

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**



**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ**

**«ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΠΟΛΥΔΡΟΞΥΛΙΚΩΝ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ  
ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *PSEUDOMONAS SP.*  
PHDV1»**

**ΓΚΙΚΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ**

**Υπεύθυνος Καθηγητής: ΤΣΙΩΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2024**

**UNIVERSITY OF CRETE  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

**BACHELOR THESIS**

**BIOCHEMICAL LABORATORY**



**BACHELOR EDUCATIONAL DEGREE**

**«DEGRADATION OF POLYDROXY AROMATIC  
COMPOUNDS BY THE BACTERIUM *PSEUDOMONAS* SP.  
PHDV1»**

**GKIKAS GEORGIOS**

**Bachelor Thesis Supervisor: TSIOTIS GEORGIOS**

**HERAKLION 2024**

## **Εξεταστική Επιτροπή**

**Τσιώτης Γεώργιος**

***Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Τομέας Βιοχημείας,  
Πανεπιστήμιο Κρήτης (Επιβλέπων)***

**Γανωτάκης Δημήτριος**

***Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Τομέας Βιοχημείας,  
Πανεπιστήμιο Κρήτης***

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Γεώργιο Τσιώτη, που με εμπιστεύτηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ στο εργαστήριό του προκειμένου να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον δεύτερο αξιολογητή της πτυχιακής μου εργασίας, τον Καθηγητή Δημήτριο Γανωτάκη, για τον χρόνο και την υπομονή που διέθεσε στην ανάγνωση και αξιολόγηση της εργασίας μου. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στον υποψήφιο διδακτορικό φοιτητή του εργαστηρίου, Αλέξανδρο Λυρατζάκη, και στον Διονύσιο Ερμή Γελαδά, οι οποίοι με βοήθησαν να εξελιχθώ, να μάθω νέες τεχνικές και γενικότερα ήταν δίπλα μου όποτε τους χρειαζόμουν. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου που στάθηκαν δίπλα μου σε όλη αυτή την πορεία για την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

## Περίληψη

Ένα από τα φλέγοντα ζητήματα του σύγχρονου κόσμου αποτελεί το θέμα των πλαστικών και η μόλυνση του περιβάλλοντος από τα υλικά αυτά. Τα πλαστικά, εξαιτίας του γεγονότος ότι δεν είναι βιοδιασπώμενα και παραμένουν σχεδόν άθικτα με το πέρασμα του χρόνου, αποτελούν μία από τις σημαντικότερες απειλές για τα χερσαία και τα υδάτινα οικοσυστήματα. Για τον λόγο αυτό, όλο και περισσότερες εταιρίες προσπαθούν να κατασκευάσουν νέα υλικά, όπως είναι τα βιοπλαστικά, τα οποία θα αντικαταστήσουν τα πλαστικά και θα είναι πολύ πιο οικολογικά και φιλικά για το περιβάλλον. Τα πολυυδροξυαλκανοϊκά (PHAs) αποτελούν μια κατηγορία πολυμερών τα οποία παράγονται από μικροοργανισμούς και μέσω αυτών κατασκευάζονται βιοπλαστικά, τα οποία έχουν εξαιρετική βιοαποικοδομησιμότητα. Στην συγκεκριμένη εργασία μελετάται η παραγωγή του PHB, το οποίο είναι το πιο διαδεδομένο και μελετημένο πολυ-υδροξυαλκανοϊκό οξύ, από το στέλεχος του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. rhDV1. Πιο συγκεκριμένα, αυτό το αερόβιο και αρνητικό κατά Gram βακτηριακό στέλεχος, έχει την ικανότητα να παράγει σφαιρίδια PHB (ή αλλιώς καρβοσώματα) στο εσωτερικό του, όταν βρίσκεται σε συνθήκες καταπόνησης. Για την παραγωγή, λοιπόν, αυτών των καρβοσωμάτων, πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη του στελέχους σε διαφορετικές πηγές άνθρακα όπως φαινόλη και άλλες μονοκυκλικές πολυυδροξυλικές αρωματικές ενώσεις, τις οποίες χρησιμοποιεί το βακτήριο ως πηγή άνθρακα. Η ποσοτικοποίηση του PHB έγινε μέσω μέτρησης της ποσότητας του κροτονικού οξέος με HPLC και η παρατήρηση των καρβοσωμάτων του βακτηρίου πραγματοποιήθηκε μέσω του οπτικού μικροσκοπίου. Ο μεταβολισμός των αρωματικών ενώσεων από το βακτήριο μελετήθηκε με φασματοσκοπία ορατού και μέσω της τεχνικής NMR  $^1\text{H}$ .

**Λέξεις κλειδιά:** *Pseudomonas* sp. rhDV1, πολυ-υδροξυαλκανοϊκά οξέα (PHAs), πολυ-υδροξυβουτυρικό οξύ (PHB), καρβοσώματα, HPLC, NMR  $^1\text{H}$

## Abstract

One of the burning issues of the modern world is the issue of plastics and the pollution of the environment by these materials. Plastics, due to the fact that they are non-biodegradable and remain almost intact over time, are one of the most significant threats to terrestrial and aquatic ecosystems. For this reason, more and more companies are trying to manufacture new materials, such as bioplastics, which will replace plastics and will be much more ecological and environmentally friendly. Poly-hydroxyalkanoates (PHAs) are a class of polymers, which are produced by microorganisms and through them bioplastics are made, which have excellent biodegradability. In this work, the production of PHB, which is the most widely used and studied poly-hydroxyalkanoic acid, by the bacterial strain *Pseudomonas* sp. phDV1 is studied. More specifically, this aerobic and Gram-negative bacterial strain has the ability to produce PHB pellets (or carbosomes) inside itself when under stress. To produce these carbosomes, therefore, the strain was grown in different carbon sources such as phenol and other monocyclic polyhydroxy aromatic compounds, which the bacterium uses as a carbon source. PHB was quantified by measuring the amount of crotonic acid by HPLC and observation of the bacterial carbosomes was carried out by optical microscope. The metabolism of aromatic compounds by the bacterium was studied by visible spectroscopy and through NMR  $^1\text{H}$  technique.

**Keywords:** *Pseudomonas* sp. phDV1, poly-hydroxyalkanoic acids (PHAs), poly-hydroxybutyric acid (PHB), carbosomes, HPLC, NMR  $^1\text{H}$

## Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Πλαστικά και περιβάλλον.....	9
1.2 Παραγωγή βιοϋλικών μέσω ζωντανών μικροοργανισμών.....	11
1.3 Παραγωγή βιοπολυμερών μορίων από το βακτηριακό στέλεχος <i>Pseudomonas</i> sp. pHDV1.....	11
1.4 Πολυ-υδροξυαλκανοϊκά οξέα (PHAs).....	13
1.4.1 Ιδιότητες και εφαρμογές των πολυ-υδροξυαλκανοϊκών οξέων (PHAs).....	15
1.4.2 Έκφραση των PHAs από τους μικροοργανισμούς.....	16
1.4.3 Σύσταση σφαιριδίων (καρβოსώματα) πολυ-υδροξυαλκανοϊκών οξέων και τα PHB.....	17
1.4.4 Βιοσυνθετικά μονοπάτια των PHAs – PHBs.....	18
1.5 Χρώση Nile Red.....	21
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	22
3. ΥΛΙΚΑ.....	23
3.1 Διαλύματα για την καλλιέργεια κυττάρων.....	23
3.2 Διαλύματα για οπτικό μικροσκόπιο και μικροσκόπιο φθορισμού.....	25
3.3 Διαλύματα για το τεστ κινητικής.....	25
4. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
4.1 Καλλιέργεια του στελέχους <i>Pseudomonas</i> sp. pHDV1.....	26
4.1.1 Στερεή καλλιέργεια κυττάρων.....	26
4.1.2 Κύρια υγρή καλλιέργεια του στελέχους.....	26
4.2 Καμπύλες ανάπτυξης.....	27
4.3 Φασματοσκοπική μέτρηση συγκέντρωσης φαινόλης.....	27
4.4 Συλλογή κυττάρων.....	27
4.5 Παρατήρηση των κυττάρων σε οπτικό μικροσκόπιο και μικροσκόπιο φθορισμού με την χρώση Nile Red.....	28
4.6 Ποσοτικοποίηση του PHB με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	28
4.7 Μελέτη διάσπασης του γαλλικού οξέος με NMR <sup>1</sup> H.....	30
4.8 Προσδιορισμός αποικοδόμησης του γαλλικού οξέος με NMR <sup>1</sup> H.....	30
4.9 Επίδραση του pH στο χρώμα των καλλιεργειών με πηγή άνθρακα γαλλικό οξύ.....	30
4.10 Τεστ κινητικής.....	31
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	32
5.1 Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου κάτω από διαφορετικές πηγές άνθρακα.....	32
5.2 Φασματοσκοπική μέτρηση συγκέντρωσης φαινόλης για συγκεντρώσεις 400, 600, 800 mg/L.....	35
5.3 Επίδραση του pH στο χρώμα των καλλιεργειών με πηγή άνθρακα γαλλικό οξύ.....	37
5.4 Τεστ κινητικής με στόχο την διαλεύκανση του καταβολισμού των ρύπων κάθε καλλιέργειας.....	38
5.5 Προσδιορισμός με NMR <sup>1</sup> H της πορείας διάσπασης του γαλλικού οξέος, χωρίς την παρουσία κυττάρων.....	45
5.6 Παρατήρηση των κυττάρων σε οπτικό μικροσκόπιο και μικροσκόπιο φθορισμού με την χρώση Nile Red.....	52

5.7 Ποσοτικοποίηση του ΡΗΒ με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	54
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	56
7. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ.....	57
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	58

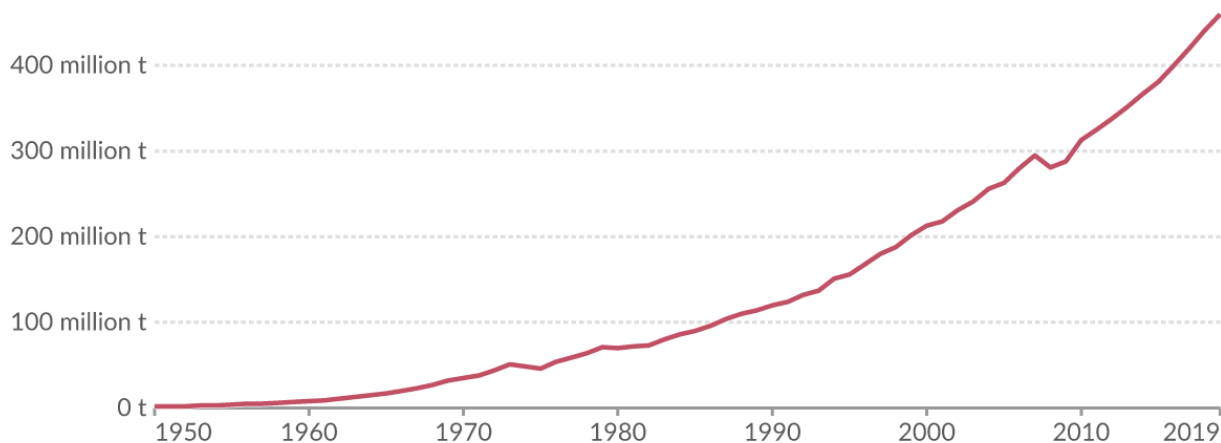


# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Πλαστικά και περιβάλλον

Τα πλαστικά είναι οργανικά πολυμερή τα οποία είναι είτε συνθετικά, είτε ημισυνθετικά και αποτελούν φθηνές, ανθεκτικές, ελαφριές και μακράς διάρκειας πρώτες ύλες. Τα τελευταία 50 χρόνια έχουν ενσωματωθεί στην καθημερινή ζωή του ανθρώπου λόγω αυτών των βασικών ιδιοτήτων τους (Walter L. F. et. al., 2021). Η λέξη «πλαστικά» αναφέρεται σε μια ευρεία κατηγορία συνθετικών και ημισυνθετικών πολυμερών υλικών που προέρχονται από ορυκτούς υδρογονάνθρακες και κατασκευάζονται για να ικανοποιούν τις ποικίλες απαιτήσεις χιλιάδων τελικών προϊόντων. Ο αυξανόμενος παγκόσμιος πληθυσμός μπορεί πλέον να εφοδιάζεται με τα υλικά που χρειάζεται χάρη στην ανάπτυξη του τομέα των πλαστικών, αλλά η συμβατική παραγωγή πλαστικών εξακολουθεί να εξαρτάται από τα ορυκτά καύσιμα. Λόγω του ευρέος φάσματος εφαρμογών για τις οποίες χρησιμοποιούνται τα πλαστικά, η παραγωγή πλαστικών αυξάνεται σταθερά και προβλέπεται να τετραπλασιαστεί τα επόμενα 20 χρόνια. Η παραγωγή πλαστικών παγκοσμίως εκτιμάται ότι έφτασε τα 360 εκατομμύρια τόνους το 2018, με την Ευρώπη να παράγει το 18,5% του συνόλου αυτού (Walter L. F. et. al., 2021). Παρά όλα τα οφέλη της χρήσης πλαστικού, το ζήτημα της διαρροής πλαστικού στο περιβάλλον γίνεται όλο και πιο σημαντικό. Εκτός από τη δημιουργία προφανών ζητημάτων για το τοπίο, η ρύπανση από πλαστικό στο έδαφος, τα θαλάσσια και τα οικοσυστήματα γλυκού νερού αποτελεί σημαντική απειλή για την υγεία των ανθρώπων και άλλων ζωντανών οργανισμών. Η ίδια η ποιότητα που κάνει τα πλαστικά τόσο ελκυστικά γίνεται επίσης μειονέκτημα, λόγω της ακραίας αντίστασής τους στη φθορά σε ανοιχτό περιβάλλον. Τα βιοπλαστικά υπόσχονται πολλά για την αντιμετώπιση διαφόρων περιβαλλοντικών ζητημάτων, καθώς μπορούν να είναι είτε βιολογικής προέλευσης είτε

βιοδιασπώμενα. Ορισμένα πλαστικά βιολογικής βάσης μπορούν να διασπαστούν με φυσικό τρόπο σε αβλαβή μόρια στο περιβάλλον, ενώ άλλα χρειάζονται συγκεκριμένες συνθήκες για να διασπαστούν. Τα τελευταία χρόνια, η παραγωγή βιοπλαστικών αυξάνεται σταθερά σε παγκόσμια κλίμακα (Walter L. F. et. al., 2021).



Εικόνα 1.1: Σχηματική απεικόνιση της ποσότητας των καθιερωμένων πλαστικών με το πέρασ των χρόνων. (Our World in Data & Geyer et al. (2017), 2015)

## Global production capacities of bioplastics



Εικόνα 1.2: Διαγραμματική απεικόνιση της παραγωγής βιοπλαστικών με το πέρασ των χρόνων. (Karen L. 2021)

### 1.2 Παραγωγή βιοϋλικών μέσω ζωντανών μικροοργανισμών

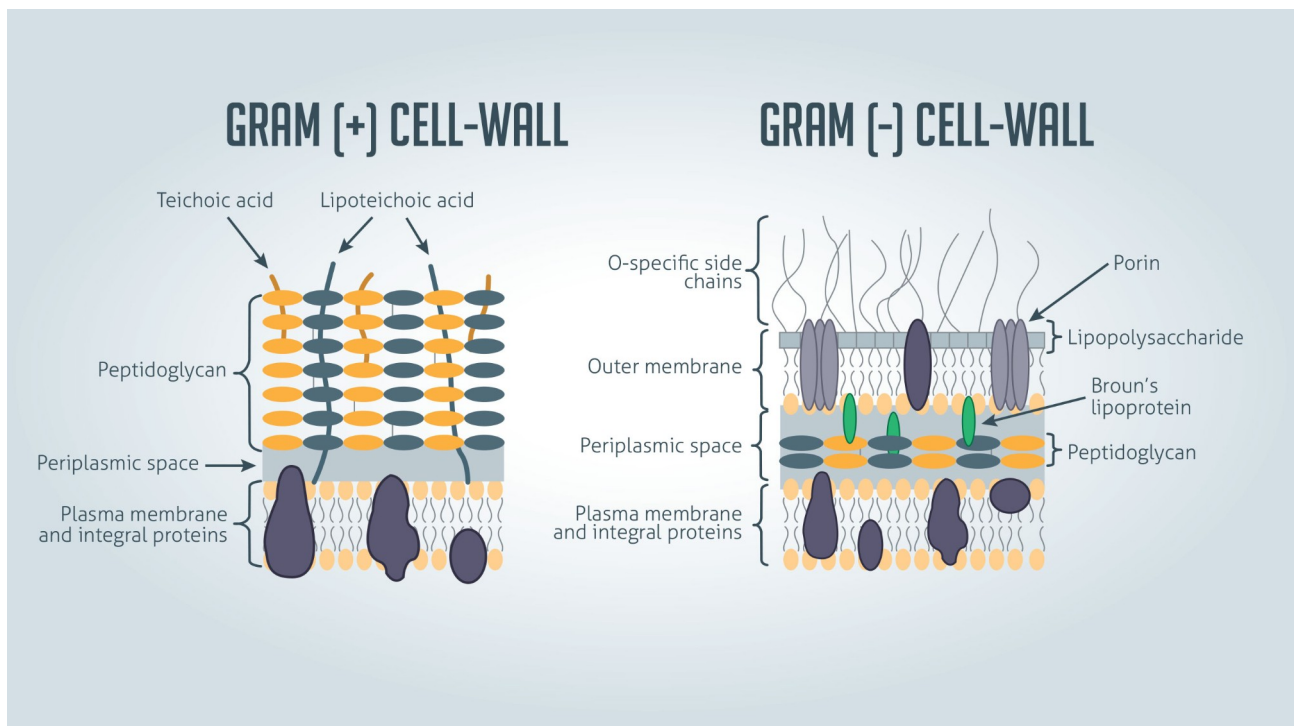
Τα βιοϋλικά είναι φυσικές ουσίες με ευρύ φάσμα βιοτεχνολογικών χρήσεων που συντίθενται και καταβολίζονται από διάφορους οργανισμούς, όπως είναι τα στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas* (Tsirogianni I., et. al., 2004). Έχουν σημαντικό πλεονέκτημα έναντι άλλων κοινών συνθετικών αγαθών, καθώς είναι βιοδιασπώμενα, διασπώνται εύκολα από διάφορα είδη και δεν έχουν επιβλαβείς επιδράσεις στον ξενιστή. Ένα συγκεκριμένο είδος βιοϋλικού είναι το βιοπλαστικό. Πρόκειται για πολυεστέρες που κατασκευάζονται από διάφορους μικροοργανισμούς που καλλιεργούνται σε διάφορα θρεπτικά και περιβαλλοντικά περιβάλλοντα. Αυτά τα πολυμερή, τα οποία συχνά βασίζονται σε λιπίδια, σχηματίζονται σαν κόκκοι που επιτρέπουν την επιβίωση των μικροβίων σε στρεσογόνα περιβάλλοντα. Ανάλογα με τον οργανισμό παραγωγής, υπάρχουν διαφορετικά μεγέθη και

αριθμοί κόκκων, διαφορετικές συνθέσεις μονομερών και μακρομοριακών δομών με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες (José M.L. et. al., 2003) .

### 1.3 Παραγωγή βιοπολυμερών μορίων από το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas* sp. pHDV1

Εξαιτίας των καταστρεπτικών επιπτώσεων των πλαστικών προς το περιβάλλον και τους οργανισμούς, εφαρμόστηκαν καινοτόμες ιδέες προκειμένου να παρασκευαστούν διαφορετικά ασφαλή και βιοδιασπώμενα είδη, τα οποία θα διαδραματίσουν τον σημαντικό ρόλο των πλαστικών στην καθημερινότητα του σύγχρονου κόσμου. Πιο συγκεκριμένα, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες στρες, βακτήρια διαφόρων ειδών συσσωρεύουν στο εσωτερικό τους βιοπολυεστέρες που ονομάζονται πολυυδροξυαλκανοϊκοί εστέρες (PHAs). Τα PHAs είναι ενώσεις που αποθηκεύουν άνθρακα και ενέργεια στο εσωτερικό των βακτηρίων και σε καταστάσεις όπου υπάρχει έλλειψη φωσφόρου ή αζώτου, τα βακτήρια τα χρησιμοποιούν ως ένα είδος μορίου αποθήκευσης ενέργειας. Τα PHAs είναι βιοδιασπώμενα και βιοσυμβατά, γεγονός που τα καθιστά βιώσιμα υποκατάστατα των παραδοσιακών πολυμερών. Ωστόσο, το υψηλό κόστος των PHAs εμποδίζει την ευρεία χρήση τους ως υποκατάστατο των συμβατικών πλαστικών. Σύγχρονες μελέτες έδειξαν ότι συγκεκριμένα, το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas* sp. pHDV1, όταν βρεθεί σε στρεσογόνες συνθήκες, έχει την ικανότητα να παράγει PHAs με την βοήθεια διάφορων ενζύμων, διασπώντας αρχικά τον ρύπο που προκαλεί στο βακτήριο τις συνθήκες καταπόνησης – στρες και έπειτα μεταβολίζοντας τον προς ενώσεις που θα παράξουν τελικά τα PHAs. Το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas* sp. pHDV1 βρέθηκε και απομονώθηκε από εδάφη μολυσμένα από απόβλητα διυλιστηρίων στην Δανία και αποτελεί ένα αερόβιο και αρνητικό κατά Gram βακτήριο (Tsirogianni I., et. al., 2004). Αναλυτικότερα, τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια περιβάλλονται από μία εξωκυτταρική μεμβράνη και περιέχουν στο εσωτερικό τους και μία στρώση πεπτιδογλυκάνης. Αντίθετα, τα θετικά κατά

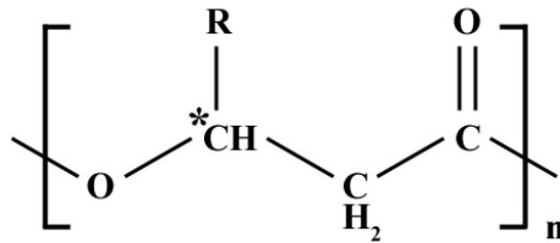
Gram βακτήρια δεν περιέχου εξωτερική μεμβράνη, αλλά περιέχουν πάνω από μία στρώσεις πεπτιδογλυκάνης (Εικόνα 1.3). Όσον αφορά στον μεταβολισμό του βακτηρίου, έχει βρεθεί ότι το συγκεκριμένο στέλεχος έχει την ικανότητα να αποικοδομεί μονοκυκλικές αρωματικές ενώσεις (όπως φαινόλες, κρεσόλες, απόβλητα οينوποιείων) που του προκαλούν στρεσογόνες συνθήκες, και τις περισσότερες από αυτές να τις μετατρέπει σε PHAs (Drakonaki A, et. al., 2023).



Εικόνα 1.3: Απεικόνιση των δύο διαφορετικών τύπων βακτηρίων. Αριστερά φαίνεται η μορφή της μεμβράνης ενός θετικά κατά Gram βακτήριο. Δεξιά φαίνεται η μορφή της μεμβράνης ενός αρνητικά κατά Gram βακτήριο. (Karen S., 2019)

## 1.4 Πολυ-υδροξυαλκανοϊκά οξέα (PHAs)

Το PHA είναι μια οικογένεια βιοπολυεστέρων που εμφανίζονται στη φύση και παράγονται από διάφορους μικροοργανισμούς. Συνήθως, ένα μόριο PHA αποτελείται από 600-35.000 μονάδες μονομερούς (R)-υδροξυ-λιπαρού οξέος. Η ομάδα R της πλευρικής αλυσίδας που υπάρχει σε κάθε μονάδα μονομερούς είναι συνήθως κορεσμένο αλκύλιο, αλλά μπορεί επίσης να είναι ακόρεστο, διακλαδισμένο ή υποκατεστημένο (Tan G-YA.et al., 2014). Το PHA μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ως PHA μικρού μήκους αλυσίδας, PHA μεσαίου μήκους αλυσίδας ή PHA μεγάλου μήκους αλυσίδας με βάση τη συνολική ποσότητα ατόμων άνθρακα σε ένα μονομερές PHA. Αυτή τη στιγμή υπάρχουν περίπου 150 διαφορετικά μονομερή των PHAs και ο αριθμός αυτός εξακολουθεί να αυξάνεται καθώς εισάγονται νέοι τύποι PHA με χημικά ή φυσικά τροποποιημένη φύση ή με τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (GMOs) οι οποίοι παράγουν PHA με συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες (Tan G-YA.et al., 2014). Τέλος, τα PHAs οργανώνονται σε σφαιρίδια, τα οποία εκτός από τις αλυσίδες του πολυμερούς, περιέχουν και διάφορες πρωτεΐνες στη επιφάνειά τους.



**Poly(3-hydroxyalkanoate)**

<i>R</i> group	Carbon no.	PHA polymer
methyl	C <sub>4</sub>	Poly(3-hydroxybutyrate)
ethyl	C <sub>5</sub>	Poly(3-hydroxyvalerate)
propyl	C <sub>6</sub>	Poly(3-hydroxyhexanoate)
butyl	C <sub>7</sub>	Poly(3-hydroxyheptanoate)
pentyl	C <sub>8</sub>	Poly(3-hydroxyoctanoate)
hexyl	C <sub>9</sub>	Poly(3-hydroxynonanoate)
heptyl	C <sub>10</sub>	Poly(3-hydroxydecanoate)
octyl	C <sub>11</sub>	Poly(3-hydroxyundecanoate)
nonyl	C <sub>12</sub>	Poly(3-hydroxydodecanoate)
decyl	C <sub>13</sub>	Poly(3-hydroxytridecanoate)
undecyl	C <sub>14</sub>	Poly(3-hydroxytetradecanoate)
dodecyl	C <sub>15</sub>	Poly(3-hydroxypentadecanoate)
tridecyl	C <sub>16</sub>	Poly(3-hydroxyhexadecanoate)

Εικόνα 1.4: Απεικόνιση των διάφορων τύπων που μπορεί να υιοθετήσει ένα βιοπολυμερές PHA. (Tan G-YA.et al., 2014)

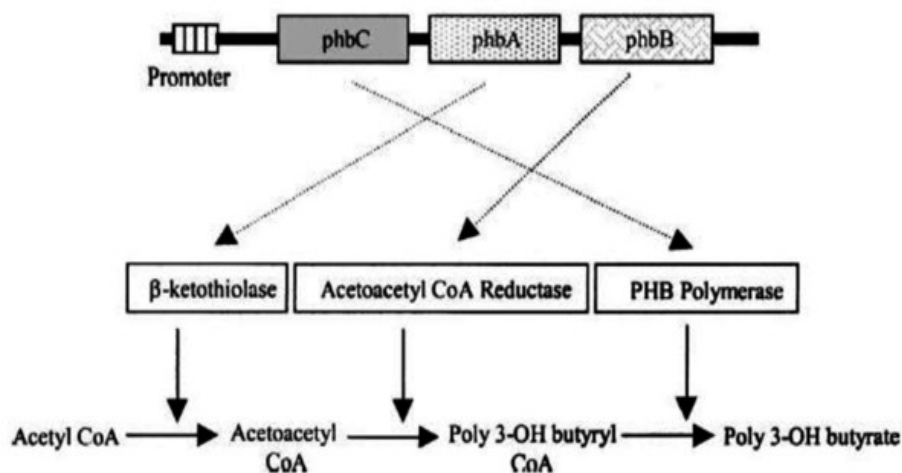
### 1.4.1 Ιδιότητες και εφαρμογές των πολυ-υδροξυαλκανοϊκών οξέων (PHAs)

Τα PHAs χαρακτηρίζονται από μια πληθώρα ιδιοτήτων, γεγονός το οποίο τα καθιστά όλο και πιο προσιτά και απαραίτητα για την καθημερινότητα των βιομηχανιών, την εξέλιξη της έρευνας και για μια γενικότερη χρήση από τον σύγχρονο κόσμο. Πιο συγκεκριμένα, τα PHAs χαρακτηρίζονται από βιοδιασπασιμότητα, βιοσυμβατότητα, μεγάλη χημική ποικιλία και παραγωγή από ανανεώσιμες πηγές άνθρακα. Δομικά έχει παρατηρηθεί, επίσης, ότι τα PHAs χαρακτηρίζονται και από διαφορετική ελαστικότητα, ανάλογα το μέγεθός τους και την έκταση των πλευρικών τους ομάδων. Αναλυτικότερα, PHAs με μικρές πλευρικές ομάδες είναι σκληρά κρυσταλλικά υλικά, ενώ τα PHAs με μεγαλύτερες πλευρικές ομάδες είναι ελαστικότερα. Αυτά τα χαρακτηριστικά οδήγησαν στην ανάπτυξη μιας ποικιλίας ποιοτήτων PHA που μπορούν να προσαρμοστούν για χρήση σε βιοδιασπώμενα υλικά συσκευασίας και φαρμακευτικά προϊόντα, μεταξύ άλλων εφαρμογών. Τα PHAs θεωρούνται επίσης ως φαρμακευτικά δραστική ουσία και επί του παρόντος ερευνάται ως πιθανό αντιβακτηριακό, αντικαρκινικό και αντι-HIV φάρμακο. Επιπλέον, τα PHAs έχουν αξιολογηθεί για μια ποικιλία ιατρικών εφαρμογών, οι οποίες περιλαμβάνουν την ελεγχόμενη απελευθέρωση, χειρουργικά ράμματα, επιθέματα πληγών, λιπαντικές σκόρες, ορθοπεδικές χρήσεις και ως υποκατάστατο του περικαρδίου (Tan G-YA.et al., 2014). Τέλος, τα υλικά αυτά βρίσκουν εφαρμογή και σε άλλους κλάδους όπως στην γεωργία και συγκεκριμένα σε λιπάσματα, στην τεχνολογία ως αισθητήρες πίεσης στα ηλεκτρολόγια και στα όργανα ήχου λόγω της πιεζοηλεκτρικής φύσης που έχουν, αλλά χρησιμοποιούνται αρκετά και στην τρισδιάστατη εκτύπωση (3D printing) (Γελαδάς Δ.Ε., 2023).



## 1.4.2 Έκφραση των PHAs από τους μικροοργανισμούς

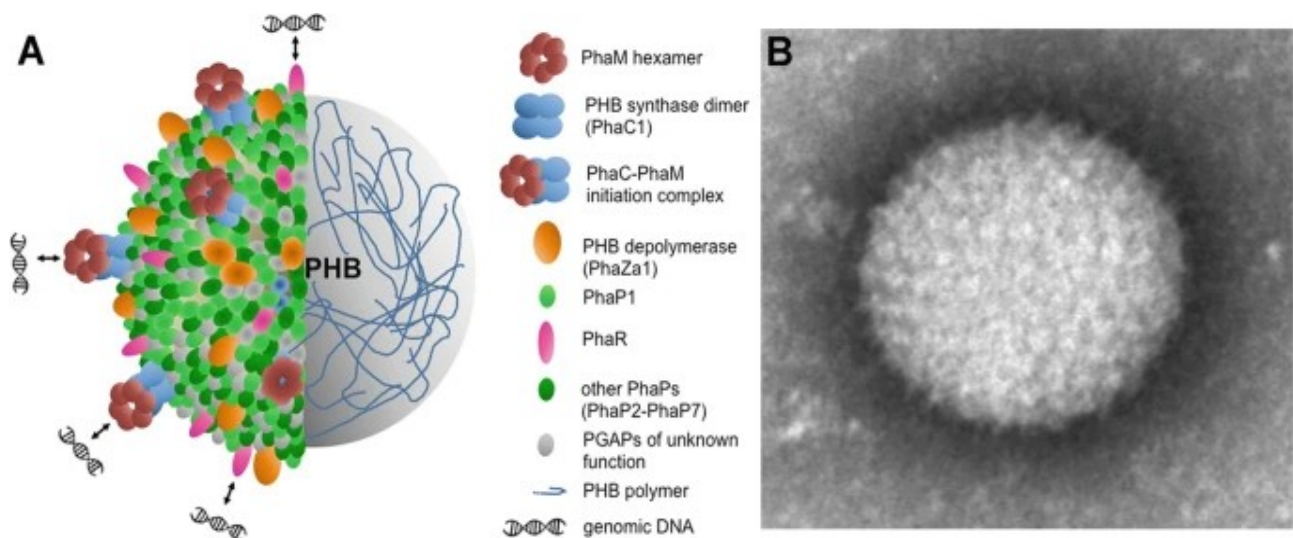
Τα PHAs παρουσιάζουν μια κοινή βιοσυνθετική πορεία για έναν μεγάλο αριθμό διαφορετικών βακτηρίων. Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την έκφραση των ενζύμων για την παραγωγή των PHAs, είναι οργανωμένα σε μια μορφή οπερονίου και ελέγχονται από τον ίδιο υποκινητή. Η σύνθεση των PHAs πραγματοποιείται με την βοήθεια τριών διαφορετικών ενζύμων τα οποία είναι η ακετυλοτρανσφεράση του ακέτυλο – CoA (ή β-κετοθειολάση) που κωδικοποιείται από το γονίδιο *phbA* του οπερονίου, η αναγωγάση του ακετοακέτυλο – CoA που κωδικοποιείται από το γονίδιο *phbB* και η συνθάση των PHAs που κωδικοποιείται από το γονίδιο *phbC* (Εικόνα 1.5). Αξιοσημείωτη παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι μετά από λεπτομερή πρωτεομική ανάλυση του γονιδιώματος του βακτηριακού στελέχους *Pseudomonas* sp. *phDV1*, βρέθηκε ότι τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των PHAs, εκφράζονται από γονίδια τα οποία οργανώνονται σε οπερόνιο με τον τρόπο που προαναφέρθηκε λίγο παραπάνω (Lyratzakis A. et. al., 2020).



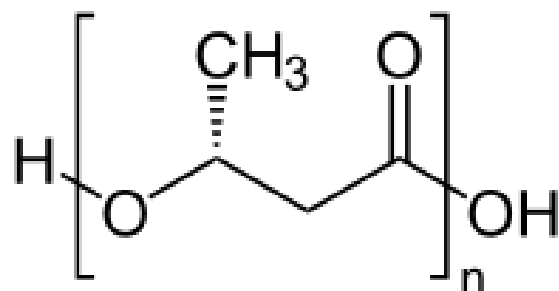
Εικόνα 1.5: Απεικόνιση του οπερονίου στο οποίο εδρεύονται τα γονίδια παραγωγής των σημαντικών ενζύμων για την σύνθεση των PHAs. (Saharan B.S. et. al., 2012)

### 1.4.3 Σύσταση σφαιριδίων (καρβοσώματα) πολυ-υδροξοαλκανοϊκών οξέων και τα PHB

Αναφορικά με την δομή των PHAs, έχει βρεθεί ότι οργανώνονται σε μικρά σφαιρίδια (καρβοσώματα) διαμέτρου περίπου 0,2 nm και μοριακού βάρους μεταξύ  $2 \times 10^5$  και  $3 \times 10^5$  Da (Anjum A., et. al., 2016). Με το ίδιο τρόπο οργανώνονται και τα μόρια του πολυ-υδροξοβουτυρικού οξέος (PHBs), τα οποία εμφανίζουν παρόμοιες ιδιότητες και εφαρμογές με τα PHAs, με την μόνη διαφορά να είναι ότι τα PHBs περιέχουν συγκεκριμένο αριθμό ανθράκων στο μόριό τους, δηλαδή τέσσερις άνθρακες ( $C_4$ ) (Εικόνα 1.7). Τα PHBs, επίσης, είναι σκληρά μόρια, χαρακτηρίζονται από μεγάλη υδροφοβικότητα και είναι αδιάλυτα στο νερό. Αναλύοντας τα καρβοσώματα που σχηματίζονται, μπορεί ειπωθεί ότι αποτελούν υπερμοριακά σύμπλοκα που αποτελούνται κυρίως από άτομα άνθρακα, ο οποίος περιβάλλεται από ένα στρώμα τουλάχιστον τριών διαφορετικών τύπων πρωτεϊνών στην επιφάνεια. Πιο συγκεκριμένα, οι τρεις διαφορετικοί τύποι πρωτεϊνών που συμβάλλουν και καθορίζουν τις ιδιότητες του επιφανειακού στρώματος είναι μια πολυμερική συνθάση που καταλύει τον πολυμερισμό του πολυμερικού πυρήνα από τα αντίστοιχα μονομερή, μια πολυμερική αποπολυμεράση που καταλύει τον αποπολυμερισμό του πολυμερούς σε μονομερή ή/και ολιγομερή και ένας ή περισσότεροι άλλοι τύποι πρωτεϊνών που συμβάλλουν στις ιδιότητες του επιφανειακού στρώματος των καρβοσωμάτων. Οι φασίνες (PhaPs) είναι αυτές, όπου στην περίπτωση των PHB ή PHA, επιτελούν αυτόν τον ρόλο (Jendrossek, D., 2020).



Εικόνα 1.6: Δεξιά παρουσιάζεται μια σχηματική απεικόνιση των καρβοσωμάτων, ενώ στα αριστερά φαίνεται το καρβόσωμα μετά από μεγέθυνση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Jendrossek, D., 2020).



Εικόνα 1.7: Απεικόνιση του συντακτικού τύπου του βιοπολυμερούς PHB.

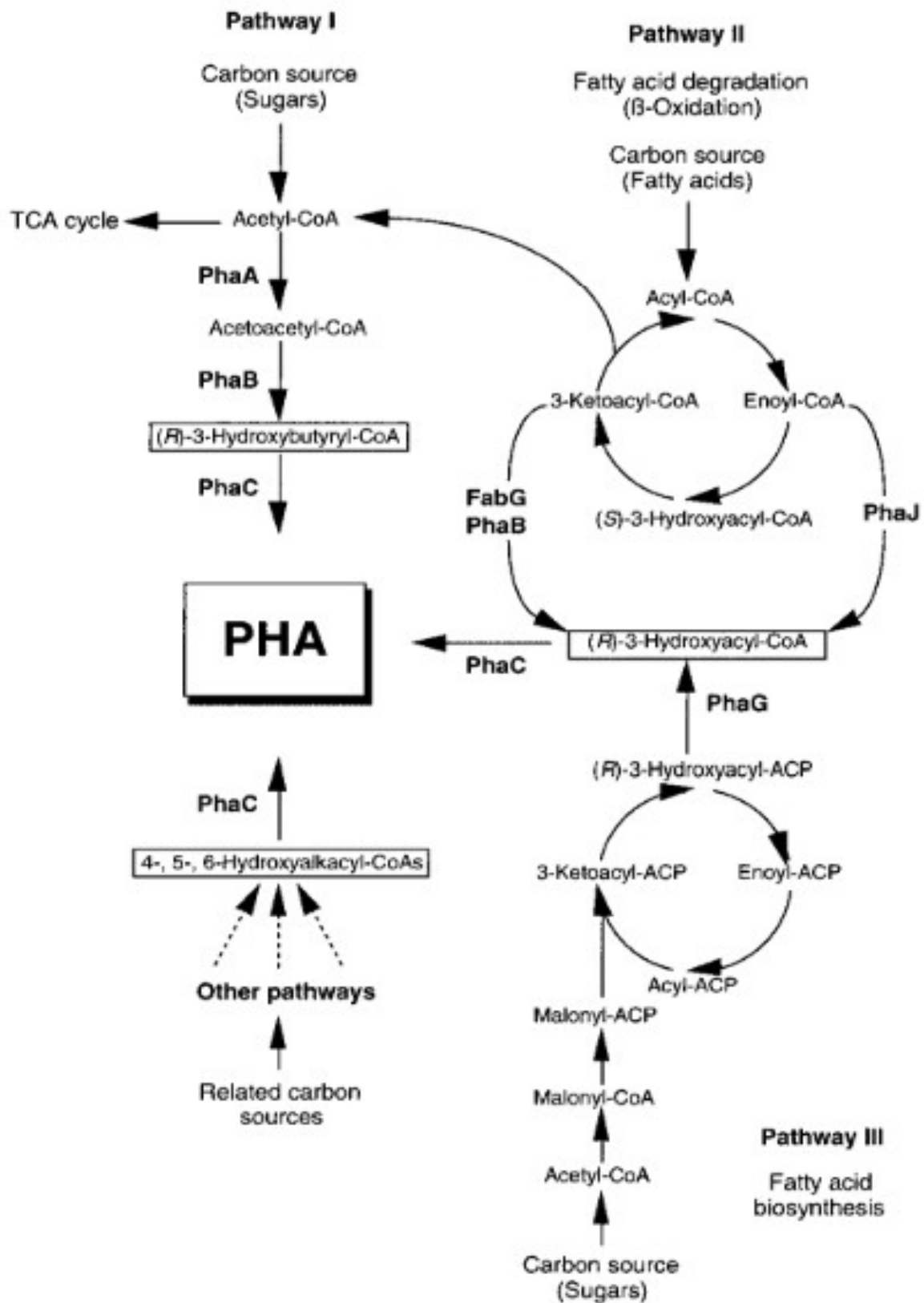
#### 1.4.4 Βιοσυνθετικά μονοπάτια των PHAs – PHBs

Η βιοσύνθεση των PHAs ποικίλει πολλές φορές ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες αναπτύσσεται το κάθε βακτηριακό στέλεχος. Κάτι τέτοιο σημαίνει ότι η παραγωγή των

PHAs μπορεί να ακολουθήσει διαφορετικό βιοσυνθετικό μονοπάτι όταν ένα βακτήριο βρίσκεται σε διαφορετική πηγή άνθρακα ή όταν πρόκειται για διαφορετικά είδη βακτηρίων. Παρόλ' αυτά έχουν βρεθεί ορισμένα βασικά βιοσυνθετικά μονοπάτια, τα οποία ακολουθούνται από τα περισσότερα βακτήρια. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχει το μονοπάτι I στο οποίο χρησιμοποιούνται μόρια που έχουν παραχθεί από την διάσπαση σακχάρων. Αναλυτικότερα, παρατηρείται, αρχικά, μια συνένωση δύο μορίων ακετύλο – CoA, τα οποία προέρχονται από τον κύκλο του Krebs. Έπειτα, μέσω της παραγωγής του βασικού ενδιάμεσου προϊόντος (R)-3-υδροξυαλκανο – CoA, προκύπτει το επιθυμητό προϊόν, το PHA. Να σημειωθεί ότι για την πραγματοποίηση του μονοπατιού I απαιτούνται μόρια NADPH έτσι ώστε να προσφερθεί η κατάλληλη ενέργεια για την διεξαγωγή της παραγωγής του PHA.

Όσον αφορά στο μονοπάτι II, χρησιμοποιούνται μόρια που έχουν παραχθεί μετά από οξείδωση των λιπαρών οξέων και αφού συμπυκνωθούν κατάλληλα και παράξουν και πάλι το βασικό ενδιάμεσο προϊόν (R)-3-υδροξυαλκανο – CoA, είναι ικανά να σχηματίσουν μόρια PHA.

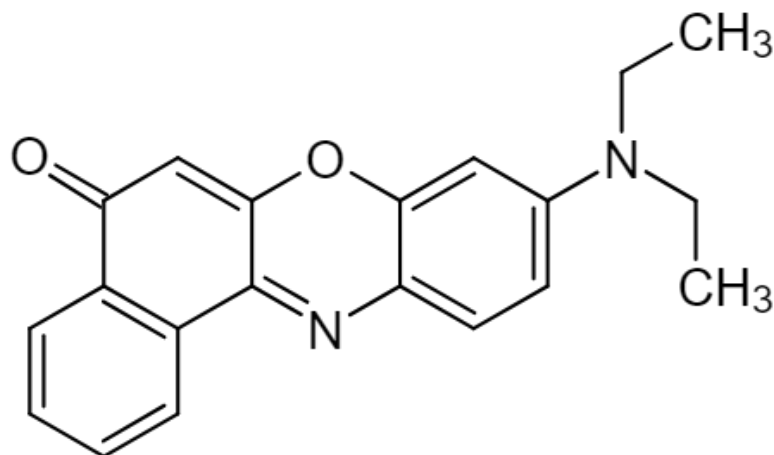
Στο βιοσυνθετικό μονοπάτι III, χρησιμοποιούνται απλά μόρια, όπως σάκχαρα, που έχουν προκύψει μέσα από την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων. Και σε αυτό το βιοσυνθετικό μονοπάτι χρησιμοποιείται το ακετύλο – CoA ως αρχικό μόριο, και μετά από διάφορες συμπυκνώσεις και τροποποιήσεις μορίων παράγεται το βασικό ενδιάμεσο προϊόν (R)-3-υδροξυαλκανο – CoA, το οποίο είναι ικανό να σχηματίσει τελικά μόρια PHA (Taguchi K. et al., 2001).



Εικόνα 1.8: Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων βιοσυνθετικών μονοπατιών με τελικό προϊόν τα PHAs (Taguchi K. et al., 2001).

## 1.5 Χρώση Nile Red

Η χρώση Nile Red αποτελεί μια χρωστική ουσία βενζοφαινοξαζόνης, ή αλλιώς γνωστή ως Nile blue A-οξαζόνη. Η Nile Red έχει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό εξαιτίας της υδρόφοβης και μη πολικής φύσης της, αλλά μπορεί να διαλυθεί σε ένα ευρύ φάσμα οργανικών διαλυτών, με τους συντελεστές κατανομής της σε οργανικούς διαλύτες να είναι περίπου 200 σε σύγκριση με το νερό. Όλοι οι οργανικοί διαλύτες παρουσιάζουν τις ισχυρές φωτεινές ιδιότητες της χρωστικής. Τα μέγιστα διέγερσης και εκπομπής του φθορισμού της Nile Red μπορούν να ποικίλλουν σε ένα εύρος 60 nm, με τα χρώματα του φθορισμού να κυμαίνονται από χρυσοκίτρινο έως βαθύ κόκκινο, ανάλογα με τη σχετική υδροφοβικότητα του διαλύτη. Οι σχετικές εντάσεις φθορισμού της χρωστικής είναι περίπου ίδιες σε όλους τους οργανικούς διαλύτες όταν μετρώνται στα αντίστοιχα μέγιστα φθορισμού τους. Από την άλλη πλευρά, το νερό εξαφανίζει τον φθορισμό της χρωστικής. Γενικότερα η μικροσκοπία φθορισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση ενδοκυτταρικών λιπιδικών σωμάτων με τη χρήση της Nile Red ως χρώση. Κατά την εξέταση του φθορισμού των κυττάρων που έχουν χρωματιστεί με την Nile Red σε μήκη κύματος μικρότερα από 570 nm, είναι δυνατόν να παρατηρηθεί μια προτιμησιακή αλληλεπίδραση μεταξύ της Nile Red και ιδιαίτερα υδρόφοβων περιβαλλόντων, όπως τα ουδέτερα λιπιδικά σώματα, ενώ ο φθορισμός της Nile Red που αλληλεπιδρά με κυτταρικές μεμβράνες είναι μειωμένος. Για τα λιπιδικά σωματίδια, η χρώση με Nile Red χάνει την επιλεκτικότητά της όταν παρατηρείται σε μήκη κύματος εκπομπής φθορισμού μεγαλύτερα από 590 nm. Δεδομένων αυτών των συνθηκών φάσματος, η Nile Red μπορεί να θεωρηθεί γενική χρώση λιπιδίων, επειδή αλληλεπιδρά και φθορίζει όταν υπάρχουν τριακυλογλυκερόλες, χοληστερόλη, φωσφολιπίδια και εστέρες χοληστερόλης (Greenspan P. et. al., 1985).



Εικόνα 1.9: Απεικόνιση του συντακτικού τύπου της χρωστικής Nile Red. Διακρίνεται ένας μεγάλος υδρογονοανθρακικός σκελετός στο μόριο, κάτι το οποίο προδίδει και την υδρόφοβη φύση της χρωστικής (Greenspan P. et. al., 1985).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους *Pseudomonas* sp. pHDV1 σε καλλιέργειες που περιείχαν ως πηγή άνθρακα φαινόλη σε συγκεντρώσεις από 400 mg/L έως 2000mg/L και σε άλλες πολυδροξυλικές ενώσεις, όπως γαλλικό οξύ, 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 2,3-διυδροξυβενζοϊκό οξύ, 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ, σε συγκεντρώσεις 200mg/L. Επίσης, αφού παρατηρήθηκε ανάπτυξη των βακτηρίων, πραγματοποιήθηκαν τεστ κινητικής με σκοπό την διαλεύκανση του μεταβολικού μονοπατιού που ακολουθείται από το βακτήριο για την διάσπαση της κάθε

πηγής άνθρακα. Έπειτα, χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο NMR  $^1\text{H}$  για να παρατηρηθεί αν το γαλλικό οξύ αποικοδομείται μόνο από τα βακτήρια ή αλληλεπιδρά και με τα υπόλοιπα συστατικά της καλλιέργειας ή και με το φως. Επιπλέον, η ποσοτικοποίηση του PHB που παράγεται από τα βακτήρια αποτέλεσε έναν από τους βασικούς σκοπούς της εργασίας, πράγμα το οποίο επιτεύχθηκε μέσω της τεχνικής HPLC. Τέλος, με σκοπό την παρατήρηση των κυττάρων και των σφαιριδίων PHB, χρησιμοποιήθηκε οπτικό μικροσκόπιο και μικροσκόπιο φθορισμού και ελήφθησαν οι κατάλληλες φωτογραφίες.

### 3. ΥΛΙΚΑ

#### 3.1 Διαλύματα για την καλλιέργεια κυττάρων

Θρεπτικό υλικό Lysogeny Broth(LB):

- Peptone 5 g/L
- NaCl 5 g/L
- Yeast Extract 2,5 g/L
- NaOH έως pH=7,4

(Όταν πρόκειται για στερεό LB προστίθεται και 1,5% w/v άγαρ)

Θειικά άλατα (R-Salts):

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10% w/v



- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1% w/v

Διάλυμα αλάτων 5x M9:

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  37,6 g/L
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  15 g/L
- $\text{NaCl}$  2,5 g/L
- $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 g/L

Πηγές άνθρακα για τις καλλιέργειες του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. pHDV1 (stocks):

Διάλυμα Φαινόλης : **47055 mg/L**

Διάλυμα γαλλικού οξέος : **5000 mg/L**

Διάλυμα 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος : **5000 mg/L**

Διάλυμα 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος : **5000 mg/L**

Διάλυμα 2,3-διυδροξυβενζοϊκού οξέος : **5000 mg/L**

Διάλυμα 3,4-διυδροξυβενζοϊκού οξέος : **5000 mg/L**

Προκαλλιέργεια :

- 25 – 35 mL LB
- Μονήρης αποικία από τρυβλίο Petri
- 0,38 ml Φαινόλη (για προκαλλιέργεια φαινόλης (600mg/L) σε 30ml LB)

### Κύρια Υγρή καλλιέργεια κυττάρων (100mL):

- Διάλυμα αλάτων 5x M9 20mL
- Θειικά άλατα (R-Salts) 700μL
- 1 M MgSO<sub>4</sub> 200 μL
- 1 M CaCl<sub>2</sub> 10 μL
- απιονισμένο H<sub>2</sub>O 72,8 mL
- Προκαλλιέργεια (τόση ώστε το OD<sub>600nm</sub> της κύριας καλλιέργειας να είναι 0,1 – 0,2 αρχικά)
- Πηγή άνθρακα (φαινόλη, γαλλικό οξύ, 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 2,3-διυδροξυβενζοϊκό οξύ, 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ)

## 3.2 Διαλύματα για οπτικό μικροσκόπιο και μικροσκόπιο φθορισμού

### Διάλυμα αγαρόζης:

- Αγαρόζη 1% w/v σε απιονισμένο H<sub>2</sub>O

### Χρώση Nile Red:

- Nile Red 250 μg/mL σε DMSO

## 3.3 Διαλύματα για το τεστ κινητικής

Διάλυμα **A**: 50 Mm KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH=7,5

Διάλυμα **B**: 50% ακετόνη – 50% τολουόλιο

Διάλυμα κατεχόλης 10 mM

## 4. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 4.1 Καλλιέργεια του στελέχους *Pseudomonas* sp. rhDV1

#### 4.1.1 Στερεή καλλιέργεια κυττάρων

Σε τρυβλίο Petri προστίθεται ποσότητα θρεπτικού υλικού LB με 1,5% άγαρ και αφήνεται να στερεοποιηθεί για λίγα λεπτά. Έπειτα, απλώνεται μικροποσότητα κυττάρων από μίγμα 1:1 με γλυκερόλη (-80°C), μέσω μεταλλικού βρόχου εμβολιασμού και ύστερα επωάζονται τα κύτταρα στο τρυβλίο για 24 ώρες στους 37°C.

#### 4.1.2 Κύρια υγρή καλλιέργεια του στελέχους

Για την δημιουργία της κύριας υγρής καλλιέργειας των κυττάρων του στελέχους *Pseudomonas* sp. rhDV1 εφαρμόστηκε το εξής πρωτόκολλο. Αρχικά, για την προκαλλιέργεια προστίθενται 25 – 35 mL θρεπτικού υλικού LB σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη, μαζί με μια μονήρη αποικία από τρυβλίο Petri και επωάζονται στους 32°C για 16 – 18 ώρες με συνεχή ανάδευση. Έπειτα, μετριέται η οπτική πυκνότητα της προκαλλιέργειας στα 600nm ( $OD_{600nm}$ ) σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης Perkin Elmer Lambda 20 και εν συνεχεία προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα προκαλλιέργειας (έπειτα από αραιώση 1:50, ώστε το  $OD_{600nm}$  της κύριας καλλιέργειας να είναι 0,1 – 0,2 αρχικά) στην κύρια υγρή

καλλιέργεια των κυττάρων. Στην κύρια υγρή καλλιέργεια προστίθενται επίσης, απιονισμένο H<sub>2</sub>O, όλα τα απαραίτητα άλατα M9, R-Salts, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, αλλά και η πηγή άνθρακα (φαινόλη, γαλλικό οξύ, 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 2,3-διυδροξυβενζοϊκό οξύ, 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ) και επωάζεται για 72 ώρες σε ίδιες συνθήκες με αυτές της προκαλλιέργειας.

## 4.2 Καμπύλες ανάπτυξης

Για την δημιουργία καμπυλών ανάπτυξης 72 ωρών του βακτηριακού στελέχους *Pseudomonas* sp. rhDV1, γινόταν καθημερινή λήψη δειγμάτων σε δοχεία erpendorf ανά 1 - 2 ώρες, τις πρωινές και μεσημεριανές ώρες της ημέρας, και μέτρηση του OD<sub>600nm</sub>.

## 4.3 Φασματοσκοπική μέτρηση συγκέντρωσης φαινόλης

Αρχικά, λαμβάνεται 1 mL κάθε φορά από την κύρια υγρή καλλιέργεια σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του βακτηρίου και στην συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 8000g για 3-4 λεπτά. Έπειτα, λαμβάνονται 100 μL από το υπερκείμενο υγρό και εισάγονται σε ειδικό UV plate. Η μέτρηση για την φαινόλη έγινε στα 277 nm σε φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer Lambda 20.

## 4.4 Συλλογή κυττάρων

Αρχικά, έγιναν καλλιέργειες 400mL τελικού όγκου με πηγές άνθρακα φαινόλη 600mg/L, γαλλικό οξύ 200mg/L και ηλεκτρικό οξύ 0,5M. Συλλέχθηκαν τα κύτταρα στις 72 ώρες καλλιέργειας στις οποίες παρατηρήθηκε και το μεγαλύτερο OD<sub>600nm</sub> (φαινόλη ~0,9, γαλλικό οξύ ~1,3, ηλεκτρικό οξύ ~1,2). Για την συλλογή των κυττάρων μεταφέρθηκαν οι καλλιέργειες σε ειδικά tubes φυγοκέντρησης, και αφού ισοσταθμίστηκαν οι όγκοι των

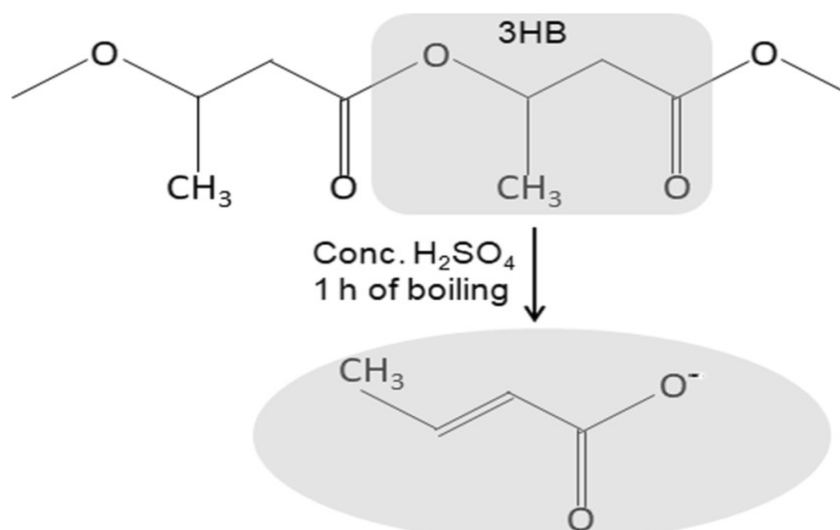
tubes, έγινε φυγοκέντρηση σε 6000g για 10 λεπτά στους 20°C. Έπειτα, απορρίφθηκε το υπερκείμενο εκτός από ~15mL έτσι ώστε να γίνει επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων. Αφού επαναδιαλυτοποιήθηκαν τα κύτταρα με την βοήθεια πινέλου, αποθηκεύτηκαν σε δοχεία falcon στους -20°C.

#### 4.5 Παρατήρηση των κυττάρων σε οπτικό μικροσκόπιο και μικροσκόπιο φθορισμού με την χρώση Nile Red

Για την παρατήρηση των κυττάρων και των PHBs σε μικροσκόπιο ακολουθείται η εξής διαδικασία. Αρχικά, λαμβάνεται δείγμα από τις καλλιέργειες σε erpendorf και φυγοκεντρείται για 1-2 λεπτά σε 13.000g, έτσι ώστε να καθιζάνουν τα κύτταρα και έπειτα απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό. Από τα κύτταρα λαμβάνονται 3  $\mu$ L και αναμειγνύονται με 1  $\mu$ L από την χρωστική Nile Red (250  $\mu$ g/mL σε DMSO) (Drakonaki A. et. al., 2023) και όλος αυτός ο όγκος τοποθετείται με πιπέτα σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Ύστερα, προετοιμάζεται διάλυμα αγαρόζης 1% w/v και θερμαίνεται έως ότου να αρχίζει να βράζει. Έπειτα, τοποθετούνται 100  $\mu$ L ζεστής αγαρόζης στην αντικειμενοφόρο πλάκα πάνω από το δείγμα και αφήνεται για 4-5 λεπτά να στερεοποιηθεί. Αργότερα, γίνεται η παρατήρηση του δείγματος στο οπτικό μικροσκόπιο και στο μικροσκόπιο φθορισμού (Nikon Eclipse E800, Jenoptik ProgRes CF CCD 1.4 M.P. Microscope Camera, Nikon Super High Pressure Mercury Lmp Power Sypply) στην περιοχή του πράσινου (Διέγερση: 562/40 nm, Εκμομπή: 594 nm). Τέλος, με την βοήθεια του προγράμματος ImageJ έγινε η επεξεργασία των φωτογραφιών που ελήφθησαν από το μικροσκόπιο.

#### 4.6 Ποσοτικοποίηση του PHB με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πολυ-υδροξυβουτυρικών σφαιριδίων (PHB), λαμβάνονται 30 mL από την κύρια υγρή καλλιέργεια κυττάρων στις 72 ώρες, όπου παρατηρείται και το μεγαλύτερο  $OD_{600nm}$  και γίνεται φυγοκέντρηση σε 15.317 g για 10 λεπτά στους 4°C. Αφού γίνει η συλλογή του δείγματος, πραγματοποιούνται δύο εκπλύσεις με διάλυμα ακετόνης:αιθανόλης 1:1. Έπειτα, το ίζημα που έχει πέσει, διαλύεται σε 1 mL πυκνού θειικού οξέος και αφήνεται για 30 λεπτά στους 105°C, έτσι ώστε να γίνει η πέψη του PHB και να παραχθεί κροτονικό όξυ (του οποίου μετριέται η απορρόφηση στα 215nm από την HPLC). Μετά την πέψη του PHB, αραιώνονται τα δείγματα με MilliQ H<sub>2</sub>O σε πενταπλάσιο όγκο, και αφού φιλτραριστούν με φίλτρα PTFE 0,22 μm, εισάγονται στο σύστημα Agilent 1260 Infinity II LC και στην στήλη αντίστροφης φάσης InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (4 μm μέγεθος πόρων, 4,6\*150 mm). Τα δείγματα εκλούνται με ταχύτητα 0,5 mL/min διαλύματος φωσφορικού οξέος 85% και ακετονιτριλίου 15% (v/v), στους 30°C. Τέλος, η ανίχνευση του κροτονικού οξέος γίνεται με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων στα 215 nm και προσδιορίζεται ποσοτικά με την χρήση πρότυπης καμπύλης (Γελαδάς Δ.Ε., 2023).



Εικόνα 4.1: Σχηματική απεικόνιση με συντακτικούς τύπους των μορίων της αντίδρασης που πραγματοποιείται κατά την προετοιμασία των δειγμάτων πριν εισαχθούν στην HPLC. Συγκεκριμένα, φαίνεται η μετατροπή του PHB σε κροτονικό οξύ μέσω της δράσης πυκνού H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και υψηλής θερμοκρασίας (105 °C) (Jayprakash Y, et. al., 2022).

## 4.7 Μελέτη διάσπασης του γαλλικού οξέος με NMR $^1\text{H}$

Αρχικά, φτιάχνεται το διάλυμα γαλλικού οξέος 200 mg/L και από αυτό λαμβάνονται 500  $\mu\text{L}$  και αναμειγνύονται με 100  $\mu\text{L}$   $\text{D}_2\text{O}$  με εσωτερικό πρότυπο TMS 5% w/w (το οποίο εμφανίζει κορυφή στα 0 ppm) σε ειδικό tube NMR. Ύστερα, το δείγμα εισάγεται σε φασματόμετρο Bruker DPX-500 σε θερμοκρασία 298K με την χρήση πρότυπων προγραμμάτων παλμών από βιβλιοθήκες της Bruker. Έπειτα, λαμβάνεται φάσμα με αριθμό scan, 128 scans και η διαδικασία αυτή ακολουθείται για 5 μέρες έτσι ώστε να παρατηρηθεί αν αποικοδομείται το γαλλικό οξύ χωρίς τα κύτταρα (το διάλυμα του γαλλικού οξέος παραμένει σε σκοτεινό μέρος στους 37°C κατά την διάρκεια των 5 ημερών). Το  $\text{D}_2\text{O}$  προστίθεται για την βαθμονόμηση του NMR και για την δημιουργία ομογενούς μαγνητικού πεδίου. Τέλος, η επεξεργασία των φασμάτων που ελήφθησαν από το φασματόμετρο, γίνεται με το πρόγραμμα ChenomX Profiler, αφού προηγήθηκε phase correction, baseline correction και calibration standard της χημικής μετατόπισης στο TOPSPIN Bruker version 14.0.

## 4.8 Προσδιορισμός αποικοδόμησης του γαλλικού οξέος με NMR $^1\text{H}$

Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή που ακολουθείται και στην προηγούμενη πειραματική διαδικασία με NMR  $^1\text{H}$ , με την μόνη διαφορά ότι το διάλυμα γαλλικού οξέος εκτίθεται σε έντονο φως μέχρι το τέλος των μετρήσεων (γίνονται μετρήσεις για 2 ημέρες).

## 4.9 Επίδραση του pH στο χρώμα των καλλιεργειών με πηγή άνθρακα γαλλικό οξύ

Δημιουργήθηκαν διαλύματα που περιείχαν όλα τα συστατικά μιας κύριας υγρής καλλιέργειας, χωρίς όμως κύτταρα, δηλαδή περιείχαν διάλυμα αλάτων 5x M9, θειικά άλατα (R-Salts),  $MgSO_4$ ,  $CaCl_2$ , απιονισμένο νερό και ποσότητα γαλλικού οξέος. Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν διαλύματα με συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος 50, 100, 150, 200 mg/L και παρατηρήθηκε πως μεταβάλλεται το pH και το χρώμα των διαλυμάτων. Τέλος, παρασκευάστηκε και ένα διάλυμα control το οποίο περιείχε όλα τα παραπάνω συστατικά, χωρίς όμως ποσότητα γαλλικού οξέος, και μετρήθηκε το pH του.

#### 4.10 Τεστ κινητικής

Αρχικά, λαμβάνεται δείγμα από την καλλιέργεια και από αυτό λαμβάνονται 200  $\mu$ L και αραιώνονται με 1,8 mL από το ρυθμιστικό διάλυμα A (50 mM  $KH_2PO_4 - K_2HPO_4$ , pH=7,5). Αφού, γίνει φυγοκέντρηση σε 7000g για 10 λεπτά, απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος A. Έπειτα, προστίθεται και 0,1 mL διαλύματος B (50% ακετόνη – 50% τολουόλιο) και αφήνεται για ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Το διάλυμα αυτό αποτελεί το κυτταρικό εκχύλισμα και διατηρείται σε πάγο μέχρι το τέλος των μετρήσεων. Η προσθήκη του τολουολίου γίνεται διότι έχει την ιδιότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις να αποδιοργανώνει τις μεμβράνες των κυττάρων και να εκχυλίζει τα συστατικά του κυτταροπλάσματος στο διάλυμα. Επίσης, η ακετόνη χρησιμοποιείται, διότι έχει την ικανότητα να διατηρεί την ενεργότητα του ενζύμου 2,3-διοξυγενάση της κατεχόλης, αφού είναι ασθενής συναγωνιστικός αναστολέας ως προς τη κατεχόλη και γι' αυτόν τον λόγο αποτελεί τον κατάλληλο σταθεροποιητή για ένζυμο που την δεσμεύουν. Για την πραγματοποίηση των μετρήσεων χρησιμοποιείται ένα ειδικό UV plate για μετρήσεις στο υπεριώδες φως, στο οποίο εισάγονται, αρχικά, 100  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος A και 1  $\mu$ L κυτταρικού εκχυλίσματος (αυτό αποτελεί το control) σε ένα από τα πηγαδάκια του plate. Έπειτα, λαμβάνεται φάσμα απορροφήσεων σε εύρος μηκών κύματος 240 – 450 nm, το οποίο θα είναι το φάσμα του control (Βαλαμίδης Ι, 2019). Έπειτα προστίθενται στο ίδιο πηγαδάκι 20  $\mu$ L από το διάλυμα κατεχόλης 10 mM και λαμβάνονται φάσματα κάθε 2 λεπτά. Κατά την διάρκεια της διαδικασίας των μετρήσεων, το

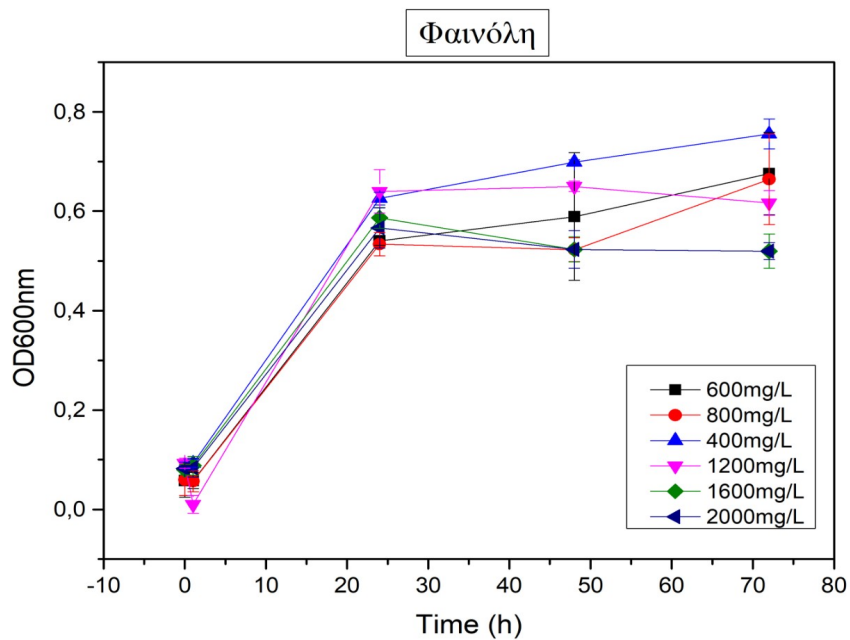


plate ανακινείται συνεχώς. Τέλος, όλα τα φάσματα λήφθηκαν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης Perkin Elmer Lambda 20.

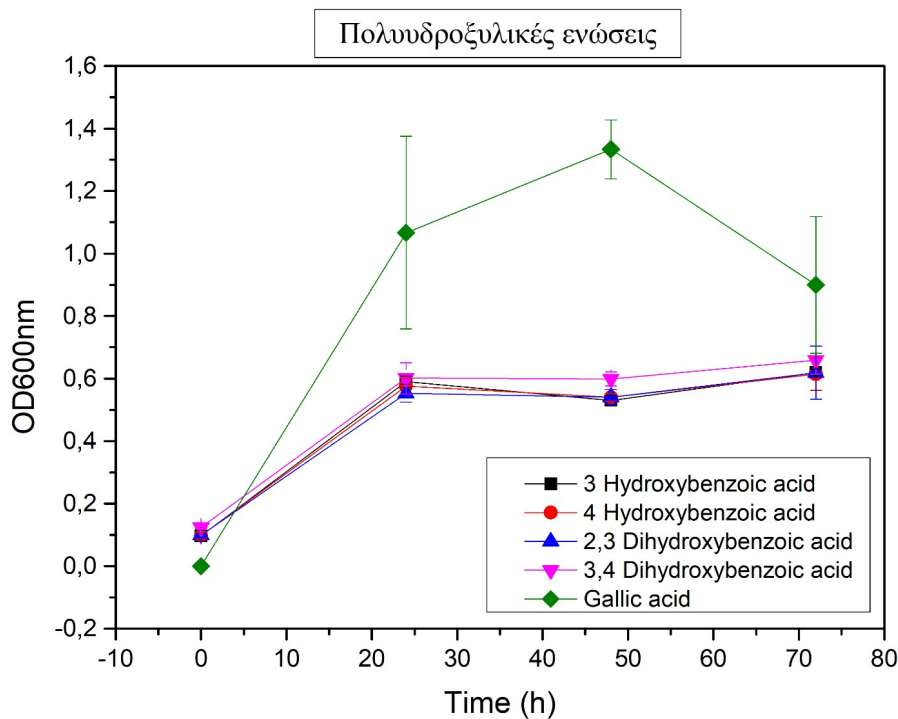
## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 5.1 Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου κάτω από διαφορετικές πηγές άνθρακα

Ένας από τους στόχους της εργασίας ήταν η ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους *Pseudomonas* sp. pHDV1 σε διαφορετικές πηγές άνθρακα. Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν καλλιέργειες με φαινόλη σε υψηλές συγκεντρώσεις (400, 600, 800, 1200, 1600, 2000 mg/L) και με άλλες πολυδροξυλικές αρωματικές ενώσεις συγκέντρωσης 200 mg/L η κάθε μία. Οι πολυδροξυλικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή άνθρακα στις καλλιέργειες του βακτηρίου ήταν το γαλλικό οξύ, το 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το 2,3-διυδροξυβενζοϊκό οξύ και το 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ σε συγκεντρώσεις 200 mg/L. Αξίζει να σημειωθεί το γεγονός ότι, τα βακτήρια στις καλλιέργειες με φαινόλη, δυσκολευόντουσαν αρκετά να αναπτυχθούν με αποτέλεσμα στις 72 ώρες καλλιέργειας, να μην παρατηρείται κάποια σημαντική αύξηση του OD<sub>600nm</sub>. Κάτι τέτοιο μπορεί να ερμηνευθεί με την υπόθεση ότι η φαινόλη αποτελεί έναν πολύ τοξικό ρύπο για τα βακτήρια και έτσι δεν τους επιτρέπει να αναπτυχθούν. Για τον λόγο αυτό, αρχικά, αναπτύχθηκαν τα βακτήρια σε προκαλλιέργεια, η οποία περιείχε, εκτός από LB, και 600 mg/L φαινόλη. Με τον τρόπο αυτό, τα βακτήρια είχαν προσαρμοστεί στις πολύ στρεσογόνες συνθήκες της φαινόλης και έτσι ήταν πιο εύκολη η ανάπτυξή τους στις κύριες υγρές καλλιέργειες με πηγή άνθρακα φαινόλη.



Εικόνα 5.1: Διαγραμματική απεικόνιση της ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους *Pseudomonas sp. rhDV1* όταν βρίσκεται σε πηγή άνθρακα φαινόλη συγκεντρώσεων από 400 έως 2000 mg/L

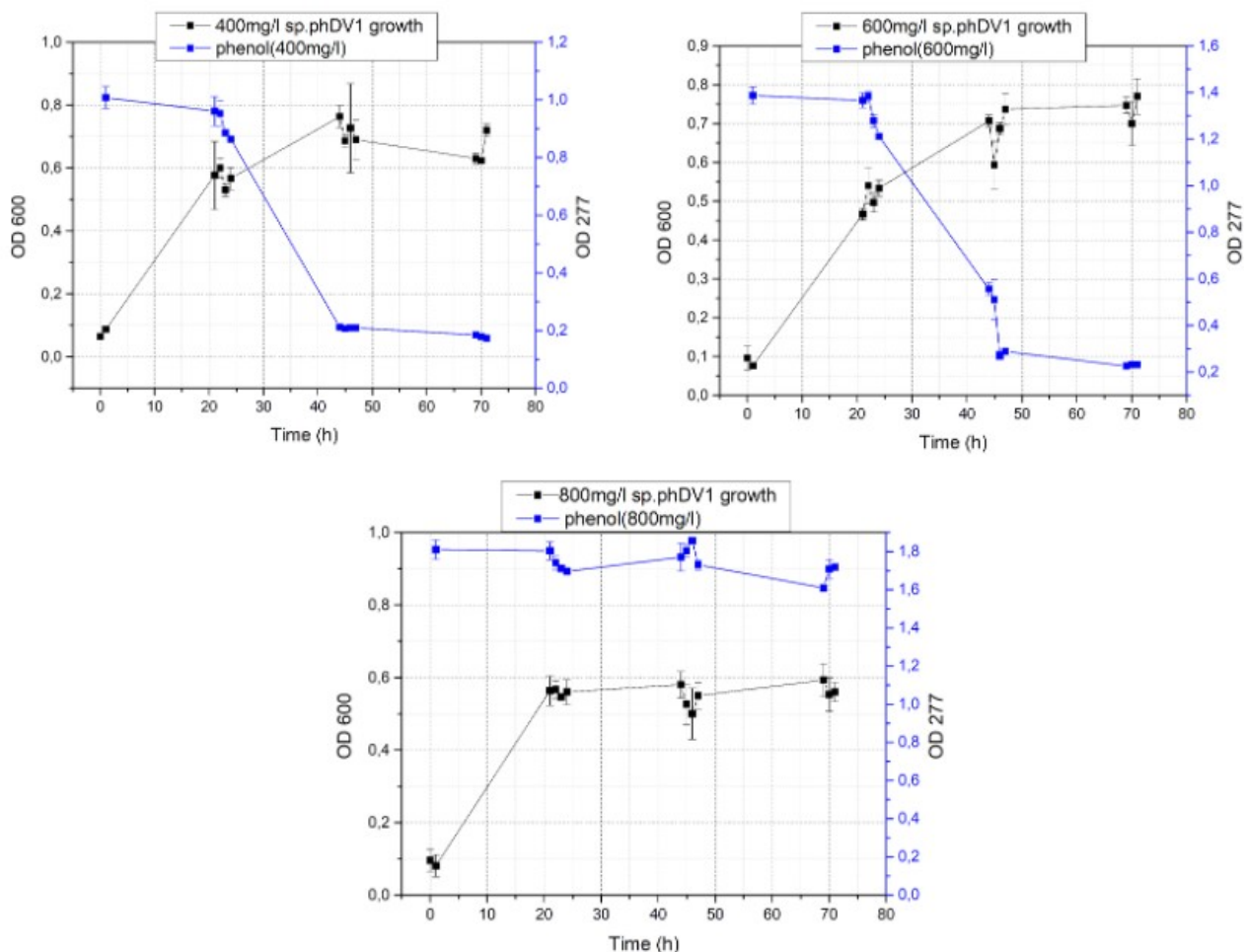


Εικόνα 5.2: Διαγραμματική απεικόνιση της ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους *Pseudomonas sp. rhDV1* όταν βρίσκεται σε πηγές άνθρακα γαλλικό οξύ, 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 2,3-διυδροξυβενζοϊκό οξύ και 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ συγκέντρωσης 200 mg/L

Λαμβάνοντας υπόψιν τις καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. pHDV1, παρατηρείται ότι και στις καμπύλες με πηγή άνθρακα φαινόλη και στις καμπύλες με πηγή άνθρακα κάποια πολυδροξυλική αρωματική ένωση, το βακτήριο βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης μέχρι και τις 24 ώρες καλλιέργειας. Έπειτα, σχεδόν σε όλες τις πηγές άνθρακα, εκτός από το γαλλικό οξύ (Εικόνα 5.2: πράσινη καμπύλη) και τις φαινόλες με συγκεντρώσεις 1200, 1600, 2000 mg/L (Εικόνα 5.1: ροζ, πράσινη, σκούρα μπλε καμπύλη), το βακτήριο περνάει στην στατική φάση ανάπτυξης έως και τις 72 ώρες καλλιέργειας. Αντίθετα, στην περίπτωση του γαλλικού οξέος και στις φαινόλες με τις υψηλές συγκεντρώσεις, το βακτήριο φαίνεται να περνάει στην φάση θανάτου από τις 48 ώρες έως και τις 72 ώρες καλλιέργειας. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην μεγάλη τοξικότητα των ρύπων, διότι συγκεντρώσεις όπως 1200, 1600 και 2000 mg/L φαινόλης είναι αρκετά υψηλές και ταυτόχρονα σημαντικά τοξικές για το βακτήριο. Όσον αφορά το OD<sub>600nm</sub>, σε όλες τις πηγές άνθρακα σημειώνεται OD<sub>600nm</sub> ~ 0,6-0,8, εκτός από την καλλιέργεια με γαλλικό οξύ, όπου σημειώνεται πολύ μεγαλύτερη ανάπτυξη με OD<sub>600nm</sub> ~ 1,3. Αυτό δείχνει ότι το βακτήριο αρέσκεται πολύ στην πηγή άνθρακα του γαλλικού οξέος και αναπτύσσεται σε μεγάλο βαθμό, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες πολυδροξυλικές ενώσεις και την φαινόλη. Επίσης, βλέποντας το Διάγραμμα 1 με την πηγή άνθρακα να είναι η φαινόλη, παρατηρείται ότι σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φαινόλης, το βακτήριο αναπτύσσεται λιγότερο. Για παράδειγμα συγκρίνοντας τις δύο ακραίες συνθήκες φαινόλης, 400mg/L και 2000mg/L, παρατηρείται ότι στα 400 mg/L σημειώνεται μεγαλύτερη ανάπτυξη σε σχέση με τα 2000 mg/L φαινόλης. Το γεγονός αυτό οφείλεται και πάλι στην τοξικότητα του ρύπου, όπου όσο πιο τοξικός είναι ο ρύπος, τόσο πιο αργή είναι και η ανάπτυξη του βακτηρίου.

## 5.2 Φασματοσκοπική μέτρηση συγκέντρωσης φαινόλης για συγκεντρώσεις 400, 600, 800 mg/L

Μέσω του πειράματος αυτού, έγινε μια μελέτη για την πορεία του ρύπου αφότου εισαχθεί στην καλλιέργεια των βακτηρίων.

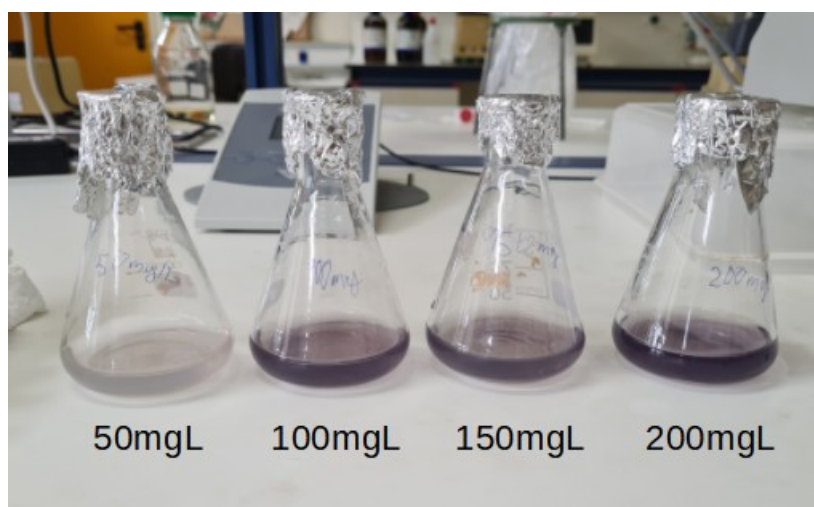


Εικόνα 5.3: Διαγράμματα αποικοδόμησης της φαινόλης από το βακτήριο *Pseudomonas sp. phDV1* κατά την διάρκεια 72 ωρών. Αριστερά πάνω παρουσιάζεται η καλλιέργεια με 400 mg/L φαινόλης. Δεξιά πάνω παρουσιάζεται η συνθήκη με 600 mg/L και κάτω παρουσιάζεται η συνθήκη με 800 mg/L φαινόλης

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η φαινόλη, η οποία αποτελεί και την πηγή άνθρακα για τα βακτήρια, αρχίζει να καταναλώνεται από τις 24 ώρες και μετά, αποτέλεσμα το οποίο φαίνεται λογικό αφού και το βακτήριο αναπτύσσεται μετά τις 24 ώρες. Η συμπεριφορά αυτή υιοθετείται από τα βακτήρια για συγκεντρώσεις φαινόλης 400 και 600 mg/L, αλλά στην υψηλότερη συγκέντρωση των 800 mg/L τα βακτήρια φαίνεται να αναπτύσσονται χωρίς όμως να καταναλώνεται η ποσότητα της φαινόλης μέσα στην καλλιέργεια. Κάτι τέτοιο μπορεί να συμβαίνει διότι τα βακτήρια μπορεί να έχουν εισάγει την φαινόλη στο εσωτερικό τους αλλά πιθανόν να μην την έχουν μετατρέψει σε PHB, πράγμα το οποίο, όμως, δεν αποδεικνύεται βιβλιογραφικά. Έτσι, λοιπόν, φαίνεται ότι δεν έχει καταναλωθεί η ποσότητα της φαινόλης στην καλλιέργεια.

### 5.3 Επίδραση του pH στο χρώμα των καλλιεργειών με πηγή άνθρακα γαλλικό οξύ

Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε με σκοπό την διαλεύκανση της προέλευσης του χρώματος του των καλλιεργειών που περιείχαν γαλλικό οξύ ως πηγή άνθρακα.



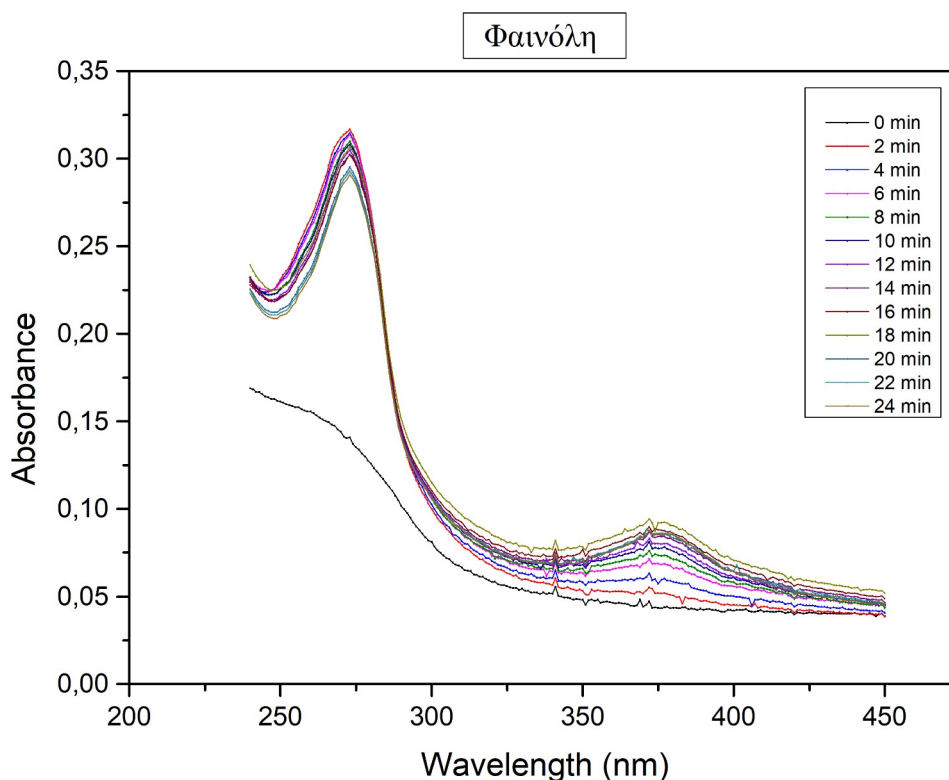
*Εικόνα 5.4: Φωτογραφία από τα τέσσερα διαλύματα με διαφορετική συγκέντρωση γαλλικού οξέος για το πείραμα της επίδρασης του pH στο χρώμα των καλλιεργειών με γαλλικό οξύ ως πηγή άνθρακα. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων ακολουθούν την σειρά, 50, 100, 150, 200 mg/L από αριστερά προς τα δεξιά*

Αφού μετρήθηκε το pH και στα τέσσερα αυτά διαλύματα, διαπιστώθηκε ότι το pH δεν άλλαζε δραματικά. Πιο συγκεκριμένα, η τιμή του pH παρέμενε σε όλα τα διαλύματα ~ 6,89, κάτι το οποίο αποδεικνύει ότι το pH δεν αποτελεί παράγοντα χρωματισμού των καλλιεργειών με πηγή άνθρακα το γαλλικό οξύ.

Επιπλέον, βρέθηκε βιβλιογραφικά ότι το χρώμα των καλλιεργειών, πιθανότατα οφείλεται στην συμπλοκοποίηση των μορίων του γαλλικού οξέος με μέταλλα δισθενούς σιδήρου ( $\text{Fe}^{2+}$ ) και δισθενούς μαγνησίου ( $\text{Mg}^{2+}$ ) τα οποία περιέχονται στο θρεπτικό υλικό των καλλιεργειών και συγκεκριμένα στα θειικά άλατα (R-Salts) (Frešer F. et. al., 2021).

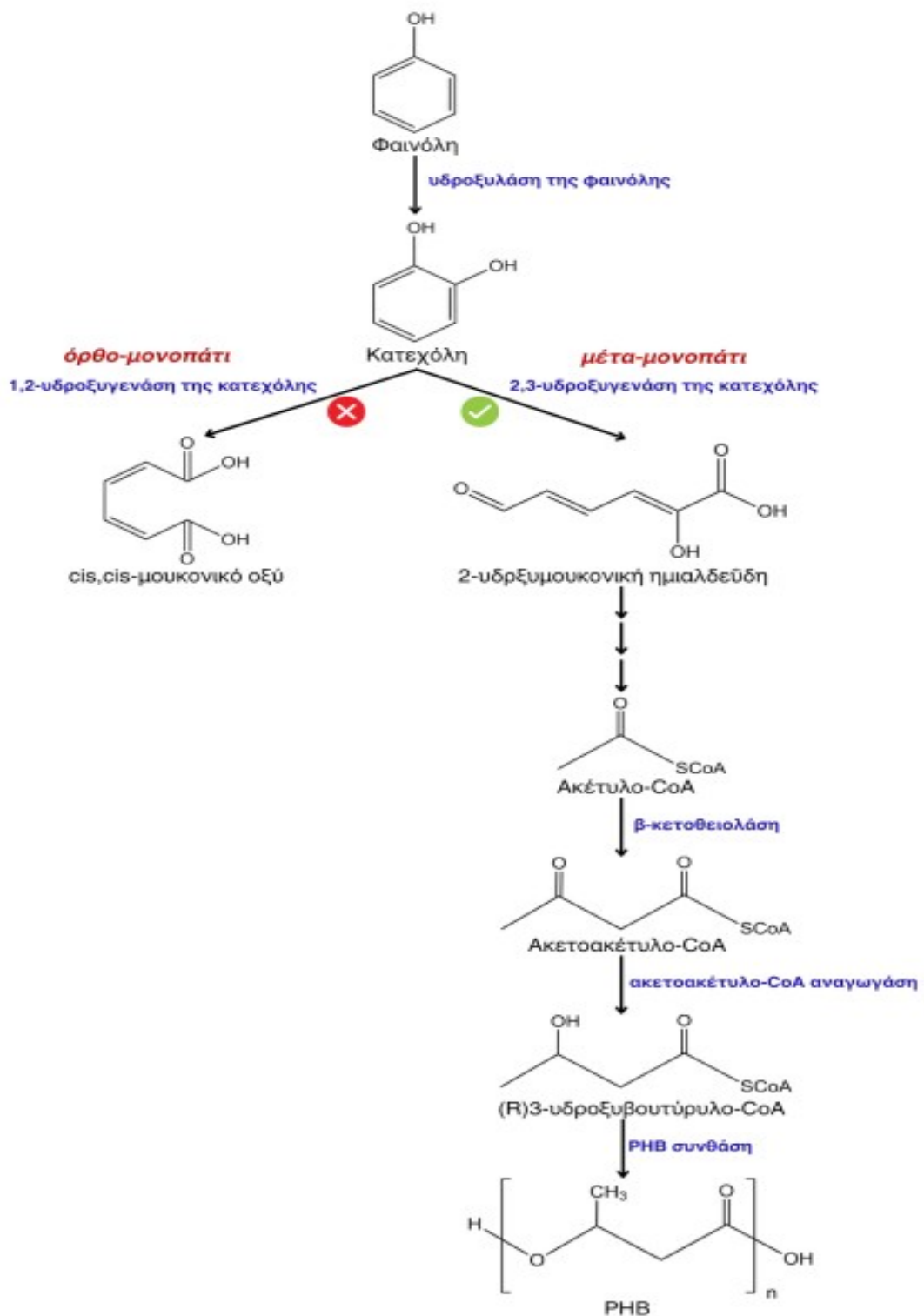
## 5.4 Τεστ κινητικής με στόχο την διαλεύκανση του καταβολισμού των ρύπων κάθε καλλιέργειας

Με σκοπό την διαλεύκανση του μεταβολισμού των πολυδροξυλικών αρωματικών ενώσεων και της φαινόλης από το βακτήριο *Pseudomonas* sp. rhDV1, διεξήχθησαν τεστ κινητικής. Με αυτή την διαδικασία μπόρεσαν να εξαχθούν ορισμένα συμπεράσματα αναφορικά με την ενεργότητα του ενζύμου της υδροξυγενάσης της κατεχόλης, το οποίο διασπά την κατεχόλη (η οποία αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν της διάσπασης της φαινόλης), σε 2-υδροξυμουκονική ημιαλδεύδη (meta-μεταβολικό μονοπάτι) ή σε cis-μουκονικό οξύ (ortho-μεταβολικό μονοπάτι). Αφού πραγματοποιήθηκε το τεστ κινητικής για τις καλλιέργειες με πηγή άνθρακα φαινόλη, προέκυψε το εξής διάγραμμα.



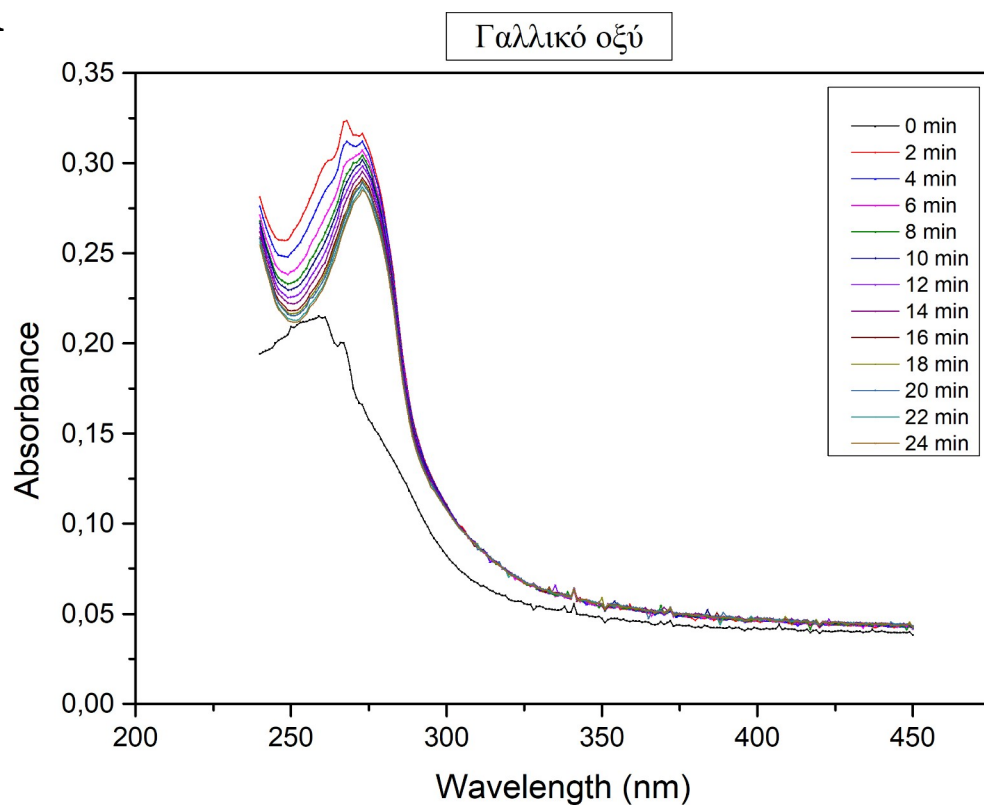
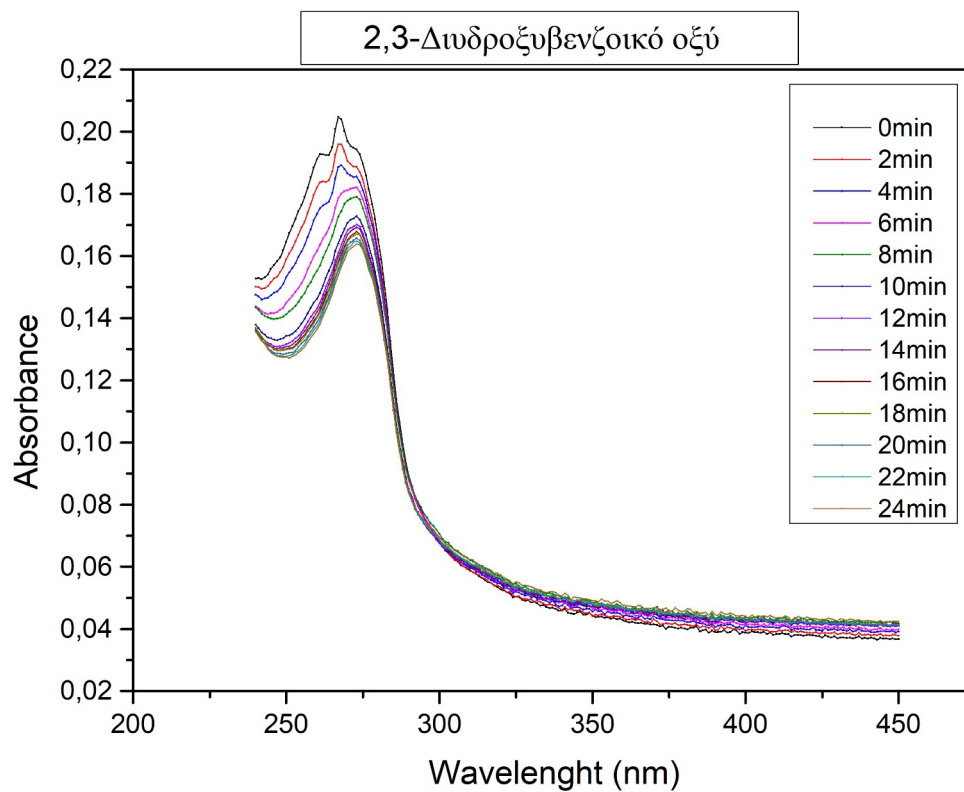
Εικόνα 5.5: Διαγραμματική απεικόνιση του τεστ κινητικής που πραγματοποιήθηκε για 24 λεπτά στις καλλιέργειες με πηγή άνθρακα φαινόλη.

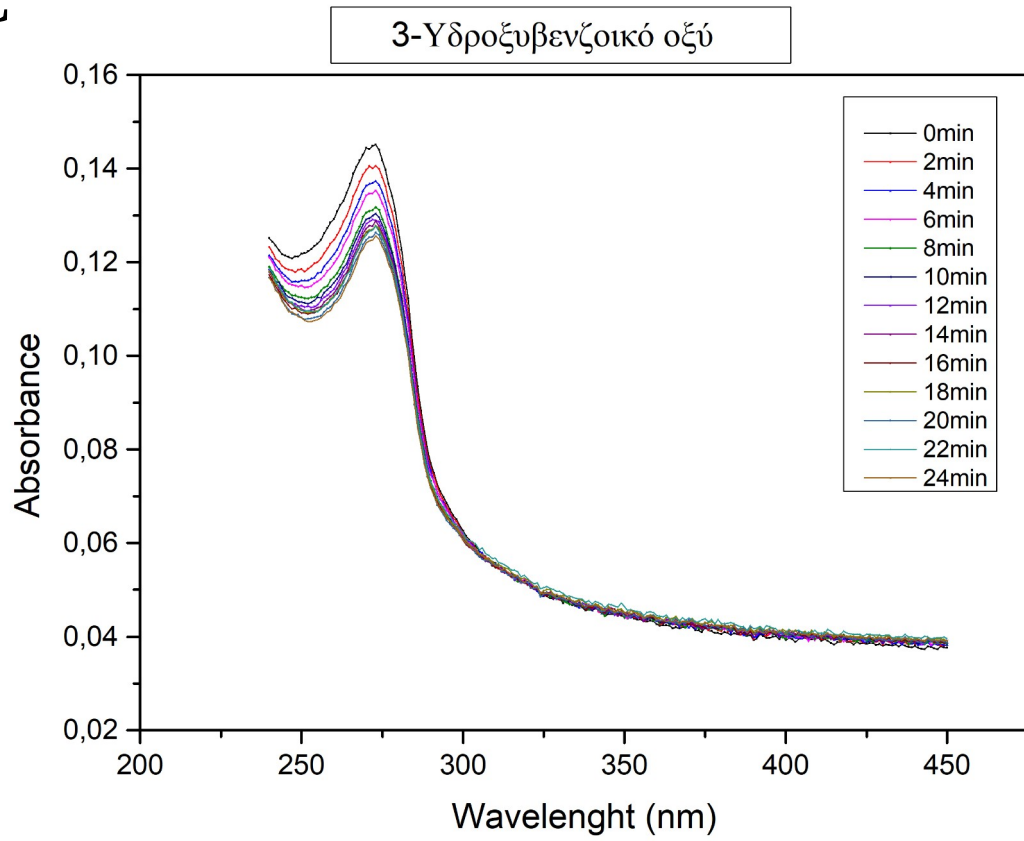
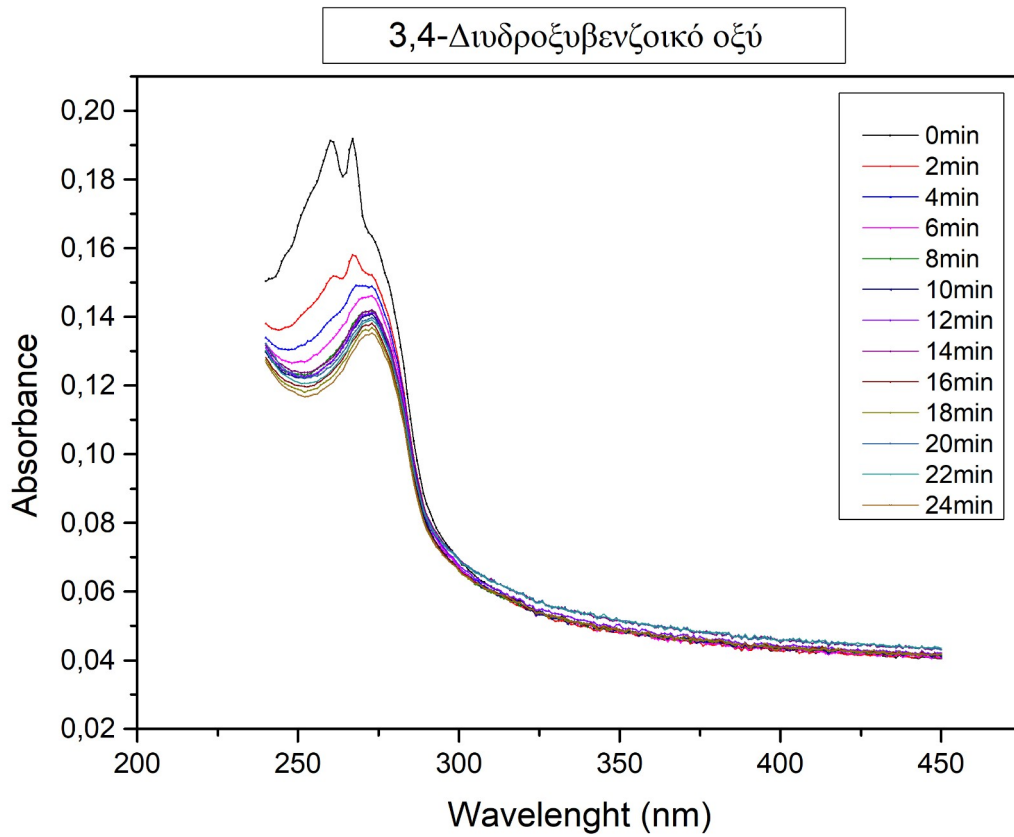
Βλέποντας την Εικόνα 5.5, μπορεί να παρατηρηθεί ότι με το πέρας των λεπτών και κατ' επέκταση με την εξέλιξη της αντίδρασης διάσπασης της κατεχόλης, αφενός μειώνεται η ποσότητα της κατεχόλης (φαίνεται να μειώνεται η απορρόφηση στα 260nm) και αφετέρου αυξάνεται η ποσότητα της 2-υδροξυμουκονικής ημιαλδεύδης (φαίνεται να αυξάνεται η απορρόφηση στα 375nm). Το γεγονός ότι υπάρχει παραγωγή της 2-υδροξυμουκονικής ημιαλδεύδης, αποδεικνύει ότι το ένζυμο της 2,3-υδροξυγενάσης της κατεχόλης είναι ενεργό και έτσι ακολουθείται το meta-μεταβολικό μονοπάτι στην περίπτωση που η πηγή άνθρακα είναι η φαινόλη (Lyratzakis A. et. al., 2020).

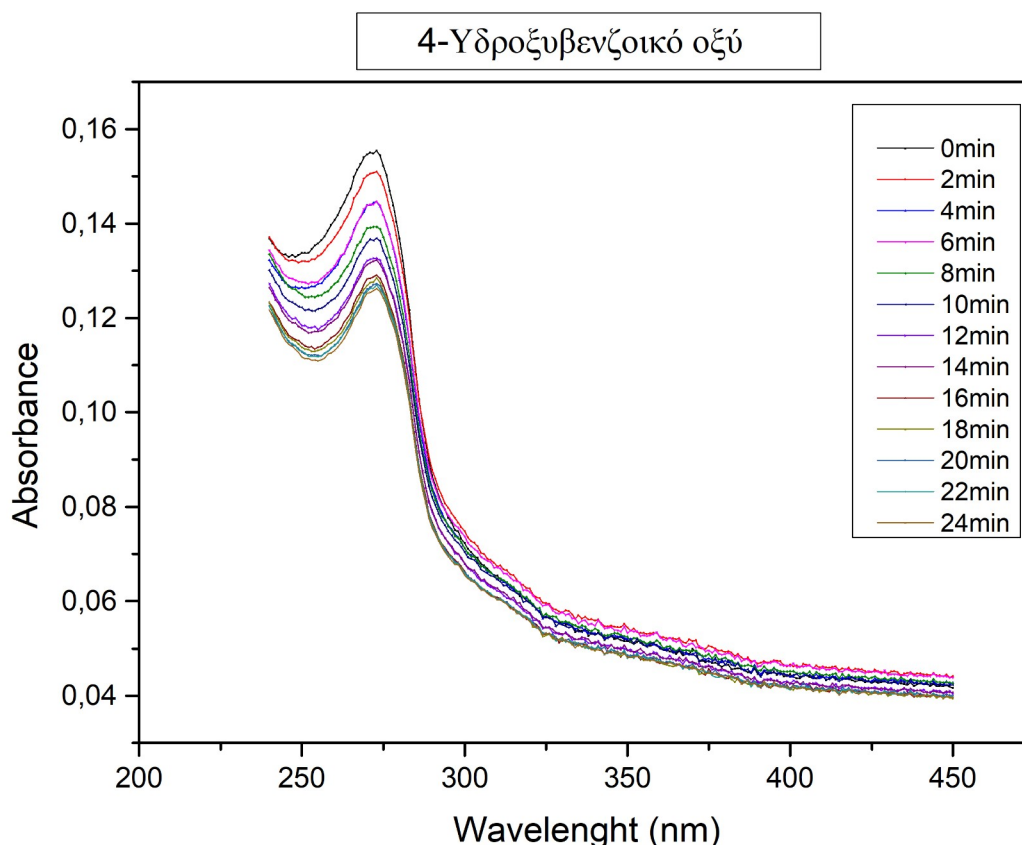


Εικόνα 5.6: Σχηματική απεικόνιση της πορείας διάσπασης της φαινόλης από το βακτήριο *Pseudomonas sp. phDV1*. (Γελαδάς Δ.Ε., 2023)



**A****B**

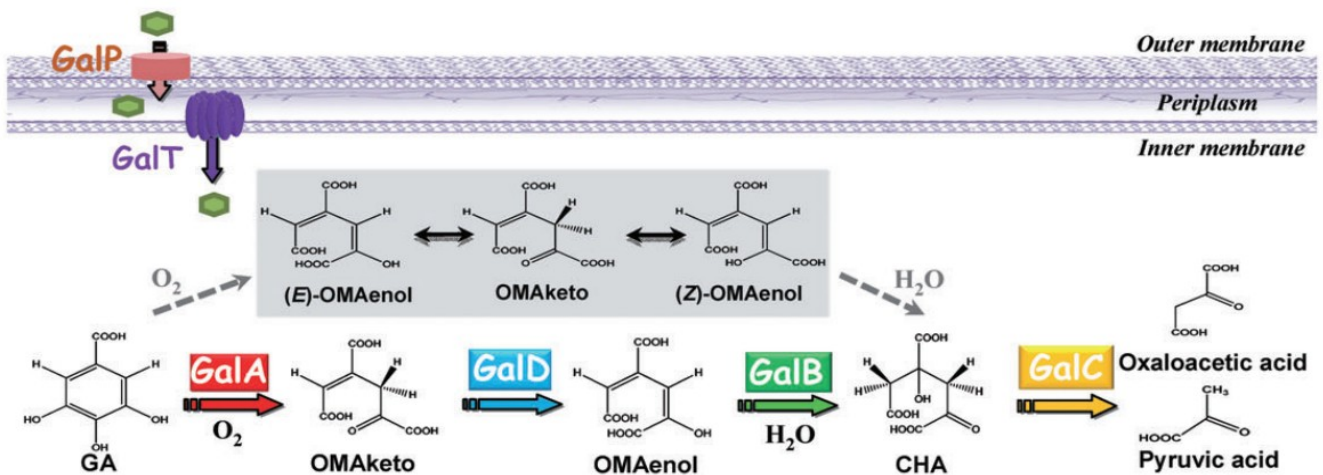
**C****D**

**E**

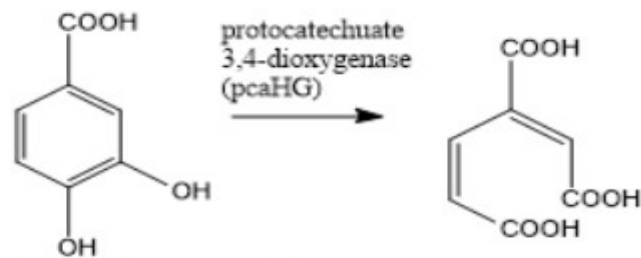
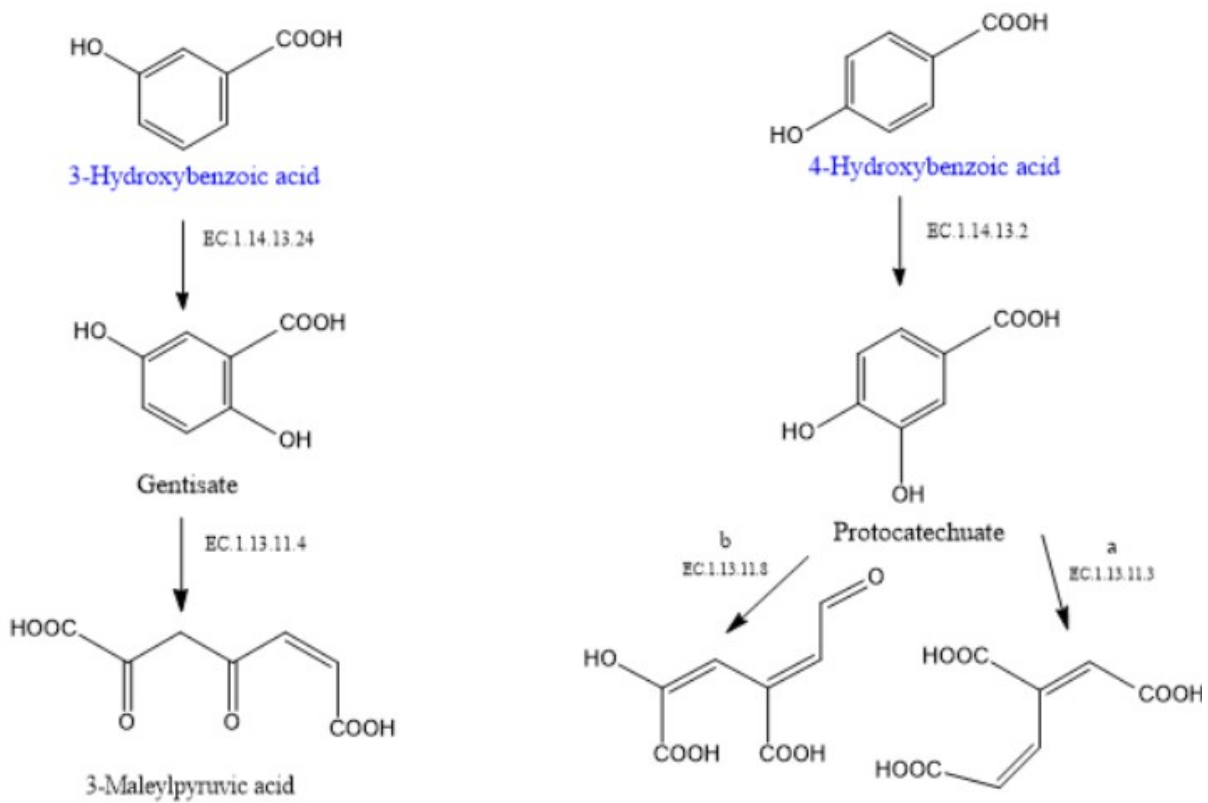
Εικόνα 5.7: Διαγραμματική απεικόνιση των τεστ κινητικής που πραγματοποιήθηκαν για 24 λεπτά το κάθε ένα στις καλλιέργειες με πηγή άνθρακα κάποια πολυδροξυλική ένωση. Συγκεκριμένα, στο A παρουσιάζεται το διάγραμμα για την καλλιέργεια με πηγή άνθρακα γαλλικό οξύ. Στο B φαίνεται το διάγραμμα για την καλλιέργεια με πηγή άνθρακα το 2,3-διυδροξυβενζοϊκό οξύ. Στο C φαίνεται το διάγραμμα για την καλλιέργεια με πηγή άνθρακα το 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ. Στο D φαίνεται το διάγραμμα για την καλλιέργεια με πηγή άνθρακα το 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ. Στο E παρουσιάζεται η καλλιέργεια με πηγή άνθρακα 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ

Από την άλλη πλευρά, λαμβάνοντας υπόψιν τις καμπύλες από τα τεστ κινητικής που πραγματοποιήθηκαν για τις πολυδροξυλικές ενώσεις της Εικόνας 5.7, παρατηρείται ότι παρόλο που η ποσότητα της κατεχόμενης μειώνεται με το πέρασμα της ώρας (φαίνεται να μειώνεται η απορρόφηση στα 260nm), δεν φαίνεται να εμφανίζεται κάποια κορυφή στα 375nm. Αυτό σημαίνει ότι η κατεχόμενη διασπάται χωρίς να παράγεται το προϊόν της 2-υδροξυμυονικής ημιαλδεύδης και έτσι δεν ακολουθείται το meta-μεταβολικό μονοπάτι για τον μεταβολισμό αυτών των πολυδροξυλικών ενώσεων. Αντίθετα, το βακτήριο αποικοδομεί τις ενώσεις αυτές ακολουθώντας το ortho-μεταβολικό μονοπάτι και παράγοντας το προϊόν

του οξέος (και όχι της αλδεύδης), το οποίο όμως δεν μπορεί να ανιχνευθεί με το τεστ κινητικής, διότι το προϊόν αυτό απορροφά στα 260nm, όπου απορροφά δηλαδή και η κατεχόλη. Έτσι, υπερκαλύπτεται, μία πιθανή κορυφή που θα μπορούσε να εμφανιζόταν από το προϊόν του οξέος στα 260nm, από την μεγάλη κορυφή της κατεχόλης. Παρ' όλα αυτά, βρέθηκαν βιβλιογραφικά στοιχεία, τα οποία επιβεβαιώνουν τα τεστ κινητικής και αποδεικνύουν ότι οι πολυδροξυλικές ενώσεις αυτές αποικοδομούνται από το βακτήριο ακολουθώντας το ορθο-μεταβολικό μονοπάτι, όπως φαίνεται και στις Εικόνες 5.8 και 5.9 (Nogales J. et. al., 2010, Spence E.M. et. al., 2020, Vanwijnsberghe S. et. al., 2021).



Εικόνα 5.8: Σχηματική απεικόνιση της αποικοδόμησης του γαλλικού οξέος και τα πιθανά προϊόντα αποικοδόμησης. (Nogales J. et. al., 2010)



3,4-Dihydroxybenzoic acid

Εικόνα 5.9: Σχηματική απεικόνιση των διαδικασιών διάσπασης των πολυδροξυλικών ενώσεων, 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ και 3,4-δihydroξυβενζοϊκό οξύ (Spence E.M. et. al., 2020, Vanwijnsberghe S. et. al., 2021)

## 5.5 Προσδιορισμός με NMR $^1\text{H}$ της πορείας διάσπασης του γαλλικού οξέος, χωρίς την παρουσία κυττάρων

Επεκτείνοντας το ζήτημα της αποικοδόμησης του γαλλικού οξέος από το βακτήριο, έγινε προσπάθεια προκειμένου να διαπιστωθεί αν το γαλλικό οξύ διασπάται και χωρίς την παρουσία κυττάρων μέσα στην καλλιέργεια. Αυτό επιτεύχθηκε μέσω της τεχνικής NMR  $^1\text{H}$ , από την οποία παρατηρήθηκε το σύνολο των μεταβολιτών της καλλιέργειας, αλλά και η ποσότητα του γαλλικού οξέος σε χρονικό διάστημα 5 ημερών. Σημειώνεται, επίσης, ότι οι καλλιέργειες (χωρίς βακτήρια) έμειναν στο σκοτάδι καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος, διότι το γαλλικό οξύ είναι φωτοευαίσθητη ένωση και μπορεί να διασπαστεί υπό την επίδραση φωτός.

Πίνακας 1: Αναλυτικοί πίνακες με αποτελέσματα NMR <sup>1</sup>H, που παρουσιάζουν τους μεταβολίτες που παράγονται ή αποικοδομούνται στην καλλιέργεια του γαλλικού οξέος (χωρίς κύτταρα) κατά την διάρκεια των πέντε ημερών

1 Day(223)	5 FIT		
Compound name	Concentration	Maximum	
Gallate	0,841	0,8318	
Ethanol	60,0222	60,1899	
Cellobiose	1,3737	0,7998	
Ethylene glycol	9,9632	10,4646	
D-Threitol	1,9703	2,8773	
Fucose	7,4154	1,2234	
Fructose	1,6787	1,0449	
Arabinose	57,0812	1,0585	
Glucuronate	4,2091	1,1427	
Glycerol	1,6105	1,2677	
Glucose-6-phosphate	1,9737	1,0129	
Maltose	0,7739	0,8333	
Nicotinic acid adenine dinucleotide	1,8448	0,1864	
Carnosine	1,7217	0,221	
Salicylurate	0,4945	0,2506	
4-Hydroxy-3-methoxymandelate	1,6183	0,2027	
Xylitol	0,7522	0,7179	
Lactose	3,7141	0,6121	
Lactulose	0,9561	0,4918	
Trehalose	0,6107	0,3533	
Glycylproline	1,3526	0,308	
N-Phenylacetyl glycine	0,8205	0,1751	
2-Phenylpropionate	0,4427	0,1664	
DSS-d6 (Chemical Shape Indicator)	4,9951	4,7143	

2 Day(224)	6 FIT		
Compound name	Concentration	Maximum	
Gallate	0.3689	0.3883	
3-Hydroxykynurenine	0.2021	0.1362	
4-Hydroxy-3-methoxymandelate	1.0284	0.0479	
Anserine	0.0747	0.1073	
Carnosine	5.5312	0.0735	
Epicatechin	0.8659	0.0362	
$\pi$ -Methylhistidine	1.0713	0.0693	
N-Acetylserotonin	0.1244	0.0592	
4-Hydroxy-3-methoxymandelate	0.7145	0.0479	
Nicotinic acid adenine dinucleotide	1.7647	0.0432	
Ethanol	63.2820	64.1343	
Ethylene glycol	9.4326	9.8195	
Ribose	0.7843	0.6697	
Glycerol	0.7599	0.6438	
Fructose	0.4465	0.5525	
Fucose	0.4594	0.4689	
Mannose	0.4158	0.3373	
Maltose	0.8991	0.2795	
Lactose	0.8295	0.2738	
Glycylproline	1.5163	0.1781	
Indole-3-acetate	7.9466	0.0536	
N-Phenylacetylglucine	7.9484	0.0469	
sn-Glycerol-3-phosphocholine	0.5056	0.0200	
DSS-d6 (Chemical Shape Indicator)	4.9225	4.9856	



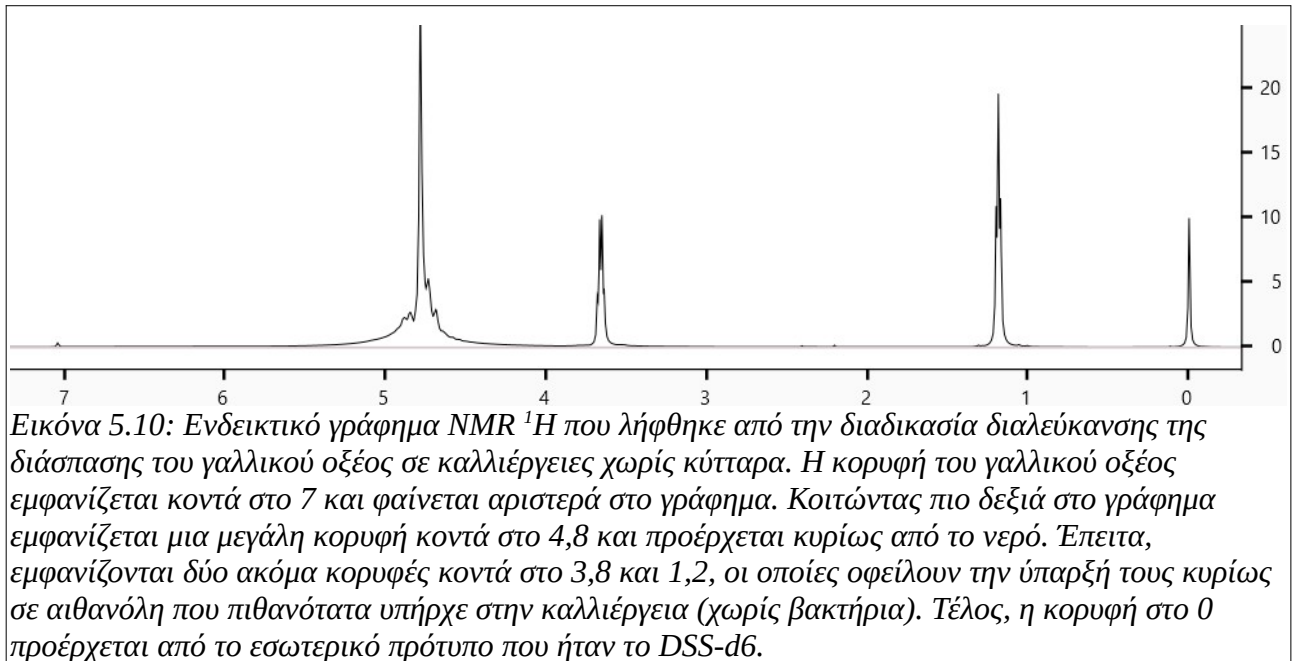
3 Day(225)	5 FIT		
Compound name	Concentration	Maximum	
Gallate	0,5109	0,5134	
Anserine	0,1991	0,1983	
$\pi$ -Methylhistidine	0,4656	0,1709	
$\tau$ -Methylhistidine	0,4951	0,1659	
N-Acetylserotonin	0,2142	0,1513	
Epicatechin	0,1665	0,1353	
Nicotinic acid adenine dinucleotide	0,1646	0,1494	
Inosine	0,1502	0,1398	
Ethanol	54,9962	55,917	
Ethylene glycol	8,3144	8,8504	
Fucose	0,6952	0,5944	
Ribose	0,7624	0,4767	
Fructose	0,3839	0,4394	
Cellobiose	2,1444	0,3745	
Maltose	0,708	0,3729	
Arabinitol	0,893	0,3722	
Mannose	1,3936	0,3679	
Galactonate	0,2931	0,3021	
Mannitol	0,2864	0,2822	
Lactose	1,4377	0,2708	
Glucitol	0,6645	0,2406	
Lactulose	0,7742	0,219	
Glycylproline	0,8888	0,2006	
Indole-3-acetate	6,9745	0,1523	
sn-Glycerol-3-phosphocholine	0,4504	0,111	
N-Acetylglucosamine	0,346	0,116	
DSS-d6 (Chemical Shape Indicator)	5,0093	4,9158	

4 Day(226)	4 FIT		
Compound name	Concentration	Maximum	
Formate	0.0584	0.0591	
Gallate	0.0920	0.1329	
$\pi$ -Methylhistidine	1.8328	0.0166	
Fucose	1.8373	0.0610	
$\tau$ -Methylhistidine	0.2226	0.0111	
Ethanol	24.0242	24.3236	
Ethylene glycol	3.5176	3.6497	
Galactose	0.4772	0.0251	
Indole-3-acetate	1.7712	0.0055	
Glutaric acid monomethyl ester	1.4768	0.0088	
Maltose	0.7761	0.0208	
DSS-d6 (Chemical Shape Indicator)	4.9468	4.5979	

5 Day(227)		4 FIT	
Compound name	Concentration	Maximum	
Formate	0.1442	0.1458	
Gallate	0.0922	0.0924	
Mannose	0.1544	0.1499	
L-Methylhistidine	0.5710	0.0237	
Epicatechin	0.0605	0.0061	
Carnosine	0.0180	0.0128	
Anserine	0.0239	0.0194	
Arabinose	0.2157	0.1805	
Ethanol	7.1993	7.3712	
Ethylene glycol	1.0412	1.0638	
Fructose	0.1757	0.1679	
Galactonate	0.1773	0.1199	
Glucitol	0.2840	0.0584	
Glutaric acid monomethyl ester	0.4267	0.0193	
Glycylproline	0.5743	0.0512	
Lactose	0.1100	0.0976	
S-Sulfoysteine	0.1236	0.1119	
N-Phenylacetyl glycine	0.8724	0.0155	
Ribose	0.5862	0.2267	
Xylitol	0.1909	0.1229	
Cellulose	0.5023	0.1177	
1,6-Anhydro-β-D-glucose	0.1156	0.1122	
Glycylproline	0.4076	0.0512	
Sucrose	0.3224	0.0517	
Fucose	0.1886	0.0669	
DSS-d6 (Chemical Shape Indicator)	4.9584	5.0041	

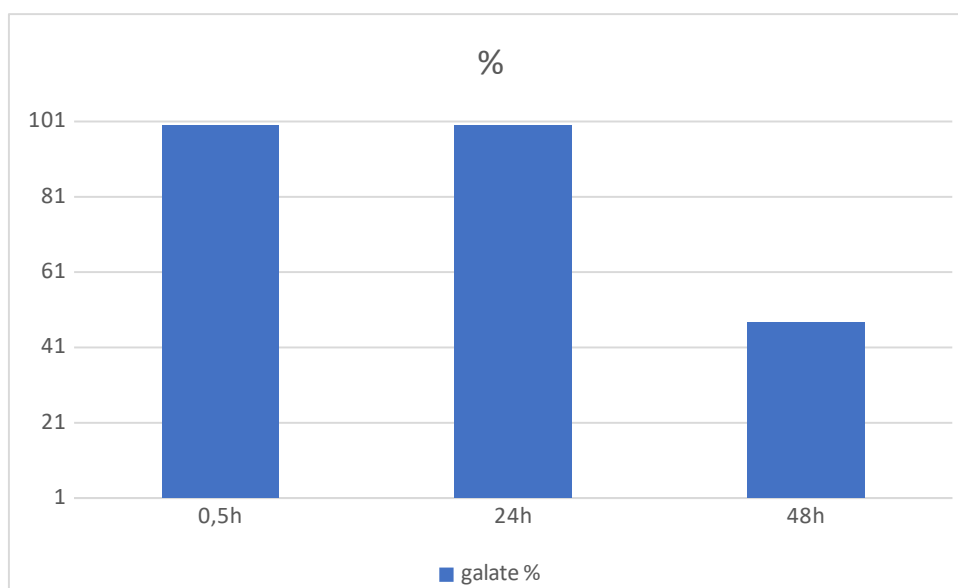
\* Με κόκκινα γράμματα αναγράφονται οι μεταβολίτες που οι τιμές της πειραματικής συγκέντρωσής τους στην καλλιέργεια δεν συνάδει με τις βιβλιογραφικές τιμές (δεν κάνουν fit), ενώ με μαύρα γράμματα αναγράφονται οι μεταβολίτες όπου οι συγκεντρώσεις τους συμφωνούν με την βιβλιογραφία (κάνουν fit). Στα κίτρινα πλαίσια φαίνεται συγκεκριμένα ο αριθμός των μεταβολιτών που κάνουν fit κάθε μέρα.

\* Οι μεταβολίτες γαλλικό και φορμικό οξύ που έχουν και το μεγαλύτερο ενδιαφέρον του πειράματος, περιβάλλονται από μαύρο πλαίσιο και έχουν διαφορετικά backgrounds σε σχέση με τους υπόλοιπους μεταβολίτες της καλλιέργειας.



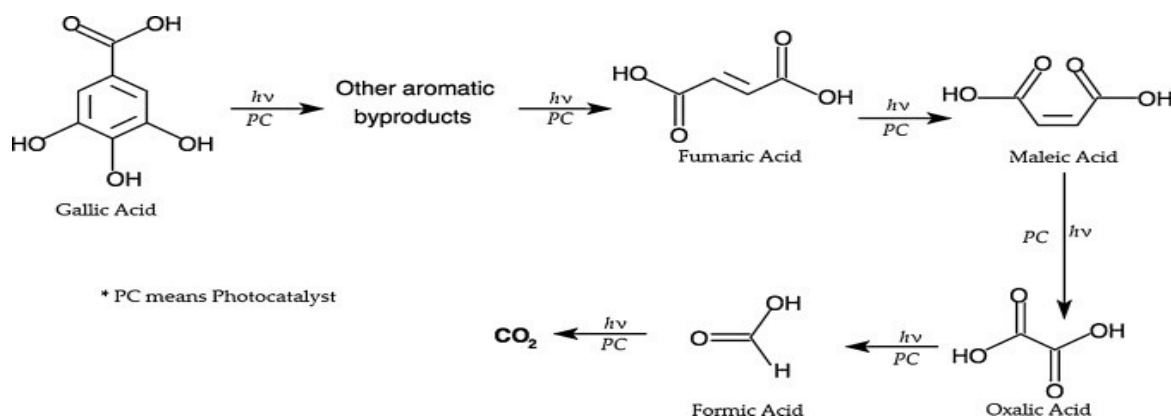
Λαμβάνοντας υπόψιν τους παραπάνω πίνακες, παρατηρείται ότι παρόλο που η συγκεντρώσεις σχεδόν όλων των μεταβολιτών της καλλιέργειας (χωρίς βακτήρια) παραμένουν σχετικά αμετάβλητες, η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος μεταβάλλεται με το πέρασμα των 5 ημερών. Πιο συγκεκριμένα, η ποσότητα του γαλλικού οξέος που εισάγεται αρχικά στην καλλιέργεια φαίνεται να μειώνεται σημαντικά. Κάτι τέτοιο σημαίνει ότι το γαλλικό οξύ μπορεί να διασπάται μέσα στο θρεπτικό υλικό και χωρίς την παρουσία των βακτηρίων, τα οποία το χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα αποικοδομώντας το. Αξιοσημείωτη παρατήρηση από τα αποτελέσματα του NMR  $^1\text{H}$  είναι το γεγονός ότι από την τέταρτη μέρα αρχίζει να παράγεται ένα νέο προϊόν στην καλλιέργεια, το οποίο είναι το φορμικό οξύ.

Για να διαπιστωθεί, λοιπόν, ο τρόπος με τον οποίον παράχθηκε το φορμικό οξύ, τοποθετήθηκε η καλλιέργεια (χωρίς κύτταρα) μπροστά από έντονο φως για 2 μέρες και ταυτόχρονα γινόταν λήψη φασμάτων NMR  $^1\text{H}$ .



Εικόνα 5.11: Ποσοτική διαγραμματική απεικόνιση της διάσπασης του γαλλικού οξέος σε χρονικές στιγμές 30 λεπτά, 1 ημέρα και 2 ημέρες, όταν βρίσκεται κάτω από έντονο φως.

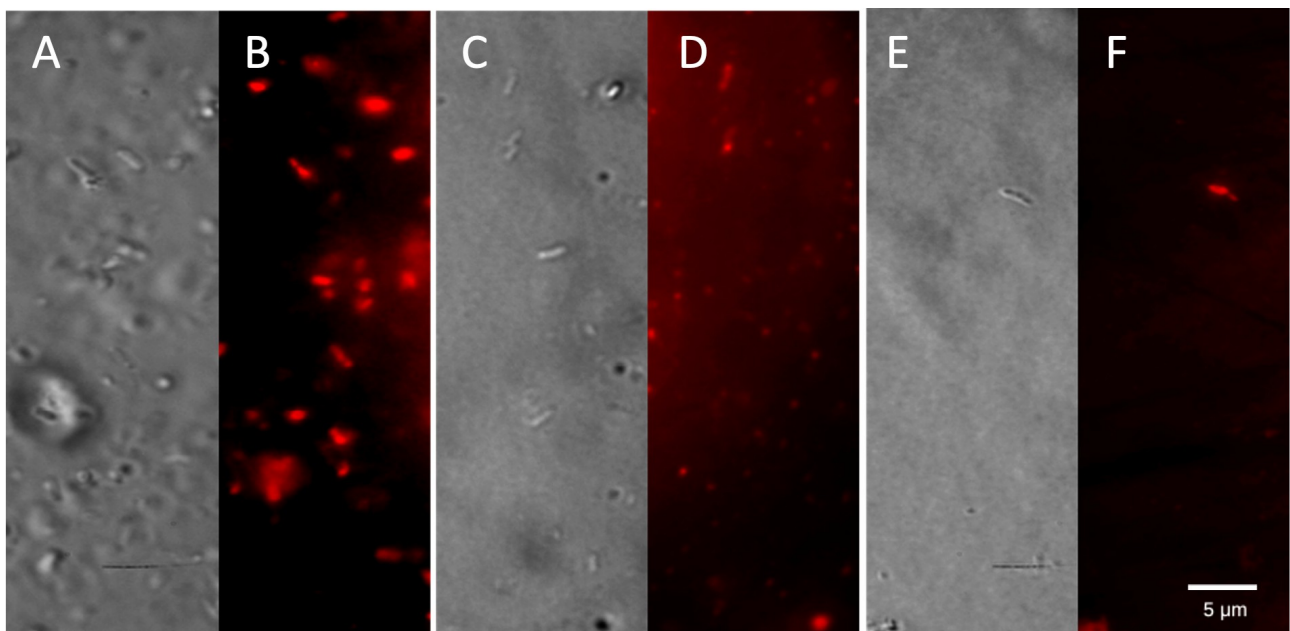
Από την Εικόνα 5.11, παρατηρείται ότι μετά από 48 ώρες επίδρασης του έντονου φωτός, η ποσότητα του γαλλικού οξέος έχει σχεδόν υποδιπλασιαστεί. Επίσης, ποσότητα φορμικού οξέος δεν ανιχνεύθηκε στο φάσμα NMR  $^1\text{H}$ , διότι η αντίδραση διάσπασης του γαλλικού οξέος προς φορμικό οξύ ήταν πολύ γρήγορη, με αποτέλεσμα οποιαδήποτε πιθανή ποσότητα φορμικού οξέος που έχει παραχθεί να διασπαστεί αμέσως προς διοξείδιο του άνθρακα (παρατηρήθηκαν μικρές φυσαλίδες μετά από 48 ώρες).



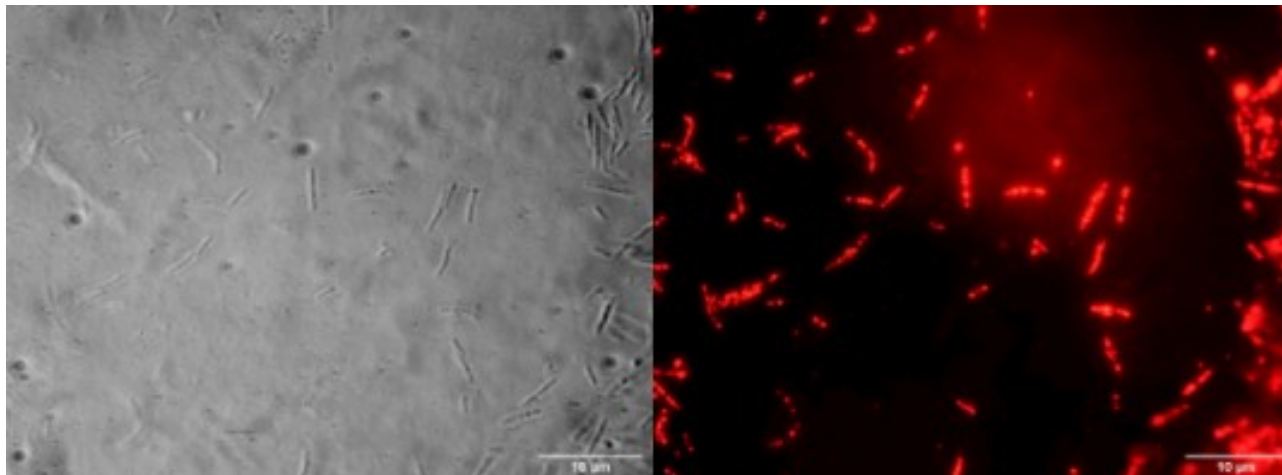
Εικόνα 5.12: Σχηματική απεικόνιση, με συντακτικούς τύπους των μορίων, της διάσπασης του γαλλικού οξέος όταν αυτό βρίσκεται κάτω από έντονο φως (Luna.L.A. et.al., 2016).

## 5.6 Παρατήρηση των κυττάρων σε οπτικό μικροσκόπιο και μικροσκόπιο φθορισμού με την χρώση Nile Red

Για την παρατήρηση των βακτηρίων και του PHB που έχουν παραχθεί, χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια από την συνθήκη της φαινόλης σε συγκεντρώσεις 400, 600, 800 mg/L και την συνθήκη του γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 200 mg/L. Επίσης, τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονταν στις 72 ώρες καλλιέργειας, διότι τότε παρατηρείται και το μεγαλύτερο OD<sub>600nm</sub> και έτσι λαμβάνονται περισσότερα κύτταρα.



Εικόνα 5.13: Εικόνες από το οπτικό μικροσκόπιο και το μικροσκόπιο φθορισμού με σκοπό την παρατήρηση των κυττάρων και των καρβοσωμάτων. Η εικόνα A παρουσιάζει τα βακτήρια στις 72 ώρες καλλιέργειας με πηγή άνθρακα φαινόλη συγκέντρωσης 400 mg/L. Στην εικόνα B φαίνεται η αντίστοιχη εικόνα φθορισμού για πηγή άνθρακα φαινόλη συγκέντρωσης 400 mg/L. Η εικόνα C παρουσιάζει τα βακτήρια στις 72 ώρες καλλιέργειας με πηγή άνθρακα φαινόλη συγκέντρωσης 600 mg/L. Στην εικόνα D φαίνεται η αντίστοιχη εικόνα φθορισμού για πηγή άνθρακα φαινόλη συγκέντρωσης 600 mg/L. Η εικόνα E παρουσιάζει τα βακτήρια στις 72 ώρες καλλιέργειας με πηγή άνθρακα φαινόλη συγκέντρωσης 800 mg/L. Στην εικόνα F φαίνεται η αντίστοιχη εικόνα φθορισμού για πηγή άνθρακα φαινόλη συγκέντρωσης 800 mg/L



Εικόνα 5.14: Εικόνες από το οπτικό μικροσκόπιο και το μικροσκόπιο φθορισμού με σκοπό την παρατήρηση των κυττάρων και των καρβωσωμάτων. Η αριστερή εικόνα παρουσιάζει τα βακτήρια στις 72 ώρες καλλιέργειας με πηγή άνθρακα γαλλικό οξύ συγκέντρωσης 200 mg/L. Στην δεξιά εικόνα φαίνεται η αντίστοιχη εικόνα φθορισμού για πηγή άνθρακα γαλλικό οξύ συγκέντρωσης 200 mg/L.

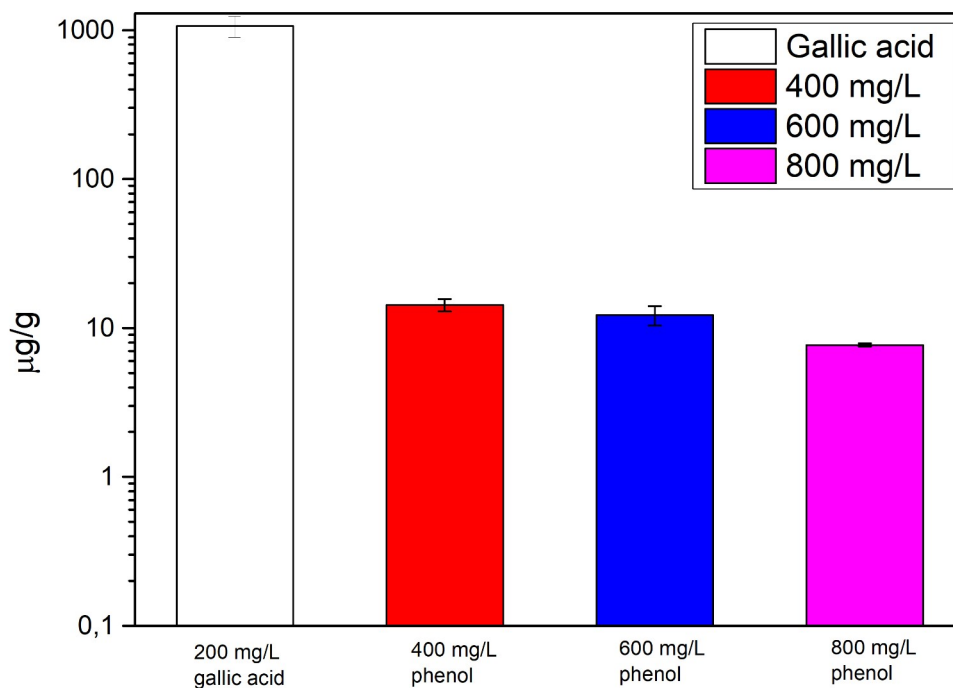
Μετά από αναλυτική επεξεργασία των παραπάνω εικόνων, έγινε μια σύγκριση μεταξύ των συνθηκών καλλιέργειας φαινόλης και γαλλικού οξέος. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι τα κύτταρα που αναπτύσσονται με πηγή άνθρακα φαινόλη, έχουν μικρότερο μέγεθος απ' ότι τα κύτταρα που αναπτύσσονται με πηγή άνθρακα γαλλικό οξύ. Αναλυτικότερα, τα κύτταρα με την φαινόλη έχουν μέγεθος  $\sim 1,75 \mu\text{m}$ , ενώ αυτά με το γαλλικό οξύ έχουν μέγεθος  $\sim 2,80 \mu\text{m}$ . Επίσης, υπάρχει αισθητή διαφορά μεταξύ των δύο αυτών συνθηκών ως προς τον αριθμό των σφαιριδίων PHB μέσα στα κύτταρα. Τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε φαινόλη περιέχουν  $\sim 2-3$  σφαιρίδια ανά κύτταρο, ενώ τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε γαλλικό οξύ περιέχουν  $\sim 5-6$  σφαιρίδια ανά κύτταρο. Όσον αφορά στο μέγεθος των σφαιριδίων PHB, ήταν περίπου το ίδιο και στις δύο συνθήκες και ίσο με  $\sim 0,42 \mu\text{m}$ . Συγκρίνοντας τις συνθήκες φαινόλης μεταξύ τους, μπορεί να παρατηρηθεί ότι τα κύτταρα, αλλά και τα σφαιρίδια PHB που περιέχονται στα κύτταρα, είναι σχεδόν ίδια και στις τρεις συγκεντρώσεις φαινόλης. Επιπλέον, όπως μπορεί να παρατηρηθεί, οι εικόνες που λήφθηκαν για τις συνθήκες της φαινόλης δεν είναι τόσο ευκρινείς σε σχέση με τις εικόνες από τα κύτταρα με το γαλλικό οξύ. Αυτό συνέβη, διότι στις συνθήκες με την φαινόλη δεν

υπήρχε πλήρης σταθεροποίηση των κυττάρων από την αγαρόζη, με αποτέλεσμα τα κύτταρα ήταν ιδιαίτερα κινητικά και να μην είναι εφικτή η λήψη τόσο σταθερών φωτογραφιών όπως στην περίπτωση των κυττάρων που αναπτύχθηκαν παρουσία γαλλικού οξέος.

## 5.7 Ποσοτικοποίηση του PHB με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Με σκοπό την ποσοτικοποίηση του PHB που έχει παραχθεί από το βακτήριο *Pseudomonas* sp. rhDV1, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της τεχνικής HPLC. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα αυτό λήφθηκαν από καλλιέργειες φαινόλης με συγκεντρώσεις 400, 600, 800 mg/L και καλλιέργειες γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 200 mg/L στις 72 ώρες ανάπτυξης. Να τονιστεί, επίσης, ότι όλα τα δείγματα προέρχονται από τρεις διαφορετικές βιολογικές επαναλήψεις το κάθε ένα. Η ανίχνευση του PHB έγινε μέσω της ανίχνευσης της ποσότητας του κροτονικού οξέος που είχε παραχθεί κατά την πέψη του PHB με πυκνό H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Η κορυφή του κροτονικού οξέος εμφανίζεται κοντά στα 7,1 λεπτά στο χρωματογράφημα της HPLC και μετά από ολοκλήρωση της κορυφής αυτής προκύπτει η συγκέντρωση του κροτονικού οξέος και κατ' επέκταση η συγκέντρωση του PHB.





*Εικόνα 5.15: Διάγραμμα ποσοτικού προσδιορισμού της ποσότητας του PHB από τα βακτήρια σε διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας. Η άσπρη κορυφή αναφέρεται σε καλλιέργειες του βακτηρίου με πηγή άνθρακα γαλλικό οξύ συγκέντρωσης 200 mg/L. Οι κόκκινη κορυφή αναφέρεται σε βακτήρια που έχουν αναπτυχθεί σε φαινόλη συγκέντρωσης 400 mg/L, η μπλε κορυφή αναφέρεται σε βακτήρια που έχουν αναπτυχθεί σε φαινόλη συγκέντρωσης 600 mg/L, και η ροζ κορυφή σε βακτήρια που έχουν αναπτυχθεί σε φαινόλη συγκέντρωσης 800 mg/L*

Λαμβάνοντας υπόψιν την Εικόνα 5.15 ποσοτικοποίησης του PHB, μπορεί να διαπιστωθεί ότι τα κύτταρα που αναπτύσσονται παρουσία γαλλικού οξέος παράγουν πολύ μεγαλύτερη ποσότητα PHB σε σχέση με τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε πηγή άνθρακα φαινόλη. Πιο συγκεκριμένα, απ' ό,τι φαίνεται τα κύτταρα με το γαλλικό οξύ παράγουν περίπου 100 φορές περισσότερο PHB συγκριτικά με τα κύτταρα που βρίσκονται σε φαινόλη. Κάτι τέτοιο έρχεται σε συμφωνία και με τις εικόνες του μικροσκοπίου μέσω του οποίου παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε γαλλικό οξύ είναι και μεγαλύτερα σε μέγεθος, αλλά περιέχουν και περισσότερα σφαιρίδια PHB στο εσωτερικό τους σε σχέση με τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε φαινόλη.



Έπειτα, συγκρίνοντας το διάγραμμα ποσοτικοποίησης του PHB ανάμεσα στις διαφορετικές συνθήκες φαινόλης, παρατηρείται ότι όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση του ρύπου, τόσο μεγαλύτερη ποσότητα PHB παράγεται από τα βακτήρια. Πιο συγκεκριμένα, τα βακτήρια παράγουν περισσότερη ποσότητα PHB σε συγκέντρωση φαινόλης 400 mg/L , μικρότερη ποσότητα σε συγκέντρωση 600 mg/L και τέλος ακόμα μικρότερη ποσότητα σε συγκέντρωση 800 mg/L. Το συγκεκριμένο γεγονός παρόλα αυτά, δεν μπορεί να ερμηνευθεί βιβλιογραφικά.

## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη και η συμπεριφορά του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. rhDV1 σε φαινόλη και σε διαφορετικές πολυδροξυλικές αρωματικές ενώσεις. Πιο συγκεκριμένα, όπως παρατηρήθηκε, το βακτήριο έχει την ικανότητα να αποικοδομεί ενώσεις όπως φαινόλη, γαλλικό οξύ, 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 2,3-διυδροξυβενζοϊκό οξύ, 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ, ακολουθώντας διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια κάθε φορά. Για παράδειγμα, ακολουθεί το meta-μεταβολικό μονοπάτι κατά την διάσπαση της φαινόλης, ενώ τις πολυδροξυλικές αρωματικές ενώσεις τις διασπά ακολουθώντας το ortho-μεταβολικό μονοπάτι, βασιζόμενοι στα τεστ κινητικής που πραγματοποιήθηκαν. Μια τέτοια διαφοροποίηση είναι ικανή να διαλευκάνει, σε κάποιο βαθμό, τους μηχανισμούς αποικοδόμησης του συγκεκριμένου στελέχους ως προς ορισμένους τύπους ρύπων. Επιπρόσθετα, σημαντικό εύρημα της εργασίας αυτής ήταν ότι το βακτήριο παράγει αρκετά μεγάλες ποσότητες PHB όταν αναπτύσσεται σε πηγή άνθρακα γαλλικό οξύ, σε αντίθεση με την ανάπτυξή του σε φαινόλη, όπου παράγει έως και δέκα φορές λιγότερη ποσότητα PHB. Κάτι τέτοιο καθιστά το γαλλικό οξύ ως μια αρκετά προσιτή πηγή άνθρακα για το βακτήριο έτσι ώστε να μπορεί να παράγει σημαντικές ποσότητες του βιοπολυμερούς. Επιπλέον, αξιοσημείωτη παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι στην περίπτωση του γαλλικού οξέος λήφθηκαν καλύτερης ποιότητας εικόνες με

περισσότερα διακριτά καρβοσώματα εντός ενός κυττάρου από το οπτικό μικροσκόπιο και το μικροσκόπιο φθορισμού, μέσω των οποίων διαπιστώθηκε ότι, στην συγκεκριμένη πηγή άνθρακα, τα κύτταρα είχαν μεγαλύτερο μέγεθος και περισσότερη ποσότητα PHB στο εσωτερικό τους. Τέλος, εξάχθηκαν ορισμένα χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με την συμπεριφορά του γαλλικού οξέος στις καλλιέργειες του βακτηρίου. Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι το γαλλικό οξύ δεν αποικοδομείται μόνο από τα βακτήρια μέσα στην καλλιέργεια, αλλά μπορεί να αλληλεπιδράσει και με τα συστατικά του θρεπτικού υλικού της καλλιέργειας αλλά και να διασπαστεί με το φως.

## 7. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Όσον αφορά στους μελλοντικούς στόχους, θα ήταν χρήσιμο να γίνει λήψη εικόνων οπτικού μικροσκοπίου και μικροσκοπίου φθορισμού για δείγματα φαινόλης σε συγκεντρώσεις 1200, 1600, 2000 mg/L, αλλά και εικόνες από δείγματα με τις πολυδροξυλικές ενώσεις (3-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 2,3-διυδροξυβενζοϊκό οξύ και 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ) σε συγκεντρώσεις 200 mg/L, έτσι ώστε να αποφανθεί ότι και σε αυτές τις συνθήκες το βακτήριο παράγει PHB. Ένας ακόμα μελλοντικός στόχος αποτελεί η ποσοτικοποίηση του PHB, εφόσον παράγεται, στις παραπάνω συνθήκες μέσω της τεχνικής HPLC. Επίσης, θα ήταν ωφέλιμο να γίνει φασματοσκοπικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των παραπάνω ρύπων στις καλλιέργειες και να κατασκευαστούν οι κατάλληλες καμπύλες. Επιπλέον, σημαντικό είναι να γίνει και πρωτεομική ανάλυση στα κύτταρα αυτών των συνθηκών με σκοπό τον καθορισμό των πρωτεϊνών που εκφράζονται από το βακτήριο σε κάθε μια συνθήκη. Τέλος, ένας ακόμα μελλοντικός στόχος είναι η πρωτεομική ανάλυση σε δείγματα φαινόλης συγκέντρωσης 600 mg/L, γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 200 mg/L και ηλεκτρικού οξέος συγκέντρωσης 0,5M στις 72 ώρες ανάπτυξης.

## 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Geyer et al. , (2015). Global plastics production. Retrieved from Our World in Data website: <https://ourworldindata.org/grapher/global-plastics-production>
- Karen L. (2021), Global bioplastics production forecast to more than triple over next 5 years, Sustainable plastics, <https://www.sustainableplastics.com/news/global-bioplastics-production-forecast-more-triple-over-next-5-years>
- Jayprakash Yadav, Nivedita Patra, Modeling of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production by *Bacillus subtilis* and its use for feed-forward bioreactor studies November 2022, Applied Microbiology and Biotechnology 107(1), DOI:[10.1007/s00253-022-12266-6](https://doi.org/10.1007/s00253-022-12266-6)
- Γελαδάς, Δ.Ε., Απομόνωση και χαρακτηρισμός πολύ-υδροξυαλκανοϊκών (PHAs) σφαιριδίων από το βακτήριο *Pseudomonas* sp.phDV1, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, 2021

- Γελαδάς, Δ.Ε., Παραγωγή πολύ-υδροξυβουτυρικού από στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas* sp.phDV1 και χαρακτηρισμός με ηλεκτρονική μικροσκοπία, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, 2023
- Walter Leal Filho, Amanda Lange Salvia, Alessandra Bonoli, Ulla A. Saari, Viktoria Voronova, Marija Klõga, Sonali Suraj Kumbhar, Katharina Olszewski, Daniela Müller De Quevedo, Jelena Barbir, An assessment of attitudes towards plastics and bioplastics in Europe, *Science of The Total Environment*, Volume 755, Part 1, 2021, 142732, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142732>.
- José M Luengo, Belén García, Angel Sandoval, Germán Naharro, Elías R Olivera, Bioplastics from microorganisms, *Current Opinion in Microbiology*, Volume 6, Issue 3, 2003 , Pages 251-260, ISSN 1369-5274, [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00040-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00040-7).
- Kanavaki, I.; Drakonaki, A.; Geladas, E.D.; Spyros, A.; Xie, H.; Tsiotis, G. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production in *Pseudomonas* sp. phDV1 Strain Grown on Phenol as Carbon Sources. *Microorganisms* 2021, 9, 1636. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081636>
- Drakonaki A, Mathioudaki E, Geladas ED, Konsolaki E, Vitsaxakis N, Chaniotakis N, Xie H, Tsiotis G. Production of Polyhydroxybutyrate by Genetically Modified *Pseudomonas* sp. phDV1: A Comparative Study of

Utilizing Wine Industry Waste as a Carbon Source. *Microorganisms*. 2023; 11(6):1592. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061592>

- Karen S., Gram Positive vs Gram Negative, Technology Networks Immunology and Microbiology, 2019, <https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/gram-positive-vs-gram-negative-323007>
- Tan G-YA, Chen C-L, Li L, Ge L, Wang L, Razaad IMN, Li Y, Zhao L, Mo Y, Wang J-Y. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers*. 2014; 6(3):706-754. <https://doi.org/10.3390/polym6030706>
- B. S. Saharan, Ankita and Deepansh Sharma, Bioplastics-For Sustainable Development, International Journal of Microbial Resource Technology, Vol.1, No.1 (Jan 2012), 11-23.
- Simon F Williams, David P Martin, Daniel M Horowitz, Oliver P Peoples, PHA applications: addressing the price performance issue: I. Tissue engineering, International Journal of Biological Macromolecules, Volume 25, Issues 1–3, 1999, Pages 111-121, ISSN 0141-8130, [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00022-7](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00022-7).
- Jendrossek, D. (2020). Carbonosomes. In: Jendrossek, D. (eds) Bacterial Organelles and Organelle-like Inclusions. Microbiology

Monographs, vol 34. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-60173-7\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-60173-7_10)

- Taguchi, K., Tsuge, T., Matsumoto, K. I., Nakae, S., Taguchi, S., & Doi, Y. (2001). Investigation of metabolic pathways for biopolyester production. *Riken review*, 71-74.
- Greenspan, P., Mayer, E. P., & Fowler, S. D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of cell biology*, 1985, 100(3), 965-973.
- Frešer F, Hostnik G, Tošović J, Bren U. Dependence of the Fe(II)-Gallic Acid Coordination Compound Formation Constant on the pH. *Foods*. 2021; 10(11):2689. <https://doi.org/10.3390/foods10112689>
- Juan Nogales, Angeles Canales, Jesús Jiménez-Barbero, José Luis García, Eduardo Dvaz, Molecular Characterization of the Gallate Dioxygenase from *Pseudomonas putida* KT2440: THE PROTOTYPE OF A NEW SUBGROUP OF EXTRADIOL DIOXYGENASES\*, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 280, Issue 42, 2005, Pages 35382-35390, ISSN 0021-9258, <https://doi.org/10.1074/jbc.M502585200>.
- Vanwijnsberghe S, Peeters C, De Ridder E, Dumolin C, Wieme AD, Boon N, Vandamme P. Genomic Aromatic Compound Degradation

Potential of Novel *Paraburkholderia* Species: *Paraburkholderia domus* sp. Nov., *Paraburkholderia haematera* sp. nov. And *Paraburkholderia nemoris* sp. Nov. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(13):7003. <https://doi.org/10.3390/ijms22137003>

- Spence EM, Scott HT, Dumond L, Calvo-Bado L, di Monaco S, Williamson JJ, Persinoti GF, Squina FM, Bugg TDH. The Hydroxyquinol Degradation Pathway in *Rhodococcus jostii* RHA1 and *Agrobacterium* Species Is an Alternative Pathway for Degradation of Protocatechuic Acid and Lignin Fragments. *Appl Environ Microbiol*. 2020 Sep 17;86(19):e01561-20. doi: 10.1128/AEM.01561-20. PMID: 32737130; PMCID: PMC7499046.
- Ana L. Luna, Miguel A. Valenzuela, Christophe Colbeau-Justin, Patricia Vázquez, Julia L. Rodriguez, Juan R. Avendaño, Salvador Alfaro, Salvador Tirado, Adrián Garduño, José M. De la Rosa, Photocatalytic degradation of gallic acid over CuO–TiO<sub>2</sub> composites under UV/Vis LEDs irradiation, *Applied Catalysis A: General*, Volume 521, 2016, Pages 140-148, ISSN 0926-860X, <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2015.10.044>.
- Irene Tsirogianni, Michalis Aivaliotis, Michael Karas, Georgios Tsiotis, Mass spectrometric mapping of the enzymes involved in the phenol degradation of an indigenous soil pseudomonad, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, Volume 1700, Issue

1, 2004, Pages 117-123, ISSN 1570-9639, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.04.003>.

- Anbreen Anjum, Mohammad Zuber, Khalid Mahmood Zia, Aqdas Noreen, Muhammad Naveed Anjum, Shazia Tabasum, Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements, International Journal of Biological Macromolecules, Volume 89, 2016, Pages 161-174, ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>.