η καταπόνηση αυτή να μετριάζεται με τις ενεργειακές διαρροές ανά κέντρο αντίδρασης (DIo/RC) να μειώνονται και την απόδοση ανά απορροφούμενη ενέργεια να αυξάνεται (PI(abs)) σε ένα βαθμό μέχρι σταδιακά κι αυτά να αρχίσουν την αντίστροφη πορεία μετά τη $2^η$ ημέρα του πειράματος πιθανότατα για τον ίδιο λόγο. Στις μεταχειρίσεις 5% CO_2 βλέπουμε μια πραγματικά ευδιάκριτη εικόνα βελτιστοποίησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Πιο συγκεκριμένα, η πυκνότητα των ενεργών κέντρων (RC/Cs) αυξάνονται ενώ το μέγεθος της λειτουργικής κεραίας (Abs/RC) μειώνεται αισθητά. Έτσι η ενέργεια που αξιοποιείται στη λεγόμενη πρωτογενής φωτοχημεία – αξιοποιήσιμη για τον οργανισμό ενέργεια - (PSIo) αυξάνεται, ενώ παράλληλα η μη φωτοχημική απόσβεση (DIo/RC) μειώνεται. Εκ τούτου, η επίδοση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού ανά απορροφούμενη ενέργεια αυξάνεται. Ακόμα κι εδώ έχουμε πορεία σε σχήμα «καμπάνας», δηλαδή οι μεταβλητές προχωρούν μέχρι να φτάσουν μια κορυφή κοντά στη μέση του πειράματος και στη συνέχεια κινούνται πίσω προς την αντίθετη κατεύθυνση. Το ίδιο μοτίβο βελτιστοποίησης βλέπουμε και στις συγκεντρώσεις 10% - 40% CO_2. Για να γίνει καλύτερα κατανοητή η ευεργετική δράση του CO_2 στη *Chlorella vulgaris* αρκεί να δώσουμε ως παράδειγμα το 30% CO_2 που καταφέρνει να παρουσιάσει την $4^η$ ημέρα την εξής εικόνα: RC/Cs ↑ έως 122% ± 9%, ABS/RC ↓ έως 47% ± 6%, PSIo↑ έως 16% ± 1%, DIo/RC↓ έως 53% ± 5% και PI(abs) ↑ έως 237% ± 50%. Αξίζει να παρατηρήσουμε ότι στις συγκεντρώσεις, όπου παρατηρείται βελτίωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού η αύξηση των κέντρων αντίδρασης τις πρώτες ημέρες είναι περίπου στα ίδια επίπεδα της τάξεως του 25%, ενώ μετά την $3^η$-$4^η$ ημέρα γίνεται η εκρηκτική αύξηση που πιθανότατα υποδηλώνει ότι το CO_2 έχει σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή ρύθμιση. Τέλος, στον χειρισμό 60% CO_2 παρόλο που η πρωτογενής φωτοχημεία μένει σχετικά αυξημένη (PSIo), οι τεράστιες ποσότητες CO_2 στην αέρια φάση που περνάνε στην υγρή υπό τη

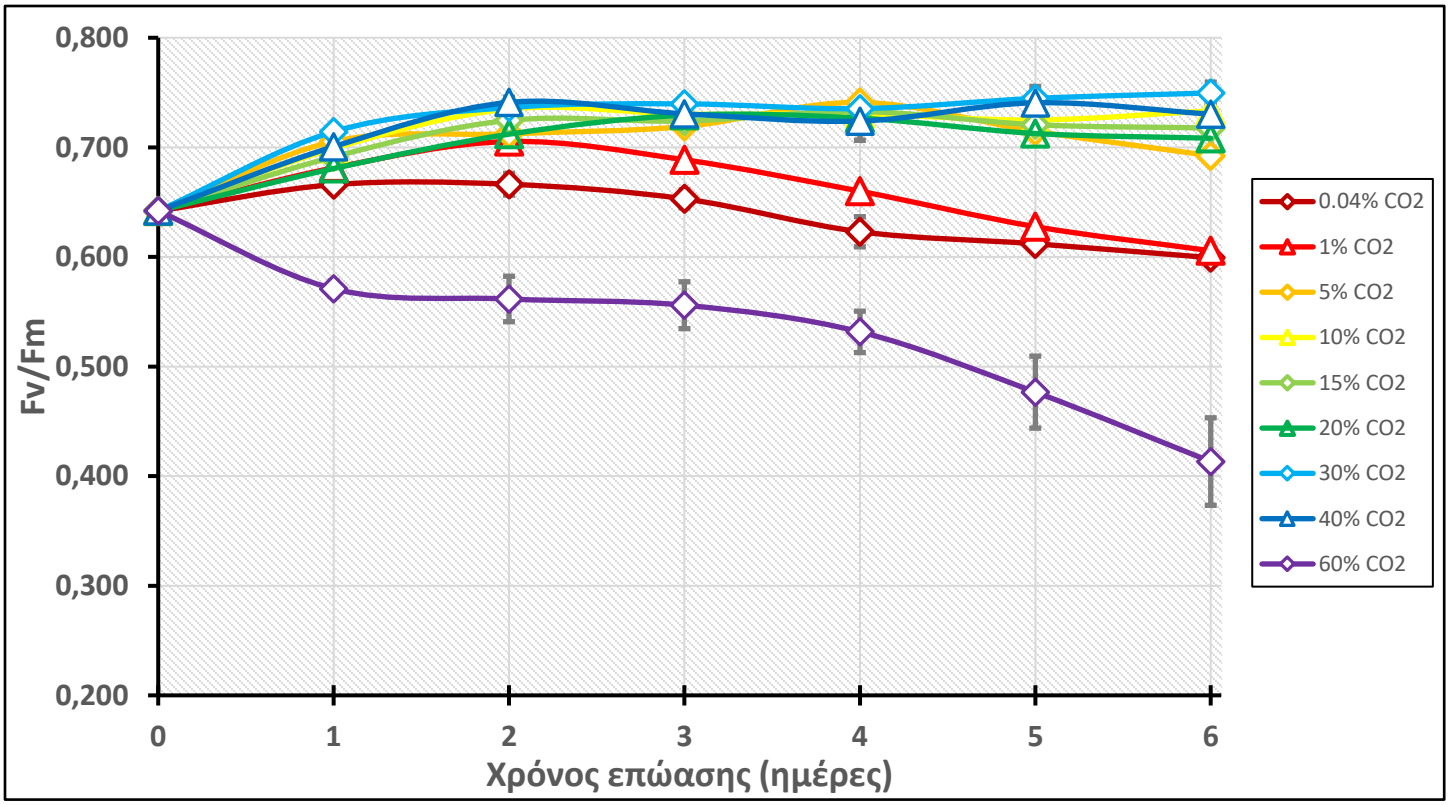
μορφή διαλυμένου CO_2 και HCO_3^- μειώνουν δραματικά τα ενεργά κέντρα αντίδρασης (RC/Cs) περίπου στα μισά με αποτέλεσμα η ενεργειακή πίεση ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης να αυξάνει (Abs/RC) και οι ενεργειακές διαρροές να μεγαλώνουν (DIo/RC). Έτσι η γενικότερη επίδοση ανά απορροφούμενη ενέργεια μειώνεται PI(abs). Στο πρώτο μισό του πειράματος το κύτταρο προσπαθεί να διατηρήσει τη φωτοσυνθετική του κατάσταση αλλά με το πέρασμα του χρόνου φαίνεται πως η μάχη χάνεται ολοένα και περισσότερο.

Περνάμε στην φωτοσυνθετική παραγωγή O_2 στον συγκεκριμένο φωτισμό. Στην Εικόνα 3.10 βλέπουμε ότι παρά την πολύ χαμηλή εισροή φωτεινής ενέργειας, η αφομοίωση άνθρακα που είναι ανάλογη με την απελευθέρωση οξυγόνου λειτουργεί ιδιαίτερα αποδοτικά. Πιο συγκεκριμένα, οι χειρισμοί 40% CO_2 και το 30% CO_2 έχουν την υψηλότερη παραγωγή φτάνοντας μέχρι τα 16 ml και 15 ml αντίστοιχα. Στη συνέχεια, έχουμε τους χειρισμούς 20% CO_2 και 15% CO_2 με παραγωγή κοντά στα 12 ml ενώ ακολουθεί το 10% CO_2 και το 60% CO_2 με 8 ml. Το 60% CO_2 όπως έδειξαν κι οι παραπάνω μετρήσεις δείχνει μεγάλη πτώση στην φωτοσυνθετική παραγωγή O_2, άρα και αφομοίωση CO_2, παρά την υπερπολλαπλάσια ποσόστωσή του. Συνεχίζουμε με τον χειρισμό 5% CO_2 κοντά στα 7 ml, τον 1% κοντά στα 3ml και την ατμοσφαιρική συγκέντρωση CO_2 με παραγωγή που παραμένει κάτω από 1ml. Αξίζει να παρατηρήσουμε ότι η πλειονότητα της παραγωγής παρατηρείται την $1^η$ ημέρα του πειράματος ενώ δεν ανιχνεύθηκε παραγωγή H_2 σε καμία μεταχείριση.

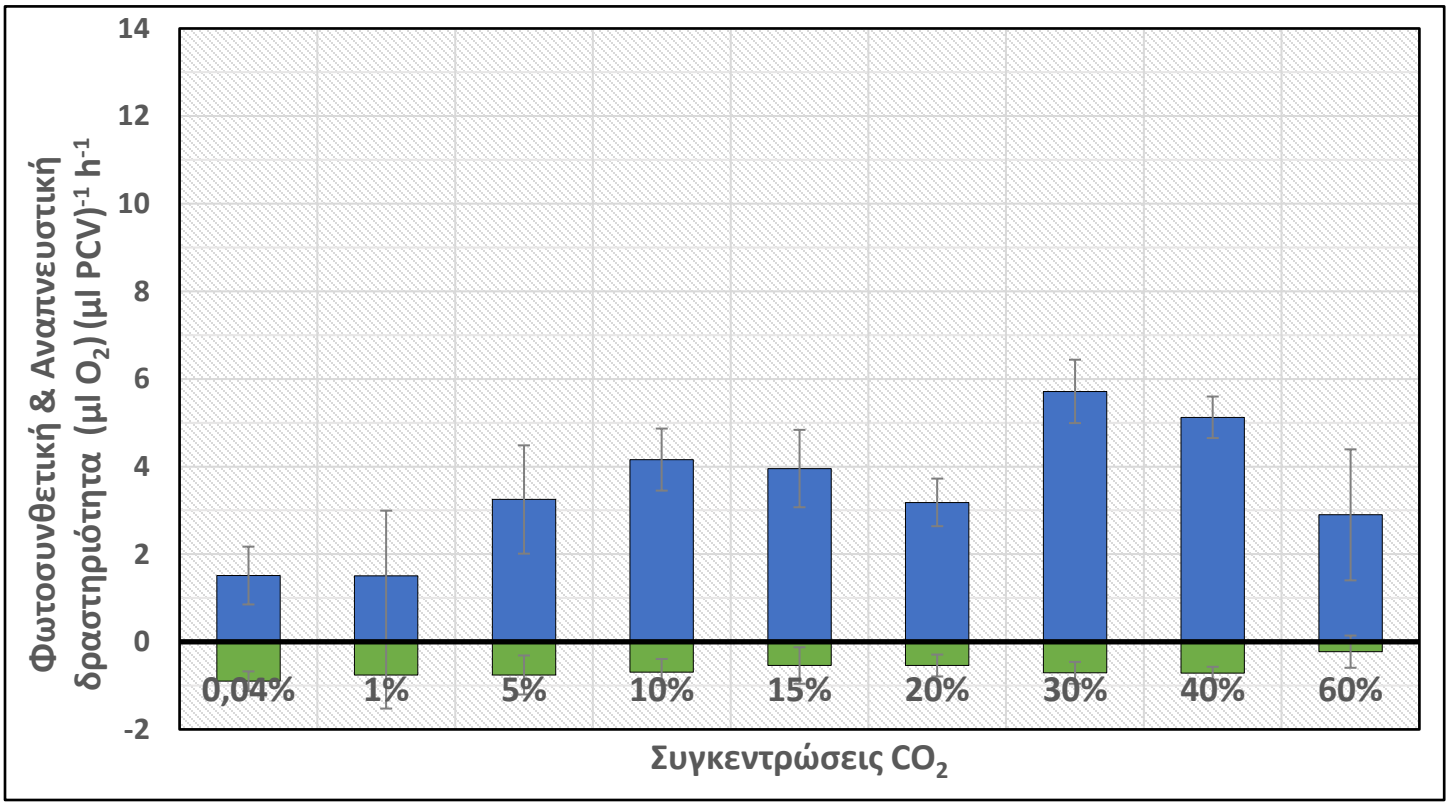
Στην Εικόνα 3.11 όπου παρουσιάζεται η αύξηση της βιομάζας των εκάστοτε μεταχειρίσεων βλέπουμε ότι το πολύ χαμηλό φως που παρέχουμε στις καλλιέργειές μας δίνει μικρά αλλά αισθητά αποτελέσματα. Βλέπουμε ότι στην ατμοσφαιρική συγκέντρωση 0,04% CO_2 η αύξηση του PCV είναι μηδαμινή από 1 σε 1,15 ± 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας. Στο 1% CO_2 φτάνει το 1,5 ± 0,2 μl PCV / ml καλλιέργειας και στο 5% CO_2 το 1,7 ± 0,05 μl PCV / ml καλλιέργειας. Στο 10% CO_2 βρισκόμαστε ξανά στο ίδιο σημείο με 1,7 ± 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας ενώ στο 15% CO_2 φτάνουμε την κορυφαία τιμή για αυτό το φωτισμό στο 1,9 ± 0,05 PCV. Συνάμα, στο 20% CO_2 τα κύτταρα αυξάνονται μέχρι το 1,8 ± 0,15 μl PCV / ml καλλιέργειας και στο 30% CO_2 αγγίζουν το 1,8 ± 0,05 μl PCV / ml καλλιέργειας. Τέλος, στις μεταχειρίσεις με 40% CO_2 η βιομάζα φτάνει μέχρι το 1,7 ± 0,05 μl PCV / ml καλλιέργειας ενώ στις τελευταίες με 60% CO_2 στο 1,6 ± 0,05 μl PCV / ml καλλιέργειας. Το διάγραμμα που βλέπουμε δείχνει ότι ακόμα και ελάχιστη αύξηση του CO_2 δίνει σημαντική αύξηση στην παραγωγή βιομάζας

Η στρατηγική του μικροφύκους εξετάζεται πιο αναλυτικά στην Εικόνα 3.11 αφού γνωρίζουμε ότι ο δεσμευόμενος άνθρακας δεν επενδύεται πάντοτε εξολοκλήρου στην ανάπτυξη. Ξεκινώντας τη μελέτη μας από τα σάκχαρα, βλέπουμε ότι το 0,04% CO_2 λόγω έλλειψης ανόργανου άνθρακα συνεχώς καταναλώνει σάκχαρα για να επιβιώσει πέφτοντας από το αρχικό 43% DW στο 26% DW. Αντίθετα, στις άλλες δύο περιπτώσεις του 30% CO_2 και 60% CO_2 ενώ αρχικά βλέπουμε μια μείωση των υδατανθράκων που πιθανότατα οφείλεται σε μια περίοδο προσαρμογής των κυττάρων στις νέες συνθήκες, έχουμε κορύφωση την $3^η$ ημέρα που αγγίζει το 55%

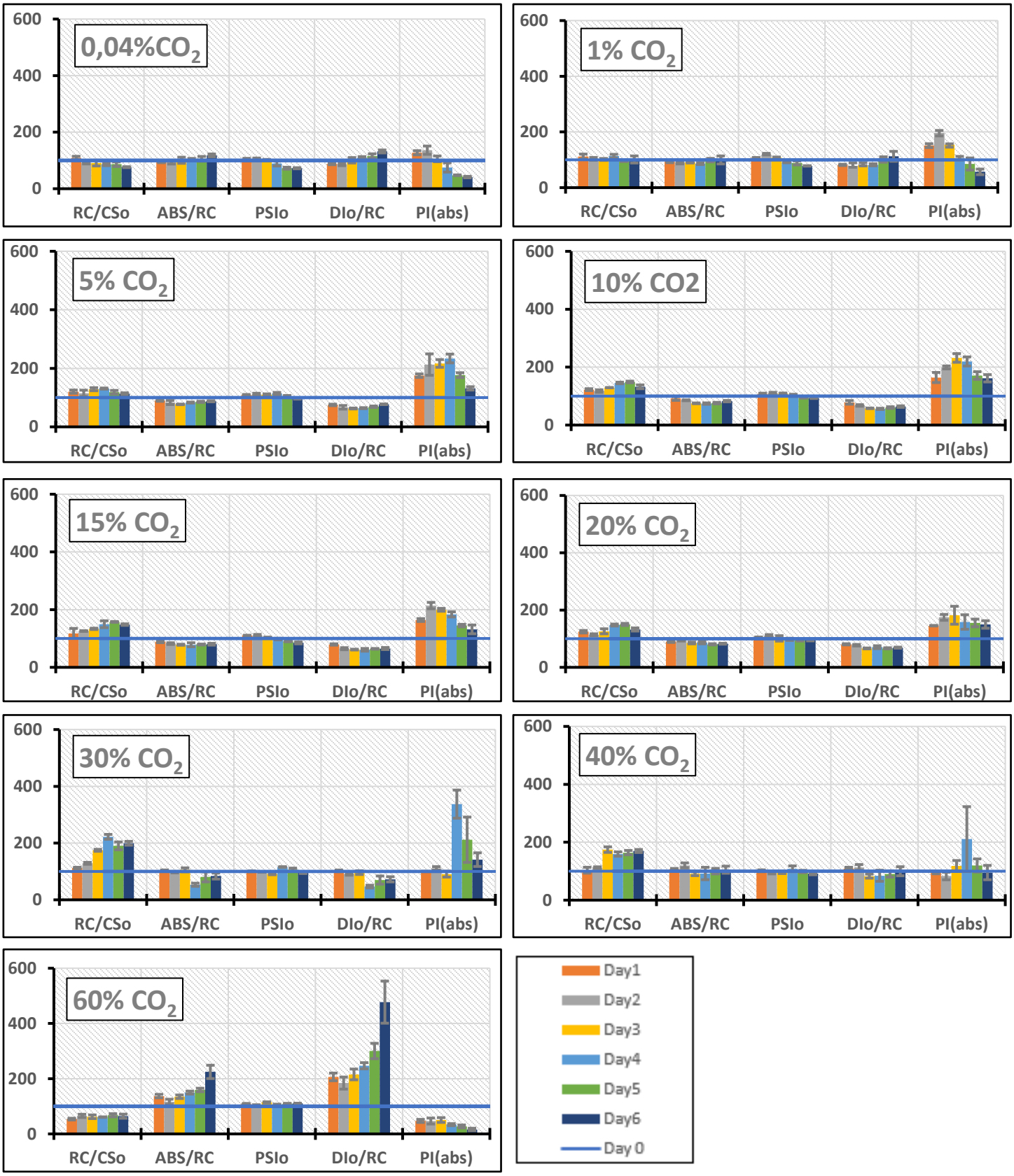
DW και το 38% DW ενώ την 6η ημέρα έχουν ξανά μειωθεί στο 35% DW και 19% DW αντίστοιχα. Εξετάζοντας τα λιπαρά μπορούμε να διακρίνουμε πως τόσο το 0,04% CO_2 λόγω έλλειψης πόρων όσο και το 30% CO_2 λόγω πολλαπλασιασμού των κυττάρων μειώνουν τα αποθέματά τους από περίπου 9% DW σε 6% DW ενώ το 60% CO_2 λόγω καταπόνησης από την υψηλή συγκέντρωση CO_2 στο μπουκάλι διατηρεί τα λιπαρά του σχεδόν στο ίδιο σημείο με 8% DW την τελευταία μέρα. Όσων αφορά τις χλωροφύλλες καταγράφηκαν μικρές διαφορές καθώς στο 30% CO_2 και 60% CO_2 διατηρήθηκαν στο 6% DW ενώ στο 0,04% CO_2 έφτασαν μόλις στο 5% DW. Οι τιμές των ολικών καροτενοειδών μειώθηκαν από 0,6% DW σε 0,3-0,5% DW.



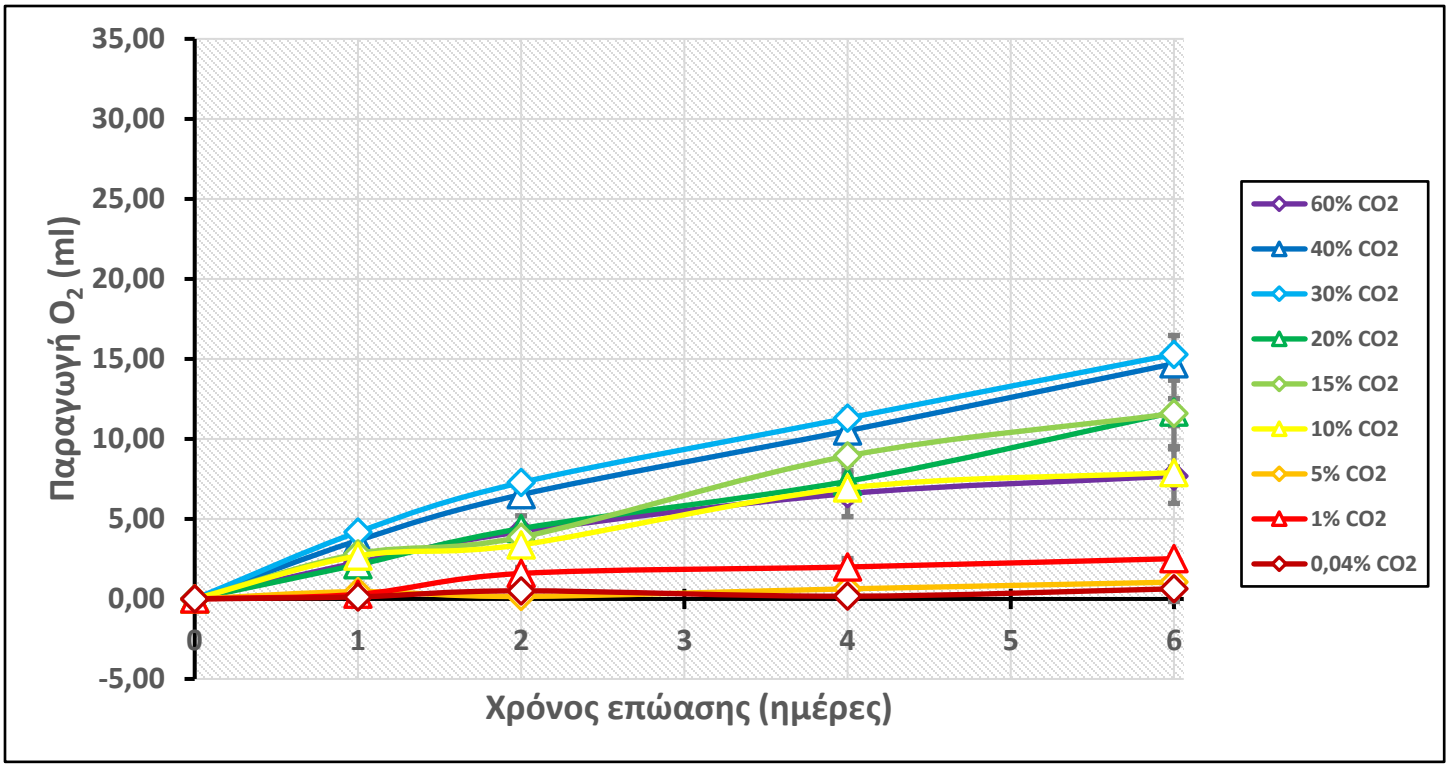
Εικόνα 3.7: Κινητική του λόγου Fv/Fm (OJIP test) ως δείκτης της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης κατά τη διάρκεια της επώασης. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες στο πολύ χαμηλό φως (10 μmol m^{-2} s^{-1}) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ºC. Στο διάγραμμα απεικονίζονται και τα τυπικά σφάλματα.



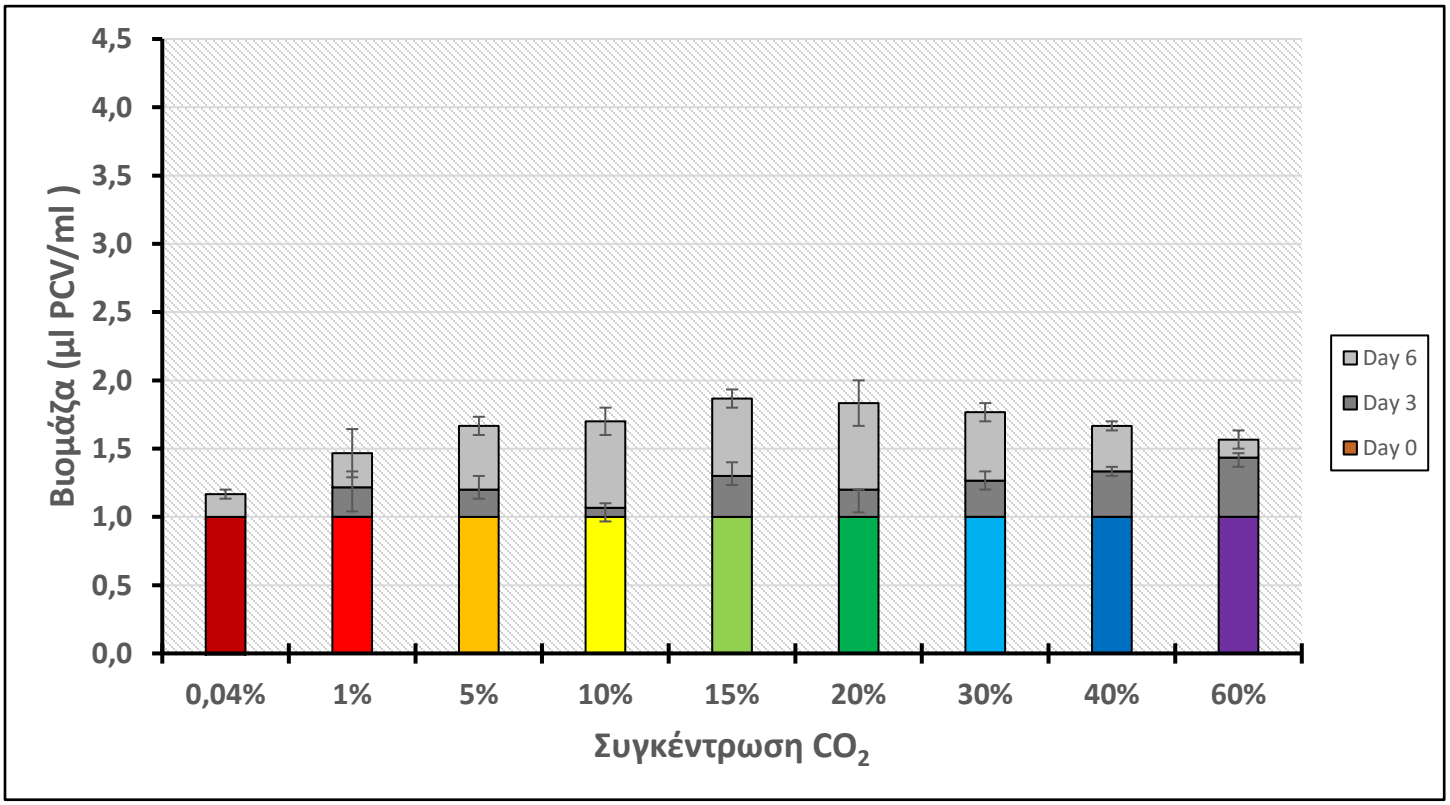
Εικόνα 3.8: Ρυθμός καθαρής φωτοσυνθετικής και αναπνευστικής δραστηριότητας στις συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας (10 μmol m^{-2} s^{-1}) [8 ώρες σκοτάδι –16 ώρες φως]. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ºC.



Εικόνα 3.9: Αναλυτική παρουσίαση της ποσοστιαίας μεταβολής των σημαντικότερων παραμέτρων του OJIP Test κανονικοποιημένων ως προς την αρχική κατάσταση (Day 0). Όλες οι μεταχειρίσεις με την αναγραφόμενη ποσόστωση 0,04% - 60% CO_2 έγιναν σε τριπλέτες στο πολύ χαμηλό φως (10 μmol m^{-2} s^{-1}) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^oC.



Εικόνα 3.10: Φωτοσυνθετική παραγωγή O_2 των κυττάρων ως προς το χρόνο σε ημέρες. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες στο πολύ χαμηλό φως (10 μmol m^{-2} s^{-1}) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ºC.



Εικόνα 3.11: Μεταβολή της βιομάζας (μl PCV/ml καλλιέργειας) ως προς τη συγκέντρωση CO_2 στην αέρια φάση του δοχείου για τις ημέρες 0, 3 και 6 (χρώμα εκάστοτε μεταχείρησης, σκούρο γκρι και ανοικτό γκρι αντίστοιχα). Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες σε πολύ χαμηλό φως (10 μmol m^{-2} s^{-1}) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ºC.

Για τα ολικά λιπαρά:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	92,59 ± 4,56	92,59 ± 4,56	92,59 ± 4,56
1η ημέρα	84,51 ± 0,98	84,20 ± 2,46	93,37 ± 0,75
3η ημέρα	57,09 ± 5,94	55,45 ± 0,91	73,05 ± 2,30
6η ημέρα	57,24 ± 1,31	60,95 ± 1,13	82,92 ± 0,50

Για τους ολικούς υδατάνθρακες:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	433,90 ± 15,55	433,90 ± 15,55	433,90 ± 15,55
1η ημέρα	270,86 ± 18,05	350,11 ± 44,47	211,13 ± 7,39
3η ημέρα	167,17 ± 26,39	545,87 ± 8,98	382,05 ± 57,57
6η ημέρα	261,6 ± 30,36	349,32 ± 11,66	185,70 ± 16,57

Για τις χλωροφύλλες a:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	46,39 ± 0,46	46,39 ± 0,46	46,39 ± 0,46
1η ημέρα	44,29 ± 2,59	42,06 ± 0,91	44,07 ± 0,73
3η ημέρα	37,19 ± 1,75	39,70 ± 0,76	51,68 ± 0,81
6η ημέρα	38,71 ± 0,74	42,29 ± 1,45	44,68 ± 0,43

Για τις χλωροφύλλες b:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	13,35 ± 0,09	13,35 ± 0,09	13,35 ± 0,09
1η ημέρα	15,00 ± 0,98	14,71 ± 0,24	15,31 ± 0,77
3η ημέρα	13,77 ± 0,52	18,66 ± 0,60	22,16 ± 0,29
6η ημέρα	14,49 ± 0,81	16,27 ± 1,73	16,58 ± 0,23

Για τις ολικές χλωροφύλλες:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	59,74 ± 0,54	59,74 ± 0,54	59,74 ± 0,54
1η ημέρα	59,29 ± 3,57	56,76 ± 1,15	59,38 ± 1,50
3η ημέρα	50,96 ± 2,27	58,36 ± 1,36	73,85 ± 1,10
6η ημέρα	53,20 ± 1,55	58,56 ± 3,18	61,26 ± 0,65

Για τα ολικά καροτενοειδή:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	6,36 ± 0,55	6,36 ± 0,56	6,36 ± 0,57
1η ημέρα	4,89 ± 3,28	4,05 ± 0,99	4,35 ± 2,32
3η ημέρα	3,80 ± 1,43	1,82 ± 1,12	5,32 ± 1,25
6η ημέρα	4,93 ± 2,80	3,43 ± 4,65	4,63 ± 0,72

Εικόνα 3.12: Ποιοτική βιοχημική ανάλυση καλλιεργειών 0,04%, 30% και 60% CO_2 στο πολύ χαμηλό φως (10 μmol m^{-2} s^{-1} PAR) για τα ολικά λιπαρά, τους ολικούς υδατάνθρακες, χλωροφύλλες a & b,ολικές χλωροφύλλες και ολικά καροτενοειδή. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^{o}C. Ο υπολογισμός έγινε σε μg/μl PCV και τροποποιήθηκε προσεγγιστικά σε μg/mg DW.

3.3 Ανάπτυξη μικροφυκών στο χαμηλό φως (50 μmol m^{-2} s^{-1})

Οι πειραματικές προσεγγίσεις συνεχίστηκαν αυξάνοντας το φωτισμό στα 50 μmol m^{-2} s^{-1} όπου εξετάσαμε ξανά τις ίδιες συγκεντρώσεις CO_2. Τα κύτταρά μας ξεκινούν με μια πολύ καλή φωτοσυνθετική κατάσταση της τάξης του Fv/Fm≈0,65. Όπως βλέπουμε στην Εικόνα 3.13, έχουμε ήδη περάσει σε ένα φωτισμό ο οποίος καταπονεί το φωτοσυνθετικό μηχανισμό της *Chlorella vulgaris* αφού η πορεία του δείκτη μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης των χειρισμών της ατμοσφαιρικής συγκέντρωσης CO_2 είναι σταθερά πτωτικός έως ότου φτάσει την 6η ημέρα γύρω στο 0,47. Ωστόσο, ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του ανόργανου άνθρακα, τόσο σταθερότερη είναι η φωτοσυνθετική κατάσταση με το κύτταρο να καταφέρνει να προσαρμοστεί στις νέες συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, η πορεία της συγκέντρωσης 1% CO_2 είναι όμοια με την ατμοσφαιρική συγκέντρωση καταλήγοντας στο ίδιο σημείο παρόλο που οι τιμές του Fv/Fm κατά τη διάρκεια του πειράματος είναι ελαφρώς υψηλότερες. Ως εδώ τα κύτταρά καταφέρνουν να διατηρούν μια πολύ καλή φωτοσυνθετική κατάσταση (Fv/Fm > 0,6) για τις πρώτες 2 ημέρες. Πτωτική τάση με τιμές υψηλότερες από την αμέσως προηγούμενη μεταχείριση έχει παράλληλα και το 5% CO_2 το οποίο καταλήγει σε Fv/Fm≈ 0,52 το οποίο διατηρεί πολύ καλή φωτοσυνθετική κατάσταση για 3 με 4 ημέρες. Με την ίδια λογική, ακολουθεί το 10% CO_2 που την διατηρεί για 5 ημέρες καταλήγοντας περίπου στο 0,57. Στη συνέχεια, από στις συγκεντρώσεις 15% , 20% και 30% CO_2 η κατάσταση διατηρείται πολύ καλή όλες τις ημέρες φτάνοντας στο 0,62, το 0,64 και το 0,66 αντίστοιχα, ενώ παρατηρείται μια μικρή αλλά αισθητή πτώση στα μέσα περίπου του πειράματος. Στο 40% CO_2 φαίνεται ότι το μικροφύκος μας δεν μπορεί να αντέξει απόλυτα την πίεση του ταυτόχρονα υψηλού φωτισμού και υψηλού διοξειδίου του άνθρακα με την φωτοσυνθετική απόδοση να πέφτει στο εύρος του απλά καλού τερματίζοντας κοντά στο 0,55. Όπως και στον πολύ χαμηλό φωτισμό έτσι κι εδώ επιλέξαμε να σταματήσουμε τη μελέτη μας στο 60% CO_2 εφόσον καταγράψαμε ταχύτατη πτώση της φωτοσυνθετικής απόδοσης φτάνοντας σε πολύ χαμηλές τιμές Fv/Fm= 0,31.

Η φωτοσυνθετική δραστηριότητα της Εικόνας 3.14 δείχνει κορύφωση για ακόμη μια φορά στις μεταχειρίσεις με πολύ υψηλές ποσοστώσεις CO_2 . Αρχικά, ο ατμοσφαιρικός αέρας δίνει περίπου 1,5 μlO_2.μl $PCV^{-1}.h^{-1}$ με το 1% και 5% CO_2 να αγγίζουν περίπου το διπλάσιο. Στη συνέχεια το 10% - 15% CO_2 αγγίζει το 5 και το 20% φτάνει περίπου στα 5,5 μlO_2.μl $PCV^{-1}.h^{-1}$. Είναι σαφές πως οι μέγιστες τιμές φωτοσυνθετικής δραστηριότητας στο χαμηλό φωτισμό είναι περίπου 9 μlO_2.μl $PCV^{-1}.h^{-1}$ και πάνω από 7 μlO_2.μl $PCV^{-1}.h^{-1}$ στα 40% CO_2 και 30% CO_2 αντίστοιχα, ενώ για ακόμη μια φορά περαιτέρω αύξηση χαμηλώνει την τιμή γύρω στο 6 μlO_2.μl $PCV^{-1}.h^{-1}$.

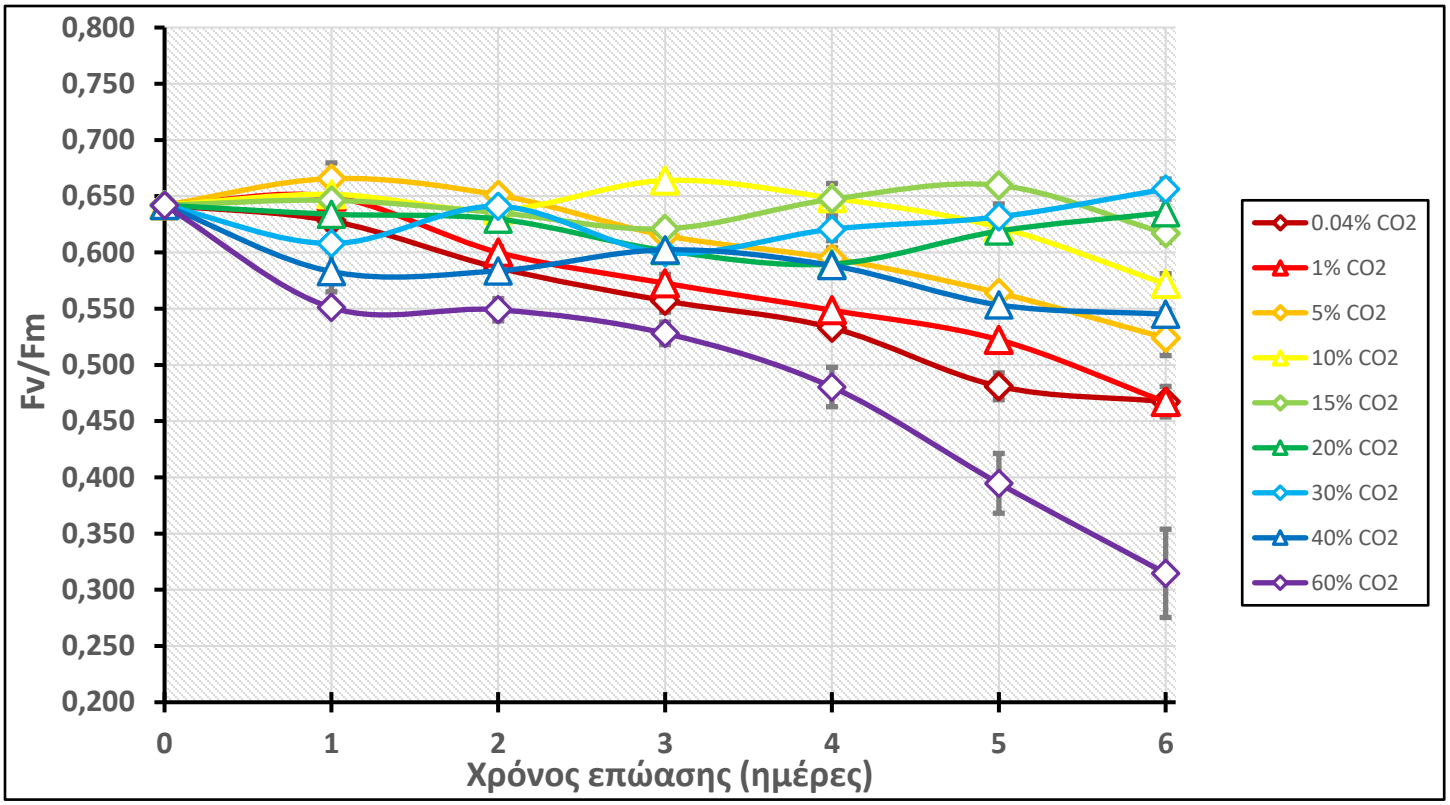
Εξετάζοντας τους αναλυτικότερους δείκτες του OJIP test στην Εικόνα 3.15 επιβεβαιώνουμε τα παραπάνω αποτελέσματα. Ο χαμηλός φωτισμός των 50 μmol.m^{-2}.s^{-1} ασκεί μερική πίεση εφόσον στον χειρισμό με την ατμοσφαιρική συγκέντρωση 0,04% CO_2 παρατηρείται η εξής εικόνα: RC/Cs↓ κατά 64% ± 2%, Abs/RC↑

κατά 50%, PSIo↓ κατά 63% ± 1%, DIo/RC↑ κατά 121% ±6% και PI(abs)↓ κατά 93%. Στεκόμαστε στο γεγονός ότι παρόλο που η πυκνότητα των κέντρων αντίδρασης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού πέφτει σημαντικά αλλά όχι δραματικά, το κύτταρο μειώνει τη φωτοχημική του απόσβεση (PSIo) σε πολύ χαμηλά επίπεδα, κοντά στο 1/3 της αρχικής κατάστασης. Παρόμοια δυναμική σημειώνει και το 1% CO_2 με την κατάσταση να ξεκινά να μετριάζεται στο 5% CO_2. Στο 10% CO_2 καταγράφουμε τα πρώτα σημάδια βελτίωσης της λειτουργικότητας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού με αύξηση των ενεργών κέντρων (RC/Cs) με παράλληλη διατήρηση του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής κεραίας ανά κέντρο αντίδρασης (Abs/RC). Η φωτοχημική απόσβεση (PSIo) παραμένει χαμηλή αυτή τη φορά όμως πάνω από το 80% της αρχικής κατάστασης με τις διαρροές ενέργειας ανά κέντρο αντίδρασης (DIo/RC) σαφέστατα μικρότερες από τις παραπάνω συγκεντρώσεις CO_2. Είναι μάλιστα πολύ κοντά στην αρχική κατάσταση με την επίδοση ανά απορροφηθείσα ενέργεια (PI(abs)) να φτάνει πλέον γύρω στο 50% της αρχικής κατάστασης. Στο 15% CO_2 και 20% CO_2 έχουμε λίγο μεγαλύτερη αύξηση στην πυκνότητα των ενεργών κέντρων με τις υπόλοιπες μεταβλητές να ακολουθούν όμοια πορεία με την αμέσως προηγούμενη συγκέντρωση που εξετάσαμε. Στο 30% CO_2 βλέπουμε ότι παρόλο που τα RC/Cs αυξάνονται κι εδώ, έχουμε αύξηση και στην Abs/RC που μειώνει τη φωτοχημική (PSIo) και αυξάνει τη μη φωτοχημική απόσβεση (DIo/RC) περαιτέρω, κρατώντας την PI(abs) σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Στο 40% CO_2 κρατούνται στο ίδιο υψηλό επίπεδο τα ενεργά κέντρα ενώ η απορρόφηση ανά κέντρο αντίδρασης αυξάνεται κοντά στο 60% της αρχικής κατάστασης. Αυτό ρίχνει την πρωτογενή φωτοχημεία στο 1/3 κι αυξάνει τις ενεργειακές διαρροές κοντά στο 130% στο πέρας του πειράματος με την PI(abs) να φτάνει κάτω από 10%. Τέλος, στο 60% CO_2, το έντονο στρες είναι για άλλη μια φορά ξεκάθαρο με το μοτίβο καταπόνησης (RC/Cs↓, Abs/Rc↑, PSIo↓, DIo/RC↑ και PI(abs)↓) να εμφανίζεται από τις πρώτες ημέρες. Για να δώσουμε μια σαφή εικόνα αρκεί να αναφέρουμε πως οι ενεργειακές διαρροές DIo/RC αυξάνονται κατά 440% ± 48%!

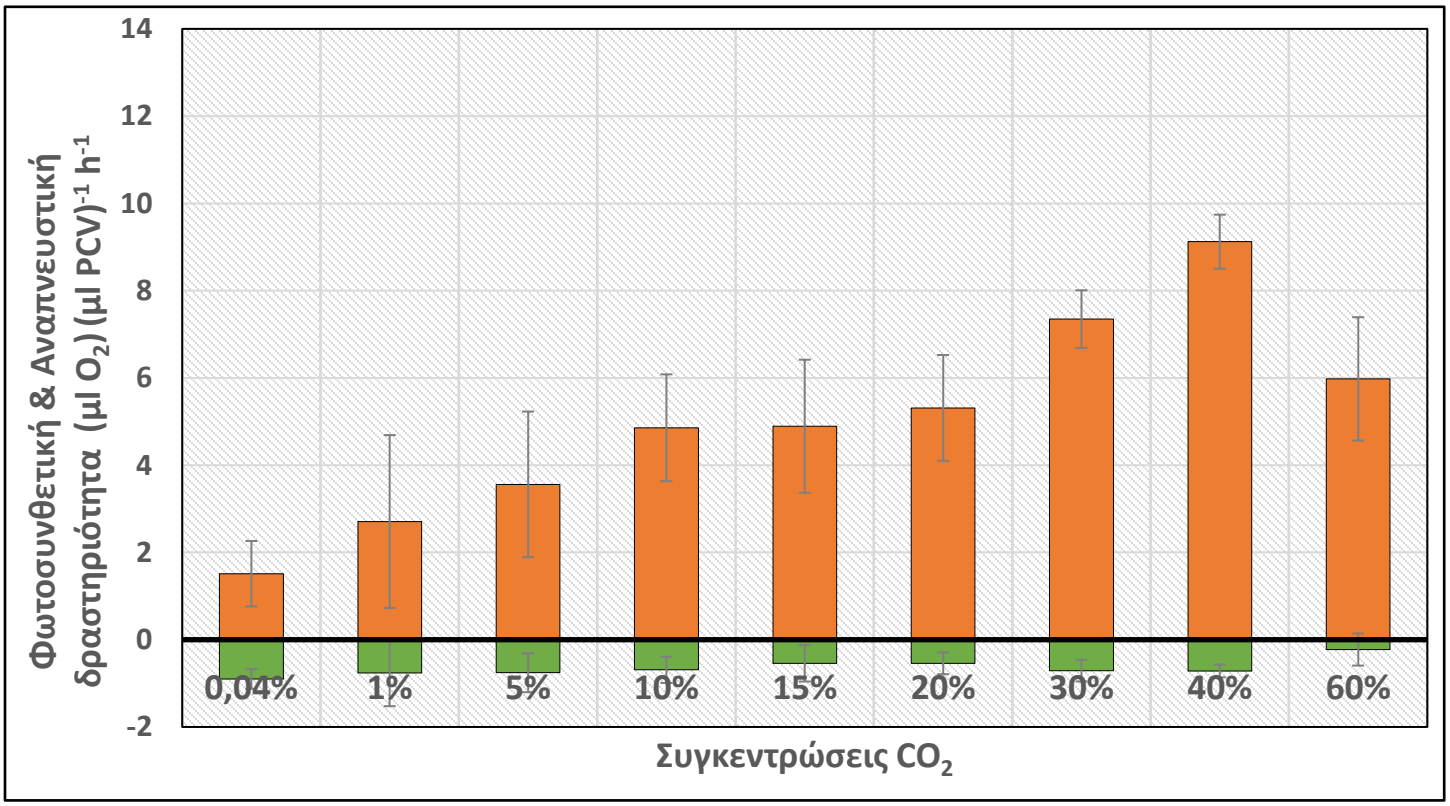
Στην φωτοσυνθετική παραγωγή O_2 της Εικόνας 3.16 βλέπουμε και σε αυτό το φωτισμό το ίδιο μοτίβο με τον αμέσως προηγούμενο. Αξίζει βέβαια να σημειωθεί μεταξύ 0,04% CO_2 έως 20% CO_2 η μέγιστη παραγωγή O_2 είχε επιτευχθεί κοντά στην $4^η$ ημέρα από την οποία και μετά είχαμε σταθεροποίηση και μικρή αλλά μετρήσιμη πτώση του O_2 λόγω της αναπνοής. Αυτό πιθανότατα υποδηλώνει ότι μόνο οι μεταχειρίσεις 30% CO_2 - 60% CO_2 είχαν περίσσεια CO_2 για να συνεχίσουν τη φωτοσύνθεση με το δικό τους ρυθμό πέραν της ημέρας αυτής καθώς τα μέγιστα τους είναι ξεκάθαρα την $6^η$ και τελευταία ημέρα του πειράματος. Το 30% CO_2 και 40% CO_2 βρίσκονται ξανά στην κορυφή με παραγωγή O_2 γύρω στα 23 και 24 ml αντίστοιχα. Ακολουθούν το 20% CO_2 στα 14 ml ενώ μετά είναι το 60% CO_2 στα 13 ml. Έπειτα, έχουμε το 15% CO_2 με 12 ml και το 5% CO_2 με 5 ml . Το τελευταίο μόλις την $4^η$ ημέρα βρέθηκε να έχει λίγο χαμηλότερα από 7 ml. Ακολουθούν με πολύ μικρή τελική παραγωγή τα 1% CO_2 και 0,04% CO_2 κάτω από 1 ml ενώ την $4^η$ ημέρα είχαν βρεθεί οι καλλιέργειες τους με πάνω από 2 ml O_2. Να επισημάνουμε ότι δεν ανιχνεύσαμε H_2 σε καμία μεταχείριση.

Όσον αφορά την αύξηση της βιομάζας για τον χαμηλό φωτισμό των 50 μmol^{-2} s^{-1}, βλέπουμε στην Εικόνα 3.17 ότι το σύνολο των τιμών είναι αρκετά μεγαλύτερο από τον αμέσως προηγούμενο φωτισμό των 10 μmol^{-2} s^{-1}. Πιο συγκεκριμένα, το 0,04% CO_2 πλέον αγγίζει το 1,5 ± 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας ενώ το 1% CO_2 και το 5% CO_2 το 1,7 ± 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας. Στη συνέχεια, το 10% CO_2 φτάνει μέχρι το 2,1 ± 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας, ενώ μεταξύ 15% CO_2 και 40% CO_2 έχουμε το σύνολο με τις υψηλότερες αλλά ταυτόχρονα παραπλήσιες τιμές. Αναλυτικότερα, το 15% CO_2 φτάνει το 2,7 ± 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας, το 20% CO_2 φτάνει το 2,6 ± 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας, το 30% CO_2 3,5 ± 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας ενώ το 40% δίνει την υψηλότερη τιμή στα 3,8 ± 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας. Στο 60% CO_2 έχουμε ξανά χαμηλότερη απόδοση με τη βιομάζα να φτάνει στο 2,1 ± 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας.

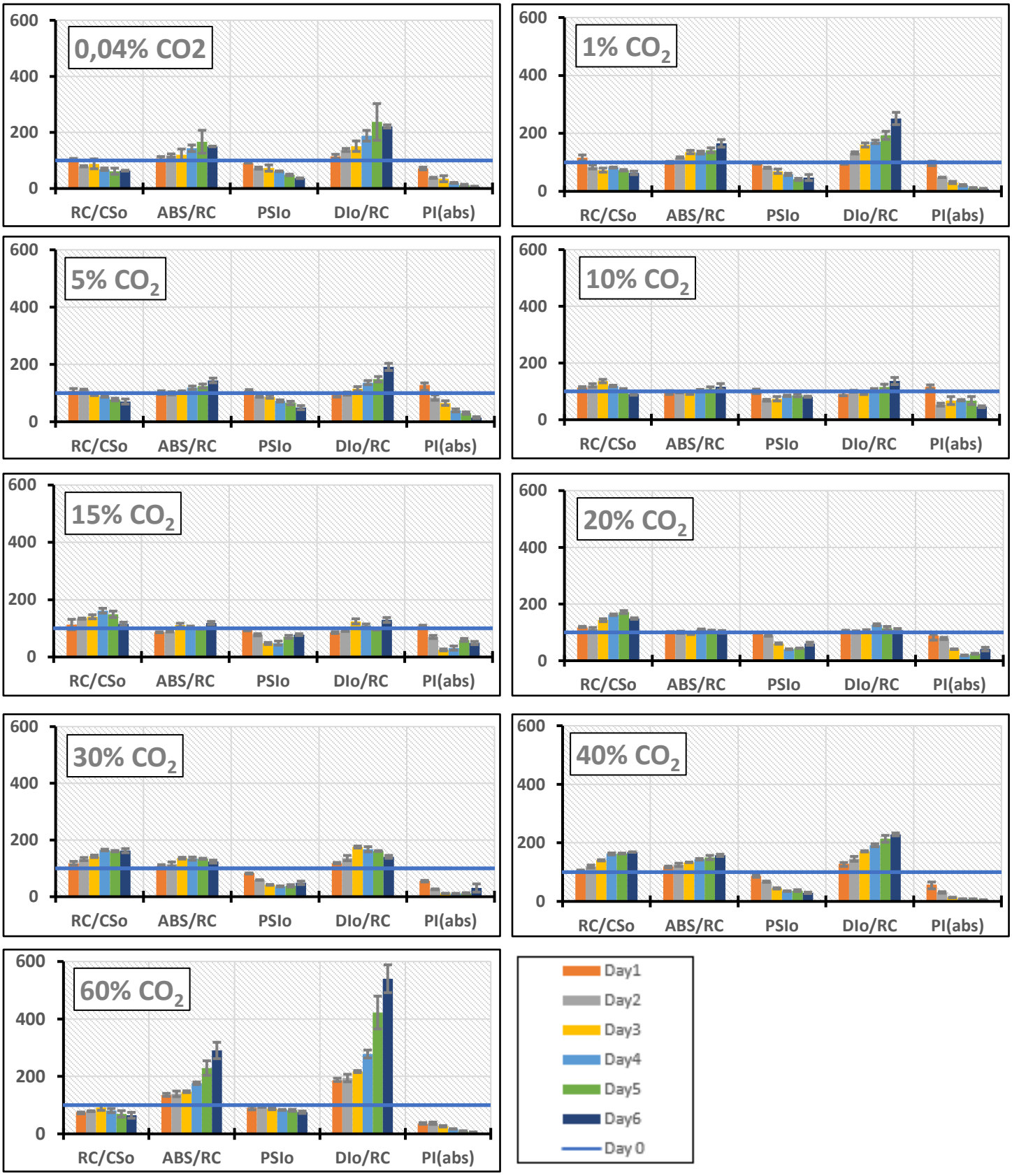
Στην Εικόνα 3.18 ξεκινάμε ξανά με τους υδατάνθρακες σε ένα επίπεδο γύρω στο 31% DW την ημέρα 0 του πειράματος. Το 0,04% CO_2 λόγω έλλειψης πόρων καταναλώνει τα σάκχαρά του, διαμορφώνοντας τιμές υδατανθράκων την τελευταία ημέρα του πειράματος γύρω στο 19% DW. Αντίθετα, στο 30% CO_2 και στο 60% CO_2 έχουμε μια κορύφωση την 1^{η} ημέρα επώασης στο 58% DW και στο 49% DW αντίστοιχα, τα οποία στη συνέχεια επενδύονται πιθανότατα στην ανάπτυξη και καταναλώνονται, διαμορφώνοντας στο τέλος του πειράματος τιμές υδατανθράκων γύρω στα 21% DW και 37% DW αντίστοιχα. Όσον αφορά τα λιπαρά, με αρχική τιμή γύρω στο 7% DW έχουμε μείωση σε όλες τις μεταχειρίσεις με το 0,04% CO_2 και το 30% CO_2 να φτάνουν γύρω στο 3,5% DW και το 60% CO_2 λίγο υψηλότερα στο 5% DW. Οι χλωροφύλλες στην προκειμένη περίπτωση κινούνται αντίστροφα. Δηλαδή από περίπου 6% DW φτάνουν περίπου στο 5% DW στον ατμοσφαιρικό αέρα ενώ στο 30% CO_2 και στο 60% CO_2 πέφτουν κάτω από 4% DW. Η εκτίμηση των καροτενοειδών δίνει τιμές κοντά στις αρχικές γύρω στα 0,5-0,6% DW.



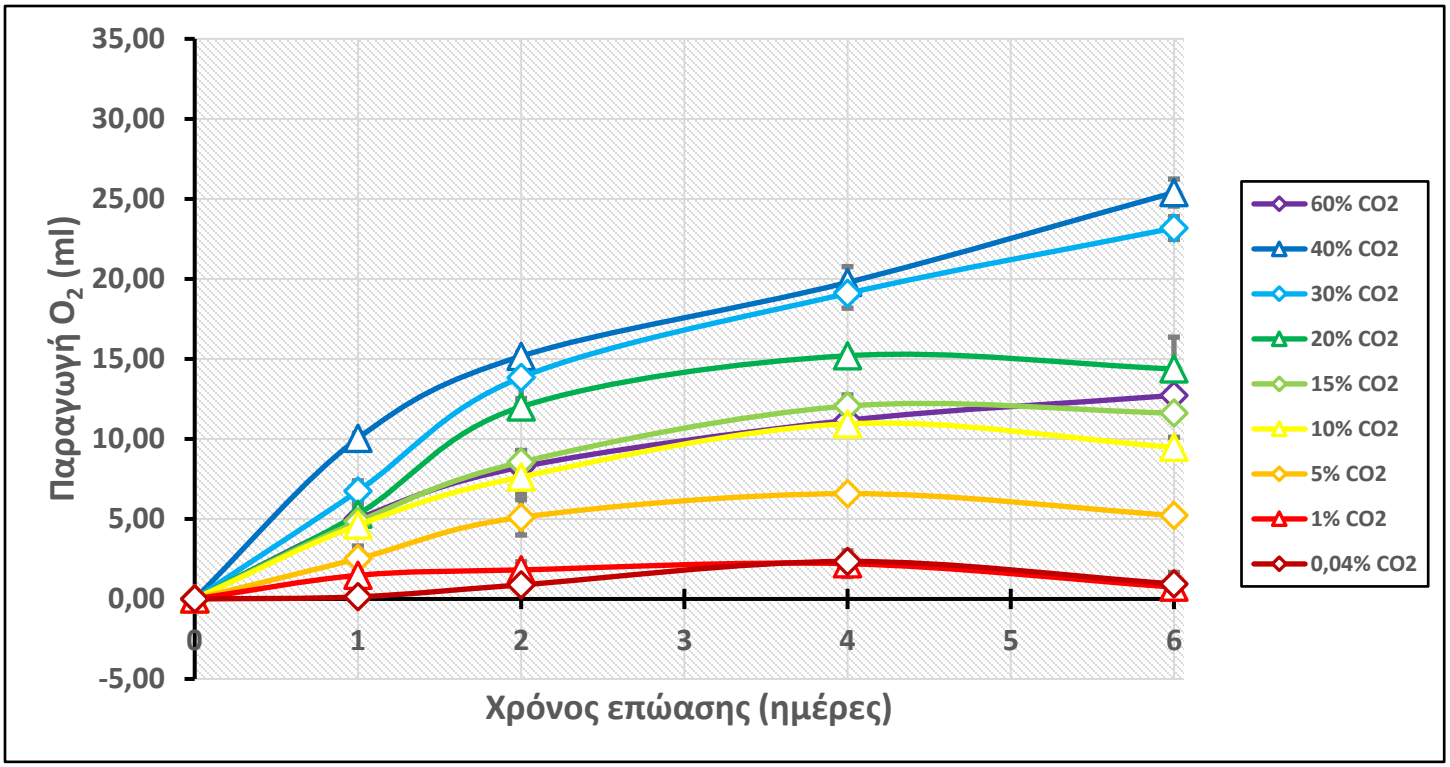
Εικόνα 3.13: Κινητική του λόγου Fv/Fm (OJIP test) ως δείκτης της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης κατά τη διάρκεια της επώασης. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες στο χαμηλό φως (50 μmol m^{-2} s^{-1}) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^{o}C.



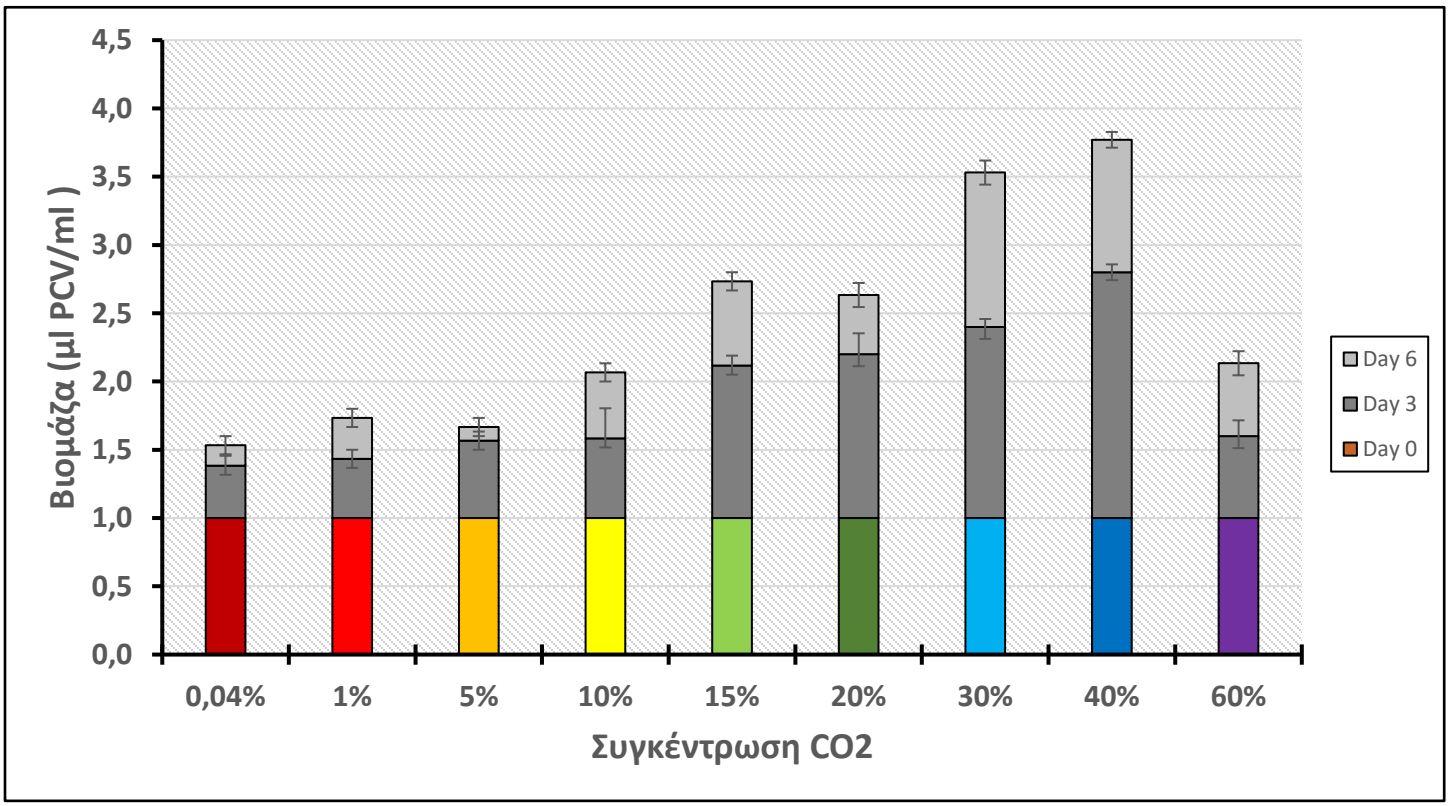
Εικόνα 3.14: Ρυθμός καθαρής φωτοσυνθετικής και αναπνευστικής δραστηριότητας για καλλιέργειες που επωάστηκαν στο χαμηλό φως (50 μmol m^{-2} s^{-1}) [8 ώρες σκοτάδι –16 ώρες φως]. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^{o}C.



Εικόνα 3.15: Αναλυτική παρουσίαση της ποσοστιαίας μεταβολής των σημαντικότερων παραμέτρων του OJIP Test κανονικοποιημένων ως προς την αρχική κατάσταση (Day 0). Όλες οι μεταχειρίσεις με την αναγραφόμενη ποσόστωση 0,04% - 60% CO_2 έγιναν σε τριπλέτες στο χαμηλό φως (50 μmol m^{-2} s^{-1}) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ºC.



Εικόνα 3.16: Φωτοσυνθετική παραγωγή O_2 των κυττάρων ως προς το χρόνο σε ημέρες. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες στο χαμηλό φως (50 μmol m^{-2} s^{-1} PAR) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^oC. Στο διάγραμμα απεικονίζονται και τα τυπικά σφάλματα.



Εικόνα 3.17: Μεταβολή της βιομάζας (μl PCV/ml καλλιέργειας) ως προς τη συγκέντρωση CO_2 στην αέρια φάση του δοχείου για τις ημέρες 0, 3 και 6 (χρώμα εκάστοτε μεταχείρησης, σκούρο γκρι και ανοικτό γκρι αντίστοιχα). Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες σε χαμηλό φως (50 μmol m^{-2} s^{-1}) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^oC.

Για τα ολικά λιπαρά:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	68,24 ± 0,31	68,24 ± 0,31	68,24 ± 0,31
1η ημέρα	52,41 ± 2,84	49,52 ± 2,57	58,45 ± 0,97
3η ημέρα	43,74 ± 1,29	35,19 ± 0,18	47,34 ± 0,75
6η ημέρα	36,04 ± 2,06	33,48 ± 0,65	49,67 ± 2,53

Για τους ολικούς υδατάνθρακες:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	310,32 ± 3,08	310,32 ± 3,08	310,32 ± 3,08
1η ημέρα	300,43 ± 30,75	572,58 ± 20,30	485,88 ± 45,92
3η ημέρα	216,55 ± 12,43	339,59 ± 23,37	354,45 ± 29,58
6η ημέρα	192,88 ± 19,52	209,28 ± 34,35	367,07 ± 35,91

Για τις χλωροφύλλες a:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	45,33 ± 2,61	45,33 ± 2,61	45,33 ± 2,61
1η ημέρα	37,37 ± 1,65	31,63 ± 0,77	34,61 ± 1,94
3η ημέρα	35,72 ± 0,13	25,63 ± 0,41	33,19 ± 0,95
6η ημέρα	31,34 ± 1,01	28,17 ± 0,70	34,70 ± 1,04

Για τις χλωροφύλλες b:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	15,99 ± 6,51	15,99 ± 6,51	15,99 ± 6,51
1η ημέρα	15,44 ± 0,57	13,81 ± 0,43	15,08 ± 1,03
3η ημέρα	13,29 ± 0,44	11,02 ± 0,56	9,83 ± 2,59
6η ημέρα	18,73 ± 3,67	11,01 ± 0,99	4,82 ± 3,75

Για τις ολικές χλωροφύλλες:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	61,32 ± 9,12	61,32 ± 9,12	61,32 ± 9,12
1η ημέρα	52,81 ± 2,21	45,44 ± 1,20	49,69 ± 2,98
3η ημέρα	49,01 ± 0,58	36,66 ± 0,98	43,02 ± 3,54
6η ημέρα	50,07 ± 4,68	39,18 ± 1,69	39,52 ± 4,79

Για τα ολικά καροτενοειδή:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	6,52 ± 0,59	6,52 ± 0,60	6,52 ± 0,61
1η ημέρα	3,47 ± 4,06	1,92 ± 1,78	2,96 ± 0,91
3η ημέρα	5,84 ± 0,96	2,52 ± 1,02	7,21 ± 6,90
6η ημέρα	5,20 ± 0,52	4,74 ± 3,42	6.28 ± 2.48

Εικόνα 3.18: Ποιοτική βιοχημική ανάλυση καλλιεργειών 0,04%, 30% και 60% CO_2 στο χαμηλό φως (50 μmol m^{-2} s^{-1} για τα ολικά λιπαρά, τους ολικούς υδατάνθρακες, χλωροφύλλες a & b, ολικές χλωροφύλλες και ολικά καροτενοειδή. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 °C. Ο υπολογισμός έγινε σε μg.μl PCV^{-1} και τροποποιήθηκε προσεγγιστικά σε μg.mg DW^{-1} χρησιμοποιώντας ανοικτές καλλιέργειες.

3.4 Ανάπτυξη μικροφυκών στο μέτριο φως (100 μmol m^{-2} s^{-1})

Διπλασιάζοντας την ένταση της φωτοσυνθετικά αξιοποιήσιμης ακτινοβολίας περνάμε στα 100 μmol m^{-2} s^{-1}, έναν φωτισμό που ορίζουμε ως μέτριο. Τα κύτταρά μας ξεκινάνε με Fv/Fm≈ 0,7. Στην Εικόνα 3.19 παρατηρούμε όπως και προηγουμένως ότι οι καλλιέργειες στις συνθήκες 0,04% CO_2, 1% CO_2 και 5% CO_2 δεν μπορούν να ανταπεξέλθουν καλά σε αυτό το φωτισμό. Σχηματίζουν ξανά μια ομάδα που ακολουθεί πτωτική τάση της μέγιστης φωτοσυνθετικής τους απόδοσης και καταλήγουν σε τελικές τιμές 0,396, 0,431 και 0,438 αντίστοιχα. Αδιαμφισβήτητα, ο φωτισμός αυτός είναι έντονος εφόσον ασκεί πίεση διέγερσης στο φωτοσύστημα ΙΙ, η οποία μειώνει το Fv/Fm. Στη συνέχεια, στις συγκεντρώσεις μεταξύ 10% CO_2 έως και 40% CO_2 κάνει την εμφάνιση του ένα πολύ ενδιαφέρον φαινόμενο. Όλες οι μεταχειρίσεις περνάνε ένα σοκ την 1η μέρα επώασης λόγω του δυνατού φωτισμού και του διοξειδίου του άνθρακα με αποτέλεσμα να χαμηλώνει το Fv/Fm δραματικά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το 20% CO_2 που φτάνει μέχρι το 0,510. Από την 2η κιόλας ημέρα, όλες οι καλλιέργειες συγχρονισμένα δείχνουν να έχουν προσαρμοστεί στις αντίξοες συνθήκες και να ανακάμπτουν πλήρως φτάνοντας σε κορυφές στο εύρος της πολύ καλής φωτοσυνθετικής απόδοσης με τιμές οι οποίες πλησιάζουν την αρχική κατάσταση. Έπειτα ακολουθεί μια μικρή πτώση σε όλες τι καλλιέργειες. Πιο συγκεκριμένα, το 10% κορυφώνεται στο 0,638 και τερματίζει στο 0,564, το 15% κορυφώνεται στο 0,661 και τερματίζει στο 0,590, το 20% κορυφώνεται στο 0,650 και τερματίζει στο 0,600, το 30% κορυφώνεται στο 0,627 και τερματίζει στο 0,608 και το 40% κορυφώνεται στο 0,609 και τερματίζει στο 0,583. Τέλος έχουμε ξανά το 60% CO_2 όπου ακολουθεί μια αργή πτωτική πορεία φτάνοντας στο 0,465.

Προτού περάσουμε στα αναλυτικά δεδομένα από το OJIP test η Εικόνα 3.20 μας δίνει μια καθαρή ματιά στη φωτοσυνθετική δραστηριότητα των πρώτων ωρών του πειράματος. Βλέπουμε ότι στο μέτριο φωτισμό η μέγιστη τιμή βρίσκεται στις υψηλότερες ποσοστώσεις CO_2 που μελετήσαμε. Πιο συγκεκριμένα, το 60% CO_2 δίνει για τις πρώτες ώρες αρκετά υψηλή φωτοσυνθετική δραστηριότητα κοντά στα 12 μlO_2.μlPCV^{-1}.h^{-1}. Εκτός αυτού, κορύφωση έχουμε ξανά κοντά στο 30% CO_2 με 11 μlO_2.μlPCV^{-1}.h^{-1} , όμοια με το 20% CO_2. Το 40% CO_2 δίνει μια σχετικά μικρότερη τιμή κοντά στο 9,5 μlO_2.μlPCV^{-1}.h^{-1} . Ακολουθούν οι χειρισμοί 15% CO_2 και 10% CO_2 με τιμές κοντά στα 9 μlO_2.μlPCV^{-1}.h^{-1} και 7,5 μlO_2.μlPCV^{-1}.h^{-1} αντίστοιχα. Έπειτα έχουμε το 5% CO_2 με τιμή κοντά στο 4,5 μlO_2.μlPCV^{-1}.h^{-1} και το 0,04% CO_2 και 1% CO_2 με τιμές κοντά στα 2 μlO_2.μlPCV^{-1}.h^{-1} .

Από την Εικόνα 3.21 έχουμε τους αναλυτικούς δείκτες του OJIP test για τον φωτισμό των 100 μmol^{-2}s^{-1}. Η πίεση διέγερσης λόγω του φωτισμού αυτού είναι ξεκάθαρη εφόσον σε όλους τους χειρισμούς που δοκιμάσαμε, από 0,04% CO_2 έως 60% CO_2 παρουσιάζουν μικρότερη πυκνότητα ενεργών κέντρων (↓RC/CS) και μεγαλύτερες φωτοσυλλεκτικές κεραίες ανά ενεργό κέντρο (↑Abs/RC). Αυτές οι αλλαγές οδηγούν σε χαμηλότερη φωτοχημική απόσβεση (↓PSIo), υψηλότερη διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης (↑DIo/RC) με αποτέλεσμα την χαμηλότερη φωτοσυνθετική απόδοση εκφρασμένη ως ↓Fv/Fm ή ↓PI(abs).

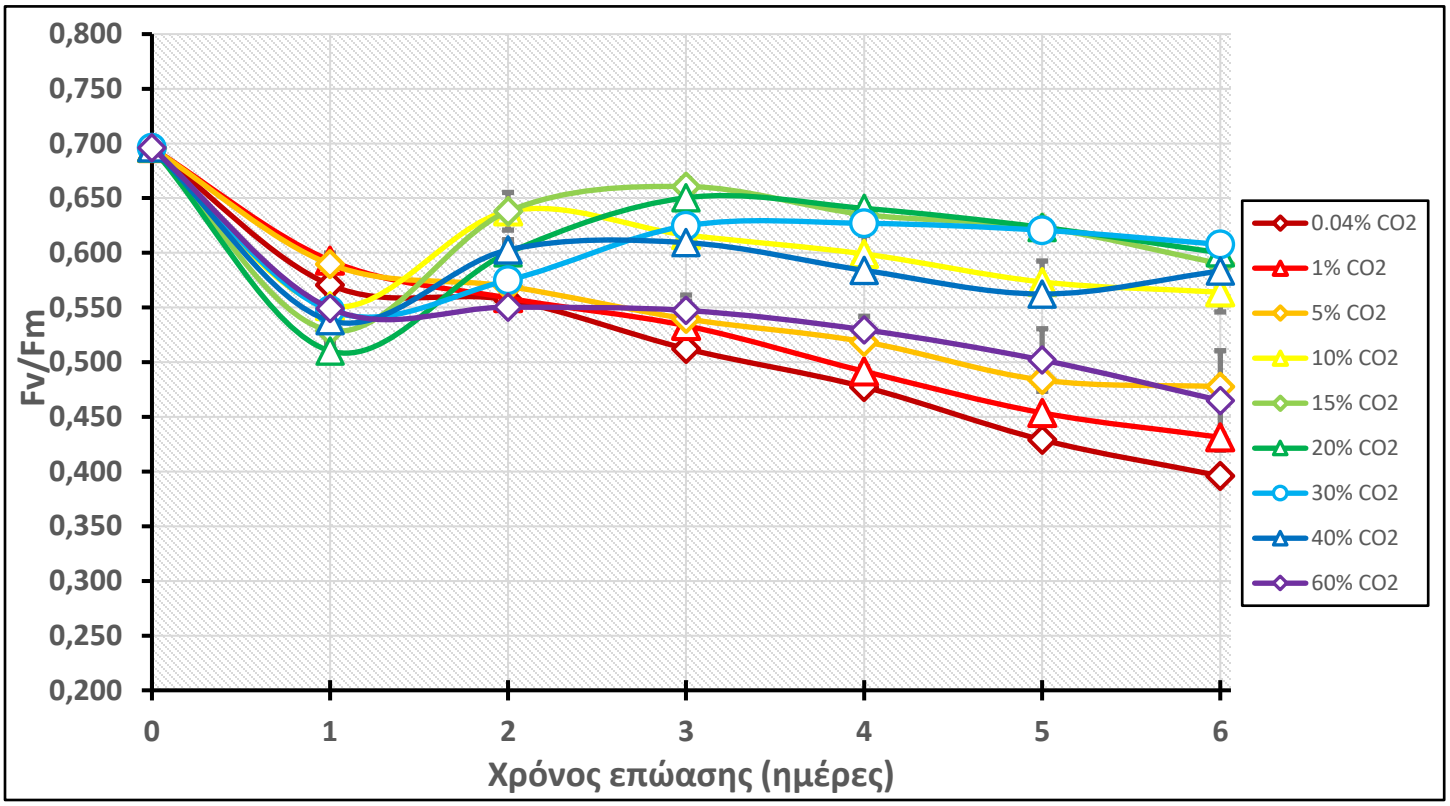
Ωστόσο, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι στην ατμοσφαιρική συγκέντρωση 0,04% CO_2 η φωτοσυνθετική κατάσταση των μικροφυκών βρίσκεται στη χειρότερη κατάσταση κι όσο ανεβαίνει η ποσόστωση του CO_2 στην αέρια φάση, αυτή βελτιώνεται λόγω της ρύθμισης που ασκεί το CO_2 απευθείας στην πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης. Με άλλα λόγια, η διαθεσιμότητα του ανόργανου άνθρακα σε σχέση με την ένταση της ακτινοβολίας είναι και αυτή που καθορίζει κατευθείαν το μέγεθος της φωτοσυνθετικής κεραίας κι όχι ο φωτισμός αυτός καθαυτός. Έπειτα, η αλλαγή αυτή συμπαρασείρει κι όλους του υπόλοιπους παράγοντες καθορίζοντας έτσι τη φωτοσυνθετική κατάσταση. Για να γίνουν τα πράγματα πιο κατανοητά, αρκεί να δείξουμε ότι τα RC/CS μειώνονται από την αρχική κατάσταση για τις συνθήκες 0,04% CO_2, 1% CO_2 και 5% CO_2, παραμένουν περίπου ίσα στο χειρισμό 10% CO_2 ενώ αυξάνονται στους χειρισμούς 15% CO_2, 20% CO_2., 30% CO_2 και 40% CO_2. Στο 60% CO_2 γίνονται πάλι περίπου ίσα με την αρχική κατάσταση. Από τα διαγράμματα και το σύνολο των μεταβλητών του OJIP test βλέπουμε ότι για να ανταπεξέλθει το μικροφύκος σε αυτό το φωτισμό χρειάζεται μεγάλες ποσοστώσεις άνθρακα με βέλτιστα αποτελέσματα κοντά στα 30% CO_2, δηλαδή συγκέντρωση περίπου 750 φορές μεγαλύτερη από αυτήν της γήινης ατμόσφαιρας σήμερα.

Συνεχίζουμε στην ενότητα του μετρίου φωτισμού με το διάγραμμα της Εικόνας 3.22. Η μέγιστη παραγωγή O_2 σε όλες σχεδόν τις μεταχειρίσεις επιτυγχάνεται κοντά στην $4^η$ ημέρα ενώ η μεγαλύτερη παραγωγή εξακολουθεί να γίνεται $1^η$ ημέρα με περίπου το μισό φωτοσυνθετικά παραγόμενο O_2 να ανιχνεύεται εκεί. Πιο αναλυτικά, τα βέλτιστα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο χειρισμός 40% CO_2 παράγει 27 ml O_2, ακολουθούμενο από το 30% CO_2 αλλά και το 60% CO_2 κοντά στα 20 ml. Στη συνέχεια, έχουμε το 20% CO_2 με 17 ml και το 15% CO_2 με 13,5 ml. Έπειτα, το 10% CO_2 με 10 ml, το 5% CO_2 με λίγο χαμηλότερα από το μισό. Τέλος έχουμε το 1% CO_2 και το 0,04% CO_2 με πολύ χαμηλές παραγωγές οξυγόνου στα 1 ml και 0,5 ml αντίστοιχα.

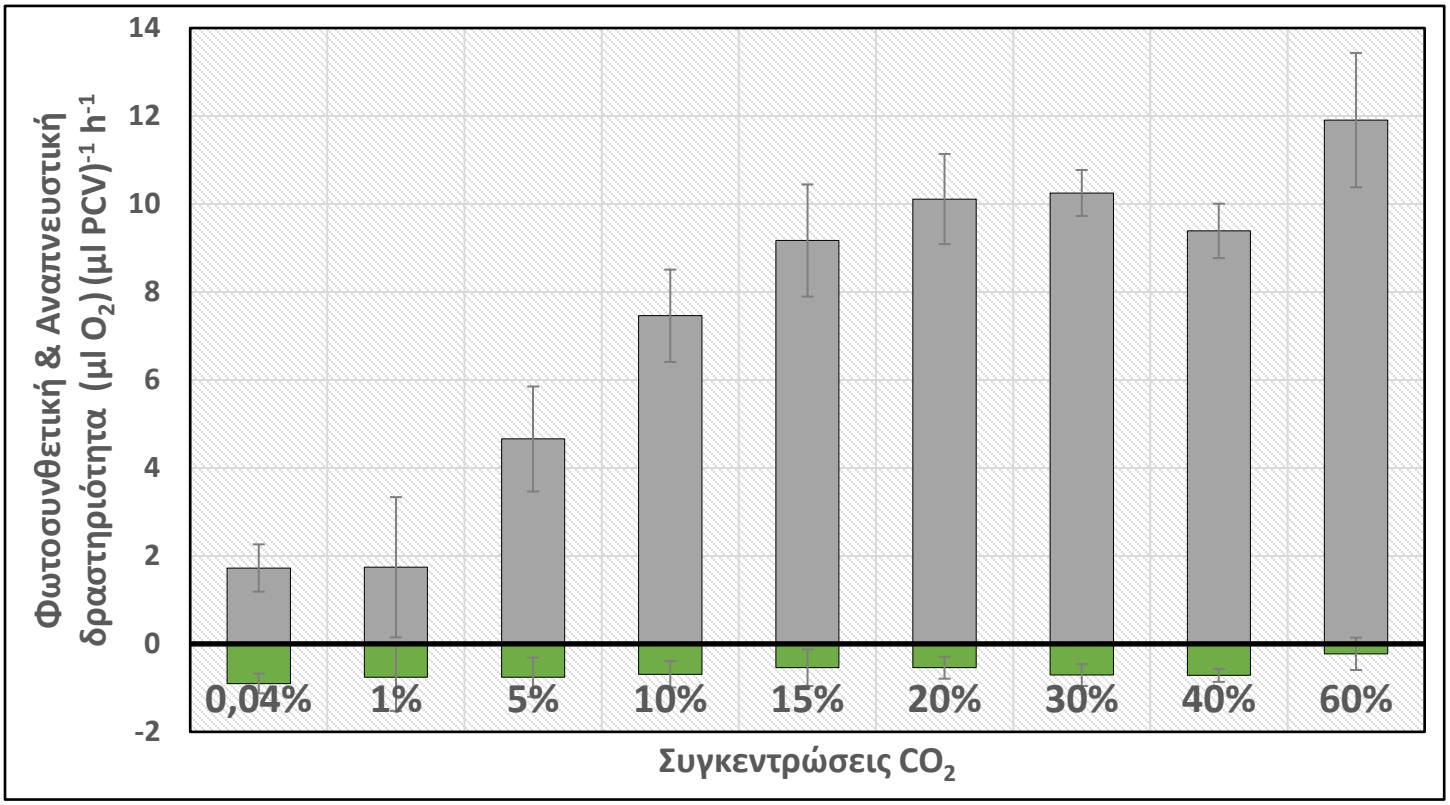
Η μεταβολή της βιομάζας σε σχέση με την ποσόστωση του CO_2 στο φωτισμό των 100 $\mu mol^{-2}\ s^{-1}$ δίνει μια ξεκάθαρη εικόνα στο διάγραμμα της Εικόνας 3.23. Όσο περισσότερο ανεβάζουμε το διαθέσιμο ανόργανο άνθρακα, τόσο μεγαλύτερη είναι η αναπαραγωγή του μικροφύκους με μέγιστα αποτελέσματα γύρω στο 30% CO_2 - 40% CO_2 . Πιο αναλυτικά, η ατμοσφαιρική συγκέντρωση CO_2 φτάνει τα 1,3 ± 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας, το 1% CO_2 τα 1,5 ± 0,05 μl PCV / ml καλλιέργειας και τα 5% CO_2 τα 1,8 ± 0,05 μl PCV / ml καλλιέργειας αντιπροσωπεύοντας το χαμηλό εύρος τιμών. Στο χειρισμό με 10% CO_2 οι τιμές της παραγόμενης βιομάζας φτάνουν το 2,1 ± 0,1 PCV, στο χειρισμό 15% CO_2 φτάνουν οι τιμές το 2,8 ± 1,5 μl PCV / ml καλλιέργειας, στον χειρισμό 20% CO_2 φτάνουν στο 3 ± 0,05 μl PCV / ml καλλιέργειας, στον χειρισμό 30% CO_2 φτάνουν στο 3,8 ± 0,2 μl PCV / ml καλλιέργειας και στον χειρισμό 40% CO_2 φτάνουν στο 4,2 ± 0,2 μl PCV / ml καλλιέργειας. Ο χειρισμός 60% CO_2 παρουσιάζει αισθητά χαμηλότερη αύξηση της βιομάζας στα 2,6 ± 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας. Αντιλαμβανόμαστε λοιπόν ότι οι υψηλότερες τιμές βιομάζας που φτάνει το μικροφύκος είναι

στους χειρισμούς των 30% CO_2 και 40% CO_2, ενώ αξίζει να παρατηρήσουμε ότι από 15% CO_2 έως 40% CO_2 οι καλλιέργειες έχουν πιάσει μέγιστο αριθμό ανάπτυξης το πρώτο μισό του πειράματος αφού στις 3 ημέρες έχουν αποτελέσματα σχεδόν πανομοιότυπα. Οι τελικές διαφορές σχηματίζονται στο δεύτερο μισό του πειράματος όπου τα κύτταρα με αρχικά μεγαλύτερες ποσοστώσεις CO_2, έχουν διαθέσιμο υπόλοιπο για να συνεχίσουν τη φωτοσυνθετική παραγωγή βιομάζας.

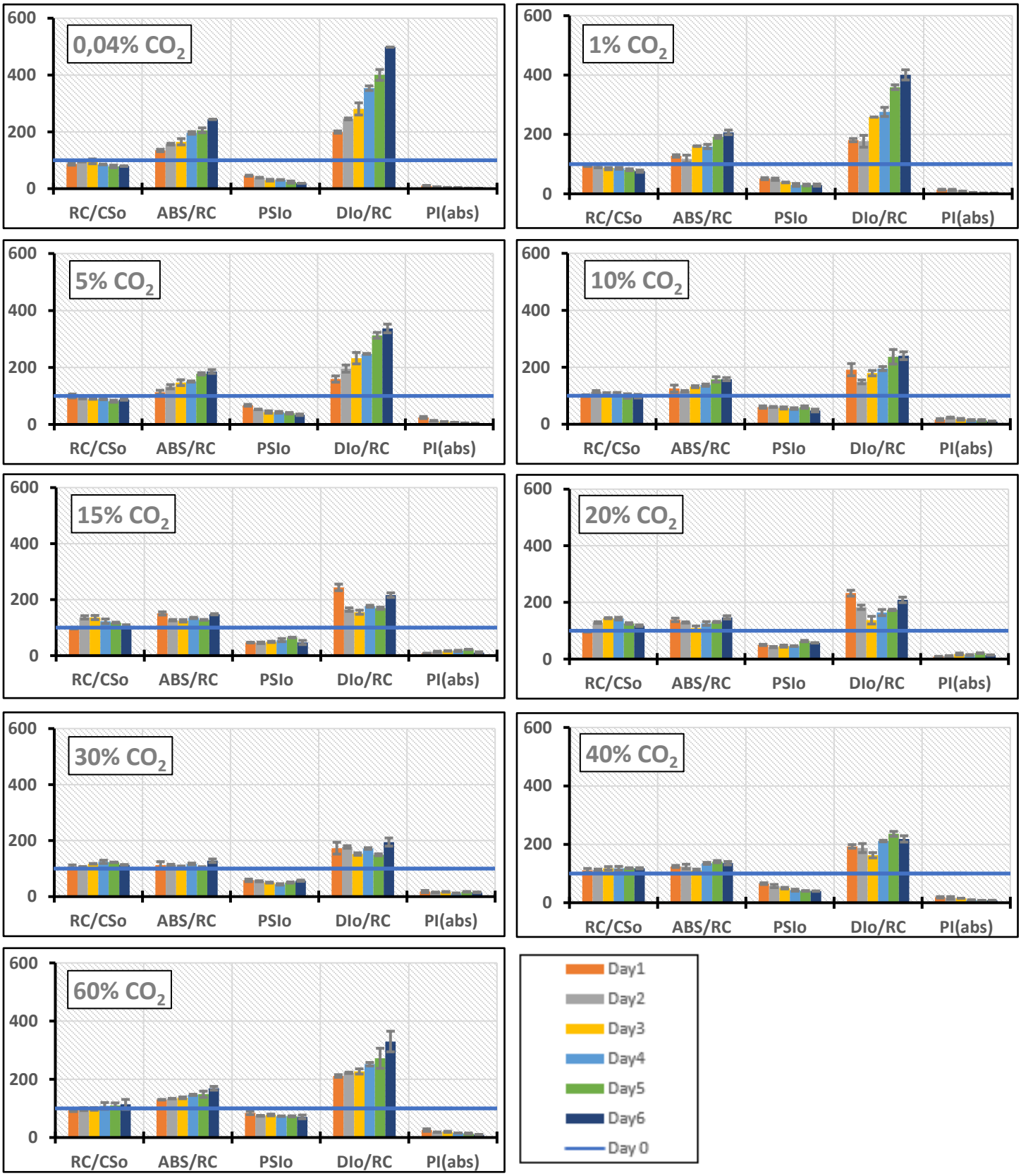
Η βιοχημική ανάλυση της βιομάζας του μικροφύκους για τα 100 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ εξετάζεται στην Εικόνα 3.24. Σε ένα γενικότερο πλαίσιο, η καλλιέργεια δείχνει να ακολουθεί την ίδια στρατηγική με τον αμέσως προηγούμενο φωτισμό. Πιο συγκεκριμένα, ξεκινάμε τις καλλιέργειές μας με υδατάνθρακες γύρω στο 36% DW με το 0,04% CO_2 συνεχώς να τους καταναλώνει φτάνοντάς τους στο 19% DW. Ταυτόχρονα, στο 30% CO_2 και 60% CO_2 βλέπουμε ξανά μέγιστα την $1^η$ μέρα γύρω στα 48% DW και 42% DW τα οποία στη συνέχεια μειώνονται γύρω στο 24-25% DW. Οι μετρήσεις των λιπαρών λένε μια παρόμοια ιστορία. Το 0,04% CO_2 και το 30% CO_2 καταναλώνουν τα λιπαρά τους φτάνοντας τα από περίπου 9% DW σε μόλις 6% DW την $6^η$ ημέρα του πειράματος. Το 60% CO_2 καταφέρνει να τα διατηρήσει περίπου στο 9-10% DW τουλάχιστον μέχρι την $3^η$ ημέρα από την οποία ύστερα την $6^η$ ημέρα τα είχε ρίξει λίγο χαμηλότερα από τους προηγούμενους δύο χειρισμούς. Περνώντας στις ολικές χλωροφύλλες διακρίνουμε πως το 0,04% CO_2 τις μειώνει από 8% DW σε περίπου 5% DW ενώ το 30% CO_2 και το 60% CO_2 τις μειώνουν ακόμα περισσότερο στο 3% και 2% DW αντίστοιχα. Τα καροτενοειδή δείχνουν να αυξάνονται στη μεταχείριση με την έλλειψη ανόργανου άνθρακα ενώ στις άλλες 2 διατηρούνται γύρω στο 0,3-0,4% DW.



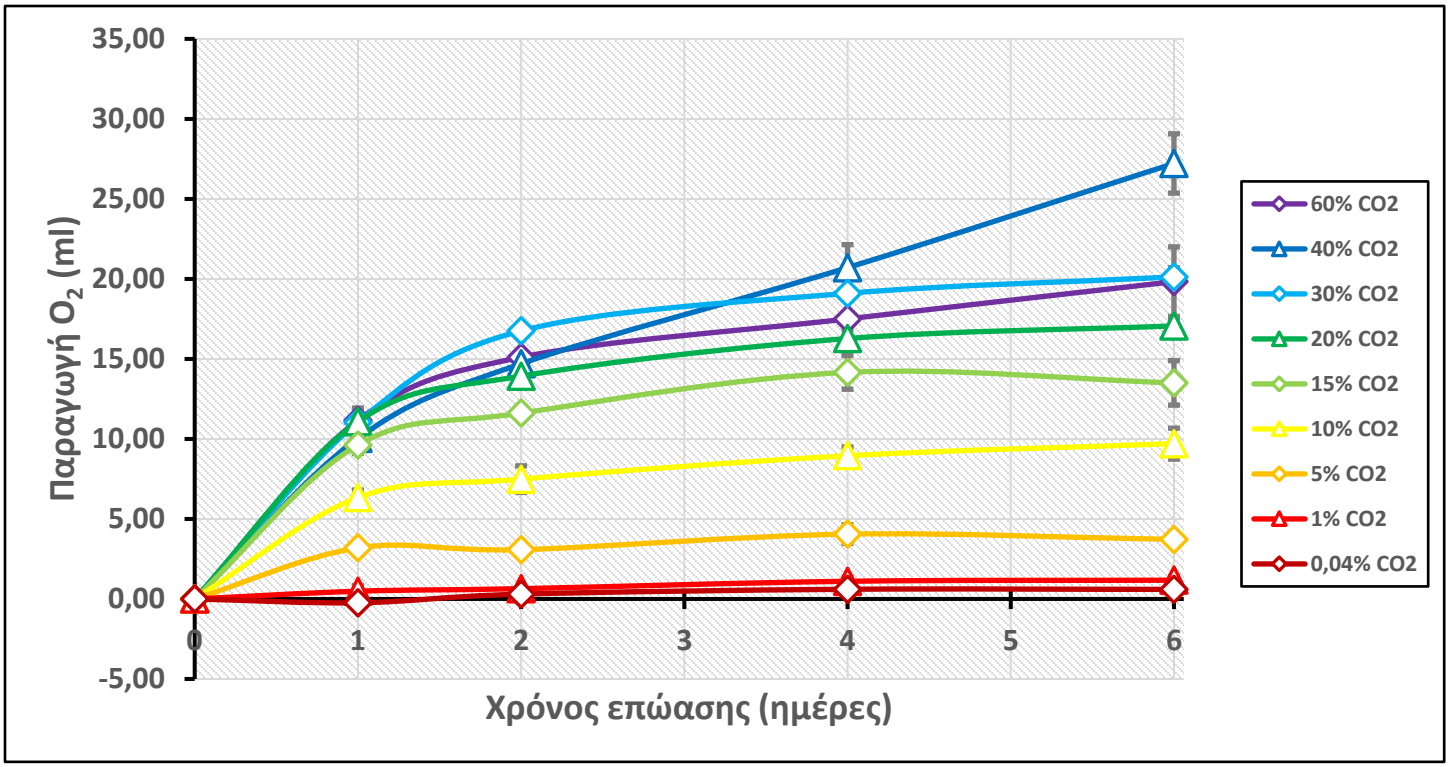
Εικόνα 3.19: Κινητική του λόγου Fv/Fm (OJIP test) ως δείκτης της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης κατά τη διάρκεια της επώασης. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες στο μέτριο φως (100 μmol m^{-2} s^{-1}) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^{o}C.



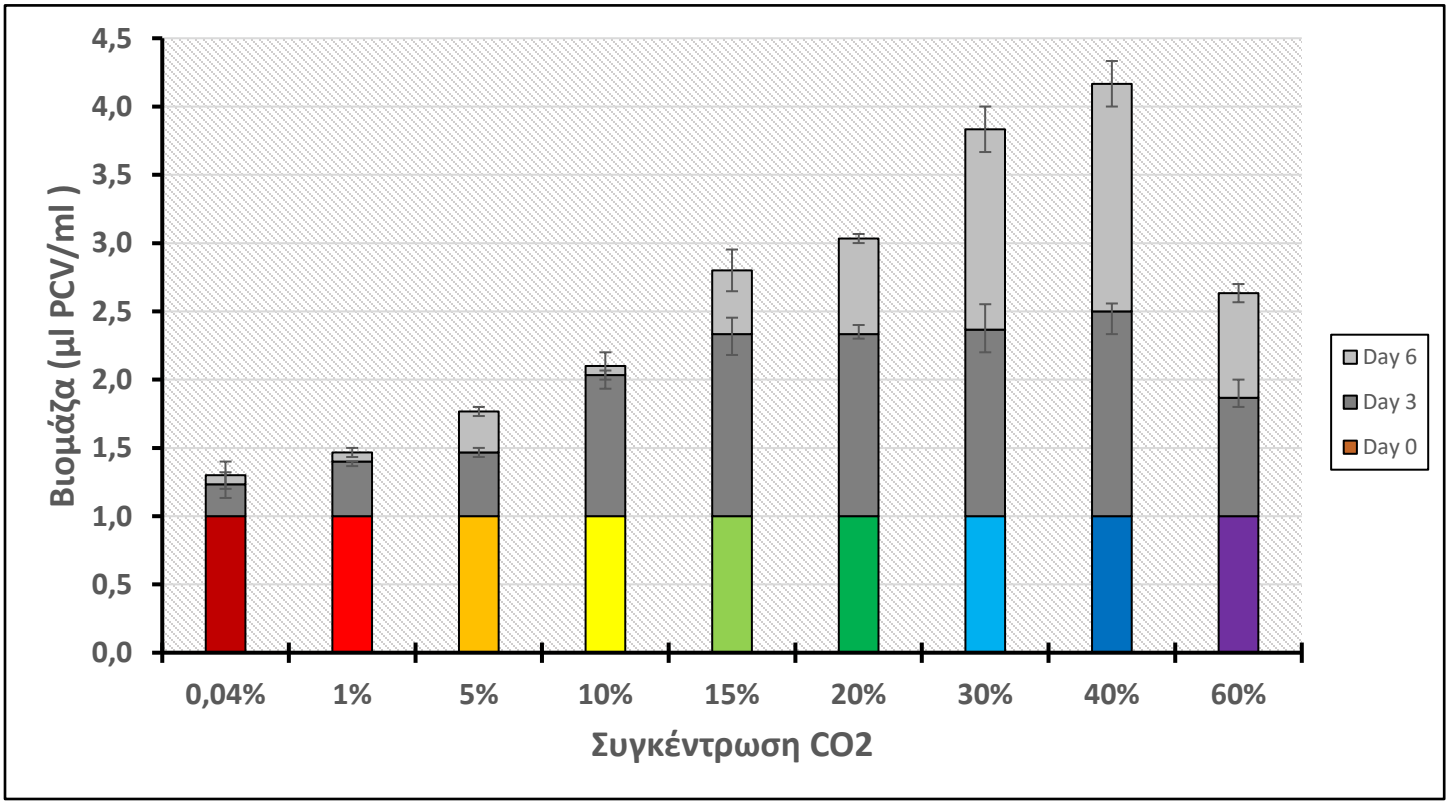
Εικόνα 3.20: Ρυθμός καθαρής φωτοσυνθετικής και αναπνευστικής δραστηριότητας για καλλιέργειες που επωάστηκαν στο μέτριο φως (100 μmol m^{-2} s^{-1}) [8 ώρες σκοτάδι –16 ώρες φως]. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^{o}C.



Εικόνα 3.21: Αναλυτική παρουσίαση της ποσοστιαίας μεταβολής των σημαντικότερων παραμέτρων του OJIP Test κανονικοποιημένων ως προς την αρχική κατάσταση (Day 0). Όλες οι μεταχειρίσεις με την αναγραφόμενη ποσόστωση 0,04% - 60% CO_2 έγιναν σε τριπλέτες στο μεσαίο φως (100 μmol m^{-2} s^{-1}) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ºC.



Εικόνα 3.22: Φωτοσυνθετική παραγωγή O_2 των κυττάρων ως προς το χρόνο. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες στο μέτριο φως (100 μmol m^{-2} s^{-1}) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ºC.



Εικόνα 3.23: Μεταβολή της βιομάζας (μl PCV/ml καλλιέργειας) ως προς τη συγκέντρωση CO_2 στην αέρια φάση του δοχείου για τις ημέρες 0, 3 και 6 (χρώμα εκάστοτε μεταχείρισης, σκούρο γκρι και ανοικτό γκρι αντίστοιχα). Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες σε μέτριο φως (100 μmol m^{-2} s^{-1} PAR) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ºC.

Για τα ολικά λιπαρά:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	92,44 ± 2,88	92,44 ± 2,88	92,44 ± 2,88
1η ημέρα	79,96 ± 3,31	61,90 ± 3,68	97,45 ± 2,84
3η ημέρα	79,90 ± 4,30	82,31 ± 4,59	112,95 ± 3,53
6η ημέρα	62,77 ± 4,04	51,16 ± 0,45	51,00 ± 1,26

Για τους ολικούς υδατάνθρακες:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	356,64 ± 23,46	356,64 ± 23,46	356,64 ± 23,46
1η ημέρα	263,41 ± 19,01	477,98 ± 25,57	418,32 ± 31,30
3η ημέρα	192,8 ± 33,55	309,90 ± 31,50	319,75 ± 19,92
6η ημέρα	186,88 ± 14,88	238,53 ± 46,61	248,39 ± 24,62

Για τις χλωροφύλλες a:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	55,03 ± 0,34	55,03 ± 0,34	55,03 ± 0,34
1η ημέρα	41,40 ± 1,20	28,06 ± 0,69	44,38 ± 1,62
3η ημέρα	38,09 ± 3,08	21,33 ± 1,13	23,18 ± 0,77
6η ημέρα	36,28 ± 1,61	18,46 ± 0,96	13,40 ± 0,66

Για τις χλωροφύλλες b:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	22,21 ± 0,62	22,21 ± 0,62	22,21 ± 0,62
1η ημέρα	16,52 ± 0,35	12,41 ± 0,40	18,91 ± 0,38
3η ημέρα	11,46 ± 1,56	9,52 ± 0,41	11,05 ± 0,42
6η ημέρα	13,83 ± 2,29	8,26 ± 1,23	5,50 ± 0,23

Για τις ολικές χλωροφύλλες:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	77,24 ± 0,96	77,24 ± 0,96	77,24 ± 0,96
1η ημέρα	57,93 ± 1,55	40,47 ± 1,08	63,29 ± 2,00
3η ημέρα	49,54 ± 4,65	30,85 ± 1,55	34,23 ± 1,19
6η ημέρα	50,11 ± 3,90	26,72 ± 2,19	18,91 ± 0,88

Για τα ολικά καροτενοειδή:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	3,63 ± 2,97	3,63 ± 2,98	3,63 ± 2,99
1η ημέρα	2,88 ± 0,79	0,78 ± 1,34	2,40 ± 2,61
3η ημέρα	7,76 ± 2,67	1,81 ± 1,51	1,47 ± 2,71
6η ημέρα	7,14 ± 3,77	3,34 ± 3,40	3,57 ± 1,25

Εικόνα 3.24: Ποιοτική βιοχημική ανάλυση καλλιεργειών 0,04%, 30% και 60% CO_2 στο μέτριο φως (100 μmol m^{-2} s^{-1}) για τα ολικά λιπαρά, τους ολικούς υδατάνθρακες, χλωροφύλλες a & b, ολικές χλωροφύλλες και ολικά καροτενοειδή. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^{o}C. Ο υπολογισμός έγινε σε μg/μl PCV και τροποποιήθηκε προσεγγιστικά σε μg/mg DW.

3.5 Ανάπτυξη μικροφυκών στο υψηλό φως (200 μmol m^{-2} s^{-1})

Σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού (200 μmol m^{-2} s^{-1}) τα μικροφύκη ξεκινάνε από μια πολύ καλή φωτοσυνθετική κατάσταση με Fv/Fm≈ 0,7. Στην Εικόνα 3.25 παρατηρούμε ότι η καταπόνηση των κυττάρων μεγαλώνει για ακόμη μια φορά καθώς πλέον ακόμη και τα υψηλά ποσοστά διοξειδίου του άνθρακα δεν καταφέρνουν να διατηρήσουν αρκετά κοντά στην αρχική κατάσταση τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό, ενώ το σοκ που παθαίνουν την πρώτη μέρα είναι δραματικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον αμέσως προηγούμενο φωτισμό. Το 0,04% CO_2, το 1% CO_2 και το 5% CO_2 σχηματίζουν ξανά μια ομάδα με σταθερά πτωτική πορεία που φτάνει έως και τη χαμηλή μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση των 0,368, 0,414 και 0,464 αντίστοιχα. Παράλληλα, η δεύτερη ομάδα των υψηλότερων συγκεντρώσεων 10% CO_2 με 40% CO_2 παθαίνει έντονο σοκ την πρώτη ημέρα με το Fv/Fm να αγγίζει τιμές κοντά στο 0,4, όμως τις επόμενες μέρες επανέρχονται πλήρως σε μια πολύ καλή φωτοσυνθετική κατάσταση όπως για παράδειγμα το 20% που την $4^{η}$ ημέρα δίνει Fv/Fm=0,635. Μια μικρή πτώση είναι αισθητή στη συνέχεια με το 10% να τερματίζει στο 0,549, το 15% στο 0,573, το 20% στο 0,598, το 30% στο 0,548 και το 40% στο 0,546. Το 60% CO_2 ακολουθεί σταθερή πτωτική πορεία φτάνοντας μέχρι και το 0,341.

Η φωτοσυνθετική δραστηριότητα στις εν λόγω συνθήκες, που απεικονίζεται στην Εικόνα 3.26 για τον υψηλό φωτισμό δείχνει να κορυφώνεται γύρω από το 30% CO_2 με αυτό και το 20% CO_2 να δίνουν τιμές φωτοσυνθετικής δραστηριότητας γύρω στα 11 και 12 μlO_2.μl PCV^{-1}.h^{-1} αντίστοιχα. ΤΟ 40% CO_2 και το 60% CO_2 δίνουν τιμές κοντά στα 11 μlO_2.μl PCV^{-1}.h^{-1} ενώ αμέσως μετά έχουμε το 15% CO_2 με λίγο πάνω από τα 10 μlO_2.μl PCV^{-1}.h^{-1} .Ύστερα, έρχεται το 10% CO_2 με 10 μlO_2.μl PCV^{-1}.h^{-1} και το 5% CO_2 με 6 μlO_2.μl PCV^{-1}.h^{-1} . Τέλος, έχουμε τις χαμηλότερες ποσοστώσεις 0,04% και 1% CO_2 με φωτοσυνθετική απόδοση κοντά στα 3 μlO_2.μl PCV^{-1}.h^{-1} .

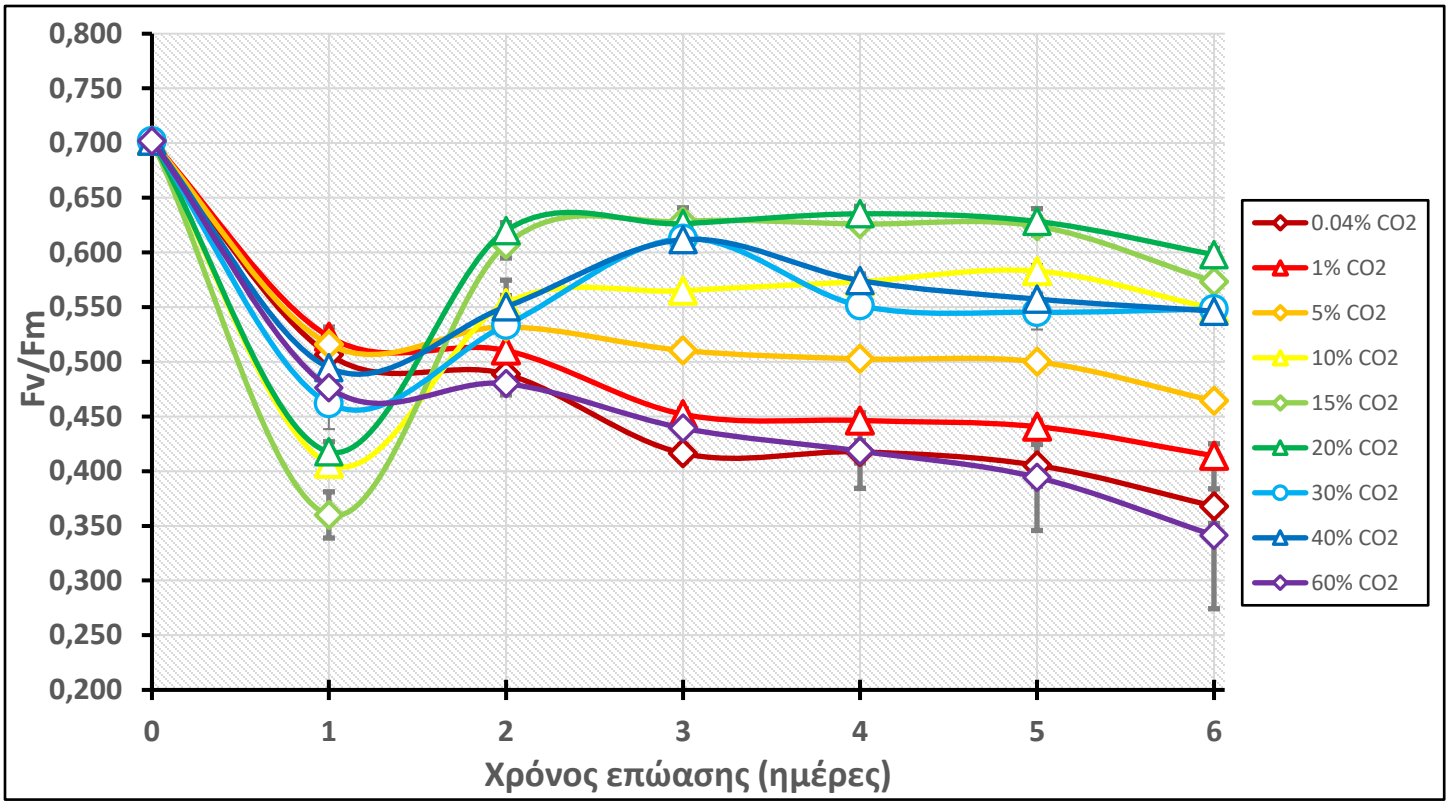
Στην Εικόνα 3.27 βλέπουμε μια πιο αναλυτική ματιά στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό των μικροφυκών στον υψηλό φωτισμό. Ξανά, οι χειρισμοί 0,04% CO_2 έως 5% CO_2 έχουν μια σαφή και σταθερή εικόνα πτώσης που μέρα με τη μέρα χειροτερεύει. Δηλαδή παρατηρούμε την εξής κλασική εικόνα καταπόνησης: RC/Cs↓, Abs/RC↑, PSIo↓, DIo/RC↑ και PI(abs) ↓. Μάλιστα, όπως και σε όλους τους προηγούμενους φωτισμούς, όσο χαμηλότερη είναι η ποσόστωση του CO_2, τόσο χειρότερη είναι κι η φωτοσυνθετική του κατάσταση. Από το 10% CO_2 διακρίνουμε τις πρώτες προσπάθειες προσαρμογής στις αντίξοες συνθήκες με τα ενεργά κέντρα αντίδρασης μετά το σοκ της $1^{ης}$ ημέρας να προσπαθούν να επανέλθουν στην αρχική κατάσταση. Από πολύ χαμηλά την $1^{η}$ ημέρα στο 49% ± 1% φτάνουν μέχρι το 91% ± 6% την $4^{η}$ ημέρα και στη συνέχεια ξαναπέφτουν μέχρι το76% ±4%. Στο 15% CO_2 μετά την $1^{η}$ ημέρα τα κύτταρα καταφέρνουν να φτάσουν τα ενεργά τους κέντρα να είναι στην ίδια περίπου πυκνότητα με την αρχική κατάσταση μέχρι την $4^{η}$ ημέρα ενώ κι εδώ ακολουθεί μια πτώση καταλήγοντας κοντά στο 81% ± 2%. Αν και σε καμία συγκέντρωση CO_2 δεν πήραμε σαφή εικόνα βελτίωσης της φωτοσυνθετικής μηχανής σε σχέση με την αρχική κατάσταση, στις συγκεντρώσεις γύρω από το

30% CO_2 είχαμε με σιγουριά τα καλύτερα αποτελέσματα κατά τη διάρκεια του πειράματος. Το 60% CO_2 για ακόμη μια φορά δείχνει μια κατάσταση ελαφρώς χειρότερη από την αμέσως προηγούμενη κατάσταση.

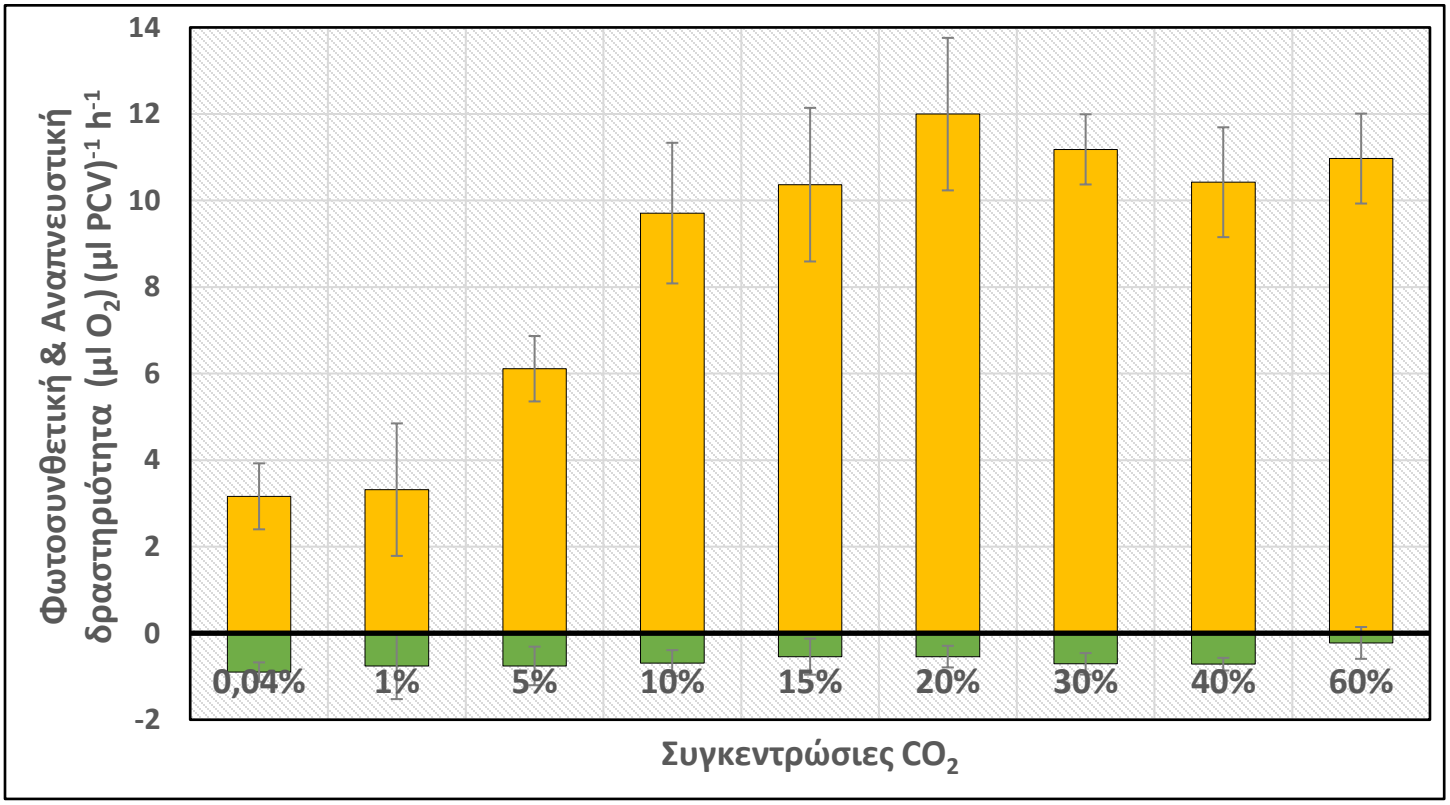
Στην Εικόνα 3.28 παρουσιάζεται η φωτοσυνθετική παραγωγή O_2. Μπορεί να διπλασιάσαμε το φωτισμό αλλά το μοτίβο και οι τιμές ομοιάζουν με τον αμέσως προηγούμενο φωτισμό. Το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής O_2 έχει γίνει την 1η ημέρα ενώ μέχρι την 4η όλες οι μεταχειρίσεις πλην του 60% CO_2 έχουν φτάσει στις ανώτερες τιμές. Ο χειρισμός με το 40% CO_2 πλησίασε τα 30 ml , το 30% CO_2 τα 18-19 ml και το 60% CO_2 τα 18 ml. Το 20% CO_2 ακολουθεί πολύ κοντά με λίγο κάτω από 18 ml και αμέσως μετά το 15% CO_2 στα περίπου 16 ml. Έπειτα, πέφτουμε στα 9-10 ml στο 10% CO_2 και στα 5 ml στα 5% CO_2. Τα 1% CO_2 είναι κάτω από 3 ml ενώ το 0,04% CO_2 είναι λίγο πάνω από 1 ml. Επισημαίνεται ότι σε καμία μεταχείριση δεν ανιχνεύθηκε παραγωγή βιοϋδρογόνου από τις καλλιέργειες των μικροφυκών.

Στην Εικόνα 3.29 βλέπουμε την μεταβολή της βιομάζας να κινείται στα αναμενόμενα επίπεδα. Όσο αυξάνεται το διαθέσιμο CO_2, τόσο περισσότερο αναπτύσσεται η καλλιέργεια με κορυφαίες τιμές στη συγκέντρωση 40% CO_2. Πιο αναλυτικά, η ατμοσφαιρική συγκέντρωση CO_2 φτάνει το 1,2 μl PCV / ml καλλιέργειας, το 1% CO_2 φτάνει το 1,2 ± 0,15 μl PCV / ml καλλιέργειας, το 5% CO_2 φτάνει το 1,7 ± 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας και το 10% CO_2 φτάνει τα 2 ± 0,05 PCV. Συνεχίζοντας, το 15% CO_2 φτάνει στα 2,6 ± 0,05 μl PCV / ml καλλιέργειας, το 20% CO_2 φτάνει το 2,9 ± 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας και το 30% CO_2 φτάνει το 3,6 ± 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας. Τέλος έχουμε την υψηλότερη τιμή για αυτό το φωτισμό στο 40% CO_2 που φτάνει το 4,1 ± 0,1 PCV και το 60% CO_2 που περιορίζεται στα 2,2 ± 0,3 μl PCV / ml καλλιέργειας. Στον υψηλό φωτισμό των 200 $\mu mol^{-2}\ s^{-1}$ οι διαφορές μεταξύ της αύξησης της βιομάζας και συγκεντρώσεων CO_2 είναι διακριτές.

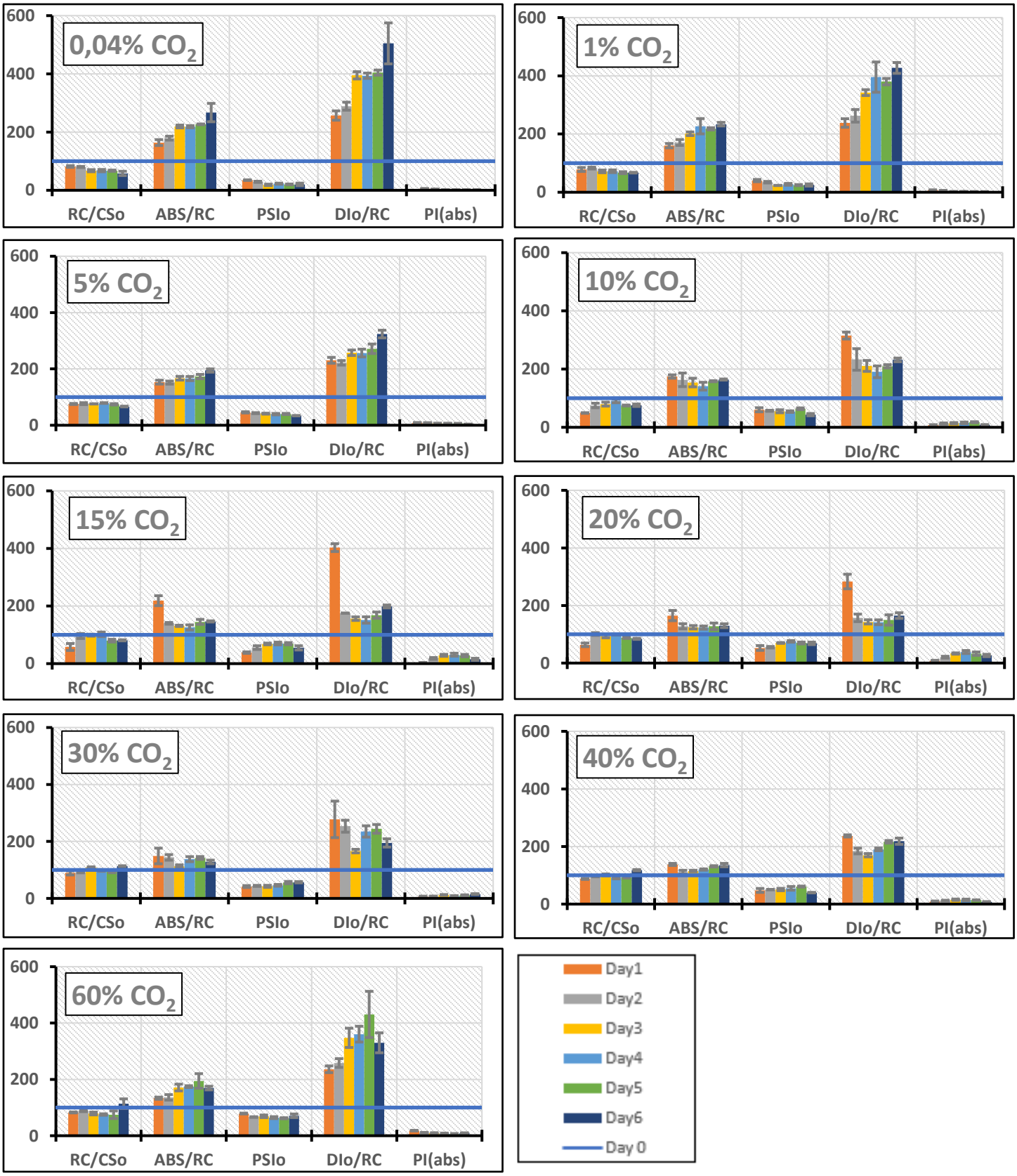
Στη κυτταρική διαχείριση πόρων στον υψηλό φωτισμό, τα κύτταρα δε δείχνουν ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις στη στρατηγική τους. Στους υδατάνθρακες, βλέπουμε το 0,04% CO_2 να καταναλώνει από 43% DW στο 30% DW παρόμοια με το 30% CO_2 το οποίο όμως καταλήγει στο 35% DW. Εδώ έχουμε μια μικρή αύξηση μόνο στο 60% της τάξης του 12% DW την 1η ημέρα, όπως και στα προηγούμενα φώτα το οποίο όμως καταλήγει κοντά στο σημείο έναρξης γύρω στο 47% DW. Η μελέτη των λιπαρών δεν έχει ιδιαίτερη αξία μιας και πέρα από μια πολύ μικρή αύξηση την 1η ημέρα έχουμε σε όλα μία περιορισμένη πτώση από 6% DW κοντά στο 5% DW. Στις ολικές χλωροφύλλες έχουμε σε όλες τις μεταχειρίσεις πτώση όμως στο 0,04% CO_2 είναι αρκετά μικρή της τάξης του 2% DW ενώ στο 30% και 60% CO_2 καταγράφεται περίπου διπλάσια μείωση από το 6% DW στο μόλις 2% DW. Τα ολικά καροτενοειδή μειώνονται από περίπου 0,6% DW στο μισό.



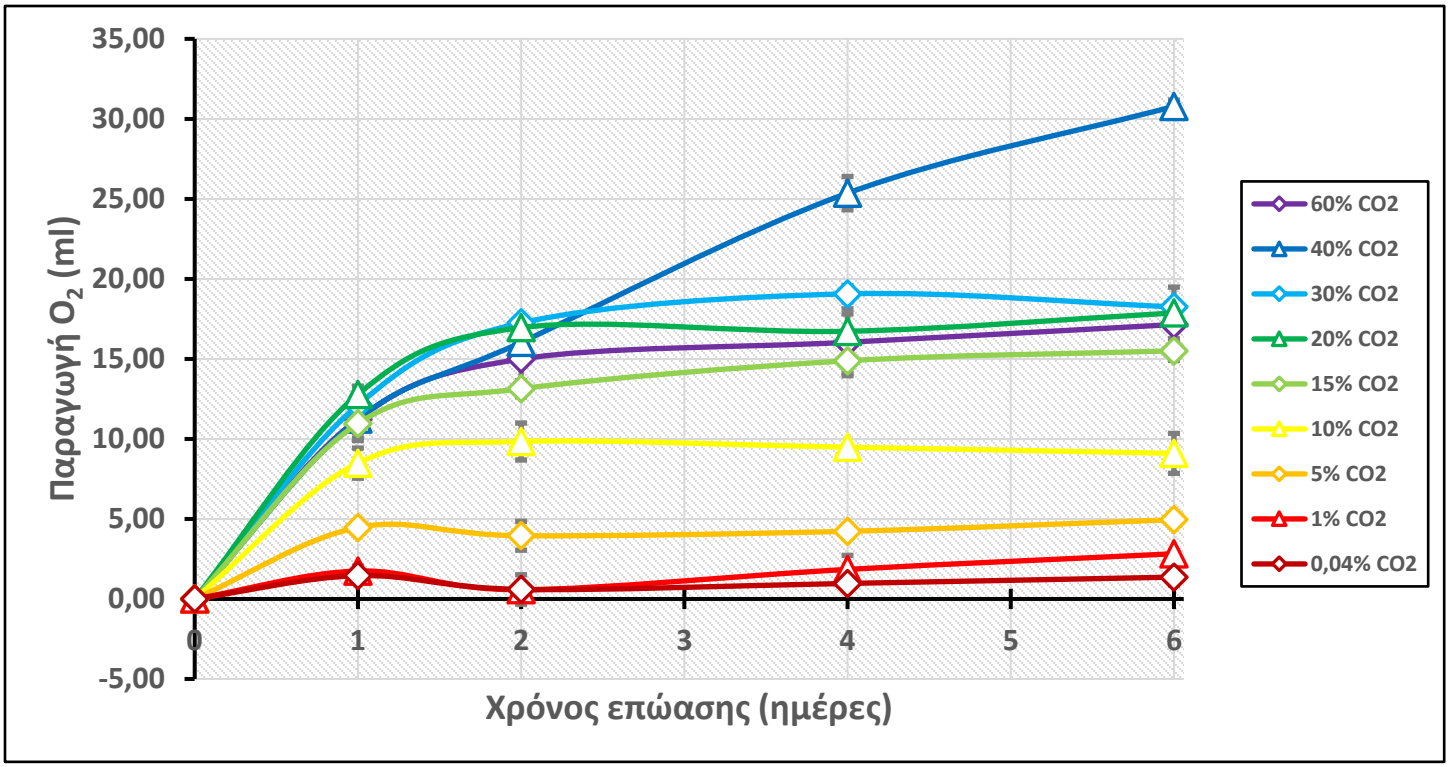
Εικόνα 3.25: Κινητική του λόγου Fv/Fm (OJIP test) ως δείκτης της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης κατά τη διάρκεια της επώασης. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες στο υψηλό φως (200 μmol m^{-2} s^{-1}) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ºC.



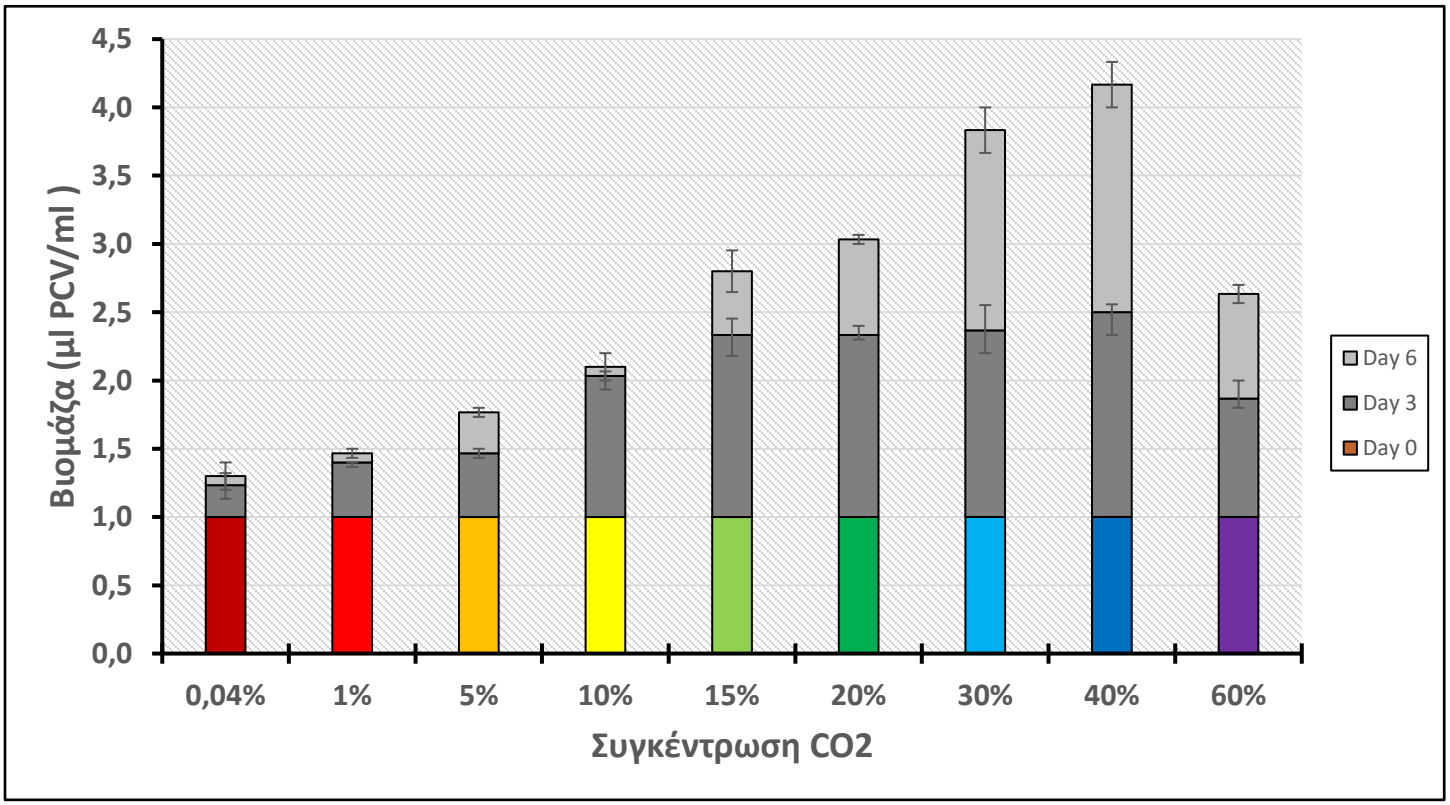
Εικόνα 3.26: Ρυθμός καθαρής φωτοσυνθετικής και αναπνευστικής δραστηριότητας για καλλιέργειες που επωάστηκαν στο υψηλό φως (200 μmol m^{-2} s^{-1}) [8 ώρες σκοτάδι –16 ώρες φως]. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ºC.



Εικόνα 3.27: Αναλυτική παρουσίαση της ποσοστιαίας μεταβολής των σημαντικότερων παραμέτρων του OJIP test κανονικοποιημένων ως προς την αρχική κατάσταση (Day 0). Όλες οι μεταχειρίσεις με την αναγραφόμενη ποσόστωση 0,04% - 60% CO_2 έγιναν σε τριπλέτες στο υψηλό φως (200 μmol m^{-2} s^{-1}) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^oC.



Εικόνα 3.28: Φωτοσυνθετική παραγωγή O_2 σε επίπεδο καλλιέργειας ως προς το χρόνο επώασης. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες στο υψηλό φως (200 μmol m^{-2} s^{-1}) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^oC.



Εικόνα 3.29: Μεταβολή της βιομάζας (μl PCV/ml καλλιέργειας) ως προς τη συγκέντρωση CO_2 στην αέρια φάση του δοχείου για τις ημέρες 0, 3 και 6 (χρώμα εκάστοτε μεταχείρισης, σκούρο γκρι και ανοικτό γκρι αντίστοιχα). Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες σε υψηλό φως (200 μmol m^{-2} s^{-1}) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^oC.

Για τα ολικά λιπαρά:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	61,13 ± 1,58	61,13 ± 1,58	61,13 ± 1,58
1η ημέρα	78,83 ± 3,27	62,27 ± 3,91	73,66 ± 4,76
3η ημέρα	65,27 ± 0,87	42,51 ± 2,07	62,15 ± 1,62
6η ημέρα	55,20 ± 0,40	47,42 ± 1,15	52,33 ± 1,68

Για τους ολικούς υδατάνθρακες:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	428,57 ± 12,97	428,57 ± 12,97	428,57 ± 12,97
1η ημέρα	331,39 ± 33,61	422,26 ± 17,47	552,57 ± 15,98
3η ημέρα	306,94 ± 6,73	331,19 ± 5,92	377,51 ± 19,71
6η ημέρα	304,57 ± 27,28	353,66 ± 6,91	467,80 ± 18,37

Για τις χλωροφύλλες a:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	44,31 ± 2,29	44,31 ± 2,29	44,31 ± 2,29
1η ημέρα	38,43 ± 0,88	19,46 ± 0,60	33,76 ± 0,26
3η ημέρα	30,11 ± 0,25	13,8 ± 0,59	24,39 ± 1,63
6η ημέρα	27,29 ± 0,96	8,94 ± 0,61	11,61 ± 0,76

Για τις χλωροφύλλες b:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	15,04 ± 1,02	15,04 ± 1,02	15,04 ± 1,02
1η ημέρα	13,92 ± 0,14	9,78 ± 0,99	14,69 ± 1,20
3η ημέρα	10,15 ± 0,09	5,25 ± 1,40	6,33 ± 0,50
6η ημέρα	13,06 ± 0,18	9,36 ± 1,61	10,80 ± 2,21

Για τις ολικές χλωροφύλλες:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	59,34 ± 3,31	59,34 ± 3,31	59,34 ± 3,31
1η ημέρα	52,35 ± 1,02	29,25 ± 1,59	48,45 ± 1,45
3η ημέρα	40,26 ± 0,33	19,05 ± 1,99	30,72 ± 2,14
6η ημέρα	40,35 ± 1,14	18,30 ± 2,22	22,41 ± 2,97

Για τα ολικά καροτενοειδή:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	5,75 ± 0,95	5,75 ± 0,96	5,75 ± 0,97
1η ημέρα	5,23 ± 1,69	2,53 ± 1,10	4,38 ± 1,97
3η ημέρα	6,48 ± 0,76	3,49 ± 4,83	5,88 ± 0,09
6η ημέρα	3,32 ± 0,99	0,67 ± 2,06	2,02± 0,29

Εικόνα 3.30: Ποιοτική βιοχημική ανάλυση καλλιεργειών 0,04%, 30% και 60% CO_2 στο υψηλό φως (200 μmol m^{-2} s^{-1}) για τα ολικά λιπαρά, τους ολικούς υδατάνθρακες, χλωροφύλλες a & b, ολικές χλωροφύλλες και ολικά καροτενοειδή. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 °C. Ο υπολογισμός έγινε σε μg/μl PCV και τροποποιήθηκε προσεγγιστικά σε μg/mg DW.

3.6 Ανάπτυξη μικροφυκών στο πολύ υψηλό φως (400 μmol m^{-2} s^{-1})

Σε αυτή την ενότητα περνάμε στον δυνατότερο φωτισμό που δοκιμάσαμε στα πειράματα μας, τα 400 μmol m^{-2} s^{-1}. Στην Εικόνα 3.31 βλέπουμε ότι ο πολύ υψηλός φωτισμός καταπονεί δραματικά το φωτοσυνθετικό μηχανισμό και κατά επέκταση το χλωροφύκος *Chlorella vulgaris*. Όχι μόνο μειώνει δραματικά την μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση στις τελευταίες ημέρες αλλά οδηγεί σε φωτοκαταστροφή και οξείδωση των χλωροφυλλών μιας και οι καλλιέργειες έπαιρναν κίτρινο-πράσινο χρώμα. όλες οι καλλιέργειες ξεκινάνε από μια πολύ καλή φωτοσυνθετική κατάσταση με Fv/Fm≈ 0,65. Την $1^η$ ημέρα τα μικροφύκη παθαίνουν ένα σοκ λόγω του υψηλού φωτισμού το οποίο όταν συνδυαστεί με υψηλές συγκεντρώσεις CO_2 γίνεται εντονότερο δίνοντας τιμές ακόμα και χαμηλότερες του 0,3 στα όρια της φωτοκαταστροφής. Ωστόσο, μετά την $1^η$ ημέρα οι καλλιέργειες δίνουν σημάδια ανάκαμψης με τις Fv/Fm τιμές να κυμαίνονται όλες στο ίδιο περίπου επίπεδο του 0,4 - 0,5. Ξεχωρίζει η τιμή του 30% CO_2, με την καλύτερη πορεία, που κορυφώνεται την $4^η$ ημέρα στο 0,52 και θεωρείται σχετικά καλή τιμή μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης. Από την $4^η$ κι ιδιαίτερα την $5^η$ ημέρα και μετά, όλες οι καλλιέργειες κάνουν μια δραματική «βουτιά» όσον αφορά την φωτοσυνθετική τους απόδοση (εκφρασμένη ως Fv/Fm) με τιμές ακόμα και κοντά στο 0,2. Το 60% CO_2 ακολουθεί τη δική του πτωτική πορεία χωρίς σημάδια ανάκαμψης καταλήγοντας στο 0,222. Είναι σαφές πως σε αυτό το φωτισμό τα κύτταρα δεν μπορούν να ανταπεξέλθουν για πολλές ημέρες ακόμα και με την παρουσία μεγάλων ποσοτήτων CO_2.

Η καταπόνηση του πολύ υψηλού φωτισμού είναι διακριτή ακόμα και στη φωτοσυνθετική δραστηριότητα της $1^{ης}$ ημέρας, όπως είναι καταγεγραμμένη στην Εικόνα 3.32. Λαμβάνουμε την υψηλότερη τιμή, στην υψηλότερη συγκέντρωση CO_2 που δοκιμάσαμε δηλαδή το 60% CO_2 με γύρω στα 10 μlO_2.μlPCV^{-1}.h^{-1}. Ύστερα, ακολουθεί το 30% και το 40% CO_2 με γύρω στα 9 μlO_2.μlPCV^{-1}.h^{-1} και 8 μlO_2.μlPCV^{-1}.h^{-1} αντίστοιχα. Έπειτα, η διαβάθμιση συνεχίζεται, όπως αναμενόταν, με το 15% CO_2 και 20% CO_2 γύρω στα 7 μlO_2.μlPCV^{-1}.h^{-1} και τα 5% και 10% CO_2 κοντά στα 5,5 μlO_2.μlPCV^{-1}.h^{-1}. Τέλος έχουμε τις χαμηλότερες ποσοστώσεις με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις ανόργανου άνθρακα, 1% CO_2 και 0,04% CO_2 περίπου 2-3 μlO_2.μlPCV^{-1}.h^{-1} .

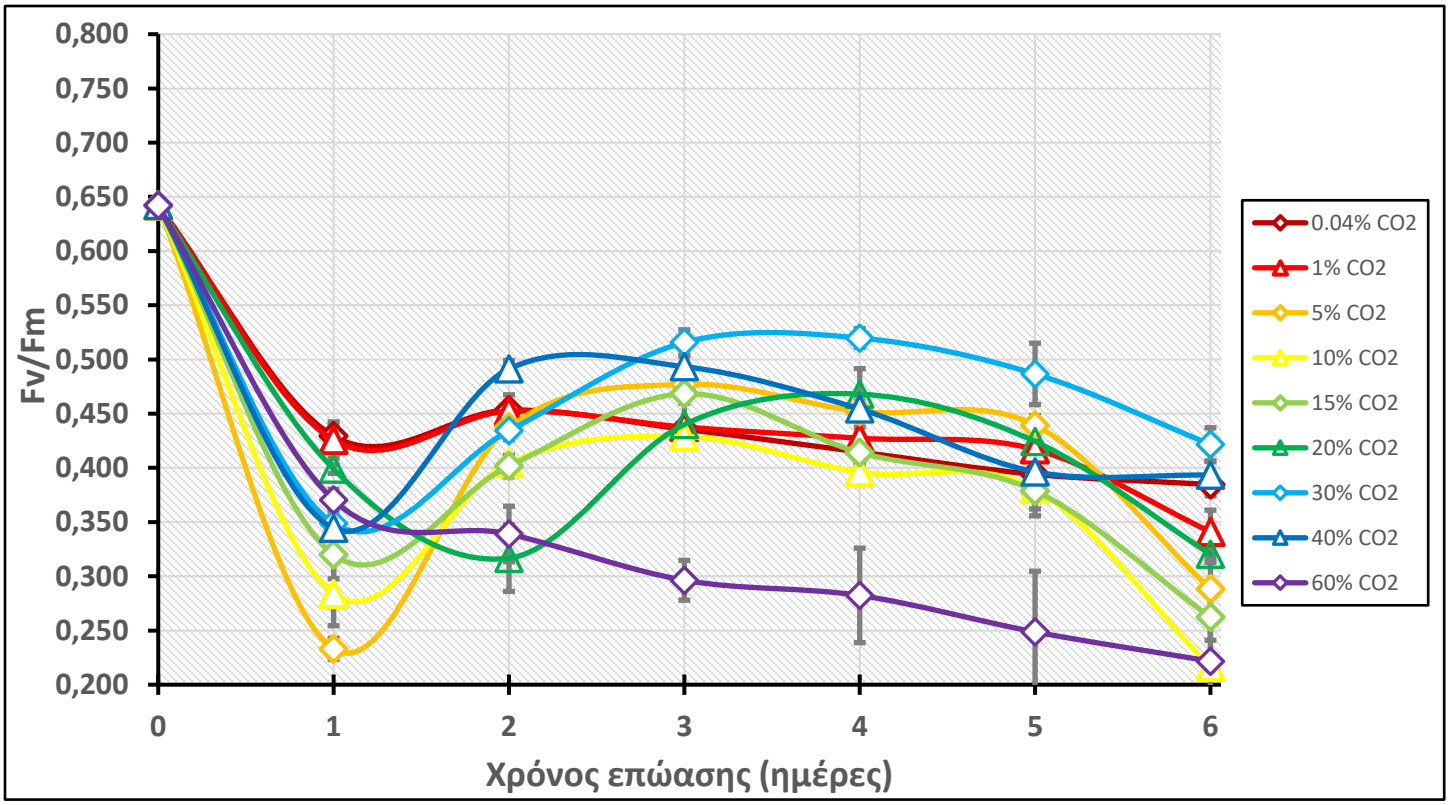
Στην Εικόνα 3.33 βλέπουμε αναλυτικότερα και με σαφήνεια την παραπάνω κατάσταση. Σε όλες τις συγκεντρώσεις CO_2 ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός είναι σε έντονη καταπόνηση με έντονη την χαρακτηριστική εικόνα καταπόνησης (RC/Cs↓, Abs/RC↑, PSIo↓, DIo/RC↑ και PI(abs)↓), όπως ήταν αναμενόμενο. Αυτό που έχει ενδιαφέρον στην προκειμένη περίπτωση είναι το γεγονός πως στις συγκεντρώσεις 0,04% CO_2, 1% CO_2 και 5% CO_2 ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός καταπονείται τις τελευταίες ημέρες σε τέτοιο βαθμό που είναι αδύνατον να γίνουν τα OJIP tests. Μόνο στους χειρισμούς μεταξύ 30% CO_2 και 60% CO_2 παίρνουμε έγκυρα και αξιόπιστα OJIP tests τα οποία αξίζει να συζητήσουμε. Τόσο στα 30% CO_2 όσο και στα 40% CO_2 διακρίνουμε ένα πολύ έντονο στρες την $1^η$ ημέρα το οποίο στη συνέχεια μετριάζεται την $3^η$ – $4^η$ ημέρα ενώ έπειτα επιδεινώνεται

ξανά. Το 60% ακολουθεί τη δική του σταθερά πτωτική πορεία όπως και τις προηγούμενες φορές με το γνωστό μοτίβο.

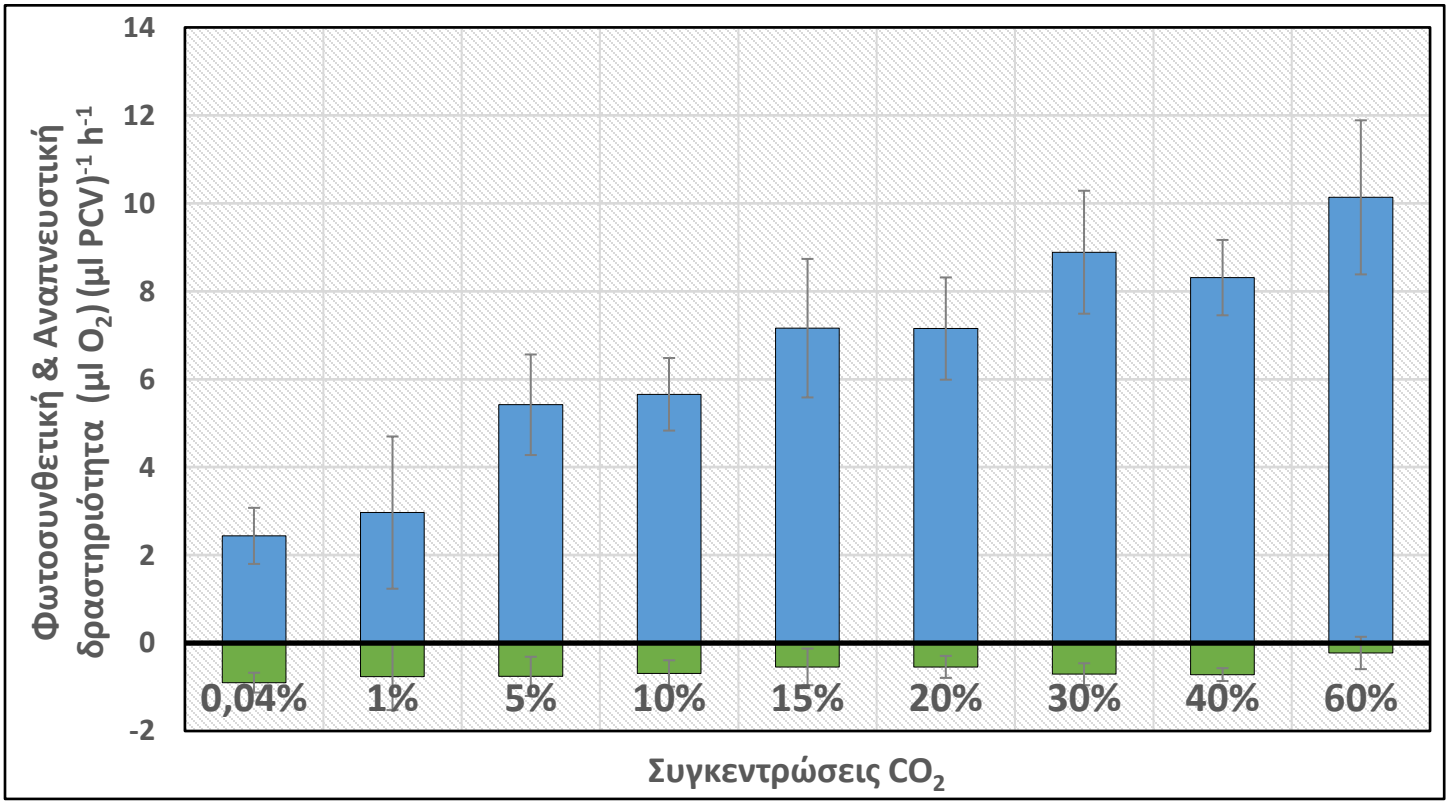
Συνεχίζουμε με τα αποτελέσματα της φωτοσυνθετικής παραγωγής O_2 για τον πολύ υψηλό φωτισμό όπως φαίνονται στο διάγραμμα της Εικόνας 3.34. Για ακόμη μια φορά, οι συγκεντρώσεις 10% CO_2 και κάτω έχουν φτάσει στη μέγιστη παραγωγή O_2 από την $1^η – 2^η$ ημέρα ενώ από 15% CO_2 και άνω από την $3^η – 4^η$ ημέρα. Μικρή αλλά αισθητή πτώση υπάρχει κι εδώ μετά την κορύφωση της παραγωγής O_2. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι εξαίρεση αποτελεί το 60% CO_2, που εδώ ακολουθεί τα πρότυπα των μικρότερων συγκεντρώσεων. Πιο συγκεκριμένα, έχουμε τις μεταχειρίσεις των 40% CO_2 που φτάνουν γύρω στα 24ml O_2, ακολουθούμενες από αυτές των 30% CO_2 και 20% CO_2 στα 20 ml και 18 ml αντίστοιχα. Στη συνέχεια, έχουμε τα 15% CO_2 στα 13-15 ml ,τα 10% CO_2 στα 10 ml και τα 5% CO_2 στα 5-6 ml O_2. Τέλος έχουμε τα 1% CO_2 και τα 0,04% CO_2 με παραγωγή που κορυφώνεται κοντά στα 2 ml O_2 περίπου.

Στην Εικόνα 3.35 βλέπουμε τα αποτελέσματα που αφορούν την παραγωγή βιομάζας στον πολύ υψηλό φωτισμό. Εμφανίζεται ξανά το ίδιο μοτίβο με αύξηση ανάλογη του ποσοστού του διοξειδίου του άνθρακα μέχρι το 40%. Πιο συγκεκριμένα το 0,04% CO_2 φτάνει 1,5 ± 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας, το 1% CO_2 φτάνει 1,6 ± 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας και το 5% CO_2 φτάνει 2,1 ± 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας. Εν συνεχεία, το 10% CO_2 φτάνει 2,7 ± 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας, το 15% CO_2 φτάνει 2,8 ± 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας και το 20% CO_2 φτάνει 3,1 ± 0,1 PCV. Στις υψηλότερες ποσοστώσεις έχουμε το 30% CO_2 με 3,8 ± 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας, το 40% CO_2 με 3,9 ± 0,05 μl PCV / ml καλλιέργειας και το 60% με μια αρκετά χαμηλή τιμή στα 1,7 ± 0,05 μl PCV / ml καλλιέργειας.

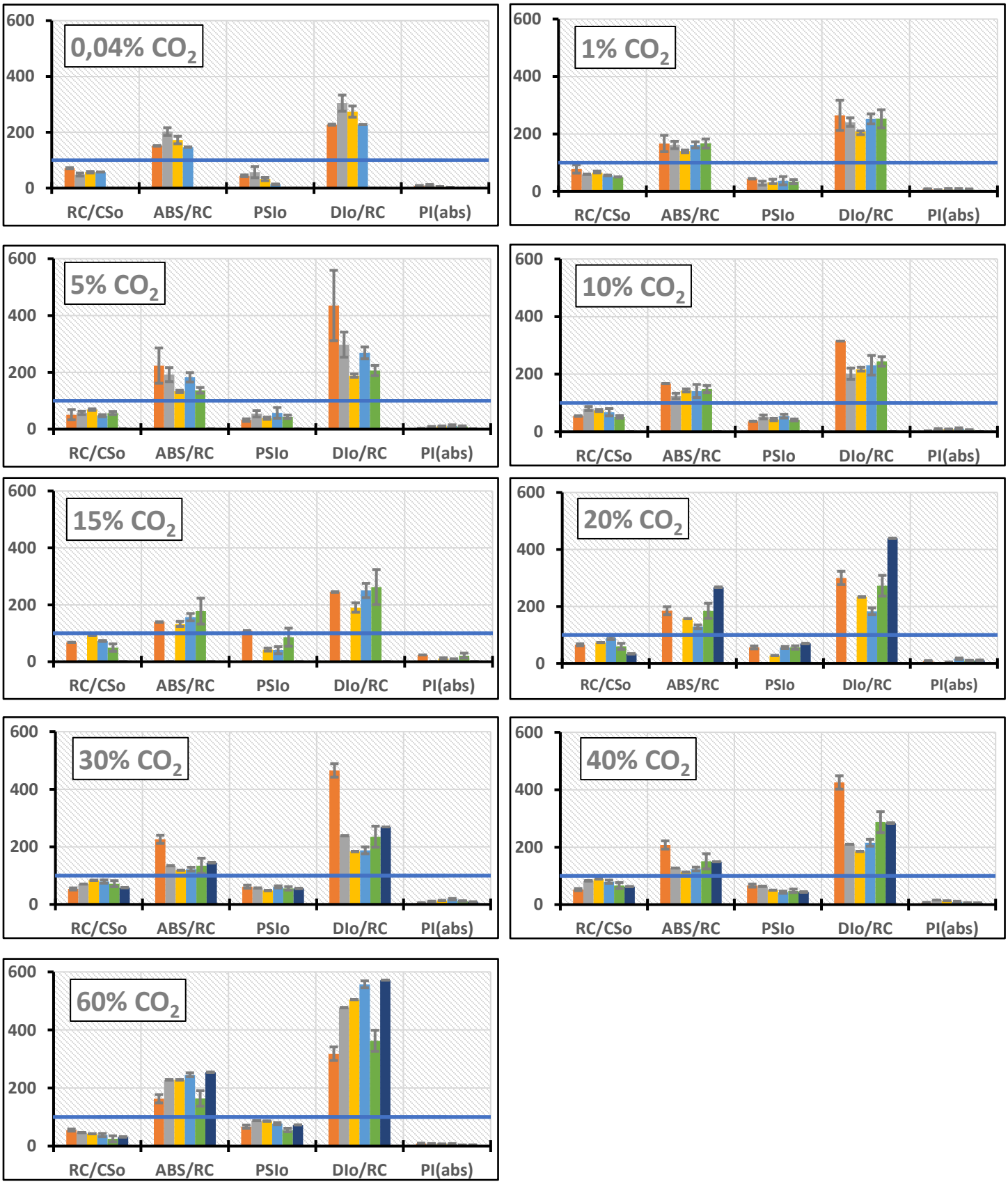
Τελευταία ενότητα των αποτελεσμάτων είναι η βιοχημική ανάλυση της Εικόνας 3.36 των καλλιεργειών που έχουν επωαστεί στο πολύ υψηλό φως. Εδώ, βλέπουμε ότι στην έλλειψη άνθρακα η καλλιέργεια καταναλώνει σε μεγάλο βαθμό τα εσωτερικά αποθέματα των υδατανθράκων της από την $1^η$ κιόλας ημέρα φτάνοντάς τα από 43% DW σε μόλις κάτω από 15% DW. Πάραυτα, η πίεση του φωτός οδηγεί το 30% CO_2 να αυξήσει τα ποσοστά του την $1^η$ ημέρα στο 53% DW κι ύστερα να τα μειώσει στο 26% DW αφού τα επενδύσει στην αύξηση. Το 60% CO_2 διατηρεί τα επίπεδα των σακχάρων του με μια μικρή μείωση στο 41% DW. Τα λιπαρά παρουσιάζουν αντίστοιχο προφίλ, μιας και σε όλες τις μεταχειρίσεις μειώνονται φτάνοντας από το 9% DW στο περίπου 4-5% DW. Όμοια με τον αμέσως προηγούμενο φωτισμό οι χλωροφύλλες του 0,04% CO_2 μειώνονται από 6% DW σε 4% ενώ στις υπόλοιπες μεταχειρίσεις αγγίζουμε σχεδόν τη διπλάσια μείωση με 2-3% DW. Η εκτίμηση των καροτενοειδών δείχνει μειώση και στις 3 περιπτώσεις με το 30% CO_2 και το 60% CO_2 να φτάνουν την τελευταία ημέρα σε μη ανιχνεύσιμες τιμές.



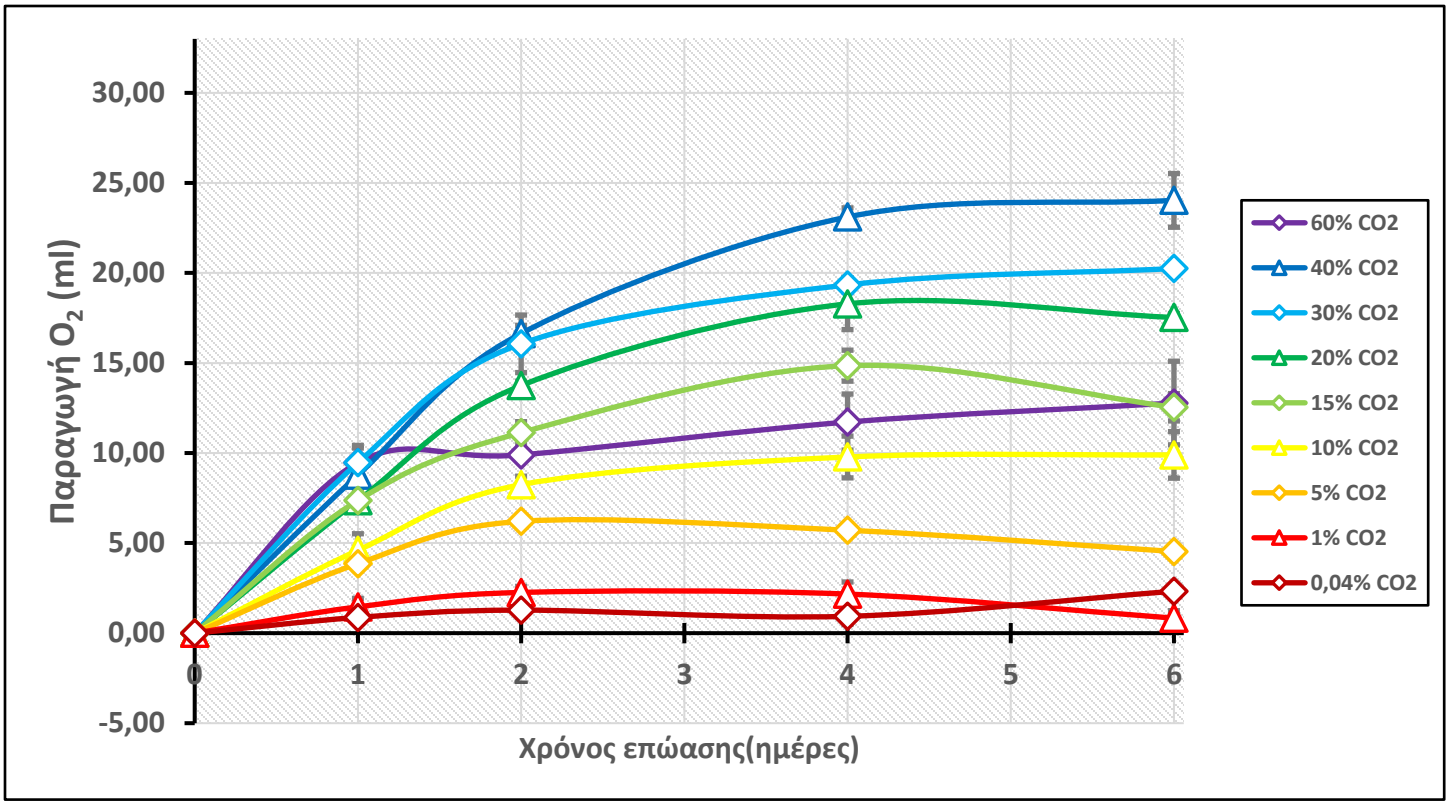
Εικόνα 3.31: Κινητική του λόγου Fv/Fm (OJIP test) ως δείκτης της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης κατά τη διάρκεια της επώασης. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες στο πολύ υψηλό φως (400 μmol m^{-2} s^{-1}) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ºC.



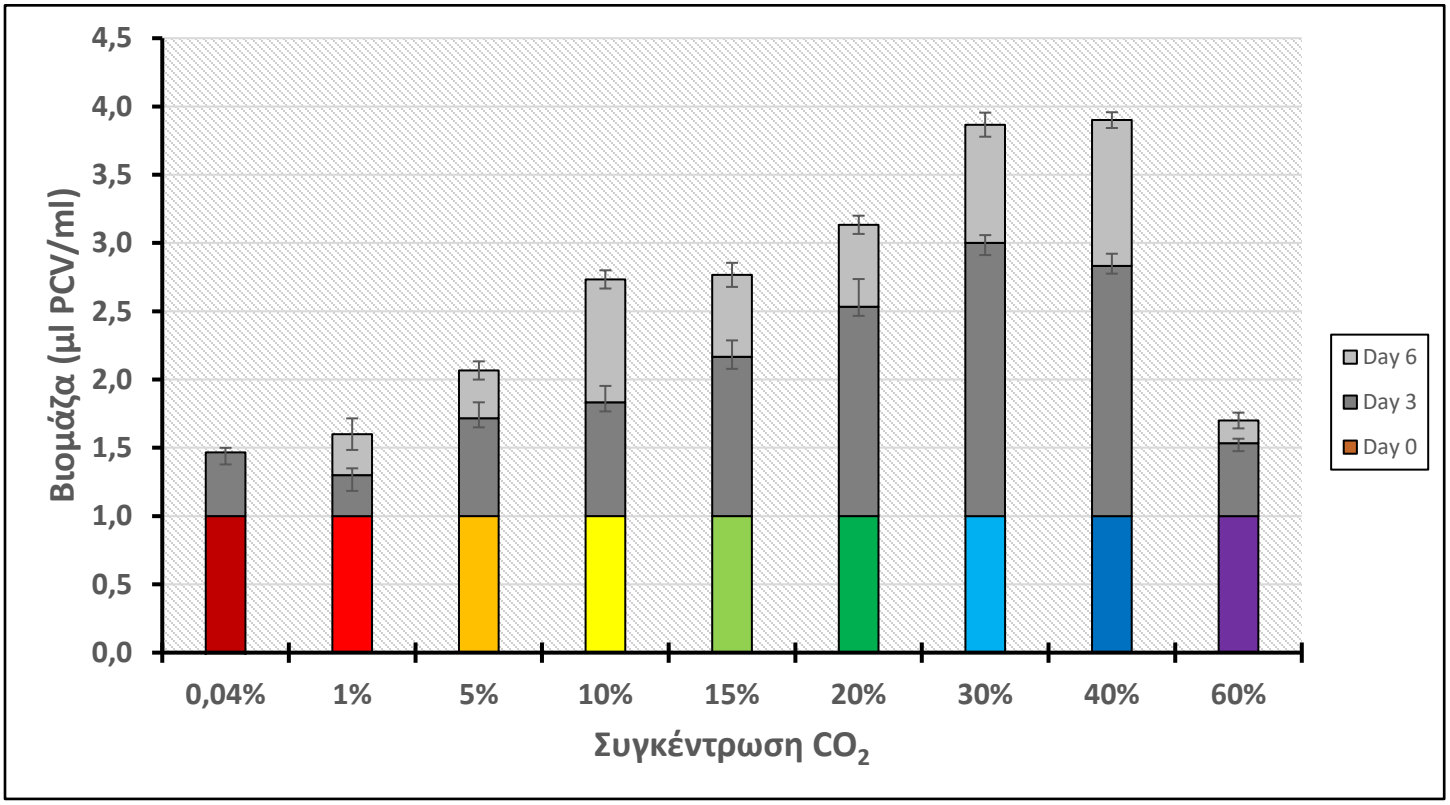
Εικόνα 3.32: Ρυθμός καθαρής φωτοσυνθετικής και αναπνευστικής δραστηριότητας για καλλιέργειες που επωάστηκαν στο πολύ υψηλό φως (400 μmol m^{-2} s^{-1}) [8 ώρες σκοτάδι –16 ώρες φως]. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ºC.



Εικόνα 3.33: Αναλυτική παρουσίαση της ποσοστιαίας μεταβολής των σημαντικότερων παραμέτρων του OJIP test κανονικοποιημένων ως προς την αρχική κατάσταση (Day 0). Όλες οι μεταχειρίσεις με ποσόστωση 0,04% έως 60% CO_2 έγιναν σε τριπλέτες στο πολύ υψηλό φως (400 μmol m^{-2} s^{-1}) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^{o}C. (Κενά = άκυρο OJIP test λόγω ακραίου στρες ή μη ύπαρξης λειτουργικού φωτοσυνθετικού μηχανισμού)



Εικόνα 3.34: Φωτοσυνθετική παραγωγή O_2 σε επίπεδο καλλιέργειας ως προς το χρόνο επώασης. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες στο πολύ υψηλό φως (400 μmol m^{-2} s^{-1} PAR) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^oC.



Εικόνα 3.35: Μεταβολή της βιομάζας (μl PCV/ml καλλιέργειας) ως προς τη συγκέντρωση CO_2 στην αέρια φάση του δοχείου για τις ημέρες 0, 3 και 6 (χρώμα εκάστοτε μεταχείρισης, σκούρο γκρι και ανοικτό γκρι αντίστοιχα). Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες σε πολύ υψηλό φως (400 μmol m^{-2} s^{-1}) ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^oC.

Για τα ολικά λιπαρά:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	92,49 ± 4,56	92,49 ± 4,56	92,49 ± 4,56
1η ημέρα	81,18 ± 5,68	80,83 ± 3,68	79,70 ± 6,34
3η ημέρα	62,46 ± 2,30	44,20 ± 2,01	80,77 ± 2,10
6η ημέρα	48,37 ± 4,24	40,26 ± 2,63	47,98 ± 1,53

Για τους ολικούς υδατάνθρακες:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	433,90 ± 15,55	433,90 ± 15,55	433,90 ± 15,55
1η ημέρα	179,39 ± 6,70	526,16 ± 35,16	444,34 ± 22,21
3η ημέρα	124,39 ± 4,35	449,47 ± 39,44	417,34 ± 13,83
6η ημέρα	145,29 ± 0,71	256,47 ± 9,66	409,45 ± 7,18

Για τις χλωροφύλλες a:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	46,39 ± 0,46	46,39 ± 0,46	46,39 ± 0,46
1η ημέρα	35,65 ± 1,43	24,59 ± 0,49	34,5 ± 0,51
3η ημέρα	31,92 ± 0,67	11,19 ± 0,34	20,27 ± 1,07
6η ημέρα	29,11 ± 0,72	11,74 ± 0,51	12,57 ± 0,09

Για τις χλωροφύλλες b:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	13,35 ± 0,09	13,35 ± 0,09	13,35 ± 0,09
1η ημέρα	9,69 ± 0,85	5,98 ± 0,59	8,19 ± 0,39
3η ημέρα	12,32 ± 0,10	6,93 ± 3,63	12,76 ± 0,76
6η ημέρα	12,99 ± 0,79	11,60 ± 0,80	17,28 ± 0,05

Για τις ολικές χλωροφύλλες:

Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	59,74 ± 0,54	59,74 ± 0,54	59,74 ± 0,54
1η ημέρα	45,34 ± 2,28	30,58 ± 1,08	42,69 ± 0,90
3η ημέρα	44,24 ± 0,77	18,12 ± 3,97	33,03 ± 1,83
6η ημέρα	42,18 ± 1,51	23,34 ± 1,30	29,84 ± 0,15

Για τα ολικά καροτενοειδή:

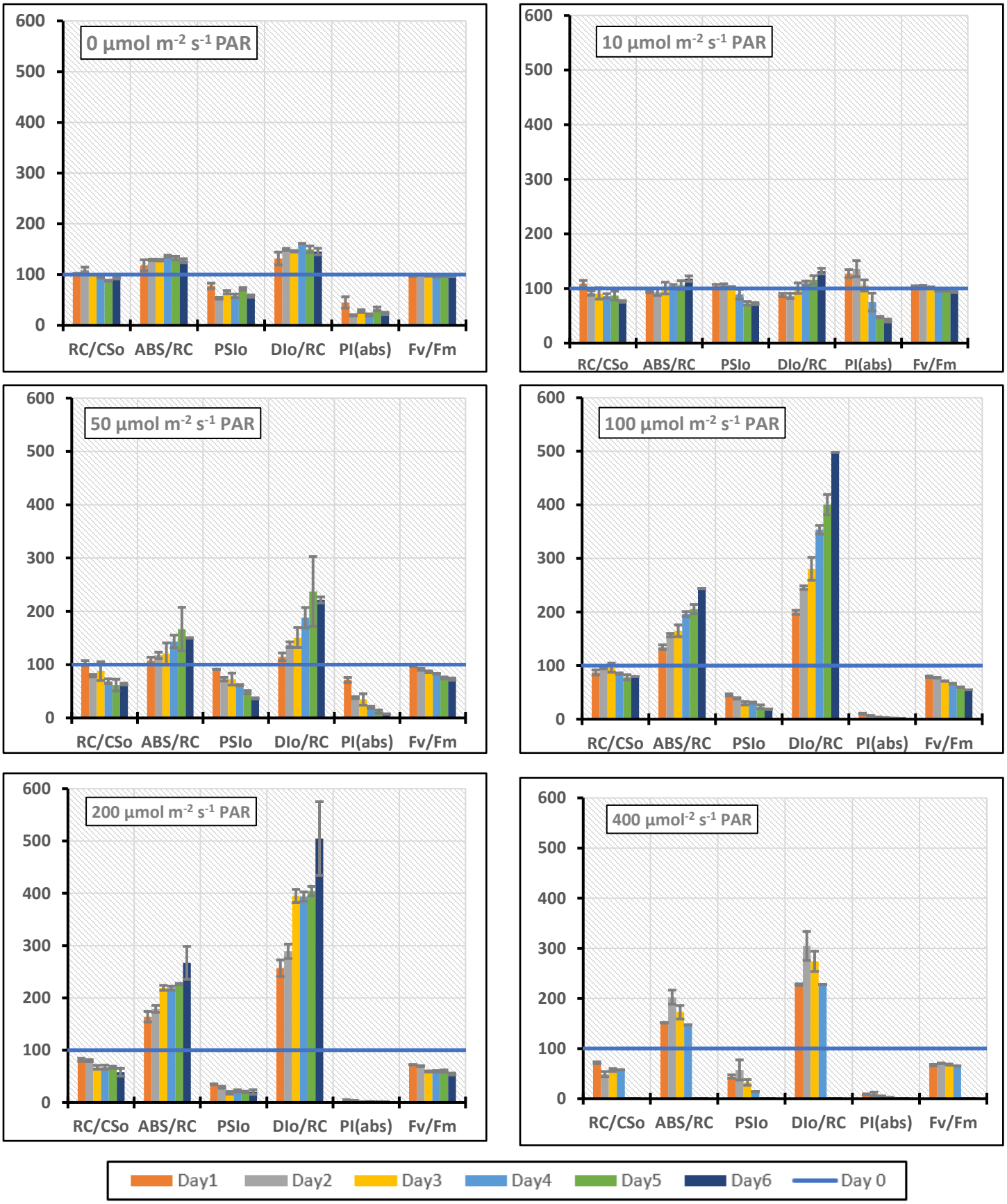
Χρόνος / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0η ημέρα	6,36 ± 0,55	6,36 ± 0,56	6,36 ± 0,57
1η ημέρα	6,38 ± 2,17	4,17 ± 0,62	7,04 ± 0,57
3η ημέρα	6,31 ± 1,52	3,72 ± 0,53	1,17 ± 1,25
6η ημέρα	4,00 ± 1,87	ND	ND

Εικόνα 3.36: Ποιοτική βιοχημική ανάλυση καλλιεργειών 0,04%, 30% και 60% CO_2 στο πολύ υψηλό φως (400 μmol m^{-2} s^{-1}) για τα ολικά λιπαρά, τους ολικούς υδατάνθρακες, χλωροφύλλες a & b, ολικές χλωροφύλλες και ολικά καροτενοειδή. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 °C. Ο υπολογισμός έγινε σε μg/μl PCV και τροποποιήθηκε προσεγγιστικά σε μg/mg DW.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Επίδραση του φωτός στη λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού υπό συνθήκες ατμοσφαιρικού αέρα

Μέσω των παραπάνω πειραμάτων βλέπουμε στην συγκεντρωτική Εικόνα 4.1 το πως ανταπεξέρχεται ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός του χλωροφύκους *Chlorella vulgaris* στην αυξανόμενη ένταση φωτισμού κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, δηλαδή σε ατμοσφαιρικό αέρα (0,04% CO_2), σε ένα κλειστό σύστημα. Εύκολα παρατηρεί κανείς ότι το απόλυτο σκοτάδι υποβιβάζει ελάχιστα το όλο φωτοσυνθετικό σύστημα αφήνοντας το σε μια σταθερή ή αλλιώς «κατάσταση αναμονής». Σε συνθήκες χαμηλής έντασης φωτός, 10 μmol m^{-2} s^{-1} παίρνουμε την βέλτιστη εικόνα με παραμέτρους πολύ κοντά στην αρχική κατάσταση, παρόλο που όσο περνάνε οι ημέρες αρχίζουν και υποβαθμίζονται. Γενικότερα, σε όλες τις συνθήκες φωτισμού που χρησιμοποιήθηκαν η φωτοσυνθετική κατάσταση των μικροφυκών τείνει να φθίνει με την πάροδο του χρόνου επώασης των καλλιεργειών (χαρακτηριστική εικόνα καταπόνησης:RC/Cs↓, Abs/RC↑, PSIo↓, DIo/RC↑ και PI(abs)↓). Στα 50 μmol m^{-2} s^{-1} βλέπουμε μια μέτρια καταπόνηση η οποία πάραυτα αφήνει το φωτοσυνθετικό μηχανισμό σε μια μέτρια κατάσταση. Στα 100 μmol m^{-2} s^{-1} το στρες γίνεται σαφώς εντονότερο με τη φωτοσυνθετική απόδοση να πέφτει σε χαμηλά επίπεδα, αλλά το χλωροφύκος μένει ακόμα ενεργό και λειτουργικό. Ένα βήμα παραπέρα, στα 200 μmol m^{-2} s^{-1} , η καταπόνηση μεγαλώνει έως ότου στα 400 μmol m^{-2} s^{-1} φτάσουμε σε οριακά σημεία τα οποία αγγίζουν και την φωτοκαταστροφή ολόκληρου του οργανισμού. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η *Chlorella vulgaris* σε μια καθαρά αυτότροφη καλλιέργεια, χωρίς περαιτέρω προσθήκη CO_2, λειτουργεί βέλτιστα σε πολύ χαμηλό φωτισμό ενώ δε χάνει τη λειτουργικότητά της ακόμα και σε υψηλότερες εντάσεις φωτισμού με τις αναμενόμενες συνέπειες στη φωτοσυνθετική της κατάσταση (φωτοαναστολή). Η αυξανόμενη εισροή φωτεινής ενέργειας χωρίς αυξημένο CO_2 επιφέρει ανάλογα αυξανόμενη καταπόνηση.



Εικόνα 4.1: Συγκεντρωτική συγκριτική παρουσίαση των αναλυτικών μεταβλητών του OJIP test για τις μεταχειρίσεις ατμοσφαιρικού αέρα (0,04% CO_2) σε όλους τους πειραματικούς φωτισμούς. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες, ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^{o}C. Στο διάγραμμα απεικονίζονται και τα τυπικά σφάλματα.

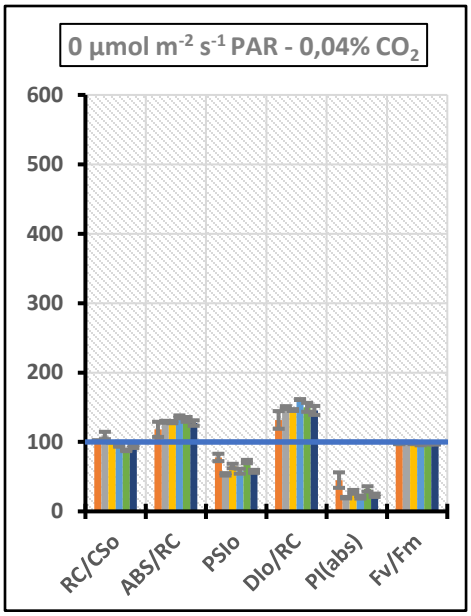
4.2 Επίδραση του CO_2 στη λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού υπό διαφορετικούς φωτισμούς

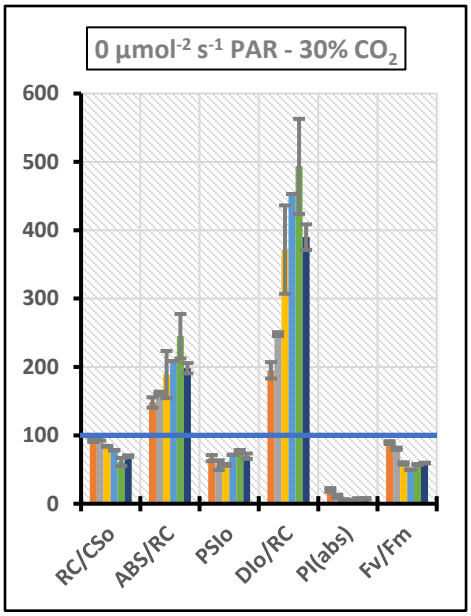
Η φωτοσυνθετική διαδικασία, όπως εξηγήσαμε, αποτελείται από δύο διακριτές διαδικασίες, τις φωτεινές και τις σκοτεινές αντιδράσεις. Εξορισμού, το φως είναι ο βασικότερος παράγοντας που ρυθμίζει τις φωτεινές αντιδράσεις, ενώ το CO_2 είναι ο βασικότερος παράγοντας που ρυθμίζει τις σκοτεινές αντιδράσεις. Από εκεί κι ύστερα, πέρα από το βασικό ρυθμιστικό κύκλο ανατροφοδοσίας NADPH – $NADP^+$ και ATP – ADP, έχουν γίνει πολλές μελέτες που αποδεικνύουν ότι πολλά από τα ένζυμα του κύκλου του Calvin είναι έμμεσα φωτοελεγχόμενα. Εντούτοις, και οι σκοτεινές αντιδράσεις ελέγχονται από το φως (Leegood, 1985; Lonergan, 2000), κάτι που αποσκοπεί στον συντονισμό φωτεινών και σκοτεινών αντιδράσεων σε ένα κοινό σύστημα που ονομάζεται φυτικός οργανισμός. Στα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύεται πως μέσω του CO_2, ενεργοποιείται ένας βιοχημικός / μεταβολικός διακόπτης ο οποίος οδηγεί σε μια σειρά δραματικών αλλαγών, που αυξάνουν τη λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού μέσω τον αποδοτικότερων φωτεινών αντιδράσεων. Μόλις τα κύτταρα της καλλιέργειας ανιχνεύσουν CO_2 κυριολεκτικά καταγράφουμε άμεση αύξηση των ενεργών κέντρων αντίδρασης, και μείωση του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής κεραίας που οδηγούν σε καλύτερη και αποδοτικότερη διαχείριση της ενέργειας. Πιο συγκεκριμένα, έχουμε αύξηση της πρωτογενούς φωτοχημείας, μείωση των ενεργειακών διαρροών ανά κέντρο αντίδρασης, αύξηση της απόδοσης ανά απορροφούμενη ενέργεια και γενικότερα έναν φωτοσυνθετικό μηχανισμό σε καλύτερη κατάσταση που περιγράφεται με τα εξής χαρακτηριστικά: RC/Cs↑, Abs/RC↓, PSIo↑, DIo/RC↓ και PI(abs)↑.

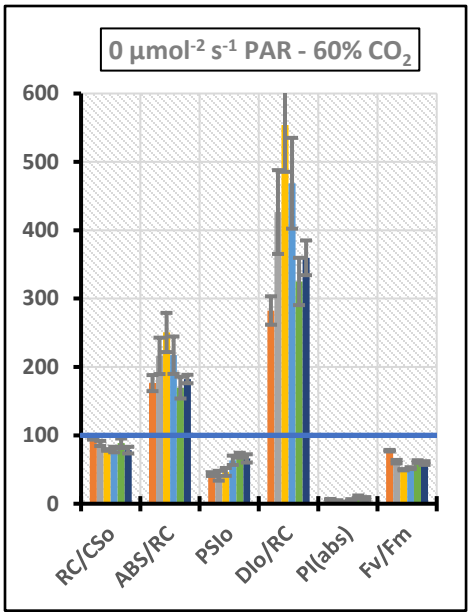
Προτού όμως προχωρήσουμε πρέπει να ξεκαθαρίσουμε πως απουσία φωτός, το CO_2 δεν είναι τίποτα άλλο πέρα από ένας παράγοντας καταπόνησης, ενώ ακόμα και προσθήκη μόλις 1% CO_2 σε περιβάλλον φωτισμού συμβάλει ευεργετικά σε ολόκληρο τον οργανισμό (παρουσία CO_2 τα κύτταρα επιβιώνουν ακόμα και σε ακραία υψηλό φωτισμό). Πιο πρακτικά, σε συνθήκες απουσίας φωτός (Εικόνα 3.3) έχουμε καλή φωτοσυνθετική κατάσταση σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις CO_2 κοντά στην ατμοσφαιρική 0,04%. Στον πολύ χαμηλό φωτισμό 10 μmol m^{-2} s^{-1} (Εικόνα 3.9) παρατηρούμε την καλύτερη φωτοσυνθετική κατάσταση σε ένα εύρος χειρισμών 5%-40% CO_2, ενώ στον χαμηλό φωτισμό των 50 μmol m^{-2} s^{-1} μεταξύ των χειρισμών 15% - 40% CO_2. Στον μέτριο και στον υψηλό φωτισμό των 100 μmol m^{-2} s^{-1} (Εικόνα 3.21) και 200 μmol m^{-2} s^{-1} (Εικόνα 3.27) αντίστοιχα διατηρείται το ίδιο εύρος χειρισμών 15% - 40% CO_2. Στον πολύ υψηλό φωτισμό των 400 μmol m^{-2} s^{-1} (Εικόνα 3.33) μετατοπίζεται η καλύτερη φωτοσυνθετική κατάσταση στους χειρισμούς 30%-40% CO_2. Σε όλους τους φωτισμούς, στο χειρισμό 40% CO_2 βλέπουμε γενικά ότι ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός αρχίζει να φθίνει και στα 60% CO_2 η καταπόνηση είναι σε όλους τους φωτισμούς πολύ έντονη. Επομένως για να συγκρίνουμε τους φωτισμούς μεταξύ τους σε σχέση με το CO_2 επιλέξαμε 3 σαφώς διακριτές καταστάσεις. Θεωρούμε το 30% CO_2 ως τη βέλτιστη συγκέντρωση ανόργανου άνθρακα. Ως μία κατάσταση καταπόνησης, λόγω έλλειψης ανόργανου άνθρακα, θεωρούμε βάσει των αποτελεσμάτων

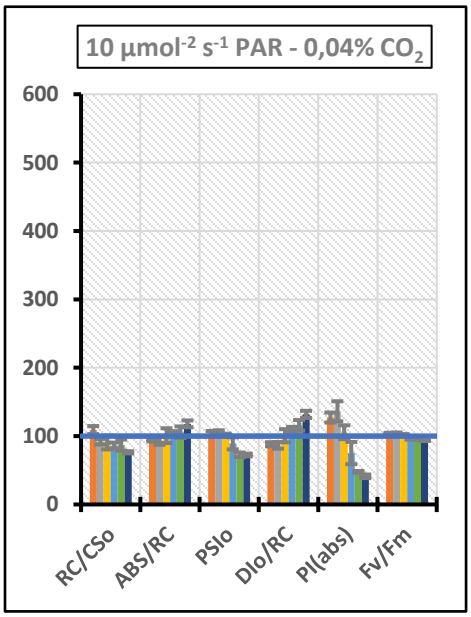
τον χειρισμό 0,04% CO_2. Ως μία τρίτη διακριτή κατάσταση καταπόνησης, λόγω υπερβολικά υψηλής συγκέντρωσης ανόργανου άνθρακα, θεωρούμε τον χειρισμό 60% CO_2. Όλα αυτά αναπαρίστανται στην συγκεντρωτική Εικόνα 4.2.

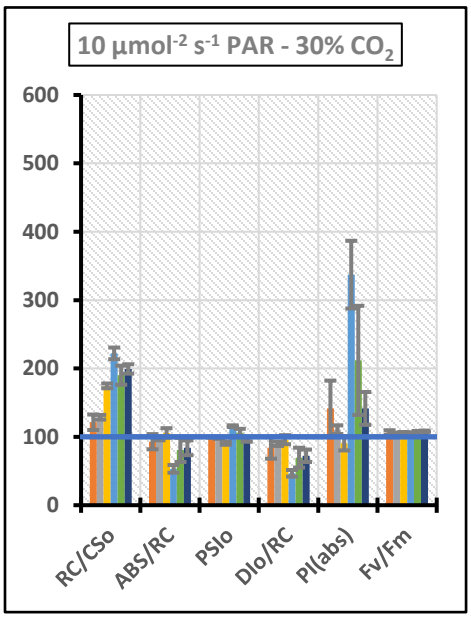
Είναι πλέον εμφανές από την Εικόνα 4.2 ότι η *Chlorella vulgaris* απαιτεί ακραίες συγκεντρώσεις CO_2 για την εύρυθμη λειτουργία της (30% CO_2 - 750 φορές υψηλότερη συγκέντρωση από την ατμοσφαιρική). Ας ελέγξουμε τώρα τον παράγοντα φως από μια ενεργειακή οπτική σε σχέση με το βέλτιστο δυνατό CO_2 για το κλειστό μας σύστημα. Αξίζει να σημειωθεί ότι αν συγκρίνουμε τα βέλτιστα αποτελέσματα από τον εκάστοτε φωτισμό, θα παρατηρήσουμε πως ο παράγοντας PSIo που εκφράζει την πιθανότητα ένα ηλεκτρόνιο να προχωρήσει στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την Q_A, δηλαδή τη φωτοχημική απόσβεση, είναι υψηλότερος στα 10 μmol m^{-2} s^{-1} ενώ μειώνεται στα 50 μmol m^{-2} s^{-1}. Από εκεί παραμένει σε χαμηλά επίπεδα αλλά περίπου σταθερός μεταξύ 100 μmol m^{-2} s^{-1}, 200 μmol m^{-2} s^{-1} και 400 μmol m^{-2} s^{-1} . Αντίθετα, ο παράγοντας DIo/RC που εκφράζει τις ενεργειακές διαρροές, δηλαδή τη μη φωτοχημική απόσβεση, αυξάνει από τα 50-100 μmol m^{-2} s^{-1} κι υψηλότερα. Λαμβάνοντας επίσης υπόψη τις κινητικές του Fv/Fm μπορούμε να προβλέψουμε ότι η μέγιστη εισροή ενέργειας που μπορεί να διαχειριστεί η *Chlorella vulgaris* αποδοτικά είναι γύρω στα 100 μmol m^{-2} s^{-1} κάτι που είναι καθοριστικό για την παραγωγή βιομάζας που θα εξετάσουμε παρακάτω καθώς η περίσσεια ενέργειας στα 200 μmol m^{-2} s^{-1} και στα 400 μmol m^{-2} s^{-1} αποσβένεται αποκλειστικά μη φωτοχημικά. Τα αποτελέσματά μας είναι σύμφωνα με τους Ali et al. 2021, που βρήκαν ότι στα 140 μmol m^{-2} s^{-1} ξεκινά έντονη παραγωγή αντιοξειδωτικών ενώσεων στο κύτταρο ως ένδειξη φωτεινής καταπόνησης σε αντίθεση με τα 40 μmol m^{-2} s^{-1} όπου τα σύγκριναν στα πειράματά τους.

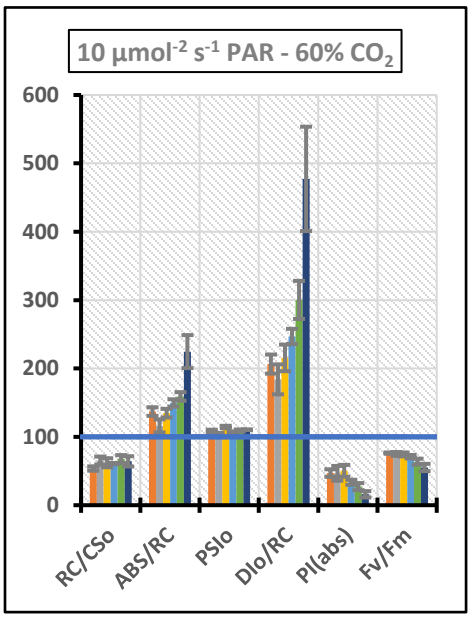

0 µmol m-2 s-1 PAR - 0,04% CO2
600
500
400
300
200
100
0
RC/CSo
ABS/RC
PSIo
DIo/RC
PI(abs)
Fv/Fm

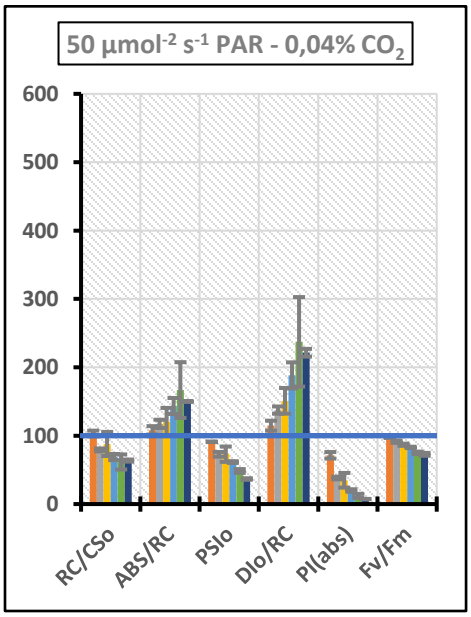

0 µmol-2 s-1 PAR - 30% CO2
600
500
400
300
200
100
0
RC/CSo
ABS/RC
PSIo
DIo/RC
PI(abs)
Fv/Fm

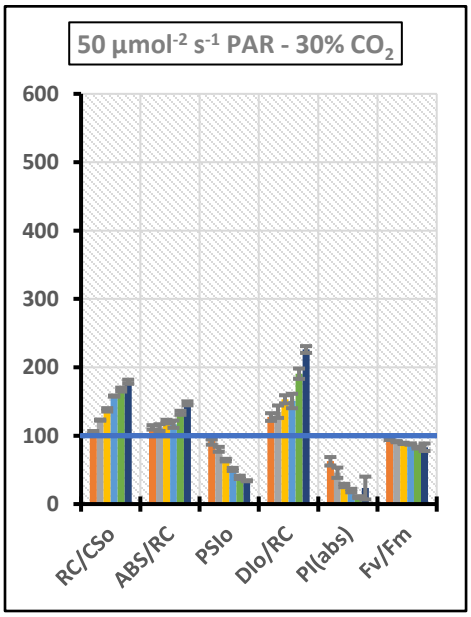

0 µmol-2 s-1 PAR - 60% CO2
600
500
400
300
200
100
0
RC/CSo
ABS/RC
PSIo
DIo/RC
PI(abs)
Fv/Fm

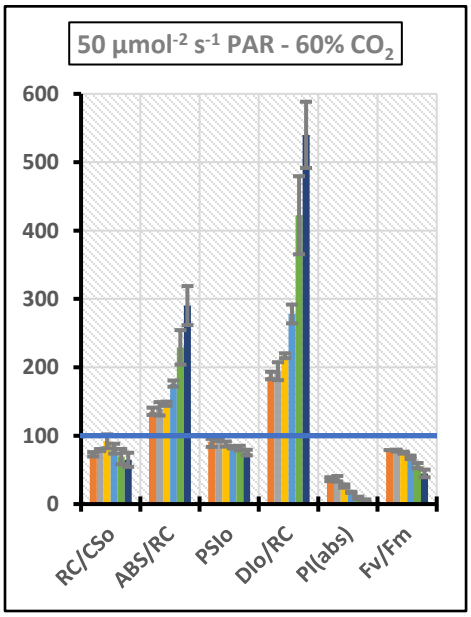

10 µmol-2 s-1 PAR - 0,04% CO2
600
500
400
300
200
100
0
RC/CSo
ABS/RC
PSIo
DIo/RC
PI(abs)
Fv/Fm

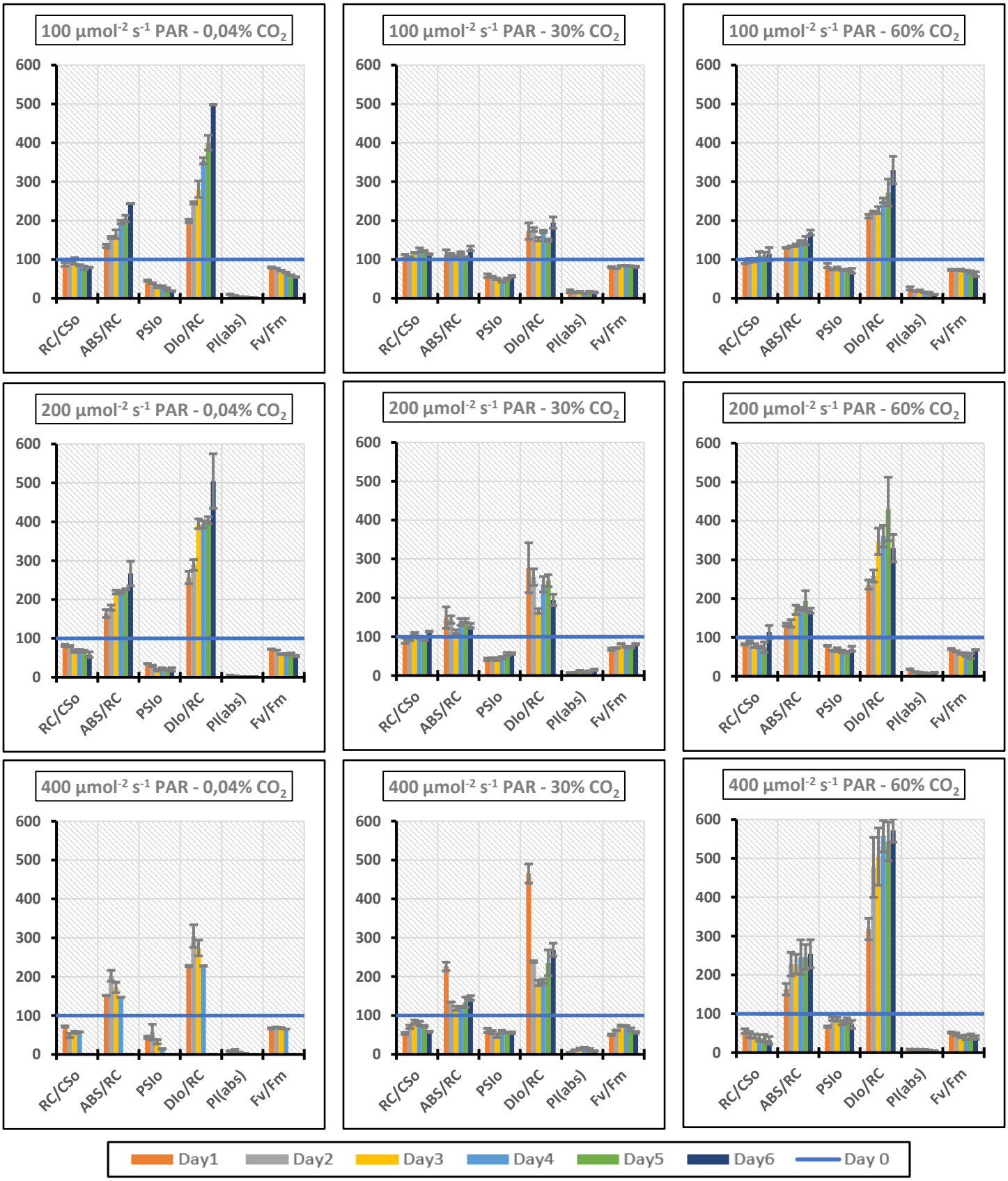

10 µmol-2 s-1 PAR - 30% CO2
600
500
400
300
200
100
0
RC/CSo
ABS/RC
PSIo
DIo/RC
PI(abs)
Fv/Fm


10 µmol-2 s-1 PAR - 60% CO2
600
500
400
300
200
100
0
RC/CSo
ABS/RC
PSIo
DIo/RC
PI(abs)
Fv/Fm


50 µmol-2 s-1 PAR - 0,04% CO2
600
500
400
300
200
100
0
RC/CSo
ABS/RC
PSIo
DIo/RC
PI(abs)
Fv/Fm


50 µmol-2 s-1 PAR - 30% CO2
600
500
400
300
200
100
0
RC/CSo
ABS/RC
PSIo
DIo/RC
PI(abs)
Fv/Fm

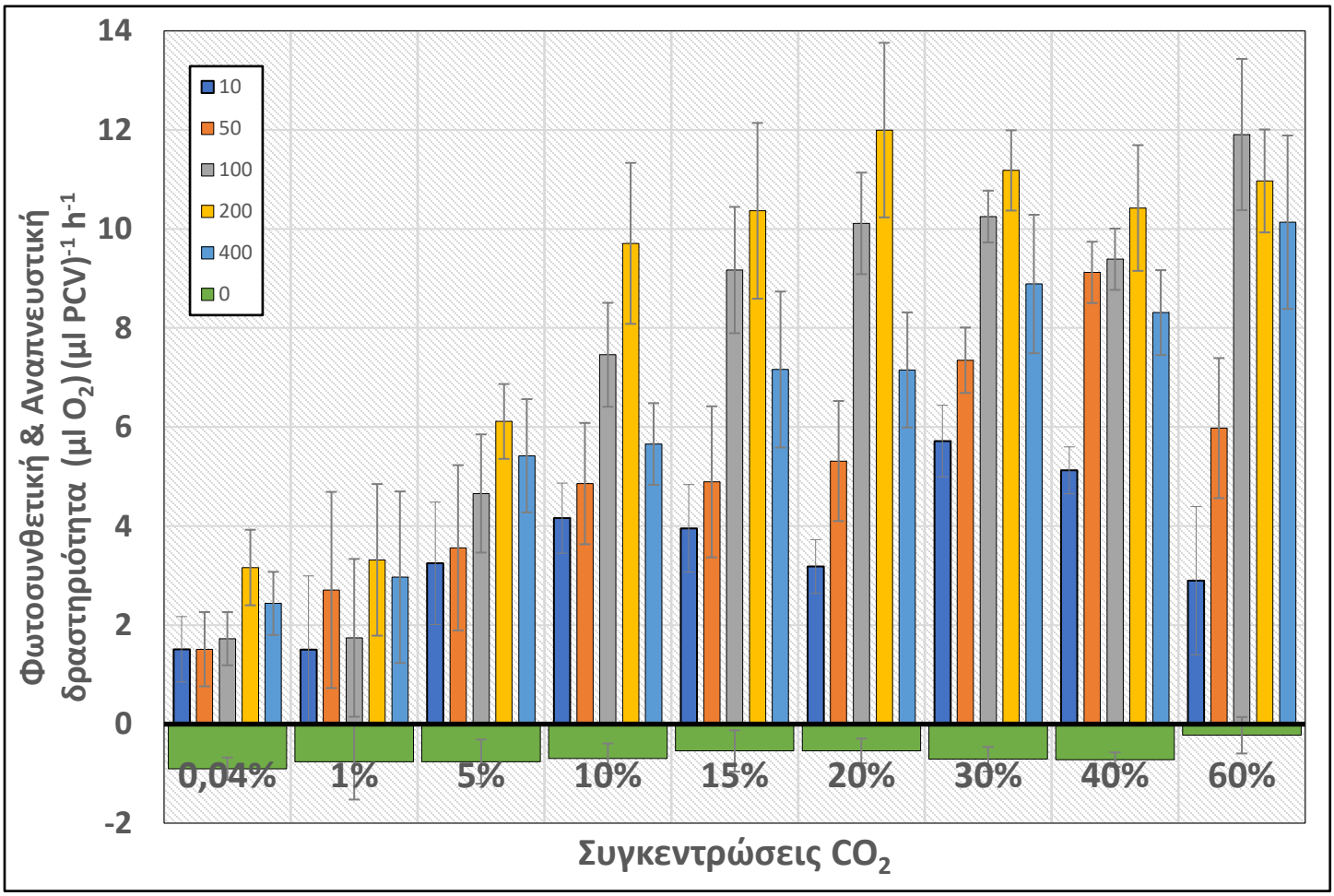

50 µmol-2 s-1 PAR - 60% CO2
600
500
400
300
200
100
0
RC/CSo
ABS/RC
PSIo
DIo/RC
PI(abs)
Fv/Fm



Εικόνα 4.2: Συγκεντρωτική συγκριτική παρουσίαση της ποσοστιαίας μεταβολής των σημαντικότερων παραμέτρων του OJIP test κανονικοποιημένων ως προς την αρχική κατάσταση (Day 0), για τις μεταχειρίσεις 0,04% CO_2, 30% CO_2 και 60% CO_2 σε όλους τους πειραματικούς φωτισμούς. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 °C.

4.3 Φωτοσυνθετική δραστηριότητα κατά την έκθεση του μικροφύκους σε διαφορετικές συνθήκες φωτισμού και διαφορετικές συγκεντρώσεις CO_2

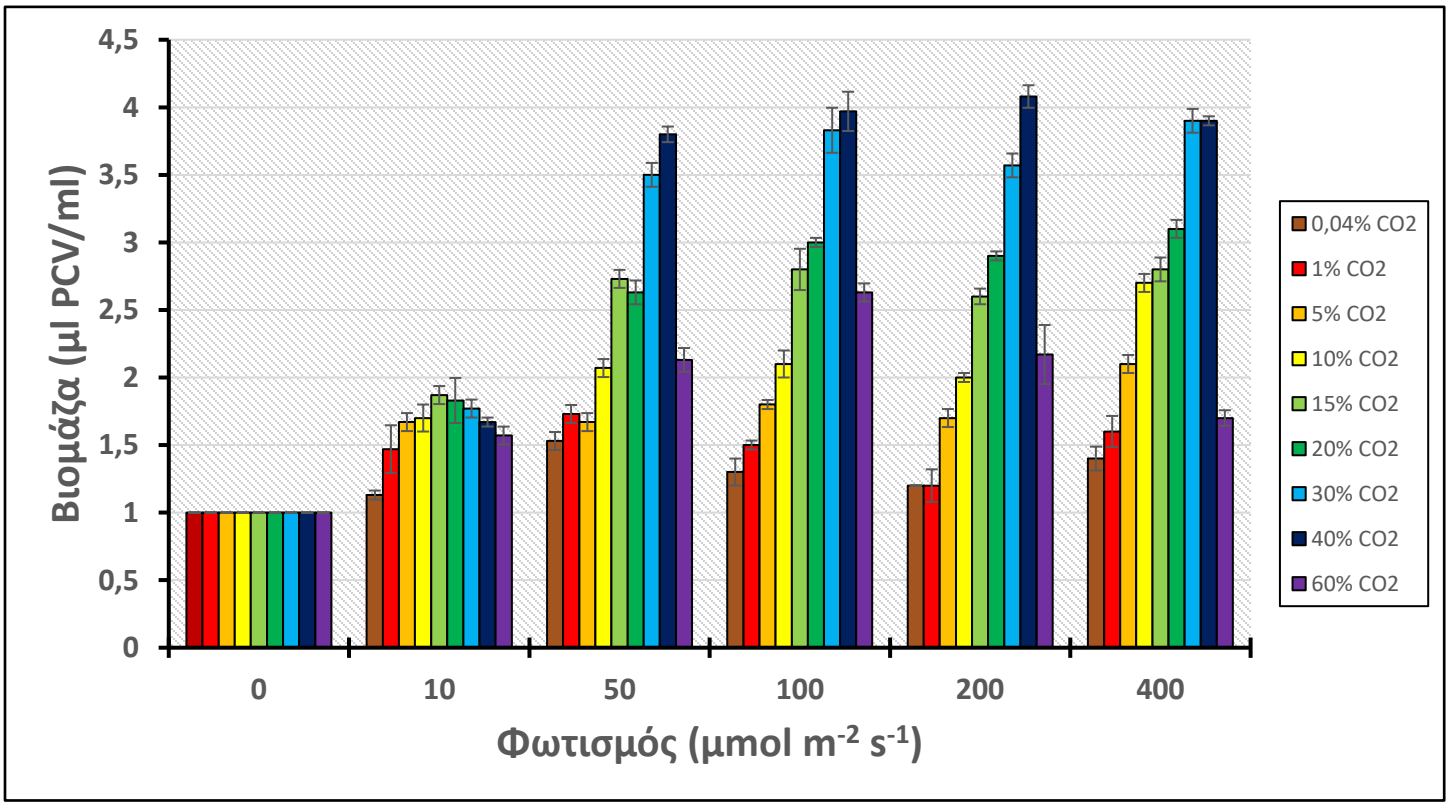
Στις παραπάνω ενότητες προσδιορίσαμε τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού βασισμένοι στην τεχνική επαγωγικού φθορισμού (OJIP test). Στη συγκεκριμένη ενότητα, προτού περάσουμε στο τελικό αποτέλεσμα της μελέτης, το οποίο είναι η βέλτιστη παραγωγή βιομάζας, ελέγξαμε την 1η ημέρα του πειράματος την φωτοσυνθετική και αναπνευστική δραστηριότητα εκφρασμένη ως (παραγωγή ή κατανάλωση αντίστοιχα) $mlO_2.mlPCV^{-1}.h^{-1}$. Τα αποτελέσματα της Εικόνας 4.3 επιβεβαιώνουν το OJIP test σε 2 βασικούς άξονες. Πρώτα από όλα, η *Chlorella vulgaris* αυξάνει το ρυθμό της φωτοσυνθετικής της δραστηριότητας από τα 10 μmol m^{-2} s^{-1} , στα 50 μmol m^{-2} s^{-1} και φτάνει σε ένα μέγιστο στα 100-200 μmol m^{-2} s^{-1} και στη συνέχεια μειώνεται στα 400 μmol m^{-2} s^{-1}. Επίσης, όσον αφορά τα επίπεδα του CO_2 βλέπουμε ότι ο ρυθμός φωτοσυνθετικής δραστηριότητας αυξάνει επίσης όσο αυξάνεται το CO_2 με τα βέλτιστα αποτελέσματα γύρω στο 30% CO_2. Το 40% CO_2 φαίνεται να είναι το σημείο στο οποίο αρχίζουμε να ξεπερνάμε την κορυφή και η απόδοση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού να αρχίζει να φθίνει. Το 60% CO_2 έχει αρκετά μεγάλη φωτοσυνθετική δραστηριότητα μόνο για την 1η ημέρα του πειράματος, ενώ μετά η καταπόνηση λόγω CO_2 τη μειώνει κατακόρυφη όπως παρατηρούμε από τα αποτελέσματα της συνολικής παραγωγής O_2 ανά καλλιέργεια στην αναλυτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 4.3: Ρυθμός καθαρής φωτοσυνθετικής και αναπνευστικής δραστηριότητας για καλλιέργειες που επωάστηκαν σε όλους τους φωτισμούς [8 ώρες σκοτάδι –16 ώρες φως]. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ºC.

4.4 Στρατηγική διαχείρισης ενεργειακών αποθεμάτων του μικροφύκους στην αύξηση βιομάζας

Η φωτοσύνθεση είναι η διαδικασία μέσω της οποίας ο οργανισμός μας αφομοιώνει ανόργανο άνθρακα υπό τη μορφή του αέριου CO_2 και του διαλυμένου στο υγρό HCO_3^-. Μετά το πέρας των σκοτεινών αντιδράσεων, ο ανόργανος άνθρακας έχει μετατραπεί σε έναν οργανικό δομικό λίθο, τον οποίο το κύτταρο και πιο σωστά η καλλιέργεια, επιλέγει πως θα επενδύσει. Μέσω της Εικόνας 4.4, όπου συγκρίνεται η φωτοσυνθετική παραγωγή O_2 σε επίπεδο καλλιέργειας την 6η και τελευταία ημέρα του πειράματος ως δείκτης της συνολικής αφομοίωσης CO_2 με την μεταβολή της βιομάζας για την εκάστοτε ένταση φωτισμού σε όλες τις συγκεντρώσεις CO_2, μπορούμε εύκολα να παρατηρήσουμε πως ο ανόργανος άνθρακας επενδύεται κυρίως προς την κατεύθυνση της αναπαραγωγής με τυχόν διαφορές να εμπίπτουν στα όρια του σφάλματος. Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψιν όλα τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούμε να προσδιορίσουμε ότι για τη βέλτιστη παραγωγή βιομάζας μπορούμε να καλλιεργήσουμε τη *Chlorella vulgaris* σε συγκέντρωση CO_2 γύρω στο 30% και φωτισμό μεταξύ 50-400 μmol m^{-2} s^{-1}. Αν μάλιστα λάβουμε υπόψη και την φωτοσυνθετική κατάσταση τότε περιοριζόμαστε στα 50-100 μmol m^{-2} s^{-1}. Σε αυτό τον φωτισμό, σε συνδυασμό και με 30% CO_2, φτάνουμε ουσιαστικά στη μέγιστη παραγωγή βιομάζας χωρίς να έχουμε ιδιαίτερη καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και κατά επέκταση του οργανισμού.



Εικόνα 4.4: Μεταβολή της βιομάζας (μl PCV/ml καλλιέργειας) ως προς την ένταση PAR (μmol m^{-2} s^{-1}) για όλες τις συγκεντρώσεις CO_2 στην αέρια φάση. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν σε τριπλέτες σε όλους τους φωτισμούς ενώ κρατήθηκε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^oC.

4.5 Ποιοτική σύσταση της παραγόμενης βιομάζας (υδατάνθρακες, λιπαρά & χρωστικές)

Οι πειραματικές μας διαδικασίες ολοκληρώθηκαν με αναλυτικές μετρήσεις υδατανθράκων, λιπαρών και χρωστικών για να ελέγξουμε εξολοκλήρου την επενδυτική στρατηγική των μικροφυκών στο σύστημά που χρησιμοποιήσαμε. Πήραμε λοιπόν τις 3 διακριτές καταστάσεις που προαναφέραμε (0,04% CO_2, 30% CO_2 και 60% CO_2) κι αναζητήσαμε τυχόν ενδείξεις συσσώρευσης λιπαρών και υδατανθράκων που αφορούν τη μετατροπή της βιομάζας σε βιοντίζελ και βιοαλκοόλη αντιστοίχως και μετρήσαμε χρωστικές για να πάρουμε περαιτέρω στοιχεία για το φωτοσυνθετικό μηχανισμό ειδικά την τελευταία ημέρα όπου θα μαζέψουμε τα κύτταρα (Εικόνα 4.5). Όσον αφορά τα λιπαρά σε γενικές γραμμές έχουμε αύξηση όσο μειώνεται η ένταση φωτισμού (και στο απόλυτο σκοτάδι) και όσο αυξάνεται η συγκέντρωση CO_2. Για τους υδατάνθρακες φαίνεται να έχουμε τις υψηλότερες τιμές σε συνθήκες υψηλού φωτισμού (200-400 μmol m^{-2} s^{-1}) και ακραίας συγκέντρωσης CO_2 (60% CO_2) (Εικόνα 4.5). Για τις ολικές χλωροφύλλες διακρίνουμε μία σταθερότητα όσον αφορά τις διαφορετικές εντάσεις φωτισμού, αλλά μία σαφή μείωση με την αύξηση της συγκέντρωσης του CO_2. Όσον αφορά τα καροτενοειδή, η φασματομετρική μας μέθοδος δεν μπόρεσε να διακρίνει κάποια σαφή τάση διαφοροποίησης μεταξύ των χειρισμών.

Για τα λιπαρά της 6η ημέρα:

Φωτισμός / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0 μmol m^{-2} s^{-1}	65,68 ± 0,32	73,66 ± 1,89	82,82 ± 4,81
10 μmol m^{-2} s^{-1}	57,24 ± 1,31	60,95 ± 1,13	82,92 ± 0,50
50 μmol m^{-2} s^{-1}	36,04 ± 2,06	33,48 ± 0,65	49,67 ± 2,53
100 μmol m^{-2} s^{-1}	62,77 ± 4,04	51,16 ± 0,45	51,00 ± 1,26
200 μmol m^{-2} s^{-1}	55,20 ± 0,40	47,42 ± 1,15	52,33 ± 1,68
400 μmol m^{-2} s^{-1}	48,37 ± 4,24	40,26 ± 2,63	47,98 ± 1,53

Για τους υδατάνθρακες της 6η ημέρας:

Φωτισμός / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0 μmol m^{-2} s^{-1}	223,35 ± 10,50	248,19 ± 8,72	260,02 ± 6,90
10 μmol m^{-2} s^{-1}	261,6 ± 30,36	349,32 ± 11,66	185,70 ± 16,57
50 μmol m^{-2} s^{-1}	192,88 ± 19,52	209,28 ± 34,35	367,07 ± 35,91
100 μmol m^{-2} s^{-1}	186,88 ± 14,88	238,53 ± 46,61	248,39 ± 24,62
200 μmol m^{-2} s^{-1}	304,57 ± 27,28	353,66 ± 6,91	467,80 ± 18,37
400 μmol m^{-2} s^{-1}	145,29 ± 0,71	256,47 ± 9,66	409,45 ± 7,18

Για τις χλωροφύλλες την 6η ημέρα:

Φωτισμός / Συγκεντρώσεις CO_2	0,04% (μg/mg DW)	30% (μg/mg DW)	60% (μg/mg DW)
0 μmol m^{-2} s^{-1}	42,36 ± 1,59	47,32 ± 3,03	56,28 ± 2,15
10 μmol m^{-2} s^{-1}	53,20 ± 1,55	58,56 ± 3,18	61,26 ± 0,65
50 μmol m^{-2} s^{-1}	50,07 ± 4,68	39,18 ± 1,69	39,52 ± 4,79
100 μmol m^{-2} s^{-1}	50,11 ± 3,90	26,72 ± 2,19	18,91 ± 0,88
200 μmol m^{-2} s^{-1}	40,35 ± 1,14	18,30 ± 2,22	22,41 ± 2,97
400 μmol m^{-2} s^{-1}	42,18 ± 1,51	23,34 ± 1,30	29,84 ± 0,15

Εικόνα 4.5: Λιπαρά, υδατάνθρακες και ολικές χλωροφύλλες για την 6η και τελευταία ημέρα του πειράματος σε όλους τους φωτισμούς για 0,04% CO_2, 30% CO_2 και 60% CO_2.

Παρόλο που αναφέρθηκαν κάποιες τάσεις μεταξύ των επιμέρους χειρισμών και της σύστασης της βιομάζας, αυτές οι διαφοροποιήσεις είναι περιορισμένης έκτασης και εν μέρει συμφωνούν με τα αποτελέσματα των Anjos et al., 2013 και Daliry et al., 2017 οι οποίοι δε βρήκαν συσχέτιση μεταξύ βιοχημικού περιεχομένου (ιδίως λιπαρά οι δεύτεροι) και αερισμού με διαφορετικές συγκεντρώσεις CO_2 στη *Chlorella vulgaris* εκτός του βασικού μεταβολισμού και του κύκλου αναπαραγωγής.

Τελικά Συμπεράσματα

- Η αυξανόμενη ένταση φωτεινής ακτινοβολίας δρα ως ένας παράγοντας καταπόνησης για το φωτοσυνθετικό μηχανισμό του μονοκύτταρου χλωροφύκους *Chlorella vulgaris* σε ατμοσφαιρική συγκέντρωση CO_2 σε ένα κλειστό σύστημα.

- Η *Chlorella vulgaris* όχι μόνο ανέχεται υψηλές έως και ακραίες συγκεντρώσεις CO_2 , αλλά οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις CO_2 δρουν ευεργετικά στη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού της μηχανισμού και κατά επέκταση στην αύξηση της βιομάζας. Πρόκειται για το ιδανικό σύστημα δέσμευσης ακραίων συγκεντρώσεων CO_2 μετατρέποντας το σε βιομάζα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Ως εκ τούτου πρόκειται για ένα σύστημα με προοπτικές για βιοτεχνολογικές και περιβαλλοντικές εφαρμογές.

- Η *Chlorella vulgaris* φτάνει τη μέγιστη βιομάζα σε ένταση φωτισμού μεταξύ 50-400 μmol m^{-2} s^{-1} και γύρω στο 30% CO_2 . Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός και γενικότερα η φυσιολογία του μικροφύκους είναι σε καλύτερη κατάσταση μεταξύ 50-100 μmol m^{-2} s^{-1} και γύρω στο 30% CO_2 . Βέλτιστος χρόνος καλλιέργειας σε τέτοια συστήματα υπολογίζεται γύρω στις 5-6 ημέρες, όπου καταγράφουμε περίπου 400% αύξηση βιομάζας, δεσμεύοντας ακραίες συγκεντρώσεις CO_2.

- Στους χειρισμούς της παρούσας εργασίας δεν παρατηρήσαμε σημαντικές διαφοροποιήσεις λιπαρών και υδατανθράκων στη βιομάζα των μικροφυκών. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση της βιομάζας κατά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας, έδειξαν σε γενικές γραμμές ότι έχουμε αύξηση των λιπαρών όσο μειώνεται η ένταση φωτισμού (και στο απόλυτο σκοτάδι) και όσο αυξάνεται ταυτόχρονα η συγκέντρωση CO_2. Για τους υδατάνθρακες φαίνεται να έχουμε τις υψηλότερες τιμές σε συνθήκες υψηλού φωτισμού (200-400 μmol m^{-2} s^{-1}) και ακραίας συγκέντρωσης CO_2 (60% CO_2).

- Όλα τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι η *Chlorella vulgaris* είναι ένα χλωροφύκος που όχι μόνο επιβιώνει, αλλά απαιτεί και τεράστιες συγκεντρώσεις CO_2 για την εύρυθμη λειτουργία της. Αυτό έχει ως συνέπεια ο οργανισμός αυτός να μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο στην παραγωγή βιοκαυσίμων, όσο και στην επίλυση περιβαλλοντικών φαινομένων όπως το φαινόμενο του θερμοκηπίου.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ali, H.E.A., El-fayoumy, E.A., Rasmy, W.E. et al. (2021). Two-stage cultivation of Chlorella vulgaris using light and salt stress conditions for simultaneous production of lipid, carotenoids, and antioxidants. J Appl Phycol 33, 227–239 (2021). https://doi.org/10.1007/s10811-020-02308-9

Anjos, M., Fernandes, B.D., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., Dragone, G. (2013). Optimization of CO_2 bio-mitigation by Chlorella vulgaris, Bioresource Technology 139: 149-154. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.032.

Archibald, J. M. (2006). Algal Genomics: Exploring the Imprint of Endosymbiosis. Current Biology, 16(24), R1033–R1035. doi:10.1016/j.cub.2006.11.008

Arnon, D. (1971). The Light Reactions of Photosynthesis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA Vol. 68, No. 11, pp. 2883-2892.

Bassham, J., Benson, A., Calvin, M. (1950). "The path of carbon in photosynthesis" , J Biol Chem. 185 (2): 781–7. doi:10.2172/910351.

Becker, B. (2007). Function and Evolution of the Vacuolar Compartment in Green Algae and Land Plants (Viridiplantae). International Review of Cytology, 1–24. doi:10.1016/s0074-7696(07)64001-7

Beyerinck [Beijerinck], M.W. (1890). Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. Botanische Zeitung 47: 725-739, 741-754, 757-768, 781-785.

Choi, H.-J., Montemagno, C. (2013). Recent Progress in Advanced Nanobiological Materials for Energy and Environmental Applications. Materials, 6(12), 5821–5856. doi:10.3390/ma6125821

Dalrymple, G. B. (2001). The age of the Earth in the twentieth century: a problem (mostly) solved. Geological Society, London, Special Publications, 190(1), 205–221. doi:10.1144/gsl.sp.2001.190.01.14

Dodd, M. S., Papineau, D., Grenne, T., Slack, J. F., Rittner, M., Pirajno, F., … Little, C. T. S. (2017). Evidence for early life in Earth's oldest hydrothermal vent precipitates. Nature, 543(7643), 60–64. doi:10.1038/nature21377

Folch J, Lees M, Stanley, G.H.S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. The Journal of Biological Chemistry 226: 497–509.

Giordano, M., Beardall, J., Raven, J. A. (2005). CO_2 concentrating mechanisms in algae: Mechanisms, Environmental Modulation, and Evolution. Annual Review of Plant Biology, 56(1): 99–131. doi:10.1146/annurev.arplant.56.032604.144052

Golzary, Abooali (2017). Investigation of optimal condition for Chlorella vulgaris microalgae growth. Global Journal of Environmental Science and Management. 113: 217-230. 10.22034/gjesm.2017.03.02.010.

Gouveia, L., Raymundo, A., Batista, A. P., Sousa, I., Empis, J. (2005). Chlorella vulgaris and Haematococcus pluvialis biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. European Food Research and Technology, 222(3-4): 362–367. doi:10.1007/s00217-005-0105-z

Jensen, P. E., Leister, D. (2014). Chloroplast evolution, structure and functions. F1000Prime Reports, 6. doi:10.12703/p6-40

Johnson, M. P. (2016). Photosynthesis. Essays In Biochemistry, 60(3): 255–273. doi:10.1042/ebc20160016

Keeling, P. J. (2004). Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. American Journal of Botany, 91(10): 1481–1493. doi:10.3732/ajb.91.10.1481

Logothetis, K., Dakanali, S., Ioannidis, N., Kotzabasis, K. (2004). The impact of high CO2 concentrations on the structure and function of the photosynthetic apparatus and the role of polyamines. J. Plant Physiol. 161(6): 715-724.

Mohapatra, P. K., Singh, N. R. (2014). Teaching the Z-Scheme of electron transport in photosynthesis: a perspective. Photosynthesis Research 123(1): 105–114. doi:10.1007/s11120-014-0034-4

Nichols, H. W., Bold, H. C. (1965). Trichosarcina polymorpha Gen. et Sp. Nov. Journal of Phycology, 1(1): 34–38. doi:10.1111/j.1529-8817.1965.tb04552.x

Noffke, N., Christian, D., Wacey, D., & Hazen, R. M. (2013). Microbially Induced Sedimentary Structures Recording an Ancient Ecosystem in the ca. 3.48 Billion-Year-Old Dresser Formation, Pilbara, Western Australia. Astrobiology 13(12): 1103–1124. doi:10.1089/ast.2013.1030

Papazi, A., Kotzabasis, K. (2013). “Rational” Management of Dichlorophenols Biodegradation by the Microalga Scenedesmus obliquus. PLoS ONE, 8(4), e61682. doi:10.1371/journal.pone.0061682

Papazi, A., Korelidou, A., Andronis, E., Parasyri, A., Stamatis, N., Kotzabasis, K. (2017). Bioenergetic reprogramming plasticity under nitrogen depletion by the unicellular green alga Scenedesmus obliquus . Planta, 247(3): 679–692. doi:10.1007/s00425-017-2816-3

Peng, L., Fu, D., Chu, H. et al. Biofuel production from microalgae: a review. Environ Chem Lett 18: 285–297 (2020). doi.org/10.1007/s10311-019-00939-0

Raines, C. A. (2003). Photosynthesis Research, 75(1): 1–10. doi:10.1023/a:1022421515027

Ratajczak, R. (2000). Structure, function and regulation of the plant vacuolar H+-translocating ATPase. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1465(1-2): 17–36. doi:10.1016/s0005-2736(00)00129-2

Roach, T., & Krieger-Liszkay, A. (2014). Regulation of Photosynthetic Electron Transport and Photoinhibition. Current Protein & Peptide Science, 15(4): 351–362. doi:10.2174/1389203715666140327105143

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 35: 265–278. doi:10.1016/j.rser.2014.04.007

Sati, H., Mitra, M., Mishra, S., & Baredar, P. (2019). Microalgal lipid extraction strategies for biodiesel production: A review. Algal Research 38: 101413. doi:10.1016/j.algal.2019.101413

Schulze, C., Wetzel, M., Reinhardt, J., Schmidt, M., Felten, L., & Mundt, S. (2016). Screening of microalgae for primary metabolites including β-glucans and the influence of nitrate starvation and irradiance on β-glucan production. Journal of Applied Phycology, 28(5): 2719–2725. doi:10.1007/s10811-016-0812-9

Serra-Maia, R., Bernard, O., Gonçalves, A., Bensalem, S., & Lopes, F. (2016). Influence of temperature on Chlorella vulgaris growth and mortality rates in a photobioreactor. Algal Research 18: 352–359. doi:10.1016/j.algal.2016.06.016

Singh, S. P., & Singh, P. (2014). Effect of CO2 concentration on algal growth: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 38: 172–179. doi:10.1016/j.rser.2014.05.043

Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., & Srivastava, A. (2004). Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient. Advances in Photosynthesis and Respiration, 321–362. doi:10.1007/978-1-4020-3218-9_12

Szulejko, J. E., Kumar, P., Deep, A., & Kim, K.-H. (2017). Global warming projections to 2100 using simple CO 2 greenhouse gas modeling and comments on CO2 climate sensitivity factor. Atmospheric Pollution Research, 8(1): 136–140. doi:10.1016/j.apr.2016.08.002

Walker, D. A. (2002). The Z-scheme – down hill all the way. Trends in Plant Science, 7(4): 183–185. doi:10.1016/s1360-1385(02)02242-2

Wong YK, Ho YH, Ho KC, Leung HM, Yung KKL (2017) Growth Medium Screening for Chlorella vulgaris Growth and Lipid Production. J Aquac Mar Biol 6(1): 00143 DOI: 10.15406/jamb.2017.06.00143

Yamamoto, M., Fujishita, M., Hirata, A., & Kawano, S. (2004). Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga Chlorella vulgaris (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). Journal of Plant Research, 117(4). doi:10.1007/s10265-004-0154-6