

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΦΩΤΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Φωτοπροσαρμογή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του  
μονοκύτταρου χλωροφύκου *Chlorella minutissima* σε  
διαφορετικές εντάσεις φωτισμού**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΥΡΙΑΚΟΣ ΚΟΤΖΑΜΠΑΣΗΣ**

**ΓΚΙΝΤΑΛΙ ΑΡΜΙΝΤΑ- ΕΙΡΗΝΗ(GJINDALI ARMIDA)**

**ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗΤΡΩΟΥ 1560**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2012**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
1.1 Ο χλωροπλάστης.....	4
1.2 Μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.....	5
1.2.1 Φωτοσύστημα II.....	6
1.2.2 Φωτοσύστημα I.....	7
1.2.3 Κυτόχρωμα b6f.....	7
1.2.4 Η ATP συνθάση.....	8
1.2.5 Η φωτοχημεία της φωτοσύνθεσης.....	8
1.3 Επίδραση του φωτός.....	8
1.3.1 Φωτοπροσαρμογή.....	11
1.4 Πολυαμίνες.....	12
1.5 Χρωστικές.....	13
1.5.1 Χλωροφύλλες.....	13
1.5.2 Καροτενοειδή.....	15
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	18
2.1 Οργανισμός.....	18
2.2 Συνθήκες ανάπτυξης.....	19
2.3 Υπολογισμός κυτταρικής συγκέντρωσης.....	20
2.4 Επαγωγικός Φθορισμός- Φυσικοχημικές Αναλύσεις της Μοριακής Δομής και Λειτουργίας του Φωτοσυνθετικού Μηχανισμού (JIP- test).....	20
2.5 Πολαρογραφικές μετρήσεις μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και αναπνοής.....	24
2.6 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση πολυαμινών.....	24
2.7 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση χρωστικών.....	25
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	27
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	43



## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

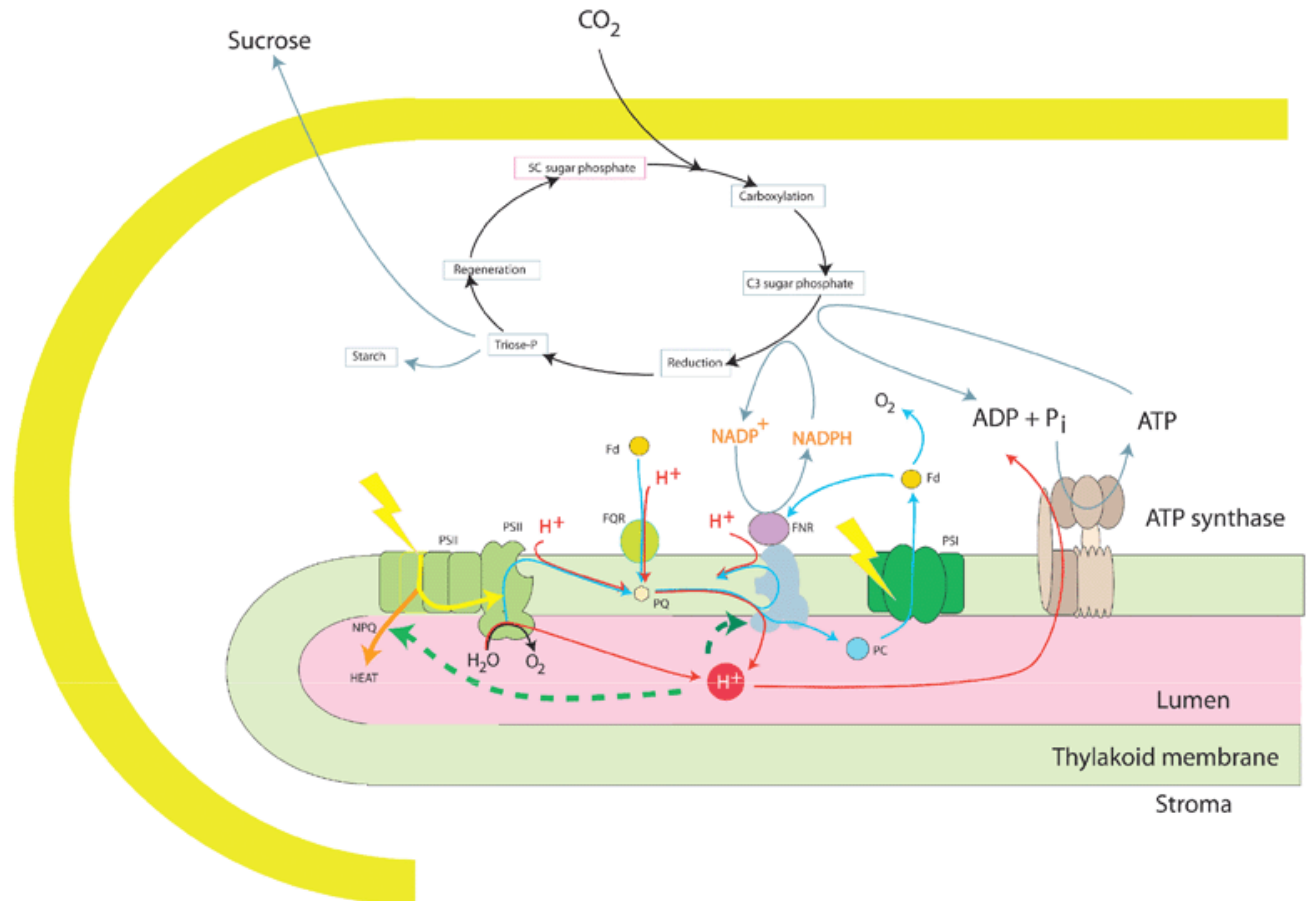
Η φωτοσύνθεση είναι ίσως η πιο σημαντική βιοχημική διαδικασία που γίνεται πάνω στη Γη. Εκτός από κάποιες εξαιρέσεις, όλη η ενέργεια για τη ζωή και την ανθρώπινη τεχνολογία έρχεται από τον ήλιο. Οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί συλλέγουν την ηλιακή ακτινοβολία και τη μετατρέπουν σε εκμεταλλεύσιμη βιοχημικά μορφή ενέργειας και την «επενδύουν» για την μετατροπή της ανόργανης ύλης σε οργανική. Φωτοσύνθεση είναι η φυσικοχημική διαδικασία μέσω της οποίας τα φυτά, τα φύκη και τα φωτοσυνθετικά βακτήρια χρησιμοποιούν την ηλιακή ενέργεια για να συνθέσουν οργανικές ενώσεις. Στα φυτά, τα φύκη και ορισμένα είδη βακτηρίων, η φωτοσυνθετική διαδικασία έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση οξυγόνου και την δέσμευση από την ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> το οποίο χρησιμοποιείται για την σύνθεση υδατανθράκων (οξυγονική φωτοσύνθεση). Η ενέργεια κινείται μέσα από τις τροφικές αλυσίδες από τον ένα ζωντανό οργανισμό στον άλλο. Το πρώτο βήμα είναι πάντοτε η φωτοσύνθεση, όπου η ακτινοβολία του ήλιου, η οποία έρχεται στη γη κάθε μέρα, μετατρέπεται σε οργανικά μόρια. Αυτές οι οργανικές ενώσεις χρησιμοποιούνται από όλους τους ζωντανούς οργανισμούς ως καύσιμο για ενέργεια, και ως βάση για να συνθέσουν άλλα βιομόρια.

Η έκλυση μοριακού οξυγόνου από τους φωτοσυνθετικούς μηχανισμούς ήταν μείζονος σημασίας για την ανάπτυξη της ζωής όπως τη γνωρίζουμε σήμερα. Η δημιουργία του στρώματος του όζοντος και η πλούσια σε οξυγόνο ατμόσφαιρα καθόρισαν την εξελικτική πορεία των ζωντανών οργανισμών και δημιούργησαν τις ιδανικές συνθήκες για την επικράτηση των σημερινών μορφών ζωής, ανάμεσά τους και ο άνθρωπος.

Σε παγκόσμια κλίμακα, η φωτοσύνθεση, η οποία γίνεται στους χλωροπλάστες, δημιουργεί δισεκατομμύρια τόνους οργανικής ύλης κάθε χρόνο. Αυτό κάνει τη φωτοσύνθεση την πιο σημαντική χημική διαδικασία της ζωής στη Γη.

Η φωτοσυνθετική διαδικασία πραγματοποιείται στους χλωροπλάστες. Οι «φωτεινές» αντιδράσεις πραγματοποιούνται πάνω ή μέσα στις μεμβράνες των θυλακοειδών, ενώ

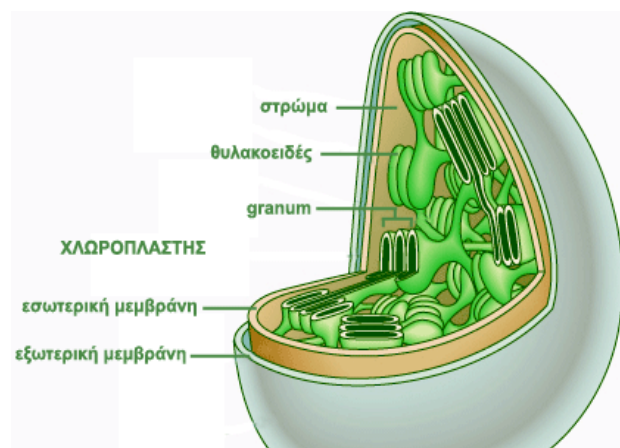
οι «σκοτεινές» αντιδράσεις (κύκλος των Calvin-Benson) εξελίσσονται στο στρώμα (Εικόνα 1).



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση των φωτεινών και σκοτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης. Τα κύρια φωτοσυνθετικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα βρίσκονται στη μεμβράνη του θυλακοειδούς. Πηγή: Donald R Ort, University of Illinois, Urbana, Illinois, USA  
David Kramer, Washington State University, Pullman, Washington, USA

## 1.1 Χλωροπλάστης

Ο χλωροπλάστης είναι το οργανίδιο στο οποίο πραγματοποιείται η φωτοσύνθεση και οφείλει το όνομά του στις χλωροφύλλες που περιέχει. Πέρα από χλωροφύλλες στις οποίες οφείλει το όνομα αλλά και το πράσινο χρώμα του, ο

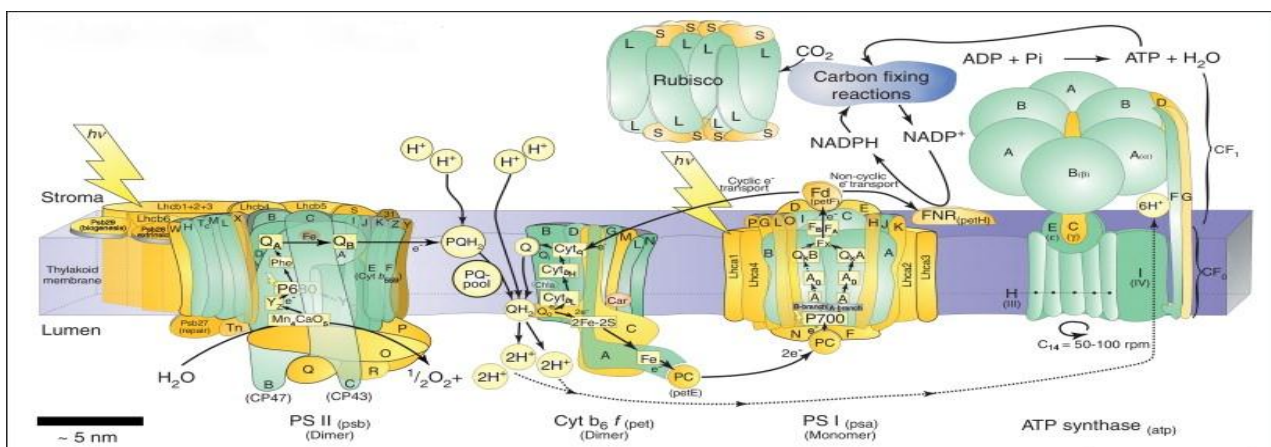


Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της δομής του χλωροπλάστη. Πηγή: Purves et al., *Life: The Science of Biology*, 4th Edition, by Sinauer Associates

χλωροπλάστης περιέχει μια πληθώρα χρωστικών όπως είναι τα καροτενοειδή. Το σχήμα του είναι συνήθως φακοειδές με διάμετρο περίπου 4-5 μm . Περιβάλλεται από διπλή μεμβράνη η οποία ονομάζεται πλαστιδιακός φάκελος (Εικόνα 2). Εκτός από το διπλό μεμβρανικό φάκελο ο χλωροπλάστης περιέχει και ένα εσωτερικό σύστημα μεμβρανών τα θυλακοειδή, τα οποία όταν στοιβάζονται πυκνά δημιουργούν τα grana και διαχωρίζονται από τα θυλακοειδή του στρώματος. Τις μεμβράνες των θυλακοειδών περιβάλλει το στρώμα στο οποίο λαμβάνουν χώρα οι σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης. Στις μεμβράνες των θυλακοειδών βρίσκονται ενσωματωμένα τα λειτουργικά σύμπλοκα πρωτεϊνών/χρωστικών του φωτοσυνθετικού μηχανισμού: Το φωτοσύστημα II(PSII), το οποίο περιλαμβάνει και το σύμπλοκο οξείδωσης του νερού το OEC (Oxygen Evolving Complex), η φωτοσυλλεκτική κεραία του LHCII ( Light Harvesting Complex II), το φωτοσύστημα I (PSI), το κυτόχρωμα b6f (Cytb6f) και η ATP συνθάση (ATPase). Κάθε ένα από αυτά τα σύμπλοκα παρουσιάζει διαφορετική χωροταξική κατανομή στη μεμβράνη του θυλακοειδούς. Τα PSII, LHCII, Cytb6f και PSI διαπερνούν τη μεμβράνη των θυλακοειδών και έρχονται σε επαφή τόσο με το στρώμα του χλωροπλάστη όσο και με το μικροχώρο του θυλακοειδούς. Από την άλλη το OEC βρίσκεται στη πλευρά του μικροχώρου του θυλακοειδούς, ενώ το ενεργό κέντρο της ATPaseβρίσκεται από τη μεριά του στρώματος. Επιπλέον το PSI και η ATPase εντοπίζονται κυρίως στα θυλακοειδή του στρώματος ενώ τα PSII και το Cytb6f εντοπίζονται πρωτίστως στα grana.

## 1.2 Μοριακή Δομή και Λειτουργία του Φωτοσυνθετικού Οργανισμού

Τα κύρια σύμπλοκα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού , όπως προαναφέρθηκε, είναι το φωτοσύστημα II(PSII), η φωτοσυλλεκτική του κεραία LHCII ( Light Harvesting Complex II), το φωτοσύστημα I (PSI), το κυτόχρωμα b6f (Cytb6f) και η ATP



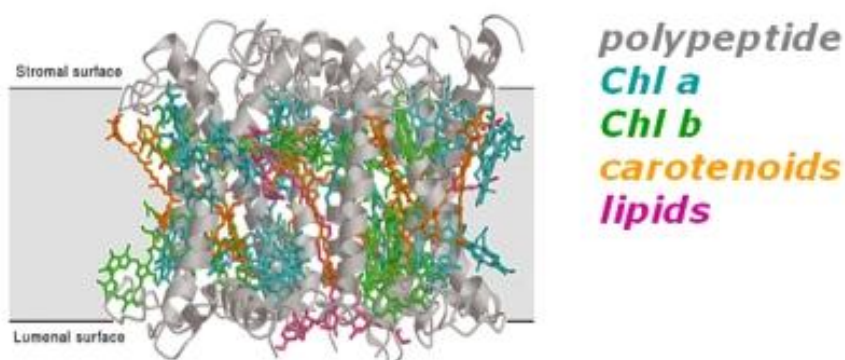
Εικόνα 3. Κύρια πρωτεϊνικά σύμπλοκα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού: φωτοσύστημα II ( PSII), κυτόχρωμα b6f (Cytb6f), φωτοσύστημα I (PSI), καρβοξυλάση-οξυγενάση της 1,5- διφωσφορικής ριβουλόζης (Rubisco) Πηγή: Elsevier, Trends in Plant Science: Volume 16, Issue 12, December 2011, Pages 645–655, John F. Allen, Wilson B.M. de Paula, Sujith Puthiyaveetil, Jon Nield

συνθάση (ATPase)( Εικόνα 3).

### 1.2.1 Φωτοσύστημα II

Το φωτοσύστημα II είναι ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο διαχωρίζεται σε δύο διακριτά μέρη με διαφορετική ενζυμική δράση το καθένα: το φωτοσυλλεκτικό σύμπλοκο LHCI και τον πυρήνα του (PSII core).

Το LHCI αντιστοιχεί περίπου στο 30% της ολικής πρωτεΐνης στις μεμβράνες του χλωροπλάστη, γεγονός το οποίο το καθιστά την πιο άφθονη μεμβρανική πρωτεΐνη στη Γη (Peter & Thornber, 1991). Το κυρίως σύμπλοκο LHCI αποτελείται από 3 πολυπεπτίδια (Lhc b1, b2, b3) των ~232 πεπτιδίων, το καθένα από τα οποία έχει



Εικόνα 4. Η φωτοσυλλεκτική κεραία του PSII (LHCII). Συλλέγει τα φωτόνια, μεταφέρει την ενέργεια στα ενεργά κέντρα των φωτοσυστημάτων και εμπλέκεται στη φωτοπροστασία. Πηγή: [http://www.theochem.uni-frankfurt.de/femtochem/Research\\_Topics/photosynthesis-en.html](http://www.theochem.uni-frankfurt.de/femtochem/Research_Topics/photosynthesis-en.html)

διαφορετική τάση να φωσφορυλιωθεί (Jansson, 1999). Κάθε πολυπεπτίδιο προσδένει 14 μόρια χλωροφύλλης ( a & b), 4 καροτενοειδή και 2 διαφορετικά λιπίδια (Standfuss & Kühlbrandt , 2005). Λειτουργικές μονάδες του LHCI είναι τα τριμερή του (Εικόνα 4). Η σχέση χλωροφύλλης a/b είναι περίπου 1.4. Η παρουσία πολλών διαφορετικών χρωστικών διασφαλίζει τη βέλτιστη χρησιμοποίηση της ηλιακής ακτινοβολίας από το φωτοσυνθετικό μηχανισμό καθώς καλύπτεται μεγαλύτερο εύρος ακτινοβολιών που μπορούν να απορροφηθούν.

Το σύμπλοκο έχει τέσσερις διακριτούς αλλά αλληλεπικαλυπτόμενους ρόλους στη φωτοσύνθεση:

- I. Συλλέγει φωτόνια τα οποία μεταφέρει ως ενέργεια διέγερσης στα ενεργά κέντρα των PSII και PSI (van Amerongen & Dekker, 2003).
- II. Διανέμει την ενέργεια που συλλέγει ανάμεσα στα PSII και PSI ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου(state transitions). Η διανομή αυτή ελέγχεται μέσω της φωσφορυλίωσης και της αποφωσφορυλίωσης του LHCI στο αμινοτελικό του άκρο (Allen & Forsberg, 2001).

- III. Διατηρεί τα στοιβαγμένα θυλακοειδή κοντά ενδυναμώνοντας έτσι τη δομή των grana και κατ' επέκταση είναι ως ένα βαθμό υπεύθυνο για τη χωροταξική κατανομή και οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.
- IV. Προστατεύει τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό μέσω της μη φωτοχημικής απόσβεσης (NPQ) της περίσσειας ενέργειας.

Ο πυρήνας του PSII (Core Complex, CCII) είναι ένα πολυπεπτιδικό σύμπλοκο που περιλαμβάνει το κέντρο αντίδρασης (Reaction Center, RC) , όπου πραγματοποιείται ο πρωτογενής διαχωρισμός φορτίου, την εσωτερική κεραία συλλογής φωτός (πρωτεΐνες CP47 & CP43) και το σύμπλοκο οξειδωσης του νερού από όπου εκλύεται το οξυγόνο (Oxygen Evolving Complex, OEC).

Το κέντρο αντίδρασης του PSII σχηματίζεται από 2 πεπτίδια, τα D1 και D2, στα οποία εντοπίζεται το P680, που είναι ο πρωτογενής δότης ηλεκτρονίων και αποτελείται από ένα διμερές χλωροφύλλης a .

Το κέντρο παραγωγής οξυγόνου (OEC) βρίσκεται στη πλευρά του μικροχώρου του θυλακοειδούς, όπου γίνεται η διάσπαση του νερού (φωτόλυση) και ο διαχωρισμός των φορτίων με αποτέλεσμα την παραγωγή 4πρωτονίων, 4 ηλεκτρονίων και 1 μορίου οξυγόνου ανά 2 μόρια νερού.

### ***1.2. 2 Το φωτοσύστημα I***

Το φωτοσύστημα I αποτελείται από δύο μέρη: το κέντρο αντίδρασης RC και τη φωτοσυλλεκτική κεραία (LHCI). Το κέντρο αντίδρασης περιλαμβάνει 12-14 υπομονάδες και στο εσωτερικό του βρίσκεται ένα ειδικό ζεύγος χλωροφυλλών a, το P700. Το πυρηνικό σύμπλοκο περιέχει επίσης χρωστικές και οξειδωαναγωγικούς παράγοντες που είναι απαραίτητοι για τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από το PSI στο **NADP<sup>+</sup>** Το σύμπλοκο LHCI είναι εμπλουτισμένο με χρωστικές αλλά, σε αντίθεση με το LHCI, δεσμεύει μόνο μικρό ποσοστό των χρωστικών της μεμβράνης του θυλακοειδούς.

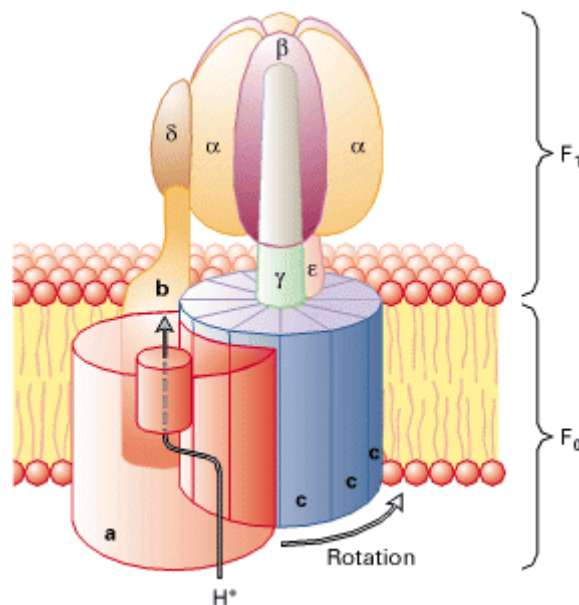
### ***1.2.3 Το κυτόχρωμα b6f***

Το κυτόχρωμα b6f αποτελεί ένα ενδιάμεσο πρωτεϊνικό σύμπλοκο στη μη κυκλική φωτοσυνθετική μεταφορά ηλεκτρονίων, καθώς προσλαμβάνει τα ηλεκτρόνια από την ανηγμένη πλαστοκινόνη (PQ) και τα μεταβιβάζει στο PSI. Σχηματίζει διμερή μεγέθους 217 kD και κάθε μονομερές αποτελείται από 4 κύριες υπομονάδες: το κυτόχρωμα f, το κυτόχρωμα b, την πρωτεΐνη Rieske Fe-S και την υπομονάδα IV. Η δομή του Cyt b6f είναι συγγενική με αυτή του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος Cyt bc1.



### 1.2.4 Η ATP συνθάση

ATP συνθάση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού ανήκει στις ATPάσες που χρησιμοποιούν πρωτόνια σαν ενεργειακή δύναμη, δηλαδή χρησιμοποιεί τη βαθμίδωση πρωτονίων (pmf) που δημιουργείται από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων προκειμένου να συνθέσει ATP από ADP και μία φωσφορική ρίζα (Pi). Γενικά είναι αρκετά συντηρημένο σύμπλοκο με τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά παρόμοια με εκείνα των αντίστοιχων ενζύμων των μιτοχονδρίων και των βακτηρίων (Nelson et al., 2002). Αποτελείται από ένα διαμεμβρανικό τμήμα (CFo) και ένα εκτεθειμένο στο στρώμα τμήμα (CF1) (Εικόνα 5). Ολόκληρο το σύμπλοκο CFo- CF1 φαίνεται να λειτουργεί σαν περιστρεφόμενος κινητήρας που κινείται λόγω της pmf και ο ρότορας του αποτελείται από τις υπομονάδες c, γ και ε. Μια πλήρη περιστροφή του ρότορα αντιστοιχεί στην παραγωγή ενός ATP (Muller et al., 2001).

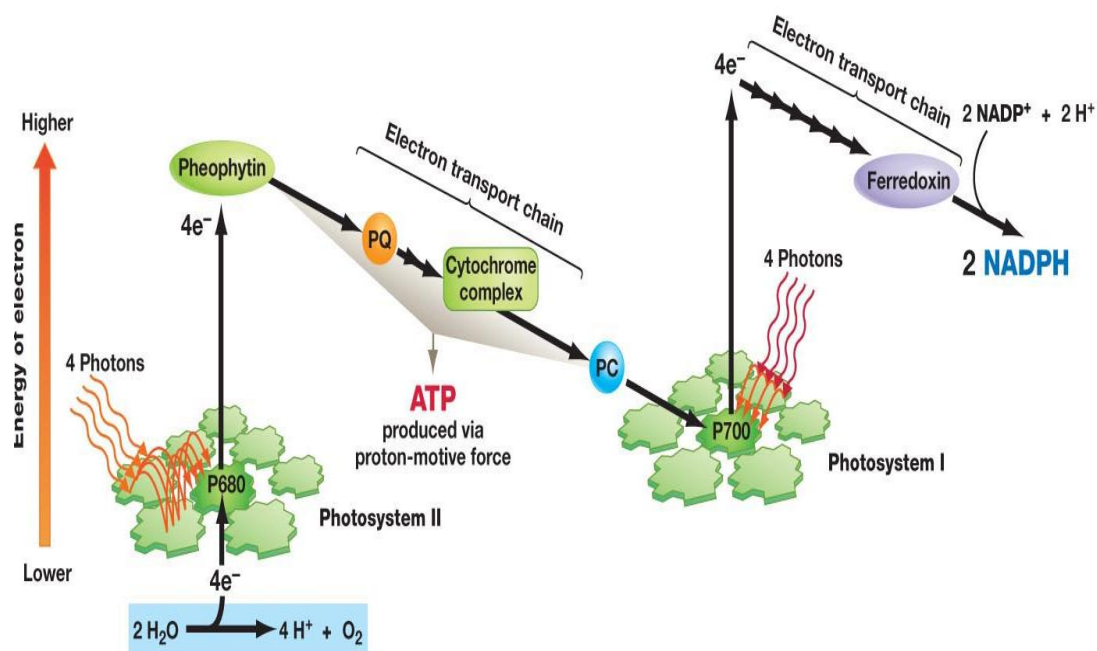


Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση της ATP συνθάσης.

Πηγή: <http://tainano.com/chin/Molecular%20Biology%20Glossary.htm>

### 1.2.5 Φωτοχημεία Φωτοσύνθεσης

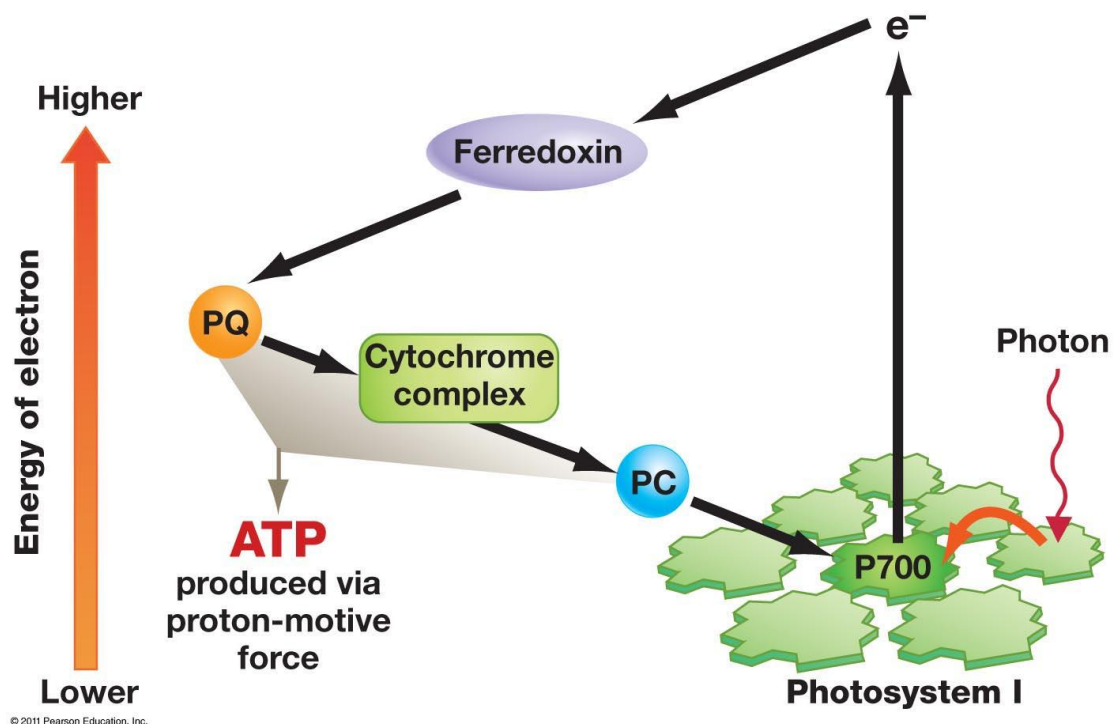
Η ενέργεια που δεσμεύεται από το LHCII μπορεί να ακολουθήσει μία από τις παρακάτω οδούς: τη φωτοχημική απόσβεση (φωτεινές αντιδράσεις) ή τη μη φωτοχημική απόσβεση (NPQ). Κατά τη φωτοχημική απόσβεση τα φωτόνια που



Εικόνα 6. Η γραμμική ροή ηλεκτρονίων. Η ενέργεια απορροφάται από το LHCII, μεταφέρεται στο ενεργό κέντρο του PSII, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται διαδοχικά στη πλαστοκινίνη, το Cytb6f, την πλαστοκυανίνη, το PSI και μέσω της φερρεδοξίνης στο  $\text{NADP}^+$ . Πηγή : Pearson Education, <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectures/ps01.htm>

δεσμεύονται μεταφέρονται στα κέντρα αντίδρασης των φωτοσυστημάτων όπου γίνεται ο διαχωρισμός των φορτίων και ακολουθεί η μεταφορά των ηλεκτρονίων κατά μήκος της φωτοσυνθετικής αλυσίδας (μη κυκλική ροή ηλεκτρονίων). Οι φωτεινές αντιδράσεις περιλαμβάνουν την μεταφορά των ηλεκτρονίων στο P680 το οποίο διεγείρεται ( $\text{P680}^*$ ) και μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο στη φαιοφυτίνη (Pheo a). Το ηλεκτρόνιο αυτό αναπληρώνεται από το νερό το οποίο οξειδώνεται για να παραχθεί μοριακό οξυγόνο και πρωτόνια. Η ανηγμένη φαιοφυτίνη μεταφέρει το ηλεκτρόνιο στην κινίνη A(QA) και ακολούθως στην κινίνη B(QB) και την πλαστοκινίνη( $\text{PQH}_2$ ). Η πλαστοκινίνη μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο Cytb6f το οποίο με τη σειρά του τα διαβιβάζει στην πλαστοκυανίνη και έπειτα περνάνε στο PSI. Από το PSI (το οποίο έχει διεγερθεί  $\text{P700}^*$ ) μεταφέρονται στην φερρεδοξίνη (Fd) και τελικά καταλήγουν στο αναγωγικό NADPH. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς των ηλεκτρονίων μεταφέρονται πρωτόνια από το στρώμα στο μικροχώρο του θυλακοειδούς καθώς επίσης παράγονται πρωτόνια και μοριακό οξυγόνο από την φωτόλυση του νερού. Η διαφορά δυναμικού που δημιουργείται μεταξύ μικροχώρου και στρώματος αποτελεί την κινητήρια δύναμη για την παραγωγή του ATP από την ATP συνθάση σύμφωνα με τη χημειοσμωτική θεωρία του Mitchel. Η πορεία των ηλεκτρονίων στη μη κυκλική ροή σχηματίζει το Z σχήμα (Εικόνα 6).

Ορισμένες φορές οι ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου σε ATP ξεπερνάνε την ανάγκη για NADPH. Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός μπορεί να ρυθμίζει την ροή ηλεκτρονίων κατά τέτοιο τρόπο ώστε να παράγεται μόνο ATP και καθόλου ο αναγωγικός παράγοντας NADPH. Αυτό επιτυγχάνεται με την κυκλική ροή ηλεκτρονίων κατά την οποία η ανηγμένη φερρεδοξίνη (τελευταίος ενδιάμεσος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πριν την αναγωγή του NADP+) μέσω της δεξαμενής της πλαστοκινόνης επιστρέφει τα ηλεκτρόνια στο Cytb<sub>6</sub>f. το κυτόχρωμα μεταφέρει τα ηλεκτρόνια μέσω της πλαστοκυανίνης πίσω στο PSI δημιουργώντας έτσι όλο και μεγαλύτερη διαβάθμιση πρωτονίων εκατέρωθεν της μεμβράνης του θυλακοειδούς.



Εικόνα 7. Κυκλική ροή ηλεκτρονίων. Τα ηλεκτρόνια που δέχεται η φερρεδοξίνη από το PSI επιστρέφονται στην πλαστοκινόνη (PQ), κι από εκεί στο κυτόχρωμα b<sub>6</sub>f, στην πλαστοκυανίνη (PC) και πάλι στο PSI δημιουργώντας μια κυκλική ροή η οποία επιτρέπει την σύνθεση ATP χωρίς την δημιουργία του αναγωγικού μέσου NADPH. Πηγή : Pearson Education, <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectures/ps01.htm>

### 1.3 Επίδραση του Φωτός

Η φωτοσύνθεση επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Η επίδραση των παραπάνω παραγόντων μπορεί να είναι άμεση (φως, CO<sub>2</sub>) ή έμμεση (θρεπτικά άλατα, νερό). Ο βασικότερος παράγοντας που επηρεάζει την απόδοση της φωτοσυνθετικής διαδικασίας είναι το φως. Η αύξηση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας είναι ανάλογη με τη ένταση της ακτινοβολίας. Ωστόσο υπάρχει κάποια τιμή έντασης του

φωτός πέρα από την οποία ο ρυθμός της φωτοσύνθεσης παραμένει σταθερός. Η τιμή αυτή αναφέρεται ως σημείο φωτοκορεσμού.

### **1.3.1. Φωτοπροσαρμογή**

Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός χαρακτηρίζεται από την ικανότητα του να προσαρμόζεται στις εκάστοτε συνθήκες φωτισμού (φωτοπροσαρμογή) (Bjorkman 1972, Senger et al. 1978). Εφόσον υπό φυσικές περιβαλλοντικές συνθήκες η ένταση φωτισμού μπορεί να διαφοροποιείται ακόμα και σε σύντομο χρονικό διάστημα, ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός πρέπει να προσαρμόζεται γρήγορα σε τέτοιες αλλαγές ώστε να προληφθεί η υπερδιέγερση, η οποία μπορεί να έχει βλαβερές επιπτώσεις στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός έχει εξελιχτεί έτσι ώστε να εκμεταλλεύεται στο μέγιστο δυνατό την προσπίπτουσα ακτινοβολία και να προστατεύεται ταυτόχρονα από πιθανή φώτο-καταστροφή με διάχυση της περίσσειας ενέργειας ως θερμότητα.

Η σωστή λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε διαφορετικά φωτονιακά περιβάλλοντα εξαρτάται άμεσα από την δυνατότητα προσαρμογής του σε διαφορετικές εντάσεις και ποιότητες φωτισμού (**φωτοπροσαρμογή**). Η φωτοπροσαρμογή του φυτού δεν περιορίζεται απλώς σε αλλαγές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού αλλά επεκτείνεται τόσο στην δομή του χλωροπλάστη όσο και ολόκληρου του φύλλου. Τα φύλλα φυτών που αναπτύσσονται σε υψηλής έντασης φωτισμό σε σχέση με αντίστοιχα που αναπτύχθηκαν σε χαμηλής έντασης φωτισμό, παρουσιάζουν μεγαλύτερο πάχος. Αυτό οφείλεται στην αύξηση του δρυφακτοειδούς παρεγχύματος (αύξηση του μεγέθους των κυττάρων αλλά και του αριθμού των κυτταρικών στρώσεων). Οι χλωροπλάστες των φυτών υψηλής φωτονιακής έντασης είναι λιγότεροι και με λιγότερα grana, ενώ ο φωτοσυνθετικός τους μηχανισμός φέρει μικρότερες φωτοσυνθετικές κεραίες (LHCII), μεγαλύτερο αριθμό αλυσίδων φωτοσυνθετικής μεταφοράς ηλεκτρονίων και περίπου το ίδιο αριθμό φωτοσυνθετικών κέντρων αντίδρασης (PSI & PSII) σε σχέση με τα αντίστοιχα φυτών που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες χαμηλής έντασης φωτισμού. Οι παραπάνω αλλαγές/διαφοροποιήσεις του φωτοσυνθετικού μηχανισμού προδίδουν μια διαφορετική δομή αλλά και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε εξάρτηση από την ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας. Φωτοσυνθετικός μηχανισμός προσαρμοσμένος σε χαμηλής έντασης φωτισμό, σε σχέση με αντίστοιχο προσαρμοσμένο σε υψηλή ένταση, παρουσιάζει μειωμένη συγκέντρωση ενεργών κέντρων αντίδρασης PSII και μεγάλο μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας (LHCII). Αυτές οι αλλαγές της δομής του φωτοσυνθετικού μηχανισμού είναι φυσικό να έχουν επιπτώσεις και στην λειτουργία του. Φυτά προσαρμοσμένα σε χαμηλής έντασης φωτισμό παρουσιάζουν μία χαρακτηριστική καμπύλη φωτοσυνθετικής δραστηριότητας με ιδιαίτερα χαμηλό σημείο αντισταθμίσεως,

γρήγορο κορεσμό και χαμηλό επίπεδο μέγιστης φωτοσυνθετικής δράσης σε σχέση με αντίστοιχο φωτοσυνθετικό μηχανισμό φυτών προσαρμοσμένων σε υψηλής έντασης φωτισμό.

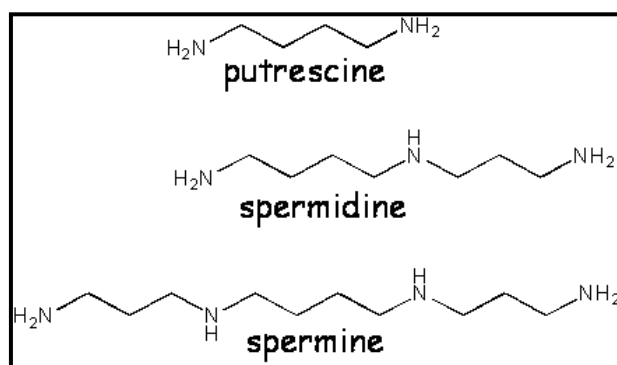
Σκοπός της προσαρμογής του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, που δικαιολογεί όλες τις παραπάνω αλλαγές, είναι η μεγιστοποίηση της αξιοποίησης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας για την φωτοσυνθετική διαδικασία και ταυτόχρονα η ελαχιστοποίηση των κινδύνων της εν λόγω ακτινοβολίας για τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό.

Η προσαρμογή του φωτοσυνθετικού οργανισμού σε χαμηλής και υψηλής έντασης φωτισμού είναι ένα φαινόμενο καλά μελετημένο τόσο στα ανώτερα φυτά όσο και στα χλωροφύκη (Boardman et al., 1974, Senger & Bauer, 1987, Kotzabasis & Dörnemann 1998, Kotzabasis et al., 1999, Sfichi, Ioannidis & Kotzabasis, 2007, Navakoudis et al., 2007).

## 1.4 Πολυαμίνες

Οι πολυαμίνες (PA) είναι χαμηλού μοριακού βάρους πολυκατιόντα, που εντοπίζονται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς (Cohen, 1998). Είναι γνωστό ότι είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Tabor και Tabor, 1984, Tiburcio et al., 1990). Σε φυτικά κύτταρα, η διαμίνη πουτρεσίνη (Put), η τριαμίνη σπερμιδίνη (Spd) και η τετραμίνη σπερμίνη (Spm) αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των κυτταρικών πολυαμινών (Εικόνα 8). Εμφανίζονται είτε στην ελεύθερη μορφή είτε συνδεδεμένες με φαινολικά οξέα και άλλες χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις ή σε μακρομόρια όπως πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Οι τρεις κύριες πολυαμίνες συμμετέχουν σε ένα ευρύ φάσμα των βιολογικών διεργασιών των φυτών, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης, της κυτταρικής διαίρεσης και απόπτωσης, της μορφογένεσης, της γήρανσης και της περιβαλλοντικής καταπόνησης (Ioannidis et al., 2011, Pirintzos et al., 2009, Sfichi et al., 2008, Ioannidis et al., 2007, Demetriou et al., 2007, Navakoudis et al., 2007, Ioannidis et al., 2006, Sfakianaki et al., 2006, Pirintzos & Kotzabasis, 2004, Sfichi et al., 2004, Logothetis et al., 2004, Navakoudis et al., 2003, Kotzabasis et al., 1999).

Οι τρεις κύριες πολυαμίνες έχουν εντοπιστεί, εκτός από το κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα, τα χυμοτόπια, τα μιτοχόνδρια και στον χλωροπλάστη διαφόρων φωτοσυνθετικών οργανισμών (Bagni & Serafini-Fracassini, 1973, Torrigiani et al., 1986, Kotzabasis et al., 1993). Έρευνες σε σπανάκι έδειξαν πως οι τρεις αυτές πολυαμίνες βρίσκονται συνδεδεμένες τόσο στο LHCIΙ όσο και στο PSII. Συγκεκριμένα ο



Εικόνα 8. Οι τρεις κύριες πολυαμίνες: πουτρεσίνη (Put), σπερμιδίνη (Spd) και σπερμίνη (Spm).

Πηγή: Stem Cell

Biology, <http://beyondthedish.wordpress.com/2012/03/06/polyamines-help-control-embryonic-stem-cell-differentiation/>

πυρήνας και το κέντρο αντίδρασης του PSII περιέχουν σχεδόν αποκλειστικά Spm σε μεγάλη συγκέντρωση (Kotzabasis et al., 1993). Οι πολυαμίνες, και ειδικότερα η Put, λόγω των φορτίων τους είναι πιθανό να μεταβάλλουν τη σχέση μεταξύ του Δψ του μικροχώρου του θυλακοειδούς και του ΔpH με τέτοιο τρόπο ώστε να προωθείται η σύνθεση ATP (Ioannidis et al., 2006). Περαιτέρω μελέτες έδειξαν πως εξωγενώς παρεχόμενη Put είναι ικανή να αναδιοργανώσει τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και να προσδώσει στο κύτταρο ανθεκτικότητα σε οποιαδήποτε μορφή καταπόνησης. Οι τρεις κύριες πολυαμίνες έχουν διακριτούς ρόλους στη φωτοχημική και στη μη φωτοχημική απόσβεση της ενέργειας. Συγκεκριμένα η διαμίνη Put φαίνεται να ελέγχει τη φωτοχημική απόσβεση της ενέργειας αυξάνοντας την παραγωγή ATP ενώ οι πολυαμίνες Spd και Spm ελέγχουν την μη-φωτοχημική απόσβεση της ενέργειας (NPQ) ενεργοποιώντας τους προστατευτικούς μηχανισμούς

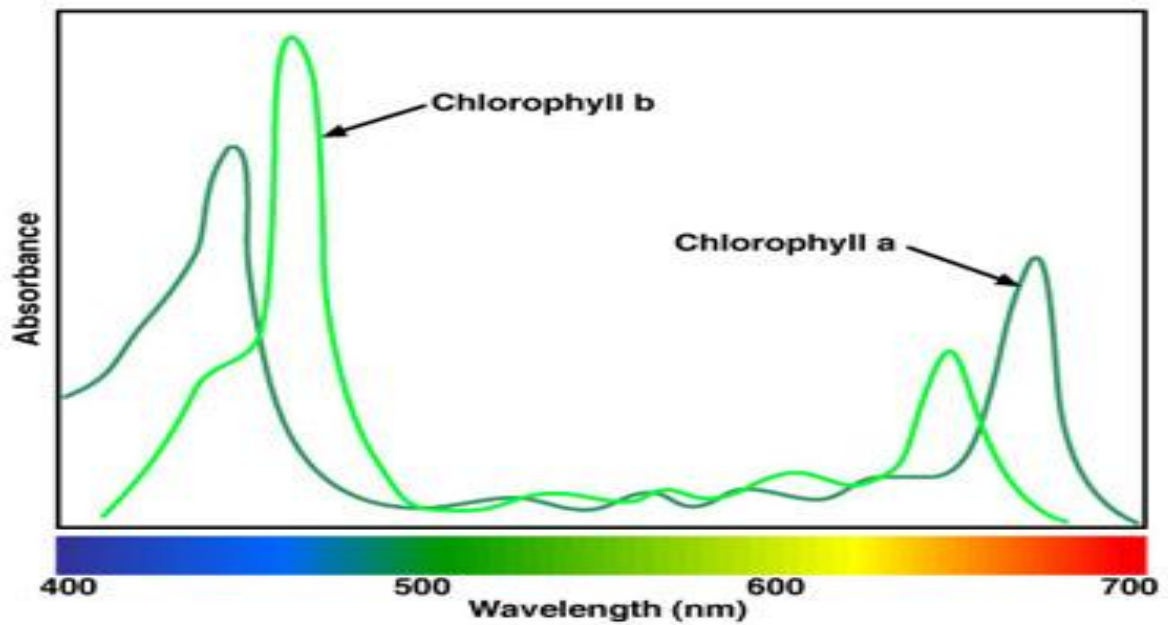
(Ioannidis et al., 2006). Ο ρόλος των πολυαμινών στην πλαστικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε διαφορετικά φωτονιακά περιβάλλοντα (φωτοπροσαρμογή) έγκειται, εκτός των άλλων, στη δεδομένη δράση τους να σταθεροποιούν και να αποσταθεροποιούν πρωτεϊνικά σύμπλοκα όπως το LHCII (Del Duca et al., 2000; Navakoudis et al., 2003). Αλλαγή στη κατανομή των πολυαμινών, κυρίως της σχέσης Put/Spm, παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στη διαδικασία της φωτοπροσαρμογής του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Kotzabasis et al., 1999, Navakoudis et al., 2007). Έκθεση σε χαμηλής έντασης φωτισμό προσομοιάζει συνθήκες καταπόνησης μειώνοντας το λόγο Put/Spm, η μείωση αυτή συνδέεται με την αύξηση του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής κεραίας και μείωση της συγκέντρωσης του PSII (Anderson et al., 1995).

## 1.5 Χρωστικές

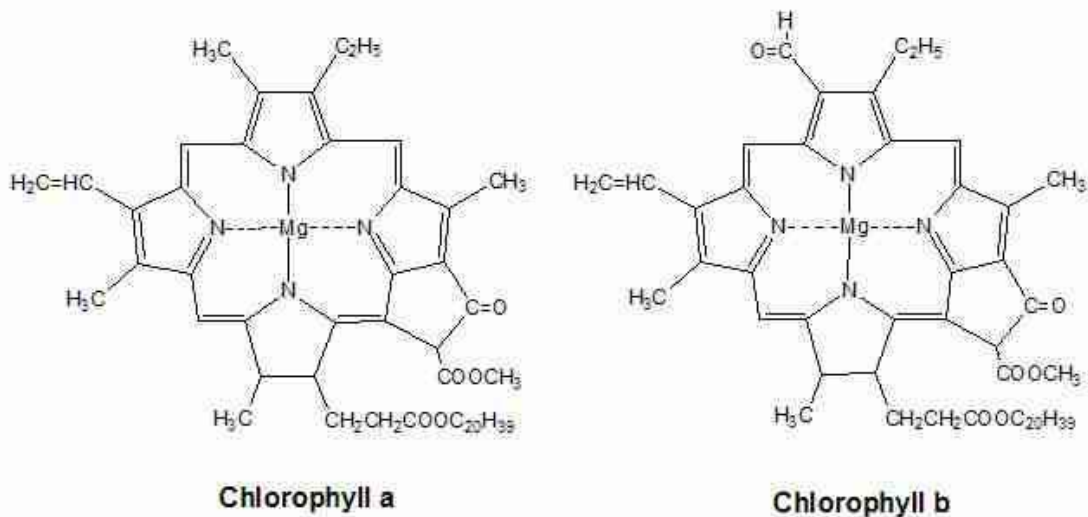
### 1.5.1 Χλωροφύλλες

Οι χρωστικές που απορροφούν το φως κατά τη φωτοσύνθεση είναι πρωτίστως οι χλωροφύλλες (χλωροφύλλη a, b) και δευτερευόντως τα καροτένια και οι ξανθοφύλλες. Η χλωροφύλλη a (μοριακός τύπος  $C_{20}H_{39}OH$ ) συναντάται σε όλους τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς (Εικόνα 10). Το μοριακό θεμέλιο της χλωροφύλλης a είναι ένας δακτύλιος πορφυρίνης (μαγνησιοπορφυρίνη). Η χλωροφύλλη b εντοπίζεται κυρίως στο PSII και η αναλογία Chla/Chlb στο PSII κυμαίνεται μεταξύ 1.4 και 3 (Bassi & Simpson, 1987). Η κεραία του φωτοσυστήματος I προσδένει κι αυτή χλωροφύλλες με αναλογία Chla/Chlb περίπου 4:1. Το φωτοσύστημα I ολόκληρο περιλαμβάνει γύρω στα 100-200 μόρια χλωροφύλλης ανά P700 και η αναλογία χλωροφύλλης a/b είναι μεγαλύτερη από 5

(Wollman et al., 1999).



Εικόνα 9. Φάσμα απορρόφησης χλωροφύλλης a και b. Πηγή: <http://www.doctortee.com/dsu/tiftickjian/bio100/photosynthesis.html>

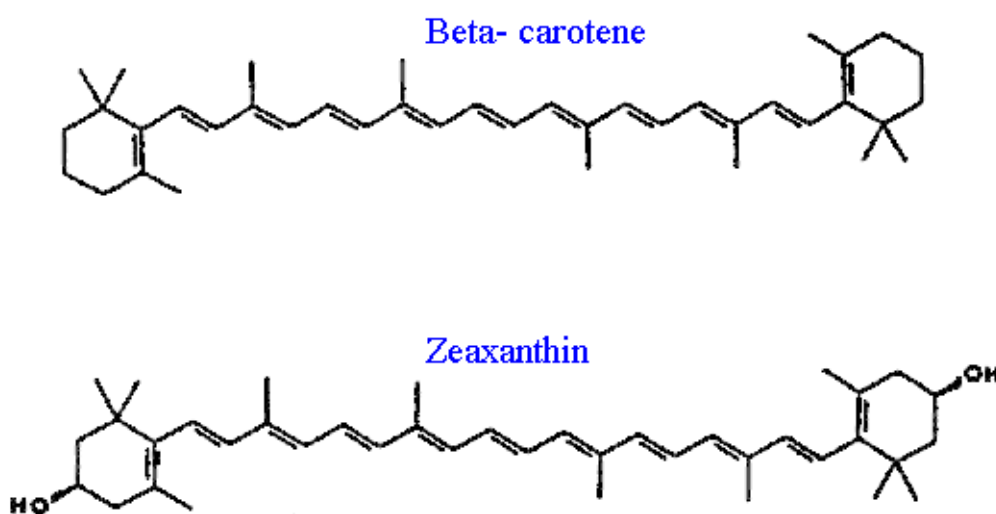


Εικόνα 10. Μόριο χλωροφύλλης a, μόριο χλωροφύλλης b. Η χλωροφύλλη a και b περιέχουν ένα δακτύλιο πορφυρίνης με ένα άτομο Mg στο κέντρο και μια μακρά λιπιδική "ουρά", τη φυτόλη. Πηγή: <http://alliedhealthblog.com/2010/11/the-similarities-between-chlorophyll-and-hemoglobin/>



### 1.5.2 Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι ερυθρές, πορτοκαλί ή κίτρινες λιποδιαλυτές χρωστικές που βρίσκονται σε όλους τους χλωροπλάστες και περιέχονται σε κάθε σύμπλοκο χρωστικών- πρωτεϊνών του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Το μόριο των καροτενοειδών είναι γραμμικό και ο σκελετός του αποτελείται από 40 άτομα C. Στους χλωροπλάστες συναντώνται συνήθως δύο ομάδες καροτενοειδών, τα καροτένια (C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>) και οι ξανθοφύλλες (οξυγονούχα παράγωγα των πρώτων) (Εικόνα 11).

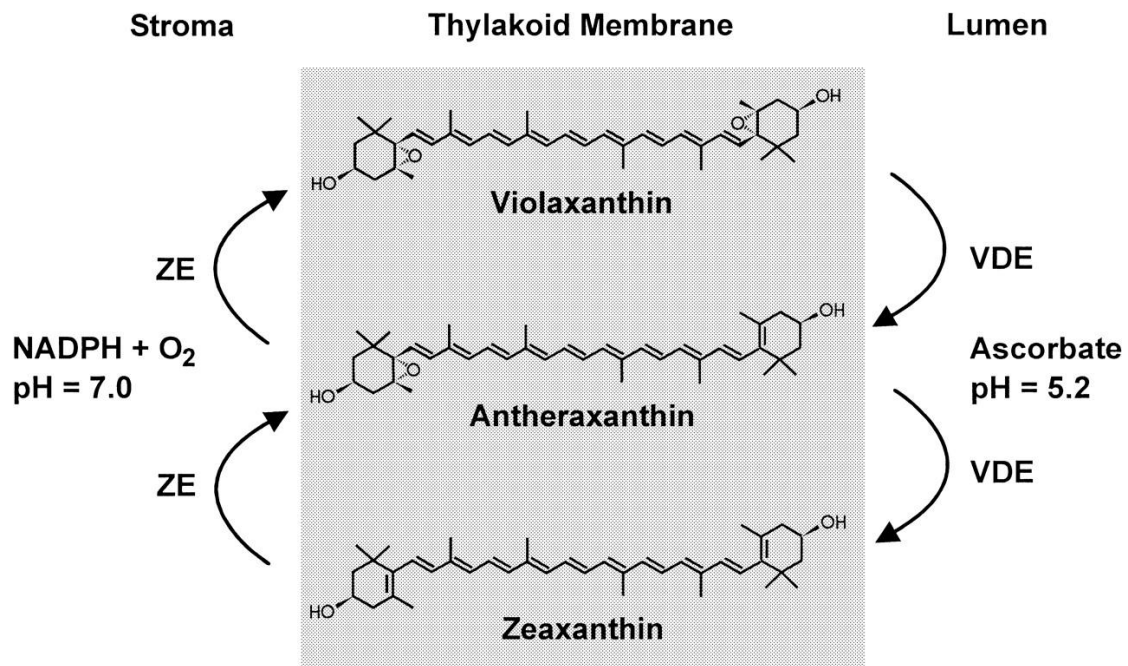


Εικόνα 11. Μόρια καροτενοειδών β-καροτένιο και ζεαξανθίνη (ξανθοφύλλη). Πηγή: Dr. Bryan D., University of Guelph.

Τα καροτενοειδή που περιέχονται στο LHCII έχουν διπλό ρόλο, λειτουργούν σαν φωτοσυλλεκτικές χρωστικές και συμμετέχουν στην φωτοπροστασία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Στο φάσμα απορρόφησης του LHC κυριαρχούν οι χλωροφύλλες γεγονός που υποδηλώνει πως η συνεισφορά των καροτενοειδών στη συλλογή ακτινοβολίας είναι συγκριτικά μικρή.

Η κρίσιμη λειτουργία τους είναι η προστασία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού από ανεπανόρθωτη φωτοκαταστροφή. Η λειτουργία αυτή περιλαμβάνει εκτός των άλλων την αποδιέγερση των triplet state χλωροφυλλών. Ο κύκλος των ξανθοφυλλών συμβάλλει επίσης στην προστασία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού όταν εκτίθεται σε υψηλής έντασης ακτινοβολία καθώς συνεισφέρει στη μη φωτοχημική απόσβεση της επιπλέον ενέργειας (NPQ) (Εικόνα 12).





Εικόνα 12. Ο κύκλος των ξανθοφυλλών. Παίζει σημαντικό ρόλο στη μη φωτοχημική απόσβεση και τη φωτοπροστασία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Πηγή: 2012 Japanese Society of Plant Physiologists.

Συγκεκριμένα η μετατροπή της βιολαξανθίνης σε ζεαξανθίνη μέσω του κύκλου των ξανθοφυλλών λαμβάνει χώρα σε συνθήκες κάτω από τις οποίες απαιτείται αύξηση της NPQ. Η ζεαξανθίνη και σε μικρότερο βαθμό η ανθεραξανθίνη και η λουτεΐνη μπορούν να αποδιεγείρουν την triplet κατάσταση της χλωροφύλλης και να αποσβέσουν την ενέργεια ως θερμότητα ( Demming- Adams 1990, Owens et al., 1992, Frank et al., 1994). Το εναλλακτικό μοντέλο προτείνει ότι οι ξανθοφύλλες αποτελούν παράγοντες ελέγχου της δομής του LHCI (Horton et al., 1994, Horton & Ruban, 2005). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο η μη πρωτονιωμένη μορφή του LHCI η οποία έχει προσδέσει βιολαξανθίνη είναι η πιο αποτελεσματική στην συλλογή φωτονίων. Κατά τη δημιουργία βαθμίδωσης του pH μεταξύ του στρώματος και του μικροχώρου, η πρωτονίωση στο περιβάλλον του LHCI σε συνδυασμό με την πρόσδεση της ζεαξανθίνης οδηγεί στην ενεργοποίηση της NPQ με αποτέλεσμα η απορροφημένη ενέργεια να αποσβένεται με μορφή θερμότητας (Horton et al., 1999). Τα καροτενοειδή που συμμετέχουν στον κύκλο των ξανθοφυλλών είναι τα μοναδικά καροτενοειδή στη φωτοσυνθετική μεμβράνη που υφίστανται πολύ γρήγορες, επαγόμενες από το φως αλλαγές στη συγκέντρωσή τους (Demmig-Adams & Adams, 1996).

Η συγκεκριμένη και διατηρημένη κατανομή των καροτενοειδών υποδηλώνει πως ίσως παίζουν και δομικό ρόλο εκτός των άλλων λειτουργιών τους. Η οργάνωση του β-καροτένιου στο PSI είναι προς το παρόν άγνωστη. Τα καροτενοειδή εντοπίζονται τόσο στην φωτοσυλλεκτική κεραία του PSII όσο και το πυρηνικό του μέρος, με το β-καροτένιο να εντοπίζεται κυρίως στο πυρηνικό κομμάτι (κοντά στο κέντρο αντίδρασης) και τις ξανθοφύλλες στο LHCI. Ανάλυση χρωστικών από το LHCI με

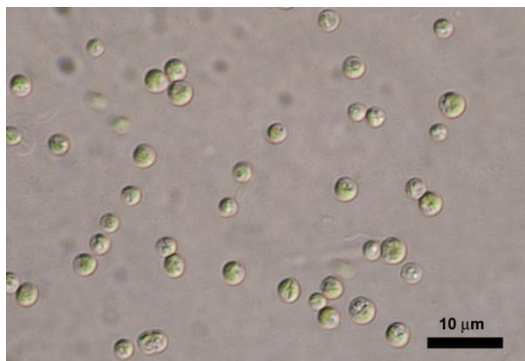
HPLC έδειξε πως πέρα από τις χλωροφύλλες a και b, το LHCII περιέχει και τις ξανθοφύλλες λουτεΐνη, νεοξανθίνη και βιολαξανθίνη (Brauman et al., 1982). Η λουτεΐνη φαίνεται να είναι απαραίτητη για την συσσώρευση και τη σταθερότητα του LHCII, όπως διαπιστώνεται από μεταλλάγματα ανάμεσα να συνθέσουν λουτεΐνη (Chunaev et al., 1991).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να διαπιστωθεί η επίδραση που έχει η ένταση φωτισμού στην ανάπτυξη του χλωροφύκου *Chlorella minutissima* καθώς επίσης και στη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των κυττάρων. Συγκρίθηκαν τρεις εντάσεις φωτισμού τα 15  $\mu\text{E}$ , τα 150  $\mu\text{E}$  και τα 1000 $\mu\text{E}$  ως προς την ανάπτυξη των κυττάρων, τη μέγιστη φωτοσυνθετική τους δραστηριότητα και αναπνοή, τη φωτοχημική τους απόδοση, τη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού τους μηχανισμού και τέλος την συγκέντρωση των πολυαμινών και των χρωστικών στα κύτταρα.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Οργανισμός

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το χλωροφύκος *Chlorella minutissima*. Η φυλογενετική του ταξινόμηση είναι η εξής:



Εικόνα 13. Κύτταρα *Chlorella minutissima*.

**Βασίλειο:** Φυτά

**Διαίρεση:** Χλωρόφυτα

**Κλάση:** *Trebouxiophyceae*

**Τάξη:** *Chlorellales*

**Γένος:** *Chlorella*

**Είδος:** *Chlorella minutissima* (Fott et Novakova 1969)

Ο οργανισμός αυτός είναι μονοκύτταρο χλωροφύκος με σφαιρικά κύτταρα μεγέθους 2-5μm περίπου. Είναι ευκαρυωτικός απλοειδής οργανισμός, χωρίς μαστίγιο και με απλό αναπαραγωγικό κύκλο. Πρόκειται για φωτοσυνθετικό οργανισμό, περιέχει χλωροφύλλη a και b και συνθέτει άμυλο όπως και τα ανώτερα φυτά. Είναι πλούσιος σε αμινοξέα και σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα γεγονός που τον καθιστά χρήσιμο για διατροφικές και φαρμακευτικές εφαρμογές. Το χαμηλότερο όριο pH στο οποίο αναπτύσσεται η *Chlorella* είναι 5.5, η μέγιστη θερμοκρασία είναι 32 °C. Η ονομασία *Chlorella* προέρχεται από το ελληνικό χλωρός (chloros) που σημαίνει πράσινος και την λατινική κατάληξη *ella* που σημαίνει μικρός. Εξελικτικά βρίσκεται κοντά με δύο άλλα γνωστά στο ερευνητικό πεδίο φύκη τη Χλαμυδομονάδα (*Chlamydomonas*) και το Σκενέδεσμο (*Scenedesmus*).

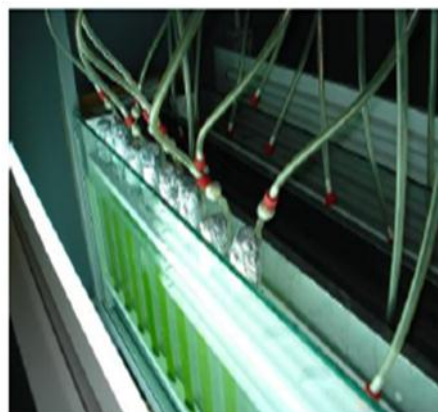
Ο κύκλος αναπαραγωγής του *Chlorella minutissima* παρουσιάζει κάποιες ιδιαιτερότητες. Κατά την ανάπτυξή τους τα κύτταρα αποκτούν τις παρακάτω μορφές: τα «σκοτεινά» κύτταρα, τα οποία είναι μικρότερα σε μέγεθος, πλούσια σε χλωροφύλλη και έχουν μεγαλύτερη φωτοσυνθετική δραστηριότητα από τα άλλα τα οποία λέγονται «φωτεινά» κύτταρα. Τα «σκοτεινά» κύτταρα όταν εκτίθενται στο φως

αυξάνονται σε μάζα και τελικά μετατρέπονται σε «φωτεινά» κύτταρα. Τα «φωτεινά» κύτταρα έπειτα, χωρίς να αυξήσουν την μάζα τους, δημιουργούν αυτοσπόρια (~6-7 ανά κύτταρο) τα οποία αφού ελευθερωθούν δίνουν τα μικρά σε μέγεθος «σκοτεινά» κύτταρα. Η διαδικασία αυτή γίνεται είτε στο φως είτε στο σκοτάδι ενώ μετατροπή των «σκοτεινών» κυττάρων σε «φωτεινά» απαιτεί φως και πιο συγκεκριμένα εξαρτάται από τη φωτοσύνθεση. Σε συνθήκες χαμηλής έντασης φωτισμού ο ρυθμός ανάπτυξης της κυτταρικής βιομάζας περιορίζεται από τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα ενώ σε συνθήκες υψηλού φωτισμού οι μεταβολικές διαδικασίες οι οποίες εξαρτώνται από το φως είναι αυτές που καθορίζουν το ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων (Tamiya et. al., 1953). Όσον αφορά την περιεκτικότητα των κυττάρων σε χλωροφύλλη, όταν περιοριστικός παράγοντας είναι το φως, δηλαδή σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού, τότε η χλωροφύλλη κυμαίνεται σε μεγαλύτερα επίπεδα, ενώ όταν το φως είναι άφθονο και δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη των κυττάρων η χλωροφύλλη έχει χαμηλή συγκέντρωση στα κύτταρα (Beale & Appleman, 1971).

## 2.2 Συνθήκες Ανάπτυξης

Η ανάπτυξη των οργανισμών έγινε σε επιμήκεις γυάλινους σωλήνες (διαμέτρου 5cm) με ειδικό στόμιο στο κάτω μέρος του σωλήνα που επιτρέπει τον αερισμό της καλλιέργειας (Εικόνα 13). Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε ενυδρείο σταθερής θερμοκρασίας στους 30° C μπροστά από λάμπες λευκού φωτισμού. Αρχικά αυτότροφες καλλιέργειες αναπτύχθηκαν στις συγκεκριμένες συνθήκες για 5 ημέρες σε θρεπτικό μέσο Bishop and Senger (1971), τροποποιημένο ως προς τη συγκέντρωση NaCl (Εικόνα 15), με λευκό φωτισμό περίπου 150μE, οι οποίες έπειτα χρησιμοποιήθηκαν ως μητρικές καλλιέργειες για τη διεξαγωγή του πειράματος.

Τα κύτταρα ανακαλλιεργήθηκαν με προσθήκη νέου θρεπτικού σε τρεις διαφορετικούς, ως προς την ένταση του φωτισμού, χειρισμούς: χαμηλής έντασης φωτισμός (L15, 15μE), μεσαίας έντασης φωτισμός (L150, 150μE) και υψηλής έντασης φωτισμός (L1000, 1000μE). Η διάρκεια του πειράματος κρίθηκε από την επίτευξη της στατικής φάσης ανάπτυξης των κυττάρων και τελικά ορίστηκε στις 4 ημέρες. Η αρχική κυτταρική συγκέντρωση, ίδια σε όλους τους χειρισμούς, ήταν 0,5 μLPCV/ mL ( Packed Cell Volume- Πακεταρισμένος Όγκος Κυττάρων) καλλιέργειας. Ο τελικός όγκος καλλιέργειας σε κάθε γυάλινο σωλήνα ήταν 250 mL.



Εικόνα 14. Σύστημα καλλιέργειας κυττάρων *Chlorella minutissima*.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (g/L)
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,50

<b>KNO<sub>3</sub></b>	80,0
<b>MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O</b>	24,6
<b>NaCl</b>	0,125
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 1H<sub>2</sub>O</b>	17,8
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	40,5
<b>FeSO<sub>4</sub> x 1H<sub>2</sub>O</b>	0,06
<b>Fe(III) citrate</b>	0,24
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	2,86
<b>MnCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O</b>	1,81
<b>ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O</b>	0,222
<b>CuSO x 5H<sub>2</sub>O</b>	0,079
<b>MoO<sub>3</sub> (85%-99.5%)</b>	0,0177

Εικόνα 15. Συστατικά του μέσου καλλιέργειας του χλωροφύκου *Chlorella minutissima*

Κάθε ημέρα γινόταν συγκομιδή κυττάρων (φυγοκέντρηση στα 1600 g για 5 λεπτά στους 25° C) για την ανάλυση χρωστικών και πολυαμινών. Τα δείγματα που συλλέγονταν αποθηκεύονταν σαν ιζήματα στους -20° C.

### 2.3 Υπολογισμός Κυτταρικής Συγκέντρωσης

Δείγματα των 2 ml από τις καλλιέργειες των μικροφυκών φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 1600g προκειμένου να καθιζάνουν σε βαθμονομημένο τριχοειδή υαλοσωλήνα (Εικόνα 3) (Logothetis et al. 2004). Η εκτίμηση της κυτταρικής συγκέντρωσης παρουσιάζεται ως όγκος καθιζάμενων κυττάρων (Packed Cell Volume : PCV) ανά mL καλλιέργειας (μL PCV/mL καλλιέργειας).



Εικόνα 15. Διαβαθμισμένοι υαλοσωλήνες για τη μέτρηση PCV

### 2.4 Επαγωγικός Φθορισμός- Φυσικοχημικές Αναλύσεις της Μοριακής Δομής και Λειτουργίας του Φωτοσυνθετικού Μηχανισμού (JIP- test)

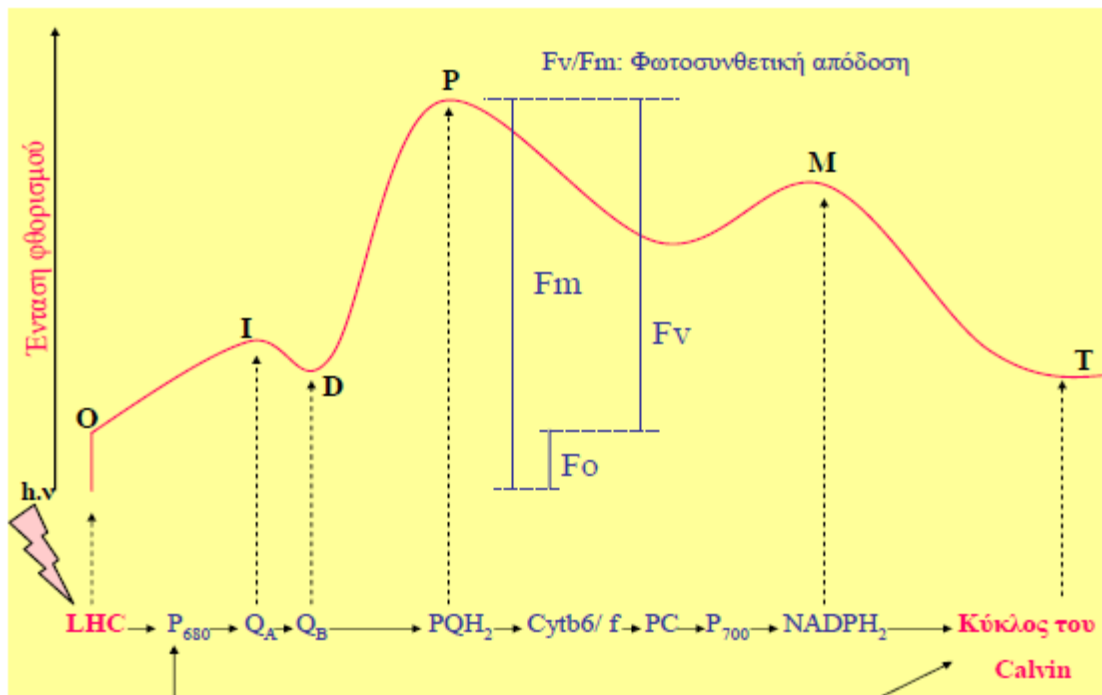
Η ενέργεια που δεσμεύεται από τις φωτοσυλλεκτικές κεραίες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού μπορεί να αποσβεστεί φωτοχημικά ή μη-φωτοχημικά.

Οι διαδικασίες αυτές είναι συμπληρωματικές, δηλαδή όταν η φωτοσύνθεση είναι υψηλή τότε η μη φωτοχημική απόσβεση μειώνονται και αντίστροφα. Στηριζόμενοι σε αυτή την αρχή μπορούμε μετρώντας το μέγιστο φθορισμό να βγάλουμε συμπεράσματα για τη μοριακή δομή και τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Ύστερα από 5-10 min προσαρμογή στο σκοτάδι όλα τα ενεργά κέντρα του PSII είναι «ανοιχτά» και όλα τα μόρια κινόνης είναι οξειδωμένα. Ο φθορισμός στο σημείο αυτό έχει τη χαμηλότερη δυνατή τιμή που ονομάζεται  $F_0$ . Μόλις το LHCI απορροφήσει φως και η κινόνη A δεσμεύσει ηλεκτρόνιο δεν μπορεί να δεχτεί

άλλο έως ότου περάσει το ήδη υπάρχον στην κινόμενη B με αποτέλεσμα να μειώνεται απόλυτα η ικανότητα φωτοχημικής απόσβεσης και να αυξάνεται ο φθορισμός στο μέγιστο ( $F_m$ ) και στη συνέχεια να μειώνεται βαθμιαία έως ένα σταθερό επίπεδο ( $F_s$ ) (Strasser & Strasser 1995).

Η μέγιστη απόδοση του PSII υπολογίζεται μέσω του επαγωγικού φθορισμού μετρώντας το  $F_v/F_m$ , όπου  $F_v = F_m - F_o$ . Υπολογίζονται επίσης πολλοί άλλοι παράγοντες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού εφαρμόζοντας το JIP-test, όπως το ABS/RC, που υποδηλώνει το μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας, το RC/CS<sub>o</sub> που υποδηλώνει την πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης του PSII και το DIO/RC, που υποδηλώνει το ποσό της ενέργειας που διαχέεται ως θερμότητα ανά κέντρο αντίδρασης.

Ο φθορισμός αυξάνεται όταν η φωτοχημική απόδοση της φωτοσύνθεσης παρεμποδίζεται, όταν για παράδειγμα δεν υπάρχει διαθέσιμος οξειδωμένος δέκτης ηλεκτρονίων σε κάποιο σημείο στη μεταφορά των ηλεκτρονίων (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Τυπική καμπύλη επαγωγικού φθορισμού.

Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού έγιναν με φορητή συσκευή Plant Efficiency Analyser (Handy PEA, Hansatech Instruments) (Εικόνα 17) και ακολούθησε επεξεργασία των δεδομένων



Εικόνα 17. Handy PEA για τις μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού

με χρήση εξειδικευμένου λογισμικού εφαρμογής JIP-test (BioLyzer HP 4.0), σύμφωνα με τη μέθοδο των Strasser & Strasser (1995) (Εικόνα 18). Η μέθοδος βασίζεται σε μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού με ανάλυση 10 $\mu$ s σε χρονικό διάστημα 1 s. Ο φθορισμός μετρήθηκε με 12-bit ανάλυση και η διέγερση έγινε από 3 διόδους φωτισμού (LEDs) με ένταση ακτινοβολίας μέχρι 3000 $\mu$ E ερυθρού φωτός.

Όλες οι μετρήσεις έγιναν σε δείγματα καλλιεργειών όγκου 2 mL τα οποία προτού διεγερθούν είχαν παραμείνει στο σκοτάδι για 10 λεπτά προκειμένου να «αδειάσουν» τα κέντρα αντίδρασης από ηλεκτρόνια.

Μεταβλητή OJIP καμπύλης	Ορισμός
$F_t$	Τιμή φθορισμού σε χρόνο t μετά την ακτινοβολήση
$F_{50\mu s}$	Ένταση φθορισμού στα 50 $\mu$ s
$F_{300\mu s}$	Ένταση φθορισμού στα 300 $\mu$ s
$F_J = F_{2ms}$	Ένταση φθορισμού στο βήμα J (2 ms) της καμπύλης OJIP
$F_I = F_{30ms}$	Ένταση φθορισμού στο βήμα I (30 ms) της καμπύλης OJIP
$F_P (= F_m)$	Μέγιστη ένταση φθορισμού στο P της καμπύλης OJIP
$t_{F_m}$	Χρόνος σε (ms) που απαιτείται για να μεγιστοποιηθεί η ένταση του φθορισμού $F_m$
Area	Συνολική συμπληρωματική περιοχή ανάμεσα στην καμπύλη OJIP και την ευθεία που διέρχεται από το $F = F_m$
<b>Παράμετροι JIP-test</b>	
$F_o$	Ελάχιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί σε «ανοιχτά» κέντρα (open PSII RC <sub>s</sub> , t = 0)
$F_m$	Μέγιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί στο χρόνο όπου όλα τα κέντρα είναι «κλειστά» (closed PSII RC <sub>s</sub> , t = t <sub>Fm</sub> )
$F_v$	Μεταβλητή τιμή φθορισμού τη χρονική στιγμή t
$F_v = F_m - F_o$	Μέγιστη τιμή μεταβλητής τιμής φθορισμού
$V_t = (F_t - F_o)/(F_m - F_o)$	Σχετική μεταβολή φθορισμού τη χρονική στιγμή t
$V_J = (F_J - F_o)/(F_m - F_o)$	Σχετική μεταβολή φθορισμού στο βήμα J
$M_o = (\Delta V/\Delta t)_o = 4(F_{300\mu s} - F_o)/(F_m - F_o)$	Αρχική κλίση σε ms της καμπύλης $V = f(t)$
$S_m = (Area)/(F_m - F_o)$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης OJIP

	(Area), ομαλοποιούμενο ως προς $F_v$ (αποτελεί μέτρο του αριθμού των οξειδοαναγωγικών κύκλων της $Q_A$ )
$S_s = V_J/M_o$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης OJIP που αντιστοιχεί μόνο στην OJ φάση (διάστημα όπου η $Q_A$ των RC ανάγεται μία φορά)
$N = S_m/S_s = S_m M_o(1/V_J)$	Μέτρο αριθμού κύκλων αναγωγής της $Q_A$ στο διάστημα $t_{Fm}$
<b>Ειδικές ροές ενέργειας (ανά κέντρο που ανάγει <math>Q_A</math>)</b>	
$ABS/RC = M_o(1/V_J)(1/\Phi_{p_0})$	Μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας
$TR_o/RC = M_o(1/V_J)$	Ενέργεια που παγιδεύεται ανά κέντρο αντίδρασης (για $t = 0$ )
$ET_o/RC = M_o(1/V_J)\Psi_o$	Ροή ηλεκτρονίων ανά κέντρο αντίδρασης (για $t = 0$ )
$DI_o/RC = (ABS/RC) - (TR_o/RC)$	Διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης (για $t = 0$ )
<b>Αποδόσεις ή λόγοι επιμέρους ροών</b>	
$\Phi_{p_0} = TR_o/ABS = [1-(F_o/F_m)]$	Μέγιστη κβαντική απόδοση της πρωτογενούς φωτοχημείας (για $t = 0$ )
$\Psi_o = ET_o/TR_o = 1 - V_J$	Πιθανότητα να προκαλέσει μια διέγερση (exciton) τη μετακίνηση ενός ηλεκτρονίου κατά μήκος της αλυσίδας πέρα από την $Q_A^-$ (για $t = 0$ )
$\Phi_{E_0} = ET_o/ABS = [1-(F_o/F_m)]\Psi_o$	Κβαντική απόδοση της μεταφοράς ηλεκτρονίων (για $t = 0$ )
$\Phi_{D_0} = 1 - \Phi_{p_0} = F_o/F_m$	Κβαντική απόδοση της διάχυσης ηλεκτρονίων (για $t = 0$ )
<b>Εκτιμώμενες ροές ενέργειας ανά διεγερμένη περιοχή</b>	
$ABS/CS_o$	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το $F_o$
$ABS/CS_m$	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το $F_m$
$TR_o/CS_o = \Phi_{p_0}(ABS/CS_o)$	Παγιδευμένη ενέργεια ανά διεγειρόμενη περιοχή της μεμβράνης (για $t = 0$ )
$ET_o/CS_o = \Phi_{E_0}(ABS/CS_o)$	Ροή ηλεκτρονίων ανά περιοχή διέγερσης (για $t = 0$ )
$DI_o/CS_o = (ABS/CS_o) - (TR_o/CS_o)$	Διαχεόμενη ενέργεια ανά περιοχή διέγερσης (για $t = 0$ )
<b>Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης</b>	
$RC/CS_o$	Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης
<b>Δείκτες επίδοσης</b>	



$PI_{ABS} = (RC/ABS) (\Phi_{p_0}/1-\Phi_{p_0})(\Psi_0/1-\Psi_0)$	Επιδόσεις ανά απορροφώμενη ενέργεια
$PI_{CS_0} = (RC/CS_0) (\Phi_{p_0}/1-\Phi_{p_0})(\Psi_0/1-\Psi_0)$	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης ( $t = 0$ )
$PI_{CS_m} = (RC/CS_m) (\Phi_{p_0}/1-\Phi_{p_0})(\Psi_0/1-\Psi_0)$	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης ( $t = t_{Fm}$ )
$SFI_{abs} = (1-\Phi_{p_0})(1-\Psi_0)$	Δείκτης λειτουργικότητας
<b>Ικανότητα παραγωγής έργου</b>	
$DF_{ABS} = \log(PI_{ABS})$	Εκτιμώμενη παραγωγή έργου ανά απορροφώμενη ενέργεια

Εικόνα 18. Βασικοί παράμετροι JIP-test.

## 2.5 Πολαρογραφικές Μετρήσεις Μέγιστης Φωτοσυνθετικής Δραστηριότητας και Αναπνοής

Οι μετρήσεις της μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και της αναπνοής έγιναν με σύστημα Clark type ηλεκτροδίου της Hansatech με κυψελίδα ρυθμιζόμενου όγκου (0.5-2.5mL) και θερμορυθμιστικό μανδύα νερού. Μεταξύ ενός ηλεκτροδίου πλατίνας (κάθοδος) και ενός άλλου από άργυρο (άνοδος) εφαρμόζεται, μέσω ενός ηλεκτρολύτη (κορεσμένο διάλυμα KCl) μια μικρή ηλεκτρική τάση (~50V). Για τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ ανόδου και καθόδου χρειάζεται οξυγόνο το οποίο διέρχεται από μια ημιπερατή μεμβράνη, η οποία διαχωρίζει το δείγμα από τα ηλεκτρόνια. Η καταγραφή της έντασης του ρεύματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του οξυγόνου στο δείγμα. Η διαθεσιμότητα CO<sub>2</sub> εξασφαλίζεται με τη χρήση διαλύματος 10mM Tricine pH 7.6 με 10mM NaHCO<sub>3</sub> και η ομοιογένεια του δείγματος εξασφαλίζεται από την περιστροφή ενός μαγνητικού αναδευτήρα.

Με φωτισμό του δείγματος (550 μE) επιτυγχάνεται η μέγιστη παραγωγή οξυγόνου από τα κύτταρα μέσω φωτοσύνθεσης. Η ένταση φωτισμού 550μE επιλέχθηκε ως ιδανική για την αποφυγή ανεπιθύμητων φαινομένων όπως η φωτοαναστολή και ο αυτοσκιασμός. Μονοκύτταρα φύκη *Chlorella minutissima* συλλέχθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν στα 1600g για 5 λεπτά και επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα A ( 34mg NaHCO<sub>3</sub>, 8.96mg Tricin σε 100mL dH<sub>2</sub>O, pH 7.6 ρυθμιζόμενο με KOH) έτσι ώστε η κυτταρική πυκνότητα του εναιωρήματος να είναι 5μL PCV/mL. Η οριοθέτηση του επιπέδου συγκέντρωσης του οξυγόνου από 0-100% στο διάλυμα του δείγματος γίνεται με αέριο άζωτο και κορεσμένο σε οξυγόνο νερό αντίστοιχα.

## 2.6 Ποιοτικός και Ποσοτικός Προσδιορισμός των Πολυαμινών

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των κύριων πολυαμινών (Put, Spd, Spm) στα δείγματα έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Kotzabasis et al.(1993). Οι πολυαμίνες, αφού βενζυλιώθηκαν, ανιχνεύθηκαν με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής

Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Η προετοιμασία των δειγμάτων περιλαμβάνει την συλλογή ιζήματος κυττάρων ύστερα από φυγοκέντρηση στα 1600g για 5min 20mL καλλιέργειας. Στο ίζημα προστίθενται 200μL 1N NaOH, γίνεται καλή ανάδευση και επώαση των δειγμάτων για 20 λεπτά στους 0°C.

Ακολουθεί προσθήκη 200μL 36% HCL και υδρόλυση των δειγμάτων στους 110° C για 20 ώρες. Μετά από εξάτμιση των υπερκειμένων τους στους 80° C, τα δείγματα επαναδιαλύονται σε 300μL 5% (v/v) PCA ( perchloric acid). Για το σχηματισμό των βενζυλιωμένων παραγώγων σε κάθε δείγμα προστίθενται 1mL 2N NaOH και 10μL Benzoyl Chloride. Ύστερα από ισχυρή ανάδευση και επώαση για 20 min στους 25° C, προστίθενται 2mL κορεσμένου διαλύματος NaCl και ακολουθεί η εκχύλιση των πολυαμινών με τη χρήση 3mL διεθλαιθέρα. Το εκχύλισμα συλλέγεται και έπειτα ο διεθλαιθέρας εξατμίζεται στους 60° C . Οι βενζυλιωμένες πολυαμίνες επαναδιαλύονται σε 200μL 63% (v/v) μεθανόλης (HPLC grade).

Η ανάλυση σε HPLC έγινε με τη χρήση στήλης narrow bore C-18 (2.1 mm x 200 mm, 5μm Hypersil, Hewlett Packard) και ένα σύστημα δύο διαλυτών που περιλάμβανε μια διαβάθμιση μεθανόλης (55%-84%, v/v). Ο διαχωρισμός έγινε σε HPLC( Shimadzu, LC-10AD, VP) σύστημα δύο αντλιών με diode array (Shimadzu SPD-M10A). Η ποσοτική ανάλυση έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Kotzabasis et al., (1993).

## 2.7 Ποιοτικός και Ποσοτικός Προσδιορισμός των Χρωστικών

Η ποιοτική και την ποσοτική ανάλυση των χρωστικών έγινε με την χρήση ενός diode array – narrow bore – HPLC συστήματος (Shimadzu, SPD-M10A,VP) Αρχικά συλλέχτηκαν δείγματα καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στα 1500 g με απώτερο σκοπό την καθίζηση των κυττάρων. Ακολούθησε εκχύλιση των χρωστικών με μεθανόλη. Αφού συλλέχθηκε το υπερκείμενο που περιελάμβανε τις χρωστικές ακολούθησε η εξάτμιση της μεθανόλης σε λυοφιλοποιητή (Heto, MAXI dry Iyo) για 1 ώρα περίπου. Οι χρωστικές επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα 80% ακετόνη (HPLC grade), 20% HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid ]] 2.5mM, pH 7.8 με τελικό όγκο εκχύλισης 200μL. Για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε μία narrow bore χρωματογραφική στήλη (Hewlett Packard, 2.1X200mm, C-18, 5 μm particle size) που αυξάνει την ευαισθησία του διαχωρισμού για επιπλέον 5-10 φορές σε σύγκριση με τις κλασσικές στήλες.

Για το διαχωρισμό των χρωστικών χρησιμοποιήθηκε διαλύτης έκλουσης, ο οποίος περιείχε υπερκάθαρο νερό (H<sub>2</sub>O) και διάλυμα μεθανόλης (CH<sub>3</sub>OH)/ ακετυλονιτριλίου (75%/25% αντίστοιχα ) , με σταθερή ροή 0,2 mL/min και θερμοκρασία διαχωρισμού τους 25 °C. Η συγκέντρωση του υπερκάθαρου νερού ήταν μεταβλητή στο χρόνο( Εικόνα 19).

<i>Χρόνος (min)</i>	<i>Συγκέντρωση υπερκάθαρου νερού (M)</i>
<i>0,01</i>	15,0

<b>15,00</b>	7,5
<b>30,00</b>	2,0
<b>30,01</b>	0,0
<b>80,00</b>	0,0
<b>80,01</b>	15,0
<b>90,00</b>	15,0
<b>90,01</b>	Stop

Εικόνα 19. Διαβάθμιση συγκέντρωσης υπερκάθαρου νερού(H<sub>2</sub>O).

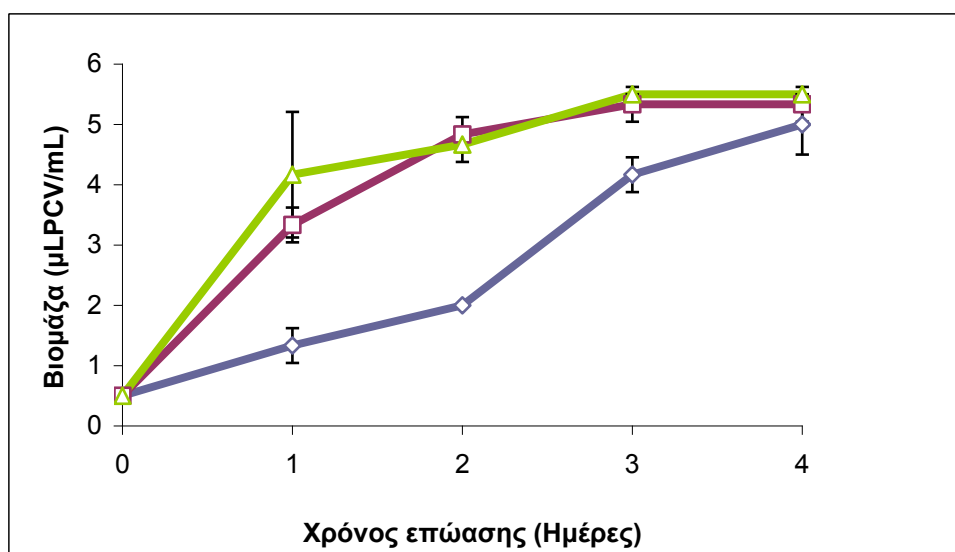
Η ποιοτική ανάλυση έγινε βάσει του φάσματος απορρόφησης των επιμέρους μεγίστων του HPLC-προφίλ, ενώ η ποσοτική εκτίμηση έγινε με την βοήθεια γνωστών συγκεντρώσεων χρωστικών.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας επιχειρήθηκε η μελέτη της φωτοπροσαρμογής του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στο μονοκύτταρο χλωροφύκος *Chlorella minutissima*. Η μελέτη έγινε μέσω της επίδρασης διαφορετικών εντάσεων φωτός στη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

#### 3.1 Έλεγχος ανάπτυξης

Ο έλεγχος ανάπτυξης των διαφορετικών χειρισμών πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε χειρισμός καλλιεργήθηκε σε τρεις επαναλήψεις από τις μετρήσεις των οποίων προέκυψαν οι μέσοι όροι της βιομάζας κάθε χειρισμού. Με την προϋπόθεση πως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση CO<sub>2</sub> και τα θρεπτικά είναι ιδανικά, ο ρυθμός ανάπτυξης των καλλιεργειών θα πρέπει να επηρεάζεται μόνο από την ένταση φωτισμού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στο παρακάτω διάγραμμα :

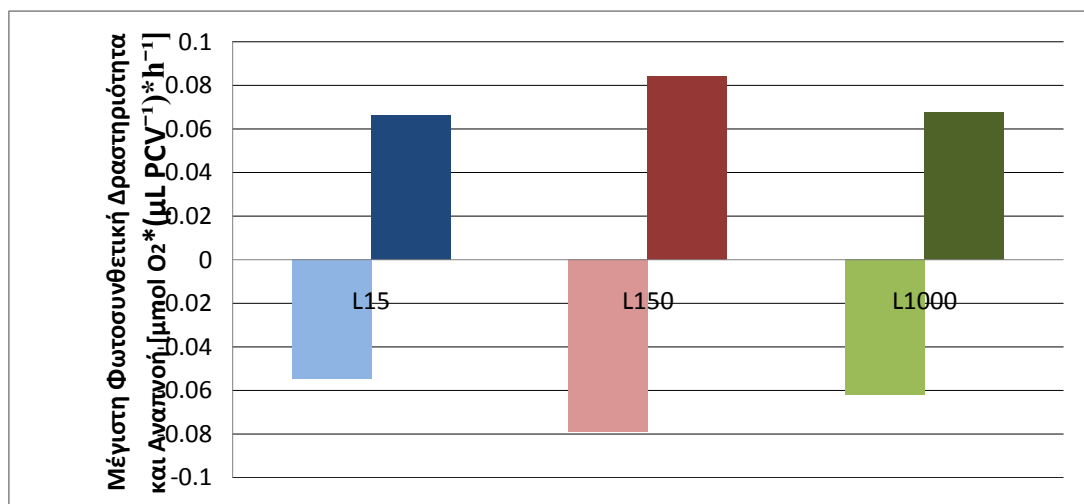


Εικόνα 20. Παραγωγή κυτταρικής βιομάζας σε συνθήκες φωτισμού L15 (-◇-) (15 μmol/sec m<sup>2</sup>), L150 (-□-) (150 μmol/sec m<sup>2</sup>), L1000 (-Δ-) (1000 μmol/sec m<sup>2</sup>).

Όπως φαίνεται και την Εικόνα 20 οι τρεις χειρισμοί φτάνουν στην ίδια περίπου βιομάζα την 4<sup>η</sup> ημέρα επώασης. Μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης αρχικά παρουσιάζει το L1000, το οποίο φτάνει σε στατική φάση από την 3<sup>η</sup> μέρα, ακολουθεί το L150, το οποίο επίσης φτάνει στη στατική φάση την 3<sup>η</sup> μέρα και έπειτα το L15, το οποίο

συνεχίζει να αναπτύσσεται εκθετικά έως και την 4<sup>η</sup> ημέρα και φτάνει τελικά στο ίδιο επίπεδο ανάπτυξης με τα L150 και L1000.

### 3.2 Μετρήσεις μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και αναπνοής



Εικόνα 21. Μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα [ $\mu\text{mol O}_2^* (\mu\text{LPCV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$ ] και αναπνοή [ $\mu\text{mol O}_2^* (\mu\text{LPCV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$ ] σε συνθήκες φωτισμού L15 (15  $\mu\text{E}$ ), L150 (150  $\mu\text{E}$ ) και L1000 (1000  $\mu\text{E}$ ) την 3<sup>η</sup> ημέρα επώασης.

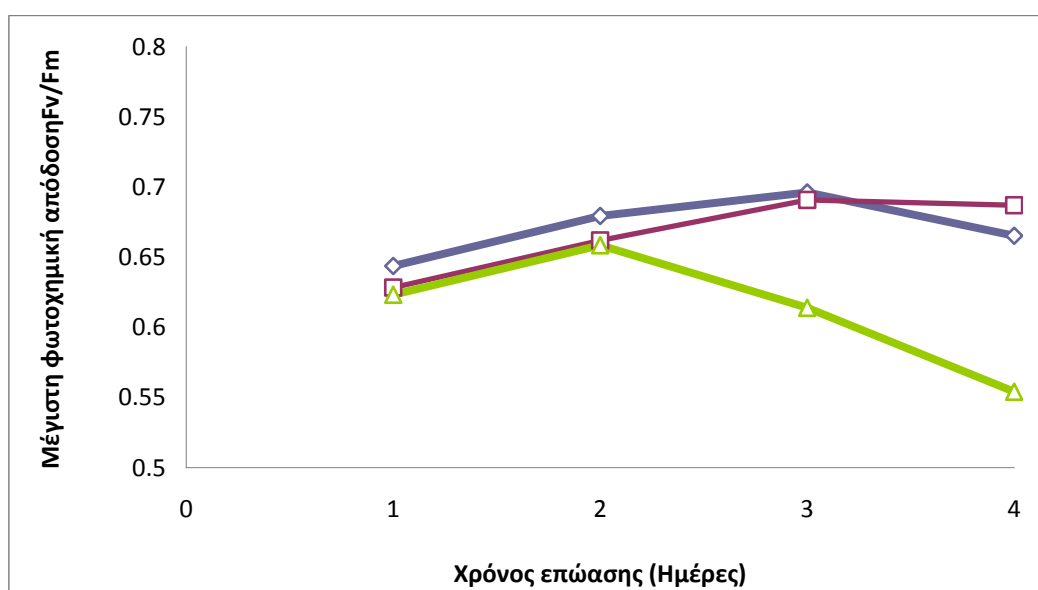
Από την εικόνα 21 φαίνεται πως μεγαλύτερη φωτοσυνθετική δραστηριότητα και αναπνοή παρουσιάζει ο χειρισμός L150 ενώ οι L15 και L1000 χειρισμοί κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα.

Στην προκειμένη περίπτωση η L1000 καλλιέργεια συμπεριφέρεται ως L15 γεγονός που ίσως οφείλεται σε τυχόν φωτοαναστολή λόγω της υψηλής έντασης φωτισμού. Ίσως όμως οφείλεται και στη διαφορά της εντάσεως φωτισμού που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας (550  $\mu\text{E}$ ) η οποία είναι αρκετά χαμηλότερη από την ένταση στην οποία είναι προσαρμοσμένα τα κύτταρα της L1000 καλλιέργειας.

Είναι γνωστό ότι η αύξηση στη μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα συνδυάζεται με ελάττωση του λειτουργικού μεγέθους του LHCII και αύξηση της συγκέντρωσης των ενεργών κέντρων αντίδρασης, η οποία συμβαίνει κατά την προσαρμογή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε υψηλής έντασης φωτισμό. Από την άλλη η μείωση της μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας μπορεί να συνδυαστεί με αύξηση στο μέγεθος του LHCII, και μείωση της συγκέντρωσης των ενεργών κέντρων αντίδρασης η οποία είναι η αναμενόμενη απόκριση προσαρμογής του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε χαμηλής έντασης φωτισμό (Walters, 2005). Οι εν λόγω δομικές και λειτουργικές αλλαγές που συμβαίνουν στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό κατά την

φωτοπροσαρμογή σε χαμηλής εντάσεως φωτισμό έχουν ως αποτέλεσμα τα L15 προσαρμοσμένα κύτταρα να παρουσιάζουν χαμηλό σημείο αντιστάθμισης, γρήγορο κορεσμό και χαμηλό επίπεδο μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας σε σχέση με τα L1000 προσαρμοσμένα κύτταρα (Senger & Fleischhacker 1973). Τα αποτελέσματα για το L150 και το L15 χειρισμό φαίνεται να ακολουθούν αυτή τη φυσιολογική απόκλιση και συμφωνούν με τα αποτελέσματα της κυτταρικής ανάπτυξης, καθώς η αύξηση στη βιομάζα οφείλεται στην αυξημένη φωτοσυνθετική δραστηριότητα. Για τις μετρήσεις του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής κεραίας και της πυκνότητας των ενεργών κέντρων αντίδρασης χρησιμοποιήσαμε μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού.

### 3.3 Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού- JIP-test



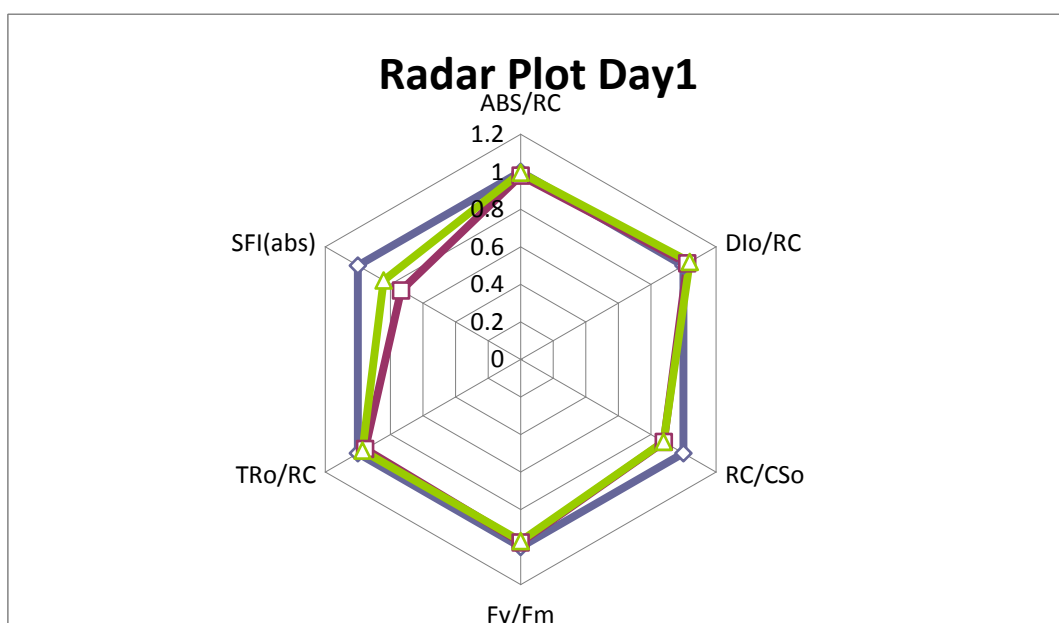
Εικόνα 22. Μέγιστη φωτοχημική απόδοση ( $F_v/F_m$ ) σε συνθήκες φωτισμού L15 (-◇-)( $15 \mu\text{mol}/\text{sec m}^2$ ), L150 (-□-)( $150 \mu\text{mol}/\text{sec m}^2$ ), L1000 (-Δ-)( $1000 \mu\text{mol}/\text{sec m}^2$ ) έπειτα από 4 ημέρες επώασης.

Η μέγιστη φωτοχημική απόδοση εκφρασμένη ως  $F_v/F_m$  είναι αρχικά ίδια και για τους τρεις χειρισμούς εφόσον καλλιεργήθηκαν με ίδια αρχική κυτταρική συγκέντρωση ( $0,5 \mu\text{L PCV}/\text{mL}$ ) σε ίδιες συνθήκες πέραν της εντάσεως φωτισμού. Οι επιπτώσεις της φωτοπροσαρμογής των κυττάρων γίνονται φανερές μετά το πέρας της 2<sup>ης</sup> ημέρας επώασης των καλλιεργειών. Όπως είναι αναμενόμενο ο L150 χειρισμός εμφανίζει μεγαλύτερη φωτοχημική απόδοση από τον L15 χειρισμό καθώς προσαρμόζεται σε μεγαλύτερη ένταση φωτισμού. Η συμπεριφορά του L1000 χειρισμού υποδηλώνει καταπόνηση των κυττάρων και πιθανή φωτοαναστολή λόγω της πολύ υψηλής έντασης του φωτός που προσπίπτει στην καλλιέργεια.

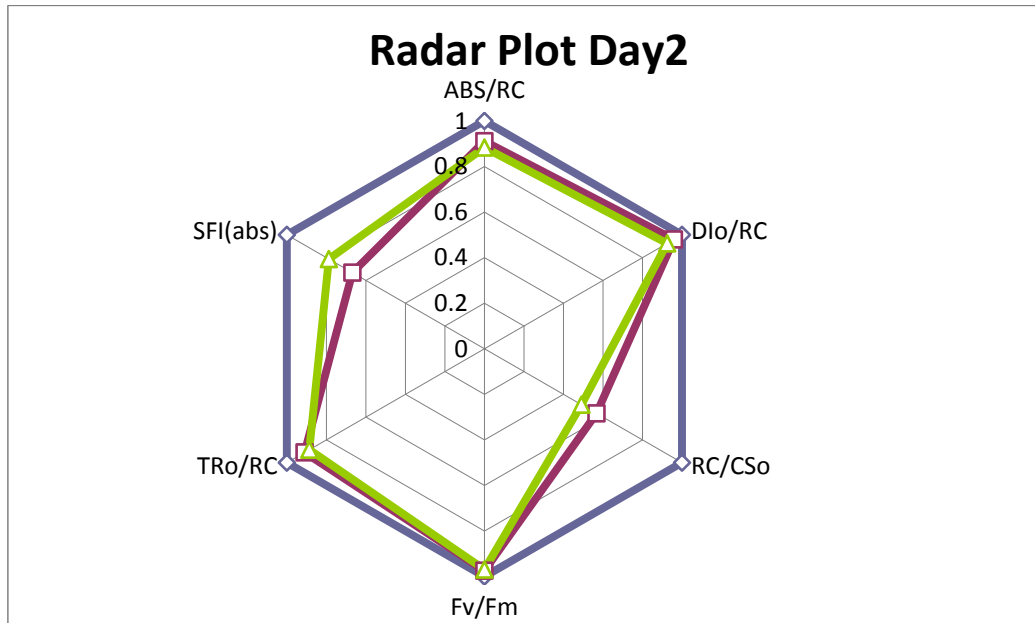
Μια γενικότερη εικόνα για τη μοριακή δομή και για τις επιμέρους λειτουργίες του φωτοσυνθετικού οργανισμού παίρνουμε από τη σύγκριση των παραμέτρων ABS/RC, DIO/RC, RC/CS<sub>0</sub>, TRo/RC και SFI(abs) του JIP-test στα παρακάτω διαγράμματα. Το ABS/RC εκφράζει την απορρόφηση ενέργειας ανά κέντρο αντίδρασης. Η τιμή

του συγκεκριμένου παράγοντα συνδέεται ανάλογα με το μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας (LHCII) του κυττάρου. Το RC/CS<sub>0</sub> εκφράζει την πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης. Το DI<sub>0</sub>/RC εκφράζει τη διάχυση ενέργειας ανά κέντρο αντίδρασης, δηλαδή το τμήμα της απορροφώμενης ενέργειας που χάνεται από κάθε κέντρο αντίδρασης παραμένοντας έτσι ανεκμετάλλευτο από το φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Το TR<sub>0</sub>/RC εκφράζει την ενέργεια που παγιδεύεται ανά κέντρο αντίδρασης ενώ το SFI(abs) αποτελεί δείκτη λειτουργικότητας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

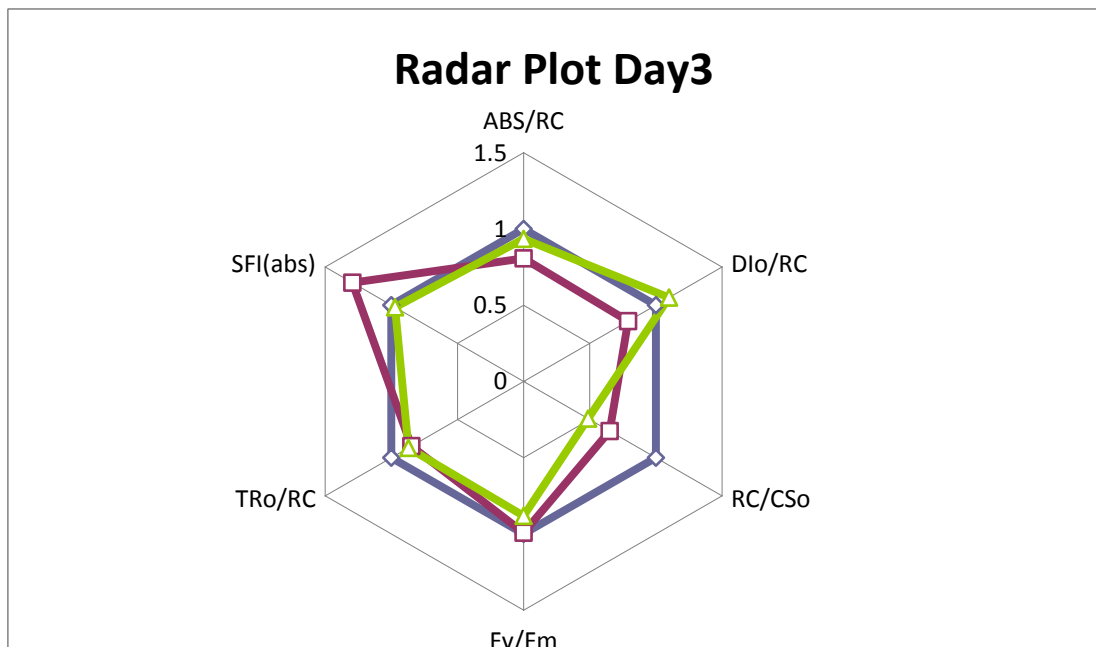
Οι κύριες αλλαγές που παρατηρούνται όταν ένας οργανισμός προσαρμόζεται σε L1000 συνθήκες είναι μείωση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας και αύξηση των ενεργών κέντρων αντίδρασης ώστε να μεγιστοποιείται η φωτοχημική απόσβεση. Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζονται οι αλλαγές αυτών των παραγόντων συγκριτικά με τις τιμές του L15 χειρισμού.



Εικόνα 23. Σύγκριση παραμέτρων ABS/RC, DI<sub>0</sub>/RC, RC/CS<sub>0</sub>, TR<sub>0</sub>/RC και SFI(abs) του JIP-test και Fv/Fm για τους τρεις χειρισμούς σε συνθήκες φωτισμού L15 (-◇-) (15 μmol/sec m<sup>2</sup>), L150 (-□-) (150 μmol/sec m<sup>2</sup>), L1000 (-Δ-) (1000 μmol/sec m<sup>2</sup>) έπειτα από 1 ημέρα επώασης

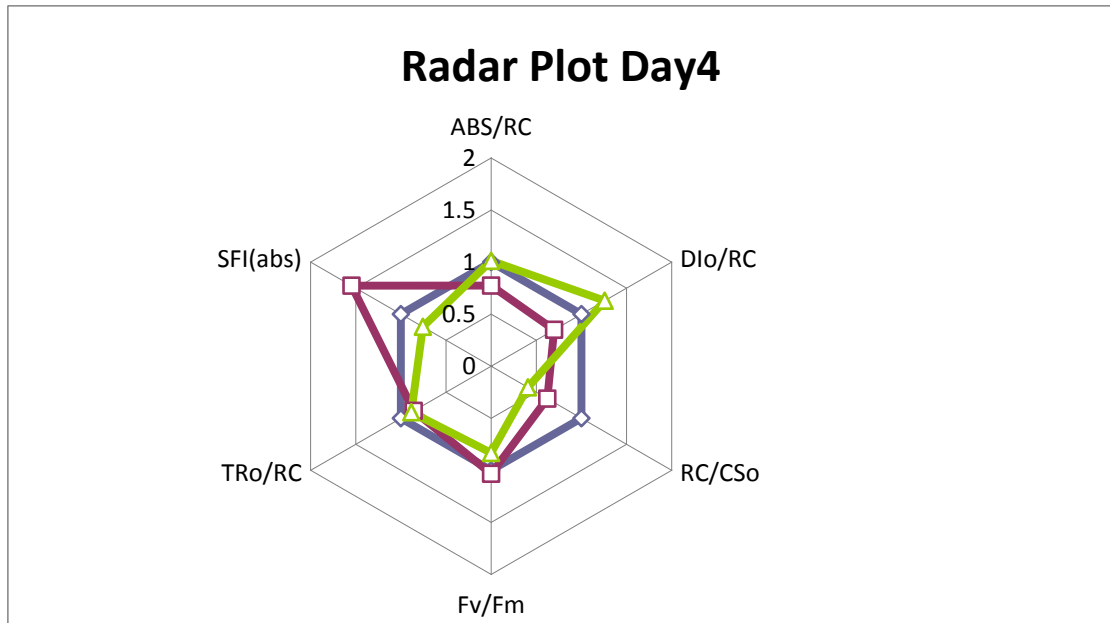


Εικόνα 24. Σύγκριση παραμέτρων ABS/RC, DIO/ RC, RC/CSO, TRo/RC και SFI(abs) του JIP-test και Fv/Fm για τους τρεις χειρισμούς σε συνθήκες φωτισμού L15 (-◇-)( 15μmol/sec m<sup>2</sup>), L150 (-□-)(150 μmol/sec m<sup>2</sup>), L1000 (-Δ-)(1000 μmol/sec m<sup>2</sup>) έπειτα από 2 ημέρα επώασης



Εικόνα 24. Σύγκριση παραμέτρων ABS/RC, DIO/ RC, RC/CSO, TRo/RC και SFI(abs) του JIP-test και Fv/Fm για τους τρεις χειρισμούς σε συνθήκες φωτισμού L15 (-◇-)( 15μmol/sec m<sup>2</sup>), L150 (-□-)(150 μmol/sec m<sup>2</sup>), L1000 (-Δ-)(1000 μmol/sec m<sup>2</sup>) έπειτα από 3 ημέρα επώασης



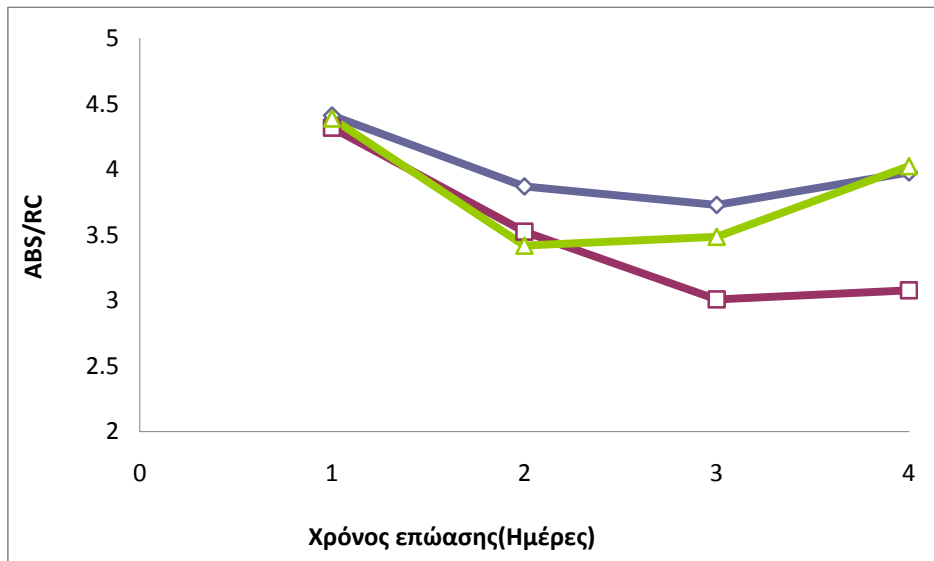


Εικόνα 25. Σύγκριση παραμέτρων ABS/RC, DIO/ RC, RC/CSO, TRo/RC και SFI(abs) του JIP-test και Fv/Fm για τους τρεις χειρισμούς σε συνθήκες φωτισμού L15 (◊)( 15μmol/sec m<sup>2</sup>), L150 (◻)(150 μmol/sec m<sup>2</sup>), L1000 (◻)(1000 μmol/sec m<sup>2</sup>) έπειτα από 4 ημέρα επώασης

Οι αλλαγές που προκαλούνται στη δομή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού λόγω της έκθεσης του σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού, αρχίζουν να εμφανίζονται από την πρώτη κιόλας μέρα επώασης των καλλιεργειών και γίνονται όλο και πιο έντονες με την πάροδο του χρόνου. Αρχικά όλες οι παράμετροι είναι ίδιες και στους τρεις χειρισμούς εκτός από το δείκτη λειτουργικότητας και την πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης τα οποία μειώνονται τόσο στο L150 όσο και στο L1000. Από την τρίτη ημέρα όμως ο L150 χειρισμός αρχίζει να παρουσιάζει καλύτερη προσαρμογή από τους άλλους δύο χειρισμούς με αύξηση του δείκτη λειτουργικότητας και μείωση του μεγέθους της κεραίας. Αντίθετα ο L1000 χειρισμός παρουσιάζει μείωση του δείκτη λειτουργικότητας, αύξηση της διαχεόμενης ενέργειας και μείωση των ενεργών κέντρων αντίδρασης γεγονός που υποδηλώνει φαινόμενα φωτοαναστολής λόγω της υψηλής προσπίπτουσας ακτινοβολίας .

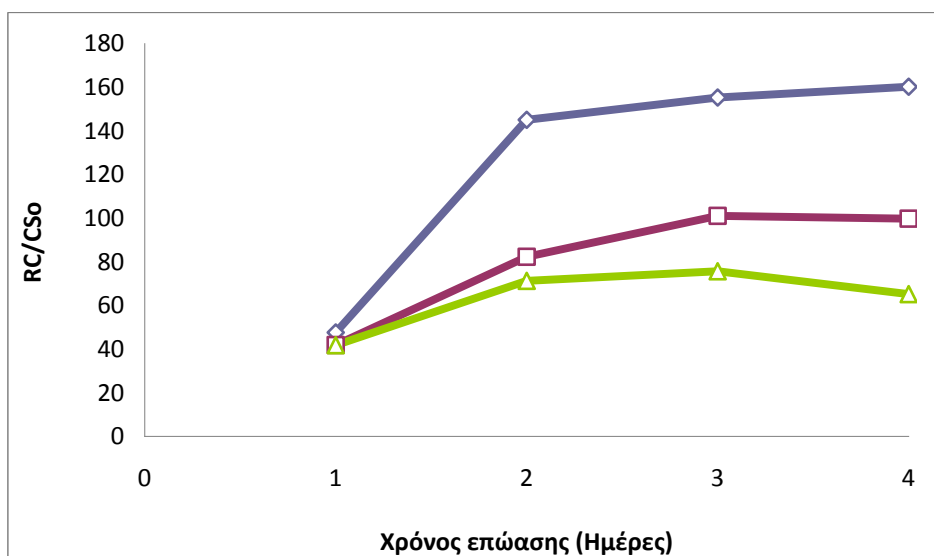
Οι μακροπρόθεσμες προσαρμογές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, οι οποίες περιλαμβάνουν κυρίως ισοζύγιο μεταξύ βιοσύνθεσης και αποδόμησης πρωτεϊνών και χρωστικών (Dau, 1994), ολοκληρώνονται σε μερικά λεπτά, ώρες ή ακόμα και ημέρες γι αυτό και οι αλλαγές στη λειτουργία και την απόδοση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στους τρεις εξεταζόμενους χειρισμούς γίνονται εντονότερες με την πάροδο του χρόνου. Παρόλη όμως την αποτελεσματικότητα των προσαρμοστικών αυτών μηχανισμών όλοι οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί έχουν ένα συγκεκριμένο εύρος στο οποίο είναι δυνατή η φωτοπροσαρμογή τους. Πέρα από το συγκεκριμένο αυτό εύρος ενεργοποιείται η διαδικασία της φωτοαναστολής (Park et al., 1997). Αυτό εξηγεί την μειωμένη αποδοτικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στο L1000 χειρισμό.

Παρακάτω απεικονίζονται διαγραμματικά οι αλλαγές των επιμέρους παραμέτρων ABS/RC, RC/CS<sub>0</sub>, DI<sub>0</sub>/RC, TR<sub>0</sub>/RC και SFI(abs) του JIP- test για κάθε παράμετρο ξεχωριστά:



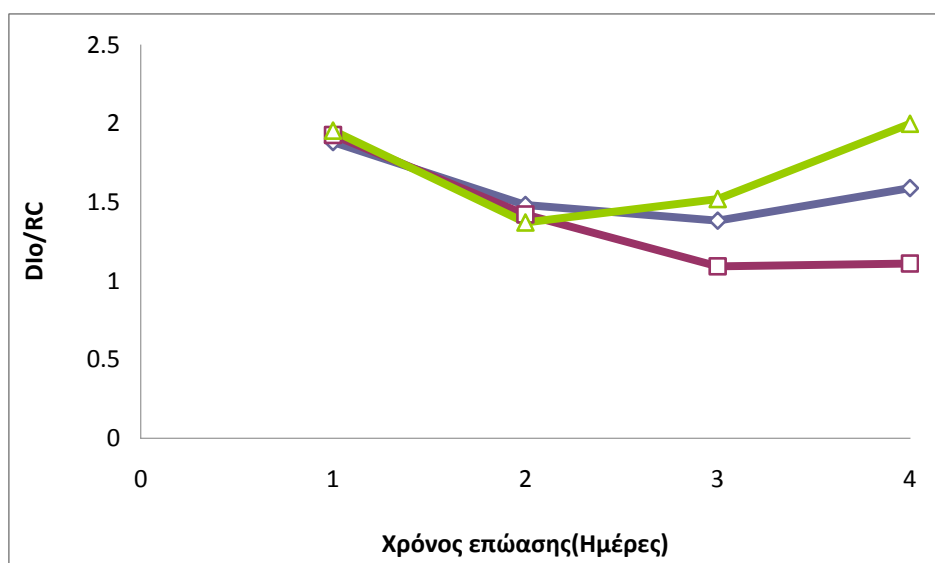
Εικόνα 26. Απορρόφηση ενέργειας ανά κέντρο αντίδρασης (ABS/RC) για τους τρεις χειρισμούς σε συνθήκες φωτισμού L15( 15μE), L150 (150 μE) και L1000(1000 μE) έπειτα από 4 ημέρες επώασης.

Έως την δεύτερη ημέρα επώασης φαίνεται ξεκάθαρα ότι η φωτοσυλλεκτική κεραία είναι μεγαλύτερη στο L15 χειρισμό, και ακολουθεί οι L150 και στη συνέχεια ο L1000 χειρισμός. Σε αυτό το σημείο φαίνεται να υπάρχει φωτοπροσαρμογή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού ανάλογη με την αναμενόμενη στις εν λόγω εντάσεις φωτισμού. Παρατεταμένη έκθεση στους εν λόγω φωτισμούς δείχνει διεύρυνση της φωτοπροσαρμοστικής ικανότητας των L15 και L150 καλλιεργειών, αλλά ο L1000 χειρισμός φαίνεται να καταπονείται και να αυξάνει σταδιακά την κεραία του, γεγονός που παρατηρούμε σε όλες τις μορφές αβιοτικής καταπόνησης (Walters, 2005), αλλά και φωτοαναστολής (Szabó, 2005).



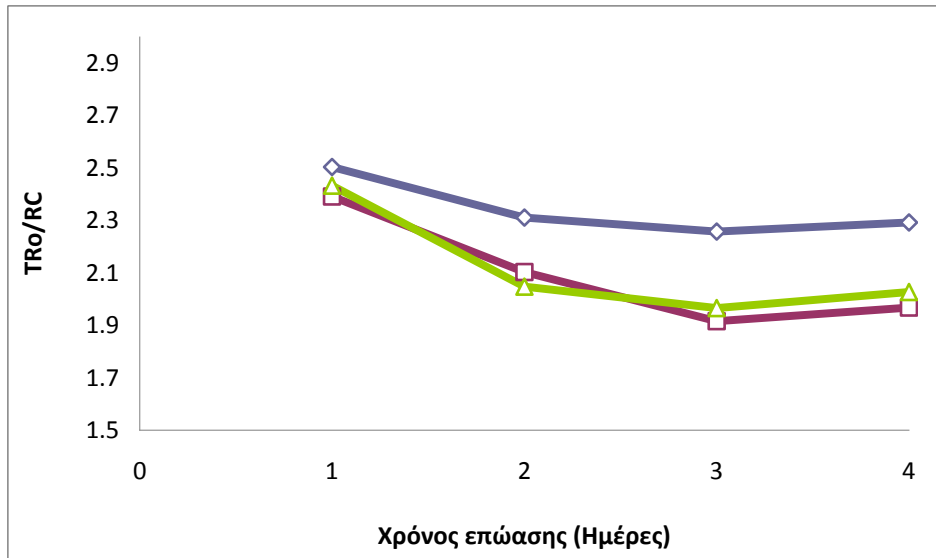
Εικόνα 27. Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης (RC/CSo) για τους τρεις χειρισμούς σε συνθήκες φωτισμού L15( 15μE), L150 (150 μE) και L1000(1000 μE) έπειτα από 4 ημέρες επώασης.

Παρόλο που σε γενικές γραμμές όλοι οι παράγοντες δείχνουν τον L150 χειρισμό ως καλύτερα προσαρμοσμένο με μεγαλύτερη απόδοση του φωτοσυνθετικού του μηχανισμού η πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης ανά μονάδα επιφάνειας είναι μεγαλύτερη στο L15 χειρισμό. Αντίθετα η πυκνότητα των ενεργών κέντρων στην L1000 καλλιέργεια, λόγω της καταπόνησης που επιδέχεται από την αυξημένη πίεση διέγερσης των κέντρων αντίδρασης, μειώνεται σοβαρά (Εικόνα 27).



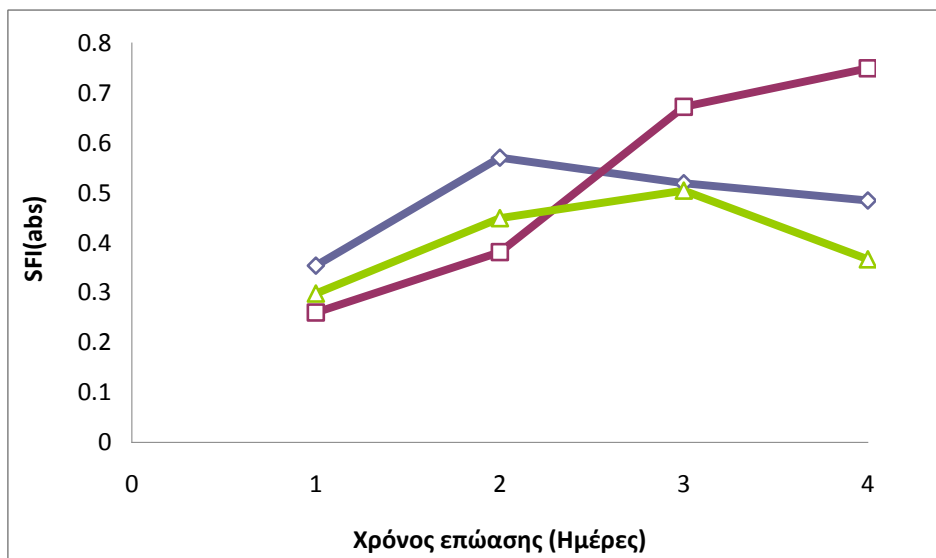
Εικόνα 28. Διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης (DIO/RC) για τους τρεις χειρισμούς σε συνθήκες φωτισμού L15( 15μE), L150 (150 μE) και L1000(1000 μE) έπειτα από 4 ημέρες επώασης.

Η ανάγκη για φωτοπροστασία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού οδηγεί την L1000 καλλιέργεια σε υψηλά επίπεδα διάχυσης ενέργειας ως φθορισμό και θερμότητα (Εικόνα 28).



Εικόνα 29. Ενέργεια που παγιδεύεται ανά κέντρο αντίδρασης (TRo/RC) για τους τρεις χειρισμούς σε συνθήκες φωτισμού L15( 15μE), L150 (150 μE) και L1000(1000 μE) έπειτα από 4 ημέρες επώασης.

Η ενέργεια που παγιδεύεται ανά κέντρο αντίδρασης κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα και για τους τρεις χειρισμούς με τον L15 να υπερτερεί ελάχιστα έναντι των άλλων χειρισμών.

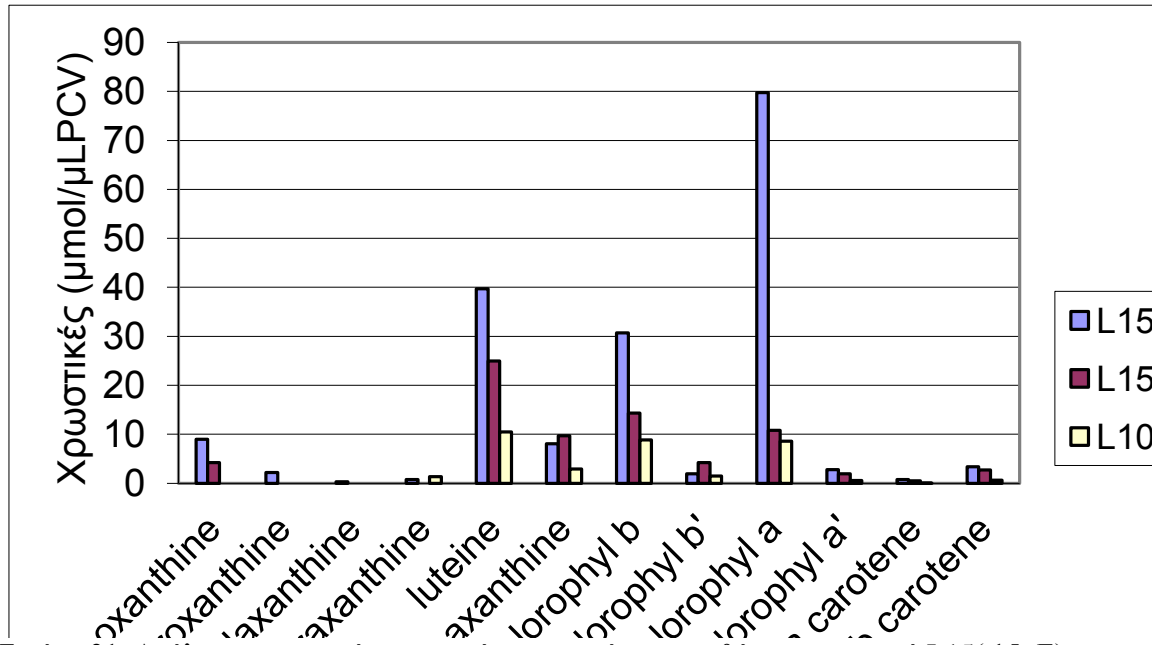


Εικόνα 30. Δείκτης λειτουργικότητας φωτοσυνθετικού μηχανισμού (SFI(abs)) για τους τρεις χειρισμούς σε συνθήκες φωτισμού L15( 15μE), L150 (150 μE) και L1000(1000 μE) έπειτα από 4 ημέρες επώασης

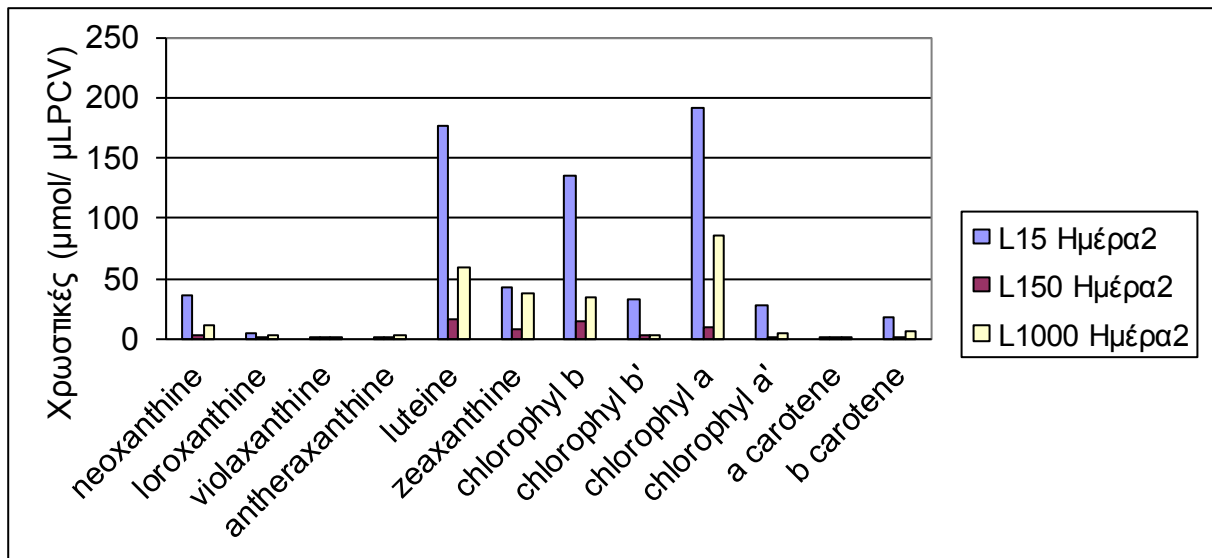
Ο δείκτης λειτουργικότητας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού αυξάνεται σταδιακά στο L15 χειρισμό, ακολουθεί ο L150 χειρισμός όπου μειώνεται σταθερά κάθε μέρα και

ο L1000, ο οποίος ενώ μέχρι και την τρίτη μέρα παρουσιάζει αύξηση στο SFI έχει μια απότομη πτώση την 4<sup>η</sup> μέρα, λόγω της φωτοαναστολής που επιδέχεται.

### 3.3 Ποσοτική και ποιοτική ανάλυση χρωστικών

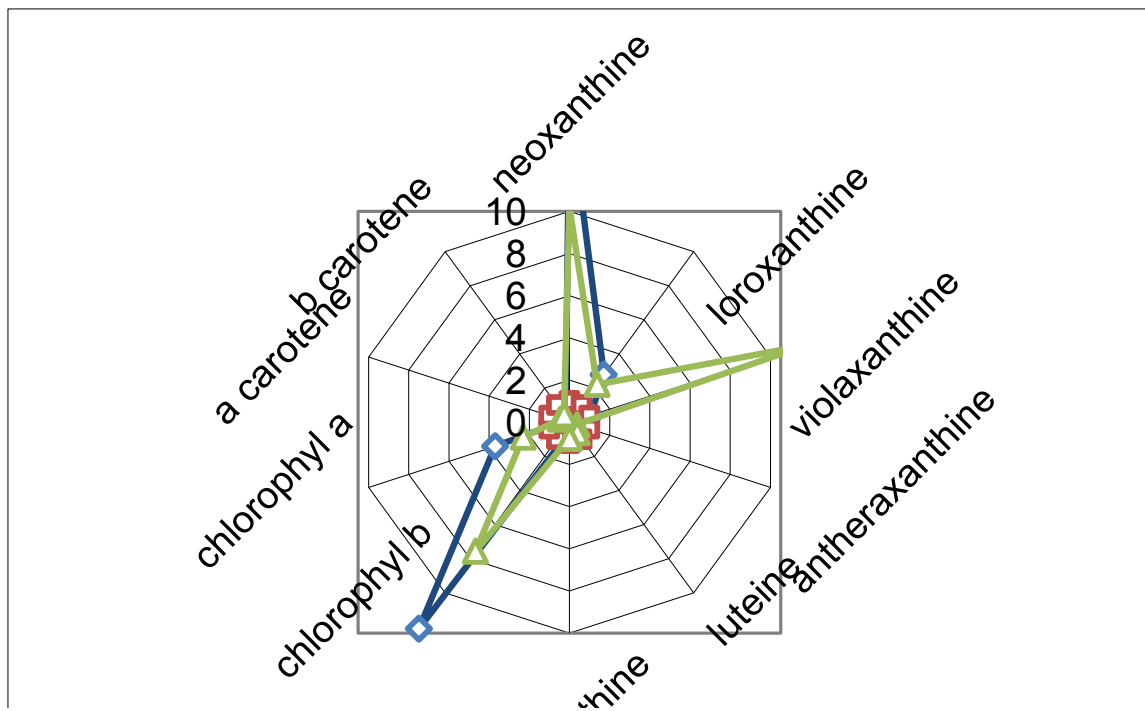


Εικόνα 31. Ανάλυση χρωστικών των τριών χειρισμών σε συνθήκες φωτισμού L15( 15μE), L150 (150 μE), L1000(1000 μE) έπειτα από 1 ημέρα επώασης.



Εικόνα 32. Ανάλυση χρωστικών των τριών χειρισμών σε συνθήκες φωτισμού L15( 15μE), L150 (150 μE), L1000(1000 μE) έπειτα από 2 ημέρες επώασης.





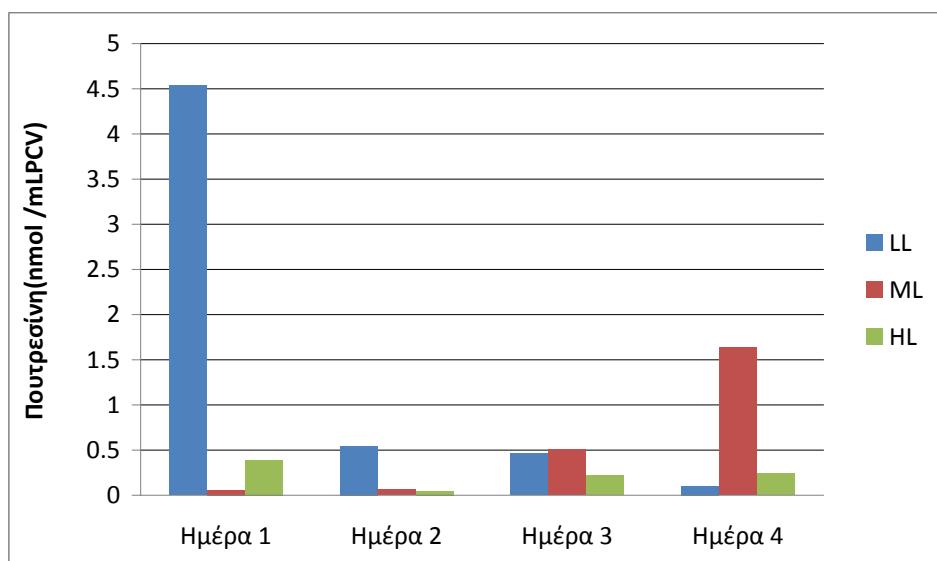
Εικόνα 35. Ανάλυση χρωστικών των τριών χειρισμών σε συνθήκες φωτισμού L15( 15μE), L150 (150 μE) και L1000(1000 μE) έπειτα από 4 ημέρες επώασης. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται η L150 καλλιέργεια.

Για μία πιο εμπειρισματομένη παρουσίαση των διαφοροποιήσεων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού κατά την έκθεση των καλλιεργειών σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού, εκχυλίστηκαν από όλους τους χειρισμούς οι χρωστικές και η ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση τους έγινε μετά από HPLC ανάλυση των εκχυλισμάτων. Τις πρώτες τρεις ημέρες επώασης το μοτίβο των χρωστικών των καλλιεργειών παραμένει σχεδόν αναλλοίωτο με μόνη διαφορά πως αυξάνονται όλες οι τιμές, χωρίς όμως να διαταράσσεται το προφίλ των χρωστικών. Συγκεκριμένα οι L15 και L1000 χειρισμοί εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα λουτεΐνης, ζεαξανθίνης και β-καροτένιου σε σχέση με το L150 χειρισμό. Τα συγκεκριμένα καροτενοειδή συμμετέχουν στη μη φωτοχημική απόσβεση της ενέργειας που συλλέγεται και είναι αντιπροσωπευτικά της απόκρισης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε στρες και σε υψηλής έντασης φωτισμό. Την 3<sup>η</sup> μέρα το πιο πυκνό σε χρωστικές δείγμα φαίνεται να είναι το L15, γεγονός που ίσως οφείλεται στη μεγάλη μεγέθους φωτοσυλλεκτική κεραία LHCP η οποία δεσμεύει και το μεγαλύτερο ποσοστό χρωστικών μορίων. Η αύξηση αυτή στις χρωστικές και ιδιαίτερα στις γλωροφύλλες, ίσως εξηγεί γιατί τα ενεργά κέντρα του L15 χειρισμού είναι περισσότερα από αυτά του L150 χειρισμού.

Την 4<sup>η</sup> μέρα των προφίλ των χρωστικών οι σχετικές αναλογίες διαφοροποιούνται. Η λουτεΐνη, η ζεαξανθίνη και το β-καροτένιο αυξάνονται στο L150 και στο L1000 ενώ μειώνονται στο L15.

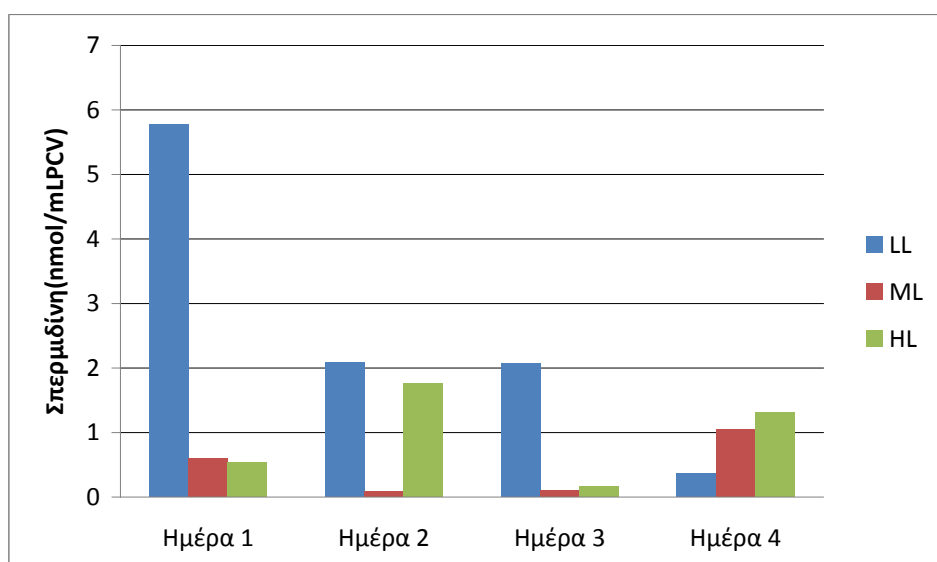
Αυτές οι μετρήσεις πιθανόν να εμπριέχουν λάθη λόγω της μη απόλυτης εκχύλισης των χρωστικών και ως εκ τούτου εκλαμβάνουμε τα εν λόγω αποτελέσματα μόνο συγκριτικά μεταξύ των επιμέρους χειρισμών, χωρίς να επικεντρωθούμε σε σχετικές αναλύσεις όπως της σχέσης Chla/Chlb, διότι θα καταλήγαμε πιθανόν σε λανθασμένα αποτελέσματα.

### 3.4. Ποσοτική και ποιοτική ανάλυση πολυαμινών



Εικόνα 36. Μεταβολή της πουτρεσίνης (Put) των τριών χειρισμών σε συνθήκες φωτισμού L15( 15 $\mu$ E), L150 (150  $\mu$ E), L1000(1000  $\mu$ E) έπειτα από 4 ημέρες επώασης.

Η ποσότητα της πουτρεσίνης στο L15 χειρισμό μειώνεται δραματικά την 2<sup>η</sup> μέρα και συνεχίζει να μειώνεται σταδιακά την 3<sup>η</sup> και 4<sup>η</sup> μέρα, στο L15 αυξάνεται σταδιακά έως και την 4<sup>η</sup> μέρα ενώ στο L1000 χειρισμό παραμένει σχετικά σταθερή σε χαμηλά επίπεδα. Η πουτρεσίνη έχει συνδεθεί με προσαρμογές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε υψηλής έντασης φωτισμό.

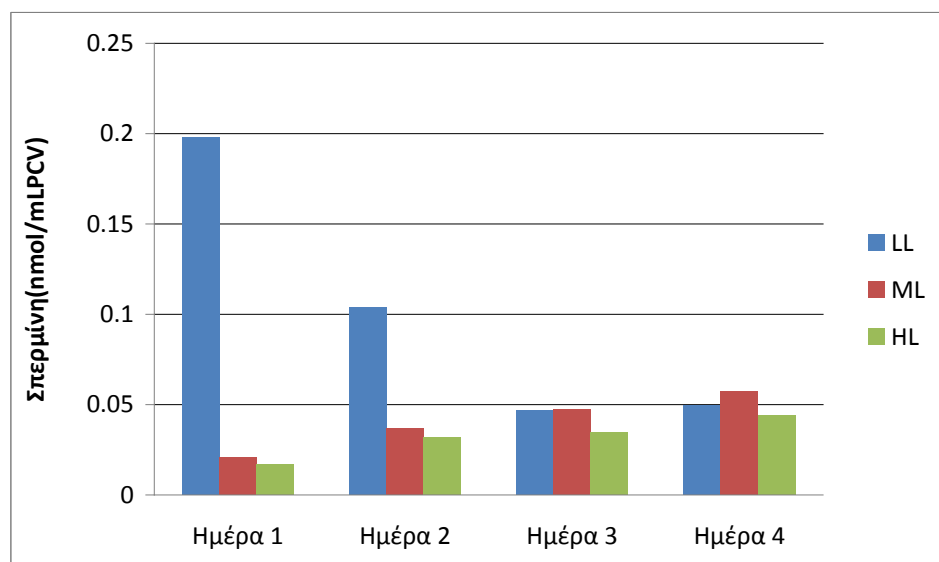


Εικόνα 37. Μεταβολή της σπερμιδίνης (Spd) των τριών χειρισμών σε συνθήκες φωτισμού L15( 15 $\mu$ E), L150 (150  $\mu$ E), L1000(1000  $\mu$ E) έπειτα από 4 ημέρες επώασης.

Τα επίπεδα σπερμιδίνης στο LL μειώνονται από την 1<sup>η</sup> στη 2<sup>η</sup> μέρα, παραμένουν σταθερά μεταξύ 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> μέρας και μειώνονται περαιτέρω στην 4<sup>η</sup> μέρα. Στο L150 μειώνονται μέχρι και την 3<sup>η</sup> μέρα και αυξάνονται την 4<sup>η</sup> μέρα. Στο L1000 η Spd αυξάνεται την 2<sup>η</sup> μέρα, μειώνεται την 3<sup>η</sup> και αυξάνεται ξανά την 4<sup>η</sup> μέρα. Τόσο η

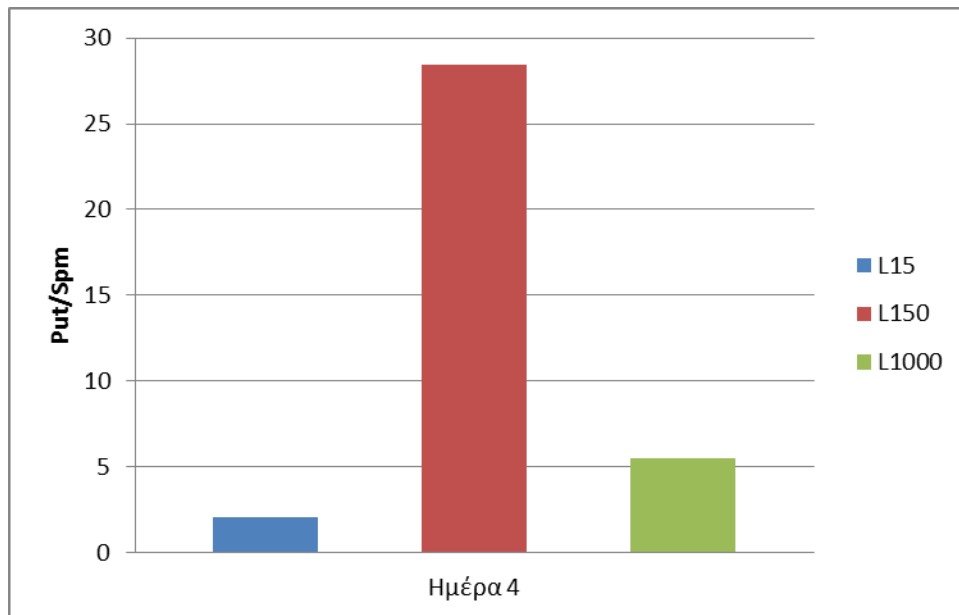


σπερμιδίνη όσο και η σπερμίνη συνδέονται με την αύξηση της μη φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας. Η NPQ ενεργοποιείται σε συνθήκες έντονης φωτονιακής ροής οπότε η αύξηση της Spd στο L15 είναι αναμενόμενη, ενώ η αύξηση της στο L150 υποδηλώνει πως τα κύτταρα παρουσιάζουν παρόμοιες προσαρμογές με αυτές σε υψηλής έντασης φωτισμό. Από την άλλη σε L15 συνθήκες η απόδοση της φωτοχημικής απόσβεσης αυξάνεται και η NPQ μειώνεται οπότε η μείωση της Spd είναι αναμενόμενη.



Εικόνα 38. Μεταβολή της σπερμίνης (Spm) των τριών χειρισμών σε συνθήκες φωτισμού L15( 15μE), L150 (150 μE), L1000(1000 μE) έπειτα από 4 ημέρες επώασης.

Η ποσότητα σπερμίνης στο L15 χειρισμό μειώνεται σταδιακά με το πέρας του χρόνου ενώ αντίθετα στους L15 και L1000 αυξάνεται ελάχιστα με την πάροδο του χρόνου. Η Spm εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα του PSII αυτό όμως που μας δίνει πληροφορία για το είδος της φωτοπροσαρμογής του φωτοσυνθετικού μηχανισμού είναι ο λόγος Put/Spm. Η μείωση του λόγου Put/Spm συνδέεται με την καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και την αύξηση του μεγέθους της κεραίας LHCI (πολυμερισμός LHCI). Αντίθετα αύξηση του λόγου Put/Spm συνδέεται με την φωτοπροσαρμογή σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού( αποπολυμερισμός LHCI). Γενικά οι δύο αυτές πολυαμίνες φαίνεται να παίζουν ρυθμιστικό ρόλο του LHCI τροποποιώντας κατ' επέκταση ολόκληρο το φωτοσυνθετικό μηχανισμό.



Εικόνα 39. Μεταβολή του λόγου πουτρεσίνης/σπερμίνης (Put/Spm) των τριών χειρισμών σε συνθήκες φωτισμού L15( 15μE), L150 (150 μE), L1000(1000 μE) έπειτα από 4 ημέρες επώασης.

Ο λόγος Put/Spm όπως αυτός μετρήθηκε μετά από επώαση 4 ημερών σε όλους τους χειρισμούς, δείχνει ξεκάθαρα ότι η L150 καλλιέργεια είναι ουσιαστικά φωτοπροσαρμοσμένη σε υψηλής έντασης ακτινοβολία (υψηλή τιμή Put/Spm) σε σχέση με την L15 καλλιέργεια (χαμηλή τιμή Put/Spm). Η L1000 καλλιέργεια παρουσιάζει χαμηλή τιμή Put/Spm, παρόμοια με αυτή του L15 χειρισμού. Αυτό επιβεβαιώνει και τα παραπάνω αποτελέσματα (Εικόνα 38), ότι η εν λόγω καλλιέργεια βρίσκεται σε συνθήκες φωτοαναστολής και ως εκ τούτου ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός της προσομοιάζει αυτόν της L15 καλλιέργειας.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όλα τα πειραματικά δεδομένα αυτής της εργασίας μπορούν να συνοψιστούν στα παρακάτω συμπεράσματα:

1. Ο ρυθμός ανάπτυξης του χλωροφύκου *Chlorella minutissima* εξαρτάται από το φωτονιακό του περιβάλλον. Η έκθεση των καλλιεργειών σε φωτισμό 150μE φαίνεται να έχει τα καλύτερα αποτελέσματα.
2. Ανάλυση της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (JIP-test & πολαρογραφικές μετρήσεις) καλλιεργειών που αναπτύχθηκαν σε 15, 150 και 1000μE φωτισμό, έδειξαν ότι η καλλιέργεια των 150μE είναι φωτοπροσαρμοσμένη (χωρίς σοβαρές ενδείξεις φωτοαναστολής) σε υψηλής έντασης ακτινοβολία [μειωμένο μέγεθος λειτουργικής

φωτοσυλλεκτικής κεραίας, μειωμένη μη φωτοχημική απόσβεση της ενέργειας, αυξημένη μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα] σε σχέση με την αντίστοιχη των 15μE που είναι φωτοπροσαρμοσμένη σε χαμηλής έντασης ακτινοβολία.

3. Η καλλιέργεια των 1000μE βρίσκεται σε καταπόνηση (φωτοαναστολή) και για να ενεργοποιήσει τους προστατευτικούς μηχανισμούς της μη φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας στην πορεία του χρόνου επώασης αυξάνει σημαντικά την λειτουργική φωτοσυλλεκτική κεραία προσομοιάζοντας τα χαρακτηριστικά της καλλιέργειας στη χαμηλή ένταση φωτισμού.
4. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από τις HPLC αναλύσεις των χρωστικών, αλλά ιδιαίτερα των πολυαμινών, όπου η εκτεθειμένη στα 150μE καλλιέργεια, σε σχέση με την αντίστοιχη στα 15μE, παρουσιάζει μία υψηλή σχέση Put/Spm υποδηλώνοντας φωτοπροσαρμογή (χωρίς φωτοαναστολή) σε υψηλής έντασης ακτινοβολία που οδηγεί σε υψηλή φωτοσυνθετική δραστηριότητα και υψηλό ρυθμό ανάπτυξης. Η καλλιέργεια των 1000μE παρουσιάζει και εδώ χαμηλή τιμή Put/Spm και επιβεβαιώνει το ότι η εν λόγω καλλιέργεια βρίσκεται σε φωτοαναστολή.
5. Όλα τα παραπάνω αναδεικνύουν την ένταση των 150μE (ίσως και χαμηλότερη) την πιο κατάλληλη ένταση ακτινοβολίας για την καλλιέργεια του χλωροφύκου *Chlorella minutissima*.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aleya L, Dauta A, Reynolds CS. (2011) Endogenous regulation of the growth-rate responses of a spring-dwelling strain of the freshwater alga, *Chlorella minutissima*, to light and temperature. *Eur J Protistol.* 2011 Nov;47(4):239-44. Epub 2011 Jun 21
2. Ashish Bhatnagar , Monica Bhatnagar , Senthil Chinnasamy and K. C. Das (2010) *Chlorella minutissima* - A Promising Fuel Alga for Cultivation in Municipal Wastewaters. *Appl Biochem Biotechnol* (2010) 161:523–536 DOI 10.1007/s12010-009-8771-0.

3. Atsuko Kanazawa and David M. Kramer(2002) In vivo modulation of nonphotochemical exciton quenching (NPQ) by regulation of the chloroplast ATP synthase. PNAS vol. 99: 12789–12794
4. BAGNI, N., STABELLINI, G. and FRACASSINI, D. S. (1973), Polyamines Bound to tRNA and rRNA of Eukaryotic Plant Organisms. *Physiologia Plantarum*, 29: 218–222. doi: 10.1111/j.1399-3054.1973.tb03096
5. Beale SI, Appleman D. (1971) Chlorophyll synthesis in chlorella: regulation by degree of light limitation of growth.
6. Björkman O, Pearcy RW, Harrison AT, Mooney H (1972) Photosynthetic adaptation to high temperatures: a field study in death valley, california. *Science* (New York, N.Y.) 175(4023):786-789.
7. Bjorkman, O. (1981) Ecological adaptation of the photosynthetic apparatus. *Photosynthesis VI*, pp. 191-202
8. Bruno J Strasser (1997) Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients. *PHOTOSYNTHESIS RESEARCH* Volume 52, Number 2 (1997), 147-155, DOI: 10.1023/A:1005896029778
9. Cohen SS. (1998) *A Guide to the Polyamines*. Oxford University Press. New York, NY, 1998.
10. Daniel A. Sims and Robert W. Pearcy (1991) Photosynthesis and respiration in *Alocasia macrorrhiza* following transfers to high and low light. *OECOLOGIA* Volume 86, Number 3, 447-453, DOI: 10.1007/BF00317615.
11. Demetriou G., C. Neonaki, E. Navakoudis and K. Kotzabasis (2007). Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus – The protective role of polyamines. *Biochim. Biophys. Acta (BIOENERGETICS)* 1767: 272-280.
12. Donald R. Ort, Charles F. Yocum (1996 ) *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, Vol. 4.
13. Galston AW and Kaur-Sawhney R.(1995) Polyamines as endogenous growth regulators. In: *Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (2nd edn). Davies PJ (Ed). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 158-178, 1995.
14. Govindjee (2002) A Role for a Light-Harvesting Antenna Complex of Photosystem II in Photoprotection. *Plant Cell*. 2002 14(8): 1663–1668
15. Govindjee, Papageorgiou, G. & Rabinowitch, E. (1967). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. — In *Fluorescence, Theory, Instrumentation and Practice* (George G. Guilbault, ed.), pp.511-564. Dekker, Inc., New York.

16. H. Tamiya, T. Iwamura, K. Shibata, E. Hase, T. Nihei (1953) Correlation between photosynthesis and light-independent metabolism in the growth of *Chlorella*. Volume 12, Issues 1–2, October 1953, Pages 23–40.
17. Horst Senger and Ph. Fleischhacker (1978) Adaptation of the Photosynthetic apparatus of *Scenedesmus obliquus* to Strong and Weak Light Conditions. *Physiol. Plant.* 43: 35-42. 1978
18. Ioannidis E.N. and K. Kotzabasis (2007). The effects of the polyamines on the functionality of the photosynthetic membrane in vivo and in vitro. *Biochim. Biophys. Acta (BIOENERGETICS)* 1767: 1372-1382.
19. Ioannidis N.E., L. Sfichi and K. Kotzabasis (2006). Putrescine stimulates chemiosmotic ATP synthesis. *Biochim. Biophys. Acta (BIOENERGETICS)* 1757: 821-828.
20. Ioannidis N.E., L. Sfichi-Duke and K. Kotzabasis (2011) Polyamines stimulate non-photochemical quenching of chlorophyll a fluorescence in *Scenedesmus obliquus*. *Photosynth. Res.* 107 : 169-175.
21. Irene Baroli, An D. Do, Tomoko Yamane and Krishna K. Niyogi (2003) Zeaxanthin Accumulation in the Absence of a Functional Xanthophyll Cycle Protects *Chlamydomonas reinhardtii* from Photooxidative Stress. *The Plant Cell* April 2003 vol. 15 no. 4 992-1008.
22. Jansson S. (1999) A guide to the Lhc genes and their relatives in *Arabidopsis*/IT. *Trends Plant Sci.* 4(6):236-240.
23. Jeffrey R. Seemann (1989) Light Adaptation/Acclimation of Photosynthesis and the regulation of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase activity in Sun and Shade Plants. *Plant Physiol.* (1989) 91, 379-386
24. JinShui Yang , Ehsan Rasa , Prapakorn Tantayotai , Kate M. Scow , HongLi Yuan , Krassimira R. Hristova (2011) Mathematical model of *Chlorella minutissima* UTEX2341 growth and lipid production under photoheterotrophic fermentation conditions. *Bioresource Technology* 102 (2011) 3077–3082.
25. John F. Allen and Jens Forsberg (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. *TRENDS in Plant Science* Vol.6 No.7
26. Jörg Standfuss, Anke C Terwisscha van Scheltinga, Matteo Lamborghini, and Werner Kühlbrandt (2005). Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *EMBO J.* 24(5): 919–928

27. K. E. Nelson (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* Volume 4, Issue 12, pages 799–808.
28. K. Humbeck, B. Hoffmann and H. Senger (1988) Influence of energy flux and quality of light on the molecular organization of the photosynthetic apparatus in *Scenedesmus*. *PLANTA* Volume 173, Number 2 (1988), 205-212, DOI: 10.1007/BF00403012.
29. K. Humbeck, B. Hoffmann and H. Senger(1988) Influence of energy flux and quality of light on the molecular organization of the photosynthetic apparatus in *Scenedesmus*. *Planta* 173:205-212
30. Kotzabasis K, M.D. Christakis-Hampsas and K.A. Roubelakis-Angelakis (1993). A narrow bore HPLC method for the identification and quantitation of free, conjugated and bound polyamines. *Analytical Biochemistry* 214:484-489.
31. Kotzabasis K. (1996). A role for chloroplast-associated polyamines? *Bot. Acta* 109:5-7.
32. Kotzabasis K. and H. Senger (1994). Free, conjugated and bound polyamines during the cell cycle in photosynchronized cultures of *Scenedesmus obliquus* *Z. Naturforsch.* 49c:181-185.
33. Kotzabasis K., B. Strasser, E. Navakoudis, H. Senger and D. Dörnemann (1999). The regulatory role of polyamines on structure and functioning of the photosynthetic apparatus during photoadaptation. *J. Photochem. Photobiol.* B50: 45-52.
34. Kotzabasis, K. and D. Dörnemann (1998). Differential changes in the photosynthetic pigments and polyamine content during photoadaptation and photoinhibition in the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus*. *Z. Naturforsch.* 53c:833-840.
35. Logothetis K., S. Dakanali, N. Ioannidis and K. Kotzabasis (2004). The impact of high CO<sub>2</sub> concentrations on the structure and function of the photosynthetic apparatus and the role of polyamines. *J. Plant Physiol.* 161: 715-724.
36. Masojídek J, Torzillo G, Koblížek M, Kopecký J, Bernardini P, Sacchi A, Komenda J. (1999) Photoadaptation of two members of the Chlorophyta (*Scenedesmus* and *Chlorella*) in laboratory and outdoor cultures: changes in chlorophyll Fluorescence quenching and the xanthophyll cycle. *Planta.* 1999, 209(1):126-35.

37. Navakoudis E., C. Lütz, C. Langebartels, U. Lütz-Meindl and K. Kotzabasis (2003). Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines. *Biochim. Biophys. Acta (GENERAL SUBJECTS)* 1621: 160-169.
38. Navakoudis E., K. Vrentzou and K. Kotzabasis (2007). A polyamine- and LHCII protease activity-based mechanism regulates the plasticity and adaptation status of the photosynthetic apparatus. *Biochim. Biophys. Acta (BIOENERGETICS)* 1767: 261-271.
39. Patricia Müller, Xiao-Ping Li and Krishna K. Niyogi (2001) Non-Photochemical Quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology* vol. 125 no. 4 1558-1566.
40. Pirintsos S., S. Munzi, S. Loppi and K. Kotzabasis (2009). Do polyamines alter the sensitivity of lichens to nitrogen stress? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72 (5): 1331-1336.
41. Pirintsos S.A., K. Kotzabasis and S. Loppi (2004). Polyamine production in lichens under metal pollution stress. *J. Atmospheric Chemistry* 49: 303-315.
42. Ravindar Kaur-Sawhney, Antonio F. Tiburcio, Teresa Altabella, and Arthur W. Galston (2003) Polyamines in plants: An overview. *Journal of Cell and Molecular Biology* 2: 1-12, 2003.
43. Senger, H. and Bauer, B. (1987), THE INFLUENCE OF LIGHT QUALITY ON ADAPTATION AND FUNCTION OF THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS. *Photochemistry and Photobiology*, 45: 939–946. doi: 10.1111/j.1751-1097.1987.tb07905.
44. Sfakianaki M., L. Sfichi and K. Kotzabasis (2006) The involvement of LHCII-associated polyamines in the response of the photosynthetic apparatus to low temperature. *J. Photochem. Photobiol.* B84:181-188.
45. Sfichi L., N. Ioannidis and K. Kotzabasis (2004) Thylakoid-associated polyamines adjust the UVB-sensitivity of the photosynthetic apparatus by means of LHCII changes. *Photochem. Photobiol.* 80: 499-506.
46. Standfuss J., Terwisscha van Scheltinga AC, Lamborghini M. and Kühlbrandt W. (2005) Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *EMBO J.*4(5):919-28
47. Tabor CW, Tabor H. (1984) Polyamines. *Annu Rev Biochem.* 1984;53:749-90.