

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



Πτυχιακή Εργασία
της Μαρίας Καραμανλή (Α.Μ:2283)

**Βιοενεργητική στρατηγική βιοαποικοδόμησης
χλωριωμένων φαινολικών ενώσεων από το
μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus***

Επιβλέπων Καθηγητής: Καθ. Κυριάκος Κοτζαμπάσης

Ηράκλειο – Ιούνιος 2017

Περίληψη

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η ικανότητα του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* να βιοαποικοδομεί χλωριωμένες φαινολικές ενώσεις. Μελετήθηκαν όλες οι χλωροφαινόλες (2-mCP, 3-mCP, 4-mCP, 2,3-dCP, 2,4-dCP, 2,5-dCP, 2,6-dCP, 3,4-dCP, 3,5-dCP, 2,3,4-trCP, 2,3,5-trCP, 2,3,6-trCP, 2,4,5-trCP, 2,4,6-trCP, 3,4,5-trCP, 2,3,4,5-teCP, 2,3,5,6-teCP, 2,3,4,6-teCP, pCP) και διαπιστώθηκε ότι η βιοαποικοδόμηση των χλωροφαινολών είναι μια βιοενεργητική διαδικασία. Το μικροφύκος διαχειρίζεται τα ενεργειακά του αποθέματα επενδύοντας τα ανάλογα με τη τοξικότητα του περιβάλλοντος του, είτε στη ανάπτυξη (αύξηση βιομάζας), είτε στη βιοαποικοδόμηση της τοξικής ένωσης. Σε όλους τους χειρισμούς η τοξικότητα όλων των επιμέρους χλωροφαινολών καταγράφηκε (1) με μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και καταγράφουν το επίπεδο της καταπόνησης, (2) με τη διαφοροποίηση του επιπέδου του O₂ (μιας και πρόκειται για χειρισμούς σε κλειστά συστήματα) που υποδεικνύει τη σχέση της φωτοσυνθετικής διαδικασίας με αυτή της αναπνευστικής διαδικασίας και (3) την αύξηση της βιομάζας της καλλιέργειας ως έκφραση της ανάπτυξης. Το μικροφύκος τελικά φαίνεται να ακολουθεί δύο διαφορετικές στρατηγικές αποτοξικοποίησης. Σε συνθήκες σχετικά μειωμένης τοξικότητας (mCPs, 2,6-dCP, 2,4-dCP) το μικροφύκος χρησιμοποιεί όλα ή τουλάχιστον περισσότερα από τα ενεργειακά του αποθέματα στη αύξηση της βιομάζας του. Με αυτό το τρόπο ο αυξημένος αριθμός των κυττάρων του έχει να αντιμετωπίσει μικρότερο αριθμό φαινολικών ενώσεων. Η αποτοξικοποίηση, ακολουθώντας αυτή τη στρατηγική, επέρχεται χωρίς τη δαπάνη επιπλέον ενέργειας (έμμεση αποτοξικοποίηση). Σε συνθήκες αυξημένης τοξικότητας (2,3-dCP, 2,5-dCP, 3,4-dCP, 3,5-dCP, trCPs, teCPs, pCP) φαίνεται να επενδύει περισσότερη ή και όλη τη ενέργεια του στη βιοαποικοδόμηση των ενώσεων, ενώ λιγότερη ή καθόλου ενέργεια επενδύει για τη ανάπτυξη του (άμεση αποτοξικοποίηση). Λαμβάνοντας υπόψη ότι μπορούμε να επεμβούμε στα ενεργειακά αποθέματα του μικροφύκου που καθορίζουν τα πλαίσια αντοχής του στο τοξικό περιβάλλον και γνωρίζοντας τη βιοενεργητική στρατηγική του μικροφύκου μπορούμε εύκολα και στοχευμένα να χρησιμοποιήσουμε τα μικροφύκη για τη βιοαποικοδόμηση τοξικών αποβλήτων στα πλαίσια μιας «έξυπνης» βιοτεχνολογικής προσέγγισης (smart biotechnology) στο άμεσο μέλλον.

Abstract

In the present work, the ability of the microalga *Scenedesmus obliquus* to biodegrade chlorinated phenolic compounds was studied. All the chlorinated phenolic compounds were studied (2-mCP, 3-mCP, 4-mCP, 2,3-dCP, 2,4-dCP, 5-trCP, 2,3,6-trCP, 2,4,5-trCP, 2,4,6-trCP, 3,4,5-trCP, 2,3,4,5- 5,6-teCP, 2,3,4,6-teCP, pCP) and the biodegradation of chlorophenols proved to be a bioenergetic process. The microalga manages its energy reserves by investing them, depending on the toxicity of the environment, either on the growth (biomass increase) or the biodegradation of the toxic compound. In all treatments the toxicity of all chlorophenols was expressed (i) with fluorescence induction measurements indicating the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus which express the level of stress, (ii) with the differentiation of O₂ level (as they are treatments in closed systems) indicating the relationship of the photosynthetic process and the respiratory process and (iii) the biomass increase of the culture as an expression of growth. Finally, the microalga seems to follow two different detoxification strategies. In relatively low toxicity conditions (mCPs, 2,6-dCP, 2,4-dCP), microalga use all or at least more of its energy reserves to increase its biomass production. Thus, the increased number of cells has to face lower number of phenolic compounds. With this strategy, detoxification occurs without investment of additional energy (indirect detoxification). In higher toxicity conditions (2,3-dCP, 2,5-dCP, 3,4-dCP, 3,5-dCP, trCPs, teCPs, pCP) the microalga invest more or all of its energy reserves in the biodegradation of phenolic compounds, while less or no energy invests for biomass increase (direct detoxification). Considering that we can interfere in microalga's energy reserves which define its endurance frames in the toxic environment and knowing the bioenergetic strategy of microalgae for biodegradation we can easily and purposefully use microalgae to biodegrade toxic waste in the frame of a smart biotechnology in the near future.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή

1.1 Φαινολικές ενώσεις.....	6
1.2 Χλωροφαινόλες.....	6
1.3 Βιοαποικοδόμηση	8
1.4 Βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων	9
1.5 Βιοαποικοδόμηση και μικροφύκη	10
1.6 Βιοχημικά μονοπάτια αποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων	11
1.6.1 Αποικοδόμηση φαινόλης	12
1.6.2 Αποικοδόμηση χλωροφαινολών	13
Σκοπός της εργασίας.....	15

2. Υλικά και Μεθόδοι

2.1 Οργανισμός.....	16
2.2 Συνθήκες ανάπτυξης.....	16
2.3 Υπολογισμός κυτταρικού όγκου μίας καλλιέργειας.....	19
2.4 Επαγωγικός φθορισμός-φυσικοχημικές αναλύσεις της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.....	19
2.5 Μέτρηση περιεκτικότητας οξυγόνου (O ₂) και παραγόμενου υδρογόνου (H ₂) με αέρια χρωματογραφία θερμοκτικής αγωγιμότητας (GC-TCD).....	23
2.6 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση φαινολικών ενώσεων με HPLC	23

3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

3.1 Βιοαποικοδόμηση φαινόλης	26
3.2 Βιοαποικοδόμηση χλωροφαινολών	30
3.2.1 Βιοαποικοδόμηση μονοχλωροφαινολών	30
3.2.1.1 Σύγκριση βιοαποικοδόμησης φαινόλης και μονοχλωροφαινολών.....	34
3.2.2 Βιοαποικοδόμηση διχλωροφαινολών	35
3.2.2.1 Σύγκριση βιοαποικοδόμησης μονοχλωροφαινολών και διχλωροφαινολών	40
3.2.3 Βιοαποικοδόμηση τριχλωροφαινολών.....	41
3.2.3.1 Σύγκριση βιοαποικοδόμησης διχλωροφαινολών	

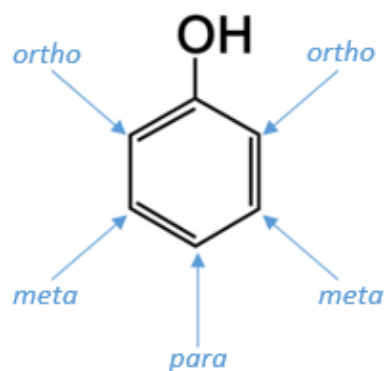
και τριγλωροφαινολών.....	44
3.2.4 Βιοαποικοδόμηση τετραγλωροφαινολών	45
3.2.4.1 Σύγκριση βιοαποικοδόμησης τριγλωροφαινολών και τετραγλωροφαινολών	49
3.2.5 Βιοαποικοδόμηση πενταγλωροφαινόλης.....	49
3.2.5.1 Σύγκριση βιοαποικοδόμησης τετραγλωροφαινολών και πενταγλωροφαινόλης	52
4. Συμπεράσματα	53
5. Βιβλιογραφία	56

1.Εισαγωγή

1.1 Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις κατατάσσονται στην κατηγορία των αρωματικών οργανικών ενώσεων και είναι ενώσεις οι οποίες φέρουν μία τουλάχιστον υδροξυλομάδα (-OH) απευθείας συνδεδεμένη στο αρωματικό δακτύλιο. Είναι σημαντικές για τη βιομηχανία αφού χρησιμοποιούνται ως ενδιάμεσα για τη παραγωγή διαφόρων προϊόντων όπως πολυμερών, βαφών, φαρμάκων. Από την άλλη αποτελούν τις ποιο διαδεδομένες μορφές χημικών ρυπαντών που απαντώνται στα οικοσυστήματα (Michałowicz and Duda, 2007).

Η απλούστερη φαινολική ένωση είναι η φαινόλη (υδροξυβενζόλιο). Αποτελείται κλασικά από ένα αρωματικό δακτύλιο, με εναλλασσόμενους διπλούς και απλούς δεσμούς μεταξύ των ατόμων του άνθρακα, όπου μία και μόνο ομάδα υδροξυλίου βρίσκεται συνδεδεμένη στο αρωματικό δακτύλιο (Εικόνα 1). Η φαινόλη αποτελεί τη βασική δομική μονάδα πολλών συνθετικών οργανικών ενώσεων. Η προσθήκη ενός υποκαταστάτη στη φαινόλη μπορεί να γίνει σε διαφορετικές θέσεις του αρωματικού δακτυλίου. Για το προσδιορισμό της ακριβής θέσης του υποκαταστάτη χρησιμοποιούνται συχνά τα προθέματα *ortho*- (o), *meta*- (m) και *para*- (p) όπως υποδεικνύονται στην Εικόνα 1.



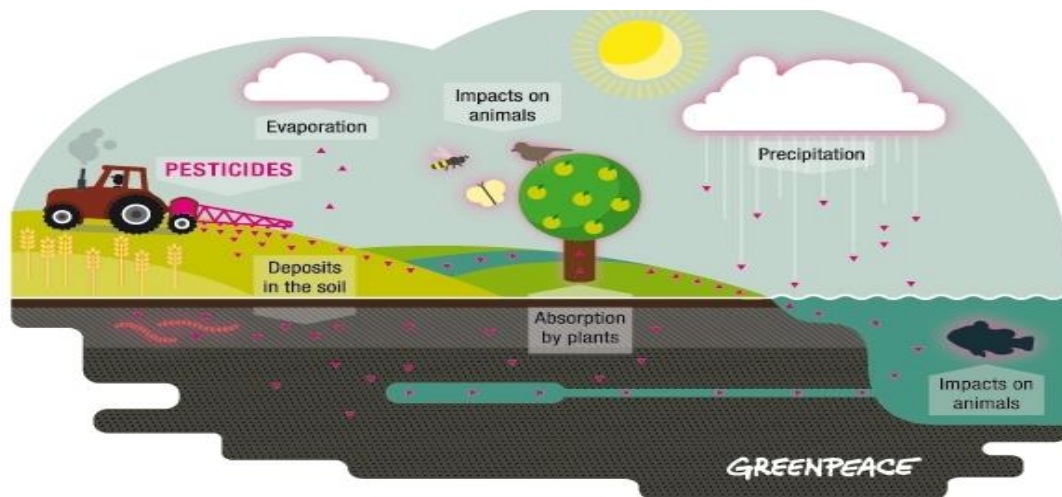
Εικόνα 1. Δομή της φαινόλης και ονοματολογία των μόνο-υποκατεστημένων παραγώγων της

1.2 Χλωροφαινόλες

Οι χλωροφαινόλες αποτελούν τη μεγαλύτερη και πιο διαδεδομένη ομάδα φαινολικών ενώσεων. Σχηματίζονται από τη ηλεκτρονιόφιλη προσθήκη χλωρίων (ένα έως πέντε) στη φαινόλη. Έτσι προκύπτουν συνολικά 19 ενώσεις, τρεις μονοχλωροφαινόλες (mCPs), 6 διχλωροφαινόλες (dCPs), 6 τριχλωροφαινόλες (trCPs), τρεις τετραχλωροφαινόλες (teCPs) και η πλήρως χλωριωμένη πενταχλωροφαινόλη (pCP) (Peng, et al., 2016).

Χρησιμοποιούνται ευρέως ως οργανικοί διαλύτες, συντηρητικά εμποτισμού ξύλου και δέρματος, απολυμαντικά, επιβραδυντικά καύσης, βακτηριοκτόνα, εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα και ως ενδιάμεσα για τη παραγωγή βαφών και φαρμακευτικών προϊόντων. Στο περιβάλλον εισέρχονται κυρίως από τα βιομηχανικά απόβλητα και τα φυτοφάρμακα με αποτέλεσμα να καταλήγουν στα υπόγεια και επιφανειακά ύδατα, στα ιζήματα του πυθμένα και στο έδαφος (Εικόνα 2) (Michałowicz and Duda, 2007; Czaplicka, 2004; Olaniran and Igbinosa, 2011; Ge, et al., 2017; Wexler, 2014).

Επειδή είναι λιπόφιλες ενώσεις μπορούν να διαπεράσουν διαμέσου κυτταρικών μεμβρανών και έτσι από το περιβάλλον, όπου εναποτίθενται καταλήγουν να συσσωρεύονται στους ζωντανούς οργανισμούς, κυρίως στα ψάρια (Ge, et al., 2017; Kishino and Kobayashi, 1996) και στα φυτά (Michałowicz, et al., 2009; Sua and Zhua, 2006). Η βιοσυσσώρευση των χλωροφαινολών στους ιστούς έχει δυσμενείς επιπτώσεις για τους οργανισμούς αφού πρόκειται για τοξικές ενώσεις. Οι τοξικές τους επιδράσεις φαίνεται να συνδέονται με τη διακοπή της παραγωγής ενέργειας (ATP) λόγω παρεμπόδισης της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια (Tissut, et al., 1987) και της φωτοσυνθετικής φωσφορυλίωσης στους χλωροπλάστες (Ravanel, et al., 1985). Μάλιστα με τη αύξηση του αριθμού των υποκατεστημένων χλωρίων στο φαινολικό δακτύλιο αυξάνεται η τοξικότητα, η λιποφιλικότητα και άρα και η ικανότητα τους για βιοσυσσώρευση (Olaniran and Igbinosa, 2011; Wexler, 2014; Kishino and Kobayashi, 1996).



Εικόνα 2. Φυτοφάρμακα: κύρια πηγή εναπόθεσης των χλωροφαινολών στο περιβάλλον

Στα ψάρια η συσσώρευση των χλωροφαινολών στους ιστούς βρέθηκε να οδηγεί σε οξειδωτικό στρες, απόπτωση, δυσλειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος, ανώμαλη ανάπτυξη, μειωμένο ρυθμό αναπαραγωγής και καρκινογένεση (Ge, et al., 2017). Στα φυτά είναι υπεύθυνες για τη παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου, την υπεροξείδωση λιπιδίων, το οξειδωτικό στρες καθώς και τη μεταβολή της ενεργότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων (Michałowicza, et al., 2009) (Santos de Araujoa, et al., 2006). Στον άνθρωπο οι χλωροφαινόλες εισέρχονται μέσω της κατάποσης μολυσμένου φαγητού, μέσω της εισπνοής ή της δερματικής επαφής (ASTR Public Health Statement, 1999). Η συχνή έκθεση σε χλωροφαινόλες βρέθηκε να αυξάνει τις πιθανότητες εκδήλωσης ισχαιμικών καρδιοπαθειών, αναπνευστικών προβλημάτων, λεμφώματος non-Hodgkin, ενώ μπορεί να οδηγήσει ακόμη και σε θάνατο (Czaplicka, 2004; ATSDR Public Health Statement, 1999; Guyton, et al., 2016).

Ο Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για το Καρκίνο (IARC) χαρακτήρισε 5 από τις 19 χλωροφαινόλες (PCP, 2,3,4,6-teCP, 2,4,6-trCP, 2,4,5-trCP, 2,4-dCP) ως πιθανά καρκινογόνα για το άνθρωπο (Czaplicka, 2004; Guyton, et al., 2016). Παράλληλα κάποιες από αυτές

(2,4,6-trCP, pCP, 2,4-dCP, 2-mCP) έχουν συμπεριληφθεί στη λίστα με τους ρυπαντές προτεραιότητας της Υπηρεσίας Προστασίας Περιβάλλοντος της Αμερικής (EPA) (EPA Priority Pollutant List, 2014). Οι χλωροφαινόλες έχουν βρεθεί σε τουλάχιστον 116 από τις 1,467 καταγεγραμμένες από την EPA περιοχές επικίνδυνων αποβλήτων (ATSDR Public Health Statement, 1999). Η ευρεία διάδοση τους στο περιβάλλον και οι τοξικές τους επιδράσεις στους ζωντανούς οργανισμούς έχουν στρέψει το ενδιαφέρον των επιστημόνων στη εύρεση μεθόδων για τη απομάκρυνση των ενώσεων αυτών από τις μολυσμένες περιοχές.

1.3 Βιοαποικοδόμηση

Η απομάκρυνση τοξικών ενώσεων από το περιβάλλον επιτυγχάνεται είτε με αβιοτική αποικοδόμηση, με χημικές δηλαδή μεθόδους (προσρόφηση, ανταλλαγή ιόντων, φωτόλυση, υδρόλυση), είτε με βιολογικές μεθόδους δηλαδή με βιοτική αποικοδόμηση ή βιοαποικοδόμηση. Η βιοαποικοδόμηση (biodegradation) ορίζεται ως η διαδικασία, όπου μικροοργανισμοί μπορούν να τροποποιήσουν ή να μετασχηματίσουν (μέσω μεταβολικών ή ενζυματικών διεργασιών) τη δομή των χημικών



Εικόνα 3. Βιοαποικοδόμηση τοξικών ενώσεων από βακτήρια

ενώσεων που εισέρχονται στο περιβάλλον. Έτσι στη περίπτωση τοξικών ενώσεων αυτές υποβαθμίζονται σε μη επικίνδυνες ενώσεις τόσο για το περιβάλλον όσο και για τους ζωντανούς οργανισμούς (Εικόνα 3). Συναφή με τη βιοαποικοδόμηση είναι η βιοαποκατάσταση (bioremediation) η οποία περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τη φυτοεξυγνίαση (phytoremediation) όπου τα φυτά χρησιμοποιούνται για το καθαρισμό του αέρα, του εδάφους και του νερού, το βιοαερισμό (bioventing) όπου οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνται για να βιοαποικοδομήσουν ρύπους που υπάρχουν στο έδαφος ενώ με τη χρήση βιοαντιδραστήρων (bioreactors) μικροοργανισμοί σε κλειστό σύστημα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη ελεγχόμενη βιοαποικοδόμηση ρύπων. Η αποικοδόμηση τοξικών ενώσεων με τη χρήση μικροοργανισμών γίνεται όλο και πιο προσιτή στην επιστημονική κοινότητα αφού πρόκειται για μία διεργασία φθηνή και ταυτόχρονα φιλική προς το περιβάλλον.

1.4 Βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων

Οι μικροοργανισμοί που μπορούν να βιοαποικοδομήσουν τις φαινολικές ενώσεις είναι τα βακτήρια (Sinha, et al., 2009; Chowdhury, et al., 2008; Jha, et al., 2011; Raeid, 2011), οι μύκητες (Hammel, 1996; Bennett, et al., 2002) καθώς και τα μικροφύκη (Sivasubramanian, et al., 2010; Petroutsos, et al., 2008; Papazi and Kotzabasis, 2007). Πρόσφατες έρευνες στη βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένου και μονοχλωροφαινολών και διχλωροφαινολών, από το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus* έδειξαν ότι η βιοαποικοδόμηση είναι καθαρά μία βιοενεργητική διαδικασία (Papazi and Kotzabasis, 2007; Papazi and Kotzabasis, 2008; Papazi and Kotzabasis, 2013). Δηλαδή μια διαδικασία όπου συνδέεται άμεσα με το ενεργειακό ισοζύγιο του μικροφύκου. Το μικροφύκος ανάλογα με τα ενεργειακά του αποθέματα επιλέγει και το καταλληλότερο μονοπάτι βιοαποικοδόμησης (Papazi and Kotzabasis, 2013).

Το ενεργειακό ισοζύγιο άρα και η βιοαποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων καθορίζεται όπως διαπιστώθηκε από πολλούς παράγοντες. Η θέση του υποκαταστάτη (*ortho-*, *meta-*, *para-*), η συμπεριφορά του ως δότη ή δέκτη ηλεκτρονίων καθώς και ο αριθμός των υποκαταστατών στο φαινολικό δακτύλιο είναι από τους πιο σημαντικούς. Όσο αφορά τη θέση του υποκαταστάτη βρέθηκε ότι η *meta-* θέση του φαινολικού δακτυλίου είναι πιο ενεργοβόρα από τις θέσεις *ortho-* και *para-* (Papazi and Kotzabasis, 2007). Έτσι ο δεσμός μεταξύ άνθρακα και υποκαταστάτη στη *meta-* θέση χρειάζεται περισσότερη ενέργεια για να διασπαστεί και να βιοαποικοδομηθεί έτσι και η ένωση. Παράλληλα, επειδή η βιοαποικοδόμηση είναι μια οξειδοαναγωγική αντίδραση το είδος του υποκαταστάτη, που καθορίζεται κυρίως από τα φαινόμενα συντονισμού και επαγωγής, κατέχει εξίσου σημαντικό ρόλο. Όσο πιο κοντά βρίσκεται ένας υποκαταστάτης δέκτης ή δότης ηλεκτρονίων στο υποκαταστάτη δότη ηλεκτρονίων (υδροξυλομάδα) αντίστοιχα τόσο πιο έντονη ή πιο δύσκολη θα είναι η βιοαποικοδόμηση (Papazi and Kotzabasis, 2008). Η δυσκολία της βιοαποικοδόμησης επιτυγχάνεται και με τη αύξηση του αριθμού των υποκαταστατών ιδιαίτερα όταν αυτοί καταλαμβάνουν τη *meta-* θέση (Papazi and Kotzabasis, 2013).

Τα ενεργειακά αποθέματα του μικροφύκου που θα επενδυθούν στη βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων καθορίζονται από τη εξωγενή πηγή άνθρακα (ανόργανου ή οργανικού) και την ένταση της φωτονιακής ακτινοβολίας η οποία μέσω της φωτοσυνθετικής διαδικασίας θα μετατραπεί σε εκμεταλλεύσιμη ενέργεια (Papazi and Kotzabasis, 2007). Συγκεκριμένα, στη παραγωγή ενέργειας εμπλέκονται τα μονοπάτια της κυκλικής και μη κυκλικής φωτοφωσφορυλίωσης στο χλωροπλάστη, η αναπνευστική αλυσίδα του κυτοχρωμικού (COX) και εναλλακτικού (AOX) μονοπατιού στο μιτοχόνδριο και της χλωραναπνοής στο χλωροπλάστη (Papazi, et al., 2012).

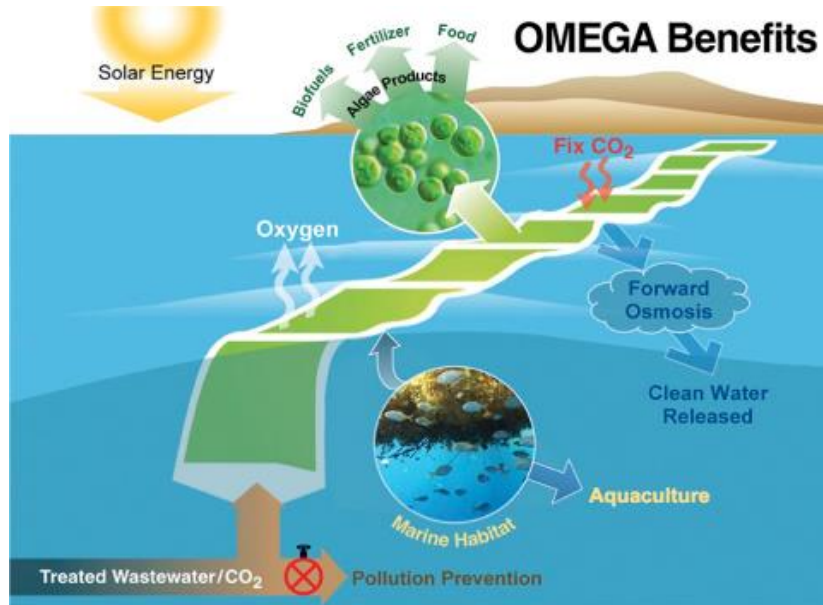
1.5 Βιοαποικοδόμηση και μικροφύκη

Τα βακτήρια και οι μύκητες συμπεριλαμβάνονται σε μία πληθώρα ερευνών που αφορούν τη απομάκρυνση τοξικών ενώσεων από το περιβάλλον. Τα μικροφύκη είχαν προταθεί από πολύ νωρίς στη επιστημονική κοινότητα για τη συμβολή τους στη απομάκρυνση ρυπαντών από τα λύματα (Oswald and Gottas, 1957). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια άρχισαν να αποκτούν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και να συμπεριλαμβάνονται όλο και περισσότερο σε σχετικές έρευνες. Κάποια πλεονεκτήματα από τη χρήση μικροφύκων είναι τα εξής:

- Σε σύγκριση με τα βακτήρια που είναι ετερότροφοι οργανισμοί, και χρειάζονται οργανική ύλη για να αναπτυχθούν και να βιοαποικοδομήσουν τις τοξικές ενώσεις, τα φύκη είναι μικτότροφοι οργανισμοί. Αυτό σημαίνει ότι συμπεριφέρονται ως αυτότροφοι οργανισμοί, δεσμεύοντας ανόργανο άνθρακα από το ατμοσφαιρικό CO₂, μετατρέποντας τον φωτοσυνθετικά σε οργανική ύλη, εμπλουτίζοντας με αυτό το τρόπο το ενεργειακό ισοζύγιο του κυττάρου. Αυτό φυσικά δεν τους εμποδίζει να δεσμεύουν άνθρακα και ενέργεια απευθείας από οργανικά μόρια (Voloshin, et al., 2016).
- Όπως και τα φυτά έτσι και τα μικροφύκη μπορούν να φωτοσυνθέτουν και κατά συνέπεια να αξιοποιούν τη απεριόριστη φωτονιακή ενέργεια. Σε αντίθεση όμως με τα φυτά, τα φύκη μπορούν και αναπτύσσονται σε αντίξοες για τα φυτά περιβαλλοντικές συνθήκες, απαιτούν λιγότερο νερό και μετατρέπουν πιο αποτελεσματικά τη φωτονιακή ενέργεια σε χημική (Li, et al., 2008).
- Αναπτύσσονται γρήγορα, είναι εύκολα στο χειρισμό, με χαμηλό κόστος παραγωγής και διατήρησης.

Επιπρόσθετα:

- Χρησιμοποιούν ανόργανο άζωτο και φώσφορο για τη ανάπτυξη τους. Άρα μπορούν να δεσμεύουν ιόντα αμμωνίου NH₄⁺, νιτρικά ανιόντα NO₃⁻, και φωσφορικά ανιόντα PO₄⁻ από το περιβάλλον και μπορούν έτσι να συμβάλλουν στο καθαρισμό των λυμάτων (Hammouda, et al., 2012) (Εικόνα 4).
- Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη παραγωγή εναλλακτικών πηγών ενέργειας. Έχουν τη ικανότητα να παράγουν H₂ (Parazi, et al., 2012) ενώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν παράλληλα με τη βιοαποικοδόμηση και για τη παραγωγή βιοκαυσίμων (Voloshin, et al., 2016; Li, et al., 2008).
- Μπορούν να παράξουν λιπίδια, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες σε μεγάλες ποσότητες τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη παραγωγή χρήσιμων προϊόντων.



Εικόνα 4. Καλλιέργεια μικροφύκων σε βιοαντηδραστικές για το καθαρισμό των λυμάτων, τη παραγωγή βιοκαυσίμων, λιπασμάτων, ζωοτροφών ή άλλων προϊόντων (OMEGA Project 2009-2012,NASA)

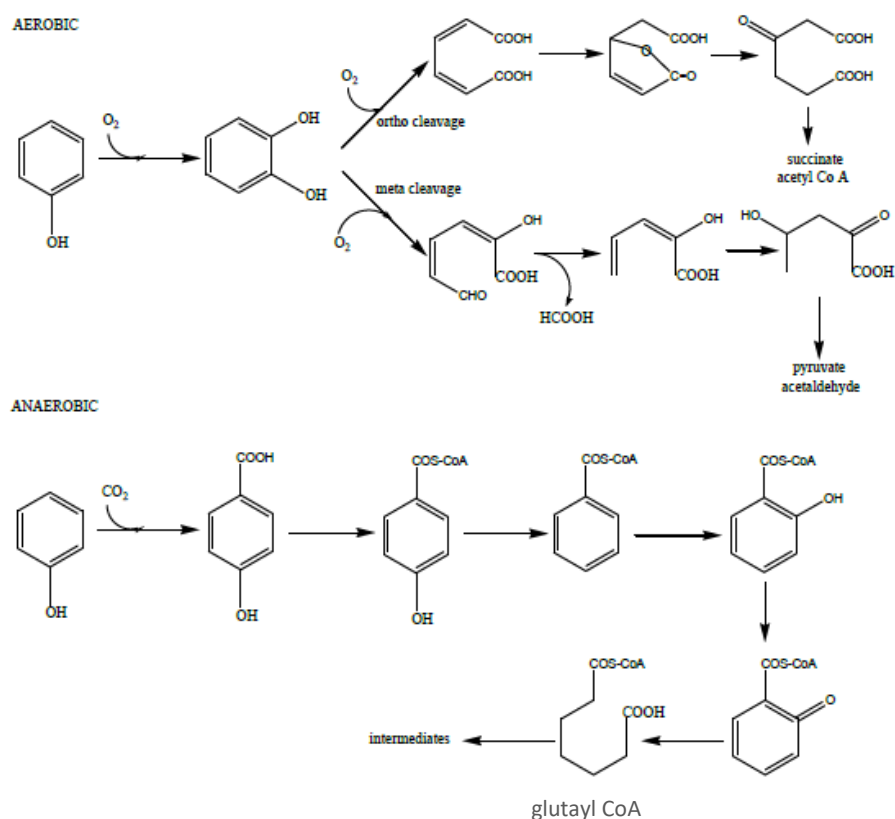
1.6 Βιοχημικά μονοπάτια αποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων

Οι φαινολικές ενώσεις χαρακτηρίζονται από υψηλή σταθερότητα και ανθεκτικότητα στη αποικοδόμηση, λόγω της δυσκολίας διάσπασης του βενζολικού δακτυλίου. Παρόλα αυτά όπως προαναφέρθηκε, υπάρχουν αρκετοί μικροοργανισμοί που μπορούν να τις αποικοδομήσουν και να τις χρησιμοποιήσουν ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Η βιοαποικοδόμηση πραγματοποιείται αρχικά με τη απόσπαση των υποκαταστατών που υπάρχουν στο φαινολικό δακτύλιο και στη συνέχεια με τη σχάση του βενζολικού δακτυλίου από ένζυμα που υπάρχουν στους μικροοργανισμούς. Πολλοί από τους μικροοργανισμούς (κυρίως βακτήρια) έχουν απομονωθεί, έχουν μελετηθεί ως προς τη αποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων με αποτέλεσμα να είναι πλέον γνωστοί οι μηχανισμοί καθώς και τα ένζυμα που εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή. Να σημειωθεί ότι ανάλογα με το μικροοργανισμό και τη ικανότητα του να αναπτύσσεται σε συγκεκριμένες συνθήκες η βιοαποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων μπορεί να γίνει είτε αναερόβια είτε αερόβια. Παρακάτω αναφέρονται τα βιοχημικά μονοπάτια αποικοδόμησης της φαινόλης και των χλωροφαινολών στα βακτήρια.

1.6.1 Αποικοδόμηση φαινόλης

Το αερόβιο μονοπάτι αποικοδόμησης της φαινόλης (Εικόνα 5) ξεκινάει με την προσθήκη ενός δεύτερου OH στη *ortho*- θέση του φαινολικού δακτυλίου ως προς το ήδη προϋπάρχον υδροξύλιο. Η προσθήκη αυτή επιτυγχάνεται με το ένζυμο υδροξυλάση της φαινόλης, όπου ένα μοριακό οξυγόνο από το ένζυμο χρησιμοποιείται προκειμένου να σχηματιστεί το υδροξύλιο. Η σχηματιζόμενη κατεχόλη (1,2 διυδροξυβενζόλιο) μπορεί έπειτα να αποικοδομηθεί, είτε με το *ortho*- είτε με το *para*- μονοπάτι. Στο *ortho*- μονοπάτι γίνεται σχάση του αρωματικού δακτυλίου ανάμεσα στα δύο υδροξύλια από το ένζυμο 1,2-διοξυγενάση προς παραγωγή *cis,cis* μουκονικού οξέος. Στο *meta*- μονοπάτι η σχάση του αρωματικού δακτυλίου γίνεται από το ένζυμο 2,3 διοξυγενάση στο δεσμό πριν η μετά από τα δύο υδροξύλια, όπου παράγεται μία ημιαλδεύδη. Τα προϊόντα από τα δύο μονοπάτια θα μεταβολιστούν περαιτέρω μέσω του κύκλου του Krebs.

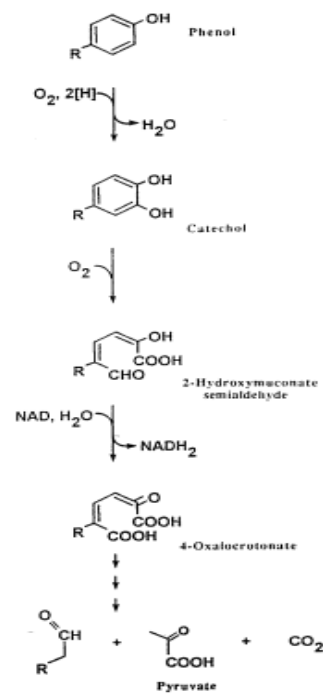
Όσον αφορά το αναερόβιο μονοπάτι αποικοδόμησης, η φαινόλη αρχικά καρβοξυλιώνεται στη *para*- θέση του φαινολικού δακτυλίου από το ένζυμο 4-υδροξυβενζοϊκή καρβοξυλάση και παράγεται έτσι το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ. Ακολουθεί μία σειρά αντιδράσεων (Εικόνα 5) με εμπλοκή διαφόρων ενζύμων όπου τελικά παράγεται το glutaryl CoA, το οποίο μπορεί να μεταβολιστεί περαιτέρω δίνοντας μεταξύ άλλων και ακέτυλο CoA (Sridevi, et al., 2012; Nair, et al., 2008).



Εικόνα 5. Βιοχημικά μονοπάτια αερόβιας και αναερόβιας αποικοδόμησης της φαινόλης σε βακτήρια (Field et al., 1995)

Όσο αφορά τα μικροφύκη, έχει βρεθεί μόνο το αερόβιο μονοπάτι βιοαποικοδόμησης της φαινόλης από το φύκος *Orchomonas danica*. Το φύκος διασπά τη φαινόλη χρησιμοποιώντας το *meta*- μονοπάτι (Εικόνα 6).

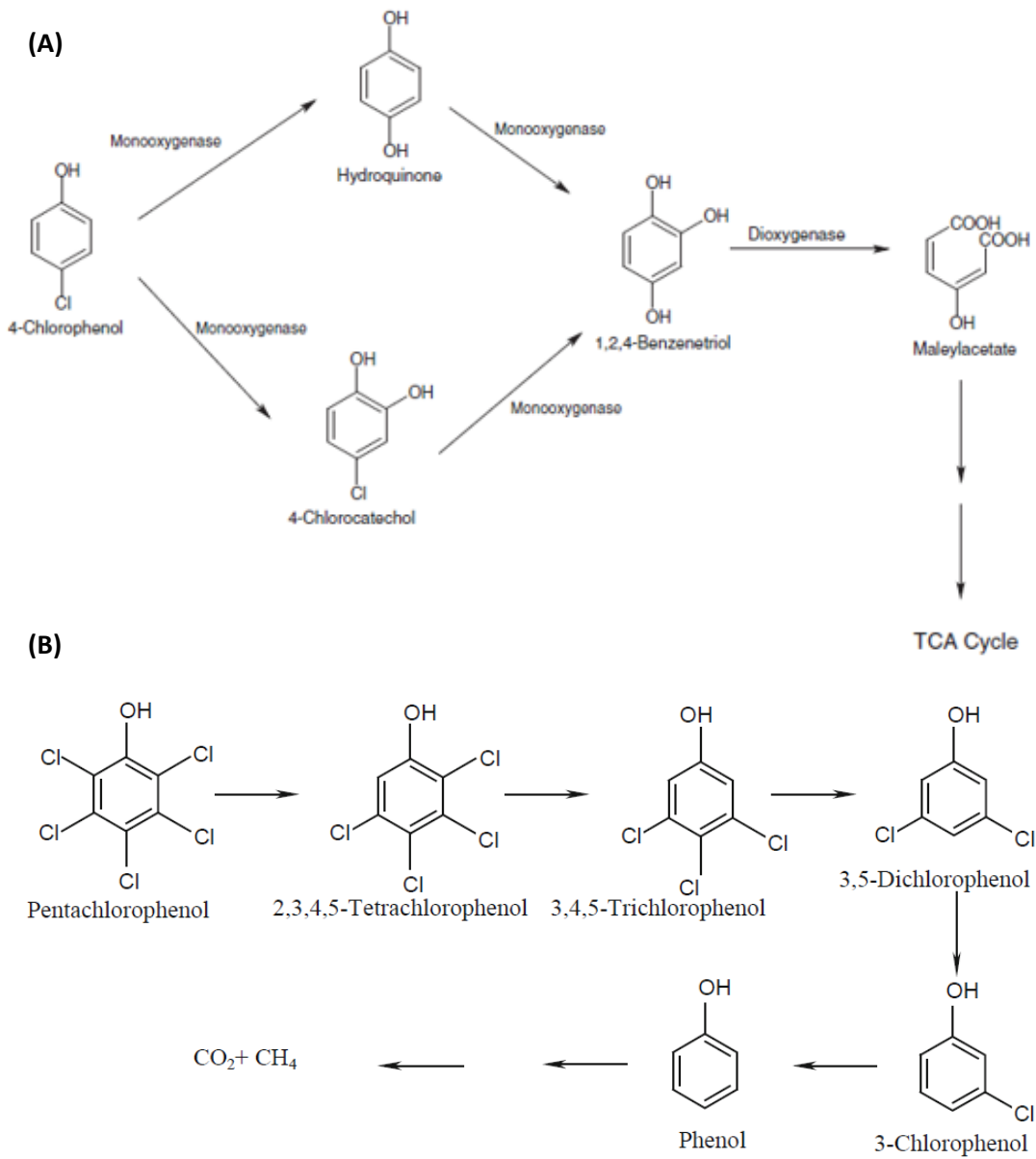
Τα βασικά ένζυμα που παίρνουν μέρος σε αυτή τη διαδικασία είναι η μονοξυγενάση της φαινόλης, η οποία εισάγει μία ομάδα υδροξυλίου σχηματίζοντας κατεχόλη, με την παρουσία οξυγόνου. Έπειτα η 2,3-διοξυγενάση της κατεχόλης χρησιμοποιεί O₂ για να διανοίξει τον δακτύλιο. Ακολούθως η αφυδρογονάση της ημιαλδεύδης χρησιμοποιεί NAD⁺ ως συμπαραγοντα για να παράγει 4-oxalocrotonate, όπου στη συνέχεια με μια σειρά αντιδράσεων καταλήγει στο πυροσταφυλικό. Αυτό με τη σειρά του θα καταλήξει στο κύκλο του Krebs (Semples and Cain, 1996).



Εικόνα 6. Μεταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησης της φαινόλης από το φύκος *Orchomonas danica*.

1.6.2 Αποικοδόμηση χλωροφαινολών

Η αερόβια αποικοδόμηση των χλωροφαινολών περιλαμβάνει δύο μονοπάτια, όπου τα αρχικά ενδιάμεσα είναι, είτε χλωροκατεχόλες, είτε χλωρουδροκινόνες (Εικόνα 7). Στο πρώτο μονοπάτι γίνεται προσθήκη ενός δεύτερου υδροξυλίου από μια μονοξυγενάση στη *ortho*-θέση, ως προς το ήδη προϋπάρχον υδροξύλιο της χλωροφαινόλης, με αποτέλεσμα να παράγεται μια χλωροκατεχόλη. Αυτή μπορεί να αποικοδομηθεί είτε με *ortho*- ή *meta*-σχάση του αρωματικού δακτυλίου, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί απομάκρυνση του χλωρίου από το αρωματικό δακτύλιο. Στο δεύτερο μονοπάτι το ένζυμο μονοοξυγενάση καταλύει τη προσθήκη του υδροξυλίου αυτή τη φορά στη *para*-θέση με αποτέλεσμα να προκύπτει μια χλωρουδροκινόνη. Αυτή μπορεί να αποικοδομηθεί περαιτέρω μέσω υδροξυλίωσης ή αφαιρώνωσης πριν γίνει η σχάση του αρωματικού δακτυλίου. Στη αναερόβια αποικοδόμηση η χλωριωμένη φαινολική ένωση υπόκειται σε αναγωγική αφαιρώνωση, όπου τα άτομα χλωρίου αντικαθίστανται σταδιακά από άτομα υδρογόνου. Έτσι προκύπτει μία ένωση λιγότερο τοξική που αποικοδομείται ευκολότερα στη συνέχεια. Για παράδειγμα η πενταχλωροφαινόλη αναγωγικά μπορεί να αφαιρωνηθεί σε 2,3,4,5-τετραχλωροφαινόλη (2,3,4,5-teCP), ακολούθως σε 3,4,5-τριχλωροφαινόλη (3,4,5-trCP), 3, 5-διχλωροφαινόλη (3,5-dCP), 3 μονοχλωροφαινόλη (3-mCP) και τελικά σε φαινόλη η οποία αποικοδομείται περαιτέρω σε CO₂ και CH₄ υπό συνθήκες έλλειψης σιδήρου ή θείου (Εικόνα 7) (Arora and Bae, 2014).



Εικόνα 7. Βιοχημικά μονοπάτια (A) αερόβιας και (B) αναερόβιας βιοαποικοδόμησης χλωροφαινολών στα βακτήρια (Arora and Bae, 2015)

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της βιοαποικοδόμησης όλων των χλωριωμένων φαινολικών ενώσεων (2-mCP, 3-mCP, 4-mCP, 2,3-dCP, 2,4-dCP, 2,5-dCP, 2,6-dCP, 3,4-dCP, 3,5-dCP, 2,3,4-trCP, 2,3,5-trCP, 2,3,6-trCP, 2,4,5-trCP, 2,4,6-trCP, 3,4,5-trCP, 2,3,4,5-teCP, 2,3,5,6-teCP, 2,3,4,6-teCP, pCP) από το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus*. Αποσκοπούμε στη αποκωδικοποίηση της βιοενεργητικής στρατηγικής του μικροφύκου στην αντιμετώπιση της τοξικότητας των εν λόγω φαινολικών ενώσεων και της βιοαποικοδόμησης τους στα πλαίσια της διαχείρισης των ενεργειακών αποθεμάτων του μικροφύκου, που καθορίζονται τόσο από τη φωτοσυνθετική διαδικασία, όσο και από τη εξωγενή προσθήκη οργανικού άνθρακα. Απώτερος σκοπός αυτής της μελέτης είναι η μελλοντική χρήση μικροφύκων για τη βιοαποικοδόμηση τοξικών αποβλήτων στα πλαίσια μιας «έξυπνης» βιοτεχνολογικής προσέγγισης.

2.Υλικά και Μεθόδοι

2.1 Οργανισμός

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* (Εικόνα 8). Η φυλογενετική του ταξινόμηση είναι η εξής:

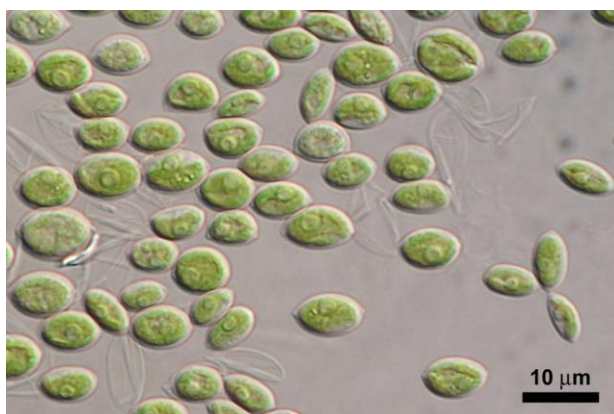
Βασίλειο: Φυτά

Διαίρεση: Χλωρόφυτα

Τάξη: Χλωροφύκη

Γένος: Chlorococcales

Είδος: *Scenedesmus obliquus*



Εικόνα 8: Κύτταρα *Scenedesmus obliquus*

Ο οργανισμός αυτός είναι μονοκύτταρος ευκαρυωτικός, με ελλειψοειδή κύτταρα, μήκους περίπου 5-10 μm . Ο κύκλος ζωής του διαρκεί γύρω στις 20 ώρες. Στη διάρκεια αυτή, διαιρείται μία φορά δίνοντας 4-8 θυγατρικά κύτταρα, τα οποία μόλις σχηματιστούν πλήρως, συνήθως αποκόπτονται μεταξύ τους (δεν σχηματίζουν κοινόβια). Εξελικτικά βρίσκεται πολύ κοντά στα άλλα δύο γνωστά στο ερευνητικό πεδίο μικροφύκη τη Χλαμυδομονάδα (*Chlamydomonas*) και τη Χλωρέλλα (*Chlorella*).

Πρόκειται για φωτοσυνθετικό μικροοργανισμό, που παράγει οξυγόνο κατά τη φωτοσυνθετική του διαδικασία του. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά της φωτοσυνθετικής του δραστηριότητας μοιάζει με τα γυμνόσπερμα φυτά. Ο άγριος τύπος (wt) έχει την ικανότητα βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης και στο σκοτάδι, όπως και στο φως. Δηλαδή, ακόμα και σε ετερότροφες συνθήκες έχει διαμορφωμένους χλωροπλάστες και ενεργά φωτοσυστήματα I και II (εφ' όσον του παρέχεται κάποια πηγή οργανικού άνθρακα στο θρεπτικό μέσο).

2.2 Συνθήκες ανάπτυξης

Η ανάπτυξη του χλωροφύκου έγινε σε υγρό μέσο καλλιέργειας Bishop and Senger (1971) (Πίνακας 1) μέσα σε επίμηκες γυάλινους σωλήνες (διαμέτρου 5 cm), με ειδικό στόμιο στο κάτω μέρος που επιτρέπει τον συνεχή αερισμό της καλλιέργειας. Οι εν λόγω σωλήνες τοποθετήθηκαν σε ενυδρείο σταθερής θερμοκρασίας 30 °C, μπροστά από λάμπες λευκού φωτισμού, με σταθερή ένταση φωτισμού ($150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) και με συνεχή τροφοδότηση

αέρα για προμήθεια CO₂ και αποφυγή καθίζησης (Εικόνα 9). Οι καλλιέργειες παρέμειναν σε αυτές τις συνθήκες για 4 ημέρες. Έπειτα ανακαλλιιεργήθηκαν στις ίδιες συνθήκες προσθέτοντας στο θρεπτικό μέσο γλυκόζη (5g/L, μικτότροφη ανάπτυξη) και χρησιμοποιήθηκαν ως μητρικές καλλιέργειες για τη διεξαγωγή του πειράματος.

Μικρές ποσότητες όγκου (50 mL) από τις μητρικές καλλιέργειες, μεταφέρθηκαν σε ερμητικά κλειστά μπουκάλια με septa των 100 mL. Κάποια από αυτά χρησίμευσαν ως μάρτυρες-control, ενώ στα υπόλοιπα έγινε προσθήκη της φαινολικής ένωσης. Επειδή οι φαινολικές ενώσεις προστίθονται διαλυμένες σε μεθανόλη η αντίστοιχη ποσότητα μεθανόλης προστέθηκε επίσης και στα μπουκαλάκια του control. Η τελική συγκέντρωση της κάθε ένωσης στο μπουκάλι ήταν 0,15 mM ενώ η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων ήταν 1,5 μL PCV/mL καλλιέργειας (Packed Cell Volume-όγκος πακεταρισμένων κυττάρων).

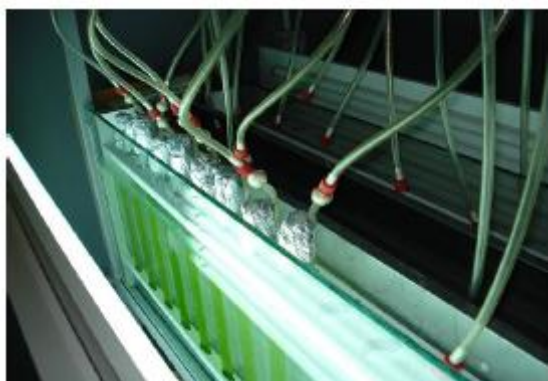
Τα μπουκάλια επώαστηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (30°C) και έντασης φωτός 50-60 μmol.m⁻².s⁻¹ για 5 ημέρες (Εικόνα 10). Η δειγματοληψία γινόταν κάθε μέρα και διά μέσου του septa χωρίς να ανοιχθούν τα μπουκάλια, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένες βελόνες.

Να σημειωθεί ότι η παραπάνω διαδικασία (προετοιμασία μητρικής καλλιέργειας και δειγματοληψία) επαναλήφθηκε για κάθε κατηγορία χλωροφαινολών (μονοχλωροφαινόλες-mCP, διχλωροφαινόλες-dCPs, τριχλωροφαινόλες-trCPs, τετραχλωροφαινόλες- teCPs, πενταχλωροφαινόλη-pCP) με τη κάθε χλωροφαινόλη κάθε κατηγορίας να προστίθεται σε ξεχωριστά μπουκαλάκια (3-4 επαναλήψεις), όπου θα γινόνταν στη συνέχεια η δειγματοληψία.

Συνολικά 20 φαινολικές ενώσεις ,19 χλωροφαινόλες και η φαινόλη, χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση τους στο μικροφύκος κατά το χρονικό διάστημα των 5 ημερών.

Οι 19 χλωροφαινόλες που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται συνοπτικά ανά κατηγορία παρακάτω.

- Μονοχλωροφαινόλες (mCPs): 2-mCP, 3-mCP, 4-mCP
- Διχλωροφαινόλες (dCPs): 2,4-dCP, 2,5-dCP, 2,6-dCP, 2,3-dCP, 3,4-dCP, 3,5-dCP
- Τριχλωροφαινόλες (trCPs): 2,3,4-trCP, 2,3,5-trCP, 2,3,6-trCP, 2,4,5-trCP, 2,4,6-trCP, 3,4,5-trCP
- Τετραχλωροφαινόλες (teCPs): 2,3,4,5-teCP, 2,3,5,6-teCP, 2,3,4,6-teCP
- Πενταχλωροφαινόλη (pCP)



Εικόνα 9. Σύστημα αυτότροφης καλλιέργειας του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*



Εικόνα 10. Μικτότροφες καλλιέργειες του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* σε κλειστά μπουκαλάκια των 100mL.

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

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (σε g/L)
CaCl₂ x 2H₂O	1,50
KNO₃	80,0
MgSO₄ x 7H₂O	24,6
NaCl	47,0
Na₂HPO₄ x 2H₂O	17,8
NaH₂PO₄ x 1H₂O	40,5
FeSO₄ x 1H₂O	0,06
Fe(III)citrate	0,24
H₃BO₃	2,86
MnCl₂ x 4H₂O	1,81
ZnSO₄ x 7H₂O	0,222
CuSO₄ x 5H₂O	0,079
MoO₃ (85%-99.5%)	0,0177

2.3 Υπολογισμός του κυτταρικού όγκου μιας καλλιέργειας

Δείγματα των 2 mL από τις καλλιέργειες των μικροφυκών φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 1500g προκειμένου να καθιζήσουν σε βαθμονομημένο τριχοειδή υαλοσωλήνα (Logothetis, et al., 2004) (Εικόνα 11). Η εκτίμηση της κυτταρικής συγκέντρωσης παρουσιάζεται ως όγκος καθιζαμένων κυττάρων (Packed Cell Volume; PCV) ανά mL καλλιέργειας ($\mu\text{L PCV}/\text{mL}$ καλλιέργειας).

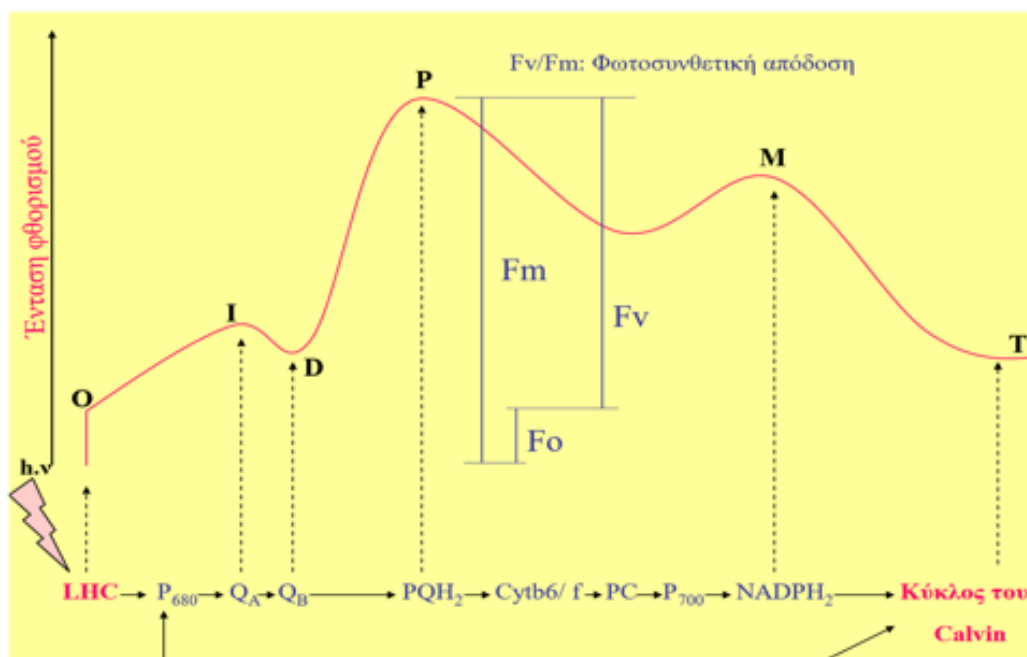


Εικόνα 11. Διαβαθμισμένοι υαλοσωλήνες για τη μέτρηση PCV

2.4 Επαγωγικός φθορισμός - καταγραφή της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού

Η ενέργεια που δεσμεύεται από τις φωτοσυλλεκτικές κεραίες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού μπορεί να αποσβεστεί είτε φωτοχημικά, να μετατραπεί δηλαδή σε εκμεταλλεύσιμη χημική ενέργεια (ATP) μέσω της φωτοσύνθεσης, είτε μη-φωτοχημικά, να διαχυθεί με τη μορφή θερμότητας ή φθορισμού. Οι δύο αυτές διαδικασίες ενεργειακής απόσβεσης λειτουργούν συμπληρωματικά. Όταν η φωτοχημική απόδοση της φωτοσύνθεσης είναι υψηλή τότε η μη φωτοχημική απόσβεση της ενέργειας είναι χαμηλή και αντίστροφα.

Ο φθορισμός αυξάνεται όταν η φωτοχημική απόδοση της φωτοσύνθεσης παρεμποδίζεται για οποιοδήποτε λόγο, για παράδειγμα όταν δεν υπάρχει διαθέσιμος οξειδωμένος δέκτης ηλεκτρονίων σε κάποιο σημείο στην πορεία της ηλεκτρονιακής μεταφοράς. Όταν ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός μετά από την προσαρμογή του στο σκοτάδι, δεχθεί παλμό κορεσμένης φωτεινής ακτινοβολίας, τότε ο φθορισμός του αυξάνεται από το αρχικό του επίπεδο (F_0) σε ένα μέγιστο επίπεδο (F_m) και στη συνέχεια μειώνεται βαθμιαία μέχρι ένα σταθερό επίπεδο (F_S) (Εικόνα 12). Από τη καμπύλη του επαγωγικού φθορισμού μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες για τη μοριακή δομή, την λειτουργία αλλά και την απόδοση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σύμφωνα με τους Strasser and Strasser (1995).



Εικόνα 12. Τυπική καμπύλη επαγωγικού φθορισμού σε συσχέτιση με τη φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων.

Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού έγιναν με τη βοήθεια της φορητής συσκευής Plant Efficiency Analyser (Handy PEA Hansatech Instruments) (Εικόνα 13). Για τη επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το εξειδικευμένο λογισμικό εφαρμογής του JIP-test (BioLyzer HP 4.0), σύμφωνα με τη μέθοδο των Strasser and Strasser (1995). Η μέθοδος βασίζεται σε μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού με ανάλυση 10 μs σε χρονικό διάστημα 1 δευτερολέπτου.

Ο φθορισμός μετρήθηκε με 12-bit ανάλυση και η διέγερση έγινε από 3 διόδους φωτισμού (LEDs) με ένταση ακτινοβολίας $3000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ερυθρού φωτός (650nm).

Όλες οι μετρήσεις έγιναν απευθείας στα κλειστά μπουκαλάκια των επιμέρους χειρισμών, όπου προτού διεγερθούν είχαν παραμείνει στο σκοτάδι για 10 min, προκειμένου να «αδειάσουν» τα φωτοσυνθετικά κέντρα αντίδρασης από ηλεκτρόνια. Από τις μετρήσεις υπολογίστηκε ο λόγος F_v/F_m , που συνδέεται άμεσα με τη φωτοσυνθετική απόδοση. Επίσης, με εφαρμογή του JIP-TEST υπολογίστηκαν μια σειρά από παράμετροι (πίνακας 2). Ο λόγος ABS/RC , που αντιπροσωπεύει το μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PSII, ο λόγος DI_0/RC , που αντιπροσωπεύει την ενέργεια που χάνεται με τη μορφή θερμότητας και ο λόγος RC/CS_0 , που συνδέεται με την πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης του PSII, είναι από τις πιο σημαντικές παραμέτρους.



Εικόνα 13. Συσκευή Handy PEA για τις μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού

Πίνακας 2. Βασικές παραμέτροι JIP-TEST

Μεταβλητή OJIP καμπύλης	Ορισμός
F_t	Τιμή φθορισμού σε χρόνο t μετά την ακτινοβολήση
$F_{50\mu s}$	Ένταση φθορισμού στα 50 μs
$F_{300\mu s}$	Ένταση φθορισμού στα 300 μs
$F_J = F_{2ms}$	Ένταση φθορισμού στο βήμα J (2 ms) της καμπύλης OJIP
$F_I = F_{30ms}$	Ένταση φθορισμού στο βήμα I (30 ms) της καμπύλης OJIP FP (= F_m)
$F_p(=F_m)$	Μέγιστη ένταση φθορισμού στο P της καμπύλης OJIP
t_{F_m}	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_o	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» (closed PSII RCs, $t = t_{F_m}$)
F_v	Μεταβλητή τιμή φθορισμού τη χρονική στιγμή t
$F_v = F_m - F_o$	Μέγιστη τιμή μεταβλητής τιμής φθορισμού
$V_t = (F_t - F_o)(F_m - F_o)$	Σχετική μεταβολή φθορισμού τη χρονική στιγμή t
$V_J = (F_J - F_o)(F_m - F_o)$	Σχετική μεταβολή φθορισμού στο βήμα J
$M_o = (\Delta V / \Delta t)_o = 4(F_{300\mu s} - F_o) / (F_m - F_o)$	Αρχική κλίση σε ms της καμπύλης $V = f(t)$
$S_m = (Area) / (F_m - F_o)$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης OJIP (Area), ομαλοποιούμενο ως προς F_v (αποτελεί μέτρο του αριθμού των οξειδοαναγωγικών κύκλων της Q_A)
$S_s = V_J / M_o$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης OJIP που αντιστοιχεί μόνο στην OJ φάση (διάστημα όπου η Q_A των RC ανάγεται μία φορά)
$N = S_m / S_s = S_m M_o (1 / V_J)$	Μέτρο αριθμού κύκλων αναγωγής της Q_A στο διάστημα t_{F_m}
Ειδικές ροές ενέργειας (ανά κέντρο που ανάγει Q_A)	
$ABS/RC = M_o (1/V_J)(1/\Phi P_o)$	Μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας
$TR_o/RC = M_o (1/V_J)$	Ενέργεια που παγιδεύεται ανά κέντρο αντίδρασης (για $t = 0$)
$ET_o/RC = M_o (1/V_J)\Psi_o$	Ροή ηλεκτρονίων ανά κέντρο αντίδρασης (για $t = 0$)
$DI_o/RC = (ABS/RC) - (TR_o/RC)$	Διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης (για $t = 0$)

Αποδόσεις ή λόγοι επιμέρους ροών	
$\Phi P_o = TR_o/ABS = [1-(F_o/F_m)]$	Μέγιστη κβαντική απόδοση της πρωτογενούς φωτοχημείας (για $t = 0$)
$\Psi_o = ET_o/TR_o = 1 - V_J$	Πιθανότητα να προκαλέσει μια διέγερση (exciton) τη μετακίνηση ενός ηλεκτρονίου κατά μήκος της αλυσίδας πέρα από την QA- (για $t = 0$)
$\Phi E_o = ET_o/ABS = [1-(F_o/F_m)]\Psi_o$	Κβαντική απόδοση της μεταφοράς ηλεκτρονίων (για $t = 0$)
$\Phi D_o = 1 - \Phi P_o = F_o/F_m$	Κβαντική απόδοση της διάχυσης ηλεκτρονίων (για $t = 0$)
Εκτιμώμενες ροές ενέργειας ανά διεγερμένη περιοχή	
ABS/CS_o	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το F_o
ABS/CS_m	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το F_m
$TR_o/CS_o = \Phi P_o(ABS/CS_o)$	Παγιδευμένη ενέργεια ανά διεγερόμενη περιοχή της μεμβράνης (για $t=0$)
$ET_o/CS_o = \Phi E_o(ABS/CS_o)$	Ροή ηλεκτρονίων ανά περιοχή διέγερσης (για $t = 0$)
$DI_o/CS_o = (ABS/CS_o) - (TR_o/CS_o)$	Διαχεόμενη ενέργεια ανά περιοχή διέγερσης (για $t = 0$)
Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης	
RC/CS_o	Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης
Δείκτες επίδοσης	
$PI_{ABS} = (RC/ABS) (\Phi P_o/1-\Phi P_o)(\Psi_o/1-\Psi_o)$	Επιδόσεις ανά απορροφώμενη ενέργεια
$PI_{CS_o} = (RC/CS_o) (\Phi P_o/1-\Phi P_o)(\Psi_o/1-\Psi_o)$	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης ($t = 0$)
$PI_{CS_m} = (RC/CS_m) (\Phi P_o/1-\Phi P_o)(\Psi_o/1-\Psi_o)$	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης ($t = t_{Fm}$)
$SFI_{abs} = (1-\Phi P_o)(1-\Psi_o)$	Δείκτης λειτουργικότητας
Ικανότητα παραγωγής έργου	
$DF_{ABS} = \log(PI_{ABS})$	Εκτιμώμενη παραγωγή έργου ανά απορροφώμενη ενέργεια

2.5 Μέτρηση περιεκτικότητας οξυγόνου (O₂) και παραγόμενου υδρογόνου (H₂) με αέρια χρωματογραφία θερμικής αγωγιμότητας (GC-TCD)

Για τη μέτρηση του παραγόμενου υδρογόνου και της περιεκτικότητας O₂ χρησιμοποιήθηκε Αέρια Χρωματογραφία Θερμικής Αγωγιμότητας (GC-TCD) (Hewlett Packard 5890 Series II), με φέρον αέριο Αργό (5bar Πίεση – 23,5 mL min⁻¹). 250 μL αέριου δείγματος από κάθε καλλιέργεια κάθε ημέρας διοχετεύονταν ,με ειδική gas type σύριγγα , στη στήλη της GC-TCD. Για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε μια τριχοειδής στήλη μήκους 30 m, διαμέτρου 0,53 mm και πάχους 20 μm (Vici Metronics MC Poulso,USA) με τη θερμοκρασία του TCD ανιχνευτή στους 170°C, του φούρνου 160°C, και του σημείου εισόδου της ένεσης στους 180°C (Chader, et al., 2009). Ο διαχωρισμός του H₂ από τα υπόλοιπα αέρια (O₂ και N₂) γινόταν 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/cmK¹⁴. Η ποσοτικοποίηση έγινε με καμπύλη αναφοράς για γνωστές ποσότητες οξυγόνου και υδρογόνου.

2.6 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση φαινολικών ενώσεων με HPLC

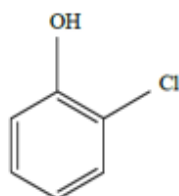
Η ποιοτική και η ποσοτική ανάλυση των φαινολικών ενώσεων έγινε με τη χρήση ενός diode array – narrow bore – HPLC συστήματος (Shimadzu, SPD-M10A, VP). Τα δείγματα καλλιέργειας από κάθε ημέρα φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στα 1500g (Heraeus SEPATECH, Biofuge 13), με σκοπό τη καθίζηση των κυττάρων. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και διοχετεύθηκε στη στήλη της HPLC. Για το διαχωρισμό των φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε μία narrow bore χρωματογραφική στήλη (Hewlett Packard, 2.1X200mm, C-18, 5 μm particle size) που αυξάνει την ευαισθησία του διαχωρισμού για επιπλέον 5-10 φορές σε σύγκριση με τις κλασικές στήλες.

Ως διαλύτης έκλυσης χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό (H₂O), μεθανόλη (CH₃OH) και οξικό οξύ (CH₃COOH) σε αναλογία όγκων 49:50:1 (v/v/v) αντίστοιχα, με σταθερή ροή 0,2 mL/min και θερμοκρασία διαχωρισμού τους 25 °C (Lovell, et al., 2002). Η ποιοτική ανάλυση έγινε βάσει του φάσματος απορρόφησης των επιμέρους μεγίστων του HPLC-προφίλ, ενώ η ποσοτική εκτίμηση έγινε με την βοήθεια γνωστών συγκεντρώσεων φαινολικών ενώσεων.

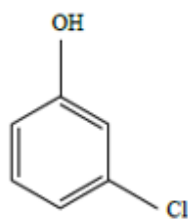
3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση των χλωροφαινολών στη ανάπτυξη, στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* κα κυρίως η ικανότητα του μικροφύκου να βιοαποικοδομεί τις ενώσεις αυτές. Οι 19 χλωροφαινόλες που χρησιμοποιήθηκαν κατατάσσονται σε 5 κατηγορίες ανάλογα με το αριθμό των υποκατεστημένων χλωρίων στο φαινολικό δακτύλιο. Αυτές είναι οι μονοχλωροφαινόλες (3), διχλωροφαινόλες (6), τριχλωροφαινόλες (6), τετραχλωροφαινόλες (3) και η πενταχλωροφαινόλη (1) (Εικόνα 14). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ανά κατηγορία χλωροφαινολών όπως ακριβώς διεξάγηκαν και τα αντίστοιχα πειράματα.

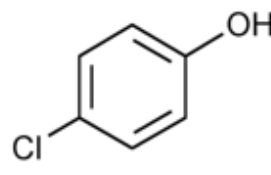
Μονοχλωροφαινόλες



2-χλωροφαινόλη
(2-mCP)

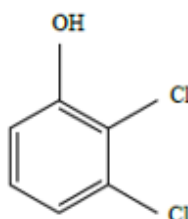


3-χλωροφαινόλη
(3-mCP)

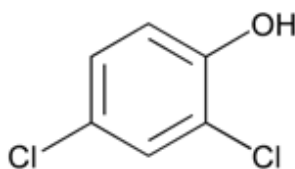


4-χλωροφαινόλη
(4-mCP)

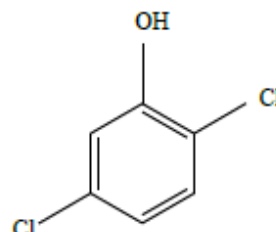
Διχλωροφαινόλες



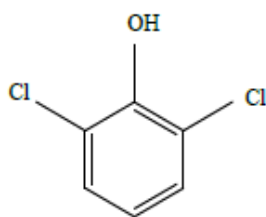
2,3-διχλωροφαινόλη
(2,3-dCP)



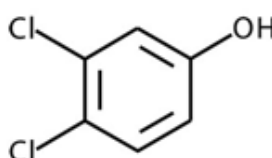
2,4-διχλωροφαινόλη
(2,4-dCP)



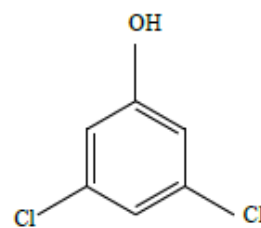
2,5-διχλωροφαινόλη
(2,5-dCP)



2,6-διχλωροφαινόλη
(2,6-dCP)

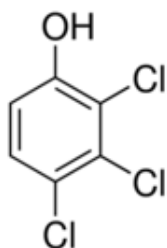


3,4-διχλωροφαινόλη
(3,4-dCP)

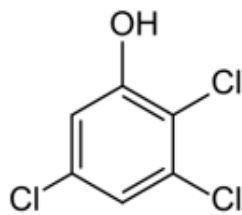


3,5-διχλωροφαινόλη
(3,5-dCP)

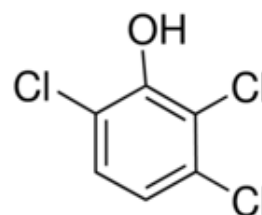
Τριχλωροφαινόλες



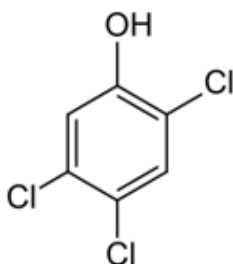
2,3,4-τριχλωροφαινόλη
(2,3,4-trCP)



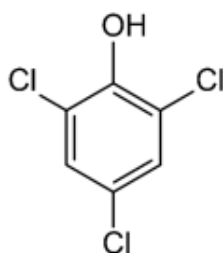
2,3,5-τριχλωροφαινόλη
(2,3,5-trCP)



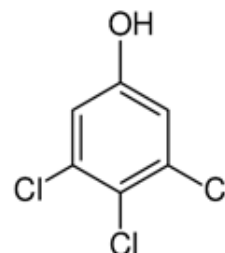
2,3,6-τριχλωροφαινόλη
(2,3,6-trCP)



2,4,5-τριχλωροφαινόλη
(2,4,5-trCP)

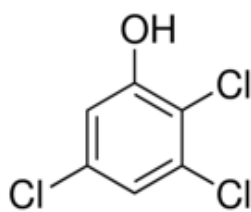


2,4,6-τριχλωροφαινόλη
(2,4,6-trCP)

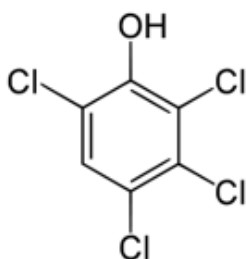


3,4,5-τριχλωροφαινόλη
(3,4,5-trCP)

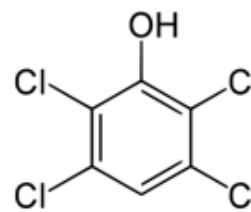
Τετραχλωροφαινόλες



2,3,4,5-τετραχλωροφαινόλη
(2,3,4,5-teCP)

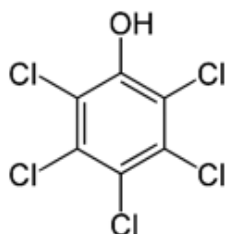


2,3,4,6-τετραχλωροφαινόλη
(2,3,4,6-teCP)



2,3,5,6-τετραχλωροφαινόλη
(2,3,5,6-teCP)

Πενταχλωροφαινόλη



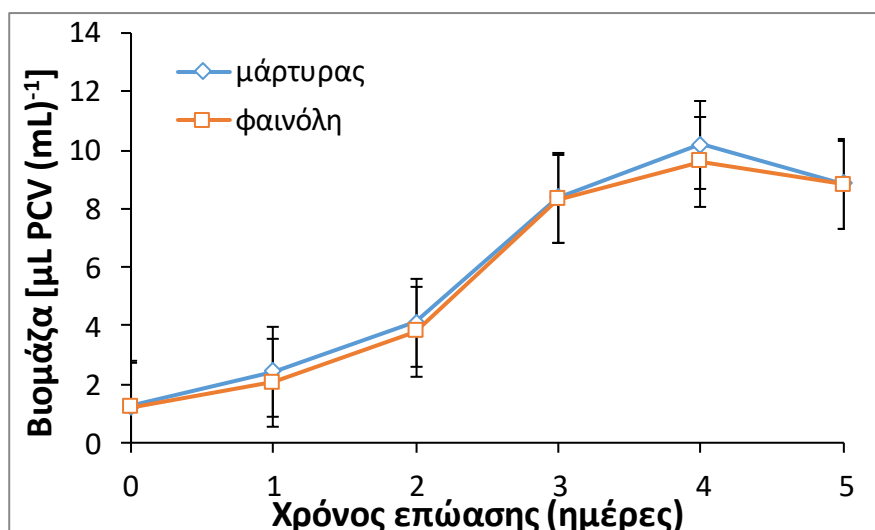
2,3,4,5,6-πενταχλωροφαινόλη
(pCP)

Εικόνα 14. Οι χλωριωμένες φαινολικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία.

3.1 Βιοαποικοδόμηση φαινόλης

Η φαινόλη είναι η πιο απλή φαινολική ένωση. Χρησιμοποιείται ως πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση άλλων πολύπλοκων αρωματικών ενώσεων. Από τη φαινόλη προκύπτουν και οι χλωροφαινόλες μέσω της ηλεκτρονιοφιλικής προσθήκης χλωρίων. Έτσι κρίθηκε αναγκαίο να εξεταστεί και η επίδραση της φαινόλης στο μικροφύκος μιας και τα αποτελέσματα από τα πειράματα αυτά θα φανούν χρήσιμα στη πορεία αυτής της εργασίας.

Από τα δεδομένα ανάπτυξης, τα οποία παρουσιάζονται στη Εικόνα 15, φαίνεται ότι η παρουσία της φαινόλης στο θρεπτικό μέσο δεν παρεμποδίζει ουσιαστικά την ανάπτυξη του μικροφύκου. Η καμπύλη ανάπτυξης φαίνεται να ακολουθεί την ίδια κινητική με αυτή του μάρτυρα και εν μέρει να συμπίπτει αφού οι τιμές είναι πολύ παραπλήσιες. Άρα η φαινόλη δεν φαίνεται να είναι ανασταλτικός παράγοντας για τη ανάπτυξη του μικροφύκου.



Εικόνα 15. Μεταβολή της βιομάζας του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* παρουσία 0,15mM φαινόλης.

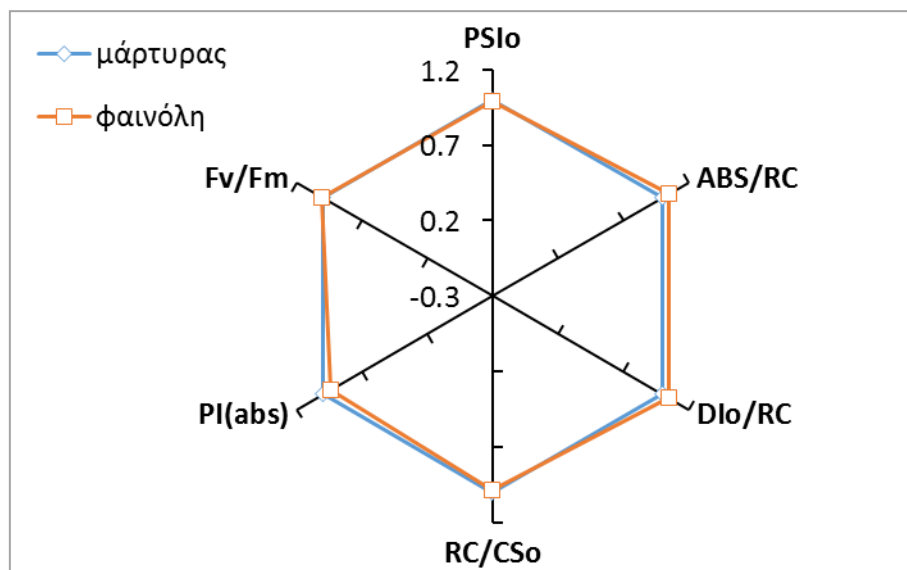
Επόμενο βήμα ήταν η καταγραφή, με την τεχνική του επαγωγικού φθορισμού (JIP-test), μια σειρά παραμέτρων που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Οι παράμετροι που υπολογίστηκαν ήταν η φωτοσυνθετική απόδοση F_v/F_m , η πυκνότητα των ενεργών φωτοσυνθετικών κέντρων RC/CS_o , το μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας ABS/RC , η μη φωτοχημική διάχυση της δεσμευθείσας ενέργειας DIo/RC , η πρωτογενής φωτοχημεία $PSIo$ και ο δείκτης $PI(abs)$ ο οποίος αντιπροσωπεύει τις επιδόσεις ανά απορροφώμενη ενέργεια.

Ο λόγος που επιλέξαμε αυτές τις παραμέτρους είναι το γεγονός ότι από προηγούμενες μελέτες έχει τεκμηριωθεί ότι οποιαδήποτε καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και κατ'επέκταση του φωτοσυνθετικού οργανισμού εκφράζεται με αύξηση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (ABS/RC), μείωση της πυκνότητας των ενεργών κέντρων (RC/Cs) με αποτέλεσμα την μείωση της φωτοχημικής απόσβεσης ($PSIo$) και αύξηση της μη φωτοχημικής απόσβεσης

(Dl_o/RC), αλλαγές που οδηγούν τελικά σε μείωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης (F_v/F_m) (Demetriou, et al., 2007; Sfichi, et al., 2004; Lütz, et al., 2005; Navakoudis, et al., 2007; Sfakianaki, et al., 2006).

Μια τέτοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας (Demetriou, et al., 2007), αυξημένης UVB ακτινοβολίας (Sfichi, et al., 2004; Lütz, et al., 2005), αυξημένου ατμοσφαιρικού όζοντος (Lütz, et al., 2005; Navakoudis, et al., 2007), χαμηλής θερμοκρασίας (Sfakianaki, et al., 2006). Μάλιστα έχει βρεθεί ότι οι εν λόγω αλλαγές στη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού ελέγχονται από τη διαφοροποίηση της σχέσης των πολυαμινών και ιδιαίτερα της πουτρεσίνης προς την σπερμίνη (Ioannidis and Kotzabasis, 2016).

Οι διαφοροποιήσεις του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στον εν λόγω χειρισμό παρουσιάζονται για την 5^η ημέρα διεξαγωγής του πειράματος στο διάγραμμα που ακολουθεί (Εικόνα 16). Να σημειωθεί ότι οι τιμές του μάρτυρα έχουν κανονικοποιηθεί ώστε να παίρνουν αυθαίρετα τη τιμή 1, ενώ οι τιμές της μεταχείρισης που μας ενδιαφέρει εμφανίζονται ως ποσοστό της τιμής του αντίστοιχου μάρτυρα.

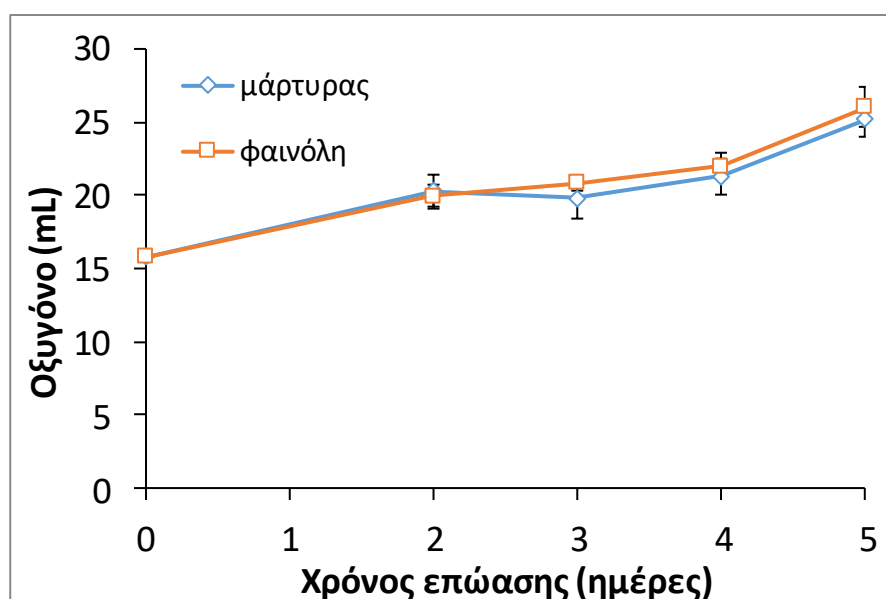


Εικόνα 16. Παράμετροι του JIP-Test την 5η ημέρα διεξαγωγής του πειράματος που αφορούν τη μοριακής δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* παρουσία φαινόλης (0,15 mM).

Όπως φαίνεται η παρουσία της φαινόλης δεν επηρεάζει τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μικροφύκου (δεν έχουμε πίεση διέγερσης του φωτοσυστήματος II) αφού δεν υπάρχει καμία σημαντική διαφοροποίηση των παραμέτρων του JIP-Test. Αυτό σημαίνει ότι δεν έχουμε καμία ενδειξη καταπόνησης (stress) του

μικροφύκους υπό τη παρουσία φαινόλης στο θρεπτικό μέσο. Άρα η φαινόλη (στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις) δεν φαίνεται να είναι τοξική για το μικροφύκος.

Με τα αποτελέσματα της ανάπτυξης και του JIP-test συμφωνούν και τα αποτελέσματα περιεκτικότητας O₂ που προέκυψαν από τη Αέρια Χρωματογραφία Θερμικής Αγωγιμότητας (Εικόνα 17). Παρατηρούμε ότι στο κλειστό σύστημα δεν υπάρχει καμία διαφοροποίηση της περιεκτικότητας οξυγόνου μεταξύ των καλλιεργιών του μικροφύκους όπου υπάρχει η φαινόλη με των αντίστοιχων του μάρτυρα. Όπως και στο μάρτυρά έτσι και παρουσία φαινόλης η φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου είναι πολύ μεγαλύτερη από τη κατανάλωση O₂ μέσω της αναπνοής.

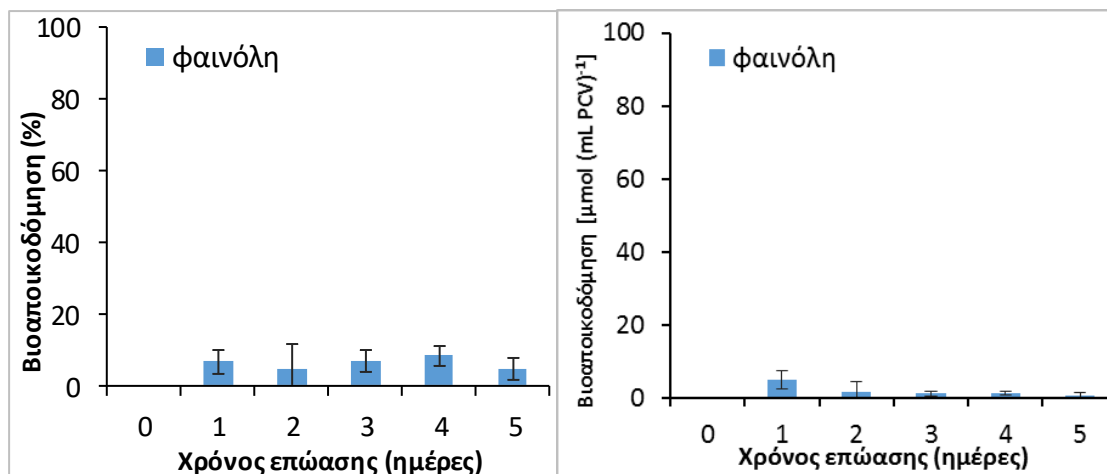


Εικόνα 17. Περιεκτικότητα O₂ στις καλλιέργειες του μικροφύκους *Scenedesmus obliquus* παρουσία 0,15mM φαινόλης.

Άρα από τα μέχρι τώρα αποτελέσματα είναι ξεκάθαρο ότι η φαινόλη δεν επηρεάζει (στη συγκεκριμένη συγκέντρωση) ούτε την ανάπτυξη ούτε το φωτοσυνθετικό μηχανισμό και τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα του μικροφύκους. Για τη ολοκλήρωση του πειραματικού μέρους μελετήθηκε εν τέλει και η βιοαποικοδόμηση της από το μικροφύκος.

Η βιοαποικοδόμηση εκφράστηκε με δύο τρόπους. Ο πρώτος αφορούσε τη βιοαποικοδόμηση ανά καλλιέργεια (σε ποσοστό της αρχικής συγκέντρωσης που ήταν 0,15mM), η οποία αντιστοιχεί στο ποσοστό απομάκρυνσης της ουσίας από το μέσο καλλιέργειας. Ο δεύτερος αφορούσε τη βιοαποικοδόμηση ανά κυτταρικό όγκο εκφραζόμενη σε μmol/ml PCV, που υποδηλώνει τη βιοαποικοδόμηση της ουσίας ανά κυτταρικό όγκο. Τα αποτελέσματα βιοαποικοδόμησης της φαινόλης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση HPLC και παρουσιάζονται στην Εικόνα 18.

Από τα δύο διαγράμματα δεν φαίνεται να υπάρχει ουσιαστική βιοαποικοδόμηση της φαινόλης από το μικροφύκος αφού οι τιμές της βιοαποικοδόμησης ανά καλλιέργεια και ανά κυτταρικό όγκο είναι πολύ μικρές (γύρω από το 5%) και δεν μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστες.



Εικόνα 18. Βιοαποικοδόμηση της φαινόλης (0,15 mM) ποσοστιαία ανά καλλιέργεια και ανά κυτταρικό όγκο από το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus* κατά το χρονικό διάστημα των 5 ημερών.

Από πρώτης άποψη μπορούμε να υποθέσουμε ότι η έλλειψη βιοαποικοδόμησης οφείλεται στο ότι η φαινόλη (στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις) δεν είναι τοξική (εικόνα 15 και 16) και άρα σύμφωνα με τους Papazi and Kotzabasis (2013) δεν υπάρχει κάποιος λόγος το μικροφύκος να δαπανήσει ενέργεια για να τη βιοαποικοδομήσει.

Επίσης, όπως διαπιστώθηκε από τους Papazi and Kotzabasis (2007), η φαινόλη για το μικροφύκος χρησιμεύει ως εναλλακτική πηγή ενέργειας. Το μικροφύκος βιοαποικοδομεί τη φαινόλη μόνο όταν τα ενεργειακά του αποθέματα (υπό τη μορφή άνθρακα) δεν είναι πλέον αρκετά για να καλύψει τις ανάγκες του, όταν δηλαδή υπάρχει έλλειψη εξωγενούς πηγής άνθρακα. Εδώ εφόσον υπάρχει επαρκής πηγή άνθρακα-γλυκόζη (ευκολότερο υπόστρωμα άνθρακα) και εφόσον η φαινόλη δεν φαίνεται να είναι τοξική για το μικροφύκος τότε δεν συντρέχει κανένας σημαντικός λόγος για να τη βιοαποικοδομήσει. Η περίσσεια ενέργειας επενδύεται στην ανάπτυξη όπως φαίνεται ξεκάθαρα στην Εικόνα 15.

Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και για τα μικροφύκη *Chlamydomonas reinhardtii* (Nazos, et al., 2016) και *Tetraselmis marina* (Petroutsos, et al., 2007). Στο πρώτο η φαινόλη δεν απομακρύνθηκε από καλλιέργειες όπου υπήρχε οξικό οξύ (οργανικός άνθρακας) παρά μόνο όταν αυτό ήταν σε έλλειψη. Η απουσία βιοαποικοδόμησης της φαινόλης, στο δεύτερο, παρουσία NaHCO_3 αποδόθηκε αρχικά σε απουσία κατάλληλων ενζύμων ενώ στη συνέχεια φάνηκε να είναι θέμα κατάλληλων συνθηκών (Papazi and Kotzabasis, 2007).

3.2 Βιοαποικοδόμηση χλωροφαινολών

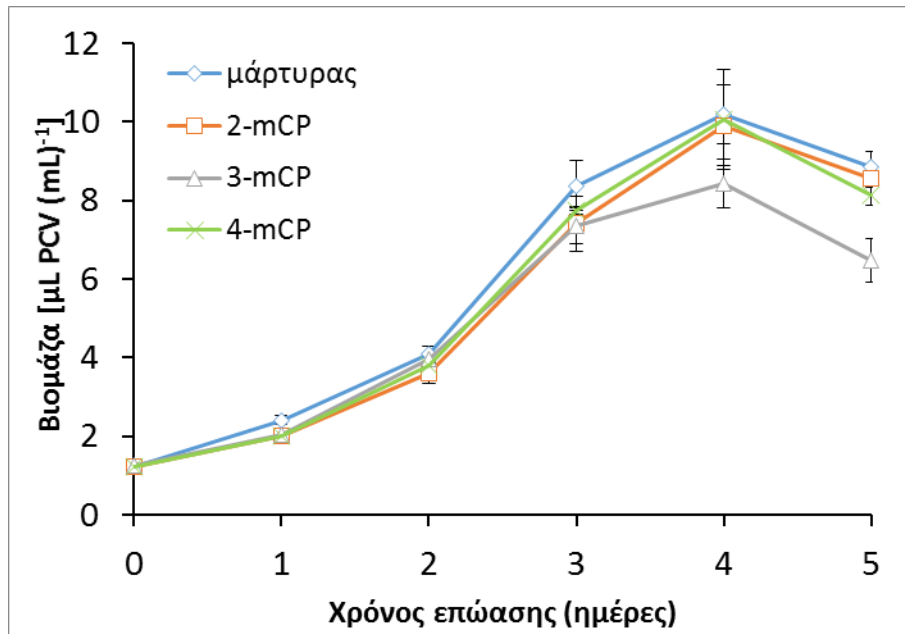
Αφού εξετάστηκε η βιοαποικοδόμηση της φαινόλης, η πρόδρομη ένωση των χλωροφαινολών, σειρά έχουν οι ίδιες οι χλωροφαινόλες. Είναι ήδη γνωστό ότι η τοξικότητα της ένωσης αυξάνεται με τη αύξηση του αριθμού των υποκαταστατών στο φαινολικό δακτύλιο (Steiert, et al., 1987). Γνωρίζουμε επίσης ότι η βιοαποικοδόμηση είναι μια βιοενεργητική διαδικασία (Papazi and Kotzabasis, 2007; Papazi and Kotzabasis, 2008; Papazi and Kotzabasis, 2013). Έτσι, στις ίδιες συνθήκες χωρίς τη προσθήκη επιπλέον πηγή ενέργειας-άνθρακα, θα αυξήσουμε σταδιακά το βαθμό τοξικότητας της ένωσης προσθέτοντας σταδιακά χλώρια στο δακτύλιο της φαινόλης. Με αυτό το τρόπο θέλουμε να εξετάσουμε την ικανότητα του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* να βιοαποικοδομεί πιο τοξικές ενώσεις αλλά και με μια πιο «βιοενεργητική» ματιά το πως διαχειρίζεται την ενέργεια του, δηλαδή πια στρατηγική ακολουθεί προκειμένου να αποικοδομήσει τις διάφορες ενώσεις.

3.2.1 Βιοαποικοδόμηση μονοχλωροφαινολών

Με τη προσθήκη ενός ατόμου χλωρίου στο φαινολικό δακτύλιο προκύπτουν 3 ισομερείς ενώσεις: 2-μονοχλωροφαινόλη (2-mCP), 3-μονοχλωροφαινόλη (3-mCP) και η 4-μονοχλωροφαινόλη (4-mCP). Οι μονοχλωροφαινόλες όπως και οι υπόλοιπες ενώσεις εξετάστηκαν με την ίδια λογική όπως εξετάστηκε και η φαινόλη. Εκτός από τη βιοαποικοδόμηση διερευνήθηκε και η επίδραση της κάθε ένωσης στη ανάπτυξη και στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό του μικροφύκου.

Η ανάπτυξη του μικροφύκου (Εικόνα 19) μέχρι και τη 2^η μέρα διεξαγωγής του πειράματος δεν φαίνεται να παρεμποδίζεται από τη παρουσία κάποια συγκεκριμένης μονοχλωροφαινόλης. Από τη 2^η μέρα και μετά μία οριακή παρεμπόδιση σημειώνεται μόνο στο χειρισμό με τη 3-mCP. Οι υπόλοιπες δύο χλωροφαινόλες, 2-mCP και 4-mCP, δεν φαίνεται να έχουν ανασταλτική επίδραση στη ανάπτυξη του μικροφύκου. Αυτό γιατί η καμπύλη ανάπτυξης του μικροφύκου παρουσία 2-mCP και 3-mCP δεν φαίνεται να διαφοροποιείται από αυτή του μάρτυρα.

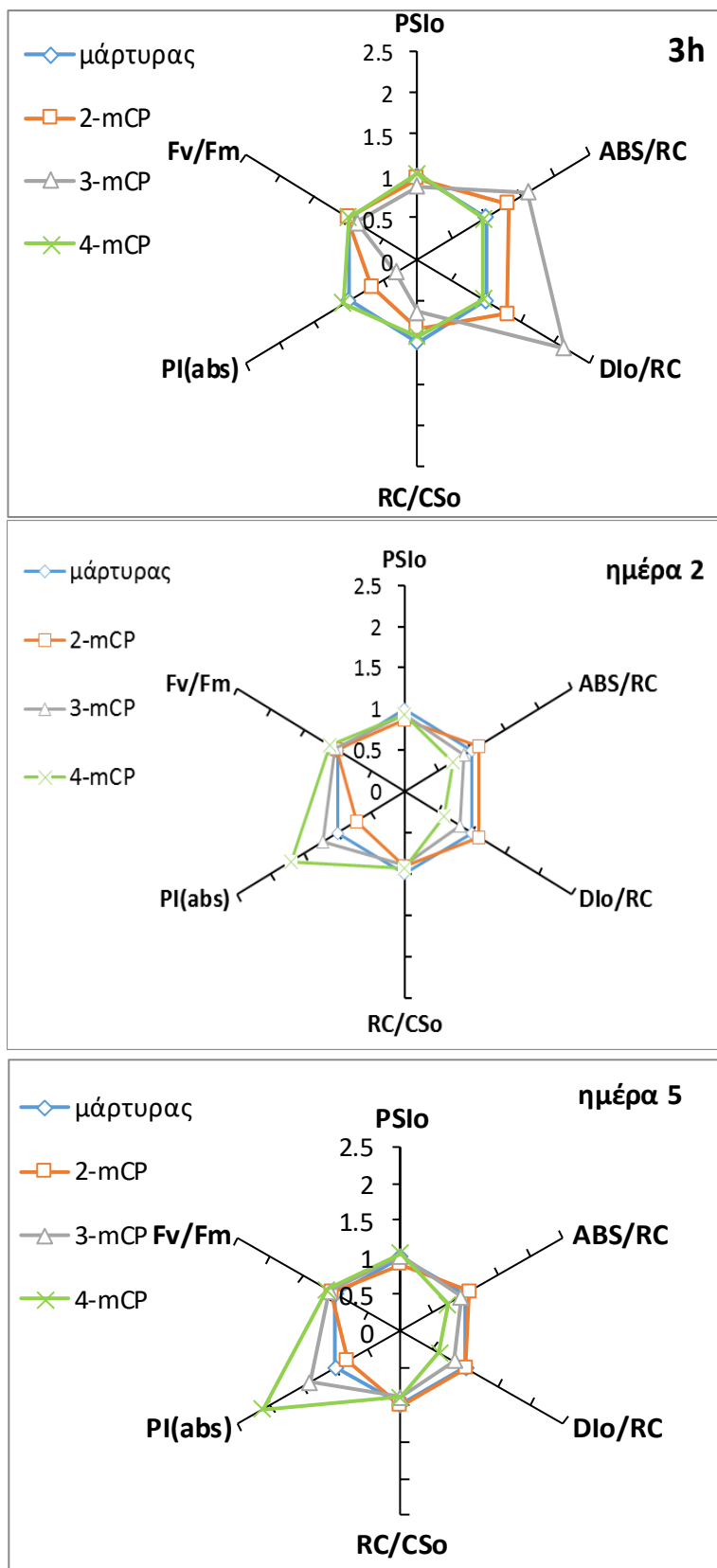
Από τα δεδομένα της ανάπτυξης προκύπτει ότι η 3-mCP είναι πιο τοξική σε σχέση με τις άλλες δύο ενώσεις. Οπότε η τοξικότητα συνδέεται καθαρά και μόνο με τη *meta*- θέση του υποκαταστάτη στην 3-mCP. Στη συνέχεια εξετάσαμε αν οι παράμετροι του JIP-Test επιβεβαιώνουν τα δεδομένα της ανάπτυξης, αν δηλαδή παρουσία 3-mCP σημειώνεται και καταπόνηση στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό του χλωροφύκου.



Εικόνα 19. Μεταβολή της βιομάζας του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* παρουσία μονοχλωροφαινολών (0,15 mM)

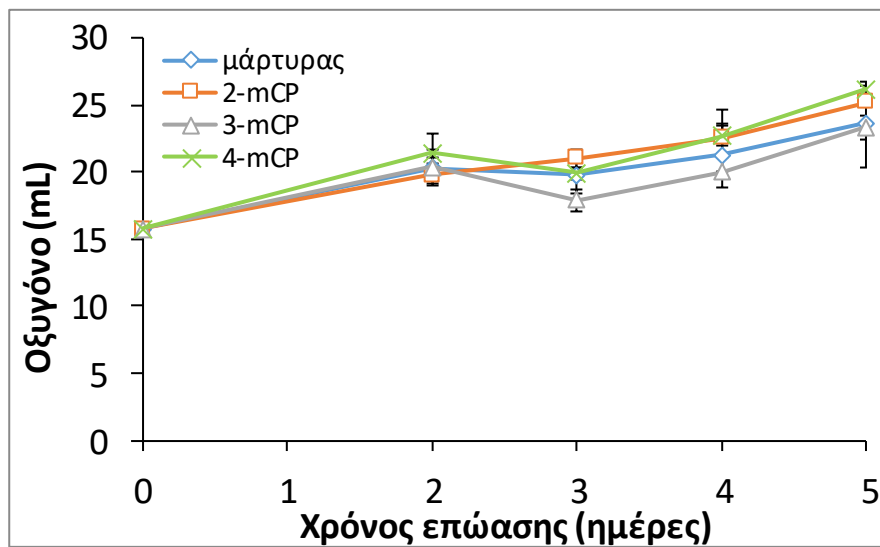
Τα αποτελέσματα από το JIP-test παρουσιάζονται επιλεκτικά για κάποιες μέρες στην Εικόνα 20. Πράγματι εμφανίζονται σημάδια καταπόνησης (stress) στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό του χλωροφύκου παρουσία 3-mCP αλλά αυτά εκδηλώνονται αμέσως μετά τη προσθήκη της στο μέσο καλλιέργειας (μετά από 3 ώρες). Η καταπόνηση εκδηλώνεται με αύξηση του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (ABS/RC), μείωση της πυκνότητας των ενεργών κέντρων αντίδρασης (RC/CS₀), αύξηση της μη φωτοχημικής διάχυσης της ενέργειας (D₁₀/RC), μείωση της πρωτογενούς φωτοχημείας (PSI₀) και κατά συνέπεια μείωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης (F_v/F_m).

Καταπόνηση παρουσιάστηκε και με τη 2-mCP με τη διαφορά ότι η φωτοσυνθετική απόδοση και η πρωτογενής φωτοχημεία παραμένουν σταθερά, τα αντίστοιχα σημάδια καταπόνησης είναι πιο ήπια και επανεμφανίζονται και τη 2^η μέρα διεξαγωγής του πειράματος. Τις υπόλοιπες μέρες φαίνεται να υπάρχει προσαρμογή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του χλωροφύκου και άρα μπορούμε να πούμε ότι το χλωροφύκος γίνεται ανεκτικό όσο αφορά την παρουσία των μονοχλωροφαινολών στο μέσο καλλιέργειας. Όσο αφορά τη 4-mCP αυτή δεν φαίνεται να προκαλεί καταπόνηση στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό του μικροφύκου για καμία μέρα. Σε γενικές γραμμές ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός του μικροφύκου δεν φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από τη παρουσία μονοχλωροφαινολών.



Εικόνα 20. Παράμετροι του JIP-Test που αφορούν τη μοριακής δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* παρουσία μονοχλωροφαινόλων (0,15 mM), μετά απο 3h, 2 ημέρες και 5 ημέρες αντίστοιχα.

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν απόλυτα και με τα αποτελέσματα που αφορούν την περιεκτικότητα O₂ στις καλλιέργειες του μικροφύκου. Σύμφωνα με το διάγραμμα της Εικόνας 21 δεν φαίνεται να υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ της περιεκτικότητας O₂ στους χειρισμούς με τις μονοχλωροφαινόλες με αυτό του μάρτυρα. Όπως ενισχυμένη είναι η φωτοσυνθετική δραστηριότητα (και άρα παραγωγή O₂) στο χειρισμό μάρτυρα έτσι φαίνεται να είναι και στους χειρισμούς με τις μονοχλωροφαινόλες (2-mCP, 3-mCP, 4-mCP).

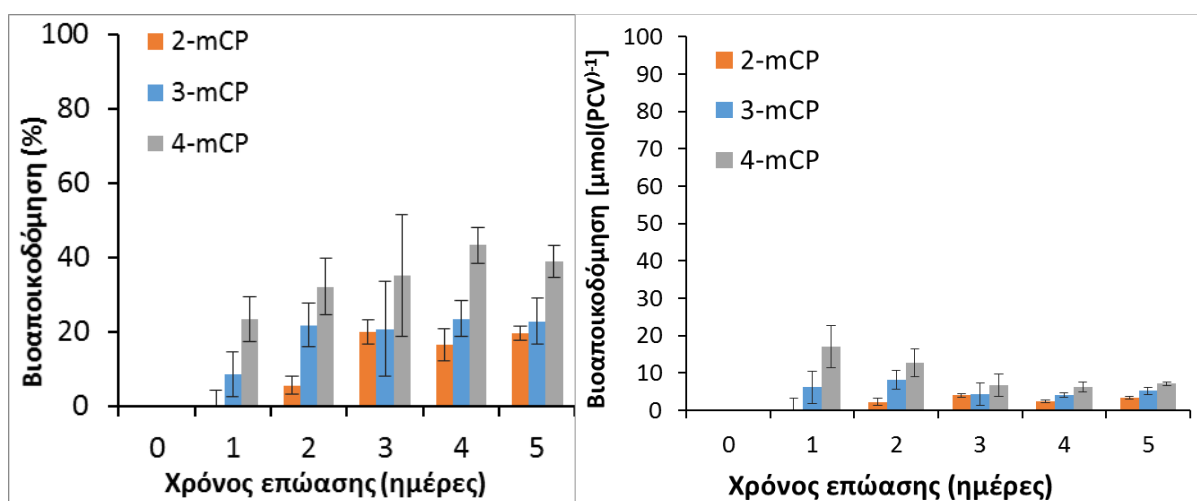


Εικόνα 21. Περιεκτικότητα οξυγόνου στις καλλιέργειες του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* παρουσία 0,15mM μονοχλωροφαινόλων

Τα αποτελέσματα της βιοαποικοδόμησης παρουσιάζονται στην Εικόνα 22 όπου το πρώτο χρωματογράφημα αναφέρεται στη ποσοστιαία βιοαποικοδόμηση των μονοχλωροφαινόλων ανά καλλιέργεια, ενώ το δεύτερο στη βιοαποικοδόμηση των επιμέρους ενώσεων ανά κυτταρικό όγκο (PCV). Όπως φαίνεται το μικροφύκος μπορεί να βιοαποικοδομεί τις μονοχλωροφαινόλες. Με βάση τα διαγράμματα η βιοαποικοδόμηση ακολουθεί τη σειρά 4-mCP > 3-mCP > 2-mCP και άρα με βάση τη θέση του υποκαταστάτη η σειρά βιοαποικοδόμησης είναι *para-* > *meta-* > *ortho-*.

Παρατηρούμε λοιπόν ότι ενώ η τοξικότητα της *meta-* θέσης είναι ορατή στη ανάπτυξη του μικροφύκου και εν μέρει στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό, στη βιοαποικοδόμηση δεν φαίνεται να είναι τόσο άμεσα ορατή. Οι Ushida and Ukawaki (2003) υπολόγισαν τις ενέργειες διάσπασης των *ortho-*, *meta-* και *para-* χλωροφαινόλων σε διάφορες θερμοκρασίες και σε συνθήκες που ταιριάζουν με τη δική μας περίπτωση, σύμφωνα με τις οποίες ισχύει ότι $\Delta H_{298}(\text{meta})=36.1\text{KJ/mol} > \Delta H_{298}(\text{para})=28.8\text{KJ/mol} > \Delta H_{298}(\text{ortho})=25.2\text{KJ/mol}$ [37]. Άρα θα αναμέναμε η 3-mCP να βιοαποικοδομείται πιο δύσκολα κάτι το οποίο δεν φαίνεται να συμβαίνει. Αυτό οφείλεται στη γλυκόζη η οποία προσφέρει τόση πολλή ενέργεια στο μικροφύκος για να φέρει εις πέρας τις ανάγκες του (π.χ ανάπτυξη), με αποτέλεσμα να

αποδυναμώνεται η επίδραση της μικρής τοξικότητας της *meta*- θέσης, όπου φάνηκε να υπάρχει το πρόβλημα.



Εικόνα 22. Βιοαποικοδόμηση μονοχλωροφαινολών (0,15mM) από το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus* στο χρονικό διάστημα των 5 ημερών

Αν συνδυάσουμε όλα τα αποτελέσματα μεταξύ τους, προκύπτει ότι οι μονοχλωροφαινόλες είναι ενώσεις με χαμηλή τοξικότητα αφού δεν επηρεάζουν σημαντικά την ανάπτυξη, το φωτοσυνθετικό μηχανισμό και τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα του μικροφύκου. Το μικροφύκος αναπτύσσεται κανονικά όπως και ο μάρτυρας ενώ η βιοαποικοδόμηση των μονοχλωροφαινολών ανά κυτταρικό όγκο είναι πολύ μικρή. Εφόσον, λοιπόν οι μονοχλωροφαινόλες δεν είναι «ενοχλητικές» για το μικροφύκος, αυτό φαίνεται να επενδύει την διαθέσιμη ενέργεια του αποκλειστικά στη ανάπτυξη του παρά στη βιοαποικοδόμηση. Βιοαποικοδόμηση υπάρχει γιατί επενδύοντας τη ενέργεια του στη ανάπτυξη, ο αριθμός των κυττάρων του αυξάνεται κατά τη διάρκεια του χρόνου επώασης. Επειδή η τοξικότητα, μεταξύ άλλων, καθορίζεται και από την συγκέντρωση της φαινολικής ένωσης σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων, η οποία βιοαποικοδόμηση των μονοχλωροφαινολών συμβαίνει τις πρώτες δύο ημέρες (βλ.Εικόνα 22). Την τρίτη ημέρα η καλλιέργεια έχει πενταπλασιάσει τον κυτταρικό της όγκο (Εικόνα 19), μειώνοντας περισσότερο την τοξικότητα και σταματώντας επί της ουσίας την βιοαποικοδόμηση (Εικόνα 22)

3.2.1.1 Σύγκριση βιοαποικοδόμησης φαινόλης και μονοχλωροφαινολών

Συγκρίνοντας τη βιοαποικοδόμηση της φαινόλης με αυτή των μονοχλωροφαινολών προκύπτουν οι πιο κάτω παρατηρήσεις. Καταρχάς, η παρουσία της φαινόλης στο θρεπτικό μέσο δεν επηρέασε καθόλου τη ανάπτυξη και το φωτοσυνθετικό μηχανισμό του μικροφύκου. Ως μη τοξική ένωση και εφόσον το μικροφύκος έχει άφθονη πηγή ενέργειας (γλυκόζη) αυτή δεν φάνηκε να βιοαποικοδομείται. Η παρουσία των μονοχλωροφαινολών

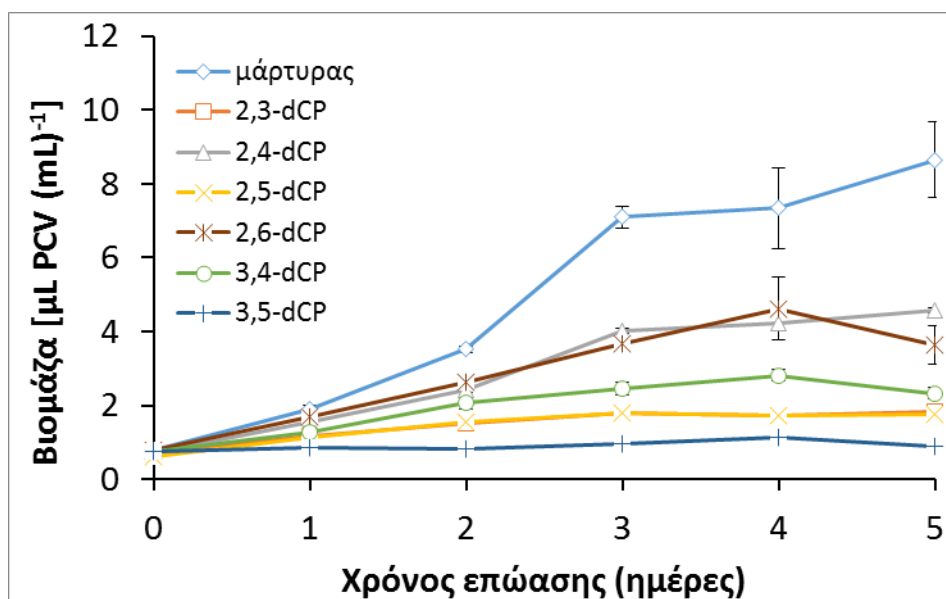
στο μέσο καλλιέργειας πάλι δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη και το φωτοσυνθετικό μηχανισμό του μικροφύκου. Η μόνη που μπορούμε να πούμε ότι είναι οριακά τοξική είναι η 3-mCP. Και αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι το χλώριο καταλαμβάνει τη *meta*- θέση, την πιο ενεργοβόρα θέση.

Και στις δύο περιπτώσεις (φαινόλη και μονοχλωροφαινόλες) το μικροφύκος αναπτύσσεται κανονικά. Άρα επενδύει την ενέργεια του στη ανάπτυξη. Με τη διαφορά ότι στην περίπτωση των μονοχλωροφαινολών το μικροφύκος μέσω της αύξησης της βιομάζας του αποτοξικοποιεί το περιβάλλον του. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, βιοαποικοδομεί τις πρώτες μέρες κατά 20-30 % τις μονοχλωροφαινόλες με παράλληλη ανάπτυξη της καλλιέργειας μειώνοντας περαιτέρω την τοξικότητα και σταματώντας στη συνέχεια την βιοαποικοδόμηση. Στον χειρισμό με την φαινόλη έχουμε απόλυτα μη τοξικές συνθήκες από τη πρώτη μέρα της επώασης και ως εκ τούτου δεν έχουμε ουσιαστική αποικοδόμηση της σε όλη τη διάρκεια της επώασης (βλ. Εικόνα 18). Το επιπλέον χλώριο τελικά οδήγησε σε έστω και μικρή αύξηση της τοξικότητας των αντίστοιχων ενώσεων, και άρα οι μονοχλωροφαινόλες μπορούν να χαρακτηριστούν ως ενώσεις χαμηλής τοξικότητας.

3.2.2 Βιοαποικοδόμηση διχλωροφαινολών

Εφόσον εξετάστηκε η συμπεριφορά του μικροφύκου παρουσία μονοχλωροφαινολών, ενώσεων με χαμηλή τοξικότητα, επόμενο βήμα ήταν να δούμε πως αυτό θα αντιδράσει αν αυξήσουμε το βαθμό τοξικότητας της ένωσης, προσθέτοντας ακόμη ένα χλώριο στο φαινολικό δακτύλιο. Έτσι εξετάσαμε την ικανότητα του μικροφύκου να βιοαποικοδομεί τις διχλωροφαινόλες. Η πορεία που ακολουθήσαμε είναι η ίδια με τις προηγούμενες δύο ενότητες, πάντα με τη σειρά που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα, όπως περιγράφονται στα «Υλικά και Μεθόδους». Να σημειωθεί για ακόμη μια φορά ότι η πηγή άνθρακα δεν αλλάζει ενώ οι αντίστοιχες χλωροφαινόλες προστίθενται, στο μέσο καλλιέργειας, σε ίδια συγκέντρωση, 0,15 mM, όπως και οι υπόλοιπες ενώσεις.

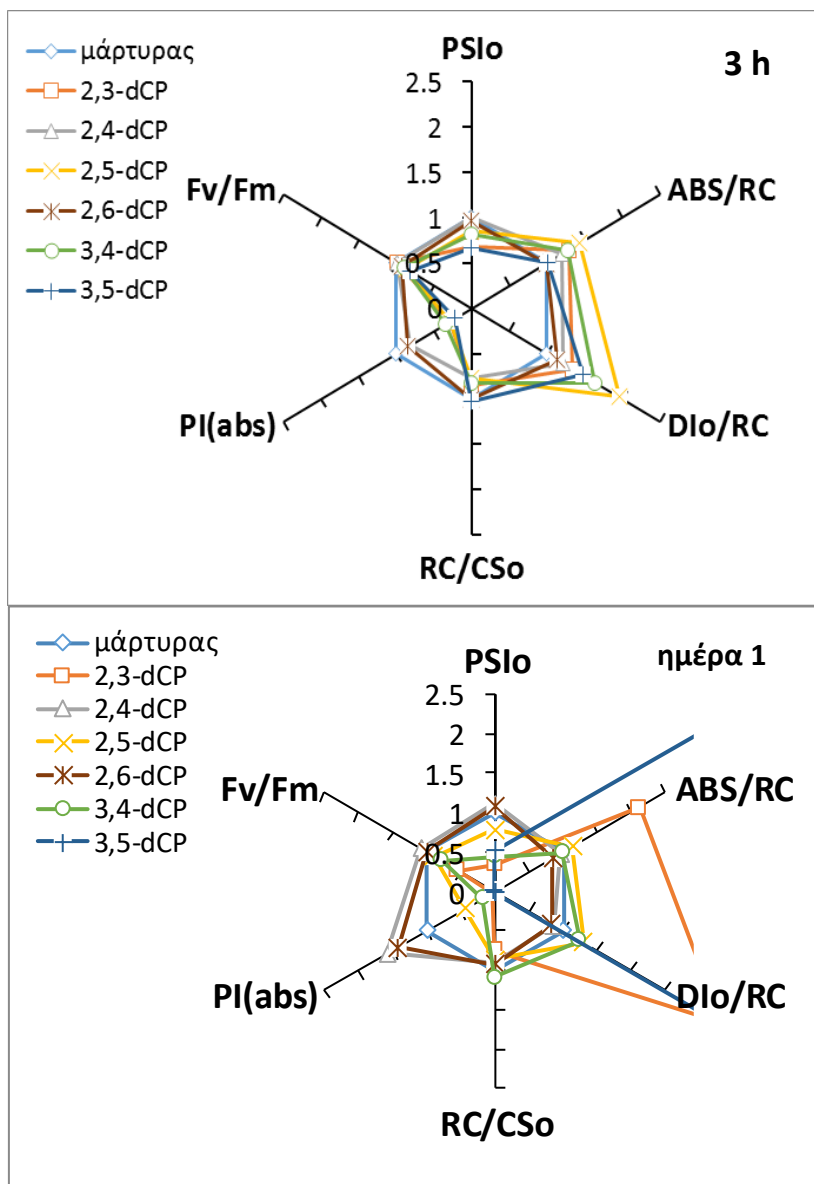
Από τα αποτελέσματα της Εικόνας 23, φαίνεται ξεκάθαρα ότι η ανάπτυξη του μικροφύκου έχει παρεμποδιστεί σημαντικά και σε διαφορετικό βαθμό από την παρουσία των διχλωροφαινολών. Από τις 6 διχλωροφαινόλες, 2,3-dCP, 2,4-dCP, 2,5-dCP, 2,6-dCP, 3,4-dCP, 3,5-dCP, φαίνεται ότι η 2,4-dCP και 2,6-dCP αναστέλλουν την αύξηση σε μικρότερο βαθμό. Ακολουθούν στη συνέχεια η 3,4-dCP η οποία αναστέλλει τη αύξηση σε ελάχιστα μεγαλύτερο βαθμό και οι 2,3-dCP και 2,5-dCP που φαίνεται να έχουν την ίδια ανασταλτική επίδραση. Τελευταία είναι η 3,5-dcp η οποία έχει τη μεγαλύτερη ανασταλτική επίδραση από τις υπόλοιπες πέντε. Από τα δεδομένα της ανάπτυξης φαίνεται να επικρατεί η ακόλουθη τάση ως προς την τοξικότητα (από τη μικρότερη προς την μεγαλύτερη) 2,6-dCP < 2,4-dCP < 3,4-dCP < 2,5-dCP < 2,3-dCP < 3,5-dCP.



Εικόνα 23. Μεταβολή της βιομάζας του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* παρουσία 0,15mM διχλωροφαινολών.

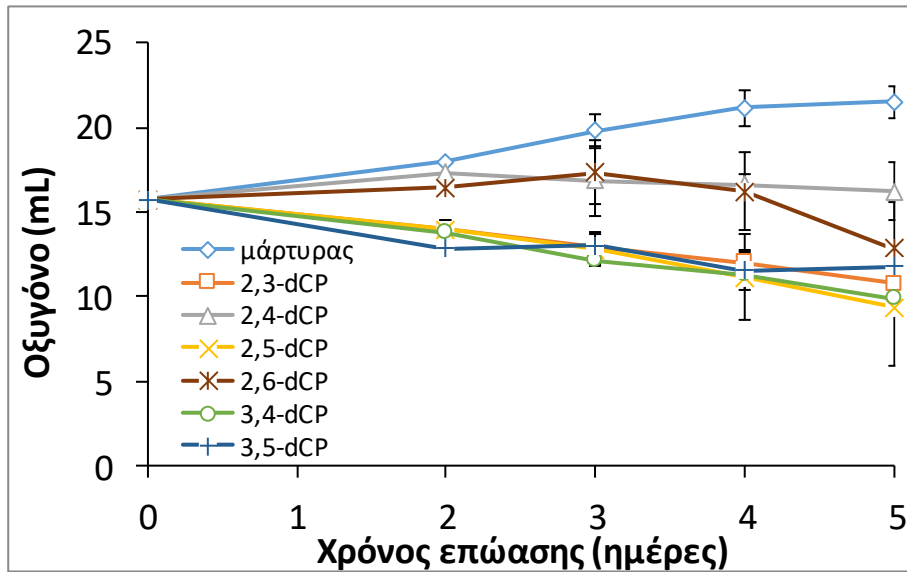
Με τα αποτελέσματα της ανάπτυξης συμφωνούν και τα αποτελέσματα του JIP-test, τα οποία μας πληροφορούν για τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Η τοξικότητα των διχλωροφαινολών γίνεται ορατή και στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό και εκδηλώνεται με αύξηση του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (ABS/RC), μείωση των ενεργών κέντρων αντίδρασης (RC/CS₀), αύξηση της ενέργειας που αποβάλλεται με τη μορφή θερμότητας (DIO/RC), μείωση της πρωτογενούς φωτοχημείας (PSI₀) και μείωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης (Fv/Fm). Αυτές οι αποκρίσεις του φωτοσυνθετικού μηχανισμού είναι χαρακτηριστικές αποκρίσεις καταπόνησης, όπως αυτές που παρατηρήθηκαν σε συνθήκες ωσμωτικής καταπόνησης (Demetriou, et al., 2007), χαμηλής θερμοκρασίας (Sfakianaki, et al., 2006), υψηλής UV-B ακτινοβολίας (Sfichi, et al., 2004; Lütz, et al., 2005) και αυξημένων συγκεντρώσεων όζοντος (Lütz, et al., 2005; Navakoudis, et al., 2007). Να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα μας αφορούν μέχρι και την ημέρα 1 αφού από τη ημέρα 2 και μετά το PSII είχε καταρρεύσει, από τη παρουσία κάποιων διχλωροφαινολών, και δεν είχαμε έτσι μετρήσιμα αποτελέσματα προς σύγκριση. Αυτά συμφωνούν και με προηγούμενα αποτελέσματα των Papazi and Kotzabasis (2013).

Τα σημάδια καταπόνησης εμφανίζονται ήδη από το πρώτο 3 ώρο και γίνονται εντονότερα την ημέρα 1 (Εικόνα 24). Είναι εμφανές ότι η μεγαλύτερη καταπόνηση σημειώνεται παρουσία 3,5-dCP και 2,3-dCP. Ακολουθούν με μικρότερο βαθμό καταπόνησης η 3,4-dCP, 2,5-dCP και 3,5-dCP ενώ η 2,4-dCP και 2,6-dCP δεν φαίνεται να ασκούν ιδιαίτερη επίδραση στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό του μικροφύκου (τη παρούσα μέρα).



Εικόνα 24. Παράμετροι του JIP-Test που αφορούν τη μοριακής δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μικροφύκους *Scenedesmus obliquus* παρουσία διγλωροφαινολών (0,15 mM), μετά από 3h και 1 ημέρα αντίστοιχα.

Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα που αφορά τη περιεκτικότητα O_2 στις καλλιέργειες του μικροφύκους παρουσία διγλωροφαινολών (Εικόνα 25). Σε σύγκριση πάντα με το μάρτυρα φαίνεται ότι σχεδόν σε όλους τους χειρισμούς των διγλωροφαινολών είναι ενισχυμένη η αναπνευστική δραστηριότητα και άρα η κατανάλωση οξυγόνου. Η φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου είναι μειωμένη, λόγω και της κατάρρευσης του φωτοσυστήματος II, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

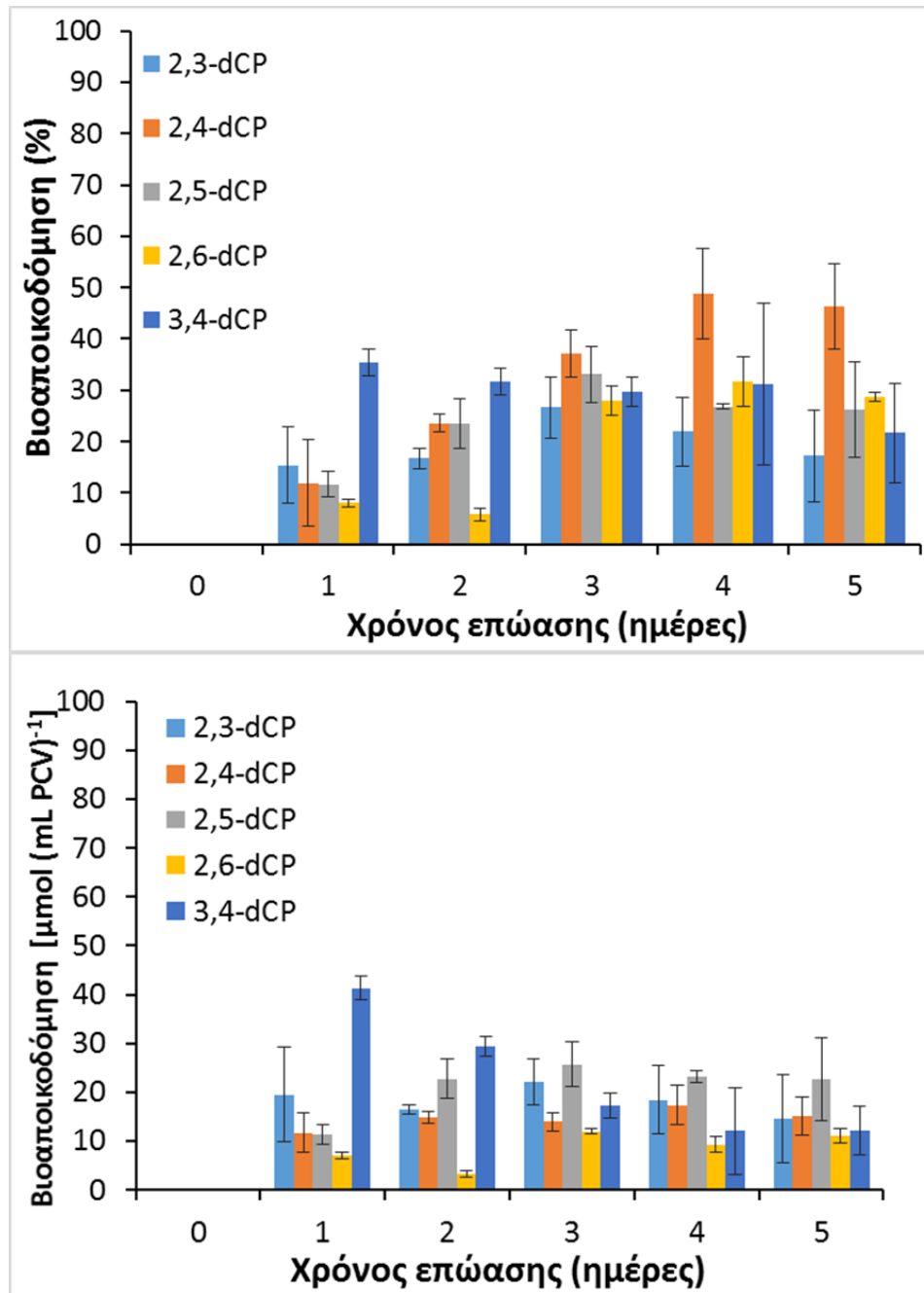


Εικόνα 25. Περιεκτικότητα οξυγόνου στις καλλιέργειες του μικροφύκος *Scenedesmus obliquus* παρουσία 0,15mM διχλωροφαινολών.

Συνοπτικά η τοξικότητα των διχλωροφαινολών, είτε αυτή εκφράζεται ως αναστολή της ανάπτυξης, είτε ως παρεμπόδιση της λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, ακολουθεί την εξής σειρά: κανένα Cl σε *meta*- θέση (2,6-dCP και 2,4-dCP) < 1 Cl σε *meta*-θέση (2,3-dCP, 2,5-dCP, 3,4-dCP) < 2 Cl σε *meta*-θέση (3,5-dCP)

Η βιοαποικοδόμηση των διχλωροφαινολών παρουσιάζεται στα διαγράμματα της Εικόνας 26. Το πρώτο διάγραμμα αντιπροσωπεύει τη ποσοστιαία βιοαποικοδόμηση ανά καλλιέργεια ενώ το δεύτερο τη βιοαποικοδόμηση ανά κυτταρικό όγκο (PCV)

Βλέπουμε λοιπόν ότι οι διχλωροφαινόλες, μπορούν να βιοαποικοδομηθούν από το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus*. Η βιοαποικοδόμηση ανά καλλιέργεια ακολουθεί τη σειρά 2,4-dCP > 2,6-dCP > 2,5-dCP > 3,4-dCP > 2,3-dCP. Άρα ο βαθμός δυσκολίας της βιοαποικοδόμησης φαίνεται να είναι μεγαλύτερος όταν τουλάχιστον ένα χλώριο καταλαμβάνει τη *meta*-θέση του φαινολικού δακτυλίου. Κάτι το οποίο είναι λογικό αφού η *meta*-θέση είναι η πιο ενεργοβόρα θέση ($\Delta H_{298\text{meta}} = 36.1 \text{ KJ/mol}$) και άρα για να αποικοδομηθεί η ένωση χρειάζεται να δοθεί περισσότερη ενέργεια. Γι' αυτό και οι ενώσεις με χλώρια σε *meta*-θέση διαπιστώθηκε να είναι πιο τοξικές. Χαρακτηριστική είναι η 3,5-dCP, όπου και τα δύο χλώρια βρίσκονται σε *meta*-θέσεις, και λόγω ενέργειας (στις συγκεκριμένες συνθήκες) δεν μπορεί το μικροφύκος να τη βιοαποικοδομήσει. Η βιοαποικοδόμηση ανά κυτταρικό όγκο (PCV) ακολουθεί τη σειρά 2,5-dCP > 2,3-dCP > 2,4-dCP > 3,4-dCP > 2,6-dCP όπου μπορούμε να πούμε ότι διχλωροφαινόλες με χλώρια υποκατεστημένα σε *meta*-θέση παρουσιάζουν μεγαλύτερη βιοαποικοδόμηση ανά κυτταρικό όγκο σε σχέση με διχλωροφαινόλες όπου το χλώριο δεν βρίσκεται σε *meta*-θέση.

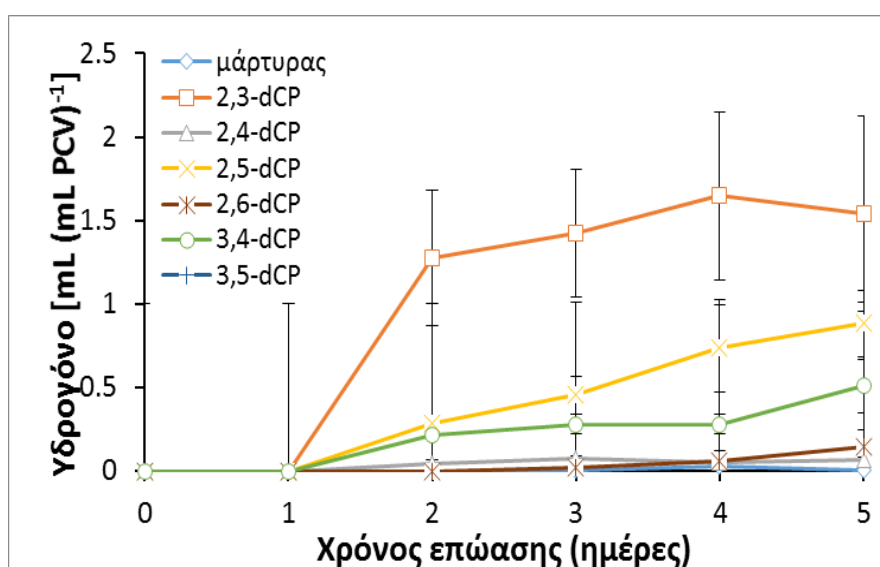


Εικόνα 26. Βιοαποικοδόμηση διχλωροφαινολών (0,15mM) ανά καλλιέργεια και ανά κυτταρικό όγκο από το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus* κατά τη διάρκεια των 5 ημερών

Αν συνδυάσουμε τα δεδομένα της βιοαποικοδόμησης με αυτά της ανάπτυξης φαίνεται ξεκάθαρα ότι υπάρχει συσχέτιση. Ένα ενεργειακό ισοζύγιο μεταξύ ανάπτυξης του χλωροφύκου και βιοαποικοδόμησης των τοξικών ενώσεων –διχλωροφαινολών, που συμφωνεί μάλιστα με προηγούμενα αποτελέσματα των Parazi and Kotzabasis (2013). Όταν η ένωση είναι πολύ τοξική (3,4-dCP, 2,3-dCP, 2,5-dCP) το μικροφύκος επενδύει το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας του στη βιοαποικοδόμηση ενώ λιγότερη ενέργεια επενδύει στην ανάπτυξη. Όταν η ένωση είναι λιγότερο τοξική (2,4-dCP, 2,6-dCP) τότε το μικροφύκος

επενδύει ένα μικρότερο μέρος της ενέργειας στην αποικοδόμηση, ώστε να χρησιμοποιήσει την υπόλοιπη ενέργεια του προκειμένου να βελτιώσει όσο γίνεται την ανάπτυξη του.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφέρουμε ότι η βιοαποικοδόμηση κάποιων διχλωροφαινολών βρέθηκε να οδηγεί σε παραγωγή υδρογόνου από το μικροφύκος, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της Εικόνας 27. Αυτές είναι η 2,3-dCP, 2,5-dCP και 3,4-dCP, δηλαδή όσες διχλωροφαινόλες είχαν το ένα χλώριο στη *meta*- θέση του φαινολικού δακτυλίου. Αυτό ήταν αναμενόμενο αφού ανάλογα αποτελέσματα είχαν βρεθεί και σε προηγούμενη έρευνα των Parazi et al (2012). Ο λόγος οφείλεται καταρχάς στη κατανάλωση οξυγόνου (εικόνα 24), στη εγκαθίδρυση ανοξικών συνθηκών και εν τέλει στη ενεργοποίηση της υδρογενάσης. Η ομοιότητα του οξειδοαναγωγικού δυναμικού των εν λόγω χλωροφαινολών με τη δεξαμενή πλαστοκινόνης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, δημιουργεί μία συνεχή παροχέτευση e⁻ στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων που καταλήγουν στη υδρογενάση με αποτέλεσμα τη συνεχή παραγωγή υδρογόνου (Parazi et al 2012)



Εικόνα 27. Παραγωγή υδρογόνου ανά κύτταρικό όγκο (PCV) στο μικροφύκος *Scenedesmus obliquus*, παρουσία διχλωροφαινολών.

3.2.2.1 Σύγκριση βιοαποικοδόμησης μονοχλωροφαινολών και διχλωροφαινολών

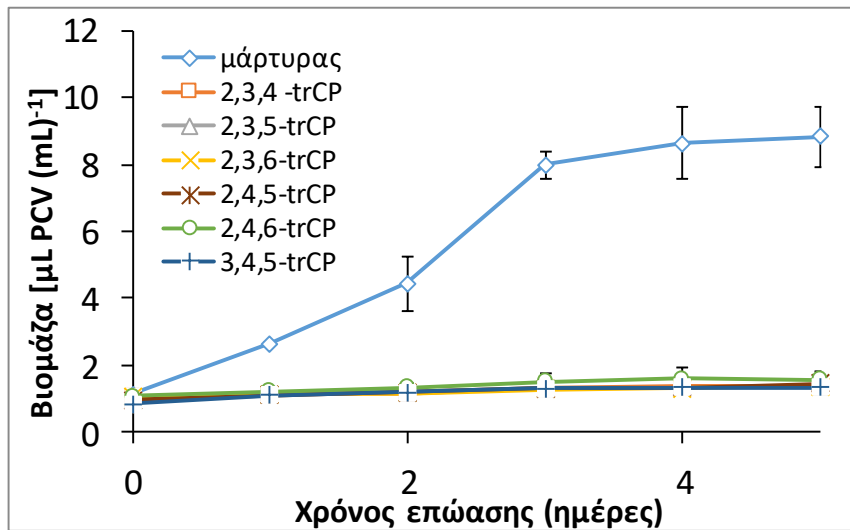
Με τη προσθήκη ενός δεύτερου χλωρίου στο φαινολικό δακτύλιο φαίνεται να αλλάζει όλο το σκηνικό, που είχε προκύψει προουμένως με τις μονοχλωροφαινόλες. Η παρουσία των μονοχλωροφαινολών στο μέσο καλλιέργειας δεν είναι ιδιαίτερα «ενοχλητική» για το μικροφύκος. Έτσι το μικροφύκος φαίνεται να τις «αγνοεί», αφού επενδύει όλη σχεδόν την ενέργεια του στη ανάπτυξη. Στην ουσία η αύξηση της βιομάζας του είναι εν τέλει η στρατηγική που ακολουθεί προκειμένου να βιοαποικοδομήσει τις μονοχλωροφαινόλες χωρίς έτσι να χρειαστεί να δαπανήσει επιπλέον ενέργεια. Με τη προσθήκη του δεύτερου χλωρίου αμέσως αυξάνεται η τοξικότητα της ένωσης, και πολύ περισσότερο όταν το χλώριο

καταλαμβάνει τη *meta*- θέση του φαινολικού δακτυλίου. Αυτό αποδείχθηκε από τα αποτελέσματα της ανάπτυξης, όπου σημειώθηκε παρεμπόδιση, και του JIP-test, όπου επιβεβαιώθηκε η καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μικροφύκου. Λόγω της τοξικότητας, το μικροφύκος αλλάζει τη βιοενεργητική στρατηγική του. Επενδύει περισσότερη ενέργεια για τη βιοαποικοδόμηση των διχλωροφαινολών και λιγότερη ενέργεια για τη αύξηση της βιομάζας του. Κρίνει απαραίτητη τη αποικοδόμηση των διχλωροφαινολών γιατί μάλλον η παραμονή τους, λόγω υψηλής τοξικότητας, θα επηρέαζε σημαντικά κύριες κυτταρικές λειτουργίες. Έτσι θα έπρεπε να επενδύσει περισσότερη ενέργεια από εκείνη της βιοαποικοδόμησης για να τις επαναφέρει ή να τις συντηρήσει. Να σημειωθεί ότι για τις 2,4-dCP και 2,6-dCP (κανένα Cl σε *meta*- θέση) φαίνεται να επενδύει λιγότερη ενέργεια στη βιοαποικοδόμηση τους, για το λόγο ότι είναι λιγότερο τοξικές από τις αντίστοιχες διχλωροφαινόλες που έχουν ένα χλώριο σε *meta*- θέση (2,5-dCP, 2,3-dCP, 3,4-dCP). Φαίνεται δηλαδή ότι ανάλογα με τη τοξικότητα της ένωσης που υπάρχει στο μέσο καλλιέργειας του, διαχειρίζεται με τέτοιο τρόπο την ενέργεια του ώστε να βγει εν τέλει κερδισμένο.

3.2.3 Βιοαποικοδόμηση τριχλωροφαινολών

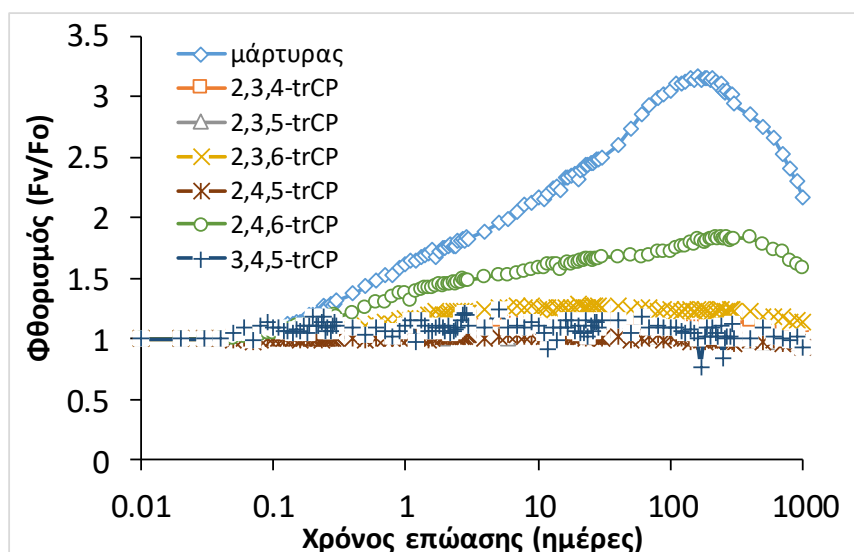
Σε συνθήκες αυξημένης τοξικότητας (διχλωροφαινόλες) το μικροφύκος φάνηκε να επενδύει περισσότερη ενέργεια στη βιοαποικοδόμηση και λιγότερη στη ανάπτυξη, απλά και μόνο για να μπορεί να συντηρηθεί. Το αντίθετο συμβαίνει όταν το περιβάλλον είναι λιγότερο τοξικό (μονοχλωροφαινόλες). Προχωρώντας ένα βήμα παρακάτω αυξάνοντας περαιτέρω τη τοξικότητα της προς διάσπαση ένωσης προσθέτοντας ένα τρίτο χλώριο στο φαινολικό δακτύλιο θα εξετάσουμε τη συμπεριφορά του μικροφύκου σε ένα ακόμη πιο τοξικό περιβάλλον.

Η ανάπτυξη του μικροφύκου παρουσία τριχλωροφαινολών (2,3,4-trCP, 2,3,5-trCP, 2,3,6-trCP, 2,4,5-trCP, 2,4,6-trCP, 3,4,5-trCP) απεικονίζεται στο διάγραμμα της Εικόνας 28. Γίνεται αμέσως ορατή η έντονη τοξικότητα των ενώσεων αυτών αφού δεν σημειώνεται καμία αύξηση της βιομάζας του μικροφύκου. Η ανάπτυξη του παρουσιάζεται ως ευθεία γραμμή, παράλληλη με το άξονα των x. Όλες οι τριχλωροφαινόλες φαίνεται να παρεμποδίζουν με το ίδιο τρόπο την ανάπτυξη. Άρα φαίνεται ότι το μικροφύκος δεν επένδυσε την ενέργεια του για τη αύξηση της βιομάζας του.



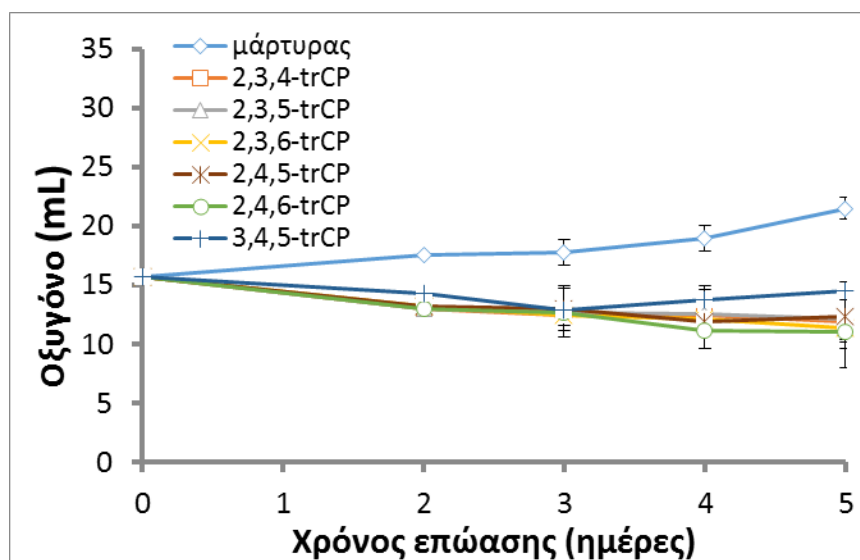
Εικόνα 28. Μεταβολή της βιομάζας του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* παρουσία 0,15 mM τριγλωροφαινολών

Η έντονη τοξικότητα των τριγλωροφαινολών φαίνεται και από το διάγραμμα του επαγωγικού φθορισμού (Εικόνα 29). Όλες οι καμπύλες αποκλίνουν από τη κανονική μορφή O-J-I-P που ακολουθεί ο μάρτυρας. Αυτό σημαίνει ότι δεν υπάρχουν ενεργά PSII καθώς αυτά έχουν καταστραφεί από τη στιγμή που οι τριγλωροφαινόλες έχουν προστεθεί στο μέσο καλλιέργειας. Έτσι οι μετρήσεις που πήραμε από το JIP-test δεν ήταν ανιχνεύσιμες γι' αυτό και δεν παρουσιάζονται σχετικά αποτελέσματα.



Εικόνα 29. Καμπύλες επαγωγικού φθορισμού για τις μεταχειρίσεις με τις τριγλωροφαινόλες (μετά από επώαση 3h)

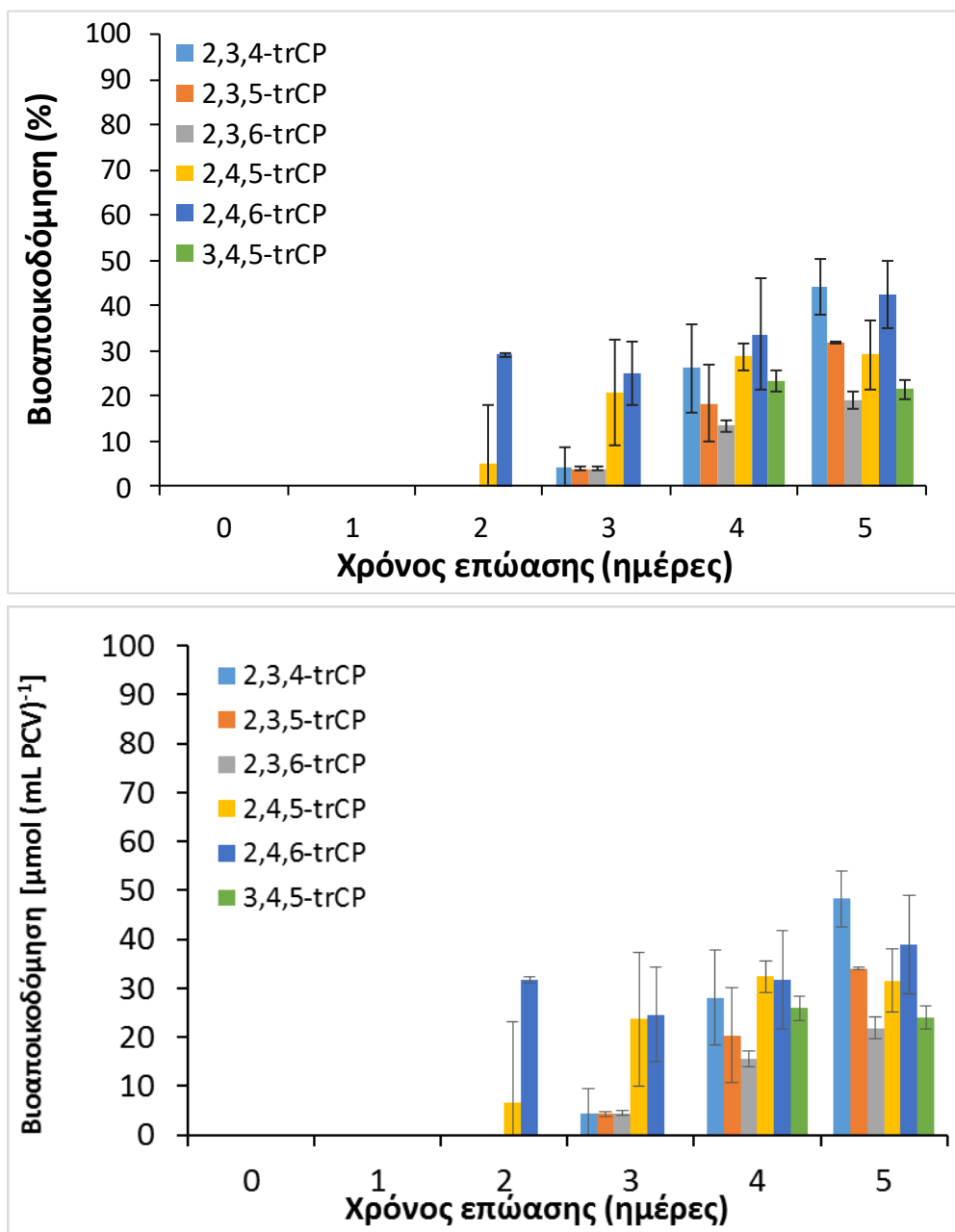
Τα αποτελέσματα περιεκτικότητας οξυγόνου στις καλλιέργειες του μικροφύκου παρουσία τριγλωροφαινολών παρουσιάζονται στο πιο κάτω διάγραμμα (Εικόνα 30). Σχεδόν σε όλους τους χειρισμούς με τις τριγλωροφαινόλες φαίνεται να είναι ενισχυμένη η αναπνοή σε σχέση με την φωτοσυνθετική παραγωγή O_2 (λόγω κατάρρευσης του φωτοσυστήματος II), που υπάρχει στα μπουκαλάκια.



Εικόνα 30. Περιεκτικότητα οξυγόνου στις καλλιέργειες του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* παρουσία τριγλωροφαινολών (0,15mM).

Η βιοαποικοδόμηση των τριγλωροφαινολών ανά καλλιέργεια και ανά κυτταρικό όγκο παρουσιάζεται στα διαγράμματα της Εικόνας 31. Φαίνεται λοιπόν ότι όλες οι τριγλωροφαινόλες μπορούν να βιοαποικοδομηθούν, παρά την έντονη τοξικότητά τους. Όπως διαπιστώθηκε από τα αποτελέσματα της ανάπτυξης, το μικροφύκος δεν επένδυσε τη παραμικρή ενέργεια για να αυξήσει τη βιομάζα του. Απεναντίας όλη την ενέργεια του την έχει επενδύσει στη βιοαποικοδόμηση των τριγλωροφαινολών, κάτι που φαίνεται ξεκάθαρα από τα αποτελέσματα μας. Η βιοαποικοδόμηση ανά κυτταρικό όγκο είναι αρκετά μεγάλη ενώ την 5η ημέρα ένα ικανοποιητικό ποσοστό των τριγλωροφαινολών απομακρύνθηκε από τις καλλιέργειες. Άρα φαίνεται ότι πρωταρχικός στόχος του μικροφύκου είναι η αποτοξικοποίηση του περιβάλλοντος του και στη συγκεκριμένη περίπτωση η βιοαποικοδόμηση των τοξικών τριγλωροφαινολών.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι τριγλωροφαινόλες στο σύνολο τους, ως τοξικές ενώσεις (πιο τοξικές από τις διγλωροφαινόλες) μπορούν να βιοαποικοδομηθούν από το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus*.



Εικόνα 31. Βιοαποικοδόμηση τριχλωροφαινολών (0,15mM) από το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus*, ανά καλλιέργεια και ανά κυτταρικό όγκο.

3.2.3.1 Σύγκριση βιοαποικοδόμησης διχλωροφαινολών και τριχλωροφαινολών

Στο σημείο αυτό θα εξετάσουμε τη στρατηγική που ακολουθεί το μικροφύκος για να αποικοδομήσει τις διχλωροφαινόλες και τις τριχλωροφαινόλες. Καταρχάς οι διχλωροφαινόλες (έκτος 3,5-dcp) φαίνεται να παρουσιάζουν σχετικά καλύτερη ανάπτυξη σε σύγκριση με τις τριχλωροφαινόλες, των οποίων η ανάπτυξη τους είναι μηδενική. Οι διχλωροφαινόλες φαίνεται να οδηγούν σε καταστροφή του PSII τη 2^η μέρα και μετά ενώ οι τριχλωροφαινόλες το κάνουν αυτό από την ώρα που προστίθενται στο θρεπτικό μέσο.

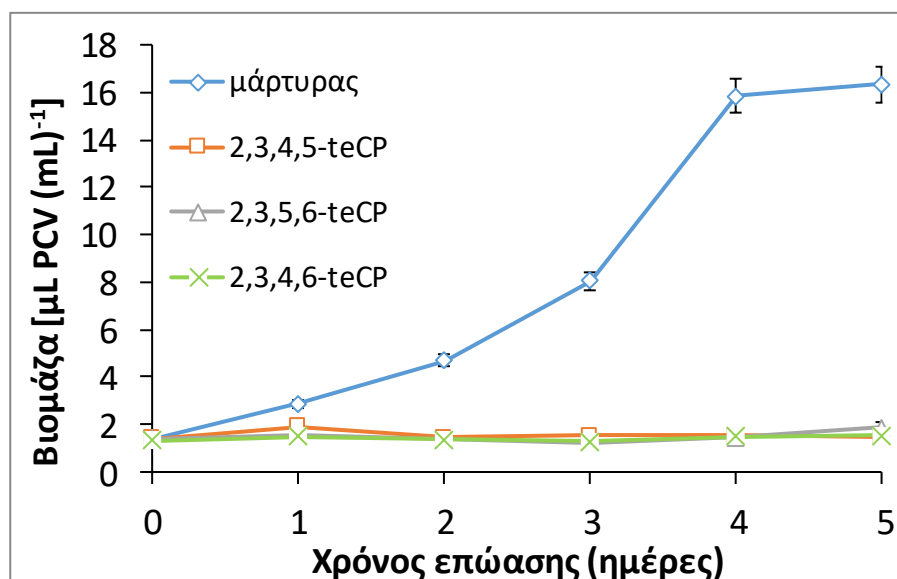
Επιβεβαιώνεται για ακόμη μια φορά ότι με τη αύξηση του αριθμού των υποκαταστατών στο φαινολικό δακτύλιο αυξάνεται και η τοξικότητα της ένωσης. Αύξηση της τοξικότητας σημαίνει ότι το μικροφύκος πρέπει να δαπανήσει περισσότερη ενέργεια για να αποικοδομήσει την ένωση. Στις διχλωροφαινόλες το μικροφύκος φάνηκε να ακολουθεί δυο διαφορετικές στρατηγικές ανάλογα με τη τοξικότητα της ένωσης. Συγκεκριμένα, στις *meta*-υποκαταστημένες διχλωροφαινόλες (τις πιο τοξικές) φάνηκε να επενδύει περισσότερη ενέργεια στη βιοαποικοδόμηση και λιγότερη στη ανάπτυξη. Στις τριχλωροφαινόλες το μικροφύκος ακολουθεί τη ίδια περίπτωση τακτική. Όμως η τοξικότητα του περιβάλλοντος του αυξήθηκε και άρα περισσότερη ενέργεια πρέπει να δοθεί για τη αποικοδόμηση των αντίστοιχων ενώσεων. Κάτι το οποίο και κάνει. Επενδύει όλη του τη διαθέσιμη ενέργεια αποκλειστικά και μόνο στη βιοαποικοδόμηση σταματώντας παράλληλα την ανάπτυξη του. Η ενέργεια που επενδύει είναι μεγαλύτερη από αυτή που επένδυσε για τη βιοαποικοδόμηση των διχλωροφαινολών. Γι'αυτό και η βιοαποικοδόμηση των τριχλωροφαινολών ανά κυτταρικό όγκο είναι μεγαλύτερη από αυτή των διχλωροφαινολών, και φυσικά ακόμη μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των μονοχλωροφαινολών και της φαινόλης.

Από τα παραπάνω μπορεί να αναρωτηθεί κανείς γιατί η 3,5-dCP δεν βιοαποικοδομείται ενώ οι πιο τοξικές τριχλωροφαινόλες, αυτές για παράδειγμα με 2 χλώρια σε *meta*- θέση και ένα χλώριο επιπλέον, βιοαποικοδομούνται; Μια πιθανή εξήγηση μπορεί να είναι η εξής: Η 3,5-dCP έχει δύο μόνο χλώρια τα οποία καταλαμβάνουν και τα δύο τις *meta*- θέσεις του φαινολικού δακτυλίου. Δηλαδή τις πιο ενεργοβόρες θέσεις. Γι'αυτό και το μικροφύκος δεν μπορεί με την ενέργεια που διαθέτει να διασπάσει τους δεσμούς C-Cl και να αποικοδομηθεί έτσι και η ένωση. Οι αντίστοιχες τριχλωροφαινόλες μπορεί να έχουν δύο χλώρια σε *meta*-θέση αλλά το τρίτο χλώριο καταλαμβάνει *ortho*- ή *para*- θέση, άρα τις λιγότερο απαιτητικές σε ενέργεια θέσεις. Αυτό που μπορεί να συμβαίνει είναι αρχικά το μικροφύκος να διασπά το δεσμό μεταξύ του άνθρακα και του τρίτου χλωρίου (*ortho*- ή *para*-). Από τη διάσπαση του δεσμού παίρνει την ενέργεια που ελευθερώνεται και πιθανό να τη χρησιμοποιεί ως επιπλέον ενέργεια για να διασπάσει στη συνέχεια και τους επόμενους δεσμούς. Η βιβλιογραφία ακριβώς επειδή είναι περιορισμένη όσον αφορά την βιοενεργητική διαχείριση της βιοαποικοδόμησης πολυχλωριωμένων φαινολών δεν είμαστε σε θέση αυτή τη στιγμή να δώσουμε άλλο λόγο παρά μόνο αυτόν, ο οποίος είναι εντελώς υποθετικός.

3.2.4 Βιοαποικοδόμηση τετραχλωροφαινολών

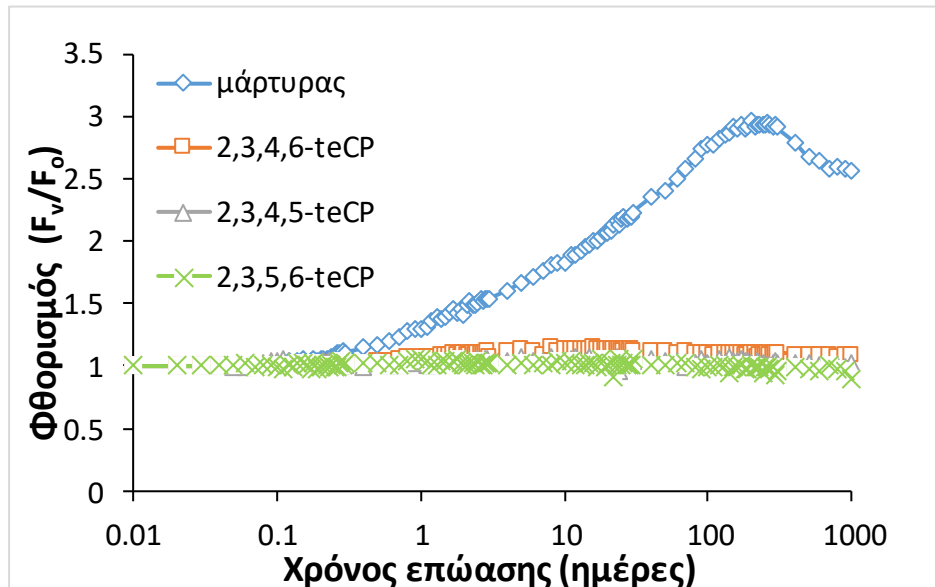
Με τη προσθήκη ενός τέταρτου χλωρίου στο φαινολικό δακτύλιο η τοξικότητα της ένωσης αυξάνεται ακόμη περισσότερο. Οι τετραχλωροφαινόλες εξετάστηκαν με την ίδια λογική που εξετάστηκαν οι προηγούμενες ενώσεις. Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση τους στη ανάπτυξη του μικροφύκου ακολουθώντας στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό και εν τέλει η βιοαποικοδόμηση τους. Εφόσον οι τριχλωροφαινόλες πιο πάνω βρέθηκε να βιοαποικοδομούνται, παρόλη τη τοξικότητα τους, το ίδιο ενδεχόμενο ίσως να συμβαίνει και με τις τετραχλωροφαινόλες.

Στο διάγραμμα που ακολουθεί (Εικόνα 32) παρουσιάζεται η ανάπτυξη του μικροφύκου παρουσία τετραχλωροφαινολών. Φαίνεται να επικρατεί το ίδιο σκηνικό με εκείνο της ανάπτυξης του μικροφύκου παρουσία τριχλωροφαινολών. Η βιομάζα του μικροφύκου παραμένει και εδώ σταθερή από τη αρχή του πειράματος μέχρι το τέλος. Άρα η έντονη τοξικότητα των ενώσεων, που έχουν προστεθεί στο θρεπτικό μέσο, δεν δίνει την δυνατότητα στο μικροφύκο να αναπτυχθεί. Εφόσον όμως στη προηγούμενη ενότητα βρέθηκε ότι το μικροφύκος χρησιμοποιούσε τα ενεργειακά του αποθέματα στη βιοαποικοδόμηση τριχλωροφαινολών τότε ίσως ισχύει το ίδιο και στη περίπτωση των τετραχλωροφαινολών.



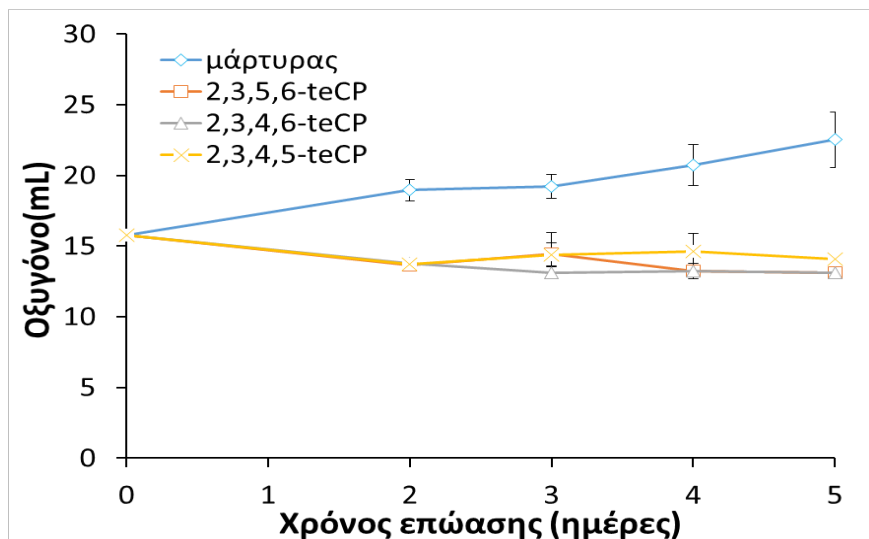
Εικόνα 32. Μεταβολή της βιομάζας του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* παρουσία 0,15mM τετραχλωροφαινολών

Με τα αποτελέσματα της ανάπτυξης συμφωνούν και τα αποτελέσματα του επαγωγικού φθορισμού (Εικόνα 33). Γίνεται και εδώ ορατή η έντονη τοξικότητα των τετραχλωροφαινολών αφού οι αντίστοιχες καμπύλες επαγωγικού φθορισμού παρουσιάζονται ως ευθείες γραμμές. Η προσθήκη των τετραχλωροφαινολών οδήγησε σε ολοκληρωτική καταστροφή των PSII της φωτοσυνθετικής μονάδας του μικροφύκου. Γι'αυτό και οι μετρήσεις μας για τις παραμέτρους του JIP-test δεν ήταν ανιχνεύσιμες.



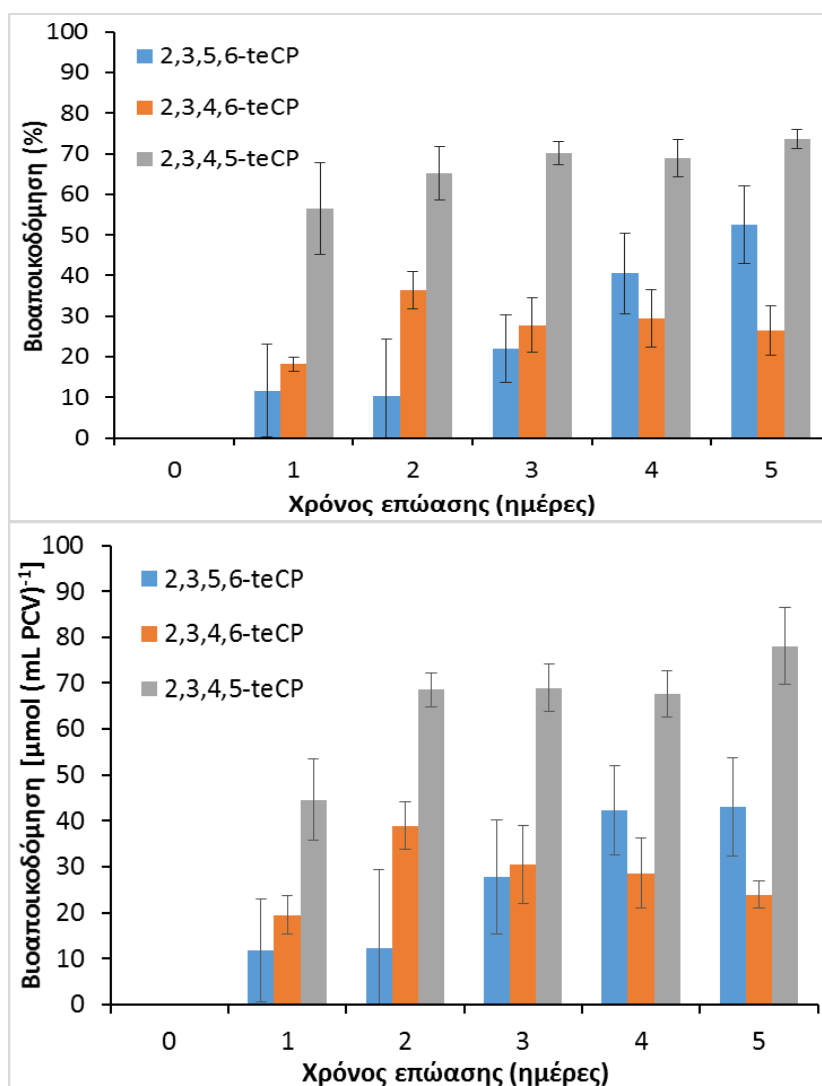
Εικόνα 33. Καμπύλες επαγωγικού φθορισμού για τις μεταχειρίσεις με τις τετραχλωροφαινόλες (μετά από επώαση 3h)

Από μετρήσεις στη αέρια χρωματογραφία που αφορούσαν τη περιεκτικότητα του O_2 στις καλλιέργειες του μικροφύκου κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος, προέκυψε το πιο κάτω διάγραμμα (Εικόνα 34). Σε σύγκριση με τον μάρτυρα, όπου η φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου ήταν μεγαλύτερη από τη κατανάλωση οξυγόνου μέσω της αναπνοής, στους χειρισμούς με τις τετραχλωροφαινόλες δεν φαίνεται να συμβαίνει αυτό. Αυτό που φαίνεται να υπάρχει σε όλους τους χειρισμούς των τετραχλωροφαινολών είναι μια σχετική ισορροπία μεταξύ παραγωγής οξυγόνου (από τη φωτοσύνθεση) και κατανάλωσης οξυγόνου (από τη αναπνοή).



Εικόνα 34. Περιεκτικότητα οξυγόνου στις καλλιέργειες του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus*, παρουσία τετραχλωροφαινολών.

Η βιοαποικοδόμηση των τετραχλωροφαινολών παρουσιάζεται στα διαγράμματα της Εικόνας 35. Το πάνω διάγραμμα αντιπροσωπεύει τη βιοαποικοδόμηση ανά καλλιέργεια ενώ το κάτω διάγραμμα αντιπροσωπεύει τη βιοαποικοδόμηση ανά κυτταρικό όγκο. Αποδεικνύεται ότι και οι τετραχλωροφαινόλες, μπορούν να βιοαποικοδομηθούν από το μικροφύκος. Λόγω της έντονης τοξικότητας τους το μικροφύκος επένδυσε όλη την ενέργεια του αποκλειστικά και μόνο στη βιοαποικοδόμηση κάτι το οποίο φαίνεται και από τα αποτελέσματα της ανάπτυξης. Η βιομάζα του μικροφύκους παραμένει σταθερή. Άρα κάθε κύτταρο έχει να αντιμετωπίσει-βιοαποικοδομήσει μεγάλη ποσότητα της τοξικής ένωσης (μεγάλη βιοαποικοδόμηση ανά κυτταρικό όγκο). Αυτό οδήγησε άμεσα σε αύξηση της βιοαποικοδόμησης ανά καλλιέργεια, όπου την 5^η ημέρα ένα ποσοστό 74%, 53%, και 27% των 2,3,4,5-teCP, 2,3,5,6-teCP, 2,3,4,6-teCP αντίστοιχα απομακρύνθηκε από τις καλλιέργειες του μικροφύκους. Η χαμηλή βιοαποικοδόμηση της 2,3,4,6-teCP, πιθανόν βάσει του κεντρικού βιοενεργητικού μοντέλου που αναδεικνύεται από όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, οφείλεται στο ότι έχει μόνο ένα χλώριο στην *meta*- θέση, ενώ αντίστοιχα οι άλλες teCPs έχουν δύο.



Εικόνα 35. Βιοαποικοδόμηση τετραχλωροφαινολών (0.15mM) ανά καλλιέργεια και ανά κυτταρικό όγκο από το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus*.

3.2.4.1 Σύγκριση βιοαποικοδόμησης τριχλωροφαινολών και τετραχλωροφαινολών.

Η βιοενεργητική στρατηγική που ακολουθεί το μικροφύκος για τη βιοαποικοδόμηση τετραχλωροφαινολών δεν φαίνεται να διαφέρει από αυτή που ακολουθεί για τη βιοαποικοδόμηση των τριχλωροφαινολών. Τόσο οι τριχλωροφαινόλες όσο και οι τετραχλωροφαινόλες είναι ενώσεις με έντονη τοξικότητα. Αυτό αποδεικνύεται από τη παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μικροφύκου, τη ολοκληρωτική κατάρρευση των PSII, τις μη ανιχνεύσιμες τιμές των παραμέτρων του JIP-test. Παρόλα αυτά βιοαποικοδομούνται και μάλιστα με υψηλότερο ρυθμό από μόνο- και δι-χλωροφαινόλες. Το μικροφύκος και στις δύο περιπτώσεις επενδύει την ενέργεια του αποκλειστικά και μόνο στη βιοαποικοδόμηση, αφού πρωταρχικός του στόχος όταν η τοξικότητα αυξάνεται, είναι να αποτοξικοποιήσει το περιβάλλον του. Η βιομάζα του παραμένει σταθερή καθόλη τη διάρκεια του πειράματος, τόσο στις τριχλωροφαινόλες όσο και στις τετραχλωροφαινόλες, όπως προκύπτει και από τα αποτελέσματα μας (Εικόνα 28,32).

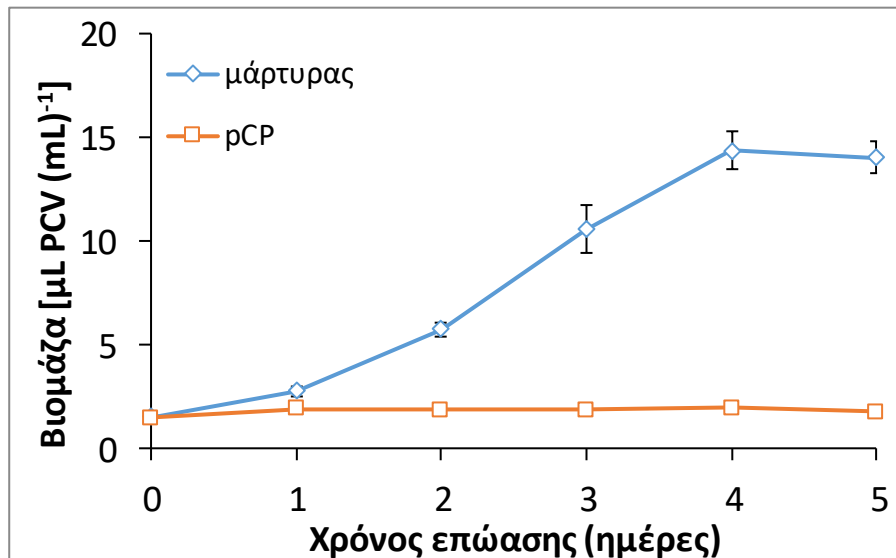
Με τη αύξηση όμως του αριθμού των υποκαταστατών αυξάνεται η τοξικότητα της ένωσης, κάτι το οποίο διαπιστώθηκε από τα μέχρι τώρα αποτελέσματα μας. Κατά αντιστοιχία, αύξηση της τοξικότητας ισοδυναμεί με μεγαλύτερη απαιτούμενη ενέργεια για βιοαποικοδόμηση. Αυτό γιατί απαιτείται η απόσπαση περισσότερων υποκαταστατών-χλωρίων, πριν από τη σχάση του φαινολικού δακτυλίου. Κάτι το οποίο μεταφράζεται σε μια πιο ενεργοβόρα διαδικασία. Άρα το μικροφύκος για τη βιοαποικοδόμηση των τετραχλωροφαινολών πρέπει να δαπανήσει περισσότερη ενέργεια, από ότι για την βιοαποικοδόμηση των τριχλωροφαινολών. Ο λόγος είναι το επιπλέον τέταρτο χλώριο. Γι' αυτό η βιοαποικοδόμηση των τετραχλωροφαινολών ανά κυτταρικό όγκο είναι μεγαλύτερη κάτι που οδηγεί και σε μεγαλύτερη βιοαποικοδόμηση ανά καλλιέργεια. Και στις τριχλωροφαινόλες σημειώνεται μεγάλη βιοαποικοδόμηση αλλά όχι τόσο μεγάλη όσο σημειώνεται στις τετραχλωροφαινόλες. Φαίνεται λοιπόν ότι με τη αύξηση της τοξικότητας αυξάνεται και η βιοαποικοδόμηση τόσο ανά κυτταρικό όγκο όσο και ανά καλλιέργεια.

3.2.5 Βιοαποικοδόμηση πενταχλωροφαινόλης

Για τη ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, προστέθηκε σε καλλιέργειες του μικροφυκούς *Scenedesmus obliquus* η τελευταία προς μελέτη ένωση. Αυτή είναι η πενταχλωροφαινόλη, η πλήρως χλωριωμένη φαινολική ένωση. Πέντε χλώρια υποκαταστάτες σημαίνει από τη μία αυξημένη τοξικότητα και από τη άλλη μεγαλύτερη απαιτούμενη ενέργεια για βιοαποικοδόμηση της.

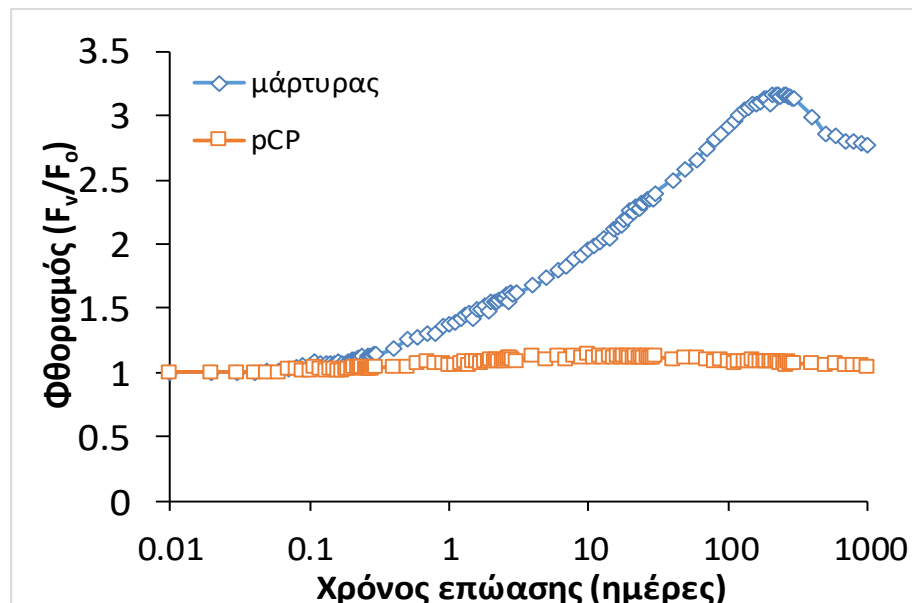
Τα πειράματα έδειξαν ότι το μικροφύκος παρουσία πενταχλωροφαινόλης δεν αναπτύσσεται καθόλου, όπως προκύπτει και από το αντίστοιχο διάγραμμα της Εικόνας 36. Αυτό ήταν αναμενόμενο, με βάση τα αντίστοιχα αποτελέσματα που αφορούσαν τις τριχλωροφαινόλες και τις τετραχλωροφαινόλες αλλά και γνωρίζοντας το πόσο τοξική είναι η

πενταχλωροφαινόλη. Άρα εφόσον δεν αναπτύσσεται, εφόσον δηλαδή δεν επενδύει την ενέργεια του για να αυξήσει τη βιομάζα του ίσως την ενέργεια του να την επενδύει στη βιοαποικοδόμηση της έντονης σε τοξικότητα πενταχλωροφαινόλης.



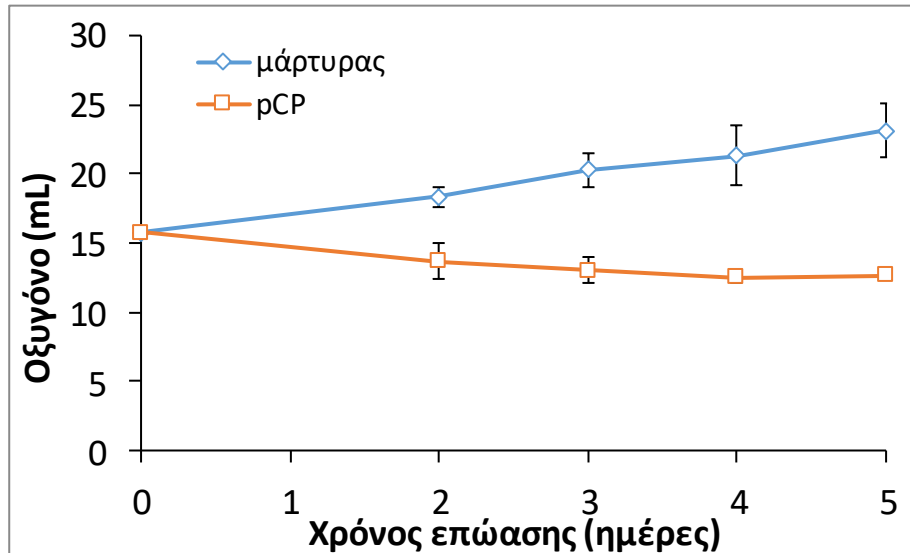
Εικόνα 36. Μεταβολή της βιομάζας του χλωροφύου *Scenedesmus obliquus* παρουσία πενταχλωροφαινόλης (0,15 mM)

Το διάγραμμα του επαγωγικού φθορισμού για το χειρισμό με την pCP (Εικόνα 37) επιβεβαιώνει την έντονη τοξικότητα της, που οδήγησε στη ολοκληρωτική καταστροφή των PSII αμέσως μετά τη προσθήκη της στις καλλιέργειες του μικροφύκου.



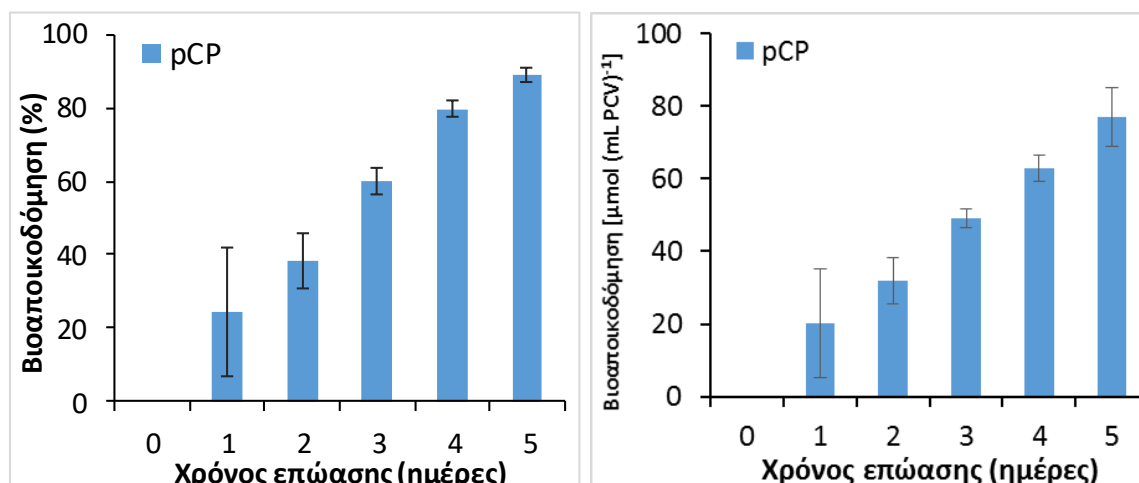
Εικόνα 37. Καμπύλες επαγωγικού φθορισμού για τη μεταχείριση με την πενταχλωροφαινόλη (μετά από επώαση 3h)

Όσο αφορά τη περιεκτικότητα του O₂ στις καλλιέργειες του μικροφύκου, φαίνεται να υπάρχει διαφοροποίηση του χειρισμού της pCP από το χειρισμό του μάρτυρα. Στο μάρτυρα η φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου είναι αυξημένη. Παρουσία pCP το μικροφύκος παρουσιάζει μια σχετική μείωση, λόγω της αναπνευστικής δέσμευσης O₂, αλλά και του περιορισμού της φωτοσυνθετικής παραγωγής O₂ (κατάρρευση PSII) (Εικόνα 38).



Εικόνα 38. Περιεκτικότητα οξυγόνου στις καλλιέργειες του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus*, παρουσία πενταχλωροφαινόλης.

Η βιοαποικοδόμηση της pCP ανά καλλιέργεια και ανά κυτταρικό όγκο παρουσιάζεται στο διάγραμμα της Εικόνας 39. Φαίνεται λοιπόν ότι η pCP, παρά την έντονη τοξικότητα της μπορεί να βιοαποικοδομηθεί. Η παρουσία πέντε χλωρίων στο φαιολικό δακτύλιο έχει αυξήσει σημαντικά το βαθμό δυσκολίας της βιοαποικοδόμησης. Έτσι το μικροφύκος επενδύει ένα πολύ μεγάλο ποσό της ενέργειας του, όπως αυτή του προσφέρεται από τη γλυκόζη, αποκλειστικά και μόνο στη βιοαποικοδόμηση. Αυτό φαίνεται μέσα από τη μεγάλη βιοαποικοδόμηση ανά κυτταρικό όγκο και ανά καλλιέργεια που σημειώνεται στα αντίστοιχα διαγράμματα. Χαρακτηριστική είναι η 5^η μέρα διεξαγωγής του πειράματος, όπου ένα ποσοστό 90% της pCP απομακρύνθηκε από τις καλλιέργειες του μικροφύκου, υπήρξε δηλαδή σχεδόν πλήρη βιοαποικοδόμηση της. Αυτό επιβεβαιώνει ότι οι επλεγμένες συνθήκες καλλιέργειας είναι οι πλέον κατάλληλες, ακόμη και για την pCP, όπου τα ενεργειακά αποθέματα δεν αποτελούν περιοριστικό παράγοντα, οπότε η σωστή διαχείριση της ενέργειας από το μικροφύκος, οδηγεί σε αποτοξικοποίηση του περιβάλλοντος του που του εξασφαλίζει την επιβίωση.



Εικόνα 39. Βιοαποικοδόμηση της πενταχλωροφαινόλης (0,15Mm) ανά καλλιέργεια και ανά κυτταρικό όγκο από το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus*.

3.2.5.1 Σύγκριση βιοαποικοδόμησης τετραχλωροφαινόλων και πενταχλωροφαινόλης

Το μικροφύκος ακολουθεί την ίδια στρατηγική για τη αποικοδόμηση τόσο της πενταχλωροφαινόλης όσο και των τετραχλωροφαινόλων αλλά και των υπόλοιπων φαινολικών ενώσεων. Οι τετραχλωροφαινόλες και η πενταχλωροφαινόλη είναι ενώσεις με έντονη τοξικότητα λόγω του αριθμού των υποκατεστημένων χλωρίων που φέρουν. Με τη παρουσία τους στο μέσο καλλιέργειας οδηγούν σε αναστολή της ανάπτυξης και σε ολοκληρωτική καταστροφή των PSII.

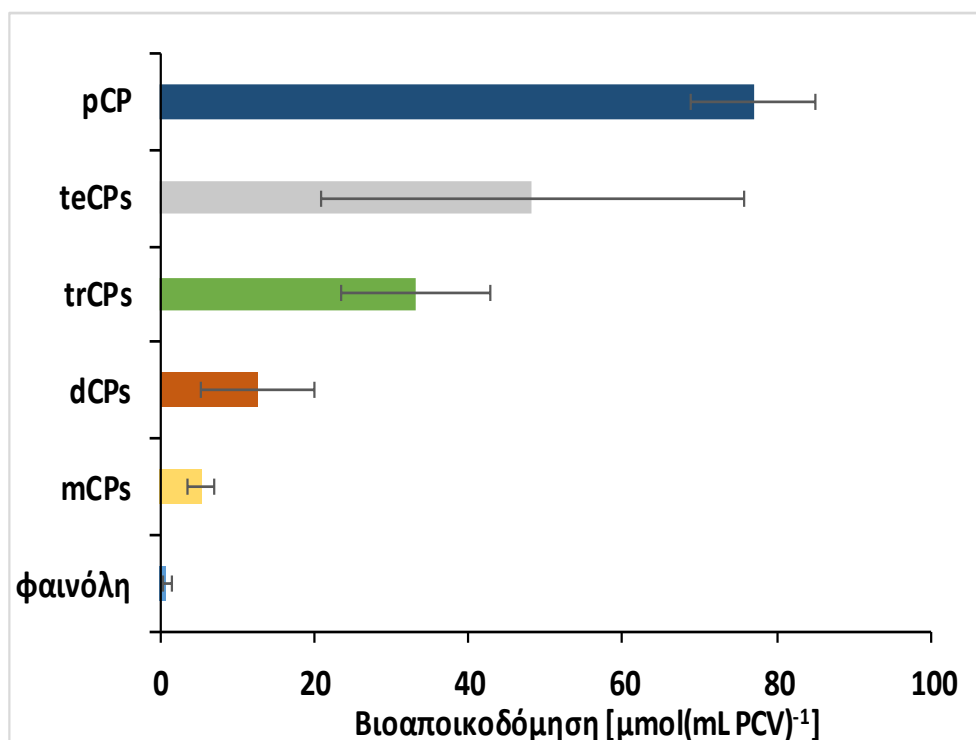
Εφόσον πρόκειται για τοξικές ενώσεις το μικροφύκος επενδύει όλη τη ενέργεια του στη βιοαποικοδόμηση προκειμένου έτσι να αποτοξικοποιήσει το περιβάλλον του με τη χρήση του οργανικού άνθρακα (γλυκόζη) που περιέχει το θρεπτικό του μέσο. Η διαφορά φαίνεται να υπάρχει στη απαιτούμενη ενέργεια που χρειάζεται να επενδύσει προκειμένου να τις βιοαποικοδομήσει και που οφείλεται στο αριθμό των υποκατεστημένων χλωρίων που φέρει η κάθε μία. Η πενταχλωροφαινόλη φέρει ένα επιπλέον χλώριο από τις αντίστοιχες τετραχλωροφαινόλες. Αυτό τη κάνει πιο τοξική. Έτσι το μικροφύκος επενδύει περισσότερη ενέργεια για τη βιοαποικοδόμηση της. Αυτό φαίνεται μέσα από τη βιοαποικοδόμηση που σημειώνεται ανά κυτταρικό όγκο και ανά καλλιέργεια η οποία είναι μεγαλύτερη στην πενταχλωροφαινόλη από ότι στις τετραχλωροφαινόλες. Όπως προαναφέρθηκε αύξηση της τοξικότητας ισοδυναμεί με αύξηση της απαιτούμενης ενέργειας για βιοαποικοδόμηση κάτι που εν τέλει οδηγεί σε μεγαλύτερη βιοαποικοδόμηση.

4. Συμπεράσματα

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η βιοαποικοδόμηση χλωριωμένων φαινολικών ενώσεων από το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus* είναι μια βιοενεργητική διαδικασία. Το μικροφύκος ανάλογα με τις συνθήκες τοξικότητας διαχειρίζεται με τέτοιο τρόπο τη ενέργεια του ώστε να την επενδύσει, όπου είναι πιο απαραίτητο, στη βιοαποικοδόμηση ή στην ανάπτυξη. Αποδείχθηκε για ακόμη μια φορά ότι η τοξικότητα της ένωσης αυξάνεται με τη αύξηση του αριθμού των υποκατεστημένων χλωρίων στο φαινολικό δακτύλιο, με τη σειρά τοξικότητας των χλωροφαινολών να είναι η ακόλουθη μονοχλωροφαινόλες < διχλωροφαινόλες < τριχλωροφαινόλες < τετραχλωροφαινόλες < πενταχλωροφαινόλη (από τις λιγότερο τοξικές στις περισσότερες τοξικές).

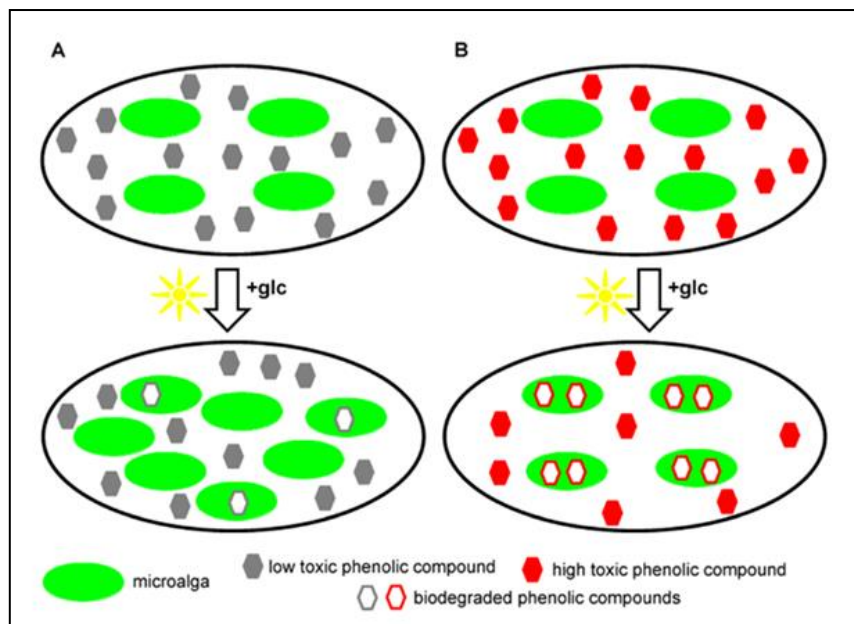
Οι μονοχλωροφαινόλες, ενώσεις σχετικά χαμηλής τοξικότητας, δεν έχουν καμία ενοχλητική επίδραση στο μικροφύκος. Όλη η ενέργεια του μικροφύκου επενδύθηκε πρωτίστως στην αύξηση της βιομάζας του. Επειδή η τοξικότητα, μεταξύ άλλων, καθορίζεται και από την συγκέντρωση της φαινολικής ένωσης σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων, η οποία βιοαποικοδόμηση των μονοχλωροφαινολών συμβαίνει τις πρώτες δύο ημέρες (βλ. Εικόνα 22). Την τρίτη ημέρα η καλλιέργεια έχει πενταπλασιάσει τον κυτταρικό όγκο (Εικόνα 19), μειώνοντας περισσότερο την τοξικότητα και σταματώντας επί της ουσίας την βιοαποικοδόμηση (Εικόνα 22). Στις διχλωροφαινόλες η τοξικότητα επηρεάζεται ορατά και από το αριθμό των χλωρίων στην *meta*- θέση. Ενώσεις με χλώριο σε *ortho*- ή *para*- θέσεις είναι λιγότερο τοξικές. Το μικροφύκος επενδύει έτσι περισσότερη ενέργεια στη ανάπτυξη του και λιγότερη στη βιοαποικοδόμηση. Ενώσεις με *meta*- χλώρια είναι πιο τοξικές και το μικροφύκος επενδύει περισσότερη ενέργεια στη βιοαποικοδόμηση παρά στην ανάπτυξη. Με τη περαιτέρω αύξηση της τοξικότητας (τριχλωροφαινόλες, τετραχλωροφαινόλες, πενταχλωροφαινόλη) το μικροφύκος επενδύει όλη τη ενέργεια του στη βιοαποικοδόμηση των ενώσεων.

Αύξηση της τοξικότητας σημαίνει περισσότερη απαιτούμενη ενέργεια για βιοαποικοδόμηση. Έτσι ανά κατηγορία (από διχλωροφαινόλες μέχρι και πενταχλωροφαινόλη) το μικροφύκος επενδύει όλο και περισσότερη ενέργεια στη βιοαποικοδόμηση. Υπάρχει αύξηση της βιοαποικοδόμησης όσο προχωράμε από λιγότερο τοξικές ενώσεις (m-dCPs) σε περισσότερες τοξικές (pCP), τόσο ανά κυτταρικό όγκο όσο και ποσοστιαία ανά καλλιέργεια, όπου αυξάνεται το ποσοστό των ενώσεων που απομακρύνεται από την καλλιέργεια. Παρακάτω παρουσιάζεται το συγκεντρωτικό διάγραμμα βιοαποικοδόμησης των χλωροφαινολών (ανά κατηγορία) και της φαινόλης ανά κυτταρικό όγκο (Εικόνα 40). Φαίνεται ξεκάθαρα η αύξηση της βιοαποικοδόμησης ανά κατηγορία ενώσεων όπως αναφέρθηκε και παραπάνω .



Εικόνα 40. Συγκεντρωτικό διάγραμμα αποικοδόμησης χλωριωμένων φαινολικών ενώσεων και φαινόλης (0,15mM) ανά κυτταρικό όγκο από το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus*.

Το μικροφύκος τελικά φαίνεται να ακολουθεί δύο διαφορετικές στρατηγικές αποτοξικοποίησης. Σε συνθήκες σχετικά μειωμένης τοξικότητας (mCPs, 2,6-dCP, 2,4-dCP) το μικροφύκος χρησιμοποιεί όλα ή τουλάχιστον περισσότερα από τα ενεργειακά του αποθέματα στη αύξηση της βιομάζας του. Με αυτό το τρόπο ο αυξανόμενος αριθμός των κυττάρων του έχει να αντιμετωπίσει μικρότερο αριθμό φαινολικών ενώσεων. Η αποτοξικοποίηση, ακολουθώντας αυτή τη στρατηγική, επέρχεται χωρίς τη δαπάνη επιπλέον ενέργειας (έμμεση αποτοξικοποίηση). Σε συνθήκες αυξημένης τοξικότητας (*meta*-dCPs, trCPs, teCPs, pCP) φαίνεται να επενδύει περισσότερη ή και όλη τη ενέργεια του στη βιοαποικοδόμηση των ενώσεων, ενώ λιγότερη ή καθόλου ενέργεια επενδύει για τη ανάπτυξη του (άμεση αποτοξικοποίηση) (Εικόνα 41).



Εικόνα 41. Οι δύο στρατηγικές που χρησιμοποιεί το μικροφύκος για την βιοαποικοδόμηση χλωροφαινόλων, ανάλογά με τη τοξικότητά τους. (A) έμμεση αποτοξικοποίηση (B) άμεση αποτοξικοποίηση όπως αυτή παρουσιάστηκε από τους Parazi and Kotzabasis (2013).

Με τη παρούσα εργασία έγινε ακόμη ένα βήμα στη μελέτη βιοαποικοδόμησης χλωριωμένων φαινολικών ενώσεων, οι οποίες αποτελούν κύριες μορφές ρύπανσης χερσαίων και υδάτινων οικοσυστημάτων ενώ ταυτόχρονα έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στους ζωντανούς οργανισμούς. Το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus*, θα μπορούσε κάλλιστα να χρησιμοποιηθεί για τη απομάκρυνση των ενώσεων αυτών από το περιβάλλον. Με τη ικανότητα που έχει να διαχειρίζεται με ορθολογικό τρόπο τα ενεργειακά του αποθέματα επιλέγοντας πάντα το καταλληλότερο μονοπάτι αποτοξικοποίησης αποδείχθηκε ότι μπορεί να βιοαποικοδομήσει τις λιγότερο τοξικές μονοχλωροφαινόλες μέχρι και τη πιο τοξική πενταχλωροφαινόλη. Λαμβάνοντας υπόψη ότι μπορούμε να επεμβούμε στα ενεργειακά αποθέματα του μικροφύκου που καθορίζουν τα πλαίσια αντοχής του στο τοξικό περιβάλλον και γνωρίζοντας τη βιοενεργητική στρατηγική του μικροφύκου, όπως αυτή παρουσιάστηκε παραπάνω, μπορούμε πολύ εύκολα και στοχευμένα να χρησιμοποιήσουμε τα μικροφύκη για τη βιοαποικοδόμηση τοξικών αποβλήτων στα πλαίσια μιας «έξυπνης» βιοτεχνολογικής προσέγγισης (smart biotechnology) στο άμεσο μέλλον.

5. Βιβλιογραφία

- Arora, P. K., Bae, H. (2014). Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives. *Microbial Cell Factories*, 13: 31-48.
- Bennett, J. W., Wunch, K. G., Faison, B. D. (2002). *Use of Fungi Biodegradation*. ASM Press Washington, D.C.
- Bishop, N. I., Senger, H. (1971). Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of *Scenedesmus*. *Methods in Enzymology*, 23: 53-66.
- Chader , S., Hacene, H., Agathos , S. N. (2009). Study of hydrogen production by three strains of *Chlorella* isolated from the soil in the Algerian Sahara. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34: 4941-4946.
- Chowdhury, S., Mishra, M., Adarsh, V. K., Mukherjee, A., Thakur, A. R., Chaudhuri, S. R. (2008). Novel Metal Accumulator and Protease Secretor Microbes from East Calcutta Wetland. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4: 255-264.
- Czaplicka, M. (2004). Sources and transformations of chlorophenols in the natural. *Science of the Total Environment*, 322: 21–39.
- Demetriou, G., Neonaki, C., Navakoudis, E., Kotzabasis, K. (2007). Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus—The protective role of polyamines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767: 272-280.
- Field , J. A., Stams , A. J., Kato , M., Schraa , G. (1995). Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 67: 47-77.
- Ge, T., Han, J., Qi, Y., Gu, X., Ma, L., Zhang, C., Naeem, S., Huang, D. (2017). The toxic effects of chlorophenols and associated mechanisms in fish. *Aquatic Toxicology*, 184: 78–93.
- Guyton, K. Z., Loomis, D., Grosse , Y., El Ghissassi , F., Bouvard , V., Tallaa , L., Guhaa, N., Mattocka, H., Straif , K. (2016). Carcinogenicity of pentachlorophenol and some related compounds. *The Lancet Oncology*, 17: 1637–1638.
- Hammel, K. E. (1996). Extracellular free radical biochemistry of ligninolytic fungi. *New Journal of Chemistry*, 20: 195-198.
- Hammouda, O., Gaber, A., Abdel-Raouf , N. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19: 257-275.
- <http://2013.igem.org/Team:TU-Munich/Project/Biodegradation>. (n.d.).
- <https://www.nasa.gov/centers/ames/research/OMEGA/>
- Ioannidis, N. E., Melidou, i., Moschou, P. N., Pankou, C., Gemes, K., Valassakis, C., Andronis, E. A, Beris, D., Haralampidis, K., Roussis, A., Karamanoli, A., Matsi, T., Kotzabasis, K., Constantinidou, H. I., Roubelakis-Angelakis, K. A. (2016). Silencing S-Adenosyl-L-Methionine Decarboxylase (SAMDC) in *Nicotiana tabacum* Points at a Polyamine-Dependent Trade-Off between Growth and Tolerance Responses. *Frontiers in Plant Science*.

- Jha, A. K., Singh, K., Sharma, C., Singh, S. K., Gupta, P. K. (2011). Assessment of Methane and Nitrous Oxide Emissions from Livestock in India. *Journal of Earth Science & Climatic Change*, 1, 107.
- Kishino, T., Kobayashi, K. (1996). Acute toxicity and structure-activity relationships of chlorophenols in fish. *Water Research*, 30: 387-392.
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C. Q., Dubois-Calero, N. (2008). Biofuels from Microalgae. *Biotechnology Progress*, 24: 815-820.
- 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. *Journal of Plant Physiology*, 161: 715-724.
- Lovell, C. R., Eriksen, N. T., Lewitus, A. J., Chen, Y. P. (2002). Resistance of the marine diatom *Thalassiosira sp.* to toxicity of phenolic compounds. *Marine Ecology Progress Series*, 229: 11-18.
- Lütz, C., Navakoudis, E., Seidlitz, H. K., Kotzabasis, K. (2005). Simulated solar irradiation with enhanced UV-B adjust plastid- and thylakoid-associated polyamine changes for UV-B protection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1710: 24-33.
- Michałowicz, J., & Duda, W. (2007). Phenols – Sources and Toxicity. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16: 347-362.
- Michałowicz, J., Posmyk, M., Duda, W. (2009). Chlorophenols induce lipid peroxidation and change antioxidant parameters in the leaves of wheat (*Triticum aestivum L.*). *Journal of Plant Physiology*, 166: 559–568.
- Nair, C. I., Jayachandran, K., Shashidhar, S. (2008). Biodegradation of phenol. *African Journal of Biotechnology*, 7: 4951-4958.
- Navakoudis, E., Vrentzou, K., Kotzabasis, K. (2007). A polyamine- and LHCII protease activity-based mechanism regulates the plasticity and adaptation status of the photosynthetic apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767: 261-271.
- Nazos, T. T., Kokorakis, E. J., Ghanotakis, D. F. (2016). Metabolism of xenobiotics by *Chlamydomonas reinhardtii*: Phenol degradation under conditions affecting photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 131: 31-40.
- Olaniran, A. O., Igbinsola, E. O. (2011). Chlorophenols and other related derivatives of environmental concern. *Chemosphere*, 83: 1297–1306.
- Oswald, W. J., Asce, A. M., Gottas, H. B. (1957). Photosynthesis in sewage treatment. *Transactions American Society of Civil Engineers*, 122: 73-105.
- Papazi, A., Kotzabasis, K. (2007). Bioenergetic strategy of microalgae for the biodegradation of phenolic compounds-Exogenously supplied energy and carbon sources adjust the level of biodegradation. *Journal of Biotechnology*, 129: 706-716.
- Papazi, A., Kotzabasis, K. (2008). Inductive and resonance effects of substituents adjust the microalgal biodegradation of toxic phenolic compounds. *Journal Biotechnology*, 135: 366-73.
- Papazi, A., Kotzabasis, K. (2013). “Rational” Management of Dichlorophenols Biodegradation by the Microalga *Scenedesmus obliquus*. *PLoS ONE* 8,4 e61628.

- Papazi, A., Andronis, E., Ioannidis, N. E., Chaniotakis, N., Kotzabasis, K. (2012). High Yields of Hydrogen Production Induced by Meta-Substituted Dichlorophenols Biodegradation from the Green Alga *Scenedesmus obliquus*. PLoS ONE 7,11 e49037.
- Peng, Y., Chen, J., Lu, S., Huang, J., Zhang, M., Buekens, A., Li, X., Yan, J. (2016). Chlorophenols in Municipal Solid Waste Incineration: A review. Chemical Engineering Journal, 292: 398–414.
- Petroutsos, D., Katapodis, P., Christakopoulos, P., Kekos, D. (2007). Removal of p-chlorophenol by the marine microalga *Tetraselmis marina*. Journal of applied phycology, 19: 485-490.
- Petroutsos, D., Katapodis, P., Samiotaki, M., Panayotou, G., Kekos, D. (2008). Detoxification of 2,4-dichlorophenol by the marine microalga *Tetraselmis marina*. Phytochemistry, 69: 707-714.
- Priority Pollutant List. (2014). United States: Environmental Protection Agency (EPA).
- Public Health Statement. (1999). Toxicological profile of chlorophenols. Georgia: Agency of Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).
- Raeid , M. A. (2011). Unraveling the role of cyanobacterial mats in the cleanup of oil pollutants using modern molecular and microsensor tools. World Congress on Biotechnology, 21-23.
- Ravanel, P., Taillandier, G., Tissut, M., Benoit-Guyod, J. L. (1985). Effect of chlorophenols on isolated plant mitochondria activities: A QSAR study. Ecotoxicology and Environmental Safety, 9: 300-320.
- Santos de Araujoa, B., Decb, J., Bollagb, J., Pletscha, M. (2006). Uptake and transformation of phenol and chlorophenols by hairy root cultures of *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare*. Chemosphere, 63: 642–651.
- Semple, K. T., Cain, R. B. (1996). Biodegradation of phenols by the alga *Ochromonas danica*. Applied and Environmental Microbiology, 62: 1265–1273.
- Sfakianaki, M., Sfichi, L., Kotzabasis, K. (2006). The involvement of LHCII-associated polyamines in the response of the photosynthetic apparatus to low temperature. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 84: 181-188.
- Sfichi , L., Ioannidis , N., Kotzabasis, K. (2004). Thylakoid-associated Polyamines Adjust the UV-B Sensitive of the Photosynthetic apparatus by means of Light-harvesting Complex II Changes. Photochemistry and Photobiology, 80: 499-506.
- Sinha, S., Chattopadhyay, P., Pan, I., Chatterjee, S., Chanda, P., Bandyopadhyay, D., Das, K., Sen, S. K. (2009). Microbial transformation of xenobiotics for environmental bioremediation. African Journal of Biotechnology, 8: 6016-6027.
- Sivasubramanian, V., Subramanian, V. V., Muthukumar, M. (2010). Bioremediation of Chrome-sludge from an Electroplating Industry Using the Microalga *Desmococcus olivaceus* – a Pilot Study. Journal of Algal Biomass Utilization , 3: 104-128.
- Sridevi, V., V Chandana Lakshmi, M. V., Manasa, M., Sravani, M. (2012). Metabolic pathways for the biodegradation of phenol. International journal of Engineering Science & Advanced Technology, 2: 695-705.

- Steiert, J. G., Pignatello, J. J., Crawford, R. L. (1987). Degradation of chlorinated phenols by a pentachlorophenol-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 907-910.
- Strasser, B. J., Strasser, R. J. (1995). Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions : the JIP-test. Vol V. Kluwer Academic Press, Dordrecht.
- Sua, Y.-H., Zhua, Y.-G. (2006). Bioconcentration of atrazine and chlorophenols into roots and shoots of rice seedlings. *Environmental Pollution*, 139: 32-39.
- Tissut, M., Taillandier, G., Ravanel, P., Benoit-Guyod, J. L. (1987). Effects of chlorophenols on isolated class A chloroplasts and thylakoids: A QSAR study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 13: 32-42.
- Uchida, M., Okuwaki, A. (2003). UV-Vis Spectrophotometric Determination of the Dissociation Constants for Monochlorophenols in Aqueous Solution at Elevated Temperatures. *Journal of Solution Chemistry*, 32: 19-39.
- Voloshin, R. A., Rodionova, M. V., Zharmukhamedov, S. K., Veziroglu, T. N., Allakhverdiev, S. I. (2016). Review: Biofuel production from plant and algal biomass. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41: 17257–17273.
- Wexler, P. (2014). *Encyclopedia of Toxicology*. United States of America: Academic Press.
- Νάζος Θεοχάρης Θ.(2013) Μελέτη της βιοαποικοδόμησης αρωματικών ενώσεων από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*, Μεταπτυχιακή Εργασία, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας.
- Παπαζή Αικατερίνη (2009), Βιοενεργητική Στρατηγική Αποικοδόμησης Φανολικών Ενώσεων από το Χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus*- Βιοτεχνολογικές Προεκτάσεις, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας.