

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



Βιοαποικοδόμηση της φαινόλης από το μικροφύκος
Chlamydomonas reinhardtii κάτω υπό συνθήκες
που επηρεάζουν τη φωτοσύνθεση.



Κοκαράκης Εμμανουήλ
Επιβλέπων καθηγητής: Δημήτριος Φ. Γανωτάκης

Ηράκλειο 2016

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



Βιοαποικοδόμηση της φαινόλης από το μικροφύκος
Chlamydomonas reinhardtii κάτω υπό συνθήκες
που επηρεάζουν τη φωτοσύνθεση.

Κοκαράκης Εμμανουήλ

Επιβλέπων καθηγητής: Δημήτριος Φ. Γανωτάκης

Ηράκλειο 2016

UNIVERSITY OF CRETE
SCHOOL OF SCIENCES AND ENGINEERING
DEPARTMENT OF CHEMISTRY



Biodegradation of phenol by the green microalga
Chlamydomonas reinhardtii under conditions
affecting photosynthesis.

Kokarakis Emmanouil

Supervisor Prof.: Demetrios F. Ghanotakis

Heraklion 2016

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η βιοαποικοδόμηση της φαινόλης από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*. Η βιοαποικοδόμηση της φαινόλης αποδείχθηκε πως ήταν μια δυναμική βιοενεργητική διαδικασία η οποία επηρεάστηκε σε μεγάλο βαθμό από τις αλλαγές στις συνθήκες των καλλιεργειών. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας ή της απουσίας οξικού οξέως στο μέσο καλλιέργειας, η ένταση του φωτισμού και η επάρκεια οξυγόνου. Εκτός από τη βιοαποικοδόμηση, μελέτηθηκε και η επίδραση της φαινόλης στην ανάπτυξη αλλά και τη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μικροφύκου. Τέλος μελετήθηκε η ικανότητα βιοαποικοδόμησης της φαινόλης από κάποια μεταλλαγμένα στελέχη του μικροφύκου.

Από τα αποτελέσματα φάνηκε πως η φαινόλη αποτελεί ένα υπόστρωμα που αναστέλλει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού κυρίως σε συγκεντρώσεις άνω των 2,00 mM. Επιπρόσθετα σε υψηλές συγκεντρώσεις της ουσίας ο μικροοργανισμός βρέθηκε να αποικοδομεί μεγαλύτερες ποσότητες φαινόλης. Σε αυτές τις συγκεντρώσεις εμφανίστηκαν συμπτώματα καταπόνησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μικροφύκου όπως εκφράστηκαν μέσω των μετρήσεων επαγωγικού φθορισμού (JIP-test) αλλά και μέσω των μετρήσεων των φωτοσυνθετικών χρωστικών. Όλες αυτές οι ανασταλτικές επιπτώσεις της φαινόλης φαίνεται πως οδήγησαν σε αυξημένη αποικοδόμηση της ουσίας όταν αυτή βρισκόταν σε υψηλές συγκεντρώσεις. Επιπλέον υψηλότερη βιοαποικοδόμηση εμφανίστηκε σε συνθήκες απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα από το μέσο καλλιέργειας. Η βιοαποικοδόμηση αποδείχθηκε να είναι μια αερόβια και φωτοελεγχόμενη διαδικασία. Η υψηλή ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας και η επάρκεια οξυγόνου οδήγησαν το μικροφύκος σε αυξημένη αποικοδόμηση της φαινόλης.

Από τις μελέτες μιας σειράς μεταλλαγμένων στελεχών *Chlamydomonas reinhardtii* φάνηκε πως και αυτά είχαν την ικανότητα να αποικοδομήσουν τη φαινόλη.

Με αυτή την εργασία αποδεικνύεται πως η βιοαποικοδόμηση δεν είναι θέμα επιλογής ενός κατάλληλου μικροοργανισμού αλλά των κατάλληλων συνθηκών.

Λέξεις κλειδιά: *Chlamydomonas reinhardtii*, φαινόλη, βιοαποικοδόμηση, φωτοσύνθεση, βιοενεργητική, καταπόνηση

Abstract

In the present work the biodegradation of phenol by the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* was studied. Biodegradation of phenol proved to be a dynamic bioenergetic process, significantly affected by the changes in culture conditions.

More specifically the presence or absence of acetate in the culture medium, light intensity and oxygen availability was studied. Impact of phenol on culture growth and structure and function of the photosynthetic apparatus was studied as well. Finally biodegradation ability of some *Chlamydomonas* mutant strains was studied as well.

Results showed that phenol is a growth inhibitive substrate, especially in concentrations over 2.00 mM. In addition higher initial concentrations of phenol led to higher biodegradation ability. In these concentrations the microalga was found able to biodegrade higher amounts of phenol. High concentrations of phenol led to evaluation of typical stress effects as they were expressed by the induced fluorescence (JIP-test) measurements and quantification of photosynthetic pigments content.

In all cases, increased stress and inhibitory effects evaluated by high concentrations of phenol led to enhanced biodegradation. In addition biodegradation was higher in acetate- limited cultures. Biodegradation proved to be an aerobic and photoregulated process. Higher light intensity and oxygen availability led to increased biodegradation of phenol.

Chlamydomonas reinhardtii mutant strains showed ability in biodegrading phenol as well.

This study proves that biodegradation does not depend on selection of the appropriate microorganism but in the selection of appropriate culture conditions.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, phenol, biodegradation, photosynthesis, bioenergetics, stress

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε το χρονικό διάστημα 2015-2016 στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης με επιβλέπων καθηγητή τον Δρ. Δημήτριο Γανωτάκη. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για τις υψηλού επιπέδου σπουδές που μου προσέφερε από το 2012 μέχρι και σήμερα σε προπτυχιακό επίπεδο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω τον επιβλέποντα Καθηγητή μου Δρ. Δημήτριο Γανωτάκη που μου επέτρεψε να εργαστώ στο εργαστήριό του για την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές που μου έχει δώσει.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου τον Δημήτρη, τον Γιώργο, την Ελευθερία, τον Γρηγόρη, τον Άρη και φυσικά δεν θα μπορούσα να παραλείψω τον αγαπητό Θεοχάρη Νάζο. Τους ευχαριστώ ιδιαίτερα καθώς με βοήθησαν αρκετά έτσι ώστε να προσαρμοστώ στο εργαστήριο.

Ευχαριστώ πάρα πολύ τον Χάρη που με βοήθησε να καταλάβω τις τεχνικές του εργαστηρίου αλλά και την υπομονή που υπέδειξε καθώς περάσαμε αρκετές ώρες μαζί. Καθώς δεν τον θεωρώ απλά ως διδακτορικό φοιτητή που με βοήθησε μου αλλά και στενό φίλο.

Επίσης σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κατερίνα Κουρκουπά και τον Δημήτρη Δέδογλου που ήταν στο διπλανό εργαστήριο του Αναπληρωτή καθηγητή του κύριου Τσιώτη. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τον κολλητό μου φίλο Στέλιο Παναγιωτάκη που μου συμπαραστάθηκε όλο αυτόν τον καιρό και στα εύκολα και στα δύσκολα.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα άλλα παιδιά Λέανδρο Ζορμπά που τυγχάνει να είμαστε και φίλοι και την Άλκηστις Σκλαβούνου, που έκαναν την διπλωματική τους εργασία στο εργαστήριο και περάσαμε αρκετές ώρες μαζί. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Άλκηστι που με βοήθησε σε αρκετά πειράματα κατά την διάρκεια της εργασίας μου.

Για το τέλος δεν θα μπορούσα να ξεχάσω τους γονείς μου καθώς με την αγάπη τους με βοήθησαν αρκετά και μου έδωσαν δύναμη για να συνεχίσω. Σας ευχαριστώ όλους και εύχομαι τα καλύτερα.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

PCV:	Όγκος καθιζαμένων κυττάρων ανά mL καλλιέργειας.
Acetate:	Συνθήκη με θρεπτικό TAP με οξικό οξύ ως πηγή άνθρακα στο φως.
Limit C:	Συνθήκη με θρεπτικό TAP από το οποίο απουσιάζει το οξικό οξύ στο φως.
t:	Χρόνος σε ημέρες.
X ₀ :	Η συνολική βιομάζα κυττάρων στην καλλιέργεια(mg) στην έναρξη του πειράματος.
X:	Η συνολική κυτταρική βιομάζα στην καλλιέργεια (mg) σε χρονικό διάστημα t.
S ₀ :	Η συνολική ποσότητα φαινόλης(mg) στην καλλιέργεια στην αρχή του πειράματος.
S:	Η συνολική ποσότητα φαινόλης(mg) στην καλλιέργεια σε χρονικό διάστημα t.
μ:	Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης.
Y _{X/S} :	Λόγος απόδοσης, υπολογισμένος από την εξίσωση $Y_{X/S} = (X - X_0) / (S_0 - S)$.
F ₀ :	Ο ελάχιστος φθορισμός σε χρόνο t ₀ όταν όλα τα ενεργά φωτοσυνθετικά κέντρα είναι ενεργά.
F _{max} :	Ο μέγιστος φθορισμός σε χρόνο t όταν όλα τα ενεργά φωτοσυνθετικά κέντρα είναι ενεργά.
F _v :	Τιμή του φθορισμού που υπολογίζεται από $(F_{max} - F_0)$.
F _v /F _{max} :	Φωτοσυνθετική απόδοση.
ABS/RC:	Μέγεθος λειτουργικής φωτοσυνθετικής κεραίας ανά κέντρο αντίδρασης.
DI ₀ /RC:	Διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης υπό μορφή θερμότητας.
RC/CS ₀ :	Πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης.
TR ₀ /ABS:	Κβαντική απόδοση της πρωταρχικής φωτοχημείας.
C _a :	Συγκέντρωση χλωροφύλλης-a εκφρασμένη σε mg χρωστικής ανά mL PCV.
C _b :	Συγκέντρωση χλωροφύλλης-b εκφρασμένη σε mg χρωστικής ανά mL PCV.
C _{x+c} :	Συγκέντρωση ολικών καροτενοειδών και ξανθοφυλλών εκφρασμένη σε mg χρωστικής ανά mL PCV.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

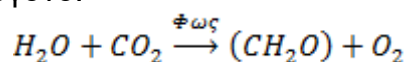
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
1.1 Φωτοσύνθεση	10
1.2 Φαινολικές ενώσεις (Φαινόλες)	12
1.3 Τοξικότητα φαινολικών ενώσεων.	13
1.3.1 Φαινόλη.....	14
1.4 Εισαγωγή στην βιοαποκατάσταση	14
1.5 Εισαγωγή στην βιοαποικοδόμηση	15
1.6 Βιοαποικοδόμηση φαινόλης.....	16
1.7 Μικροφύκη.....	17
1.8 Το μικροφύκος <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	19
1.9 Επισκόπηση του μεταβολισμού του άνθρακα στο μικροφύκος <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ...	20
1.10 Κινητικά μοντέλα ανάπτυξης μικροοργανισμών παρουσία ενώσεων που αναστέλλουν την ανάπτυξη.....	22
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	24
2.1 Οργανισμός	25
2.2 Θρεπτικό μέσο και συνθήκες ανάπτυξης.	25
2.3 Υπολογισμός κυτταρικής συγκέντρωσης.	27
2.4 Παρασκευή καλλιεργείων για μελέτη βιοαποικοδόμησης	27
2.4.1 Παρασκευή καλλιεργείων για μελέτη βιοαποικοδόμησης σε φως και σκοτάδι	27
2.4.2 Παρασκευή καλλιεργείων για μελέτη βιοαποικοδόμησης καλλιεργείων παρουσία N_2 ή O_2 ..	28
2.5 Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού	29
2.5.1 Αρχή λειτουργίας της μεθόδου	29
2.5.2 Μετρήσεις Επαγωγικού Φθορισμού σε δείγματα καλλιεργείων <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	29
2.6 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση φαινολικών ενώσεων με τη χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης.....	31
(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)	31
2.6.1 Αρχή της μεθόδου	31
2.6.2 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση φαινολικών ενώσεων με HPLC.....	32
2.7 Φασματοφωτομετρία.....	33
2.8 Μέτρηση έκλυσης οξυγόνου(O_2)	34

2.8.1. Αρχή της μεθόδου	34
2.8.2 Πολαρογραφικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικού ρυθμού παραγωγής οξυγόνου.	34
2.9 Υπολογισμός παραμέτρων που σχετίζονται με την ανάπτυξη.....	35
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	36
3.1 Επίδραση της παρουσίας ή απουσίας εναλλακτικού οργανικού άνθρακα στη βιοαποικοδόμηση της φαινόλης από το μικροφύκος <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	36
3.1.1 Ανάπτυξη του <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-125 σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων φαινόλης.	36
3.1.2 Επίδραση της φαινόλης στη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μικροφύκου.....	38
3.1.3. Βιοαποικοδόμηση φαινόλης από τα κύτταρα <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-125.....	43
3.1.4 Μελέτη επίδρασης απλού θρεπτικού μέσου ανόργανων αλάτων (HS medium) στη βιοαποικοδόμηση της φαινόλης.	46
3.2. Μελέτη επίδρασης εντάσεως φωτισμού και διαθεσιμότητας οξυγόνου στη βιοαποικοδόμηση της φαινόλης από το μικροφύκος <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-125.	47
3.2.1. Μελέτη επίδρασης έντασης φωτισμού στη βιοαποικοδόμηση της φαινόλης.	47
3.2.2. Μελέτη επίδρασης διαθεσιμότητας οξυγόνου στην βιοαποικοδόμηση της φαινόλης.	50
3.3 Μελέτη βιοαποικοδόμησης της φαινόλης από μεταλλαγμένα στελέχη του <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	51
4.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	55
5.ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	57

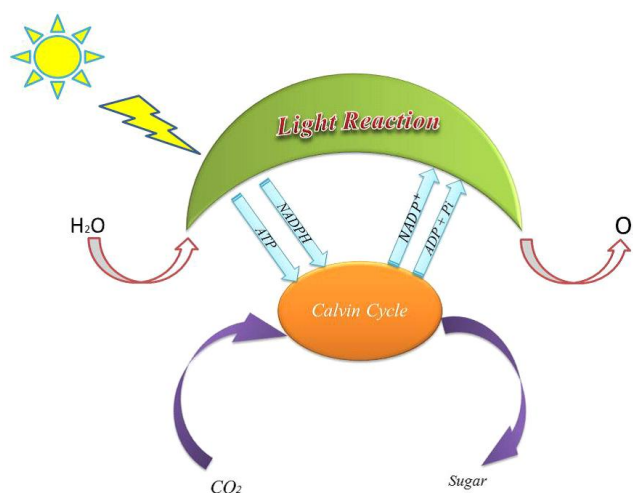
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Φωτοσύνθεση

Η φωτοσύνθεση είναι η πιο σημαντική διεργασία στον πλανήτη. Οι κυριότερες κατηγορίες φωτοσυνθετικών οργανισμών είναι τα φυτά, βακτήρια και τα μικροφύκη. Οι παραπάνω οργανισμοί απορροφούν ηλιακή ακτινοβολία μετατρέπουν το διοξείδιο του άνθρακα της ατμόσφαιρας σε οργανικά προϊόντα. Επίσης ως παραπροϊόν στην αντίδραση παράγεται το οξυγόνο.

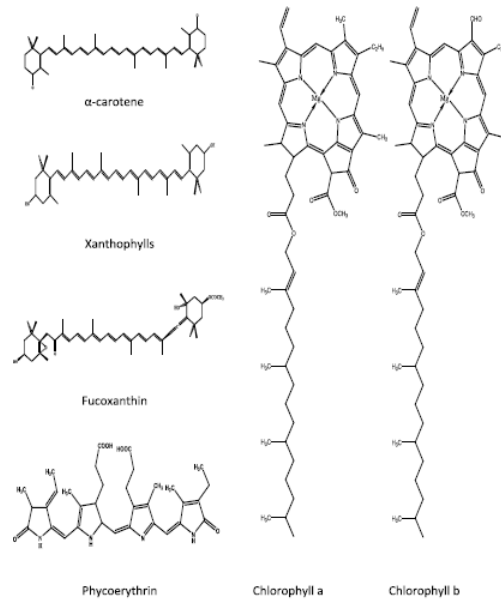


Το βασικό όργανο όπου γίνεται η διαδικασία της φωτοσύνθεσης είναι ο χλωροπλάστης.



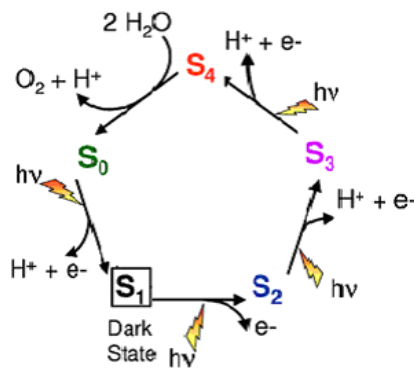
Εικόνα 1 : Διαδικασία φωτοσύνθεσης

Ο χλωροπλάστης αποτελείται από δύο μεμβράνες, όπου εσωτερικά της μεμβράνης περιέχεται το στρώμα στο οποίο βρίσκονται οι θυλακοειδείς μεμβράνες στις οποίες επιτελείται η φωτοσυνθετική διαδικασία. Η απορρόφηση της ακτινοβολίας επιτυγχάνεται με τις φωτοσυνθετικές χρωστικές που είναι οι χλωροφύλλες α και β, τα καροτένια και οι ξανθοφύλλες.



Εικόνα 2 :φωτοσυνθετικές χρωστικές για την απορρόφηση ακτινοβολίας

Τα φωτόνια που παγιδεύονται στα κέντρα αντίδρασης παρέχουν την κατάλληλη ενέργεια για τις πρωτογενείς φωτοχημικές αντιδράσεις όπως η οξειδωση του νερού κατά την οποία απελευθερώνονται τα ηλεκτρόνια και τα πρωτόνια στο φωτοσύστημα II. [1]

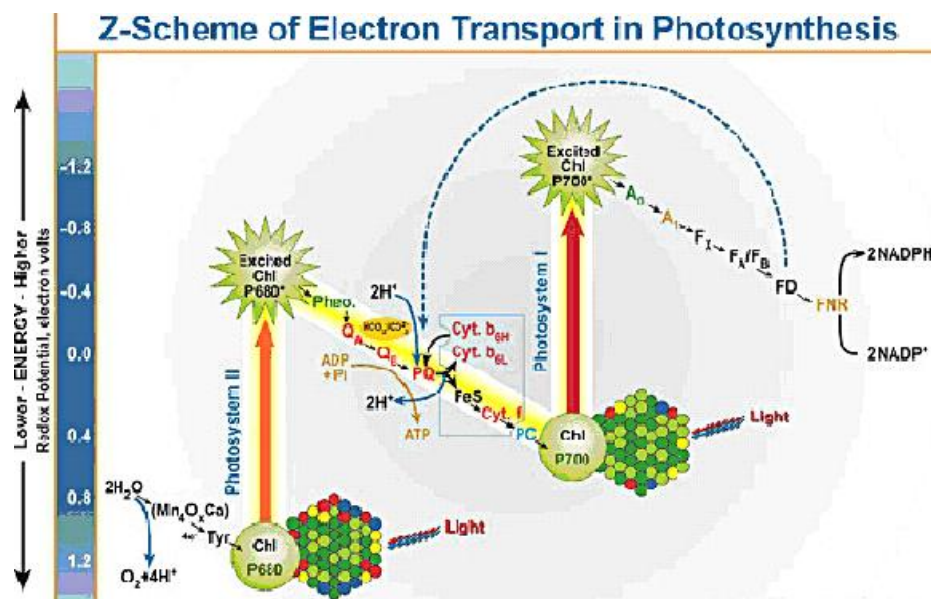


Εικόνα 3:Καταλυτικός κύκλος για την οξειδωση του νερού, πρωτόνια και ηλεκτρόνια[2]

Η φωτοσύνθεση λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, οι αντιδράσεις που εξαρτώνται από το φως χρησιμοποιούν αυτή την ενέργεια για να σχηματίσουν τα μόρια αποθήκευσης ενέργειας (ATP ή NADPH). Κατά το δεύτερο στάδιο, οι σκοτεινές αντιδράσεις χρησιμοποιούν αυτά τα προϊόντα για να ανάγουν το διοξείδιο του άνθρακα, έτσι ώστε να δημιουργήσουν διάφορα μεταβολικά προϊόντα μέσω του κύκλου του Krebs .

Η κυκλική και η μη κυκλική φωτοφωσφορυλίωση είναι δύο διαφορετικές μορφές των φωτο-εξαρτώμενων διαδικασιών. Η κυκλική φωτοφωσφορυλίωση είναι παρόμοια με την μη κυκλική αλλά διαφέρει στο γεγονός ότι η μη κυκλική φωτοφωσφορυλίωση παράγει μόνο ATP και κανένα NADPH.Όταν ένα μόριο χλωροφύλλης στο κέντρο αντίδρασης του φωτοσυστήματος II αποκτά αρκετή ενέργεια διέγερσης από τις περιφερειακές χρωστικές, της φωτοσυνθετικής κεραίας, ένα ηλεκτρόνιο μεταφέρεται στον πρωτογενή δέκτη ηλεκτρονίων, την φαιοφυτίνη,

μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται φωτοεπαγόμενος διαχωρισμός φορτίων. Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων φαίνεται στην εικόνα 4.



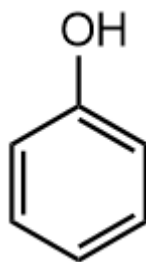
Εικόνα 4: Σχήμα της ηλεκτρονιακής ροής στην φωτοσύνθεση

Η ATP- συνθάση χρησιμοποιεί το ηλεκτροχημικό δυναμικό που δημιουργείται καθώς τα ηλεκτρόνια μετακινούνται. Λαμβάνει χώρα άντληση πρωτονίων από το στρώμα στη θυλακοειδή μεμβράνη έχοντας ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ATP. Το NADPH είναι ένα προϊόν της τερματικής οξειδοαναγωγικής αντίδρασης. Το NADP⁺ ανάγεται μέσω μιας σειράς ενδιάμεσων δεκτών που ανάγονται κατά τη διέγερση του P700 δότη και οξειδώνουν την πλαστοκυανίνη. Η αποθηκευμένη ενέργεια στο NADPH και ATP χρησιμοποιείται στη συνέχεια από τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς για να συνθέσουν απαραίτητα στοιχεία για την επιβίωσή τους μέσω του κύκλου του Calvin [1].

1.2 Φαινολικές ενώσεις (Φαινόλες)

Οι φαινόλες είναι ενώσεις που έχουν μια ομάδα υδροξειδίου απευθείας συνδεδεμένη στον βενζολικό δακτύλιο. Βρίσκονται ευρέως στη φύση και χρησιμοποιούνται ως ενδιάμεσα στη βιομηχανική σύνθεση διαφόρων προϊόντων, όπως κόλλες και αντισηπτικά.

Η φαινόλη είναι ένα άχρωμο κρυσταλλικό στερεό με χαρακτηριστική οσμή. Είναι μέτρια όξινη (pK_a = 9,95), αλλά χρειάζεται προσοχή στο χειρισμό της, επειδή είναι δηλητηριώδης και μεταλλαξιογόνος, προκαλώντας, μάλιστα, άμεση επαφή με το δέρμα λευκές κηλίδες και χημικά εγκαύματα.



Εικόνα 5: Σκελετική δομή της φαινόλης.

1.3 Τοξικότητα φαινολικών ενώσεων.

Η τοξικότητα των φαινολικών ενώσεων ανθρωπογενούς προέλευσης έγκειται πρώτον στον υδρόφοβο χαρακτήρα των περισσότερων ενώσεων αυτού του τύπου και στην ικανότητα δημιουργίας ελεύθερων ριζών [3]. Η αύξηση της υδροφοβικότητας βοηθάει το μόριο να μπορέσει να εισχωρήσει ευκολότερα μέσω της πλασματικής μεμβράνης, που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της τοξικότητας των ενώσεων αυτών.

Συγκρίνοντας την τοξικότητα μεταξύ των ουσιών πρέπει να ληφθούν υπόψη και κάποιες χαρακτηριστικές παράμετροι της κάθε ένωσης, εκτός από την υδροφοβικότητα. Αυτές είναι το pK_a της ουσίας ($-\log K_a$, όπου K_a είναι η σταθερά διάστασης της ένωσης) και το $\log P$ (όπου P είναι ο παράγοντας κατανομής οκτανόλης: νερού σε αδιάστατα οξέα). Όταν αυξάνεται η υδροφοβικότητα και το $\log P$ με ταυτόχρονη μείωση του pK_a , έχει ως αποτέλεσμα την πιο αποτελεσματική διείσδυση της ουσίας δια μέσω της μεμβράνης και άρα ενισχύει την τοξικότητά της [4]. Όταν οι τιμές pK_a των ενώσεων είναι παρόμοιες, τότε μόνο η υδροφοβικότητα είναι ο καθοριστικός παράγοντας σύγκρισης [5].

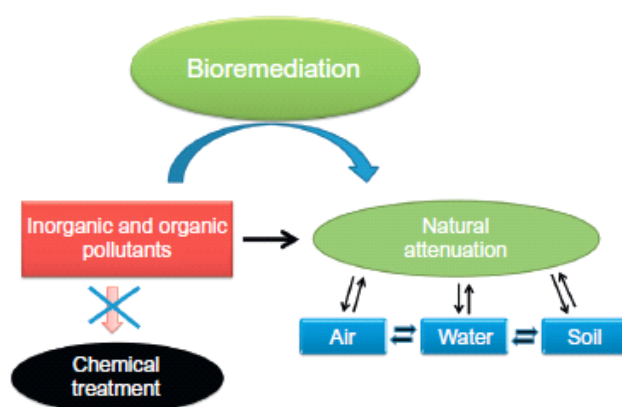
Οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται από την αλληλεπίδραση της ουσίας με βιομόρια μέσα στα κύτταρα. Αντιδράσεις μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου συνήθως καταλύονται από ένζυμα όπως τις υπεροξειδάσες, τις προσταγλανδίνες και τις μυελοϋπεροξειδάσες που περιέχονται στο μυελό των οστών στους ανώτερους οργανισμούς [6]. Οι φαινολικές ενώσεις συμμετέχουν ενεργά σε τέτοιες αντιδράσεις και σχηματίζουν ρίζες. Όταν γίνεται αναφορά σε έναν ξеноβιοτικό παράγοντα και τις επιπτώσεις του στους ζωντανούς οργανισμούς και κυρίως στον άνθρωπο, λαμβάνονται υπόψη τα ακόλουθα μεγέθη: η *οξεία τοξικότητα* που έχει να κάνει με την ποσότητα δόσης της ένωσης που προκαλεί θάνατο ή δυσμενείς επιπτώσεις στους οργανισμούς αλλά και τις επιπτώσεις της χρόνιας έκθεσης, την *μεταλλαξιγένεση* και η *καρκινογένεση*. Η φαινόλη είναι μία από τις πιο υδατοδιαλυτές ενώσεις από την οικογένεια των αρωματικών ενώσεων.

1.3.1 Φαινόλη

Η φαινόλη και τα παράγωγά της, που αποτελούνται από μία ομάδα υδροξειδίου συνδεδεμένο απευθείας σε έναν αρωματικό δακτύλιο. Οι φαινόλες είναι μια ομάδα των επικίνδυνων τοξικών οργανικών ρύπων που είναι τοξικές για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις είναι πολύ δύσκολο να απομακρυνθούν από το περιβάλλον, ακόμα και με τη χρήση χημικών τεχνικών. Επίσης οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μια κατηγορία ρύπων του εδάφους λόγω της χρήσης τους σε μεγάλη κλίμακα για τη σύνθεση των φυτοφαρμάκων, φαρμακευτικών προϊόντων, πλαστικών κτλ [7].

1.4 Εισαγωγή στην βιοαποκατάσταση

Βιοαποκατάσταση είναι η διαδικασία όπου ζωντανοί οργανισμοί [8] ή τα ένζυμα αυτών [9] χρησιμοποιούνται για να μετατρέψουν ξеноβιοτικές ουσίες σε λιγότερο τοξικές μορφές και να επαναφέρουν το περιβάλλον στην αρχική του κατάσταση με σκοπό να μειωθεί η ποσότητα αυτών των ουσιών κάτω από όρια που έχουν θεσπιστεί από τις αρμόδιες αρχές [10]. Η βιοαποκατάσταση είναι μία πολύπλοκη διαδικασία που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν την ύπαρξη ενός μικροβιακού πληθυσμού ικανό να μπορέσει να αποικοδομήσει τους ρύπους. Η διαθεσιμότητα των ρύπων στον μικροβιακό πληθυσμό, και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες (τύπος του εδάφους, θερμοκρασία, pH, και επάρκεια οξυγόνου ή κατάλληλοι αποδέκτες ηλεκτρονίων και θρεπτικά συστατικά). Οι κύριες απαιτήσεις είναι πηγή ενέργειας και μια πηγή άνθρακα για τους μικροοργανισμούς, πράγμα πολύ σημαντικό καθώς ο άνθρακας είναι απαραίτητος σε μεγαλύτερες ποσότητες από άλλα στοιχεία.



Εικόνα 6: Φυσική εξασθένηση και βιοαποκατάσταση είναι ευρέως αποδεκτές διαδικασίες καθαρισμού του περιβάλλοντος.

Για να είναι εφικτή η εφαρμογή της βιοαποκατάστασης θα πρέπει να βρεθούν και οι κατάλληλες μικροβιακές κοινότητες οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στους

βιογεωχημικούς κύκλους. Είναι σημαντικό να αναλυθεί η δομή της κοινότητας και οι μεταβολές της ποικιλότητάς της κατά τη διάρκεια των διαδικασιών βιολογικής αποκατάστασης. Οι χρονικές και χωρικές μεταβολές στους πληθυσμούς των βακτηρίων και η ποικιλότητα της μικροβιακής κοινότητας κατά τη διάρκεια της βιολογικής αποκατάστασης μπορεί να καθοριστεί χρησιμοποιώντας μοριακές μεθόδους. Οι πρόσφατες εξελίξεις στην μοριακές τεχνικές, σε συνδυασμό με τις γονιδιωματικές πληροφορίες, βοηθούν σε μεγάλο βαθμό στην εύρεση του ρόλου των μικροοργανισμών στις κοινότητες αυτές [11]. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την βιοαποκατάσταση είναι κυρίως βακτήρια, μύκητες και φύκη. Ο πίνακας 1 δείχνει μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα.

1.5 Εισαγωγή στην βιοαποικοδόμηση

Βιοαποικοδόμηση είναι η βιολογικά καταλυόμενη διαδικασία κατά την οποία μικροοργανισμοί μετατρέπουν (μέσω μεταβολικής ή ενζυματικής δράσης) τη δομή χημικών ενώσεων που βρίσκονται στο περιβάλλον με σκοπό να μειώσουν την πολυπλοκότητα τους [12, 13]. Φαινολικές ενώσεις μπορούν να βιοδιασπαστούν υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Παρουσία οξυγόνου πραγματοποιείται από οξυγονο-εξαρτώμενα ένζυμα. Επιτυχής προσθήκη δύο ατόμων οξυγόνου στο δακτύλιο ή άμεση εισαγωγή του μοριακού οξυγόνου οδηγεί στο σχηματισμό των διφαινολικών ενώσεων. Αυτές οι ενώσεις στη συνέχεια διασπώνται από τα ένζυμα που χρησιμοποιούν μοριακό οξυγόνο [14].

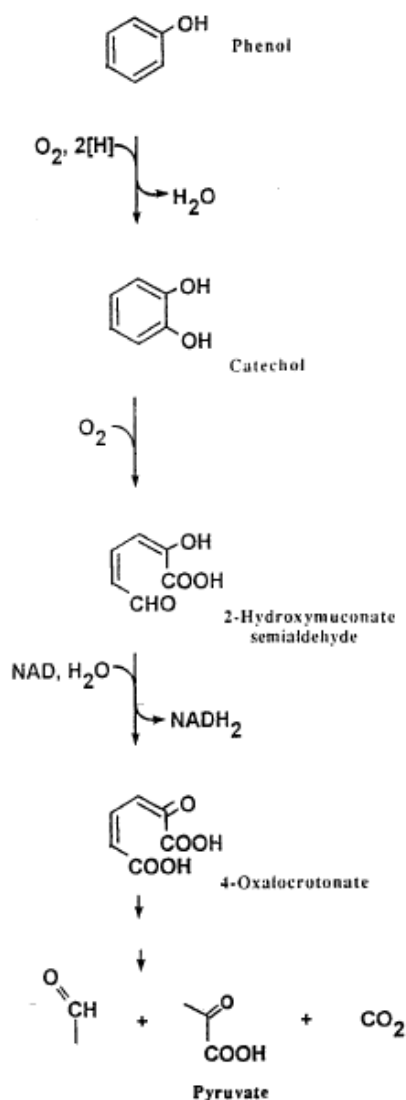
Πίνακας 1: Παραδείγματα μικροοργανισμών που αποικοδομούν αποτελεσματικά φαινολικές ενώσεις

Κατηγορία	Είδη
Βακτήρια	Αερόβια: <i>Pseudomonas</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Sphingobium</i> , <i>Pandoraea</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Gordonia</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Micrococcus</i> [15]
	Αναερόβια: <i>Pelatomaculum</i> , <i>Desulfotomaculum</i> , <i>Syntrophobacter</i> , <i>Syntrophus</i> , <i>Desulphovibrio</i> , <i>Methanospirillum</i> , <i>Methanosaeta</i> [16]
	Μεθανοτροφικά βακτήρια[17]
	Κυανοβακτήρια[18]
Μύκητες	Λιγνολυτικοί μύκητες[19] Μυκορριζικοί οργανισμοί[20]
Φύκη	<i>Chlorococcum</i> sp, <i>Chroococcus</i> sp[21], <i>Chlorella Vulgaris</i> , <i>Tetraselmis Marina</i> [22], <i>Scenedesmus Obliquus</i> [23]

Επίσης το οξυγόνο παίζει ζωτικό ρόλο τόσο ως τερματικός αποδέκτης ηλεκτρονίων και ως αντιδραστήριο στη βιοχημική ενεργοποίηση των αδρανών αρωματικών ενώσεων κάτω από όξινες συνθήκες [24].

Οι κυριότεροι λόγοι που οι μικροοργανισμοί βιοαποικοδομούν τις οργανικές ενώσεις είναι:

1. Πρόσληψη θρεπτικών συστατικών που ενδεχομένως υπάρχουν σε έλλειψη.
2. Μετατροπή ενός πολύπλοκου μορίου σε πιο απλή μορφή έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η απομάκρυνση από το κύτταρο.
3. Μια διαδικασία βιοαποικοδόμησης μπορεί να είναι εντελώς τυχαία. Αυτό μπορεί να συμβεί όταν ένας οργανικός ρύπος, προφανώς μοιάζει τυχαία με ένα φυσικό υπόστρωμα του συστήματος του ενζύμου. Όταν ένα σύστημα ενζύμου έχει ευρεία



ή χαλαρή εξειδίκευση υποστρώματος για να επιτρέψει σε έναν οργανισμό να βιοαποικοδομήσει μια μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων, ή όταν εξωκυτταρικά ενζυμικά εμπλέκονται παράγοντας ελεύθερες ρίζες για την επίτευξη αντίδρασης[13]

1.6 Βιοαποικοδόμηση φαινόλης

Η διαδικασία αποικοδόμησης της φαινόλης είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες. Τα τελευταία χρόνια έχουν μελετηθεί πολλοί οργανισμοί που μπορούν να αποικοδομήσουν τη φαινόλη και είναι κυρίως βακτήρια και μύκητες αλλά κάποια μικροφυκή [25].

Όσο αφορά στα μικροφύκη, έχει βρεθεί το αερόβιο μονοπάτι αποικοδόμησης της φαινόλης από το φύκος *Ochromonas danica*. Το φύκος διασπά τη φαινόλη χρησιμοποιώντας το meta μονοπάτι.

Εικόνα 7: Μεταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησης της φαινόλης από το μικροοργανισμό *Ochromonas danica*.

Τα βασικά ένζυμα που παίρνουν μέρος σε αυτή τη διαδικασία είναι η μονοοξυγενάση της φαινόλης που εισάγει μια ομάδα υδροξειδίου στο δακτύλιο σχηματίζοντας κατεχόλη με απαραίτητη την παρουσία O_2 . Έπειτα η 2,3 διοξυγενάση

της κατεχόμενης χρησιμοποιεί το O_2 για να διανοίξει τον δακτύλιο. Στη συνέχεια η αφυδρογονάση της ημιαλδεΐδης χρησιμοποιεί το NAD^+ ως συμπαραγοντα για να παράγει το 4-oxalocrotonate όπου στην συνέχεια καταλήγει στο πυροσταφυλικό, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τον οργανισμό στον κύκλο του Krebs [26].

1.7 Μικροφύκη

Τα μικροφύκη είναι μονοκύτταροι φωτοαυτότροφοι μικροοργανισμοί. Τα μικροφύκη εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία στο μεταβολισμό στην ποικιλία των χρωστικών, κυτταρικών τοιχωμάτων, λιπαρών οξέων και λιπιδίων. Οι πιο κύριες κατηγορίες μικροφυκών είναι:

1.Χλωροφυτά

Τα μέλη του γένους χλωροφυτά μπορούν να βρεθούν σε γλυκά νερά, θαλάσσια, ή ακόμα και επίγεια περιβάλλοντα και περιλαμβάνουν μονοκύτταρους και πολυκύτταρων που έχουν χλωροφύλλες α και β σε έναν χλωροπλάστη που περιβάλλεται από δύο μεμβράνες. Μονοκύτταροι οργανισμοί είναι *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* και είναι κυριότεροι εκπρόσωποι για τα χλωροφύτα [27].

2.Ερυθροφύκη

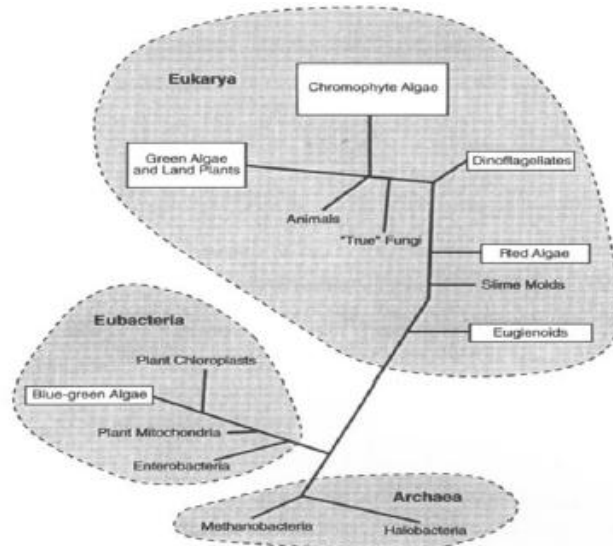
Τα μέλη του γένους ερυθροφυκών είναι κυρίως θαλάσσια πολυκύτταρα είδη, ενώ είδη του γλυκού νερού ή μονοκύτταρα είναι σπάνια. Τα κύτταρα είναι σφαιρικά με έναν κεντρικό πυρήνα και περιέχουν ένα μεγάλο ενιαίο χλωροπλάστη που περιβάλλεται από δύο μεμβράνες με κεντρικό πυρηνοειδές [28].

3.Απτόφυτα

Τα μικροφύκη που ανήκουν στην κατηγορία απτόφυτα είναι κυρίως μονοκύτταρα. Τα περισσότερα είδη είναι θαλάσσια αν και μερικά είδη του γλυκού νερού είναι γνωστά. Όλα τα απτόφυτα περιέχουν χλωροπλάστες και ένα πυρήνα με τον πυρηνικό φακέλου [29].



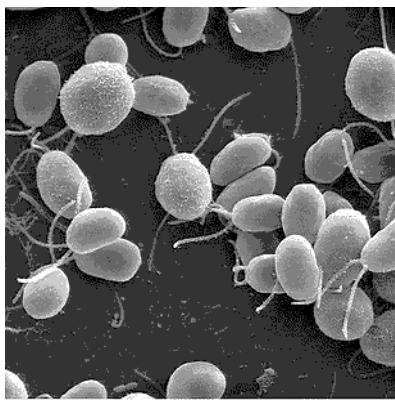
Εικόνα 8: Φαινοτυπική ποικιλομορφία των μικροφυκών. Διαφορετικές μορφές και σχήματα ανάλογα με γενετική τους και περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά (εικόνα από το βιβλίο MICROALGAE:BIOTECHNOLOGY, MICROBIOLOGY AND ENERGY)



Εικόνα 9: Απεικόνιση της φυλογενετικής συγγένειας ορισμένων ομάδων των φυκών. Μήκη των τμημάτων της γραμμής είναι ανάλογα με την εξελικτική απόσταση με βάση την ανάλυση των γονιδιακών αλληλουχιών ριβοσωμικού RNA.[30]

1.8 Το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*

Βασίλειο:	Φυτά
Διαίρεση:	Chlorophyta
Κλάση:	Chlorophyceae
Τάξη:	Chlamydomonadales
Οικογένεια:	Chlamydomonadaceae
Γένος:	<i>Chlamydomonas</i>
Είδος:	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>



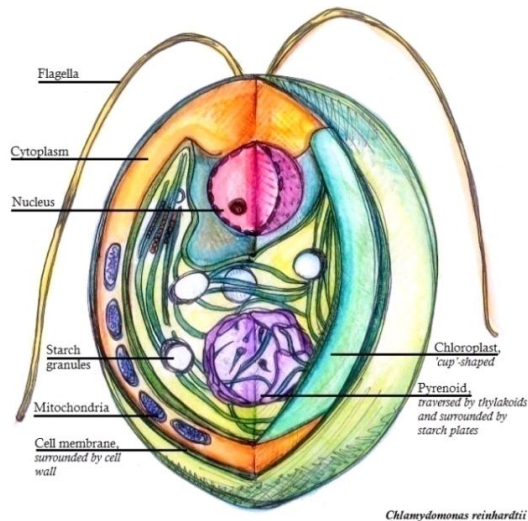
Εικόνα 10: το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*

Το *Chlamydomonas reinhardtii* είναι ένα πράσινο μικροφύκος και είναι μονοκύττατος ευκαρυωτικός μικροοργανισμός. Χρησιμοποιεί τη φωτοσύνθεση ως κύριο μέσο για την ενέργεια. Μέχρι τώρα έχουν αναφερθεί κυρίως τρεις συνθήκες ανάπτυξης για μικροφύκη κατά τις οποίες χρησιμοποιούνται οργανικές πηγές άνθρακα. Το *Chlamydomonas reinhardtii* μπορεί επίσης να επιβιώσει στο σκοτάδι σε οξικό οξύ μέσω.

Τα *Chlamydomonas reinhardtii* έχουν κυτταρικό τοίχωμα, έναν χλωροπλάστη, μία κεραία που δέχεται το φως και δύο μαστίγια με τα οποία μπορούν να κινούνται. Επίσης ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός τους είναι ίδιος με αυτό των ανώτερων φυτών

Τα κύτταρα του είδους *Chlamydomonas reinhardtii* μπορούν να επιβιώσουν σε πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα, καθώς μπορούν να βρεθούν στο γλυκό νερό, υγρό έδαφος, τη θάλασσα και μερικές φορές ακόμη και το χιόνι. Αυτός ο οργανισμός χρησιμοποιείται πολύ συχνά ως πρότυπος οργανισμός στη βιολογία λόγω της γρήγορης παραγωγής βιομάζας και της ικανότητάς του να μεγαλώνει τόσο στο φως όσο και στο σκοτάδι.

Το μικροφύκος αυτό είναι ένας πρότυπος οργανισμός για έρευνα από τον προηγούμενο αιώνα και δίνει απαντήσεις σε πολλά βασικά ερωτήματα που αφορούν την κυτταρική ζωή. Ειδικότερα έχει μελετηθεί αρκετά για να απαντηθούν κύρια ερωτήματα για τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης. Τέλος, είναι ένας ιδανικός οργανισμός για μελέτες μεταλλαξιγένεσης εντοπισμένες στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό, δηλαδή στο γενετικό υλικό των χλωροπλάστων, διότι περιέχει έναν χλωροπλάστη ανά κύτταρο [31].



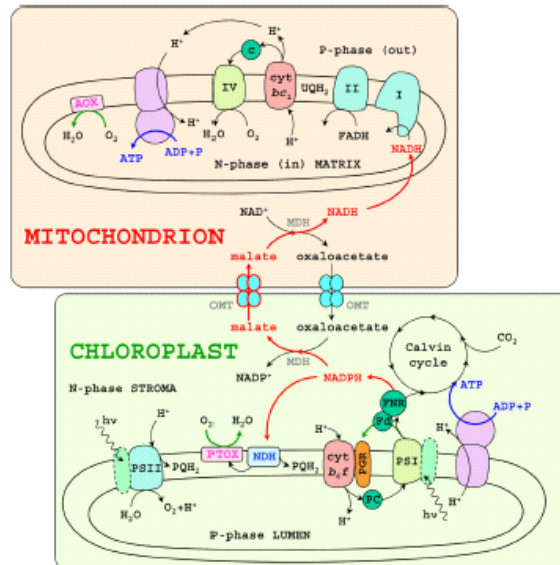
Εικόνα 11: Το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*

1.9 Επισκόπηση του μεταβολισμού του άνθρακα στο μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*

Στον μεταβολισμό του *Chlamydomonas reinhardtii* παρατηρείται ότι τα οργανίδια μιτοχόνδριο και χλωροπλάστης συνδέονται μέσω ενός κοινού μεταβολικού προϊόντος. Στα μιτοχόνδρια, τα κύρια συστατικά της αναπνευστικής αλυσίδας παράγουν ATP. Το *Chlamydomonas reinhardtii* έχει ένα χλωροπλάστη και πολλά μιτοχόνδρια που είναι σφικτά συσκευασμένα μαζί. Μια πιθανή οδός για τη μεταφορά των αναγωγικών από ένα οργανίδιο στο άλλο, είναι μέσω του μηλικού οξέως όπως και φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα [32].

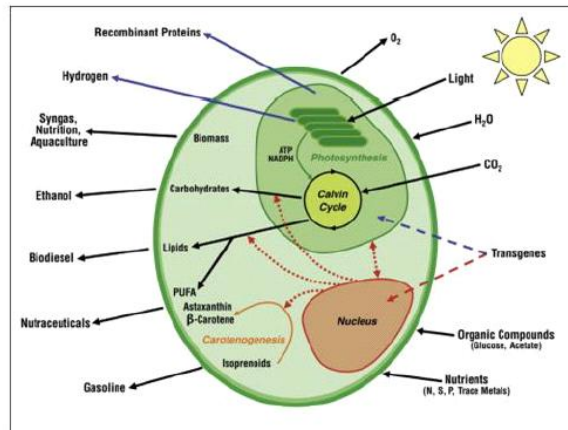
Τα φωτοσυνθετικά μικροφύκη καθηλώνουν το διοξείδιο του άνθρακα χρησιμοποιώντας την φωτεινή ενέργεια για να παράγουν ATP. Στο φως η αφομοίωση του οξικού γίνεται κυρίως μέσω της κυκλικής φωτοφωσφορυλίωσης. Σε αντίθεση με τα φυτά, τα οποία έχουν τόσο φωτοσυνθετικά όσο και μη-φωτοσυνθετικά πλαστίδια, ο χλωροπλάστης του *Chlamydomonas reinhardtii* διατηρεί μια λειτουργική φωτοσυνθετική αλυσίδα, ακόμα και στο σκοτάδι.

Ο μεταβολισμός του *Chlamydomonas* μπορεί να βασιστεί σε διαφορετικές πηγές άνθρακα, όπως το ενδογενές άμυλο που έχει συσσωρευτεί στον χλωροπλάστη κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων του φωτός, ή εξωγενείς πηγές άνθρακα από αναγόμενες ενώσεις όπως το οξικό. Αυτές τις πηγές άνθρακα μπορεί να τις χρησιμοποιήσει στο σκοτάδι υπό αναερόβιες συνθήκες. Στο σκοτάδι, οι απαιτήσεις ATP για την αφομοίωση του οξικού πληρούνται υπό αερόβιες συνθήκες (αναπνοή), αλλά όχι κάτω από αναερόβιες συνθήκες (ζύμωση). Στο σκοτάδι και απουσία οξικού οξέως το άμυλο διασπάται με την διαδικασία της γλυκόλυσης παρέχοντας ATP και NADH.

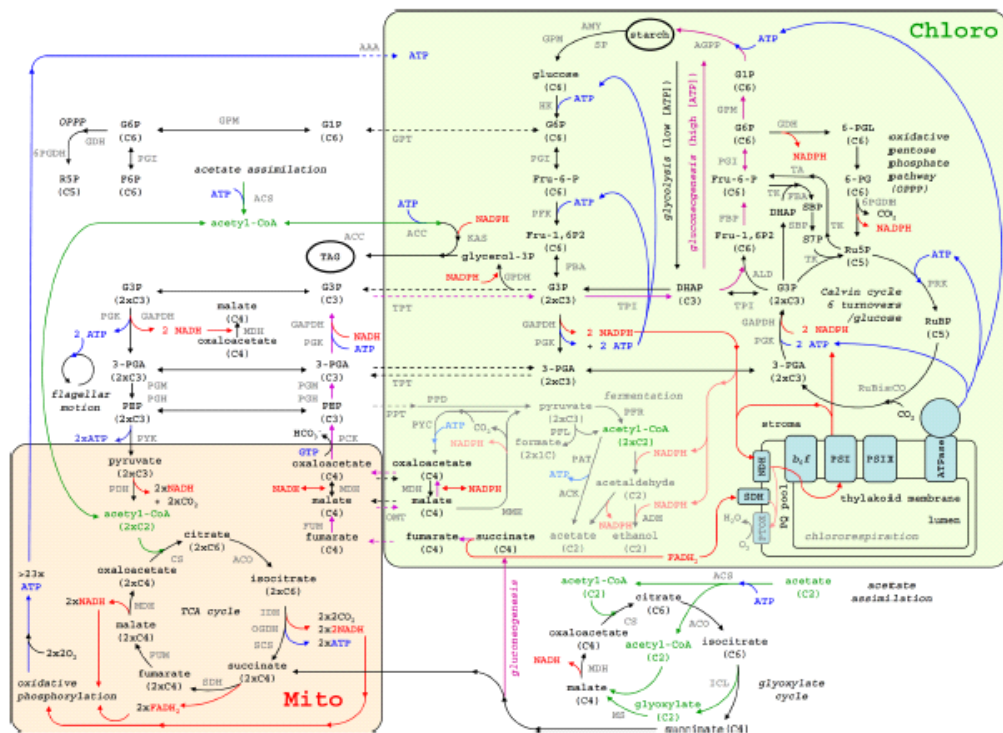


Εικόνα 12: Στην εικόνα βλέπουμε τα ενεργειακά οργάνια των Chlamydomonas. Στους χλωροπλάστες, οι αντιδράσεις του φωτός και μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων τα NADPH και ATP που παράγονται χρησιμοποιούνται στον κύκλο Calvin

Στο παρακάτω σχήμα βλέπουμε ότι το οξικό μπορεί να ενσωματωθεί σε ακετυλο συνένζυμο Α μετά από δύο πιθανές πορείες, που απαιτούν ATP. Πιο συγκεκριμένα το οξικό οξύ μπορεί να μετατραπεί απευθείας σε ακέτυλο CoA με την συνθετάση του ακέτυλο CoA ή μπορεί να γίνουν δύο αντιδράσεις που περιλαμβάνει μια οξική κινάση και μια ακέτυλοτρανσεφεράση του φωσφορικού. [32]



Εικόνα 13: Σημαντικές μεταβολικές οδοί μικροφυκών. Αυτή η σχηματική παράσταση απεικονίζει απλοποιημένο κυτταρικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των διαφόρων προϊόντων που προέρχονται από τα μικροφύκη [33]



Εικόνα 14: Διαμερισματοποίηση του κεντρικού μεταβολισμού του άνθρακα στα *Chlamydomonas reinhardtii*. Τα κόκκινα βέλη αντιπροσωπεύουν την ισχύ της αναγωγής, NAD (P) H, και τα μπλε βέλη αντιπροσωπεύουν ATP. Η πρόσληψη του οξικού (πράσινα βέλη) μπορούν να τροφοδοτούν το γλυκοξυλικό κύκλο για την αφομοίωση του άνθρακα μέσω γλυκονεογένεση (μωβ βέλη) ή στον κύκλο TCA για τη διατήρηση αναπνοή και μιτοχονδριακή παραγωγή ATP. Τα γκρι βέλη αντιπροσωπεύουν εναλλακτικές οδούς (χλωροαναπνοή και ζύμωση)[32]

1.10 Κινητικά μοντέλα ανάπτυξης μικροοργανισμών παρουσία ενώσεων που αναστέλλουν την ανάπτυξη

Η μελέτη της κινητικής ανάπτυξης των μικροοργανισμών παρουσία διάφορων οργανικών υποστρωμάτων έχει πολύ μεγάλη σημασία τόσο για την εύρεση των κατάλληλων πηγών άνθρακα που θα χρησιμοποιηθούν σε μια εργαστηριακή καλλιέργεια ή βιοαντιδραστήρα και στη χρήση αυτών των μικροοργανισμών για την αποικοδόμηση τοξικών ενώσεων. Σε γενικές γραμμές στις καλλιέργειες η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος (S_0) αντιπροσωπεύει μια οργανική ένωση η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ενεργειακούς σκοπούς όπως η βιοσύνθεση. Η αρχική συγκέντρωση της βιομάζας περιγράφεται ως X_0 . Φαίνεται ότι αυτός ο λόγος S_0/X_0 δείχνει το αρχικό ενεργειακό επίπεδο της καλλιέργειας καθώς και ότι μπορεί άμεσα να επηρεάσει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Μια καλλιέργεια χωρίζεται σε δύο κατηγορίες που έχει να κάνει με το αν υπάρχει επαρκής ποσότητα υποστρώματος και όταν δεν υπάρχει. Σε καλλιέργειες που υπάρχει επαρκές υπόστρωμα ο λόγος S_0/X_0 επηρεάζει αρκετά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Πράγμα που σημαίνει ότι ο λόγος αυτός μπορεί να καθορίσει τις μεταβολικές οδούς των μικροοργανισμών σε μια καλλιέργεια [34].

Υπό ανεπαρκείς ποσότητες υποστρώματος ο μικροοργανισμός χρησιμοποιεί την ενέργεια μέσω του αναβολισμού για να αυξήσει την βιομάζα του. Παρόλα αυτά σε καλλιέργειες με επαρκή ποσότητα υποστρώματος δεν υπάρχει ξεκάθαρη συσχέτιση μεταξύ του αναβολισμού και του καταβολισμού καθώς ο μικροοργανισμός δεν χρησιμοποιεί όλη την ενέργεια για να αυξήσει την βιομάζα του αλλά και για άλλους σκοπούς όπως η συντήρηση (maintenance).

Το οργανικό υπόστρωμα καταναλώνεται από τους μικροοργανισμούς για να παράγουν διάφορους μεταβολίτες και ATP. Στη συνέχεια οι μεταβολίτες αυτοί και η ενέργεια χρησιμοποιούνται για να παράγουν βιομάζα ή συντήρηση (maintenance). Οι μεταβολίτες και η ενέργεια μπορούν επίσης να καταναλωθούν μέσω άλλων μεταβολικών κύκλων. Σε καλλιέργειες που υπάρχει επαρκής ποσότητα υποστρώματος, αυτό καταναλώνεται σε μεγαλύτερη ποσότητα από όταν δεν βρίσκεται σε επάρκεια [34].

Απόδοση ανάπτυξης ($Y_{X/S}$) ορίζεται ο λόγος που υποδηλώνει κατά πόσο αναπτύχθηκε ο οργανισμός σε σχέση με την ποσότητα της τοξικής ένωσης που βιοαποικοδόμησε.

Σε καλλιέργειες του βακτηρίου *Pseudomonas putida* μελετήθηκε πως επηρεάζεται η βιοαποικοδόμηση της φαινόλης αλλά και πως η ίδια η φαινόλη επηρεάζει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Όταν οι αρχικές συγκεντρώσεις της φαινόλης ήταν 300 και 500 mg/mL υπήρξε επιτυχής βιοαποικοδόμηση της φαινόλης. Παρόλα αυτά το ποσοστό της βιοαποικοδόμησης της φαινόλης μειωνόταν με την βαθμιαία αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της φαινόλης, γεγονός που οφείλεται στην τοξικότητα της φαινόλης ως υπόστρωμα. Η συμπεριφορά αυτή παρατηρήθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις φαινόλης 700 και 1000 mg/mL. Επίσης σε υψηλές συγκεντρώσεις της φαινόλης υπήρξε μια επιβράδυνση στην βιοαποικοδόμηση της φαινόλης σε σχέση απ' όταν ήταν σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Η καθυστέρηση οφείλεται ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις φαινόλης λειτουργούν ανασταλτικά.

Για να εκτιμηθούν οι κινητικές παράμετροι ανάπτυξης χρησιμοποιούνται τα κινητικά μοντέλα του Haldane και του Monod. Παρόλα αυτά το κινητικό μοντέλο του Monod δεν μπορεί να προσομοιάσει επαρκώς τις κινητικές παραμέτρους ανάπτυξης στις υψηλές συγκεντρώσεις φαινόλης καθώς το μοντέλο δεν προβλέπει τον ανασταλτικό χαρακτήρα της ουσίας αυτής. Το κινητικό μοντέλο του Haldane είναι πιο ιδανικό σε αυτές τις περιπτώσεις [35].

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της βιαποικοδόμησης της φαινόλης από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* κάτω από διάφορες συνθήκες που επηρεάζουν την φωτοσύνθεση. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας ή απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα στην ανάπτυξη και τη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μικροφύκου. Επιπλέον σκοπός ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της έντασης της ακτινοβολίας και πως η παρουσία ή η απουσία του O_2 επηρεάζει τις καλλιέργειες. Επιπλέον μελετήθηκαν κάποια μεταλλαγμένα στελέχη του *Chlamydomonas* για την ικανότητα αποικοδόμησης της φαινόλης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Οργανισμός.

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία είναι το *Chlamydomonas reinhardtii*. Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα ήταν το CC-125 που είναι το άγριου τύπου (wild type) στέλεχος. Για τη μελέτη των μεταλλαγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη CC-S264K, CC-4476, CC-2656 και aadAοT.



Εικόνα 15: *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125

2.2 Θρεπτικό μέσο και συνθήκες ανάπτυξης.

Κύτταρα του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο TAP (Tris- Acetate- Phosphate) κάτω από λευκές λάμπες φθορισμού (ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50-60 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) σε κωνικές φιάλες όγκου 2 L, για 4-5 ημέρες, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Harris [44]. Όλα τα θρεπτικά μέσα και σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν απαραίτητο να έχουν αποστειρωθεί προηγουμένως στους 120°C (για την αποφυγή μολύνσεων από άλλους οργανισμούς) για 20 λεπτά. Στις στερεές καλλιέργειες στο θρεπτικό γινόταν επιπλέον προσθήκη 1,5% w/v agar [36].

Όλα τα πειράματα εκτελέστηκαν σε δωμάτιο σταθερής θερμοκρασίας $25\pm 1^\circ\text{C}$. Οι φιάλες βρίσκονταν υπό συνεχή ανάδευση. Μετά από 4-5 ημέρες, χρησιμοποιήθηκαν ως μητρική καλλιέργεια για την εκτέλεση του κάθε πειράματος

Πίνακας 2: Συστατικά υγρού θρεπτικού μέσου TAP (pH=7,2)

Διαλύματα	Ποσότητα
1. 1M Trizma base (or Tris-HCl)	2,42 g/L (3,15 g/L)
2. Phosphate buffer I	1,0 mL/L
3. Hutner's trace metals	1,0 mL/L
4. Solution A	10,0 mL/L
5. Acetic acid (d=1,049 g/mL, ≥99,8%)	1,0 mL/L

Πίνακας 3: Συστατικά solution A

Συστατικά	Συγκέντρωση στο διάλυμα
NH ₄ Cl	40,0 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10,0 g/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O (CaCl ₂)	5 ,0g/L (3,8 g/L)

Πίνακας 4: Συστατικά Phosphate buffer I

Συστατικά	Συγκέντρωση στο διάλυμα
K ₂ HPO ₄	104,4 g/L
KH ₂ PO ₄	54,0 g/L

Πίνακας 5: Συστατικά Hutner's Trace Metals

Συστατικά	Συγκέντρωση στο διάλυμα
EDTA	50,00 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4,99 g/L
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22,00 g/L
H ₃ BO ₃	11,40 g/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	5,06 g/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,57 g/L
Mo ₇ O ₂₄ (NH ₄) ₆ ·4H ₂ O	1,10 g/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,61 g/L

Πίνακας 6: Συστατικά HS medium.

Διαλύματα	Ποσότητα
Διάλυμα του Beijerinck	5,0mL/L
Phosphate buffer II	5,0mL/L
Hutner's trace metals(όπως για το TAP)	1,0mL/L

Πίνακας 7: Συστατικά διαλύματος του Beijerinck's

Συστατικά	Ποσότητα
NH_4Cl	100,0g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,0g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0g/L

Πίνακας 8: Συστατικά phosphate buffer II

Συστατικά	Συγκέντρωση στο διάλυμα
K_2HPO_4	288,0 g/L
KH_2PO_4	144,0 g/L

2.3 Υπολογισμός κυτταρικής συγκέντρωσης.

Δείγματα από τις καλλιέργειες φυγοκεντρίθηκαν για 5 λεπτά στα 1000g προκειμένου να καθιζάνουν σε βαθμονομημένο τριχοειδείς σωλήνες TPP όπως αυτόν της εικόνας 17. Η κυτταρική συγκέντρωση εκφράστηκε ως όγκος καθιζαμένων κυττάρων (Packed Cell Volume, PCV) ανά mL καλλιέργειας (μL PCV/ mL καλλιέργειας).



Εικόνα 16 : Διαβαθμισμένος σωλήνας PCV της εταιρίας TPP.

2.4 Παρασκευή καλλιεργειών για μελέτη βιοαπικοδόμησης

2.4.1 Παρασκευή καλλιεργειών για μελέτη βιοαπικοδόμησης σε φως και σκοτάδι

Τα κύτταρα πρώτα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρωση στα 1000g για 3 λεπτά, έπειτα επαναιωρήθηκαν στο νέο μέσο και μετά ακολουθώντας την ίδια διαδικασία δύο φορές, τελικά κατανεμήθηκαν σε ερμητικά κλειστά γυάλινα μπουκάλια με septa (διάμετρος 5 cm, ύψος 9,5 cm), με 100 mL συνολική χωρητικότητα. Ο τελικός όγκος

που προστέθηκε ήταν 50 mL. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ένα δωμάτιο με θερμοκρασία (25°C) υπό ένταση φωτός 50-60 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινόλης εξετάστηκαν, 0,15 mM (14,1 mg/L), 0,50 mM (47,1 mg/L), 2,00 mM (188,2 mg/L) και 4,00 mM (376,4 mg/L).

Η φαινόλη είχε διαλυθεί σε υπερκάρθρο νερό (nanopure), και το διάλυμα υπέστη φιλτράρισμα μέσω ενός φίλτρου σύριγγας 0,2 μm . Η συγκέντρωση του διαλύματος φαινόλης ήταν 0.5 M. Εκτός από φαινόλη, δύο διαφορετικές συνθήκες από εξωγενώς παρεχόμενο άνθρακα εξετάστηκαν: οξικό οξύ (1 g/L) ως οργανική πηγή άνθρακα, και ο περιορισμός της εναλλακτικής πηγής άνθρακα (οξικό) από το μέσο καλλιέργειας. Όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές. Όλα τα θρεπτικά μέσα και γυαλικά τοποθετήθηκαν στον κλίβανο στους 120 ° C για 20 λεπτά, ώστε να αποφευχθεί η μόλυνση. Οι καλλιέργειες βρίσκονταν υπό συνεχή ανάδευση στα 140 min^{-1} σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα. Τα πειράματα διεξήχθησαν σε laminar flow hood αφού πρώτα αυτό είχε απολυμανθεί με αιθανόλη και ακτινοβολία UV.

Πίνακας 9: Χειρισμοί που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια εκτέλεσης των πειραμάτων μας. (* ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)

Όνομα χειρισμού	Οξικό οξύ	Φώς/σκοτάδι
Acetate/light	1mL/L	Φώς
Limit C/light	-	Φώς

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων η αρχική κυτταρική συγκέντρωση προσαρμόστηκε στα 2,0 $\mu\text{LPCV} / \text{mL}$ καλλιέργειας ενώ η ένταση της φωτονιακής ακτινοβολίας που έφτανε στα μπουκαλάκια ήταν 50-60 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την περίπτωση που βάλαμε τις καλλιέργειες στο σκοτάδι.

2.4.2 Παρασκευή καλλιεργειών για μελέτη βιοαποικοδόμησης καλλιεργειών παρουσία N_2 ή O_2

Πραγματοποιήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο με την ενότητα 2.4.1. Μόλις παρασκευάστηκαν οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν κάτω από ροή αερίου N_2 ή O_2 για διάστημα 30 δευτερολέπτων προκειμένου να απομακρυνθεί το μεγαλύτερο μέρος του ατμοσφαιρικού αέρα που περιείχαν.

2.5 Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού

2.5.1 Αρχή λειτουργίας της μεθόδου

Κατά τη φωτοσύνθεση, μόνο ένα μέρος της ενέργειας που απορροφάται από τις χρωστικές χρησιμοποιείται κατά τη φωτοσύνθεση. Το υπόλοιπο αποβάλλεται με διάφορους τρόπους, συνήθως υπό μορφή θερμότητας αλλά και με εκπομπή δευτερεύουσας ακτινοβολίας. Η εκπομπή δευτερεύουσας ακτινοβολίας χαρακτηρίζεται με τον γενικό όρο *φωταύγεια*. Αν αυτή η εκπομπή γίνει σε χρονικό διάστημα 10^{-9} - 10^{-6} s μετά τη διέγερση, η φωταύγεια χαρακτηρίζεται ως *φθορισμός*. Η επαγωγή του φθορισμού από τα φυτά πραγματοποιείται σε δύο φάσεις, εκ των οποίων η πρώτη είναι ταχεία και η δεύτερη αργή. Σήμερα, η μελέτη της καμπύλης του επαγωγικού φθορισμού, ιδιαίτερα της ταχείας φάσης, αποτελεί ένα πολύτιμο ερευνητικό μέσο για τη μελέτη της μοριακής δομής και λειτουργίας, αλλά και γενικότερα της απόδοσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Η μέθοδος των Strasser & Strasser [37] είναι χρήσιμη για να εκτιμηθεί μία πληθώρα παραμέτρων που αφορούν τη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, μεταξύ των οποίων το μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυνθετικής κεραίας, η πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης, η ποσότητα της ενέργειας που χάνεται υπό μορφή θερμότητας κ.α.

Ο φθορισμός αυξάνεται όταν η φωτοχημική απόδοση της φωτοσύνθεσης παρεμποδίζεται για οποιοδήποτε λόγο. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι 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, δεχτεί την επίδραση συνεχούς φωτισμού, 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).

2.5.2 Μετρήσεις Επαγωγικού Φθορισμού σε δείγματα καλλιιεργειών *Chlamydomonas reinhardtii*.

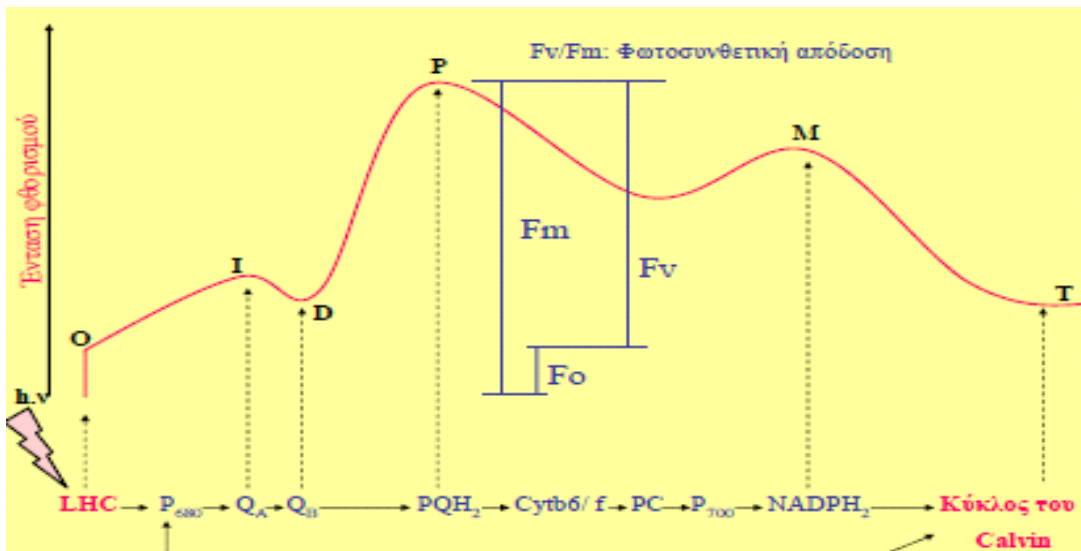
Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού έγιναν με τη φορητή συσκευή Plant Efficiency Analyser (Handy PEA Hansatech Instruments), και ακολούθησε επεξεργασία των δεδομένων με χρήση εξειδικευμένου λογισμικού εφαρμογής του JIP-test (BiolyzerHP 4.0), σύμφωνα με τη μέθοδο των Strasser&Strasser [37].



Εικόνα 17 :HandyPEA για τις μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού

Οι μετρήσεις έλαβαν χώρα σε δείγματα καλλιεργειών όγκου 50mL, τα οποία αρχικά παρέμειναν στο σκοτάδι για 10 λεπτά, προκειμένου τα κέντρα αντίδρασης να «αδειάσουν» από ηλεκτρόνια, και στην συνέχεια διεγέρθηκαν. Η μέθοδος αυτή βασίζεται σε μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού με ανάλυση 10μs, μέσα σε χρονικό διάστημα 1 δευτερολέπτου. Ο φθορισμός μετρήθηκε με 12-bit ανάλυση

και η διέγερση έγινε από 3 διόδους φωτισμού (LEDs) με ένταση ακτινοβολίας μέχρι 3000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ερυθρού φωτός (650nm). Από τις μετρήσεις υπολογίστηκε ο λόγος F_v/F_m , που αποτελεί τη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση του. Επίσης με εφαρμογή του JIP-TEST για τιμές φθορισμού, που αντιστοιχούν σε καθορισμένα στάδια [J, I και P] υπολογίστηκαν τα επιμέρους χαρακτηριστικά του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και συγκεκριμένα ο λόγος ABS/RC, που συνδέεται με το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PSII, ο λόγος D1o/RC, που συνδέεται με την ενέργεια που χάνεται με τη μορφή θερμότητας, ο λόγος RC/CSo, που δείχνει την πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης του PSII και ο λόγος TRo/ABS που δείχνει τη μέγιστη κβαντική απόδοση πρωτογενούς φωτοχημείας για $t=0$. Η παρακάτω καμπύλη δείχνει ένα τυπικό διάγραμμα μεταβολής του φθορισμού



Εικόνα 18:Τυπική καμπύλη επαγωγικού φθορισμού

2.6 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση φαινολικών ενώσεων με τη χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

2.6.1 Αρχή της μεθόδου

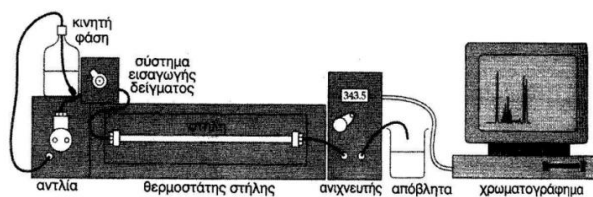
Η HPLC ανήκει στις χρωματογραφικές τεχνικές. Η μέθοδος βασίζεται στην κατακράτηση των ουσιών σε μία στήλη με κατάλληλο πληρωτικό υλικό (στατική φάση) και ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης (που παρέχεται συνεχώς). Το δείγμα εισάγεται μέσω ένεσης σε ένα βρόγχο. Με τη βοήθεια της κινητής φάσης τα συστατικά του κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης. Οι ουσίες έχουν διαφορετική ισχύ κατακράτησης από την στατική φάση, που οφείλεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών δραστικών παραγόντων: της προς ανάλυση ουσίας, της κινητής φάσης και της στατικής φάσης. Αυτό προκαλεί τον διαχωρισμό τους και την μετακίνηση τους με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης.

Ο τύπος χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν χρωματογραφία κατανομής αντίστροφης φάσης (reversed phase chromatography). Στην χρωματογραφία αντίστροφης φάσης η στατική φάση είναι μη πολική (υδρόφοβη), ενώ η κινητή φάση είναι ένα μίγμα πολικών διαλυτών συνεπώς το πολικότερο συστατικό εμφανίζεται πρώτο. Η κατακράτηση μιας ένωσης σε μία χρωματογραφική στήλη καθορίζεται από την πολικότητα της ένωσης και τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες που εφαρμόζονται όπως η σύσταση της κινητής φάσης, το είδος του πληρωτικού υλικού της στήλης και τη θερμοκρασία.

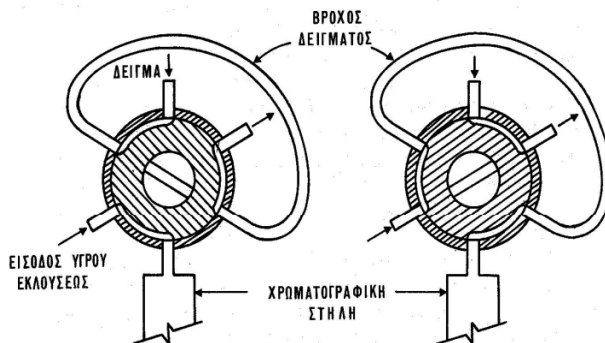
Η μέθοδος βρίσκει πολλαπλές εφαρμογές στην ανάλυση μίας πληθώρας δειγμάτων (δείγματα νερού, βιολογικά δείγματα, οργανικές ενώσεις, συστατικά τροφίμων, συστατικά ποτών κτλ.). Βασικά πλεονεκτήματα είναι η ταχύτητα, η μεγάλη διαχωριστική ικανότητα, η μεγάλη ευαισθησία (ng ή pg), η απαίτηση μικρής ποσότητας δείγματος (5-200μL) και η αρκετά μεγάλη ακρίβεια. Μειονεκτήματα αποτελούν το υψηλό κόστος (πολύ ακριβοί διαλύτες και πρότυπα διαλύματα), η περιπλοκότητα, η μη αντιστρεπτή προσρόφηση κάποιων ενώσεων και το γεγονός ότι οι χρόνοι κατακράτησης των ουσιών στη στήλη διαφέρουν από χρήστη σε χρήστη.

Τα βασικά τμήματα ενός υγρού χρωματογράφου είναι

1. Φιάλες αποθήκευσης διαλυτών.
2. Αντλία (σταθερής ροής, σταθερής πίεσης).
3. Μονάδα εισαγωγής δείγματος (βαλβίδα εισαγωγής δείγματος, αυτόματος δειγματολήπτης).
4. Χρωματογραφική στήλη.
5. Ανιχνευτή.
6. Καταγραφικό.



εικόνα 19:Οργανολογία της HPLC



Εικόνα 20:Σύστημα εισαγωγής δείγματος αριστερά θέση φόρτωσης, δεξιά θέση εισαγωγής

2.6.2 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση φαινολικών ενώσεων με HPLC

Τα δείγματα καλλιέργειας φυγοκεντρίθηκαν για 5min στα 1500 g. Το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιήθηκε για την ποιοτική και την ποσοτική ανάλυση των φαινολικών ενώσεων με την χρήση του υγρού χρωματογράφου

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του συστήματος HPLC, που αποτελούνταν από μια αντλία υψηλής ακρίβειας (μοντέλο GyncoTec 480), έναν ανιχνευτή υπεριώδους (Linear UV-VIS 200) και μια χρωματογραφική στήλη C18 (Grace Smart RP18, 250mm L και 4,6mm ID, 5μm μέγεθος των σωματιδίων). Πραγματοποιήθηκε ισοκρατική έκλουση, κατά την οποία ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε το σύστημα διαλυτών μεθανόλη: νερό: οξικό οξύ με αναλογία όγκων 50:49:1. Η ροή του διαλύτη ήταν 1.0 mL·min⁻¹. Ο προσδιορισμός έγινε σε μήκος κύματος 278,8 nm έπειτα από εκτέλεση προκαταρκτικών πειραμάτων [38].

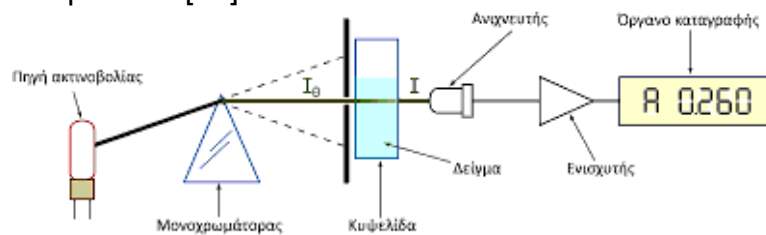
Όλοι οι διαλύτες ήταν HPLC grade. Όποτε ήταν απαραίτητο, γινόταν αραίωση του προς ανάλυση δείγματος προκειμένου αυτό να είναι στα όρια της πρότυπης καμπύλης που προσδιορίστηκε πειραματικά με γνωστές ποσότητες φαινόλης με βάση την εξίσωση (1).

$$\text{Area} = 275,749 \cdot \text{Phenol} (\mu\text{g}) + 86,898 (1), R^2 = 0,9996$$

2.7 Φασματοφωτομετρία

Η φασματοφωτομετρία είναι μια από τις πιο χρήσιμες αναλυτικές τεχνικές στη για τον χαρακτηρισμό βιολογικών δειγμάτων. Το τμήμα του μορίου που είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας καλείται χρωμοφόρο και η εμφάνιση των χαρακτηριστικών ταινιών απορροφήσεως των διαφόρων χρωμοφόρων σε ένα φάσμα απορροφήσεως είναι ενδεικτική για την ύπαρξη των ομάδων αυτών στο μόριο. Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (~200-800nm) χρησιμοποιείται κυρίως για τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών, με συσχέτιση του ποσοστού απορροφήσεως ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας προς τη συγκέντρωση της ουσίας που είναι υπεύθυνη για την απορρόφηση. Για τον προσδιορισμό των φωτοσυνθετικών χρωστικών 1 mL της καλλιέργειας φυγοκεντρίθηκε στα 1000g για 5 λεπτά και μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου κυτταρικό ίζημα διαλύθηκε σε 1 mL που το 80% ήταν ακετόνη. Στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση σε συγκεκριμένα μήκη κύματος (470,0 nm, 646,8 nm και 663,2 nm) με τη χρήση ενός UV-2700 UV-Vis φασματοφωτομέτρου.

Οι εξισώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των χλωροφυλλών παρουσιάζονται παρακάτω [39].



Εικόνα 21: Διάταξη φασματοφωτομετρίας

$$\begin{aligned}
 C_a &= 12.25A_{663.2} - 2.79A_{646.8} \\
 C_b &= 21.5A_{646.8} - 5.1A_{663.2} \\
 C_{x+c} &= \frac{(1000A_{470} - 1.82C_a - 85.02C_b)}{198}
 \end{aligned}$$

2.8 Μέτρηση έκλυσης οξυγόνου(O₂)

2.8.1. Αρχή της μεθόδου

Μεταξύ ενός ηλεκτροδίου πλατίνας (κάθοδος) και ενός άλλου από άργυρο (άνοδος) τίθεται, μέσω ενός ηλεκτρολύτη (κορεσμένο διάλυμα KCl), μία μικρή ηλεκτρική τάση (~50V). Για τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ ανόδου και καθόδου, χρειάζεται O₂ το οποίο περνά από μία ημιπερατή μεμβράνη, που χωρίζει το δείγμα από τα ηλεκτρόδια.

Η φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου από το δείγμα (φωτοσυνθετικά κύτταρα) επιτυγχάνεται μόνο με το φωτισμό του δείγματος. Η αποφυγή του περιοριστικού για τη φωτοσύνθεση παράγοντα (συγκέντρωση CO₂ στο διάλυμα του δείγματος) επιτυγχάνεται με την προσθήκη NaHCO₃

2.8.2 Πολαρογραφικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικού ρυθμού παραγωγής οξυγόνου.

Οι μετρήσεις του ρυθμού έκλυσης οξυγόνου γίνεται με επιλεκτικό ηλεκτρόδιο τύπου Clark. Η ρύθμιση του ηλεκτροδίου έγινε στους 25°C με διάλυμα 0.034%NaHCO₃και 0.896%tricine ρυθμισμένο σε PH ίσο με 7,6. Το διάλυμα ήταν κορεσμένο σε οξυγόνο. Η κυψελίδα, που χρησιμοποιείται είναι γυάλινη με πρόσθετο γυάλινο περίβλημα, που επιτρέπει τη διέλευση H₂O, προκειμένου να διατηρείται η θερμοκρασία στους 25°C. Για την πραγματοποίηση της φωτοσύνθεσης ,το φως παράγεται από μία λάμπα βολφραμίου ισχύος 250W και εστιάζεται στο δείγμα, έτσι ώστε να δημιουργούνται συνθήκες φωτοκορεσμού (παρατηρείται αύξηση της μεταβολής του O₂ και λαμβάνονται μετρήσεις ανά πέντε δευτερόλεπτα). Το φως πριν φθάσει στην κυψελίδα, διέρχεται πρώτα από μια γυάλινη φιάλη μήκους 5cm, που περιέχει διάλυμα 0,2%w/v θειϊκού χαλκού (CuSO₄). Το διάλυμα αυτό απορροφώντας τα μεγάλα μήκη κύματος, προστατεύει το δείγμα από γρήγορη θέρμανση. Στη συνέχεια, το φως διέρχεται από ένα κόκκινο πλαστικό φίλτρο, για την απορρόφηση των μικρών μήκων κύματος. Έτσι, το φως, που διέρχεται στην κυψελίδα με το δείγμα, κυμαίνεται σε ένα εύρος μηκών κύματος 600-700nm.

Για τις μετρήσεις έκλυσης οξυγόνου συλλέχθηκαν από τα δείγματα προς ανάλυση 3mL, φυγοκεντρήθηκαν για 5min(1500g) έτσι ώστε να ληφθεί το κυτταρικό ίζημα και να επαναιωρηθεί αργότερα σε 4mL διαλύματος (0,034%NaHCO₃και 0,896%tricine) τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση.

2.9 Υπολογισμός παραμέτρων που σχετίζονται με την ανάπτυξη

Στην συγκεκριμένη εργασία υπολογίστηκαν κάποιες παράμετροι που σχετίζονται με την ανάπτυξη μικροοργανισμών παρουσία διαφορετικών υποστρωμάτων.

Για το σκοπό αυτό, αρχικά το ξηρό βάρος των κυττάρων συσχετίστηκε με τον όγκο καθιζαμένων κυττάρων ανά mL καλλιέργειας με βάση την εξίσωση:

$$\text{Dry Weight (mg)} = 0,340 \cdot \text{PCV } (\mu\text{L}) - 0,020 \quad R^2 = 0,9910$$

Οι κυριότερες παράμετροι που υπολογίστηκαν στην παρούσα εργασία είναι οι ακόλουθες:

1. Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (specific growth rate, μ).

$$\mu = \frac{\ln W_f - \ln W_i}{t_f - t_i}$$

Όπου, t_f τελικός χρόνος, t_i αρχικός χρόνος (είναι κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης), W_f και W_i είναι τα ξηρά βάρη τελικά και αρχικά αντίστοιχα. Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης υπολογίστηκε για τις πρώτες 48 ώρες που οι καλλιέργειες βρίσκονταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

2. Απόδοση ανάπτυξης

$$Y_{x/s} = \frac{W_f - W_i}{S_i - S_f}$$

S_i και S_f είναι τα mg της φαινολικής ένωσης που καταναλώθηκαν στην αρχή και στο τέλος του πειράματος δηλαδή της πέμπτης μέρας. Αυτός ο λόγος υποδηλώνει κατά πόσο αναπτύχθηκε ο οργανισμός σε σχέση με την ποσότητα φαινόλης που αποικοδόμησε [40].

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Επίδραση της παρουσίας ή απουσίας εναλλακτικού οργανικού άνθρακα στη βιοαποικοδόμηση της φαινόλης από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*.

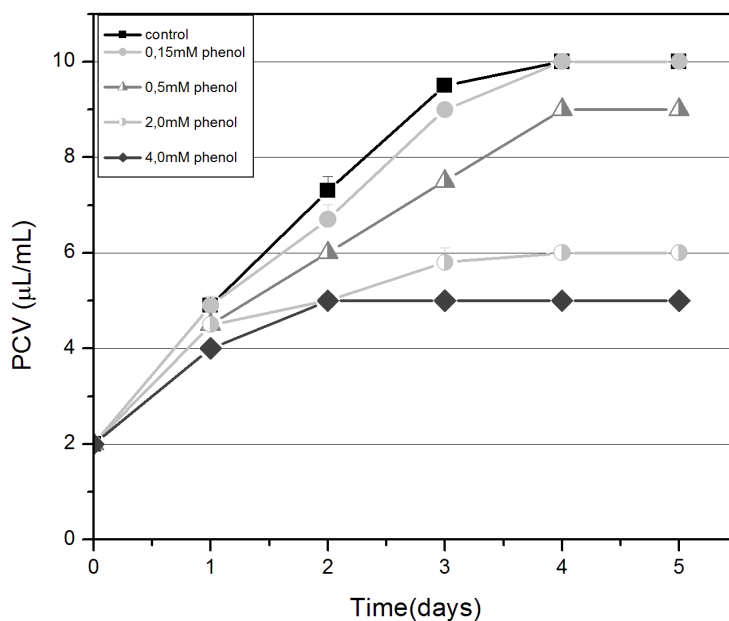
3.1.1 Ανάπτυξη του *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125 σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων φαινόλης.

Στην εικόνα 22 παρουσιάζεται η ανάπτυξη του μικροφύκου στο φως, παρουσία εναλλακτικής πηγής οργανικού άνθρακα (οξικό οξύ). Χρησιμοποιήθηκε ένα εύρος συγκεντρώσεων φαινόλης από 0,15 mM έως 4,0 mM. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πηγή του άνθρακα σε συνδυασμό με την ποσότητα φαινόλης που χρησιμοποιήθηκε επηρέασαν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, ανεξάρτητα από την παρουσία ή την απουσία φαινόλης, ανάπτυξη επιτεύχθηκε μόνο με την παρουσία του οξικού οξέως. Απουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα δεν παρατηρήθηκε καθόλου αύξηση βιομάζας (όπως φαίνεται και στα αποτελέσματα του πίνακα 10). Το αποτέλεσμα είναι αναμενόμενο καθώς η οργανική πηγή άνθρακα είναι μία “εύκολη” πηγή ενέργειας που με τη διάσπασή της κερδίζει μεγάλες ποσότητες ATP.

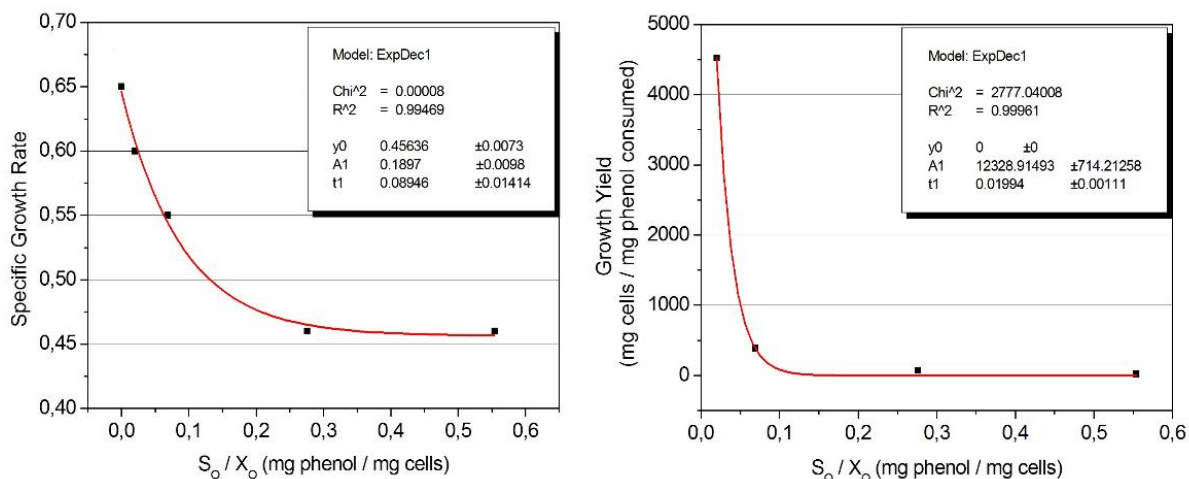
Με αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της φαινόλης παρατηρήθηκε μια διαδοχική αναστολή της ανάπτυξης. Όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα 11, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μ) μειώθηκε από 0,65 σε 0,46 παρουσία 4,00 mM φαινόλης. Επίσης από τον πίνακα 11 παρατηρείται μια μείωση του λόγου απόδοσης (Y_{XS}) διότι όπως θα παρουσιαστεί και στα αποτελέσματα βιοαποικοδόμησης, παρόλο που ο μικροοργανισμός καταναλώνει μεγαλύτερες ποσότητες φαινόλης όσο αυξάνεται η αρχική συγκέντρωση, ταυτόχρονα σημειώνεται σημαντική αναστολή στην ανάπτυξή του. Δεν παρατηρήθηκε μεγαλύτερη αύξηση της βιομάζας του οργανισμού παρουσία της φαινόλης (ακόμα και στις χαμηλές συγκεντρώσεις) σε σχέση με την καλλιέργεια μάρτυρα (control). Αυτό φαίνεται ξεκάθαρα στην καλλιέργεια με οξικό οξύ στο φως, όπου μόνο η καλλιέργεια φαινόλης με συγκέντρωση 0,15mM καταφέρνει να επιτύχει την ίδια παραγωγή βιομάζας με την καλλιέργεια control την τελευταία ημέρα του. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι φαινόλη είναι ένα υπόστρωμα που αναστέλλει την ανάπτυξη σε καλλιέργειες του *Chlamydomonas*, ιδιαίτερα σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Πίνακας 10. Κυτταρική συγκέντρωση καλλιιεργειών την 5^η πειραματική ημέρα σε συνθήκες απουσίας οξικού οξέως (Limit C) στο φως 50-60 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Αρχική Συγκέντρωση φαινόλης (mM)	Κυτταρική Συγκέντρωση ($\mu\text{LPCV} / \text{mLκαλλιέργειας}$)	
	Ημέρα 0	Ημέρα 5
0,15	2,0	2,0
0,50	2,0	2,0
2,00	2,0	2,0
4,00	2,0	2,0



Εικόνα 22: Καμπύλη ανάπτυξης του *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125 παρουσία οξικού οξέως υπό ένταση φωτός 50-60 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων φαινόλης. Η αρχική συγκέντρωση κυττάρων ήταν 2,0 $\mu\text{L PCV} / \text{mL}$.



Εικόνα 23: Συσχέτιση του λόγου S_0/X_0 με τις παραμέτρους ανάπτυξης, Αριστερά φαίνεται το διάγραμμα που δείχνει τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης σε συνάρτηση με τον λόγο S_0/X_0 (mg φαινόλης / mg κυττάρων) ενώ δεξιά φαίνεται το διάγραμμα που δείχνει τον λόγο απόδοσης σε συνάρτηση με το λόγο S_0/X_0 (mg φαινόλης/mg κυττάρων).

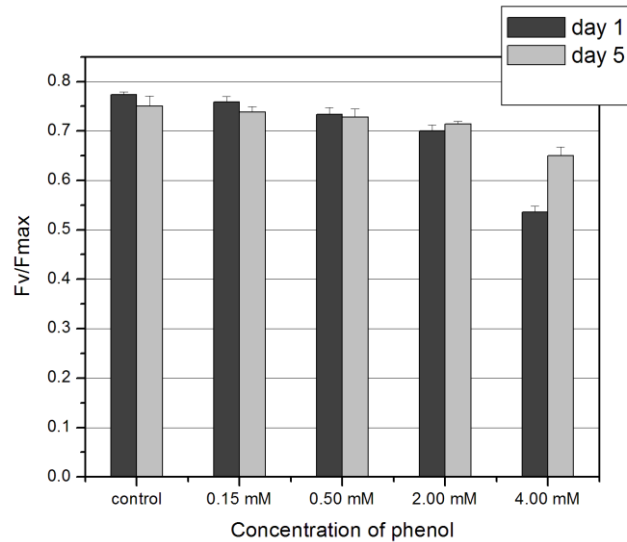
Πίνακας 11: Κινητικές παραμέτροι για τις συνθήκες παρουσίας οξικού στο φως

Παρουσία οξικού οξέως	Λανθάνουσα φάση, χρόνος(σε μέρες)	Εκθετική φάση χρόνος (σε μέρες)	specific growth rate μ^1 (days ⁻¹)	$Y_{X/S}^2$ (mg cells/ mg phenol)
control	0	2	0,65	
0,15 mM	0	2	0,60	4521,30
0,50 mM	0	2	0,55	387,15
2,00 mM	0	2	0,46	71,84
4,00 mM	0	2	0,46	19,87

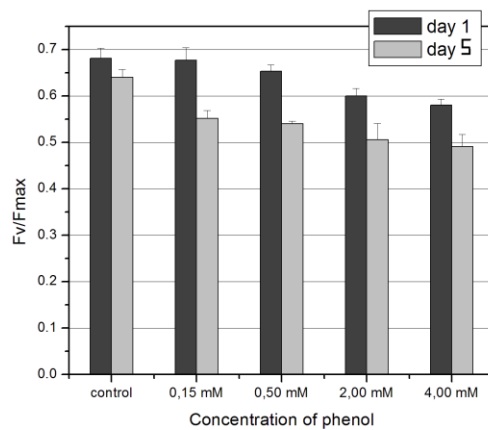
3.1.2 Επίδραση της φαινόλης στη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μικροφύκου.

Για να διαπιστώσουμε πως επηρεάζει η φαινόλη τη δομή και τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού έγιναν μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού στις καλλιέργειες στις πρώτες 24 ώρες και έπειτα από διάστημα 5 ημερών. Λαμβάνοντας τα αποτελέσματα του JIP-test διαπιστώθηκε η παρουσία φαινόλης προκαλεί συμπτώματα καταπόνησης (stress) στα κύτταρα. Στις εικόνες 24 και 25 παρουσιάζεται η μεταβολή του λόγου F_v/F_{max} στις 24 ώρες και στην 5^η ημέρα από την έναρξη των πειραμάτων για τις συνθήκες παρουσία και απουσίας οξικού οξέως στο φως. Στον πίνακα 12 παρουσιάζονται οι παράμετροι που υπολογίστηκαν με το JIP- test. Ο λόγος που δεν αναλύθηκαν οι παράμετροι του JIP-test την 5^η μέρα είναι

γιατί ενδεχομένως να παρατηρούνται δευτερογενή φαινόμενα στις καλλιέργειες καθώς οι καλλιέργειες έχουν ήδη εισέλθει στη στατική φάση



Εικόνα 24: Διάγραμμα που δείχνει πως επηρεάζεται η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση τις ημέρες 1 και 5 παρουσία διάφορων φαινολικών συγκεντρώσεων παρουσία οξικού οξέως υπό ένταση φωτός $50-60 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$



Εικόνα 25: Διάγραμμα που δείχνει πως επηρεάζεται η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση τις ημέρες 1 και 5 παρουσία διάφορων φαινολικών συγκεντρώσεων απουσίας οξικού οξέως υπό ένταση φωτός $50-60 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Πίνακας 12: Φωτοσυνθετικοί παράμετροι του JIP-test στις πρώτες 24 ώρες στις καλλιέργειες του *Chlamydomonas reinhardtii* παρουσίας και απουσίας οξικού οξέως στο φως 50-60 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Παρουσία οξικού οξέως					
	F_v/F_{max}	ABS/RC	DI_o/RC	RC/ CS_o	TR_o/ABS
control	0,773	1,855	0,437	53,901	0,747
0,15 mM	0,759	2,048	0,496	47,126	0,741
0,50 mM	0,734	2,163	0,572	43,814	0,704
2,00 mM	0,700	2,261	0,669	38,521	0,674
4,00 mM	0,536	3,109	1,365	30,643	0,511
Απουσία οξικού οξέως					
	F_v/F_{max}	ABS/RC	DI_o/RC	RC/ CS_o	TR_o/ABS
control	0,681	2,138	0,698	30,715	0,663
0,15 mM	0,677	2,287	0,772	29,671	0,649
0,50 mM	0,653	2,877	1,246	26,484	0,590
2,00 mM	0,600	3,385	1,470	23,286	0,581
4,00 mM	0,580	3,489	1,533	24,802	0,554

F_v / F_{max} : μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση (STDEV: 0,005 - 0,027), ABS / RC: Μέγεθος λειτουργικής κεραίας (STDEV: 0,044 - 0,309), DI_o / RC : Διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης υπό μορφή θερμότητας (STDEV: 0,001 - 0,087), RC / CS_o : πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης (STDEV: 0.181- 3.551), TR_o / ABS : κβαντική απόδοση της πρωταρχικής φωτοχημείας (STDEV: 0,001 - 0,043)

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι με την παρουσία οξικού οξέως στις καλλιέργειες παρατηρούνται σταδιακά χαμηλότερες τιμές (όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της φαινόλης) για την μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση, την πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης και της κβαντικής απόδοσης της πρωταρχικής φωτοχημείας. Αντίθετα παρατηρείται μια αύξηση του μεγέθους της φωτοσυνθετικής κεραίας και της διαχεόμενης ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης υπό μορφή θερμότητας, πράγμα που αιτιολογεί ότι ο οργανισμός είναι σε καταπόνηση (stress). Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται και στις καλλιέργειες απουσία οξικού οξέως. Η διαφορά είναι ότι δεν παρατηρήθηκε τόσο μεγάλη μείωση στα ενεργά φωτοσυνθετικά κέντρα σε σχέση με την καλλιέργεια που περιέχεται το οξικό οξύ. Αυτές οι αλλαγές στις παραμέτρους του JIP-test έχουν παρατηρηθεί προηγουμένως στη βιβλιογραφία κάτω από υψηλές συγκεντρώσεις του όζοντος [41], θερμικής καταπόνησης [37] και υπό την παρουσία υποκατεστημένων φαινολικών ενώσεων [23].

Είναι αξιοσημείωτο ότι υπό την παρουσία του οξικού οξέως η έκφραση της καταπόνησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού δεν είναι τόσο έντονη. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην πυκνότητα των ενεργών φωτοσυνθετικών κέντρων αντίδρασης (RC / CS_o). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι όταν το οξικό οξύ ήταν παρόν η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση την τελευταία πειραματική ημέρα επέστρεψε σε υψηλά επίπεδα, ειδικά στην περίπτωση που η

συγκέντρωση της φαινόλης είναι 4,00mM το φαινόμενο αυτό είναι πιο έντονο σε σχέση με την τιμή που παρατηρήθηκε στις πρώτες 24 ώρες. Από την άλλη πλευρά με την απουσία του οξικού, η φωτοσυνθετική απόδοση μειώνεται σημαντικά κατά την τελευταία ημέρα του πειράματος. Αυτό το αποτέλεσμα δείχνει την σημασία της οργανικής πηγής άνθρακα, καθώς αποτελεί ένα υπόστρωμα το οποίο μπορεί να παράγει ενέργεια την οποία έπειτα θα χρησιμοποιήσει ο μικροοργανισμός. Όλες οι καλλιέργειες στις οποίες η φαινόλη ήταν παρών οι λόγοι F_v/F_{max} ήταν χαμηλότεροι από τις καλλιέργειες μάρτυρες.

Για να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω αποτελέσματα υπολογίστηκε η συγκέντρωση των φωτοσυνθετικών χρωστικών την 5^η ημέρα διεξαγωγής του πειράματος.

Πίνακας 13: Συγκέντρωση φωτοσυνθετικών χρωστικών την πέμπτη ημέρα διεξαγωγής του πειράματος σε συνθήκες παρουσίας οξικού οξέως στο φως 50-60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$

Παρουσία οξικού οξέως	C _a μg χρωστικής/ μL PCV	C _b μg χρωστικής/ μL PCV	C _{x+c} μg χρωστικής/ μL PCV	C _a / C _b
control	4,23±0,05	1,99±0,01	1,62±0,03	2,12
0,15 mM	4,07±0,04	1,92±0,03	1,60±0,01	2,12
0,50 mM	3,89±0,06	1,88±0,08	1,59±0,07	2,07
2,00 mM	5,25±0,42	2,67±0,20	2,21±0,15	1,97
4,00 mM	7,24±0,13	3,98±0,12	2,88±0,02	1,82

Πίνακας 14: Συγκέντρωση φωτοσυνθετικών χρωστικών την πέμπτη ημέρα διεξαγωγής του πειράματος σε συνθήκες παρουσίας οξικού οξέως στο φως 50-60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$

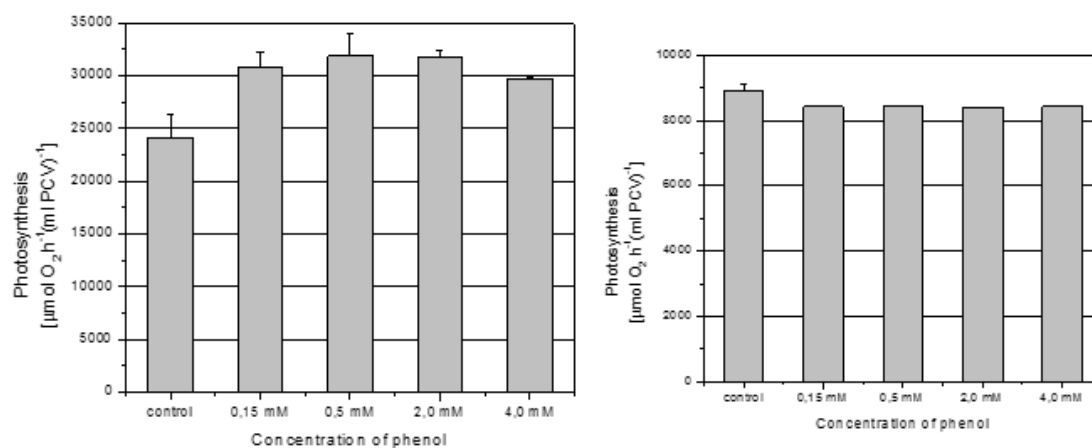
Απουσία οξικού οξέως	C _a μg χρωστικής/ μL PCV	C _b μg χρωστικής/ μL PCV	C _{x+c} μg χρωστικής/ μL PCV	C _a / C _b
control	6,11±0,50	2,79±0,028	2,26±0,19	2,19
0,15 mM	5,76±0,02	2,82±0,04	2,24±0,07	2,05
0,50 mM	4,89±0,08	2,39±0,06	1,94±0,05	2,05
2,00 mM	4,28±0,52	2,29±0,09	1,47±0,07	1,86
4,00 mM	4,01±0,18	2,51±0,01	1,56±0,09	1,60

Ο λόγος C_a / C_b ήταν χαμηλότερος σε καλλιέργειες που περιείχαν φαινόλη και αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι υπάρχει μια μείωση στην πυκνότητα των ενεργών φωτοσυνθετικών κέντρων αντιδράσεις και μία αύξηση στο μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυνθετικής κεραίας όπως έδειξαν και οι σχετικές παράμετροι του JIP-test. Αυτό αιτιολογείται από το γεγονός ότι η χλωροφύλλη α είναι μια χρωστική

βρίσκεται στο κέντρο της αντίδρασης, ενώ η χλωροφύλλη β είναι κυρίως μια χρωστική που βρίσκεται στη φωτοσυνθετική κεραία.

Στην περίπτωση παρουσίας οξικού οξέως στις υψηλές συγκεντρώσεις φαινόλης η χλωροφύλλη α είναι σε μεγαλύτερη ποσότητα σε σχέση με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις αλλά και το control. Αυτό εξηγείται γιατί υπήρχε μεγάλη διαφορά στη βιομάζα στις χαμηλές με τις υψηλές συγκεντρώσεις φαινόλης με αποτέλεσμα να έχουμε φαινόμενα σκίασης(στις χαμηλές συγκεντρώσεις φαινόλης) εξαιτίας της μεγάλης κυτταρικής ανάπτυξης.

Τα αποτελέσματα του επαγωγικού φθορισμού μπορούν να συσχετιστούν και με μετρήσεις του ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου. Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα με την μέτρηση της φωτοσύνθεσης μετά από 24 ώρες.

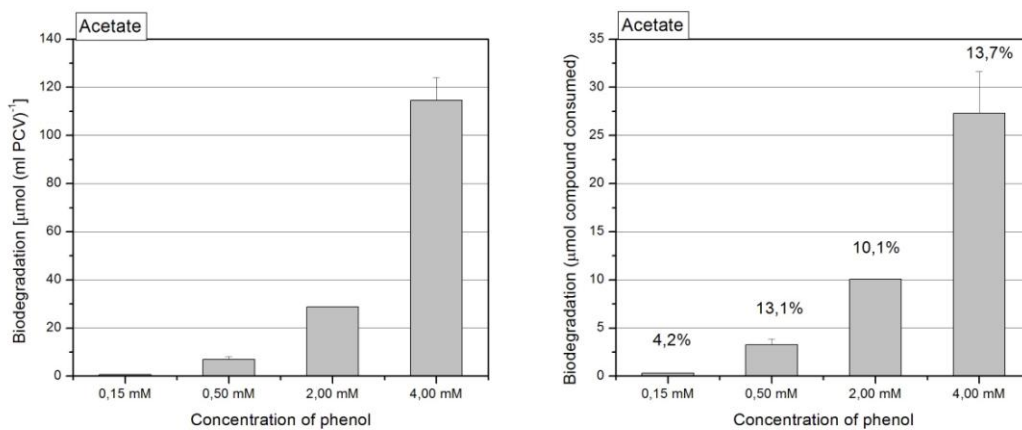


Εικόνα 26: Αριστερά φαίνεται η φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου τις πρώτες 24 ώρες στην καλλιέργεια παρουσία οξικού οξέως στο φως ανά κυτταρικό όγκο, ενώ δεξιά ομοίως φαίνεται η φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου απουσίας οξικού οξέως.

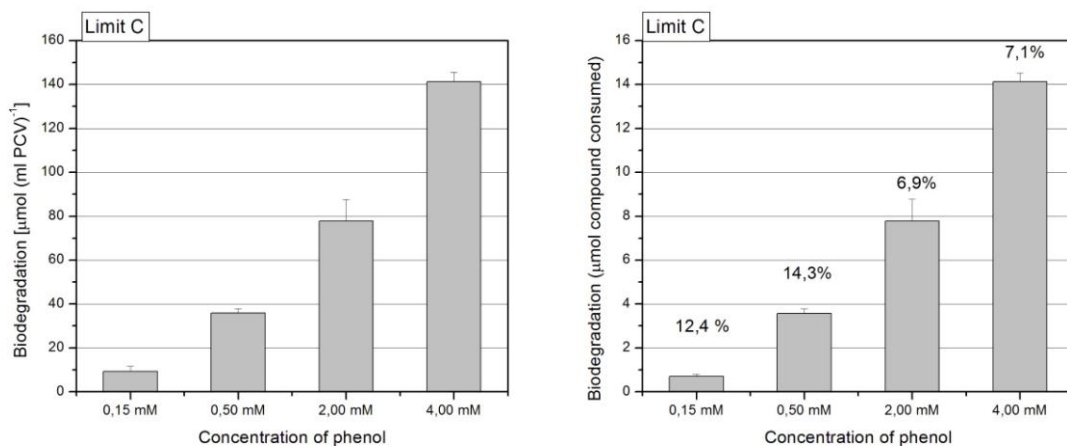
Παρατηρείται ότι στις συνθήκες απουσίας οξικού έχουμε μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας σε σχέση με τις καλλιέργειες μάρτυρες αν και η έκκλιση του O_2 δεν αλλάζει σημαντικά από την αύξηση της συγκέντρωσης της φαινόλης, καθώς φαίνεται να μην έχει καθοδική τάση. Παρουσία οξικού φαίνεται ότι οι καλλιέργειες που περιέχουν φαινόλη εμφανίζουν υψηλότερη φωτοσυνθετική δραστηριότητα από αυτή του control φτάνοντας σε ένα μέγιστο και στην συνέχεια ακολουθεί διαδοχική μείωση της δραστηριότητας. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι αλλαγές που προκαλούνται στις παραμέτρους JIP-test συνήθως συνδέονται με ενισχυμένη φωτοχημική απόσβεση της απορροφούμενης ενέργειας και κατά συνέπεια σε αυξημένο ρυθμό φωτοσυνθετικής δραστηριότητας όπως έχει αναφερθεί και στη βιβλιογραφία παρουσία para- κρεσόλης [42].

3.1.3. Βιοαποικοδόμηση φαινόλης από τα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125

Η βιοαποικοδόμηση εκφράστηκε με δύο τρόπους. Ο πρώτος αφορούσε την απόλυτη βιοαποικοδόμηση της φαινόλης ανά καλλιέργεια, εκφρασμένη σε μολ φαινόλης που καταναλώθηκαν και ο δεύτερος δείχνει τη σχετική βιοαποικοδόμηση φαινόλης που εκφράζεται σε μολ ουσίας που αποικοδομήθηκε ανά κυτταρικό όγκο (PCV). Ο λόγος που δεν επικεντρωθήκαμε στη βιοαποικοδόμηση της φαινόλης εκφρασμένη σε ποσοστό είναι γιατί δεν μπορούμε να εξάγουμε συγκρίσιμα αποτελέσματα διότι στα πειράματα έχει χρησιμοποιηθεί ένα εύρος συγκεντρώσεων. Όταν η βιοαποικοδόμηση εκφράζεται ανά κυτταρικό όγκο φαίνεται κατά πόσο “μία μονάδα” ποσότητας κυττάρων αποικοδομεί την ουσία. Η αποικοδόμηση φαινόλης μετά από πέντε ημέρες επώασης απεικονίζεται παρακάτω.



Εικόνα 27: Βιοαποικοδόμηση της φαινόλης από καλλιέργειες *Chlamydomonas reinhardtii* την 5^η πειραματική ημέρα. Δεξιά το διάγραμμα δείχνει την απόλυτη απομάκρυνση φαινόλης ανά καλλιέργεια, εκφρασμένη σε μολ και αριστερά την απομάκρυνση φαινόλης ανά κυτταρικό όγκο (PCV) παρουσία οξικού οξέως στο φως. Τα ποσοστά στο δεξί διάγραμμα δείχνουν την ποσοστιαία βιοαποικοδόμηση της φαινόλης.



Εικόνα 28: Βιοαποικοδόμηση της φαινόλης από καλλιέργειες *Chlamydomonas reinhardtii* την 5^η πειραματική ημέρα. Δεξιά το διάγραμμα δείχνει την απόλυτη απομάκρυνση φαινόλης ανά καλλιέργεια, εκφρασμένη σε μολι και αριστερά την απομάκρυνση φαινόλης ανά κυτταρικό όγκο (PCV) απουσία οξικού οξέως στο φως. Τα ποσοστά στο δεξί διάγραμμα δείχνουν την ποσοστιαία βιοαποικοδόμηση της φαινόλης.

Είναι εμφανές ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της φαινόλης, αυξάνεται βαθμιαία και η βιοαποικοδόμησή της. Αυτό παρατηρήθηκε και στις δύο συνθήκες. Σε απόλυτους όρους βιοαποικοδόμησης της φαινόλης, η παρουσία οξικού οξέως φαίνεται να βοηθάει αυτή τη διαδικασία. Αυτή όμως η παρατήρηση δεν είναι πραγματική γιατί με την παρουσία οξικού οξέως η βιομάζα των κυττάρων είναι σε πολύ υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με τις αντίστοιχες καλλιέργειες απουσία οξικού οξέως.

Στις συνθήκες που δεν υπήρχε οξικό οξύ δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη, επομένως θα ήταν πιο σωστό να συγκρίνουμε τα ποσά βιοαποικοδόμησης μεταξύ των δύο συνθηκών εκφρασμένη ανά κυτταρικό όγκο. Σε μια τέτοια περίπτωση τα υψηλότερα επίπεδα βιοαποικοδόμησης παρατηρήθηκαν απουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα, ειδικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Η σημασία αυτού του γεγονότος είναι ότι σε συνθήκες χωρίς αποθέματα άνθρακα τα κύτταρα προσαρμόζουν τον μεταβολισμό τους, προκειμένου για να αποκτήσουν αποθέματα. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία σε καλλιέργειες του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* [23] όπου παρατηρήθηκε απομάκρυνση φαινόλης μόνο σε καλλιέργειες που δεν υπήρχε εναλλακτική πηγή άνθρακα. Έτσι φαίνεται ότι η φαινόλη χρησιμοποιείται από τα μικροφύκη ως εναλλακτική πηγή άνθρακα.

Στην περίπτωση υψηλών συγκεντρώσεων φαινόλης αυτή η υπόθεση αλλάζει. Στις καλλιέργειες με οξικό οξύ η βιοαποικοδόμηση ανά καλλιέργεια αυξήθηκε σημαντικά σε υψηλές συγκεντρώσεις φαινόλης. Σε κάθε περίπτωση πρέπει να συνυπολογίσουμε το γεγονός της αναστολής της ανάπτυξης που προκαλείται από τη φαινόλη σε υψηλές συγκεντρώσεις. Για το λόγο αυτό υπολογίστηκε ο λόγος απόδοση ανάπτυξης ($Y_{X/S}$) (Πίνακας 11).

Η μείωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης αποδεικνύει τη σημασία της παρουσίας πηγής υψηλών ενεργειακών αποθεμάτων στο μέσο καλλιέργειας. Συνεπώς η σημασία του οξικού οξέος δεν θα πρέπει να υποτιμηθεί, γιατί είναι ξεκάθαρο ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο να επιτρέπει στα μικροφύκη να ξεπεράσουν τις συνέπειες της καταπόνησης από τις υψηλές συγκεντρώσεις φαινόλης. Είναι σαφές ότι σε όλες τις περιπτώσεις, αυξημένη καταπόνηση οδηγεί σε αυξημένη αποικοδόμηση της φαινόλης. Είναι σαφές ότι η αποικοδόμηση της φαινόλης επιβραδύνει την ανάπτυξη των κυττάρων. Σύμφωνα με τη θεωρία του Pirt [43] η επιπλέον κατανάλωση του υπόστρωματος δεν χρησιμοποιείται για σκοπούς ανάπτυξης. Με άλλα λόγια η ενέργεια δεν χρησιμοποιείται για την παραγωγή βιομάζας. Οι Rusell και Cook [44] πρότειναν ότι αφού η συντήρηση (maintenance) είναι μια κυτταρική λειτουργία που μειώνει την ανάπτυξη, η συνεισφορά της συντήρησης είναι πιο έντονη ιδιαίτερα όταν ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης είναι χαμηλός (Πίνακας 11).

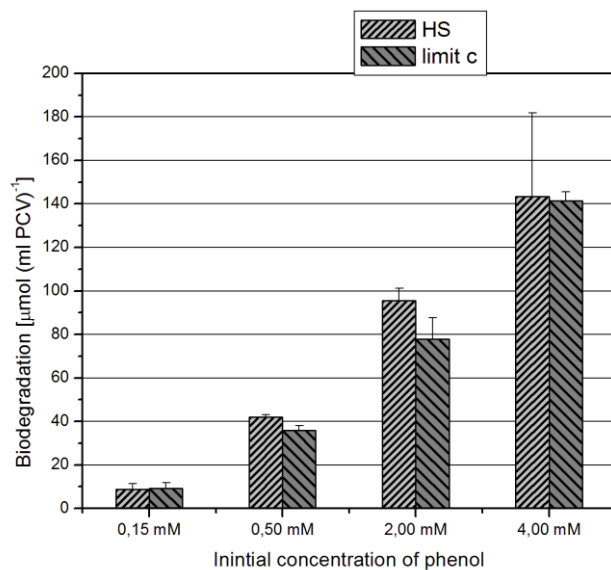
Οι Liu et al., [45] έλαβαν υπόψη τον συντελεστή αποσύνδεσης της ενέργειας (energy uncoupling coefficient), και πρότειναν ότι αυτή η παράμετρος μειώνει την αποτελεσματικότητα της μετατροπής ενέργειας σε βιομάζα. Το υπόστρωμα καταναλώνεται από τους μικροοργανισμούς για τη δημιουργία διάφορων ενδοκυτταρικών μεταβολιτών και ενέργειας (ATP). Οι μεταβολίτες και η ενέργεια στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για τον σχηματισμό βιομάζας, συντήρηση (maintenance) και σχηματισμό μεταβολικών προϊόντων. Επίσης ενέργεια μπορεί να καταναλωθεί μέσω απωλειών ή ανενεργούς κύκλου [45]. Τα κύτταρα έχουν εναλλακτικές οδούς ενεργειακής εκμετάλλευσης. Το φαινόμενο αυτό καλείται «εκροή», «αποσύνδεση» και «υπερμεταβολισμός». Επιπλέον, μια καλλιέργεια με επάρκεια σε υπόστρωμα επιδεικνύει μεγαλύτερη κατανάλωση υποστρώματος σε σχέση από μία καλλιέργεια στη οποία το οργανικό υπόστρωμα δεν είναι αρκετό [46].

Στη δική μας περίπτωση, αυτές οι υποθέσεις υποστηρίζονται από το γεγονός ότι στις καλλιέργειες των *Chlamydomonas* που στερούνται μια εναλλακτική πηγή άνθρακα, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη παρά την υψηλή βιοαποικοδόμηση της φαινόλης. Έτσι ο μεταβολισμός των μικροφυκών χρησιμοποιεί την παραγωγή ενέργειας για την απομάκρυνση φαινόλης αντί για την παραγωγή βιομάζας.

Λαμβάνοντας υπόψη την αποικοδόμηση της φαινόλης σε καλλιέργειες που περιέχουν οξικό οξύ (εικόνα 27), καθώς και την παράμετρο F_v / F_{max} (Πίνακας 12) υπό τις ίδιες συνθήκες, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η βιοαποικοδόμηση της φαινόλης σε καλλιέργειες με συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 2,00 mM λαμβάνει χώρα για λόγους αποτοξικοποίησης. Η αντίστοιχες καλλιέργειες που περιέχουν οξικό οξύ, παρουσιάζουν αυξημένη αναλογία F_v/F_{max} μετά την απομάκρυνση της φαινόλης.

3.1.4 Μελέτη επίδρασης απλού θρεπτικού μέσου ανόργανων αλάτων (HS medium) στη βιοαποικοδόμηση της φαινόλης.

Πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω πειράματα σχετικά με την συνθήκη απουσίας οξικού οξέως διότι σε εκείνη τη συνθήκη καταγράφηκε μεγαλύτερη βιοαποικοδόμηση της φαινόλης ανά κυτταρικό όγκο. Προκειμένου να επαληθεύσουμε τα αποτελέσματα της αυξημένης απομάκρυνσης φαινόλης σε περιορισμένες συνθήκες του άνθρακα, τα πειράματα έγιναν σε θρεπτικό μέσο ανόργανων αλάτων (HS medium) [47] διότι στο θρεπτικό μέσο TAP (Limit C συνθήκη) οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω.



Εικόνα 29: το ακόλουθο διάγραμμα δείχνει την απομάκρυνση φαινόλης που εκφράζεται ανά κυτταρικό όγκο, στη συνθήκη απουσίας οξικού στο φως και με (HS) minimal medium

Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην απομάκρυνση φαινόλης σε σύγκριση με το θρεπτικό μέσο TAP απουσίας οξικού οξέως (η φαινόλη ήταν η μόνη πηγή άνθρακα). Επομένως το οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα που υπάρχει στο θρεπτικό μέσο TAP δεν επιδρά στην αποικοδόμηση της φαινόλης.

3.2. Μελέτη επίδρασης εντάσεως φωτισμού και διαθεσιμότητας οξυγόνου στη βιοαποικοδόμηση της φαινόλης από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125.

3.2.1. Μελέτη επίδρασης έντασης φωτισμού στη βιοαποικοδόμηση της φαινόλης.

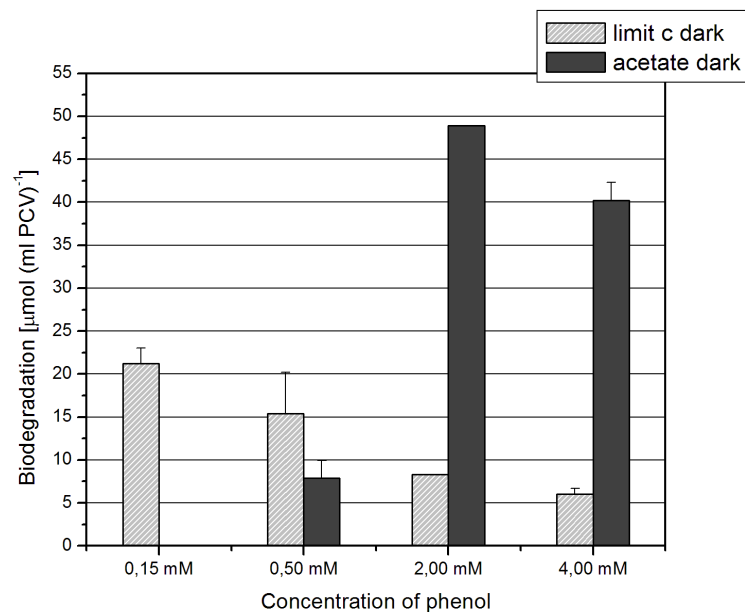
Εκτός από τις καλλιέργειες στο φως μελετήθηκε και η βιοαποικοδόμηση της φαινόλης στο σκοτάδι. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μεταβολής του κυτταρικού όγκου και τα διαγράμματα βιοαποικοδόμησης της φαινόλης παρουσίας και απουσίας οξικού οξέως στο σκοτάδι. Σε όλα τα πειράματα η αρχική συγκέντρωση ήταν 2,0 μL PCV/ mL καλλιέργειας.

Πίνακας 15. Κυτταρικός όγκος καλλιεργειών *Chlamydomonas reinhardtii* την 5^η πειραματική ημέρα σε συνθήκες παρουσίας οξικού οξέως στο σκοτάδι.

Αρχική Συγκέντρωση φαινόλης (mM)	Κυτταρική Συγκέντρωση (μL PCV / mL καλλιέργειας)	
	Ημέρα 0	Ημέρα 5
0.15	2,0	2,5
0.50	2,0	2,5
2.00	2,0	3,0
4.00	2,0	3,0

Πίνακας 16: Κυτταρικός όγκος καλλιεργειών *Chlamydomonas reinhardtii* την 5^η πειραματική ημέρα σε συνθήκες απουσίας οξικού οξέως στο σκοτάδι.

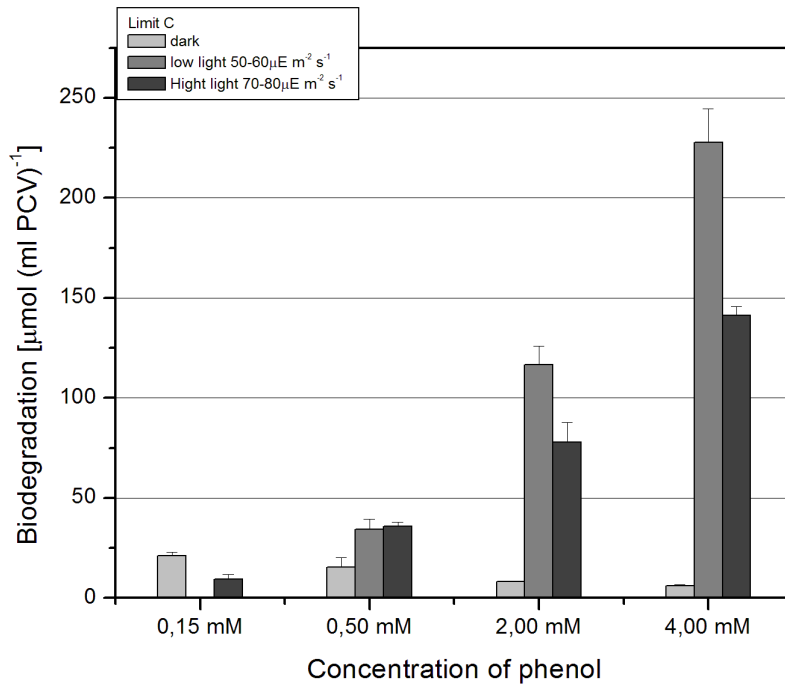
Αρχική Συγκέντρωση φαινόλης (mM)	Κυτταρική Συγκέντρωση (μL PCV / mL καλλιέργειας)	
	Ημέρα 0	Ημέρα 5
0.15	2,0	2,0
0.50	2,0	2,0
2.00	2,0	2,0
4.00	2,0	2,0



Εικόνα 30 : Βιοαποικοδόμηση φαινόλης την 5^η πειραματική ημέρα. Η βιοαποικοδόμηση εκφράζεται ανά κυτταρικό όγκο σε συνθήκες απουσίας και παρουσίας οξικού οξέως στο σκοτάδι.

Παρατηρείται ότι απουσία οξικού οξέως στο σκοτάδι παρατηρείται σταδιακή πτώση της ποσότητας που αποικοδομείται ανά κυτταρικό όγκο με αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της φαινόλης. Σε μικρές συγκεντρώσεις, το μικροφύκος αποικοδομεί τη φαινόλη για να προσλάβει άνθρακα και ενέργεια διότι η φωτοσύνθεση είναι απενεργοποιημένη. Καθώς όμως αυξάνεται η συγκέντρωση της φαινόλης το μικροφύκος αδυνατεί να την απομακρύνει καθώς χρειάζεται πολύ περισσότερη ενέργεια για να μπορέσει να την βιοαποικοδομήσει. Σε αυτό συντελεί και το αντίθετο ακριβώς φαινόμενο που παρατηρείται στην καλλιέργεια που περιέχει οξικό οξύ. Στις χαμηλές συγκεντρώσεις το μικροφύκος δεν χρησιμοποιεί την φαινόλη ως εναλλακτική πηγή άνθρακα καθώς μπορεί να χρησιμοποιήσει το οξικό οξύ χωρίς να καταναλώσει παραπάνω ενέργεια. Παράλληλα στις χαμηλές συγκεντρώσεις η φαινόλη δεν είναι τοξική (όπως φάνηκε από τις αντίστοιχες συνθήκες στο φως) οπότε το μικροφύκος δεν του μπαίνει στη διαδικασία να την αποικοδομήσει. Παρόλα αυτά στις υψηλές συγκεντρώσεις αλλάζουν τα δεδομένα. Καθώς η φαινόλη πλέον είναι τοξική για το μικροφύκος οπότε την αποικοδομεί με σκοπό να αποτοξικοποιήσει το περιβάλλον του.

Έχει προταθεί ότι η βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων είναι μια φωτοσυνθετική διαδικασία. Για το λόγο αυτό η ίδια σειρά πειραμάτων διεξήχθη σε υψηλότερη ένταση φωτός ($70-80 \mu\text{E m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) καθώς και σε απόλυτο σκοτάδι.



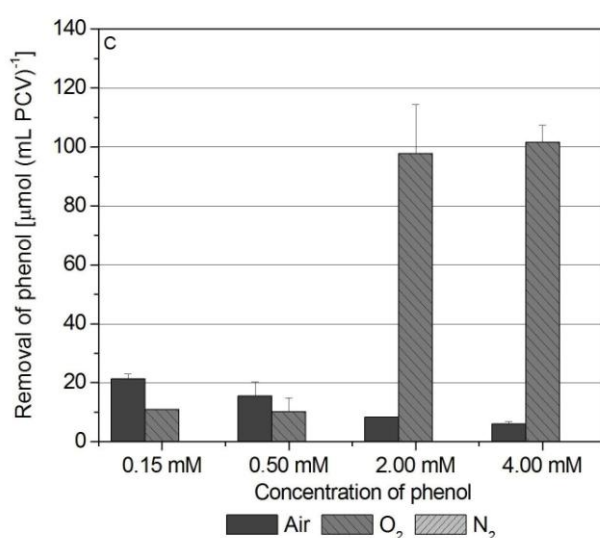
Εικόνα 31: Βιοαποικοδόμηση της φαινόλης που εκφράζεται ανά κυτταρικό όγκο, στην συνθήκη απουσίας οξικού οξέως σε διάφορες εντασεις φωτισμού και στο σκοτάδι.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 31, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην αποικοδόμηση της φαινόλης κάτω από συνθήκες υψηλού φωτισμού όσο αυξανόταν η αρχική συγκέντρωση της ξενοβιοτικής ουσίας. Αντίθετα παρατηρήθηκε αμελητέα απομάκρυνση της φαινόλης στο σκοτάδι σε υψηλότερες αρχικές συγκεντρώσεις της ουσίας. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι οι υψηλότερες εντάσεις φωτός διευκολύνουν την βιοαποικοδόμηση της φαινόλης κάτω από συνθήκες υψηλού stress. Στο σκοτάδι τα *Chlamydomonas* πρέπει να χρησιμοποιήσουν την φαινόλη ως εναλλακτική πηγή άνθρακα, δεδομένου ότι δεν έχει αποθέματα ενέργειας που παρέχονται από τη φωτοσύνθεση. Είναι ευκολότερο για τα κύτταρα να εκτελούν αυτή τη λειτουργία σε χαμηλές συγκεντρώσεις της φαινόλης. Υψηλές συγκεντρώσεις της φαινόλης δρουν ανασταλτικά.

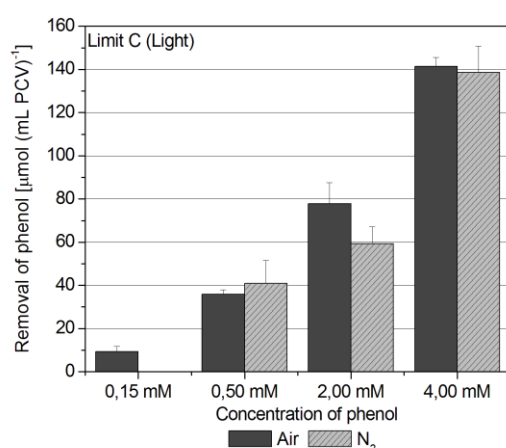
Οι Wurster et al [48] παρατήρησαν ολική αποικοδόμηση φαινόλης από το κυανοβακτήριο *Synechococcus* PCC 7002 στο σκοτάδι και με έλλειψη εναλλακτικής πηγής άνθρακα. Επιπλέον, παράλληλα τη βιοαποικοδόμηση της φαινόλης από το συγκεκριμένο μικροοργανισμό, σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε αύξηση της βιομάζας του, αποτελέσματα που συμφωνούν με τα δικά μας. Το γεγονός επίσης ότι δεν παρατηρείται αύξηση της βιομάζας του *Chlamydomonas* ίσως να οφείλεται στο ότι ο μικροοργανισμός καταναλώνει μεγάλα ποσά ενέργειας στην αποικοδόμηση του ρύπου και χρησιμοποίησή του σαν πηγή άνθρακα. Συνεπώς παρουσιάζεται ανεπάρκεια ενέργειας για την ανάπτυξή του.

3.2.2. Μελέτη επίδρασης διαθεσιμότητας οξυγόνου στην βιοαποικοδόμηση της φαινόλης.

Έχει προταθεί ότι η απομάκρυνση φαινόλης από μικροφύκη είναι μία αερόβια διαδικασία [49] καθώς τα ένζυμα που εμπλέκονται (π.χ. μονοοξυγενάση της φαινόλης, 2,3-διοξυγενάση της κατεχόλης κλπ) χρησιμοποιούν οξυγόνο ως υπόστρωμα [50]. Οι παρακάτω εικόνες δείχνουν τα αποτελέσματα που ελήφθησαν όταν τα πειράματα επαναλήφθηκαν σε συνθήκες με ατμόσφαιρα αζώτου ή περίσσειας οξυγόνου.



Εικόνα 32 : Βιοαποικοδόμηση της φαινόλης που εκφράζεται ανά κυτταρικό όγκο, στις συνθήκες απουσίας οξικού οξέως παρουσίας N₂, O₂ και αέρα στο σκοτάδι



Εικόνα 33 : Βιοαποικοδόμηση της φαινόλης που εκφράζεται ανά κυτταρικό όγκο, στην συνθήκη απουσίας οξικού οξέως παρουσίας N₂ και αέρα στο φως.

Όταν διοχετεύτηκε άζωτο στις φιάλες προκειμένου να αντικαταστήσει τον αέρα και τα πειράματα επαναλήφθηκαν υπό συνθήκες φωτός, δεν παρατηρήθηκαν

σημαντικές διαφορές στη βιοαποικοδόμηση της φαινόλης. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, διότι το οξυγόνο παράγεται φωτοσυνθετικά υπό συνθήκες φωτός. Όταν το ίδιο πείραμα διεξήχθη σε πλήρες σκοτάδι δεν παρατηρήθηκε αποικοδόμηση της φαινόλης ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Για να επιβεβαιωθεί αυτή η παρατήρηση, το ίδιο πείραμα εκτελέστηκε αλλά με διοχέτευση οξυγόνου στις φιάλες αντί για άζωτο. Παρατηρήθηκε σημαντική βιοαποικοδόμηση φαινόλης σε υψηλές συγκεντρώσεις στο σκοτάδι. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η βιοαποικοδόμηση φαινόλης από το *Chlamydomonas reinhardtii* είναι μία αερόβια διαδικασία.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι σε όλες τις συνθήκες έγιναν παράλληλα πειράματα για να ελέγξουμε οποιαδήποτε αβιοτική απομάκρυνση φαινόλης (λόγω φωτοοξειδωσης) που πιθανόν να λάμβανε χώρα. Σε αυτά τα πειράματα δεν παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης της φαινόλης.

Η βιοαποικοδόμηση της φαινόλης είναι μια δυναμική βιοενεργητική διαδικασία που εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την επιλογή των κατάλληλων συνθηκών ανάπτυξης που βοηθούν τα μικροφύκη να ενεργοποιήσουν τους κατάλληλους μηχανισμούς, προκειμένου να μεταβολίσουν την ένωση.

3.3 Μελέτη βιοαποικοδόμησης της φαινόλης από μεταλλαγμένα στελέχη του *Chlamydomonas reinhardtii*.

Εκτός από το στέλεχος του CC-125 μελετήθηκαν και μεταλλαγμένα στελέχη του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii*. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα στελέχη CC-S264K, CC-4476, CC-2656 και το aadAοT. Ο λόγος που χρησιμοποιήσαμε μεταλλάγματα είναι γιατί η χρήση μεταλλάξεων για τη μελέτη ενός συστήματος παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα. Το βασικότερο είναι η ικανότητα παρατήρησης διαφοροποιήσεων εξαιτίας πολύ συγκεκριμένων αλλαγών. Οι αλλαγές αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν τη διαγραφή ή προσθήκη ολόκληρου γονιδίου, τμημάτων του γονιδίου ή ακόμα και στοχευμένη αλλαγή ενός μόνο κωδικονίου η οποία θα επιφέρει αλλαγή σε ένα μόνο αμινοξύ. Παρακάτω περιγράφεται η διαφοροποίηση του κάθε μεταλλάγματος.

CC-S264K: Το μεταλλαγμένο στέλεχος *Chlamydomonas reinhardtii* CC-S264K διαθέτει μία μετάλλαξη στο *psbA* γονίδιο που βρίσκεται στο γονιδίωμα των χλωροπλαστών και κωδικοποιεί την D1 υπομονάδα του φωτοσυστήματος II. Στην D1 υπομονάδα υπάρχουν συγκεκριμένα αμινοξέα που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση της πλαστοκινόνης (QB), ζιζανιοκτόνων, χρωστικών και μετάλλων όπως επίσης και σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων. Το στέλεχος S264K (Ser264→Lys) έχει μια μετάλλαξη που το κάνει ανθεκτικό απέναντι στην ατραζίνη, και γενικότερα στις τριαζίνες, οι οποίες είναι αρωματικές ενώσεις. [51, 52]

CC-4476: Το στέλεχος αυτό έχει υποστεί μετάλλαξη στο γονίδιο TLA2-CpFTSY. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να έχει μικρότερη συγκέντρωση χλωροφύλλης ανά

κύτταρο και υψηλότερη αναλογία χλωροφύλλης α προς β σε σχέση με το άγριου τύπου CC-125.[53]

CC-2656: Το στέλεχος αυτό έχει ανεπαρκές κυτταρικό τοίχωμα. [54]

aadAοT: Το στέλεχος αυτό δεν μπορεί να αναπτυχθεί αυτότροφα αλλά μόνο ετερότροφα.

Μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας ή απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα (οξικό οξύ) κάτω υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{E m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Ο λόγος που τα πειράματα έγιναν στο φως είναι γιατί οι τροποποιήσεις που έγιναν στα μετελάγματα ήταν στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό τους. Εξαίρεση αποτελεί το CC-2656. Η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ήταν 2,0 $\mu\text{L PCV /mL}$ καλλιέργειας.

Πίνακας 17: Κυτταρικός όγκος καλλιεργειών *Chlamydomonas reinhardtii* την 5^η πειραματική ημέρα σε συνθήκες παρουσίας οξικού οξέως στα στελέχη CC-S264K,CC-4476,CC-2656 ,aadAοT.

Αρχική συγκέντρωση φαινόλης	CC-125	CC-S264K	CC-4476	CC-2656	aadAοT
Control	10,00	5,20	4,10	6,00	4,55
0.15 mM	10,00	4,60	2,77	6,30	4,50

Πίνακας 18: καλλιεργειών *Chlamydomonas reinhardtii* την 5^η πειραματική ημέρα σε συνθήκες απουσίας οξικού οξέως στα στελέχη CC-S264K,CC-4476,CC-2656 ,aadAοT

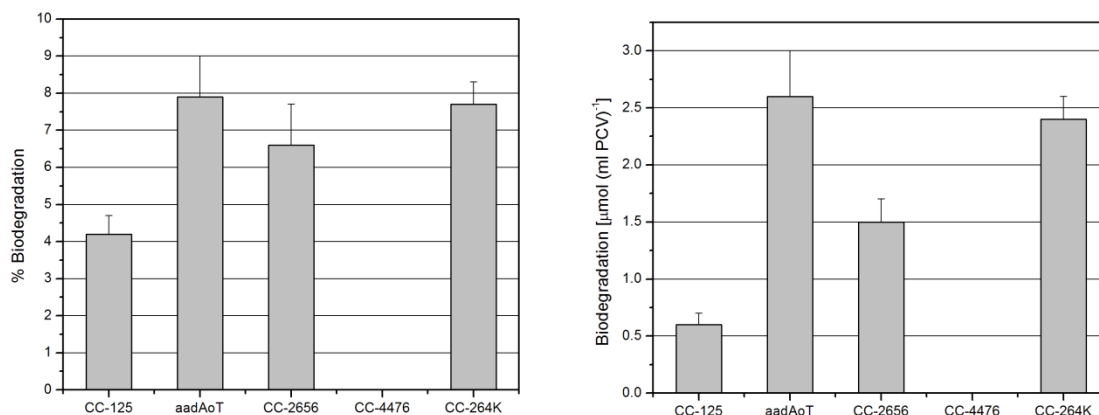
Αρχική συγκέντρωση φαινόλης	CC-125	CC-S264K	CC-4476	CC-2656	aadAοT
Control	2,00	1,80	2,00	1,30	1,00
0.15 mM	2,00	1,80	2,00	1,30	1,00

Από τα αποτελέσματα είναι εμφανές ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη παρουσίασαν μικρότερη ανάπτυξη από το CC-125 παρουσία οξικού οξέως. Για το στέλεχος CC-S264K παρουσία οξικού οξέως παρατηρείται ότι η φαινόλη στην συγκεκριμένη συγκέντρωση δεν επηρεάζει την ανάπτυξη του οργανισμού συγκρίνοντας την με την καλλιέργεια μάρτυρα. Παρόμοια συμπεριφορά εμφανίζουν τα στελέχη CC-2656 και aadAοT. Στο στέλεχος όμως CC-4476 φαίνεται πως η παρουσία της φαινόλης επηρεάζει την ανάπτυξη του οργανισμού καθώς παρατηρείται μείωση της βιομάζας που φτάνει το 32%.

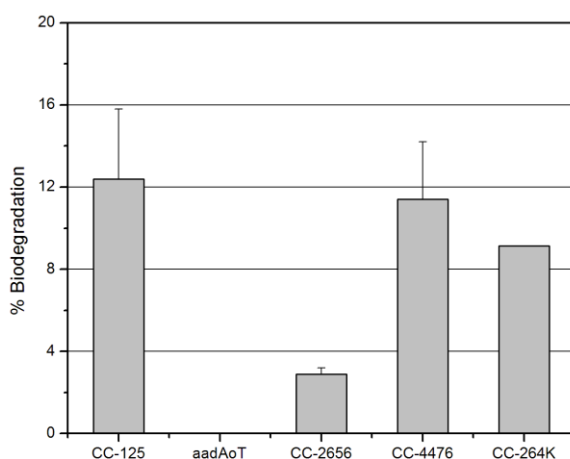
Στη συνθήκη απουσίας οξικού οξέως παρατηρείται ότι τα στελέχη δεν παρουσιάζουν ανάπτυξη. Επίσης πρέπει να επισημανθεί ότι στις καλλιέργειες

απουσίας οξικού οξέως παρατηρήθηκαν συσσωματώματα των μικροφυκών. Επομένως τα αποτελέσματα της κυτταρικής συγκέντρωσης που παρουσιάζονται στον πίνακα 18 δεν αντιπροσωπεύουν τις πραγματικές τιμές. Για το λόγο αυτό η βιοαποικοδόμηση της φαινόλης στην συνθήκη απουσίας οξικού οξέως εκφράστηκε μόνο ως ποσοστό.

▪



Εικόνα 34: Βιοαποικοδόμηση φαινόλης την 5^η πειραματική ημέρα. Η βιοαποικοδόμηση εκφράζεται ως ποσοστό (αριστερά) και ανά κυτταρικό όγκο (δεξιά) σε συνθήκες παρουσίας οξικού οξέως.



Εικόνα 35: Βιοαποικοδόμηση φαινόλης την 5^η πειραματική ημέρα. Η βιοαποικοδόμηση εκφράζεται ως ποσοστό σε συνθήκες απουσίας οξικού οξέως.

Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα το στέλεχος aadAoT εμφάνισε την μεγαλύτερη αποικοδόμηση φαινόλης παρουσίας οξικού οξέως. Ο οργανισμός αυτός αναπτύσσεται μόνο ετερότροφα, γεγονός που φαίνεται να επηρεάζει αρκετά την

αποικοδόμηση της φαινόλης. Αν συγκριθεί με το στέλεχος CC-125 φαίνεται ότι παρουσιάζει έως και τέσσερις φορές μεγαλύτερη αποικοδόμηση ανά κυτταρικό όγκο. Στην περίπτωση απουσίας οξικού οξέως τα πράγματα διαφέρουν. Καθώς το στέλεχος aadAοT δεν μπορεί να αποικοδομήσει την φαινόλη.

Το στέλεχος CC-264K εμφανίζει μεγαλύτερη βιοαποικοδόμηση ανά κυτταρικό όγκο σε σχέση με στέλεχος CC-125 ενώ εμφανίζει παρόμοια με αυτή του aadAοT ανά κυτταρικό όγκο.

Όσο αφορά το στέλεχος CC-2656 φαίνεται και αυτό με τη σειρά του ότι απομακρύνει την φαινόλη περισσότερο από το στέλεχος CC-125. Φαίνεται ότι επειδή έχει ανεπαρκές κυτταρικό τοίχωμα η φαινόλη μπορεί να εισέρχεται με μεγαλύτερη ευκολία στο κύτταρο και να μπορεί να την χρησιμοποιήσει ως εναλλακτική πηγή άνθρακα. Παρόλα αυτά στη συνθήκη απουσίας οξικού οξέως το στέλεχος εμφανίζει πολύ χαμηλά ποσοστά που φτάνει κάτω από το 5%.

Τέλος για το στέλεχος CC-4476 παρατηρείται ότι δεν έχει την ικανότητα να απομακρύνει την φαινόλη στη συνθήκη παρουσίας οξικού οξέως στο φως. Αντίθετα στην συνθήκη απουσίας οξικού οξέως το στέλεχος βιοαποικοδομεί την φαινόλη σε ποσοστό που πλησιάζει το στέλεχος CC-125.

4.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Υψηλότερη βιοαποικοδόμηση φαινόλης για το CC-125 παρατηρείται σε συνθήκες απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα.
- Σε υψηλές συγκεντρώσεις φαινόλης παρατηρείται αναστολή της ανάπτυξης του μικροφύκου.
- Η παρουσία της φαινόλης αυξάνει την καταπόνηση (stress) του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μικροφύκου όπως έδειξαν οι παράμετροι του JIP-test και οι μετρήσεις φωτοσυνθετικών χρωστικών.
- Παρουσία οξικού οξέως ο ρυθμός παραγωγής O_2 είναι μεγαλύτερος από την καλλιέργεια μάρτυρα. Σταδιακά φτάνει σε ένα μέγιστο και μετά μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της φαινόλης
- Σε υψηλές συγκεντρώσεις φαινόλης παρατηρείται μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης τις πρώτες 48 ώρες σε σχέση με την καλλιέργεια μάρτυρα. Άρα η φαινόλη είναι ένα υπόστρωμα που αναστέλλει την ανάπτυξη.
- Η μείωση του λόγου απόδοσης ($Y_{X/S}$) δείχνει πως ο μικροφύκος αποικοδομεί τη φαινόλη παρόλο που αυτή αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα στην ανάπτυξη του.
- Η βιοαποικοδόμηση της φαινόλης σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι αποτέλεσμα της αυξημένης καταπόνησης που προκαλείται στο μικροφύκο με σκοπό το τελευταίο να αποτοξικοποιήσει το περιβάλλον του.
- Σε συνθήκες απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα παρατηρήθηκε υψηλότερη βιοαποικοδόμηση της φαινόλης εκφρασμένη ανά μονάδα κυτταρικού όγκου.
- Η βιοαποικοδόμηση της φαινόλης από το μικροφύκο *Chlamydomonas reinhardtii* είναι μια αερόβια διαδικασία.
- Η αύξηση της έντασης της ακτινοβολίας οδήγησε σε πιο αποτελεσματική αποικοδόμηση υψηλών αρχικών συγκεντρώσεων φαινόλης.
- Από τα μεταλλαγμένα στελέχη φάνηκε ότι ορισμένα εμφάνισαν την ικανότητα να αποικοδομήσουν την φαινόλη. Παρόλα αυτά περεταίρω πειράματα πρέπει να γίνουν καθώς τα πειράματα που εκτελέστηκαν ήταν προκαταρκτικά.

5.ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Με την παρούσα εργασία έγινε ένα ακόμα βήμα στη μελέτη βιοαποικοδόμησης των φαινολικών ενώσεων που αποτελούν μια από τις κύριες μορφές ρύπανσης χερσαίων και υδάτινων οικοσυστημάτων, ενώ ταυτόχρονα έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στους οργανισμούς που ζουν σε αυτά. Επόμενο βήμα είναι να πραγματοποιηθεί μια ευρύτερη μελέτη για την αποικοδόμηση και των υπόλοιπων ενώσεων με βάση αυτή που μελετήθηκε ώστε να υπάρξει περαιτέρω διερεύνηση των παραγόντων που επηρεάζουν την ικανότητα αποικοδόμησης αυτών των ουσιών από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*.

Επίσης πρέπει να δοκιμαστούν και άλλες πειραματικές συνθήκες όπως αλλαγή του pH στο θρεπτικό, αλλαγή στη θερμοκρασία που αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί. Επιπρόσθετα θα μπορούσε να εξεταστεί η περίπτωση να τοποθετηθεί το μικροφύκος με άλλους μικροοργανισμούς όπως βακτήρια για να δούμε πως αυτή η συμβίωση των μικροοργανισμών μπορεί να επηρεάσει την απομάκρυνση των τοξικών ενώσεων. Παράλληλα θα μπορούσε να δοκιμαστεί μια κλιμακωτή διαβάθμιση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος στο θρεπτικό μέσο για να επιβεβαιώσουμε τα πειραματικά αποτελέσματα, για το ρόλο του οξικού στην αποικοδόμηση της φαινόλης. Επίσης η χρήση μεταλλάξεων στο μικροφύκος για να εισαχθούν ένζυμα τα οποία χρησιμοποιούνται για οξείδωση φαινολικών υποστρωμάτων όπως οι λακκάσες. Τέλος θα πρέπει να διερευνηθεί η περαιτέρω βιοτεχνολογική εκμετάλλευση αυτής της ικανότητας του μικροφύκου να αποικοδομεί φαινολικές ενώσεις διότι από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι το πιο συγγενές είδος του μικροοργανισμού μας, το *Scenedesmus obliquus* έχει την ικανότητα να παράγει αποδοτικά υδρογόνο (H₂) κατά τη βιοαποικοδόμηση διχλωροφαινολών. Άρα από αυτά κρίνεται απαραίτητο να συνεχιστεί η έρευνα πάνω σε αυτό το πεδίο διότι η εκμετάλλευση αυτών των φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών μπορεί να ανοίξει νέες πόρτες και ενδεχομένως να δώσει λύσεις επάνω στο ζήτημα των εναλλακτικών μορφών ενέργειας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mohammad, N. and P. Babak, *Photosynthesis: How and Why?*, in *ADVANCES IN PHOTOSYNTHESIS –FUNDAMENTAL ASPECTS*
N. Mohammad, Editor 2012, InTech: Croatia. p. 1-11.
2. Sproviero, E.M., et al., *Quantum mechanics/molecular mechanics study of the catalytic cycle of water splitting in photosystem II*. *J Am Chem Soc*, 2008. **130**(11): p. 3428-42.
3. Hansch C., et al., *Comparative QSAR evidence for a free-radical mechanism of phenol-induced toxicity*. *Chem. Biol. Interact.* 127,61. 2000.
4. Moridani, M., et al., *Quantitative structure toxicity relationship for catechols in isolated rat hepatocytes*, *Chem. Biol. Interact.* 147, 297. 2004.
5. Tsu , T., et al., *Benzene-, catechol-, hydroquinone- and phenol- induced cell transformation, gene mutation, chromosome aberrations, aneuploidy, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells*, *Mut. Res.* 373, 113. 1997.
6. Sellassie , C., et al., *Phenol toxicity in leukemia cells: a radical process?* *Chem-Biol. Interact.*, 113,175. 1998.
7. Pimentel M, D.M. Oturan N, and O. MA., *Phenol degradation by advanced electrochemical oxidation process electro-Fenton using a carbon felt cathode*. *Appl Catal B Environ.* 2008.
8. Vidali, M., *Bioremediation. An overview*, *Pure Appl. Chem.*, 73, 7, 1163-1172. 2001.
9. Boopathy, R., *Factors limiting bioremediation technologies*. *Biores. Technol.*, 74, 63-67
2000.
10. Mueller, G., E. Cerniglia, and H. Pritchard, *Bioremediation of Environments Contaminated by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. In *Bioremediation: Principles and Applications*, 125-194, Cambridge University Press, Cambridge. 1996.
11. Dash, S. and H. Dash, *Microbial Bioremediation: A Potential Tool for Restoration of Contaminated Areas*, in *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, D. Surajit, Editor 2014, Elsevier. p. 11-12.
12. Alexander, M., *Biodegradation and bioremediation* 71-98
1994.
13. Van Hamme, J., *Bioavailability and Biodegradation of Organic Pollutants - A Microbial Perspective*, in *Biodegradation and Bioremediation*2004, Springer-Vedag: New York. p. 37-39.
14. Reineke, W., *Degradation of Aromatic Compounds*, in *Biodegradation and Persistence*
B. Beek, Editor 2001, Springer: Berlin Heidelberg. p. 15-17.
15. Sinha , S., et al., *Microbial transformation of xenobiotics for environmental bioremediation*. *Afr J Biotechnol* 8: 6016-6027. 2009.
16. Chowdhury , S., et al., *Novel metal accumulator and protease secretor microbes from East Calcutta Wetland*. *Am J Biochem Biotechnol* 4: 255-264. 2008.
17. Jha , A., et al., *Assessment of Methane and Nitrous Oxide Emissions from Livestock in India*. *J Earth Sci Climat Change* 1: 107. 2011.
18. Raeid , M., *Unraveling the role of cyanobacterial mats in the cleanup of oil pollutants using modern molecular and microsensor tools*. *World Congress on Biotechnology, India*. 2011.

19. Kenneth, H., *Extracellular Free Radical Biochemistry of Ligninolytic Fungi*. *New J Chem* 20: 195-198. 1996.
20. Bennet, J., K. Wunch, and B. Faison, *Use of Fungi Biodegradation Manual of Environmental Microbiology* ASM Press Washington DC. 2002.
21. Sivasubramanian, V., V. Subramanian, and M. Muthukumar, *Bioremediation of Chrome-Sludge from an Electroplating Industry Using the Micro Alga Desmococcus olivaceus – A pilot study*. *J. Algal Biomass Utiln.* 3: 104-128. 2010.
22. Petroustos, D., et al., *Detoxification of 2,4-dichlorophenol by the marine microalga Tetraselmis marina*. *Phytochemistry* 69: 707-714. 2008.
23. Papazi, A. and K. Kotzabasis, *Bioenergetic strategy of microalgae for the biodegradation of phenolic compounds: exogenously supplied energy and carbon sources adjust the level of biodegradation*. *J Biotechnol*, 2007. **129**(4): p. 706-16.
24. Diaz, E., *Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility*. *Int Microbiol* 7: 173-180
2004.
25. Van Schie PM and L.B.o.P.M.a.A.J.B.-. Young, *Biodegradation of Phenol: Mechanisms and Applications*. *J. Bioremediat.* 4: 1-18. 2000.
26. Semple, K. and R. Cain, *Biodegradation of phenols by the alga Ochromonas danica*. *Appl Environ Microbiol* 62: 1265-1273
1996.
27. Leliaert, F. and et al., *Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae*. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2012. **31**(1): p. 1-46.
28. Gantt, E. and S.F. Conti, *The ultrastructure of Porphyridium cruentum*. *J Cell Biol*, 1965. **26**(2): p. 365-381.
29. Edvardsen, B. and et al., *Phylogenetic reconstructions of the Haptophyta inferred from*.
30. Radmer, R.J. and B.C. Parker, *Commercial Applications of Algae - Opportunities and Constraints*. *Journal of Applied Phycology*, 1994. **6**(2): p. 93-98.
31. Harris, E., *In The Chlamydomonas*. 2009.
32. Johnson, X. and j. Alric, *Central Carbon Metabolism and Electron Transport in Chlamydomonas reinhardtii: Metabolic Constraints for Carbon Partitioning between Oil and Starch*. *Eukaryotic Cell*, 2013. **12**(6): p. 776-793.
33. Rosenberg, J. and et al., *A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution*. *Curr Opin Biotechnol*, 2008. **19**(5): p. 430-436.
34. Liu, Y., *Bioenergetic interpretation on the S-o/X(o) ratio in substrate-sufficient batch culture*. *Water Research*, 1996. **30**(11): p. 2766-2770.
35. Bakhshi, Z. and et al., *Growth kinetic models for phenol biodegradation in a batch culture of Pseudomonas putida*. *Environ Technol*, 2011. **33**(15-16): p. 1835-1841.
36. Gorman, D.S. and R.P. Levine, *Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1965. **54**(6): p. 1665-9.
37. Strasser, B. and R. Strasser, *Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test Vol V*. *Kluwer Academic Press, Dordrecht*. 1995.

38. Lovell, C.R., et al., *Resistance of the marine diatom Thalassiosira sp to toxicity of phenolic compounds*. Marine Ecology Progress Series, 2002. **229**: p. 11-18.
39. Wellburn, A., *The Spectral Determination of Chlorophylls a and b as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution*. Plant Physiol, 1994. **144**: p. 307-313.
40. Singer, S., *Analyzing growth in cell cultures. I. Calculating growth rates*. Can. J. Bot, 1985. **64**: p. 233-237.
41. Navakouvis, E., et al., *Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines*. Bba-Gen Subjects 2003. **1621**(2): p. 160-169.
42. Papazi, A., K. Assimakopoulos, and K. Kotzabasis, *Bioenergetic strategy for the biodegradation of p-cresol by the unicellular green alga Scenedesmus obliquus*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51852.
43. Pirt, S.J., *The maintenance energy of bacteria in growing cultures*. . Proc R Soc Lond B Biol Sci, , 1965. **163**(991): p. 224-31.
44. Russell, J. and G. Cook, *The maintenance energy of bacteria in growing cultures. Proceedings of the Royal Society of London Series B. Microbiological reviews* 1995. **59**(1): p. 48-62.
45. Liu , Y., G. Chen, and E. Paul, *Effect of the S-0/X-0 ratio on energy uncoupling in substrate-sufficient batch culture of activated sludge*. . Water Res, 1998. **32**(10): p. 2883-2888.
46. Forrest, W., *Energetic aspects of microbial growth. In: Microbial Energetics*. . Cambridge University Press, , 1969: p. 65-86.
47. Sueoka, N.-. *Mitotic Replication of Deoxyribonucleic Acid in Chlamydomonas Reinhardi*. . Proc Natl Acad Sci U S A, 1960. **46**(1): p. 83-91.
48. Wurster, M., et al., *Extracellular degradation of phenol by the cyanobacterium Synechococcus PCC 7002*, . Journal of Applied Phycology 2003. **15**: p. 171-176.
49. Lika, K. and I. Papadakis, *Modeling the biodegradation of phenolic compounds by microalgae*. Journal of Sea Research, 2009. **62**: p. 135-146.
50. Semple , K. and R. Cain, *Biodegradation of phenols by the alga Ochromonas danica*. Appl Environ Microbiol, 1996. **62**(4): p. 1265-1273.
51. Vermaas, W. and M. Ikeuchi, *Chapter 2: Photosystem II in The Photosynthetic Apparatus: Molecular Biology and Operation Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Pages 25–111*
1991.
52. Godde, D., et al., *Photoinhibition in intact spinach plants: effect of high light intensities on the function of the two photosystems and on the content of the D1 protein under nitrogen*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics*, 1992. **1140**: p. 69-77.
53. Kirst, H., et al., *Assembly of the Light-Harvesting Chlorophyll Antenna in the Green Alga Chlamydomonas reinhardtii Requires Expression of the TLA2-CpFTSY Gene*. Plant and Cell Physiology, 2012. **158**: p. 930-945.
54. Loppes, R. and R. Deltour, *Chnages in Phosphatase Activity Associates with Cell Wall Defects in Chlamydomonas reinhardi*. Arch Microbiol, 1975. **103**: p. 247-250.