

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ
ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ**

ΘΕΟΧΑΡΗΣ ΝΑΖΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΑΝΩΤΑΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2018

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
LABORATORY OF BIOCHEMISTRY



DOCTORAL THESIS

**A STUDY OF THE BIODEGRADATION OF PHENOLIC
COMPOUNDS BY MICROORGANISMS**

THEOCHARIS NAZOS

THESIS SUPERVISOR: DEMETRIOS GHANOTAKIS

HERAKLION 2018

Η διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε με υποτροφία του ΙΚΥ η οποία χρηματοδοτήθηκε από την Πράξη «Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών για μεταπτυχιακές σπουδές δεύτερου κύκλου σπουδών» από πόρους του ΕΠ «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», 2014-2020 με τη συγχρηματοδότηση του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (Ε.Κ.Τ.) και του Ελληνικού Δημοσίου.



*Στην οικογένειά μου και στους ανθρώπους που με στήριξαν όλα αυτά
τα χρόνια.*

Εξεταστική Επιτροπή (αλφαβητικά)

Δημήτριος Γανωτάκης

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης (Επιβλέπων)

Χαράλαμπος Κατερινόπουλος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Κυριάκος Κοτζαμπάσης

Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Αναστάσιος Μελής

Καθηγητής Department of Plant and Microbial Biology UC Berkeley

Ιωάννης Παυλίδης

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Γεώργιος Τσιώτης

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Νικόλαος Χανιωτάκης

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης



ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΕΤΑΣΗ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή της Διδακτορικής Διατριβής του κ. Θεοχάρη Νάζου, η οποία ορίσθηκε στην από 04/06/2018 συνεδρία της Σ.Τ., συνεδρίασε σήμερα Δευτέρα 10 Σεπτεμβρίου 2018 να εξετάσει τη διατριβή του υποψήφιου με τίτλο:

«Μελέτη της βιοαποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων από μικροοργανισμούς»

Τα παρόντα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής εκφράζουν ομόφωνα την πλήρη ικανοποίησή τους για την υψηλή ποιότητα του περιεχομένου και της υποστήριξης της Διατριβής.

Τα Ερευνητικά αποτελέσματα της εργασίας του κ. Θεοχάρη Νάζου είναι σημαντικά, πρωτότυπα και διευρύνουν το πεδίο της έρευνας στον Τομέα Βιοχημείας.

Ως εκ τούτου η Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή προτείνει ομόφωνα την απονομή του Διδακτορικού Διπλώματος στον κύριο Θεοχάρη Νάζο.

Τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την Αξιολόγηση της Διδακτορικής Διατριβής του κυρίου Θεοχάρη Νάζου :

1. Γανωτάκης Δημήτριος (Επιβλέπων)
Καθηγητής
Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης 
2. Τσιώτης Γεώργιος
Καθηγητής
Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης 
3. Χανιωτάκης Νικόλαος
Καθηγητής
Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης 
4. Κατερινόπουλος Χαράλαμπος
Καθηγητής
Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης 
5. Κοτζαμπάσης Κυριάκος
Καθηγητής
Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης 
6. Μελής Αναστάσιος
Καθηγητής
Department of Plant and Microbial Biology UC Berkeley 
7. Παυλίδης Ιωάννης
Επίκουρος Καθηγητής
Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης 

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για του υψηλού επιπέδου σπουδές που μου προσέφερε σε προπτυχιακό αλλά και μεταπτυχιακό επίπεδο καθώς και για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε για να μπορέσω να φέρω εις πέρας την παρούσα Διδακτορική Διατριβή. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (I.K.Y.) για την υποτροφία που μου παρείχε, η οποία χρηματοδοτήθηκε από την Πράξη «Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών για μεταπτυχιακές σπουδές δεύτερου κύκλου σπουδών» από πόρους του ΕΠ «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», 2014-2020 με τη συγχρηματοδότηση του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (Ε.Κ.Τ.) και του Ελληνικού Δημοσίου.

Τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου θα ήθελα να αποδώσω στον επιβλέποντα Καθηγητή μου Δημήτριο Γανωτάκη ο οποίος μου επέτρεψε να εργαστώ στο εργαστήριο του, αρχικά για την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας και έπειτα με εμπιστεύτηκε με την ανάθεση της μεταπτυχιακής εργασίας αλλά και για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Η εμπειρία του στο πεδίο της φωτοσύνθεσης και η βοήθεια η οποία προσέφερε ήταν καθοριστική για την περάτωση της παρούσας διατριβής. Θέλω να τον ευχαριστήσω γιατί πέρα από επιστήμονας μου στάθηκε και ως άνθρωπος και ήταν ανά πάσα στιγμή διαθέσιμος να προσφέρει τη βοήθειά του. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω για τη συνολική εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια της συνεργασίας μας καθώς και για την ευκαιρία που μου προσέφερε να μιλήσω σε δύο διεθνή συνέδρια. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω γιατί οι συμβουλές του σε κομβικά σημεία της παρούσας διατριβής ήταν καθοριστικές. Όσα λόγια και αν γράψει κάποιος είναι λίγα και δεν μπορούν να περιγράψουν την έκταση της βοήθειας και της στήριξης αυτά τα χρόνια.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής μου Επιτροπής, Καθηγητές Γεώργιο Τσιώτη και Νικόλαο Χανιωτάκη, για την παρακολούθηση της προόδου μου αυτά τα χρόνια. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Γεώργιο Τσιώτη γιατί οι συμβουλές του κατά την έναρξη και διάρκεια της διατριβής ήταν επικουρικές και σημαντικές από την εμπειρία του στο πεδίο της βιοαποικοδόμησης. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Νικόλαο Χανιωτάκη που μου επέτρεψε να εργαστώ στο όργανο υγρής χρωματογραφίας του εργαστηρίου του. Ευχαριστώ επίσης τα άλλα μέλη της Επταμελούς μου Επιτροπής, Καθηγητή Χαράλαμπο Κατερινόπουλο, Καθηγητή Κυριάκο

Κοτζαμπάση και Επίκουρο Καθηγητή Ιωάννη Παυλίδη οι οποίοι δέχτηκαν να διαβάσουν και να κρίνουν την παρούσα διατριβή και με τις παρατηρήσεις τους αλλά και τις διορθώσεις που πρότειναν βοήθησαν σε σημαντικό βαθμό στη διαμόρφωση του τελικού κειμένου. Ιδιαίτερη μνεία θα ήθελα να κάνω στον Καθηγητή Αναστάσιο Μελή ο οποίος δέχτηκε να κρίνει την παρούσα εργασία και κατά τις επισκέψεις του στην Κρήτη με ευχαρίστηση και ενδιαφέρον συζήτησε και παρείχε σημαντικές συμβουλές πάνω σε τεχνικά κομμάτια της παρούσας διατριβής. Επίσης καθοριστική είναι η βοήθεια που μας παρείχε όσο αφορά το χαρακτηρισμό του μικροοργανισμού από τον ποταμό Γιόφυρο.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στα μέλη του εργαστηρίου που περάσαμε μαζί πολλές ώρες και εργαστήκαμε συνολικά ως μία ενωμένη ομάδα. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Υποψήφια Διδάκτωρ Ελευθερία Βαλσαμή για την άψογη συνεργασία, την ανταλλαγή απόψεων και την αλληλοβοήθεια σε πειραματικά κομμάτια όλα αυτά τα χρόνια. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Δημήτριο Στεφανάκη ο οποίος παρείχε μεγάλη βοήθεια και πολύτιμες συμβουλές και βοήθησε από την αρχή στην προσαρμογή μου στο εργαστήριο. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη με τα οποία είχα την ευχαρίστηση να συνεργαστώ αυτά τα χρόνια και προσέφεραν πολύτιμη βοήθεια, Μάνο Κοκαράκη, Τένια Παπαβασιλείου, Ελένη Πολωνιατάκη, Ναπολέον Στρατηγάκη, Άλκιστη Σκλαβούνου και Γιώργο Ροντογιάννη με τους οποίους ανταλλάξαμε ιδέες όσο αφορά τα επιστημονικά πεδία στα οποία εργαστήκαμε μαζί. Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον υποψήφιο διδάκτωρ Γιώργο Σφενδουράκη και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Δώρα Σταυρινού για τη συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου του κυρίου Τσιώτη και κυρίου Παυλίδη για τη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που διαμορφώσαμε όλοι μαζί αυτά τα χρόνια στον τομέα.

Ιδιαίτερη ευχαριστία θα ήθελα να αποδώσω στα μέλη του εργαστηρίου του κυρίου Χανιωτάκη, Μαρία Φουσκάκη, Γιώργο Ρούσσο και Μαρία Μπελενιώτη για τη βοήθεια τους με την εκμάθηση του συστήματος υγρής χρωματογραφίας και τη βοήθεια που μου παρείχαν σε τεχνικά κομμάτια. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Σπύρο Περγαντή για την πολύτιμη βοήθεια του και τον προσωπικό χρόνο που αφιέρωσε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων φασματομετρίας μάζας καθώς και το μεταπτυχιακό φοιτητή του εργαστηρίου του Λεωνίδα Μαυρουδάκη για το χρόνο για την πολύτιμη βοήθειά στη συλλογή των δεδομένων και επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου μικροσκοπίας Στέφανο Παπαδάκη και Σεβαστή Παπαδογιωργάκη για την

υπομονή τους και τη διάθεσή τους στην εκμάθηση της τεχνικής προετοιμασίας δειγμάτων καθώς και για τη λήψη φωτογραφιών με ηλεκτρονική μικροσκοπία. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου στο Ηράκλειο και στη Σκιάθο που με στήριξαν όλα αυτά τα χρόνια τόσο στις εύκολες όσο και στις δύσκολες στιγμές.

Ιδιαίτερη ευχαριστία οφείλω στους γονείς μου Χρυσούλα και Θεόφιλο καθώς και στον αδερφό μου Ευάγγελο. Θα ήθελα να τους ευχαριστήσω για τη στήριξη όλα αυτά τα χρόνια. Από την πρώτη στιγμή στάθηκαν δίπλα μου και με βοήθησαν έμπρακτα να κυνηγήσω και να πραγματοποιήσω τα όνειρά μου καθώς και να πετύχω τους στόχους μου. Ακόμα και σε δύσκολες οικονομικές συγκυρίες είχαν ως σημαντική προτεραιότητα να με βοηθήσουν να πετύχω τους στόχους μου και να μου παρέχουν τη δύναμή τους αλλά και τη στήριξή τους όποτε τη χρειάστηκα. Πραγματικά τους ευχαριστώ!

*Πάντα στο νου σου να 'χεις την Ιθάκη.
Το φθάσιμον εκεί ειν' ο προορισμός σου.
Αλλά μη βιάζεις το ταξίδι διόλου.
Καλλίτερα χρόνια πολλά να διαρκέσει•
και γέρος πια ν' αράξεις στο νησί,
πλούσιος με όσα κέρδισες στον δρόμο,
μη προσδοκώντας πλούτη να σε δώσει η Ιθάκη*
[Κ.Π. Καβάφης- «Ιθάκη», 1911]

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΘΕΟΧΑΡΗΣ ΝΑΖΟΣ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Ημερομηνία γέννησης: 30/10/1988
Διεύθυνση: Ηράκλειο Κρήτης (Ελλάδα) 71304
Τηλέφωνο: (+30) 697 716 3003
Διεύθυνση ηλεκτρονικού ταχυδρομείου: theonazos@hotmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

12/2013–Σήμερα: **Υποψήφιος Διδάκτωρ Χημείας**

Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο (Ελλάδα)

Τίτλος Διδακτορικής Διατριβής: Μελέτη της βιοαποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων από μικροοργανισμούς (Επιβλέπων: Δημήτριος Γανωτάκης)

03/2011–11/2013: **Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στη Βιοχημεία**

Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο (Ελλάδα)

Μέσος όρος μεταπτυχιακών μαθημάτων: Άριστα (9,67/10)

Τίτλος Διατριβής: Μελέτη της βιοαποικοδόμησης αρωματικών ενώσεων από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*. (Επιβλέπων: Δημήτριος Γανωτάκης)

09/2006–03/2011: **Πτυχίο Χημείας**

Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο (Ελλάδα)

Βαθμός: Λίαν Καλώς (7,05/10)

Διπλωματική Εργασία: Αντιβακτηριακές, αντιμυκυτιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες των ανθοκυανινών που απομονώθηκαν από τον καρπό του *Myrtus communis*. (Επιβλέπων: Δημήτριος Γανωτάκης)

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

03/2015–06/2015: **Επιστημονικός Συνεργάτης** στο Ερευνητικό Πρόγραμμα «ΘΑΛΗΣ-ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ- Παραγωγή Βιο-υδρογόνου (H₂) από μονοκύτταρα χλωροφύκη».

Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, Επιστημονικά υπεύθυνος: Καθ. Δημήτριος Γανωτάκης

01/2014–12/2014 **Επιστημονικός Συνεργάτης** στο Ερευνητικό Πρόγραμμα «Εθνική Συμμετοχή ΚΑ 2366» με τίτλο: «Μελέτη φωτοσυνθετικών οργανισμών στην αποικοδόμηση οργανικών ενώσεων και παραγωγή H₂».

Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, Επιστημονικά υπεύθυνος: Καθ. Δημήτριος Γανωτάκης

04/2012–07/2012 **Επιστημονικός Συνεργάτης** στο Πρόγραμμα «Gadolinium Nanoparticles for targeted drug delivery».

Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, Επιστημονικά υπεύθυνος: Καθ. Δημήτριος Γανωτάκης

ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Μητρική γλώσσα: Ελληνικά

Αγγλικά: Certificate of Proficiency in English, University of Michigan (C2 Level)

Οργανωτικές δεξιότητες: Πρόεδρος της Οργανωτικής Επιτροπής του 19ου Συνεδρίου Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας, Ηράκλειο Κρήτης, 2-4 Μαΐου 2017

Μέλος της Οργανωτικής Επιτροπής της 12^{ης} Συνέλευσης των Αντιπροσώπων του Ευρωπαϊκού Δικτύου Νέων Χημικών (12th Delegate Assembly of the European Young Chemists Network) Ηράκλειο Κρήτης, 4-7 Μαΐου 2017

Τεχνικές δεξιότητες: Καλλιέργειες βακτηρίων, μυκήτων, καρκινικών κυττάρων, χλωροφυκών και κυανοβακτηρίων, φυγοκέντρηση, φθορισμομετρία, φωτομετρία UV-Vis, τεχνικές χρωματογραφίας (HPLC, GC), πολυαρογραφία, τεχνικές ηλεκτροφόρησης, τεχνικές ακινητοποίησης μικροοργανισμών σε μήτρες πολυμερών, απομόνωση φυσικών προϊόντων από φυτικούς οργανισμούς, προσδιορισμός αντιμικροβιακών, αντιοξειδωτικών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων.

Ψηφιακή δεξιότητα: Βεβαίωση επαρκούς γνώσης πληροφορικής και χειρισμού Η/Υ, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Υποτροφίες: Υπότροφος του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών σε πρόγραμμα που χρηματοδοτήθηκε από την Πράξη «Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών για μεταπτυχιακές σπουδές δεύτερου κύκλου σπουδών» από πόρους του ΕΠ «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του ΕΣΠΑ 2014-2020 (15/5/2017-14/5/2018)

Δημοσιεύσεις: **Nazos, T. T.**, Kokarakis, E. J. & Ghanotakis, D. F. 2017. Metabolism of xenobiotics by *Chlamydomonas reinhardtii*: Phenol degradation under conditions affecting photosynthesis. *Photosynth Res*, 131, 31-40. DOI:10.1007/s11120-016-0294-2

Συνέδρια: **7th European Bioremediation (EBC-VII) and 11th International Society of Environmental Biotechnology (ISEB 2018) Joint Conference**, Chania, Crete, Greece, June 25-28, 2018. “*Bioenergetics as a tool to monitor environment restoration- Phenol biodegradation by photosynthetic microalgae*” **T. Nazos**, E. Kokarakis, E. Poloniataki, G.T. Mastrokalos, M. Papavasileiou and D. Ghanotakis (Oral Presentation)

66th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, American Society for Mass Spectrometry (ASMS), San Diego, CA, USA, 3/6 – 7/6/2018. “*Desorption easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry for lipidomic analysis of cyanobacteria and green algae during growth and stress conditions*” Leonidas Mavroudakis, **Theocharis Nazos**, Eleftheria-Angeliki Valsami, Evangelia-Veatraki Sakellaraki, N. Lydakis-Simantiris, Demetrios F. Ghanotakis and

Spiros A. Pergantis (Poster presentation by L. Mavroudakis)

19th Postgraduates' Conference on Chemistry, Heraklion, Crete, Greece, May 2-4, 2017. “*Biodegradation of phenolic compounds by photosynthetic microalgae-From bioenergetics to environment restoration*” T. Nazos, E. Kokarakis, E. Poloniataki, G.T. Mastrokallos and D. Ghanotakis (Oral Presentation)

18^ο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας, Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα, 26-28 Μαρτίου 2016. «*Βιοενεργητική προσέγγιση για την αποικοδόμηση της φαινόλης από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii**». Θεοχάρης Νάζος, Μανώλης Κοκαράκης και Δημήτριος Γανωτάκης (Προφορική Ομιλία)

12th International Conference on Protection and Restoration of the Environment (PRE12). Skiathos island, Greece, June 29 to July 4, 2014. “*Effective biodegradation of phenolic compounds by the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii**”. T. Nazos, I. Chatzidaki and D. Ghanotakis (Oral Presentation)

Σεμινάρια: **4η Διημερίδα Τμήματος Χημείας 25-26 Νοεμβρίου 2016 στη μνήμη της Δρ. Μαρίας Χατζημαρινάκη**. Ομιλία με τίτλο: Χρήση της πράσινης βιοτεχνολογίας για την αποκατάσταση του περιβάλλοντος: *Βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων από φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς*.

Πιστοποιήσεις: Πιστοποιητικό Οινολογικής Εκπαίδευσης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης (2013)

Συνδρομές: Μέλος της Ένωσης Ελλήνων Χημικών (EEX)

CURRICULUM VITAE

THEOCHARIS NAZOS

PERSONAL INFORMATION

Date of birth: 30/10/1988
Address: Heraklion, Crete, Greece, 71304
Phone number: (+30) 6977163003
E-mail: theonazos@hotmail.com

EDUCATION AND TRAINING

12/2013–Today: **PhD candidate**

Department of Chemistry, School of Sciences and Engineering, University of Crete, Heraklion (Greece)

Doctoral Thesis Title: A study of the biodegradation of phenolic compounds by microorganisms (Thesis Supervisor: Professor Demetrios Ghanotakis)

03/2011–11/2013: **Master of Sciences (MSc) in Biochemistry**

Department of Chemistry, School of Sciences and Engineering, University of Crete, Heraklion (Greece)

Average Grade of Examined Subjects: Excellent (9.67/10)

Master Thesis Title: Biodegradation study of aromatic compounds from the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. (Thesis Supervisor: Professor Demetrios Ghanotakis)

09/2006–03/2011: **Degree in Chemistry**

Department of Chemistry, School of Sciences and Engineering, University of Crete, Heraklion (Greece)

Grade: 7.05/10

Bachelor Thesis: Antibacterial, antifungal and antioxidant properties of anthocyanins extracted from the fruit of *Myrtus communis*. (Thesis Supervisor: Professor Demetrios Ghanotakis)

WORK AND RESEARCH EXPERIENCE

03/2015–06/2015: **Research associate** in the research program “THALES- UNIVERSITY OF CRETE- Bio-hydrogen production from unicellular microalgae”.
University of Crete, Department of Chemistry, P.I.: Professor Demetrios Ghanotakis

01/2014–12/2014: **Research associate** in the research program “National Participation KA 2366” entitled: “Study of photosynthetic microorganisms in the biodegradation of organic compounds and H₂ production”.
University of Crete, Department of Chemistry, P.I.: Professor Demetrios Ghanotakis

04/2012–07/2012: **Research associate** in the research program “Gadolinium Nanoparticles for targeted drug delivery”.
University of Crete, Department of Chemistry, P.I.: Professor Demetrios Ghanotakis

PERSONAL SKILLS

Mother Tongue: Greek

English: Certificate of Proficiency in English, University of Michigan (C2 Level)

Organisational / managerial skills: Chair of the organizing committee of the 19th Chemistry Postgraduates' Conference, Heraklion, Crete, Greece, May 3-5,2017

Member of the organizing committee of the European Young Chemists' Network (EYCN) 12th Delegate Assembly, Heraklion, Crete, Greece, May 4-7,2017

Job-related skills: Culture methods for bacteria, fungi, tumor cells, microalgae and cyanobacteria, centrifugation, UV-Vis and fluorescence spectroscopy, chromatographic techniques (HPLC, GC), polarography, electrophoresis, immobilization techniques, isolation and characterization of natural products from plants, antimicrobial and antioxidant properties of natural products.

Digital competence: Certification of competency in computer use, Department of Chemistry, University of Crete

ADDITIONAL INFORMATION

Scholarships: Scholar of a programme of State Scholarships Foundation (IKY)- founded by the European Union (European Social Fund - ESF) and Greek national funds through the action entitled "Scholarships programme for postgraduates studies -2nd Study Cycle" in the framework of the Operational Programme "Human Resources Development Program, Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework (NSRF) 2014 – 2020 (15/5/2017-14/5/2018).

Publications: **Nazos, T. T.**, Kokarakis, E. J. & Ghanotakis, D. F. 2017. Metabolism of xenobiotics by *Chlamydomonas reinhardtii*: Phenol degradation under conditions affecting photosynthesis. *Photosynth Res*, 131, 31-40. DOI:10.1007/s11120-016-0294-2

Conferences: **7th European Bioremediation (EBC-VII) and 11th International Society of Environmental Biotechnology (ISEB 2018) Joint Conference**, Chania, Crete, Greece, June 25-28, 2018. "*Bioenergetics as a tool to monitor environment restoration- Phenol biodegradation by photosynthetic microalgae*". **T. Nazos**, E. Kokarakis, E. Poloniataki, G.T. Mastrokalos, M. Papavasileiou and D. Ghanotakis (Oral Presentation)

66th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, American Society for Mass Spectrometry (ASMS), San Diego, CA, USA, 3/6 – 7/6/2018. "*Desorption easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry for lipidomic analysis of cyanobacteria and green algae during growth and stress conditions*" Leonidas Mavroudakis, **Theocharis Nazos**, Eleftheria-Angeliki Valsami, Evangelia-Veatraki Sakellaraki, N. Lydakis-Simantiris, Demetrios F. Ghanotakis and Spiros A. Pergantis (Poster presentation by L. Mavroudakis)

19th Postgraduates' Conference on Chemistry, Heraklion, Crete, Greece, May 2-4, 2017. "*Biodegradation of phenolic compounds by photosynthetic microalgae-From bioenergetics to environment restoration*". T. Nazos, E. Kokarakis, E. Poloniataki, G.T. Mastrokallos and D. Ghanotakis (Oral Presentation)

18^o Postgraduates' Conference on Chemistry . Heraklion, Crete, Greece, March 26-28, 2016. "*Bioenergetic approach for the biodegradation of phenol by the green microalgae Chlamydomonas reinhardtii*". T. Nazos, E. Kokarakis and D. Ghanotakis. (Oral presentation)

12th International Conference on Protection and Restoration of the Environment (PRE12). Skiathos island, Greece, June 29 to July 4, 2014. "*Effective biodegradation of phenolic compounds by the green microalga Chlamydomonas reinhardtii*". T. Nazos, I. Chatzidaki and D. Ghanotakis* (Oral Presentation).

Seminars: **4th Seminar of the Chemistry Deptment in the memory of Dr. Maria Chatzimarini**. **November 25-26, 2016**. Oral presentation entitled: *Use of green biotechnology for the remediation of the environment: Biodegradation of phenolic compounds by photosynthetic microorganisms*.

Certifications: Certificate of Oenology, Department of Chemistry, University of Crete (2013)

Memberships: Member of Association of Greek Chemists

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η αποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων από δύο φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* που αποτελεί έναν οργανισμό μοντέλο και ένα μικροφύκος που απομονώθηκε από ένα επιβαρυσμένο σημείο στον ποταμό Γιόφυρο στην πόλη του Ηρακλείου.

Από τα αποτελέσματα της διατριβής αποδείχθηκε πως η αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων, οι οποίες μελετήθηκαν, από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* είναι μία αυστηρά βιοενεργητική διαδικασία. Σε συνθήκες έλλειψης εναλλακτικής πηγής άνθρακα το μικροφύκος βρέθηκε να αποικοδομεί τη φαινόλη κυρίως για να εξασφαλίσει αποθέματα άνθρακα, ενώ ταυτόχρονα η βιοαποικοδόμηση υψηλών αρχικών συγκεντρώσεων φαινόλης φάνηκε να είναι μία αερόβια και φωτοελεγχόμενη διαδικασία. Το μικροφύκος χρησιμοποιεί το αερόβιο μονοπάτι αποικοδόμησης με την παραγωγή ενός ενδιάμεσου κατεχόλης. Το μικροφύκος μπόρεσε να αποικοδομήσει τη φαινόλη στο σκοτάδι μόνο όταν του παρασχέθηκε εξωγενώς το απαιτούμενο οξυγόνο. Η παρουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα επηρέασε σημαντικά τη διαδικασία αποικοδόμησης. Η παρουσία διοξειδίου του άνθρακα ως εναλλακτική πηγή σχεδόν εξαφάνισε την ικανότητα του μικροφύκου να αποικοδομήσει τη φαινόλη ενώ αντίθετα το οξικό οξύ διετέλεσε επικουρικό ρόλο ώστε το μικροφύκος να αποικοδομήσει τη φαινόλη όταν αυτή βρισκόταν σε υψηλές συγκεντρώσεις οδηγώντας ταυτόχρονα σε αύξηση της βιομάζας και στη μείωση των επιπτώσεων της ουσίας στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Η αναστολή στην ανάπτυξη που προκλήθηκε από τη φαινόλη έδειξε πως η φαινόλη ωθεί το μεταβολισμό του μικροφύκου *Chlamydomonas* σε κατάσταση συντηρησης. Από τα αποτελέσματα αποδείχθηκε ότι το καθοριστικό βήμα στην αποικοδόμηση της φαινόλης είναι η διάσπαση του ενδιάμεσου της κατεχόλης.

Το μικροφύκος *Chlamydomonas* φάνηκε ικανό να αποικοδομήσει μερικώς και μονοϋποκατεστημένες μεθυλοφαινόλες. Η σχετική θέση των υποκαταστατών στον αρωματικό δακτύλιο σε συνδυασμό με την παροχή ή όχι εναλλακτικής πηγής άνθρακα καθόρισαν το ποσοστό της αποικοδόμησης. Τα *ortho* και *meta* ισομερή επέδειξαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην αποικοδόμηση σε σχέση με το αντίστοιχο *para* ισομερές και σε αυτή την περίπτωση αποδείχθηκε για άλλη μία φορά η σημασία της παρουσίας οξικού οξέος ως εναλλακτική πηγή άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας. Οι μελέτες αποικοδόμησης της φαινόλης από ακινητοποιημένα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου έδειξαν ότι τα ακινητοποιημένα κύτταρα είναι σε θέση να αποικοδομήσουν τη

φαινόλη εξίσου ή περισσότερο αποτελεσματικά στις περισσότερες περιπτώσεις σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα. Από τις μετρήσεις της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης αποδείχθηκε πως η πολυμερική μήτρα προσέφερε προστασία στα κύτταρα από την επίδραση της φαινόλης. Τα κύτταρα παρέμειναν μεταβολικά ενεργά για ένα συνολικό διάστημα 15 ημερών, ενώ συνεισφορά στη διαδικασία αποικοδόμησης είχαν τα κύτταρα της εξωτερικής επιφάνειας των σφαιριδίων. Η απελευθέρωση των κυττάρων βρέθηκε να συσχετίζεται τόσο με την αρχική συγκέντρωση του αλγινικού, όσο και με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονταν τα ακινητοποιημένα κύτταρα.

Στο τρίτο και τελευταίο μέρος μελετήθηκε ένα φωτοσυνθετικό μικροφύκος που απομονώθηκε από τον ποταμό Γιόφυρο. Το μικροφύκος αυτό φέρει μια εξωκυττάρια μήτρα που περιβάλλει το κυτταρικό τοίχωμα, η οποία λειτουργεί ως φυσικός φραγμός και το προστατεύει από μία σειρά χημικών αναστολέων που μελετήθηκαν όπως τα αντιβιοτικά και η DCMU. Το μικροφύκος εμφάνισε την ικανότητα να αναπτυχθεί σε αυτούς τους αναστολείς και ταυτόχρονα να κρατήσει ενεργή τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του, συγκριτικά με το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* το οποίο δεν είχε αυτή τη δυνατότητα. Όσο αφορά τη μελέτη απομάκρυνσης της φαινόλης, φάνηκε πως η ουσία δεν είχε ισχυρή επίδραση στο μικροφύκος από τον ποταμό Γιόφυρο εξαιτίας της προστασίας που του παρέχει η εξωκυττάρια μήτρα. Το μικροφύκος εμφάνισε ικανότητα αποικοδόμησης της φαινόλης μόνο απουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα από το μέσο καλλιέργειας.

Βασικό συμπέρασμα της παρούσας διατριβής είναι πως η αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων από τους φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς είναι μία βιοενεργητική διαδικασία που εξαρτάται από τις εκάστοτε συνθήκες καλλιέργειας και τα χαρακτηριστικά του εκάστοτε οργανισμού. Οι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί λειτουργούν ως «καλοκουρδισμένες βιοενεργητικές μηχανές» που διαχειρίζονται με το βέλτιστο τρόπο τα παρεχόμενα αποθέματα ενέργειας και βρίσκουν το κατάλληλο ισοζύγιο ανάμεσα στην ανάπτυξη, το στρες και τη βιοαποικοδόμηση των ξеноβιοτικών ουσιών.

Λέξεις κλειδιά: Βιοαποικοδόμηση, φαινόλη, μεθυλοφαινόλες, μικροφύκη, βιοενεργητική, *Chlamydomonas reinhardtii*, φωτοσύνθεση, ακινητοποίηση, σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου, καταπόνηση, ανάπτυξη.

ABSTRACT

The main objective of this study was elucidation of the biodegradation mechanism of phenolic compounds by two different photosynthetic microorganisms. More specifically, the model organism *Chlamydomonas reinhardtii* and a novel green microalga that was isolated from a contaminated site of the river Giofyros (city of Heraklio) were used.

Through this study it was shown that the biodegradation of phenolic compounds by the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* is a bioenergetic process. In the absence of an alternative carbon source, *Chlamydomonas* was found to biodegrade phenol in order to obtain carbon reserves. At the same time the biodegradation of high initial concentrations of phenol proved to be an aerobic, photoregulated process. *Chlamydomonas* uses an aerobic pathway with a catechol intermediate implicated. The microalga was able to biodegrade phenol in the dark only when the cultures were supplied with oxygen exogenously. The presence of an alternative carbon source affected significantly the biodegradation process. The presence of carbon dioxide eliminated the ability of the microorganism to biodegrade phenol, while the presence of acetic acid assisted *Chlamydomonas* in the biodegradation of high initial concentrations of phenol effectively, resulting in biomass increase and alleviation of the impacts of xenobiotics on the photosynthetic apparatus of the alga. When culture growth was inhibited, phenol biodegradation pushed microalgae into a maintenance and survival mode. The determining step in the biodegradation of phenol proved to be the catechol ring cleavage.

Chlamydomonas reinhardtii was found to be able to biodegrade partially a series of monosubstituted methylphenols. The relative position of the substituents in combination with the presence or absence of an alternative carbon source regulated the biodegradation percentage. *Ortho* and *meta* isomers exhibited resistance in biodegradation compared to the *para* isomer. Once again, the role of acetic acid as an alternative carbon source was demonstrated.

Biodegradation studies of phenol by immobilized *Chlamydomonas reinhardtii* in calcium alginate beads showed that immobilized cells are able to biodegrade phenol as well. Photosynthetic efficiency measurements proved that the polymeric matrix protected the cells from phenol inhibitory effects. Cells remained metabolically active for a period of 15 days while only the cells immobilized at the outer surface of the beads contributed to the

biodegradation process. Cell release depended on the initial concentration of the alginate solution as well as the culture conditions such as the presence or absence of phenol.

In the final part of this thesis, a green microalga from the Giofyros river was isolated and studied. The presence of a pronounced extracellular matrix around the cell wall of this alga was found to play an important role in the protection of this microorganism from some inhibitors such as antibiotics and DCMU. The cells were able to grow in the presence of these inhibitors and keep the function of the photosynthetic apparatus active, compared to the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, which was significantly inhibited. Phenol was found not to have a measurable effect on the microalga from the river Giofyros due to the protective role of the extracellular matrix. This microorganism was found to be able to biodegrade phenol only in the absence of an alternative carbon source from the culture medium.

The main conclusion of this thesis is that the biodegradation of phenol by photosynthetic microorganisms is a bioenergetic process depending on the culture conditions and the structural and cell wall characteristics of each particular strain. Photosynthetic microorganisms act like bioenergetic machines that manage with the most profitable way their energy reserves by finding the best bioenergetic balance between growth, stress and the biodegradation of phenolic compounds.

Keywords:

Biodegradation, phenol, methylphenols, microalgae, bioenergetics, photosynthesis, *Chlamydomonas reinhardtii*, immobilization, alginate beads, stress, growth.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	27
1.1 ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΡΥΠΑΝΣΗ	29
1.2 ΡΥΠΑΝΣΗ ΤΩΝ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	29
1.3 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	32
1.4 ΒΙΟΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ	34
1.5 ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	36
1.6 ΣΥΜΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ	41
1.7 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΕΝΕΡΓΗΤΙΚΗ.....	42
1.7.1. Εισαγωγή στη βιοενεργητική.....	42
1.7.2. Φάσεις ανάπτυξης καλλιεργειών με καθορισμένη ποσότητα θρεπτικών μέσων	44
1.7.3. Απόδοση της κατανάλωσης οργανικών υποστρωμάτων στην παραγωγή βιομάζας.	46
1.7.4. Κινητικά μοντέλα ανάπτυξης μικροοργανισμών.....	47
1.7.5. Μικροβιακή συντήρηση- η ελάχιστη ενέργεια που απαιτείται για την επιβίωση ενός κυττάρου	47
1.8 ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΟΞΥΓΟΝΙΚΗΣ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗΣ.....	48
1.8.1. Φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης	48
1.8.2. Φωτοσυνθετικές χρωστικές.....	51
1.8.3. Φθορισμός χλωροφύλλης.....	53
1.9 ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ	57
1.10 ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ	57
1.11 ΤΟ ΠΡΑΣΙΝΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΣ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	63
1.11.1. Ταξινόμηση και φυσιολογία του μικροφύκου <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	63
1.11.2. Ροή του άνθρακα στο μικροφύκος <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	64
1.12 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΒΙΟΕΝΕΡΓΗΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΣ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	69
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	71

2.2 ΣΚΟΠΟΣ.....	71
2.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	73
2.3.1. Οργανισμός και συνθήκες ανάπτυξης.....	73
2.3.2. Μέτρηση της κυτταρικής συγκέντρωσης.....	75
2.3.3. Παρασκευή καλλιιεργειών για μελέτη αποικοδόμησης της φαινόλης	76
2.3.4. Δειγματοληψία και υπολογισμοί για τη μέτρηση της ανάπτυξης.....	77
2.3.5. Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού.....	78
2.3.6. Ποσοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών	79
2.3.7. Πολαρογραφικός προσδιορισμός ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου... 79	
2.3.8. Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC)	80
2.3.9. Ταυτοποίηση της παραγόμενης κατεχόλης με φασματομετρία μαζών ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού συζευγμένη με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (ESI-HPLC-MS) μέσω της μεθόδου παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (MRM).....	81
2.3.10. Παρατήρηση των κυττάρων με οπτική μικροσκοπία και μικροσκοπία φθορισμού	81
2.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	82
2.4.1. Μελέτη βιοαποικοδόμησης της φαινόλης από το μικροφύκος <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> όταν είναι η μόνη πηγή άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας.	82
2.4.2. Μελέτη της επίδρασης της έντασης του φωτισμού και της διαθεσιμότητας οξυγόνου στην αποικοδόμηση της φαινόλης.	85
2.4.3. Ταυτοποίηση της παραγόμενης κατεχόλης	87
2.4.4. Μελέτη βιοαποικοδόμησης της φαινόλης από το μικροφύκος <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> παρουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας.	93
2.4.5. Μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης εναλλακτικής πηγής άνθρακα στην αποικοδόμηση της φαινόλης από το μικροφύκος <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	108
2.4.6. Μελέτη της επίδρασης της παρουσίας ή απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα στο βιοενεργητικό ισοζύγιο παραγωγής κατεχόλης κατά την αποικοδόμηση της φαινόλης από το μικροφύκος <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	124
2.4.7. Μελέτη της βιοαποικοδόμησης μονοϋποκατεστημένων μεθυλοφαινολών από το μικροφύκος <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	130
2.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	137

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΦΑΙΝΟΛΗΣ ΑΠΟ
ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* ΣΕ
ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ 141**

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	143
3.1.1. Ακίνητοποίηση κυττάρων σε πολυμερικές μήτρες.	143
3.1.2. Αλγινικά πολυμερή	144
3.1.3. Παγίδευση κυττάρων σε αλγινικά πολυμερή για χρήση σε διάφορες εφαρμογές....	147
3.2 ΣΚΟΠΟΣ.....	148
3.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	149
3.3.1. Οργανισμός και συνθήκες ανάπτυξης.....	149
3.3.2. Μέτρηση της κυτταρικής συγκέντρωσης.....	149
3.3.3. Ακίνητοποίηση των κυττάρων <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου.....	149
3.3.4. Δειγματοληψία	150
3.3.5. Μέτρηση αριθμού κυττάρων που απελευθερώθηκαν από τα σφαιρίδια.....	151
3.3.6. Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού.....	151
3.3.7. Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC)	151
3.3.8. Παρατήρηση σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)	152
3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	152
3.4.1. Παρατήρηση ακινητοποιημένων κυττάρων σε σφαιρίδια διαφορετικής συγκέντρωσης αλγινικού.	152
3.4.2. Μελέτη αποικοδόμησης της φαινόλης, παραγωγής κατεχόλης και απελευθέρωσης των κυττάρων έπειτα από παραμονή των σφαιριδίων σε θρεπτικό μέσο TAP απουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα (Limit C) για διάστημα 10 ημερών παρουσία 4,0 mM φαινόλης.	157
3.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	169

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΝΟΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΥΣ
ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΟΤΑΜΟ ΓΙΟΦΥΡΟ- ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΠΕΝΑΝΤΙ
ΣΕ ΧΗΜΙΚΟΥΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΗΣ
ΦΑΙΝΟΛΗΣ..... 171**

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	173
4.1.1. Μικροοργανισμοί από ακραία και υποβαθμισμένα περιβάλλοντα.....	173
4.1.2. Το ζιζανιοκτόνο DCMU	174
4.1.3. Αντιβιοτικά	176
4.1.4. Ο Ποταμός Γιόφυρος.....	177
4.2 ΣΚΟΠΟΣ.....	177
4.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	178
4.3.1. Δειγματοληψία	178
4.3.2. Διαδικασία απομόνωσης καθαρών αποικιών του φωτοσυνθετικού μικροοργανισμού	178
4.3.3. Μελέτη της ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε θρεπτικό μέσο TAP.....	180
4.3.4. Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών του μικροοργανισμού.	180
4.3.5. Μελέτη της μορφολογίας του μικροοργανισμού με χρήση οπτικής μικροσκοπίας .	181
4.3.6. Μελέτη της μορφολογίας του μικροοργανισμού με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM).	182
4.3.7. Παρασκευή πειραματικών καλλιιεργειών για τη συγκριτική μελέτη της επίδρασης του ζιζανιοκτόνου DCMU και μίας σειράς αντιβιοτικών στην ανάπτυξη του μικροφύκου <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> και του μικροφύκου που απομονώθηκε από τον ποταμό Γιόφυρο.....	182
4.3.8. Παρασκευή καλλιιεργειών για μελέτη αποικοδόμησης της φαινόλης	184
4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	185
4.4.1. Απομόνωση καθαρών αποικιών του μικροοργανισμού από τον Γιόφυρο Ποταμό.	185
4.4.2. Χαρακτηρισμός του φωτοσυνθετικού μικροοργανισμού.....	186
4.4.3. Μελέτη της επίδρασης της DCMU και μίας σειράς αντιβιοτικών στην ανάπτυξη του μικροφύκου από τον ποταμό Γιόφυρο συγκριτικά με το μικροφύκο <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	195
4.4.4. Μελέτη της αποικοδόμησης της φαινόλης από καλλιιεργείες του μικροφύκου από τον ποταμό Γιόφυρο παρουσία και απουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα.	201
4.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	208
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	211
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι. ΑΝΤΙΓΡΑΦΟ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗΣ	217

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ. ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΕΣ ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ ΦΑΙΝΟΛΗΣ ΚΑΙ ΚΑΤΕΧΟΛΗΣ	221
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	225

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

2-MePh:	2-μεθυλοφαινόλη
3-MePh:	3-μεθυλοφαινόλη
4-MePh:	4-μεθυλοφαινόλη
ABS	Ενέργεια που απορροφάται από τις χρωστικές της φωτοσυνθετικής κεραίας
ABS/RC:	Μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας
Acetic acid:	Συνθήκη στην οποία υπάρχει οξικό οξύ στο μέσο καλλιέργειας ως εναλλακτική πηγή άνθρακα
Acetic acid+CO ₂ :	Συνθήκη καλλιέργειας στην οποία υπάρχουν συνδυαστικά οξικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας ως εναλλακτική πηγή άνθρακα
C _a :	Συγκέντρωση χλωροφύλλης-a
C _b :	Συγκέντρωση χλωροφύλλης-b
CO ₂ :	Συνθήκη στην οποία υπάρχει διοξείδιο του άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας ως εναλλακτική πηγή άνθρακα
CS:	Επιφάνεια διατομής
C _{x+c} :	Συγκέντρωση ολικών καροτενοειδών και ξανθοφυλλών
DCMU:	3-(3,4-διχλωροφαινόλη)-1,1-διμεθυλο-ουρία
DI:	Διαχεόμενη ενέργεια
DI ₀ /RC:	Ποσό ενέργειας που διαχέεται ως θερμότητα ανά κέντρο αντίδρασης
EDS:	Φασματοσκοπία ακτίνων X με ενεργειακή διασπορά (Electron Dispersive X-ray Spectroscopy)
ESI:	Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό
ET:	Ροή ενέργειας που αντιστοιχεί στη μεταφορά ηλεκτρονίων πέραν της πλαστοκινόλης
ET ₀ /TR ₀ :	Αποτελεσματικότητα κατά την οποία μία διέγερση μπορεί να μετακινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την ανηγμένη μορφή της πλαστοκινόνης
F _{max} :	Μέγιστη εκπομπή φθορισμού

F_0 :	Εκπομπή φθορισμού τη χρονική στιγμή $t=0$
F_v :	$F_{\max}-F_0$
F_v/F_{\max} :	Μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση
GDA:	Γλουταραλδεϋδη
HPLC-MS:	Συζευγμένη φασματομετρία μαζών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
HS:	Θρεπτικό μέσο ανόργανων αλάτων του Sueoka
L:	α -L-γουλουρονικό οξύ
Limit C:	Συνθήκη στην οποία απουσιάζει εναλλακτική πηγή άνθρακα από το μέσο καλλιέργειας
M:	β -D-μαννουρονικό οξύ
MRM:	Παρακολούθηση Πολλαπλών Αντιδράσεων (Multiple Reaction Monitoring)
OD:	Οπτική πυκνότητα καλλιέργειας
PCV:	Όγκος καθιζαμένων κυττάρων ανά mL καλλιέργειας (Packed Cell Volume)
PFA:	Παραφορμαλδεϋδη
Q _B :	Θέση πρόσδεσης της πλαστοκινόνης στη D1 υπομονάδα του φωτοσυστήματος-II
RC:	Κέντρο αντίδρασης
RC/CS ₀ :	Πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης
RP-HPLC:	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης
SCB	Ρυθμιστικό διάλυμα διμεθυλαρσινικού νατρίου (Sodium Cacodylate Buffer)
SEM:	Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy)
S ₀ :	Αρχική ποσότητα της φαινόλης μετρημένη σε mg
S _t :	Ποσότητα φαινόλης που απέμεινε στο μέσο καλλιέργειας την τελευταία πειραματική ημέρα μετρημένη σε mg
TAP:	Θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη μικροφυκών (Tricine-Acetate-Phosphate)
t ₀ :	Χρονική στιγμή έναρξης καλλιέργειας (πειραματική ημέρα μηδέν)

t:	Χρόνος μετρημένος σε ημέρες
TR:	Ροή ενέργειας που παγιδεύεται στα κέντρα αντίδρασης και οδηγεί στην αναγωγή της πλαστοκινίνης
TR ₀ /ABS:	Κβαντική απόδοση της πρωταρχικής φωτοχημείας
X:	Ξηρό βάρος των κυττάρων σε χρόνο t
X ₀ :	Ξηρό βάρος των κυττάρων σε χρόνο t ₀
Y _{X/S} :	Συντελεστής απόδοσης
μ:	Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ξενοβιοτικές ουσίες και ρύπανση

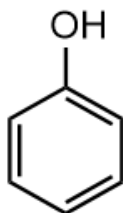
Ξενοβιοτικές ουσίες είναι ενώσεις ανθρωπογενούς προέλευσης οι οποίες βρίσκονται στο περιβάλλον ή σε ζωντανούς οργανισμούς σε ασυνήθιστα υψηλές συγκεντρώσεις και δεν προέρχονται από φυσική πηγή [1]. Πρόκειται για ουσίες τις οποίες οι ζωντανοί οργανισμοί μεταβολίζουν με δυσκολία ή αδυνατούν να τις μεταβολίσουν και για το λόγο αυτό οι συγκεντρώσεις τους μπορούν να φτάσουν σε υψηλά επίπεδα με αποτέλεσμα την εμφάνιση τοξικών επιπτώσεων [2]. Οι άμεσες πηγές απόρριψης αυτών των ουσιών στο περιβάλλον είναι οι αρωματικές και φαινολικές ενώσεις, τα πλαστικά, οι υδρογονάνθρακες, οι βαφές και τα χρώματα, τα εντομοκτόνα και ζιζανιοκτόνα, τα βαρέα μέταλλα και τα ραδιενεργά απόβλητα. Οι έμμεσες πηγές έχουν να κάνουν με την απόρριψη φαρμάκων από νοσοκομεία και φαρμακοβιομηχανίες, π.χ. τα μη-στερεοειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs), άλλα φάρμακα όπως αναισθητικά και αντιβιοτικά τα οποία περνούν στο περιβάλλον είτε στην αρχική τους μορφή, είτε μερικώς αποικοδομημένα και έχουν την ικανότητα να εισέρχονται στις τροφικές αλυσίδες. Επιπλέον τα συνθετικά πολυμερή αποτελούν μεγάλη πηγή μόλυνσης αν αναλογιστεί κανείς όλα τα πλαστικά (π.χ. σακούλες) που απορρίπτονται στο περιβάλλον καθώς και το πόσο δύσκολη είναι η μετατροπή τους σε απλούστερες ουσίες [3]. Η συσσώρευση των παραπάνω κατηγοριών ενώσεων στο περιβάλλον επιφέρει δυσμενείς επιπτώσεις στους ζωντανούς οργανισμούς. Μία πολύ σημαντική κατηγορία οργανικών ρυπαντών είναι οι φαινολικές ενώσεις ανθρωπογενούς προέλευσης.

1.2 Ρύπανση των οικοσυστημάτων από φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις φέρουν απευθείας ενωμένη τουλάχιστον μία ομάδα υδροξειδίου πάνω σε έναν αρωματικό δακτύλιο. Η πιο απλή ένωση αυτής της κατηγορίας είναι η φαινόλη (Εικόνα 1.1). Οι φαινολικές ενώσεις απαντούν ευρέως στη φύση και χρησιμοποιούνται ως ενδιάμεσα στη βιομηχανική σύνθεση διαφόρων προϊόντων, όπως κόλλες, αντισηπτικά, εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα κτλ. [4]. Οι ενώσεις αυτές εισέρχονται κυρίως στα οικοσυστήματα εξαιτίας της διοχέτευσης αστικών και βιομηχανικών λυμάτων σε επιφανειακά ύδατα [5]. Μία άλλη πηγή προέλευσης είναι η αποσύνθεση βιοκτόνων ουσιών όπως π.χ. η πεντάχλωροφαινόλη [6] καθώς και ζιζανιοκτόνων όπως το Dinoseb [7]. Μερικές φαινολικές ενώσεις μπορούν να σχηματιστούν ως αποτέλεσμα φυσικών διεργασιών. Παράδειγμα αποτελεί ο σχηματισμός της φαινόλης και της *para*-κρεσόλης κατά την

αποσύνθεση οργανικής ύλης όπως επίσης η σύνθεση των χλωροφαινολών από μύκητες και ανώτερα φυτά [8]. Τέλος οι φαινολικές ρυτίνες οι οποίες παράγονται από τη φαινόλη χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία ξυλείας και κατασκευών για ποικίλους σκοπούς [9].

Η φαινόλη είναι ένα λευκό κρυσταλλικό στερεό με χαρακτηριστική οσμή, διαλυτό τόσο στο νερό όσο και σε οργανικούς διαλύτες. Πρόκειται για μία από τις πρώτες ενώσεις οι οποίες εγγράφηκαν στον κατάλογο ρύπων προτεραιότητας (List of Priority Pollutants) του Οργανισμού Προστασίας του Περιβάλλοντος των Η.Π.Α. (US EPA). Η παραγωγή της φαινόλης στη βιομηχανία έχει παρουσιαστεί στη βιβλιογραφία [10]. Η φαινόλη χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη για την παραγωγή περισσότερο υποκατεστημένων φαινολικών ενώσεων. Επιπλέον χρησιμοποιείται ως πρόδρομη ένωση στη σύνθεση σε παρασιτοκτόνων, εκρηκτικών καθώς και στην παραγωγή χρωστικών [11]. Ένας από τους τρόπους με τους οποίους εισέρχεται στα οικοσυστήματα είναι μέσω των αερίων που παράγονται από τις εξατμίσεις των οχημάτων, καθώς επίσης έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν ως απολυμαντικό [12]. Σε φυσικά ύδατα η συγκέντρωση της φαινόλης κυμαίνεται από 0,01- 2,0 μg/L [11]. Επιπλέον τα απόβλητα από αρδευόμενες γεωργικές εκτάσεις περιέχουν φαινόλη σε μικρές συγκεντρώσεις, αλλά παρόλα αυτά μπορεί να καταστήσουν τους καρπούς μη- βρώσιμους όταν αυτοί εκτεθούν [13].



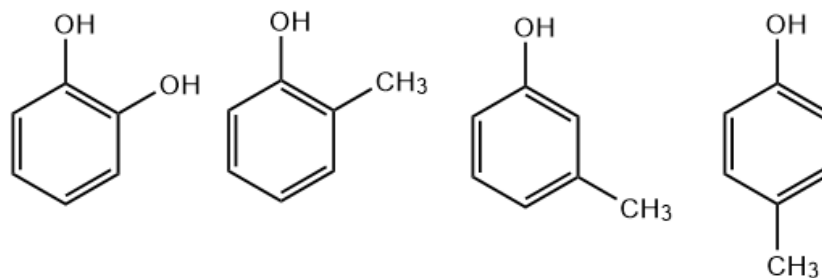
Εικόνα 1.1. Σκελετική δομή της φαινόλης.

Ένα άλλο φαινολικό παράγωγο είναι η κατεχόλη. Η κατεχόλη χρησιμοποιείται στην παραγωγή συνθετικών υλικών και στη σύνθεση των φαρμάκων. Επιπλέον η κατεχόλη παράγεται κατά την αποικοδόμηση της φαινόλης από ζωντανούς οργανισμούς [11]. Χλωριωμένα παράγωγα της κατεχόλης παράγονται κατά τη βιομετατροπή των χλωροφαινολών από μικροοργανισμούς οι οποίοι υδροξυλιώνουν το φαινολικό δακτύλιο σε *ορθο* θέση ως προς την υπάρχουσα ομάδα υδροξειδίου [14].

Υψηλής σημασίας είναι και η παρουσία περισσότερο υποκατεστημένων φαινολικών ενώσεων στο φυσικό περιβάλλον όπως είναι οι αλογοφαινόλες, οι νιτροφαινόλες και ένας μεγάλος αριθμός από *αλκυλο* (π.χ. κρεσόλες) και *άκυλο* υποκατεστημένες φαινόλες [11]. Τα αλογονωμένα παράγωγα, και κυρίως οι χλωροφαινόλες, αποτελούν τον κύριο ρύπο των οικοσυστημάτων αυτής της οικογένειας ενώσεων κυρίως σε περιοχές όπου εκδηλώνεται έντονη βιομηχανική δραστηριότητα. Υπάρχουν αρκετά παραδείγματα στη βιβλιογραφία που περιγράφουν την κατά τόπους ρύπανση από χλωροφαινόλες [15, 16]. Οι αλογοφαινόλες έχουν την ικανότητα να βιοσυσσωρεύονται στα οικοσυστήματα με όλες τις δυσμενείς συνέπειες για τους ανώτερους καταναλωτές όπου ανιχνεύονται στους ιστούς τους [17]. Οι νιτροφαινόλες είναι κοινοί ρυπαντές λόγω της ευρείας χρήσης τους σε βιομηχανικές και αγροχημικές εφαρμογές [18]. Επίσης προκύπτουν από την διάσπαση ζιζανιοκτόνων όπως είναι το Dinosab καθώς και από τη φωτοχημική αντίδραση μεταξύ των νιτροδών ιόντων του νερού και τη φαινόλης υπό την παρουσία υπερϊόδους ακτινοβολίας [19].

Οι αλκυλιωμένες φαινόλες είναι συχνοί ρυπαντές του εδάφους. Μια κύρια πηγή είναι το κρεοσότο, το οποίο απαντάται κυρίως στην επεξεργασία του ξύλου. Πιο συγκεκριμένα σε επιφανειακά ύδατα κοντά σε ανάλογες βιομηχανίες βρέθηκε ότι η συγκέντρωση της 4-μεθυλοφαινόλης ήταν υψηλότερη από 2 mg/L [11]. Η *παρα*-μεθυλοφαινόλη (αλλιώς *παρα*-κρεσόλη) έχει χρησιμοποιηθεί ως μυκητοκτόνο στην παρασκευή συνθετικών ρητινών, σε διαλύματα εμφάνισης φωτογραφιών καθώς επίσης έχει αναφερθεί και χρήση της ως εκρηκτικό, ενώ η ίδια ουσία είναι τοξική και διαβρωτική αλλά και υπεύθυνη για την απενεργοποίηση του νευρικού συστήματος. Η *μετα*-κρεσόλη χρησιμοποιείται κυρίως στην παραγωγή καλλυντικών, αρωμάτων, απολυμαντικών, εκρηκτικών αλλά και παρασιτοκτόνων, ενώ μίγμα των *μετα*- και *παρα*- ισομερών της κρεσόλης χρησιμοποιείται στη σύνθεση εντομοκτόνων [20-22]. Πέραν όμως της βιομηχανικής δραστηριότητας, σημαντικές ποσότητες αλκυλιωμένων και ακυλιωμένων φαινολικών ενώσεων αποτίθενται στο περιβάλλον εξαιτίας της απόρριψης των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων στις ελαιοπαραγωγούς χώρες στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου όπου λαμβάνει χώρα το 95% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιόλαδου [23]. Η σύσταση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (Olive Mill Wastewaters, OMW) φαίνεται πως περιλαμβάνει κυρίως οργανικές ενώσεις όπου μετρήσεις Χημικός Απαιτούμενος Οξυγόνου (Chemical Oxygen Demand, COD) λαμβάνουν τιμές από 50 έως 150 g/L. Αυτές οι τιμές είναι περίπου δύο τάξεις μεγέθους μεγαλύτερες σε σχέση με αστικά λύματα. Πιο συγκεκριμένα έχουν βρεθεί κυρίως

σάκχαρα και φαινόλες. Η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων ποικίλει από 0,5 έως 25 g/L. Πάνω από 30 φαινολικές ενώσεις έχουν ανιχνευθεί σε OMW οι οποίες διαφέρουν ανάλογα με την περιοχή, το είδος της επεξεργασίας που ακολουθείται για την παραγωγή ελαιολάδου και τις εκάστοτε κλιματολογικές συνθήκες [24]. Οι μονομερείς φαινολικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους έχουν αντιμικροβιακές και φυτοτοξικές ιδιότητες ενώ το σκούρο καφέ χρώμα των OMW αποδίδεται κυρίως σε μεγαλομοριακές φαινολικές ενώσεις [25].



Εικόνα 1.2. Σκελετικές δομές (από αριστερά προς δεξιά) της κατεχόλης, *ορθο*-κρεσόλης, *μετα*-κρεσόλης και *παρα*-κρεσόλης.

1.3 Τοξικότητα φαινολικών ενώσεων

Όταν γίνεται αναφορά σε έναν ξеноβιοτικό παράγοντα και τις επιπτώσεις του στους ζωντανούς οργανισμούς και κυρίως στον άνθρωπο, λαμβάνονται υπόψη οι ακόλουθες παρενέργειες: 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, η μεταλλαξιγένεση και η καρκινογένεση [5].

Η τοξικότητα των φαινολικών ενώσεων σχετίζεται με δύο κύριους παράγοντες, το σχηματισμό ελευθέρων ριζών και τη μη καθορισμένη τοξικότητα που σχετίζεται με την υδροφοβικότητα της ένωσης [26]. Η αύξηση της υδροφοβικότητας βοηθάει το μόριο να μπορέσει να εισχωρήσει ευκολότερα μέσω της πλασματικής μεμβράνης, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της τοξικότητας των ενώσεων αυτών. Για παράδειγμα, αύξηση των ατόμων χλωρίου στο δακτύλιο αυξάνει την υδροφοβικότητά της και κατ' επέκταση την τοξικότητα της ένωσης [27]. Συγκρίνοντας την τοξικότητα μεταξύ των ουσιών πρέπει να ληφθούν υπόψη και κάποιες χαρακτηριστικές παράμετροι της κάθε ένωσης, εκτός από την υδροφοβικότητα. Αυτές είναι 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 συνεπώς την ενίσχυση της τοξικότητάς της [28]. Όταν οι τιμές pK_a των ενώσεων είναι παρόμοιες, τότε μόνο η υδροφοβικότητα είναι ο καθοριστικός παράγοντας σύγκρισης [29]. Επιπλέον ο βαθμός τοξικότητας επηρεάζεται και από τη θέση του υποκαταστάτη. Για παράδειγμα, ένα άτομο χλωρίου σε *ορθο* θέση ως προς το υδροξείδιο στο μόριο της φαινόλης μειώνει την τοξικότητα του μορίου, ενώ στη *μετα* θέση την αυξάνει.

Οι φαινόλες, μετά την είσοδό τους στο κύτταρο, υφίστανται μετασχηματισμό, κυρίως με συμμετοχή οξειδασών στο κυτόχρωμα P450. Μερικές φορές ο μετασχηματισμός των φαινόλων οδηγεί σε αύξηση της τοξικότητάς τους μέσω του σχηματισμού μεταβολιτών που μπορούν να δεσμεύονται στο DNA ή σε ένζυμα και να τα καταστρέφουν. Η ανάπτυξη καρκίνου σε άτομα που έχουν εκτεθεί σε φαινολικές ενώσεις σχετίζεται με την ενεργοποίηση του κυτοχρώματος P450. Οι αντιδράσεις οξείδωσης οδηγούν στη μετατροπή κάποιων ξενοβιοτικών παραγόντων σε ηλεκτρονιόφιλες μορφές που αλληλεπιδρούν ενεργά με τις κυτταρικές δομές. Η δημιουργία ελεύθερων ριζών σχετίζεται με την αλληλεπίδραση της ουσίας με ενδοκυτταρικά βιομόρια. Αντιδράσεις μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου συνήθως καταλύονται από ένζυμα όπως π.χ. οι υπεροξειδάσες που βρίσκονται κυρίως στο ήπαρ και στους πνεύμονες [30].

Εκτός από τα παραπάνω η φαινόλη ερεθίζει το δέρμα και προκαλεί τη νέκρωση του, ενώ βλάπτει τα νεφρά, το συκώτι, τους μυς και τα μάτια [31]. Όσο αφορά την ταχεία απορρόφησή της από το δέρμα, ακόμη και η επαφή του χεριού ή του προσώπου με πυκνό διάλυμα φαινόλης είναι ικανή να προκαλέσει θάνατο [32]. Έρευνες σε ινοβλάστες απομονωμένους από χάμστερ αποκάλυψαν μεταλλαξιγόνο δράση της φαινόλης. Επιπλέον έχει βρεθεί πως μπορεί να αναστείλει τη σύνθεση, την αντιγραφή και τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA σε καρκινικά κύτταρα Henrietta Lacks (σειρά HeLa) [33]. Σε ανθρώπους οι οποίοι έχουν υποστεί χρόνια έκθεση στη φαινόλη έχουν αναφερθεί συμπτώματα ανορεξίας, προοδευτικής απώλειας βάρους, διάρροιας, σκούρος χρωματισμός των ούρων αλλά και επιπτώσεις στο αίμα και το συκώτι ενώ πρόσληψη δόσης 1,0 g φαινόλης ίσως να είναι θανατηφόρα για έναν ενήλικα [31, 32]. Σε ποντίκια η τιμή LD_{50} είναι ίση με 270 mg/kg.

Κλινικά δεδομένα έδειξαν ότι τα άτομα που εκτίθενται στην επίδραση χλωροφαινόλων έχουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης όγκων, σαρκώματος και καρκίνου του πνεύμονα. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά στοιχεία το μείγμα χλωροφαινόλων ή αλάτων

νατρίου αυτών των ενώσεων είναι πιθανώς καρκινογόνο για τα ζώα [34].

Οι κρεσόλες σε μικρές συγκεντρώσεις βρίσκονται φυσιολογικά στο περιβάλλον και δεν ενέχουν κανένα κίνδυνο για τον γενικό πληθυσμό. Ο κίνδυνος αυξάνεται για ανθρώπους που ζουν και εργάζονται σε βιομηχανικές περιοχές και εκτίθενται σε αυτές, όπου έχουν βρεθεί ποσότητες πάνω από τα επιτρεπόμενα όρια σε ροφήματα. Η υπερβολική πρόσληψη προκαλεί παρόμοια συμπτώματα με αυτά που έχουν αναφερθεί παραπάνω με επιπλέον σύμπτωμα την υπόταση και την παράλυση του κεντρικού νευρικού συστήματος [11].

Όσο αφορά τα υψηλά φαινολικά φορτία στα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων, αυτά έχουν τοξικές επιδράσεις κυρίως στη γονιμότητα των σπόρων των φυτών. Η υψηλή περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες και λιπαρά οξέα μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών που είναι χρήσιμοι και απαραίτητοι για το περιβάλλον [35]. Επιπλέον έχει αποδειχθεί η τοξικότητα τους στην διαδικασία της φωτοσύνθεσης όπου είναι υπεύθυνα για την πτώση στη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση αλλά και την υψηλή πίεση διέγερσης (excitation pressure) του φωτοσυστήματος II [36]. Το φαινολικό κλάσμα αυτών των αποβλήτων έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης στο μικροοργανισμό *A. braunii* [37]. Στην παραπάνω μελέτη είχε βασικό συμπέρασμα ήταν ότι συνεργειακά φαινόμενα κυρίως οφείλονται για την αυξημένη τοξικότητα αυτών των ενώσεων. Επιπρόσθετα, έχουν αποδειχθεί υπεύθυνα για δημιουργία προβλημάτων κατά την παραγωγή της ATP λόγω του ότι προκαλούν αναστολή οξειδοαναγωγικών συμπλόκων και προκαλούν διαρροή πρωτονίων μέσω της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης [38]. Τέλος τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων είναι υπεύθυνα για πιθανή αλλοίωση της δομής και σύνθεσης του χρώματος, με το φαινολικό κλάσμα να αποδεικνύεται ιδιαίτερα τοξικό για τη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους [39].

Για τους παραπάνω λόγους κρίνεται απαραίτητο να βρεθούν αποτελεσματικές και φιλικές προς το περιβάλλον τεχνικές για την απομάκρυνση αυτών των ενώσεων από τη φύση.

1.4 Βιοαποκατάσταση

Ως βιοαποκατάσταση (bioremediation) ορίζεται η διαδικασία κατά την οποία ζωντανοί οργανισμοί ή ένζυμα αυτών χρησιμοποιούνται για να μετατρέψουν ξενοβιοτικές ουσίες σε λιγότερο τοξικές μορφές και να επαναφέρουν το περιβάλλον στην αρχική του κατάσταση απαλλαγμένο από αυτές ή να μειώσουν την ποσότητα αυτών των ουσιών κάτω από όρια που έχουν θεσπιστεί από τις αρμόδιες αρχές [40-42]. Η βιοαποκατάσταση μπορεί να

λάβει χώρα είτε απευθείας στη μολυσμένη περιοχή (*in situ*) είτε με την εκσκαφή του μολυσμένου χώματος ή την άντληση των μολυσμένων υδάτων σε ειδικές εγκαταστάσεις (*ex situ*). Η δεύτερη διαδικασία είναι και οικονομικά ασύμφορη. Έχει γίνει ανασκόπηση σε αυτές τις τεχνολογίες στη βιβλιογραφία [43].

Μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών έχει χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση ξενοβιοτικών ουσιών από το περιβάλλον περιλαμβάνοντας κυρίως βακτήρια και μύκητες ενώ η χρήση φωτοσυνθετικών οργανισμών δεν είναι τόσο διαδεδομένη [3]. Για να λάβει χώρα η βιοαποκατάσταση υπάρχουν κάποιες απαιτήσεις όπως η ύπαρξη θρεπτικών συστατικών, εναλλακτικής πηγής ενέργειας, κατάλληλα μόρια δέκτες ηλεκτρονίων και κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. θερμοκρασία, pH). Επιπλέον είναι σημαντικό να προσδιοριστεί η έκταση της ρύπανσης όσο αφορά την επιφάνεια της περιοχής αλλά και το βάθος [44]. Σημαντικός παράγοντας είναι ότι η ενδογενής μικροβιακή κοινότητα των μολυσμένων σημείων είναι πολύ καλά προσαρμοσμένη στο να επιβιώνει υπό υψηλές συγκεντρώσεις του ρύπου αλλά και στις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες, γεγονός που μειώνει τους χρόνους προσαρμογής των μικροοργανισμών και επιταχύνει συνολικά τη διαδικασία [45]. Πάντως και σε αυτή την περίπτωση κάποιες φορές είναι απαραίτητο να υπάρχει υποβοήθηση της μικροβιακής κοινότητας από κάποιον εξωγενή παράγοντα (π.χ. αερισμός και παροχή θρεπτικών στοιχείων) [46]. Οι μεταβολές και η ποικιλότητα της μικροβιακής κοινότητας κατά τη διάρκεια της βιολογικής αποκατάστασης μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας μεθόδους μοριακής βιολογίας. Οι πρόσφατες εξελίξεις στις μοριακές τεχνικές σε συνδυασμό με τις γονιδιωματικές πληροφορίες βοηθούν σε μεγάλο βαθμό στην εύρεση των μικροοργανισμών στις κοινότητες αυτές και πλέον αποτελούν ισχυρό εργαλείο σε εφαρμογές βιοαποκατάστασης [47]. Επιπλέον η αποτελεσματικότητα της βιοαποκατάστασης μπορεί να ενισχυθεί με τη χρήση γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών οι οποίοι έχουν τροποποιηθεί για να εκφράζουν τα απαραίτητα ένζυμα του μεταβολικού μονοπατιού για την αποικοδόμηση της ουσίας- στόχου. Σε αυτή την περίπτωση θα πρέπει να ληφθούν αυστηρά μέτρα ώστε να μη διαφύγουν αυτοί οι μικροοργανισμοί στη φύση και διαταράξουν τη βιοποικιλότητα προκαλώντας μεταβολές στους φυσικούς πληθυσμούς [48].

Μερικά από τα βασικά πλεονεκτήματα της βιοαποκατάστασης σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές αποκατάστασης είναι ότι αποτελεί μια φυσική διαδικασία η οποία μετατρέπει επικίνδυνες ουσίες σε αβλαβείς μορφές ενώ ταυτόχρονα δεν διαταράσσει τις

φυσιολογικές διαδικασίες διότι μπορεί να λάβει χώρα *in situ*. Επιπλέον εμφανίζει μειωμένο κόστος σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους της χημικής αποκατάστασης όπου απαιτείται μεταφορά του μολυσμένου χώματος ή άντληση των μολυσμένων υδάτων σε ειδικές εγκαταστάσεις. Αντίθετα μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι δεν είναι ικανοί όλοι οι ρύποι να αποικοδομηθούν ενώ κάποια προϊόντα αποικοδόμησης ενδέχεται να είναι πιο τοξικά από την αρχική ξενοβιοτική ουσία σε κάποιες περιπτώσεις. Επίσης απαιτεί την ύπαρξη κατάλληλων περιβαλλοντικών συνθηκών και κάποιες φορές μεγάλη χρονική περίοδο για να επιτευχθεί. Οι οργανισμοί που θα χρησιμοποιηθούν πρέπει να έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν ή να βιοσυσσωρεύουν τις ξενοβιοτικές ουσίες. Παραδείγματα τέτοιων μικροοργανισμών έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία [3, 40].

1.5 Βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων

Η βιοαποικοδόμηση είναι η βιολογικά καταλυόμενη διαδικασία κατά την οποία μικροοργανισμοί μετατρέπουν (μέσω μεταβολικής ή ενζυμικής δράσης) τη δομή χημικών ενώσεων που βρίσκονται στο περιβάλλον με σκοπό να μειώσουν την πολυπλοκότητα της δομής τους [49, 50]. Κατά τη διαδικασία της βιοαποικοδόμησης πραγματοποιείται διάσπαση πολύπλοκων οργανικών ενώσεων σε πιο απλά μόρια και η ενέργεια που παράγεται από αυτήν την διαδικασία χρησιμοποιείται για την κάλυψη των απαιτήσεων του κυττάρου. Η μετατροπή των ουσιών αυτών γίνεται μέσω μιας σειράς οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων όταν επικρατούν αερόβιες συνθήκες, στις οποίες ως αποδέκτης ηλεκτρονίων λειτουργεί το οξυγόνο. Σε κάποιους μικροοργανισμούς οι αντιδράσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν και σε αναερόβιες συνθήκες, όπου οι αποδέκτες ηλεκτρονίων είναι συνήθως νιτρικά ή θειικά άλατα, διοξείδιο του άνθρακα, οξειδωμένα ανόργανα στοιχεία ή άλλες οργανικές ενώσεις [51]. Η πλήρης αποικοδόμηση οδηγεί συνήθως στο σχηματισμό νερού και διοξειδίου του άνθρακα, υπό αερόβιες συνθήκες ή μεθανίου υπό αναερόβιες [52].

Η αποικοδόμηση της φαινόλης είναι μια διαδικασία η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί 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 κάποιοι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί (μικροφύκη και κυανοβακτήρια) ενώ έχει βρεθεί και ένας σημαντικός αριθμός ενζύμων που συμμετέχουν στη διαδικασία [53]. Αυτά περιλαμβάνουν την υδροξυλάση της φαινόλης [54], οξειδάσες της

φαινόλης και των πολυφαινολών [55-59], υπεροξειδάσες [60], λακκάσες [61-64] και τυροσινάσες [65].

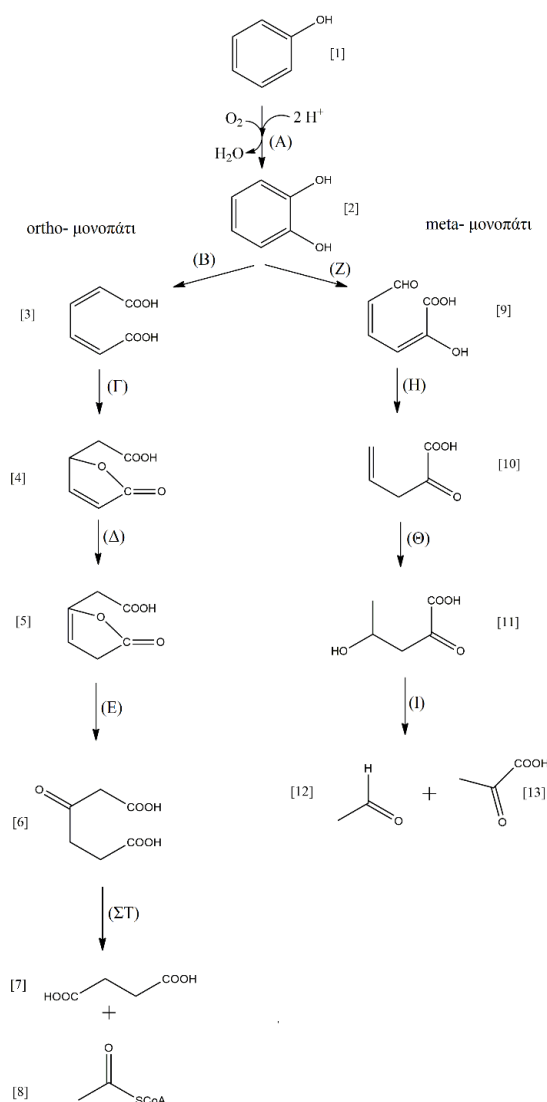
Όσο αφορά το αερόβιο μονοπάτι αποικοδόμησης της φαινόλης, αρχικά το ένζυμο υδροξυλάση της φαινόλης χρησιμοποιεί μοριακό οξυγόνο για να προσθέσει μία δεύτερη ομάδα υδροξειδίου στο δακτύλιο σε *ορθο* θέση ως προς την πρώτη προς σχηματισμό κατεχόλης. Η αντίδραση απαιτεί ένα μόριο ανηγμένου νικοτάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτιδίου και κατιόντος υδρογόνου (NADH/H⁺). Η κατεχόλη που σχηματίζεται είναι δυνατόν να αποικοδομηθεί μέσω δύο εναλλακτικών μονοπατιών ανάλογα με το μικροοργανισμό, το *ορθο* και το *μετα*.

Στο *ορθο* μονοπάτι (β -ketoadipate) λαμβάνει χώρα διάσπαση του δεσμού του κατεχολικού δακτυλίου ανάμεσα στις δύο ομάδες υδροξειδίου από το ένζυμο 1,2-διοξυγενάση με αποτέλεσμα να σχηματιστεί *cis,cis*-μουκονικό οξύ [(2Z,4Z)-εξα-2,4-διενοδιϊκό οξύ] το οποίο μεταβολίζεται περαιτέρω με σκοπό να μετατραπεί σε ηλεκτρικό οξύ και ακέτυλο συνένζυμο-A τα οποία μπορούν να εισαχθούν με τη σειρά τους στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Στο *μετα* μονοπάτι η σχάση του δακτυλίου λαμβάνει χώρα στον προσκείμενο δεσμό μόνο της μίας ομάδας υδροξειδίου με τη βοήθεια του ενζύμου 2,3-διοξυγενάση. Αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός μίας ημιαλδεΐδης που διασπάται περαιτέρω για να μετατραπεί σε ακεταλδεΐδη και πυροσταφυλικό οξύ και να εισαχθεί στον κύκλο του κιτρικού οξέος [53, 66, 67]. Ανάλογα μονοπάτια έχουν βρεθεί και σε άλλους μικροοργανισμούς που αποικοδομούν τη φαινόλη. Τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα έχουν δείξει βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, με πιο αποτελεσματικό το είδος *Pseudomonas putida*, το οποίο μπορεί να εκμεταλλεύεται τη φαινόλη ενώ έχει αναπτύξει μηχανισμούς για την καταπολέμηση των τοξικών επιπτώσεων της φαινόλης επιδεικνύοντας ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις ξενοβιοτικών ουσιών [68-70].

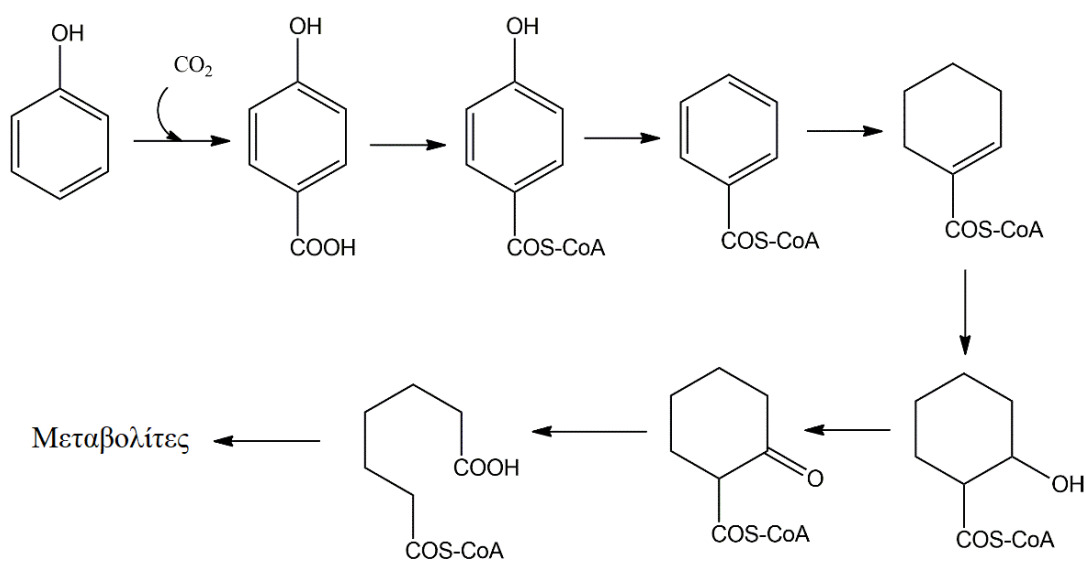
Το αναερόβιο μονοπάτι αποικοδόμησης της φαινόλης έχει μελετηθεί εκτενώς σε απονιτροποιητικά βακτήρια [71]. Η φαινόλη υφίσταται καρβοξυλίωση προς σχηματισμό του 4-υδρόξυ-βενζοϊκού οξέος [72]. Έπειτα μετατρέπεται σε 4-υδροξυ-βενζοϋλο-CoA και στη συνέχεια σε βενζοϋλο-CoA. Ο αρωματικός δακτύλιος ανάγεται και μεταβολίζεται περαιτέρω μέσω β -οξειδωσης [73].

Ανάλογη με το αερόβιο μονοπάτι αποικοδόμησης της φαινόλης είναι και η στρατηγική αποικοδόμησης των μεθυλοφαινολών από μικροοργανισμούς. Σε αυτή την κατηγορία ενώσεων είναι γνωστά μεταβολικά μονοπάτια από βακτήρια. Σημαντικό κρίνεται

να ληφθεί υπόψη πως η θέση ως προς το υδροξύδιο μιας επιπλέον ομάδας στο φαινολικό δακτύλιο παίζει σημαντικό ρόλο όσο αφορά τα επαγωγικά φαινόμενα που αναπτύσσονται.

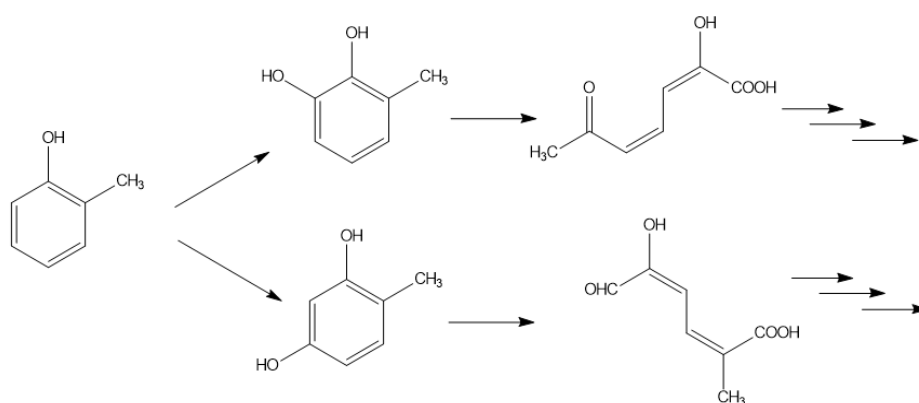


Εικόνα 1.3. Μεταβολικό μονοπάτι αερόβιας αποικοδόμησης της φαινόλης. Με αριθμούς παρουσιάζονται τα υποστρώματα και προϊόντα ενώ με ελληνικά κεφαλαία γράμματα τα ένζυμα που συμμετέχουν σε κάθε βήμα. 1. phenol, 2. catechol, 3. cis-cis muconate, 4. muconolactone, 5. 3-oxoadipate enol-lactone, 6. 3-oxoadipate, 7. succinic acid, 8. acetyl-CoA, 9. 2-hydroxymuconic-semialdehyde, 10. 2-oxo-penta-4-enoate, 11. 4-hydroxy-2-oxo-valerate, 12. acetaldehyde, 13. pyruvic acid, (A) phenol monooxygenase, (B) catechol-1,2-dioxygenase, (Γ) muconate lactonizing enzyme, (Δ) muconolactone isomerase, (E) oxoadipate enol-lactone hydrolase, (ΣΤ) oxoadipate succinyl- CoA transferase, (Z) catechol 2,3-dioxygenase, (H) hydroxymuconic semialdehyde hydrolase, (Θ) 2-oxopent-4-enoic acid hydrolase, (I) 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase.



Εικόνα 1.4. Μεταβολικό μονοπάτι αναερόβιας αποικοδόμησης της φαινόλης [74].

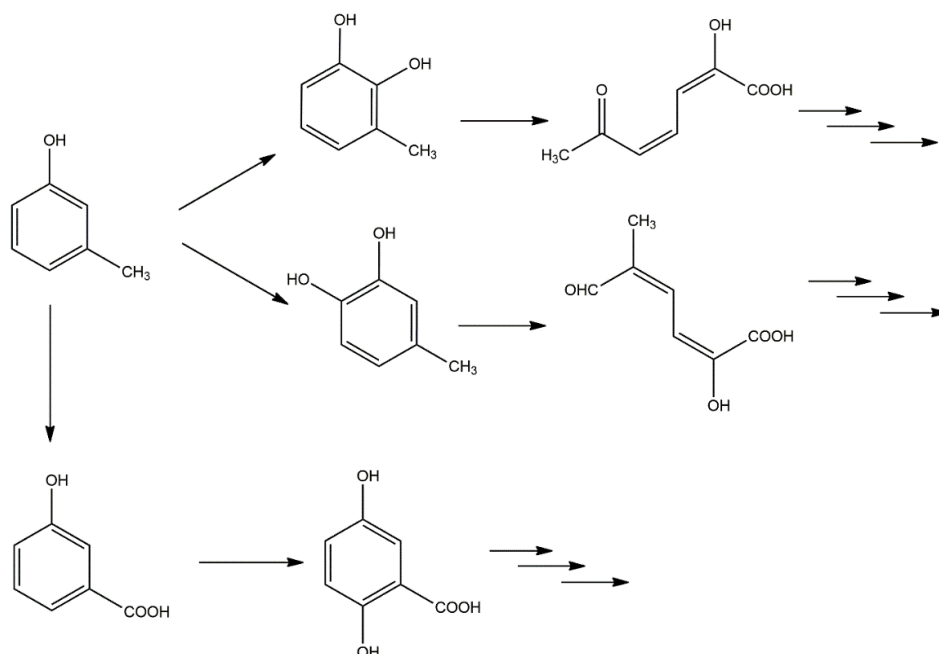
Για το λόγο αυτό εμφανίζεται διαφοροποίηση ως προς τα μεταβολικά ενδιάμεσα και μονοπάτια ανάλογα με τον μικροοργανισμό που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το αντίστοιχο ισομερές. Όσο αφορά την οξείδωση της *ορθο*-κρεσόλης έχει βρεθεί ότι μπορεί να σχηματίσει αρχικά ένα ενδιάμεσο 3-μέθυλο-κατεχόλης [75] και να προκύψει διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου μέσω του *μετα*- μεταβολικού μονοπατιού ή να σχηματίσει ένα ενδιάμεσο 4-μέθυλο-ρεσορκινόλης. Το τελευταίο ενδιάμεσο διασπάται περαιτέρω μέσω του ενζύμου 2,3-διοξυγενάση [76].



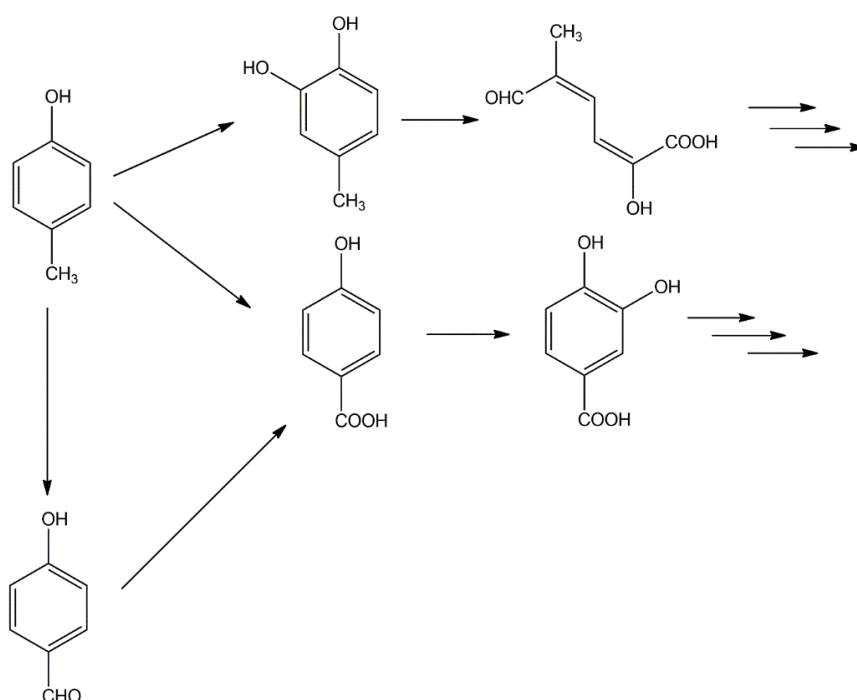
Εικόνα 1.5. Αρχικά στάδια των μεταβολικών μονοπατιών αερόβιας αποικοδόμησης της *ορθο*- κρεσόλης.

Όσο αφορά τη διάσπαση της *μετα*-κρεσόλης έχει βρεθεί ότι παράγει ένα μίγμα από 3-μέθυλο και 4-μέθυλο-κατεχόλης. Κάθε ένα από τα παραπάνω ενδιάμεσα εκκινεί ένα καταρράκτη αντιδράσεων που εξαρτάται σε κάθε οργανισμό από τα ένζυμα αλλά και το μεταβολικό μονοπάτι. Σε αυτή την περίπτωση έχουν βρεθεί ότι λαμβάνουν χώρα τόσο το *ορθο* όσο και το *μετα* μεταβολικό μονοπάτι. Σημαντικό στοιχείο είναι ότι το *μετα* ισομερές οξειδώνεται πάρα πολύ πιο αργά σε σχέση με τα αντίστοιχα *ορθο* και *παρα* ισομερή [76-80]. Ένα εναλλακτικό μονοπάτι που έχει βρεθεί είναι ότι αρχικά η μεθυλομάδα οξειδώνεται σε καρβοξυλομάδα και έπειτα πραγματοποιείται μια υδοξυλίωση σε *ορθο* θέση ως προς την καρβοξυλομάδα. Το παραγόμενο 2,5-διϋδρόξυ-βενζοϊκό οξύ διασπάται περαιτέρω μέσω του *ορθο* μονοπατιού [81].

Όσο αφορά τη διάσπαση της *παρα*- μεθυλοφαινόλης αρχικά μπορεί να σχηματιστεί 4-μέθυλο-κατεχόλη και να διασπαστεί μέσω του *μετα* μεταβολικού μονοπατιού [76]. Ένα εναλλακτικό μονοπάτι το οποίο προτάθηκε είναι η αρχική οξείδωση της μεθυλομάδας σε *φορμυλο*-ομάδα και έπειτα είτε αρχικά η οξείδωση της αλδεΐδης σε καρβοξυλικό οξύ είτε η απευθείας οξείδωση της μεθυλομάδας σε καρβοξυλικό οξύ το οποίο στη συνέχεια διασπάται μέσω του *ορθο* μονοπατιού. Στο μικροοργανισμό *Stenotrophomonas maltophilia* η επαγωγή της 2,3-διοξυγενάσης ήταν πολύ ισχυρή όταν καλλιεργήθηκε παρουσία των τριών ισομερών [81].



Εικόνα 1.6. Αρχικά στάδια των μεταβολικών μονοπατιών αερόβιας αποικοδόμησης της *μετα*- κρεσόλης.



Εικόνα 1.7. Αρχικά στάδια των μεταβολικών μονοπατιών αερόβιας αποικοδόμησης της *παρα-* κρεσόλης.

1.6 Συμμεταβολισμός

Ο συμμεταβολισμός ορίζεται ως ο μεταβολισμός μίας οργανικής ένωσης υπό την παρουσία ενός δεύτερου οργανικού υποστρώματος που χρησιμοποιείται ως πρωταρχική πηγή ενέργειας και άνθρακα και ως συνέπεια ευνοεί την ανάπτυξη. Συνήθως αυτή η διαδικασία λαμβάνει χώρα όταν ο μεταβολισμός μιας ξενοβιοτικής οργανικής ουσίας δεν έχει ενεργειακό όφελος για το μικροβιακό πληθυσμό με αποτέλεσμα από μόνη της να μην μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της βιομάζας [82, 83]. Οι προϋποθέσεις για να λάβει χώρα συμμεταβολική βιομετατροπή είναι η έκφραση κατάλληλων ενζύμων από τα κύτταρα και η παρουσία των απαραίτητων συμπαραγόντων για την εκτέλεση ενζυμικών αντιδράσεων [84]. Έχει βρεθεί πως ο συμμεταβολισμός λαμβάνει χώρα σε σημαντικό βαθμό στη διάσπαση των χλωροαρωματικών ενώσεων [50, 82].

Η διαδικασία του συμμεταβολισμού είναι πολύ υψηλής σημασίας και δείχνει τον τρόπο με τον οποίο περισσότερα του ενός υποστρώματα μπορούν να επηρεάσουν το μεταβολισμό ενός μικροοργανισμού [85]. Έτσι σε πολλές περιπτώσεις είναι πολύ σημαντική η επιλογή ενός κατάλληλου δεύτερου υποστρώματος το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για

συμμεταβολισμό κατά τη διάρκεια μιας εφαρμογής βιοαποκατάστασης [74]. Όσο αφορά την αποικοδόμηση των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) έχει αναφερθεί ότι μίγμα αυτών αποικοδομείται πιο αποτελεσματικά σε σχέση με καλλιέργειες από μεμονωμένες ενώσεις [4]. Επίσης βακτήρια του γένους *Nocardia* είχαν την ικανότητα να συμμεταβολίσουν μίγμα από ισομερή του ξυλενίου μέσω του ίδιου μεταβολικού μονοπατιού [86]. Ο συμμεταβολισμός μπορεί να λάβει χώρα και όταν χρησιμοποιούνται ανάμεικτες καλλιέργειες από βακτήρια και φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς κατά την αποικοδόμηση οργανικών ρύπων. Αρκετά παραδείγματα έχουν αναφερθεί προηγουμένως στη βιβλιογραφία [87].

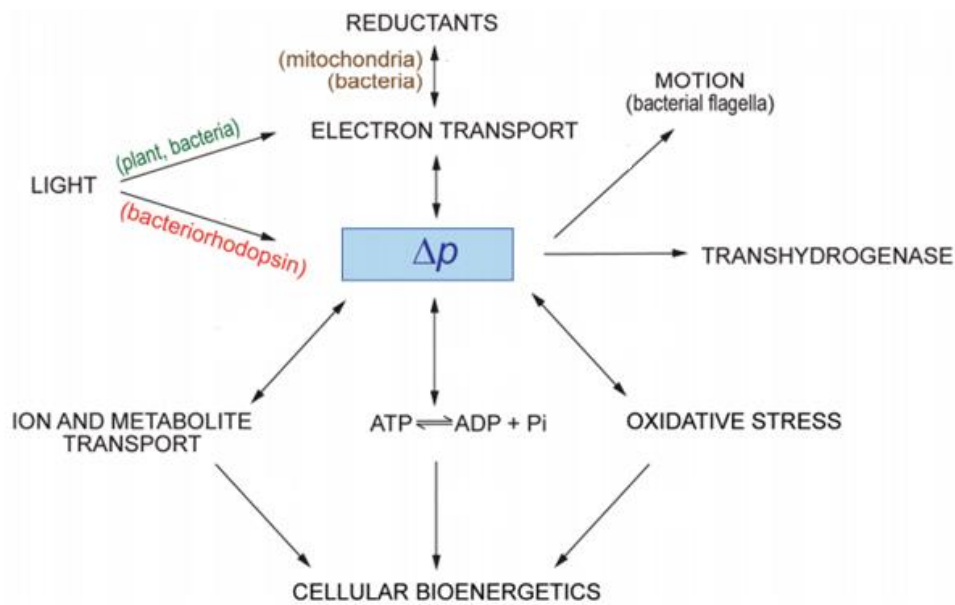
1.7 Μικροβιακή Βιοενεργητική

1.7.1. Εισαγωγή στη βιοενεργητική

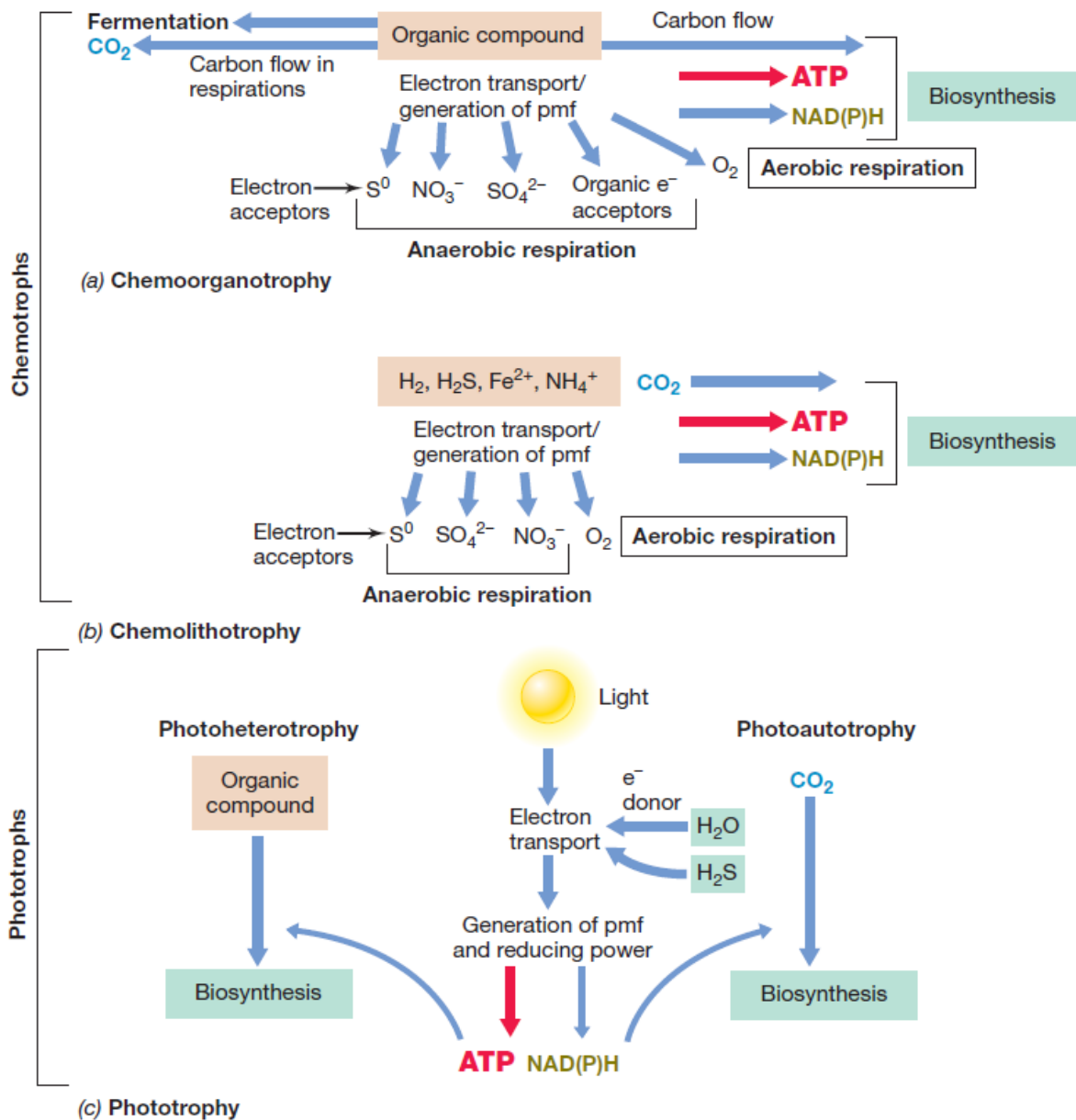
Βιοενεργητική ονομάζεται ο κλάδος που μελετάει τη ροή ενέργειας στους ζωντανούς οργανισμούς εξαιτίας των μεταβολικών αντιδράσεων που πραγματοποιούνται. Ο όρος αρχικά είχε χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει τις διεργασίες παραγωγής ενέργειας στα μιτοχόνδρια των βακτηρίων και στις θυλακοειδείς μεμβράνες των φωτοσυνθετικών οργανισμών [88]. Η παραγωγή και κατανάλωση ενέργειας είναι αναπόσπαστο κομμάτι των μεταβολικών διεργασιών στους ζωντανούς οργανισμούς. Όταν αναφερόμαστε σε ενέργεια στα βιολογικά συστήματα θα πρέπει να αλλάξουμε τη θεώρηση της ενέργειας που παράγεται ή καταναλώνεται κατά τη διάρκεια μίας αντίδρασης σε ένα εργαστήριο. Αν και οι βασικές αρχές της θερμοδυναμικής είναι οι ίδιες, η μεταβολή της ενέργειας κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης σε ένα βιολογικό σύστημα μπορεί να ενεργοποιήσει ή να απενεργοποιήσει μία σειρά από επιπλέον χημικές αντιδράσεις. Επιπλέον αντιδράσεις οι οποίες είναι μη-αυθόρμητες μπορούν να πραγματοποιηθούν μέσω κατάλληλων ενζύμων και συμπαραγόντων.

Η μεταβολική δραστηριότητα των οργανισμών βασίζεται κυρίως σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται μεταφορείς όπως είναι η οξειδωμένη και ανηγμένη μορφή του νικοτάμιδο αδένινο δινουκλεοτιδίου (NAD^+/NADH). Επιπλέον είναι απαραίτητη η ύπαρξη χημικών ενώσεων υψηλού ενεργειακού περιεχομένου όπως είναι η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και το ακέτυλο συνένζυμο Α (acetyl-CoA) [89]. Στη φύση υπάρχει μεγάλη ποικιλότητα με τους τρόπους με τους οποίους τα βιολογικά συστήματα παράγουν ενέργεια κατά τον καταβολισμό. Οι κυριότερες κατηγορίες είναι οι χημειοργανότροφοι (chemoorganotrophs), οι χημειολιθότροφοι (chemolithotrops) και οι

φωτότροφοι (phototrophs). Οι τελευταίοι διαιρούνται σε φωτοαυτότροφους (photoautotrophs) και σε φωτοετερότροφους (photoheterotrophs). Τα σχήματα της Εικόνας 1.9 περιγράφουν το βασικό μεταβολισμό αυτών των οργανισμών.



Εικόνα 1.8. Διάγραμμα που περιγράφει τη ροή της ενέργειας εξαιτίας της διαβάθμισης συγκέντρωσης πρωτονίων στα βιολογικά συστήματα [88]

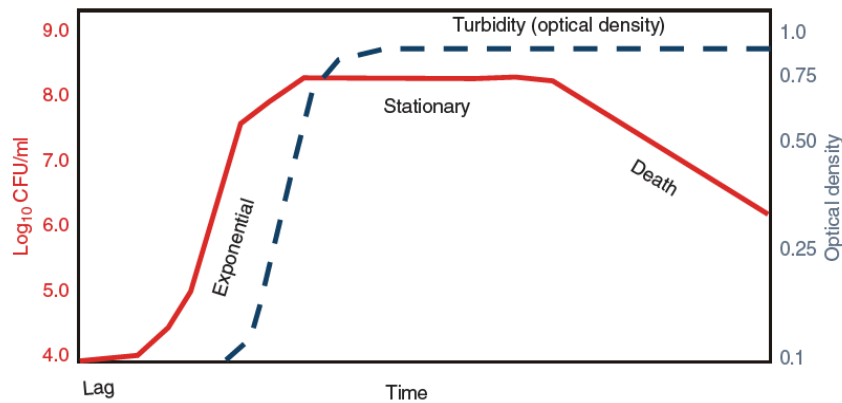


Εικόνα 1.9. Διάγραμμα που περιγράφει τα καταβολικά μονοπάτια στις κατηγορίες των χημειοοργανότροφων, χημειολιθότροφων και φωτότροφων οργανισμών. Οι κυριότερες διαφορές εντοπίζονται στη φύση του αρχικού δότη των ηλεκτρονίων και στη φύση της πηγής άνθρακα [89].

1.7.2. Φάσεις ανάπτυξης καλλιεργειών με καθορισμένη ποσότητα θρεπτικών μέσων

Όταν εργαζόμαστε με συστήματα καλλιεργειών μικροοργανισμών σε μία φιάλη στο εργαστήριο είναι πολύ σημαντικό να γνωρίζουμε τις ενεργειακές απαιτήσεις του κάθε

συστήματος ώστε να προετοιμαστούν κατάλληλα θρεπτικά μέσα και οι καλλιέργειες να πραγματοποιηθούν στις κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. θερμοκρασία, υγρασία). Απαραίτητη είναι η μελέτη της καμπύλης ανάπτυξης του μικροοργανισμού με τον οποίο πρόκειται να εργαστούμε.



Εικόνα 1.10. Τυπική καμπύλη ανάπτυξης ενός βακτηριακού πληθυσμού [90].

Μία καλλιέργεια περνάει από διακριτές φάσεις ανάπτυξης. Η πρώτη φάση είναι η λανθάνουσα (lag phase). Είναι η φάση κατά την οποία δε λαμβάνει χώρα πολλαπλασιασμός των κυττάρων στο μέσο καλλιέργειας εξαιτίας της προσαρμογής του μικροβιακού πληθυσμού στις συνθήκες [91]. Έπειτα από την προσαρμογή των κυττάρων σε αυτές τις συνθήκες εκκινείται η εκθετική φάση (exponential phase) στην οποία ο πληθυσμός των κυττάρων αυξάνεται εκθετικά. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (specific growth rate) που συμβολίζεται με το ελληνικό γράμμα «μ». Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης είναι η πρώτη παράγωγος της καμπύλης ανάπτυξης και υπολογίζεται ποσοτικά από την Εξίσωση 1.1 όπου X_0 είναι η αρχική βιομάζα, X η βιομάζα τη δεδομένη χρονική στιγμή για το διάστημα στο οποίο γίνεται ο προσδιορισμός, t_0 η χρονική στιγμή μηδέν και t η δεδομένη χρονική στιγμή.

$$\mu = \ln \frac{X - X_0}{t - t_0} \quad (\text{Εξίσωση 1.1})$$

Η επόμενη φάση είναι η στατική (stationary phase). Είναι η φάση στην οποία δεν παρατηρείται πλέον αύξηση της βιομάζας των κυττάρων εφόσον έχουν εξαντληθεί τα θρεπτικά μέσα και κυρίως ο άνθρακας. Στη στατική φάση ο αριθμός των κυττάρων που διαιρούνται είναι ίσος με τον αριθμό των κυττάρων που πεθαίνουν. Ένας άλλος λόγος που

μια καλλιέργεια φτάνει σε στατική φάση είναι εξαιτίας του γεγονότος ότι συσσωρεύονται στο θρεπτικό μέσο παραπροϊόντα του μεταβολισμού τα οποία μπορούν να έχουν τοξικές επιδράσεις στο μικροβιακό πληθυσμό. Τελευταία είναι η φάση θανάτου (death phase) στην οποία τα κύτταρα που πεθαίνουν είναι περισσότερα από αυτά που διαιρούνται. Συνήθως η φάση θανάτου δεν μπορεί να παρατηρηθεί με μετρήσεις οπτικής πυκνότητας [90].

1.7.3. Απόδοση της κατανάλωσης οργανικών υποστρωμάτων στην παραγωγή βιομάζας

Κατά την ανάπτυξη μιας καλλιέργειας υπάρχει φυσιολογικά αύξηση στη βιομάζα η οποία είναι ανάλογη της αύξησης του αριθμού των κυττάρων. Σε αυτή την περίπτωση ορίζεται ότι τα κύτταρα μεταβολίζουν το υπόστρωμα κάτω υπό συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη (growth conditions). Σε κάποιες περιπτώσεις η κατανάλωση ενός υποστρώματος δεν οδηγεί σε αύξηση της βιομάζας αλλά χρησιμοποιείται σε άλλες λειτουργίες του κυττάρου και σε εκείνη την περίπτωση τα κύτταρα διασπούν το υπόστρωμα κάτω υπό συνθήκες που δε ευνοούν την ανάπτυξη (nongrowth conditions) [90]. Το ποσό ενέργειας που απαιτείται για να συντηρηθεί ένα κύτταρο ονομάζεται *ενέργεια συντήρησης* (maintenance energy) [92]. Ως *συντελεστής απόδοσης* (yield coefficient, $Y_{x/s}$) ορίζεται ο λόγος της παραγόμενης βιομάζας ανά μάζα καταναλισκόμενου υποστρώματος.

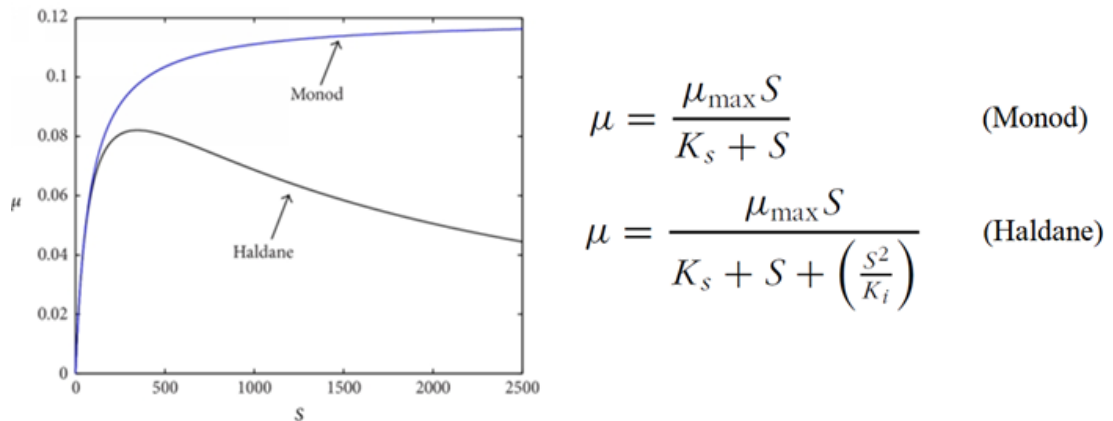
$$Y_{x/s} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t} \quad (\text{Εξίσωση 1.2})$$

Ο παραπάνω λόγος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του υποστρώματος που καταναλώνεται από το μικροβιακό πληθυσμό.

Όταν γίνεται αναφορά σε κατανάλωση υποστρωμάτων πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η αρχική ποσότητα της προς διάσπαση ουσίας (S_0) και η αρχική βιομάζα των κυττάρων που χρησιμοποιούνται (X_0). Έχει εξηγηθεί πως ο λόγος S_0/X_0 δείχνει το αρχικό ενεργειακό επίπεδο της καλλιέργειας καθώς και ότι μπορεί άμεσα να επηρεάσει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Σε καλλιέργειες που υπάρχει επαρκές υπόστρωμα ο λόγος S_0/X_0 επηρεάζει αρκετά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και κατ' επέκταση είναι πιθανό να καθορίσει τις μεταβολικές οδούς των μικροοργανισμών σε αυτές τις συνθήκες [93]. Αυτές οι παράμετροι βρίσκουν εφαρμογή σε βιοαντιδραστήρες, όχι μόνο εργαστηριακής αλλά και βιομηχανικής κλίμακας και είναι υψηλής σημασίας να εξετάζονται.

1.7.4. Κινητικά μοντέλα ανάπτυξης μικροοργανισμών

Όταν γίνεται αναφορά σε κινητικά μοντέλα ανάπτυξης μικροοργανισμών υπό την παρουσία οργανικών υποστρωμάτων (συμπεριλαμβανομένων και ξενοβιοτικών ουσιών) είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη αν το υπόστρωμα ευνοεί την προώθηση της ανάπτυξης (growth promoting substrate) ή την αναστέλλει (growth limiting substrate). Στη βιβλιογραφία έχουν προταθεί αρκετά κινητικά μοντέλα. Όσο αφορά τη βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων τα πιο διαδεδομένα είναι το μοντέλο του Monod και το μοντέλο του Haldane. Το μοντέλο του Monod δε λαμβάνει υπόψη του φαινόμενα αναστολής της ανάπτυξης σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος και έτσι δεν είναι κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί σε συνθήκες όπου εμφανίζεται αναστολή στην ανάπτυξη. Αντίθετα το μοντέλο του Haldane λαμβάνει υπόψη του αυτή την παράμετρο [94]. Στη βιβλιογραφία είναι διαθέσιμος ένας αρκετά μεγάλος αριθμός μοντέλων τα οποία περιγράφουν τη μικροβιακή βιοενεργητική.

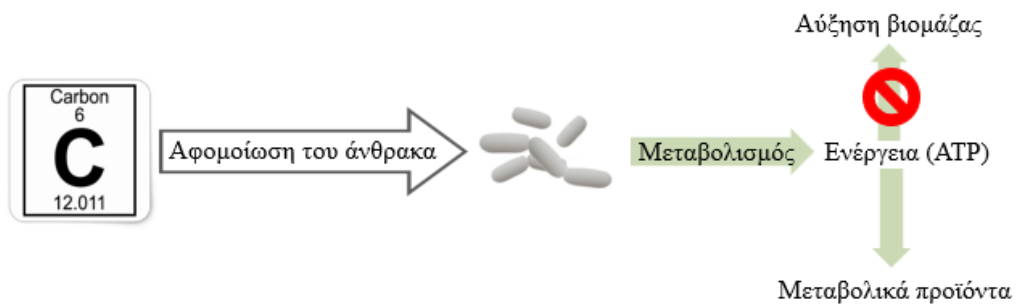


Εικόνα 1.11. Εξισώσεις και διαγραμματική απεικόνιση των εξισώσεων του Monod και του Haldane που συσχετίζουν την αρχική ποσότητα του υποστρώματος με τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης [95].

1.7.5. Μικροβιακή συντήρηση- η ελάχιστη ενέργεια που απαιτείται για την επιβίωση ενός κυττάρου

Ως ενέργεια συντήρησης (maintenance) ονομάζεται το ποσό ενέργειας το οποίο καταναλώνεται σε διεργασίες που είναι διαφορετικές από την αύξηση της βιομάζας ενός μικροοργανισμού [96]. Εφόσον η συντήρηση είναι μια κυτταρική λειτουργία που μειώνει την ανάπτυξη, η συνεισφορά της συντήρησης είναι πιο έντονη ιδιαίτερα όταν παρατηρούνται χαμηλοί ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης στις καλλιέργειες [97]. Επιπλέον η συντήρηση

εμφανίζεται σε περιπτώσεις διάσπασης πολύπλοκων υποστρωμάτων τα οποία παράγουν πολλά μεταβολικά ενδιάμεσα. 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 μεταβολικών προϊόντων. Επίσης ενέργεια μπορεί να καταναλωθεί μέσω απωλειών ή μεταβολικών μονοπατιών πολλών βημάτων (π.χ. διάσπαση μακρομορίων) όπως επίσης και εξαιτίας της κίνησης των κυττάρων, αντίδρασης στο οξειδωτικό στρες αλλά και τη διατήρηση της ωσμωτικής πίεσης στο εσωτερικό του κυττάρου [98-100].



Εικόνα 1.12. Σχηματική απεικόνιση της κατάστασης συντήρησης (maintenance). Η ενέργεια που παράγεται από το μεταβολισμό οργανικών υποστρωμάτων δε χρησιμοποιείται για την αύξηση της βιομάζας αλλά για τη διάσπαση των μεταβολικών ενδιάμεσων μέσω περίπλοκων μεταβολικών μονοπατιών που απαιτούν κατανάλωση ενέργειας.

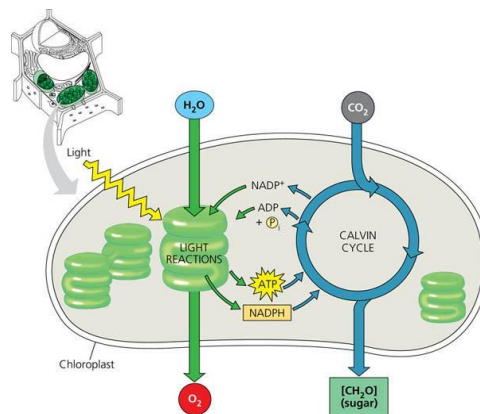
1.8 Επισκόπηση της Οξυγονικής Φωτοσύνθεσης

1.8.1. Φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης

Φωτοσύνθεση είναι η διαδικασία μετατροπής της φωτεινής ενέργειας σε χημική. Η ενέργεια του φωτός που συλλέγεται από μόρια χρωστικών στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό των φωτοσυνθετικών οργανισμών χρησιμοποιείται για την παραγωγή ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας με υψηλό αναγωγικό δυναμικό. Τα ηλεκτρόνια αυτά χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ATP και NADPH σε μία σειρά αντιδράσεων που ονομάζονται *φωτεινές αντιδράσεις* διότι προκειμένου να πραγματοποιηθούν χρειάζονται φως. Στη συνέχεια τα μόρια ATP και NADPH μέσω ενζυμικής δράσης ανάγουν το διοξείδιο του άνθρακα και το μετατρέπουν σε 3-φωσφογλυκερικό μέσω μιας σειράς αντιδράσεων γνωστών ως *κύκλος του*

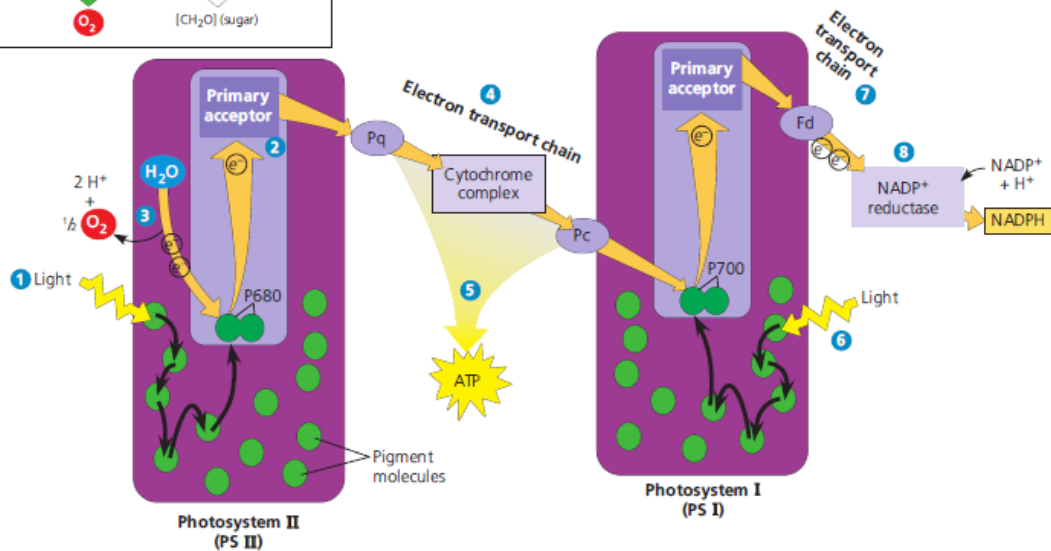
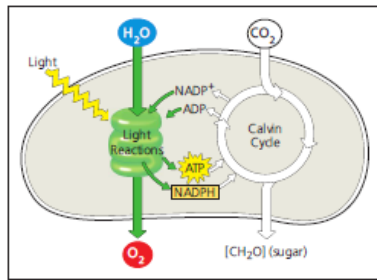
Calvin [101]. Στα μικροφύκη και τα φυτά η φωτοσύνθεση πραγματοποιείται στις θηλακοειδείς μεμβράνες των χλωροπλαστών.

Αρχικά τα οι χρωστικές της φωτοσυνθετικής κεραίας δεσμεύουν το φως με απορρόφηση τού και έπειτα μέσω φαινομένων συντονισμού μεταφέρουν την ενέργεια του στα κέντρα αντίδρασης. Αυτές οι περιφερειακές χρωστικές βρίσκονται στα σύμπλοκα συλλογής φωτός και περιέχουν κυρίως μόρια χλωροφύλλης-b και καροτενοειδή και σε μικρότερο βαθμό χλωροφύλλη-a. Αυτές επιτυγχάνουν αποτελεσματική μεταφορά της ενέργειας του φωτός στα κέντρα αντίδρασης.



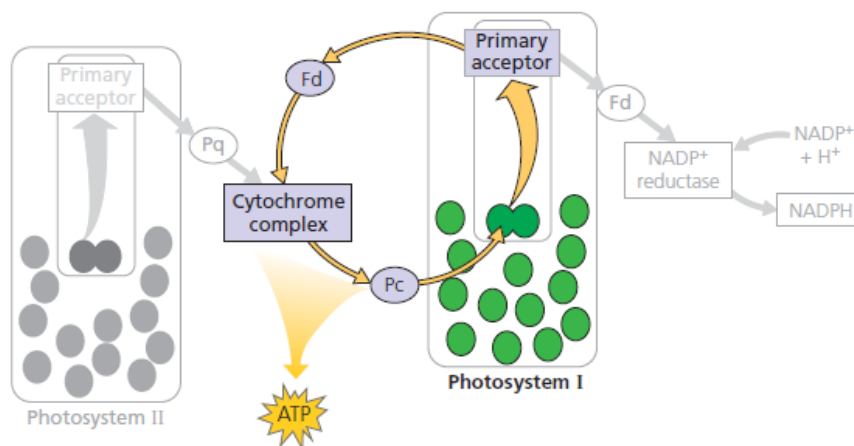
Εικόνα 1.13. Επισκόπηση των φωτεινών αντιδράσεων και αντιδράσεων καθήλωσης του διοξειδίου του άνθρακα της φωτοσύνθεσης [102].

Στο κέντρο αντίδρασης του φωτοσυστήματος II η απορρόφηση ενός φωτονίου από τη χλωροφύλλη του κέντρου αντίδρασης (P680) προκαλεί διέγερσή της με αποτέλεσμα τη μετατροπή της σε ισχυρό αναγωγικό ικανό να μεταφέρει άμεσα ένα ηλεκτρόνιο σε ένα μόριο φαιοφυτίνης. Στη συνέχεια το ηλεκτρόνιο μεταφέρεται σε μία σειρά μορίων πλαστοκινόνης οι οποίες ανάγονται σε πλαστοκινόλη και οδηγούν στην παραγωγή βαθμίδωσης συγκέντρωσης πρωτονίων. Το κέντρο αντίδρασης επανακτά τα ηλεκτρόνια του από την οξείδωση του νερού σε μοριακό οξυγόνο μέσω ενός κέντρου με τέσσερα ιόντα μαγγανίου. Έπειτα η πλαστοκινόλη επανοξειδώνεται από το σύμπλεγμα κυτοχρωμάτων b₆f το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνια προς την πλαστοκυανίνη. Από την πλαστοκυανίνη τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο φωτοσύστημα I, όπου η διέγερση ενός ειδικού ζεύγους P700 απελευθερώνει ηλεκτρόνια τα οποία ρέουν προς τη φερρεδοξίνη. Η αναγωγή του ζεύγους φερρεδοξίνης-NADP⁺ καταλύει τη σύνθεση του NADPH. Ταυτόχρονα με τη ροή ηλεκτρονίων παράγεται μία βαθμίδωση της συγκέντρωσης πρωτονίων με αποτέλεσμα την παραγωγή ATP από τη συνθάση της ATP.



Εικόνα 1.14. Σχήμα Z των φωτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης [102].

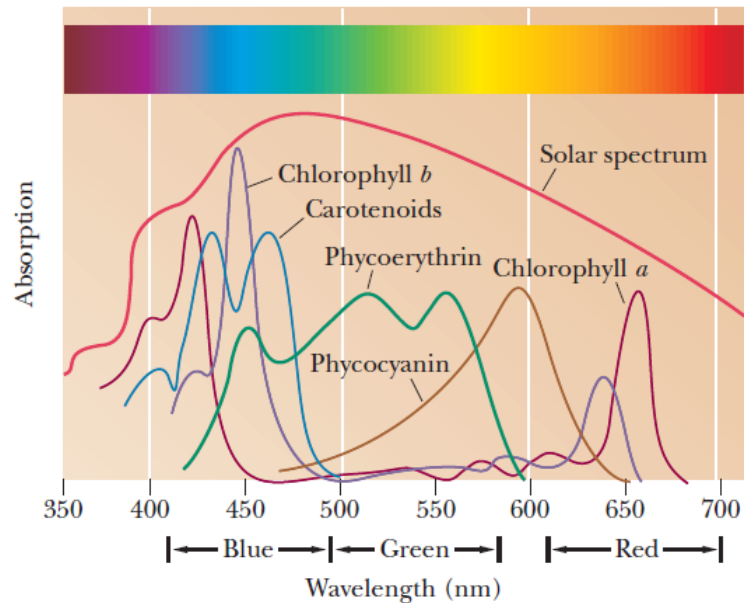
Σε περίπτωση όπου ο λόγος $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ είναι υψηλός ενεργοποιείται η κυκλική ροή ηλεκτρονίων η οποία χρησιμοποιεί το φωτοσύστημα I και όχι το φωτοσύστημα II. Τα ηλεκτρόνια από τη φερρεδοξίνη επιστρέφουν στο σύμπλεγμα κυτοχρωμάτων και από εκεί μεταφέρονται σε μία χλωροφύλλη του κέντρου αντίδρασης του φωτοσυστήματος I. Δεν λαμβάνει χώρα παραγωγή οξυγόνου και NADPH ενώ παράγεται ATP .



Εικόνα 1.15. Κυκλική φωτοφωσφορυλίωση [102].

1.8.2. Φωτοσυνθετικές χρωστικές

Οι κυριότερες φωτοσυνθετικές χρωστικές είναι οι χλωροφύλλες, τα καροτενοειδή, η φυκοκυανίνη και η φυκοερυθρίνη. Οι τελευταίες δύο βρίσκονται στα κυανοβακτήρια και στα ερυθροφύκη αντίστοιχα. Όσο αφορά τα φωτοσυνθετικά μικροφύκη και τα ανώτερα φυτά, αυτά περιέχουν κυρίως χλωροφύλλες και καροτενοειδή. Στη φωτοσύνθεση οι χρωστικές χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για την απορρόφηση της φωτεινής ενέργειας που απαιτείται για τη διαδικασία.

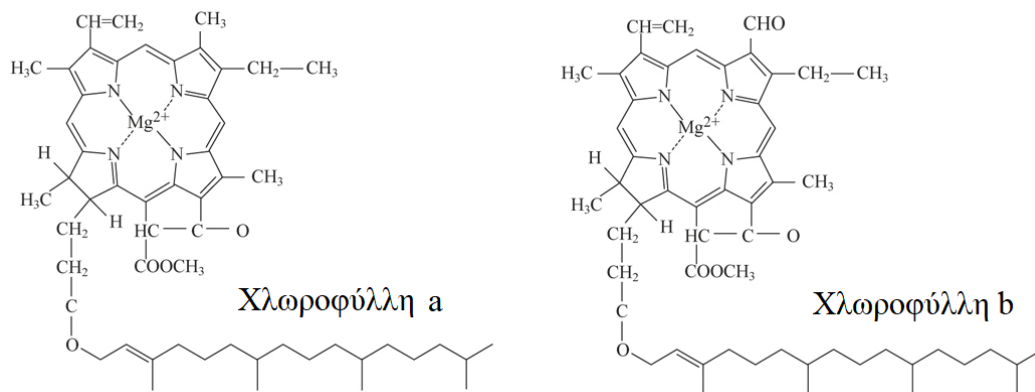


Εικόνα 1.16. Φάσματα απορρόφησης ορατού των κυριότερων φωτοσυνθετικών χρωστικών [103].

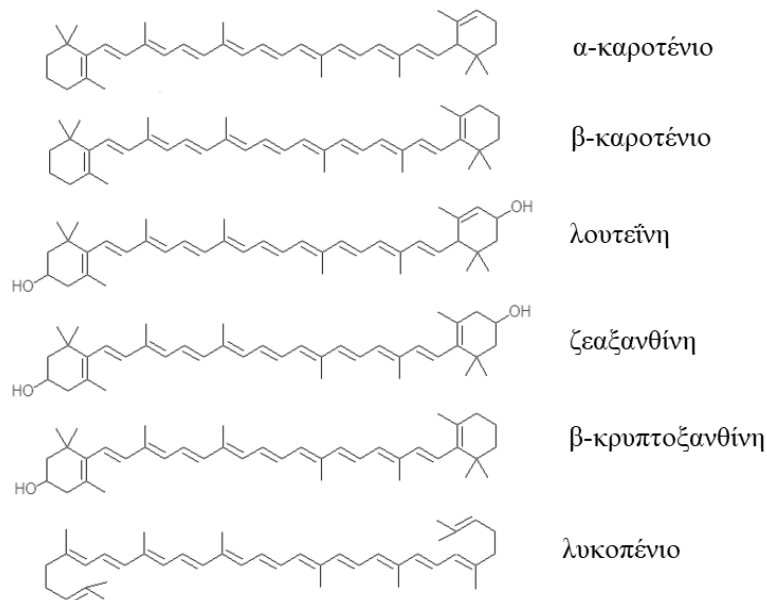
Οι χρωστικές βρίσκονται στους χλωροπλάστες των κυττάρων, όπου συνδέονται με πρωτεΐνες των θυλακοειδών. Υπάρχουν πολλά είδη χλωροφυλλών, με τις σημαντικότερες να είναι η χλωροφύλλη-*a* και η χλωροφύλλη-*b*. Η χλωροφύλλη-*a* συναντάται σε όλα τα φυτά, φύκη και κυανοβακτήρια που φωτοσυνθέτουν, ενώ η χλωροφύλλη-*b* υπάρχει στα πράσινα φύκη και στα ανώτερα φυτά. Η χλωροφύλλη *a* είναι η χρωστική στα κέντρα αντίδρασης των φωτοσυστημάτων. Οι χλωροφύλλες-*a* και *b* διαφέρουν δομικά στη θέση 3 του δακτυλίου 3 όπου η χλωροφύλλη-*a* φέρει μια μεθυλομάδα ενώ η χλωροφύλλη-*b* μία αλδεϋδομάδα. Η χλωροφύλλη-*a* εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 430 nm και 662 nm, ενώ η χλωροφύλλη-*b* στα 453 nm και 642 nm.

Τα καροτενοειδή είναι επικουρικές φωτοσυλλεκτικές χρωστικές στα σύμπλοκα συλλογής φωτός, όπου μεταφέρουν την ενέργεια σε χλωροφύλλες του κέντρου αντίδρασης.

Επιπλέον διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φωτοπροστασία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού αποσβaineοντας την περίσσεια ενέργειας ως θερμότητα. Είναι χρωστικές χρώματος κόκκινου, πορτοκαλί και κίτρινου και συμπεριλαμβάνουν τα καροτένια, τα οποία είναι υδρογονάνθρακες και τις ξανθοφύλλες που είναι τερπενοειδή με ομάδες υδροξειδίου ή εποξειδίου. Τα κυριότερα καροτένια περιλαμβάνουν το α-καροτένιο, β-καροτένιο και το λυκοπένιο, ενώ στις ξανθοφύλλες περιλαμβάνονται η λουτεΐνη, η ζεαξανθίνη, η νεοξανθίνη και η βιολαξανθίνη. Τα καροτενοειδή απορροφούν σε μήκη κύματος 400-550 nm.



Εικόνα 1.17. Δομές της χλωροφύλλης-a και χλωροφύλλης-b.



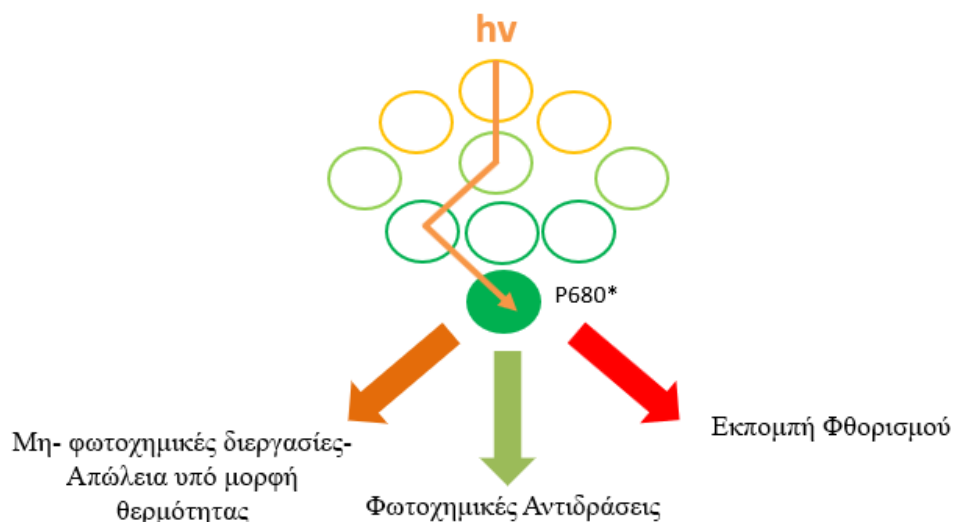
Εικόνα 1.18. Δομές αντιπροσωπευτικών καροτενοειδών

1.8.3. Φθορισμός χλωροφύλλης

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 [104] 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 η περίπτωση στην οποία δεν υπάρχει διαθέσιμος οξειδωμένος δέκτης ηλεκτρονίων σε κάποιο σημείο στην πορεία της ηλεκτρονιακής μεταφοράς.



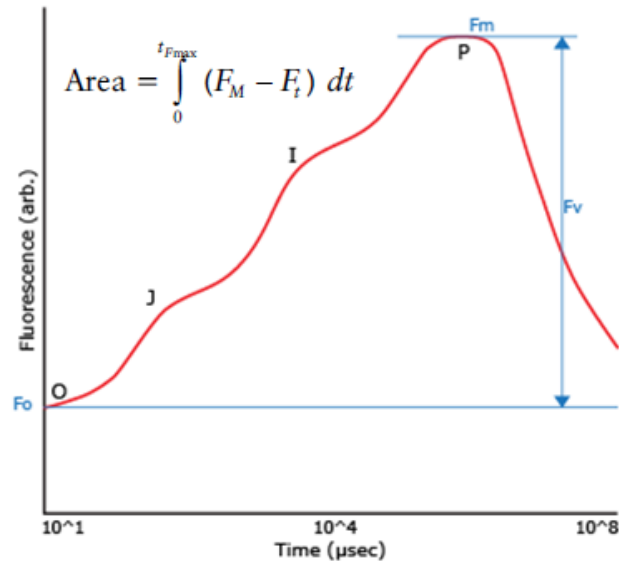
Εικόνα 1.19. Ροή της ενέργειας που απορροφάται από τη φωτοσυλλεκτική κεραία και διοχετεύεται στα κέντρα αντίδρασης.

Πριν από τη μέτρηση του φθορισμού είναι απαραίτητη η προσαρμογή του προς μελέτη δείγματος στο σκοτάδι προκειμένου να αδειάσουν από ενέργεια όλα τα διαθέσιμα κέντρα αντίδρασης και όλα τα φωτοσυλλεκτικά μόρια να επιστρέψουν στη θεμελιώδη τους κατάσταση. 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). Η ταχεία αυτή μεταβολή του φθορισμού περιγράφεται από την καμπύλη του Kautsky στην οποία όταν ο άξονας x παρουσιαστεί σε λογαριθμική κλίμακα παρουσιάζει την πολυφασική μεταβολή του φθορισμού. Οι μεταβολές αυτές εμφανίζονται σε όλα τα φυτά, μικροφύκη και κυανοβακτήρια κάτω υπό φυσιολογικές συνθήκες. Από την καμπύλη ταχείας μεταβολής επαγωγικού φθορισμού μπορεί να υπολογιστεί η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση η οποία ισούται με το λόγο F_v / F_m όπου $F_v = F_m - F_0$. Επιπλέον η περιοχή πάνω από την καμπύλη (Area) ανάμεσα στις τιμές F_0 και F_m είναι αντιπροσωπευτική των διαθέσιμων δεκτών κινονών (Q_a) στην αναγωγική πλευρά του φωτοσυστήματος II. Εάν για οποιοδήποτε λόγο μεταφορά ηλεκτρονίων από τα κέντρα αντίδρασης προς την πλαστοκινόνη παρεμποδίζεται αυτή η παράμετρος μειώνεται σημαντικά [105, 106].

Τα δεδομένα που συλλέγονται από τα στάδια O-J-I-P της ταχείας μεταβολής του φθορισμού μπορούν να υποστούν περαιτέρω επεξεργασία και έχει αναπτυχθεί η μέθοδος που ονομάζεται JIP-test. Αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταχεία παρακολούθηση πολλών δειγμάτων παρέχοντας επαρκείς πληροφορίες για τη δομή, διαμόρφωση και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού τους. Πιο συγκεκριμένα είναι δυνατόν να υπολογιστεί μία σειρά φαινομενολογικών και βιοφυσικών παραμέτρων οδηγώντας στην περιγραφή ενός φωτοσυνθετικού δείγματος σε δεδομένη φυσιολογική κατάσταση. Ο τρόπος υπολογισμού αυτών των παραμέτρων έχει παρουσιαστεί αναλυτικά στη βιβλιογραφία [107].

Το σύνολο των παραμέτρων υπολογίζεται μέσω ενός απλοποιημένου μοντέλου ροών ενέργειας στις βιολογικές μεμβράνες όπου περιλαμβάνονται εξισώσεις για ειδικές ροές ενέργειας (ανά κέντρο αντίδρασης, RC) είτε φαινομενολογικές ροές ενέργειας (ανά επιφάνεια διατομής, CS) [107, 108]. Ως ABS συμβολίζεται η ροή φωτονίων που απορροφάται από τις χρωστικές της κεραίας, ως DI η ροή των ηλεκτρονίων που διασκορπίζεται και δε συμμετέχει στη φωτοχημεία, ως RC το σύνολο των ενεργών κέντρων αντίδρασης, ως TR η ροή ενέργειας

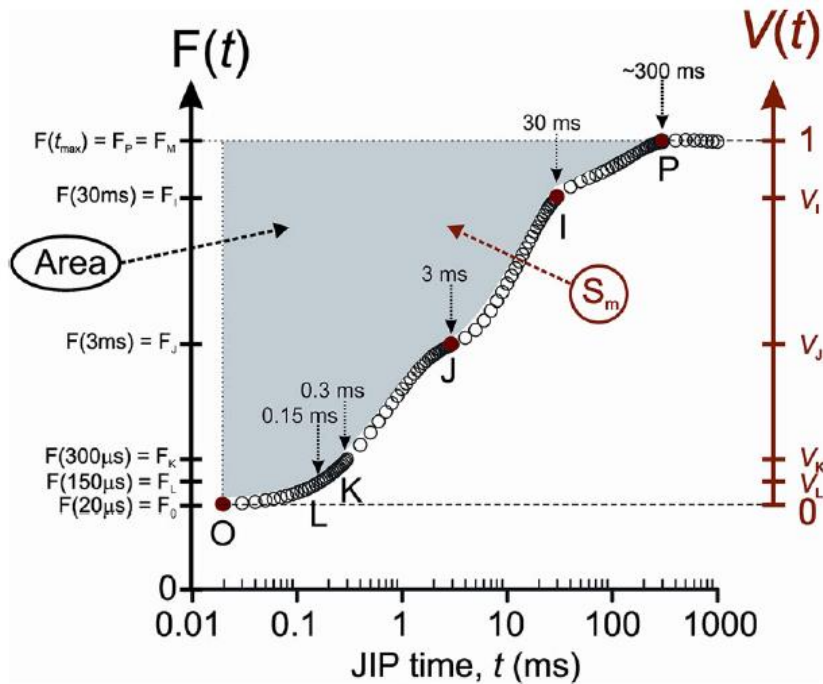
που παγιδεύεται στα κέντρα αντίδρασης και οδηγεί στην αναγωγή της πλαστοκινίνης και ως ΕΤ η ροή ενέργειας που αντιστοιχεί στη μεταφορά ηλεκτρονίων πέραν της πλαστοκινόλης.



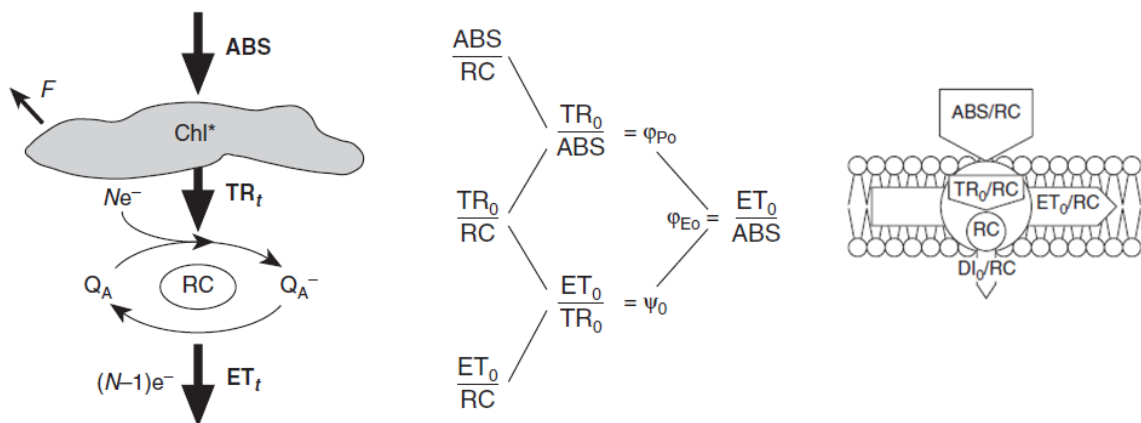
Εικόνα 1.20. Τυπική καμπύλη μεταβολής επαγωγικού φθορισμού¹.

Στη συγκεκριμένη εργασία ελήφθησαν υπόψη ο λόγος RC/CS_0 που δείχνει την πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης, η κβαντική απόδοση της πρωταρχικής φωτοχημείας ($\phi_{P_0}=TR_0/ABS$) που αποτελεί το λόγο της ενέργειας που παγιδεύεται στα κέντρα αντίδρασης προς την ενέργεια που απορροφήθηκε από τη φωτοσυνθετική κεραία, η αποτελεσματικότητα κατά την οποία μία διέγερση μπορεί να μετακινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την ανηγμένη μορφή της πλαστοκινόνης ($\psi_0=ET_0/TR_0$), ο λόγος DI_0/RC που ανταποκρίνεται στο ποσό ενέργειας που χάνεται ως θερμότητα ανά κέντρο αντίδρασης και ο λόγος ABS/RC που συνδέεται με το μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας. Η εικόνα 1.22 παρουσιάζει ένα απλοποιημένο μοντέλο των ροών ενέργειας κατά την απορρόφηση φωτός στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης.

¹<http://www.hansatech-instruments.com/products/introduction-to-chlorophyll-fluorescence/continuous-excitation-chlorophyll-fluorescence/handy-pea/>



Εικόνα 1.21. Χρονικά σημεία και παράμετροι που χρησιμοποιούνται στο JIP test. Αριστερά η μη-κανονικοποιημένη κλίμακα του φορισμού που σχετίζεται με τη συμπληρωματική περιοχή (Area) και δεξιά η κανονικοποιημένη κλιμακα ανάμεσα στα O και P στάδια [109].



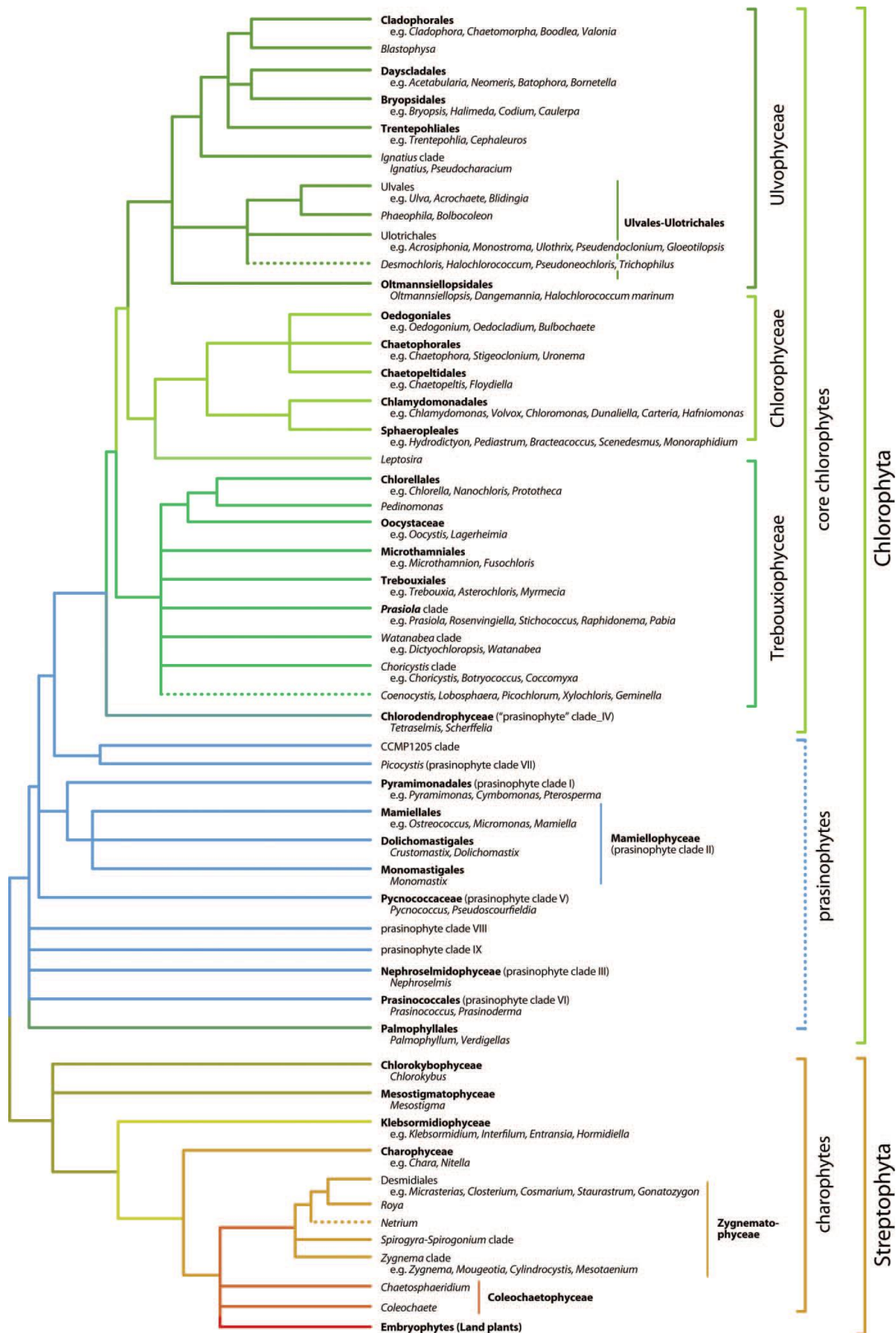
Εικόνα 1.22. Μοντέλα ροών ενέργειας μέσα στη μεμβράνη [105].

1.9 Φωτοσυνθετικά 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 κυριότερες κατηγορίες μικροφυκών είναι τα χλωρόφυτα, τα ερυθροφύκη και τα απτόφυτα. Τα μέλη του γένους χλωροφυτά μπορούν να βρεθούν σε γλυκά και αλμυρά ύδατα ή ακόμα και σε επίγεια περιβάλλοντα. Περιλαμβάνουν μονοκύτταρους και πολυκύτταρους οργανισμούς που περιέχουν χλωροφύλλες a και b σε χλωροπλάστες που περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη. Κυριότεροι εκπρόσωποι των μονοκύτταρων χλωρόφυτων είναι τα γένη *Chlamydomonas*, *Chlorella* και *Scenedesmus* [110]. Τα ερυθροφύκη είναι κυρίως θαλάσσια πολυκύτταρα είδη, ενώ σπανιότερα συναντώνται είδη του γλυκού νερού ή μονοκύτταρα. Τα κύτταρα είναι σφαιρικά με έναν κεντρικό πυρήνα και περιέχουν ένα μεγάλο ενιαίο χλωροπλάστη που περιβάλλεται από δύο μεμβράνες με κεντρικό πυρηνοειδές [111]. Τα απτόφυτα είναι κυρίως μονοκύτταροι οργανισμοί. Τα περισσότερα είδη ανπτύσσονται σε αλμυρά ύδατα. Όλα τα απτόφυτα περιέχουν χλωροπλάστες και ένα πυρήνα με πυρηνικό φάκελο [112]. Ένα φυλογενετικό δέντρο παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.23. Εξαιτίας της ευρείας ποικιλομορφίας αλλά και της εξελικτικής διαφοροποίησης οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να αποτελέσουν εργαλείο στην παραγωγή φυσικών προϊόντων υψηλής βιομηχανικής και φαρμακευτικής αξίας, εναλλακτικών μορφών ενέργειας καθώς και να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές βιοαποκατάστασης [87].

1.10 Βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων από φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς

Οι περισσότερες αναφορές στη βιβλιογραφία σε σχέση με την αποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων σχετίζονται με βακτήρια και μύκητες [3]. Η ιδέα χρήσης μικροφυκών παρουσιάστηκε αρχικά από τους Oswald και Gotaas το 1957 οι οποίοι πρότειναν τη χρήση της φωτοσύνθεσης ως μια μέθοδο ταυτόχρονης παραγωγής οξυγόνου και διαχείρισης αποβλήτων [113]. Τα κύρια πλεονεκτήματα της χρήσης μικροφυκών σε διαδικασίες αποκατάστασης έχει να κάνει με τις χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις διότι οι οργανισμοί αυτοί χρειάζονται μόνο φως και αέρα για να αναπτυχθούν γεγονός που κάνει τη μέθοδο να έχει χαμηλό κόστος εξαιτίας της χρήσης μίας άφθονης πηγής ενέργειας. Επιπλέον μειώνεται ο σχηματισμός ιζημάτων από μικροοργανισμούς ενώ η βιομάζα μετά το πέρας της διαδικασίας

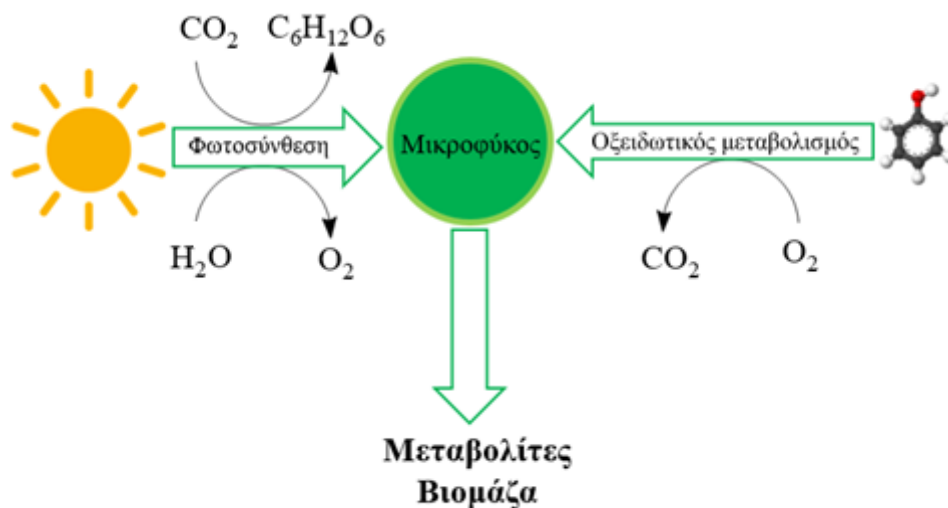


Εικόνα 1.23. Φυλογενετικό δέντρο των εξελικτικών σχέσεων των πράσινων μικροφυκών βασισμένο σε μοριακά δεδομένα [110].

μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παραγωγή βιοκαυσίμων [114-116]. Το σχήμα της βασικής ιδέας παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.24.

Κατά καιρούς υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία για διάφορα είδη μικροφυκών του γλυκού νερού που έχουν χρησιμοποιηθεί για την αποικοδόμηση της φαινόλης και της κατεχόλης. Μία σημαντική παρατήρηση ήταν η αυξημένη παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα κατά τη διαδικασία βιοαποικοδόμησης ενώ η διαδικασία λάμβανε χώρα κάτω υπό αερόβιες συνθήκες [117]. Έτσι λοιπόν η βασική ιδέα μπορεί να είναι ότι τα μικροφύκη μέσω της φωτοσύνθεσης μπορούν να παράγουν οξυγόνο το οποίο έπειτα μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των φαινολικών ενώσεων. Αυτή η διαδικασία πλεονεκτεί διότι το οξυγόνο παράγεται φωτοσυνθετικά και δεν παρέχεται εξωγενώς. Το τελικό προϊόν της διαδικασίας αποικοδόμησης είναι διοξείδιο του άνθρακα το οποίο μπορεί έπειτα να χρησιμοποιηθεί κατά τη φωτοσύνθεση.

Έκτοτε έχουν δημοσιευτεί αρκετά άρθρα με μικροφύκη ικανά να αποικοδομούν φαινολικές ενώσεις. Σε μία μηχανιστική μελέτη το μικροφύκος *Ochromonas danika* βρέθηκε να αποικοδομεί τη φαινόλη μέσω του μετα μεταβολικού μονοπατιού. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι μετρήθηκε και η ενεργότητα του ενζύμου της αφυδρογονάσης της υδροξυμουκονικής ημιαλδεΐδης και βρέθηκε να είναι από 5 έως 23 φορές λιγότερο ενεργή σε σχέση με είδη του γένους *Pseudomonas* [118].

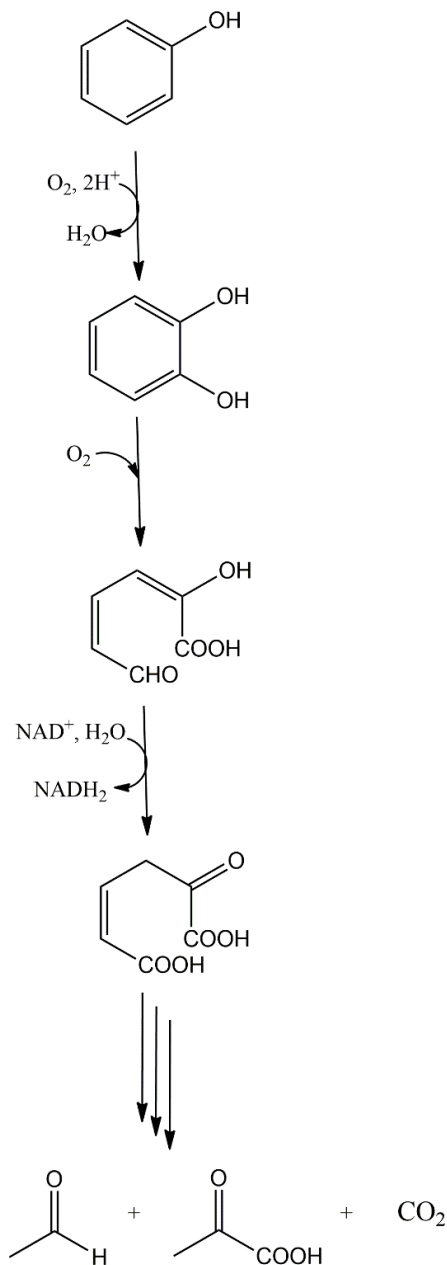


Εικόνα 1.24. Βασική ιδέα χρήσης μικροφυκών σε διαδικασίες αποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων.

Σε είδη του γένους *Chlorella* βρέθηκε πως στη διαδικασία οξειδωσης εμπλέκεται η μονοοξυγενάση του κυτοχρώματος-P450 ενώ στο γένος *Thalassiosira* λάμβαναν χώρα αντιδράσεις εξαρτώμενες από το NADH [119, 120]. Τα μικροφύκη *Ankistrodesmus braunii* και *Scenedesmus quadricauda*, έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για να αποικοδομήσουν φαινολικές ενώσεις [121].

Τα πιο διαδεδομένα μικροφύκη που έχουν χρησιμοποιηθεί για εφαρμογές βιοαποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων ανήκουν στα γένη *Chlorella* και *Scenedesmus*. Μία σειρά από δημοσιεύσεις έχει δείξει ότι το γένος *Chlorella* είναι ικανό να αποικοδομήσει ένα μεγάλο αριθμό από φαινολικά υποστρώματα συμπεριλαμβανομένων της φαινόλης, της δισφαινόλης-A, της 4-νιτροφαινόλης, της 4-χλωροφαινόλης, της 2,4-δινιτροφαινόλης και της 2,4-διμέθυλοφαινόλης [122-125]. Κοινό χαρακτηριστικό όλων των παραπάνω μελετών ήταν η παρουσία μιας εναλλακτικής πηγής άνθρακα και συνθήκες φωτισμού. Κύτταρα του γένους *Scenedesmus* έχουν βρεθεί ικανά να αποικοδομούν ένα μεγάλο αριθμό από ακυλιωμένες φαινόλες, αλκυλοφαινόλες και αλογονοφαινόλες [126-129].

Παρόλα αυτά ελάχιστες είναι οι μελέτες που εστιάζουν στη βιοενεργητική θεώρηση της αποικοδόμησης των φαινολικών ενώσεων. Σε μία από αυτές το είδος *Scenedesmus obliquus* που καλλιεργήθηκε σε διάφορες φαινολικές ενώσεις έδειξε σημαντική ανάπτυξη σε σχέση με συνθήκες όπου η εναλλακτική πηγή άνθρακα ήταν διοξείδιο του άνθρακα ή απλά στο μέσο υπήρχε μόνο η φαινολική ένωση ως πηγή άνθρακα. Την ίδια στιγμή φάνηκε πως η παρουσία γλυκόζης εξυπηρετούσε το μικροφύκος να αποικοδομεί μεγαλύτερες ποσότητες από αλογονωμένες φαινόλες. Στη μελέτη αυτή φάνηκε πως το καθοριστικό βήμα στην αποικοδόμηση ήταν η αφαιολόγηση του αρωματικού δακτυλίου. Η μελέτη αυτή απέδειξε πως ο πιο σημαντικός παράγοντας στη βιοαποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων ήταν η επιλογή των κατάλληλων συνθηκών και όχι του οργανισμού [130]. Επιπλέον βρέθηκε ότι η αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων επηρεαζόταν από φαινόμενα επαγωγής και συντονισμού στον αρωματικό δακτύλιο [128]. Λίγο αργότερα προτάθηκε ένα δυναμικό υπολογιστικό μοντέλο για την αερόβια αποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων από μικροφύκη. Το μοντέλο πρότεινε πως υπάρχει περίπτωση να υπάρξει αναστολή στην αποικοδόμηση όταν στο μέσο καλλιέργειας υπάρχει μία οργανική πηγή άνθρακα που ενισχύει την ανάπτυξη (π.χ. γλυκόζη) εξαιτίας του ανταγωνισμού των ενζύμων για το μοριακό οξυγόνο ενώ την ίδια στιγμή η παρουσία της ενίσχυε τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης [131].



Εικόνα 1.25. Μεταβολικό μονοπάτι διάσπασης της φαινόλης από το *Ochromonas danika*. Το ενδιάμεσο κατεχόλης διασπάται μέσω του *μετα* μεταβολικού μονοπατιού. Τελικά προϊόντα είναι η ακεταλδεΐδη, το πυροσταφυλικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα [118].

Πρόσφατα το είδος *Chlamydomonas mexicana* βρέθηκε ικανό να απομακρύνει από το μέσο καλλιέργειας τη δισφαινόλη-A ενώ αυξημένες ποσότητες αυτής της ουσίας οδηγούσαν σε αύξηση της συγκέντρωσης υδατανθράκων στα κύτταρα εξαιτίας της απόκρισης στην καταπόνηση [132]. Επίσης το είδος *Chlorella pyrenoidosa* βρέθηκε ότι μπορεί να διασπά πλήρως τη φαινόλη σε αρχική συγκέντρωση 200 mg/L τόσο μέσω του *ortho* όσο και μέσω του

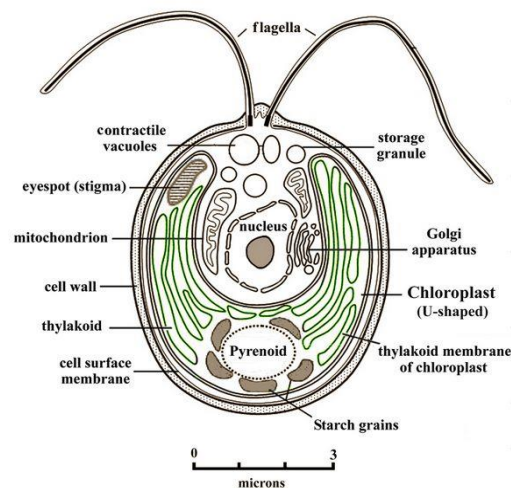
μετα μεταβολικού μονοπατιού. Ανιχνεύτηκαν ενδοκυττάριοι μεταβολίτες και των δύο μονοπατιών ενώ χαρακτηριστικό ήταν ότι στο μέσο καλλιέργειας συσσωρευόταν κατεχόλη. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει πως το καθοριστικό βήμα στην αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων είναι η διάσπαση του σταθερού αρωματικού δακτυλίου. Σημαντική ήταν η παρατήρηση της συσσώρευσης ουδέτερων λιπιδίων στο κύτταρο. Η μελέτη αυτή πρότεινε ότι η χρήση μικροφυκών μπορεί να έχει διπλό όφελος. Από τη μία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη διάσπαση οργανικών ρύπων και από την άλλη η βιομάζα να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία [133]. Φαίνεται πως η στρατηγική που ακολουθείται πλέον είναι η επιλογή του κατάλληλου φωτοσυνθετικού μικροοργανισμού ή συνόλου μικροοργανισμών που έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν συγκεκριμένες ενώσεις και έπειτα γνωρίζοντας τις μεταβολές που προκαλούνται σε επίπεδο μεταβολισμού να πραγματοποιηθεί εκμετάλλευση της βιομάζας [134]. Το 2014 για πρώτη φορά απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε μια εξωκυττάρια λακκάση από το μικροφύκος *Tetracystis aerea* και σχετίζεται με την οξειδωση φαινολικών ενώσεων [135]. Εκτενείς βιοενεργητικές μελέτες για τη βιοαποικοδόμηση υποκατεστημένων φαινολικών ενώσεων έχουν διεξαχθεί στο μικροφύκος *Scenedesmus obliquus*. Ο μικροοργανισμός βρέθηκε ικανός να αποικοδομεί μία σειρά από διχλωροφαινόλες μέσω αυτότροφων και μεικτότροφων συνθηκών με αποτέλεσμα να υπάρξει διαφοροποίηση όσο αφορά την επίδραση των υποκαταστατών. Μάλιστα βρέθηκε ότι οι διχλωροφαινόλες οι οποίες είχαν υποκαταστάση σε μετα θέση ως προς την ομάδα υδροξειδίου ήταν λιγότερο επιρρεπείς στο να βιοαποικοδομηθούν ενώ η ένωση 3,5-διχλωροφαινόλη δεν ήταν δυνατό να αποικοδομηθεί δείχνοντας emphaticά τη σημασία της θέσης των υποκαταστατών στον αρωματικών δακτύλιο [136]. Μάλιστα στον ίδιο μικροοργανισμό βρέθηκε ότι οι μετα-διχλωροφαινόλες μιμούνται ενδογενείς μεταφορείς ηλεκτρονίων και πρωτονίων στους χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια του μικροφύκου, αναστέλουν τη λειτουργία του φωτοσυστήματος II και ενισχύουν τη δραστηριότητα του φωτοσυστήματος I και της υδρογενάσης με αποτέλεσμα την παραγωγή υδρογόνου [137]. Πρόσφατα στον ίδιο μικροοργανισμό βρέθηκε πως κατά την αποικοδόμηση της τυροσόλης και της υδροξυ-τυροσόλης, το μέτρο στο οποίο αποικοδομείται η εκάστοτε ουσία έχει να κάνει με τη διαχείριση των αποθεμάτων ενέργειας από το μικροοργανισμό. Αυτότροφες συνθήκες ανάπτυξης και υψηλές συγκεντρώσεις των φαινολικών ενώσεων βρέθηκαν να επάγουν υψηλότερα ποσά αποικοδόμησης συγκριτικά μεικτοτροφικές συνθήκες και χαμηλές συγκεντρώσεις των παραπάνω φαινολικών ενώσεων [138]. Φαίνεται πως η μεταβολική

ευελιξία των μικροφυκών δίνει μια νέα διάσταση στην αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων με περαιτέρω εφαρμογές και προτείνει μία νέα ακολουθούμενη στρατηγική με εφαρμογή στην αποκατάσταση του περιβάλλοντος.

1.11 Το πράσινο μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*

1.11.1. Ταξινόμηση και φυσιολογία του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii*

Το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* είναι ένας ευκαρυωτικός, μονοκύτταρος οργανισμός και εντάσσεται στα πράσινα άλγη που μπορούν να βρεθούν είτε στο χώμα είτε σε βιότοπους γλυκού νερού. Δομικά αυτά τα κύτταρα του γένους έχουν κυτταρικό τοίχωμα, ένα μεγάλο κυπελοειδή χλωροπλάστη (σχήματος U) ο οποίος μερικώς περικυκλώνει τον πυρήνα δύο μαστίγια, και τουλάχιστον ένα πυρηνοειδές μέσα στο χλωροπλάστη και μία κεραία. Τα κύρια συστατικά του κυτταρικού του τοιχώματος αποτελούνται από γλυκοπρωτεΐνες πλούσιες σε υδρόξυ-προλίνη με τα κυρίαρχα σάκχαρα να είναι αραβινόζη, μαννόζη, γαλακτόζη και γλυκόζη. Η αναπαραγωγή των κυττάρων πραγματοποιείται είτε μέσω μίτωσης είτε μέσω μείωσης.



Εικόνα 1.26. Κυτταρική δομή του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii*ⁱⁱ.

ⁱⁱ <https://bit.ly/2xgKDd9>

Τα κύτταρα του είδους μπορούν να μεγαλώσουν σε ένα απλό θρεπτικό μέσο ανόργανων αλάτων, χρησιμοποιώντας τη φωτοσύνθεση για να εξασφαλίσουν ενέργεια. Μπορούν επίσης να μεγαλώσουν σε απόλυτο σκοτάδι αν τους παρέχεται οξικό οξύ ως εναλλακτική πηγή άνθρακα. 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 και έχει υπάρξει ο συνδετικός κρίκος ανάμεσα στα κυανοβακτήρια και τα φυτά, αν και είναι πιο συγκρίσιμο με τα φυτά. Τέλος είναι απλοειδές και είναι ένας ιδανικός οργανισμός για μελέτες μεταλλαξιγένεσης που αφορούν το φωτοσυνθετικό μηχανισμό, διότι περιέχει έναν χλωροπλάστη ανά κύτταρο και το γονιδιώμα του έχει αποκρυπτογραφηθεί [139-142].

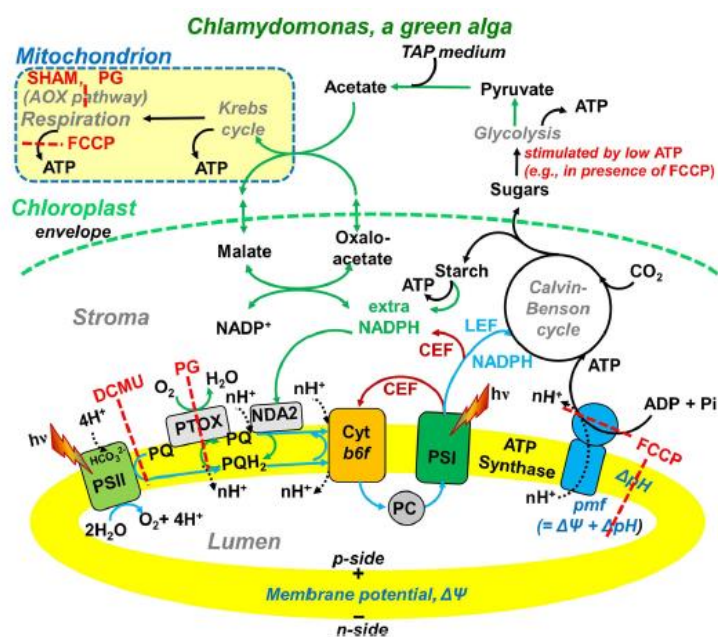
Πίνακας 1.1. Συστηματική ταξινόμηση του *Chlamydomonas reinhardtii*.

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

1.11.2. Ροή του άνθρακα στο μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*

Το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* διαθέτει ένα ευέλικτο δίκτυο ροής του άνθρακα με πολλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μεταβολικών μονοπατιών [143]. Τα κύτταρα αυτού του είδους μπορούν να αναπτυχθούν με τρεις διαφορετικούς τρόπους: αυτότροφα όταν τους παρέχεται διοξείδιο του άνθρακα στο φως, ετερότροφα όταν τους παρέχεται οξικό οξύ ως πηγή άνθρακα στο σκοτάδι ή μειζότροφα όταν τους παρέχεται οξικό οξύ στο φως [144]. Χαρακτηριστικό είναι ότι ο μικροοργανισμός δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε γλυκόζη ή δομικά όμοια μόρια. Όταν το μικροφύκος αναπτύσσεται κάτω υπό αναερόβιες συνθήκες ζυμώνει υδατάνθρακες και αυτό άμεσα έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή υδρογόνου [145].

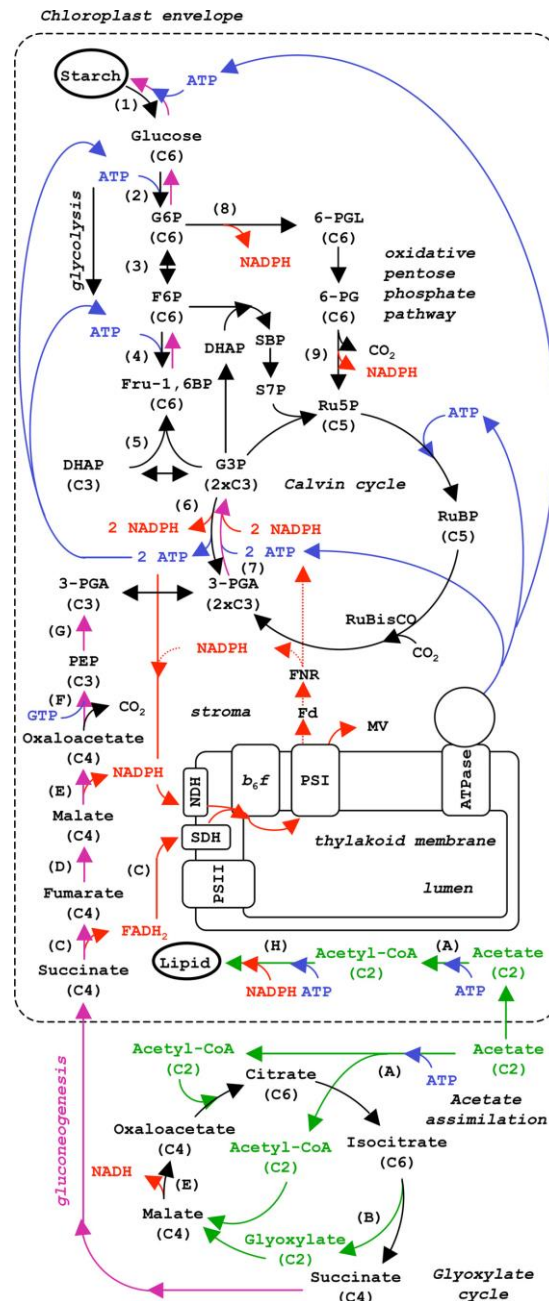
Κάτω υπό αερόβιες συνθήκες το οξικό οξύ μεταβολίζεται σε τριόζες ακολουθώντας μια ATP-εξαρτώμενη είσοδο στον κύκλο του γλυκοξυλικού οξέος στον οποίο ο ανόργανος άνθρακας ανάγεται σε τριόζες κατά τη φωτοσύνθεση [146]. Ο μεταβολισμός του οξικού οξέος μπορεί να επιφέρει αντιτιθέμενες επιρροές στη χρήση του ανόργανου άνθρακα. Έχει βρεθεί ότι μπορεί να αναστείλει προσωρινά τη φωτοσύνθεση και να ενισχύσει την αναπνοή σε καλλιέργειες *Chlamydomonas* που αναπτύσσονται στο φως με ταυτόχρονη διοχέτευση διοξειδίου του άνθρακα [147]. Έτσι είναι πολύ πιθανό τα κύτταρα *Chlamydomonas* τα οποία αναπτύσσονται σε μειξοτροφικές συνθήκες να αποκρίνονται διαφορετικά στην καταπόνηση (stress) από αυτά που αναπτύσσονται αυτότροφα.



Εικόνα 1.26. Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της ροής ηλεκτρονίων και της αφομοίωσης του άνθρακα στους χλωροπλάστες του *Chlamydomonas reinhardtii*. Λεπτομέρειες για τις επιμέρους ροές δίνονται στη δημοσίευση [148].

Όσο αφορά την πρόσληψη του ανόργανου άνθρακα, το *Chlamydomonas* έχει εξελιχθεί να αναπτύσσεται τόσο σε ύδατα, όσο και στο χώμα. Η διαθεσιμότητα του άνθρακα ως CO₂, HCO₃⁻ και CO₃²⁻ εξαρτάται από το εκάστοτε περιβάλλον. Το μικροφύκος *Chlamydomonas* έχει αναπτύξει ένα πολύπλοκο σύστημα για να χρησιμοποιεί οποιαδήποτε μορφή είναι διαθέσιμη και έχει τη δυνατότητα να τον συγκεντρώνει εσωτερικά. Αυτές οι διαδικασίες είναι γνωστές ως *μηχανισμός συγκέντρωσης του άνθρακα (CCM)* και έχουν

μελετηθεί εκτενώς. Έχουν βρεθεί τρεις α - και έξι β -καρβονικές ανυδράσες που αναλόγως με τη λειτουργία βρίσκονται ανάμεσα στην πλασματική μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα, στον αυλό του θυλακοειδούς, στο πλαστιδιακό στρώμα και στα μιτοχόνδρια. Φωτοσυνθετικά ο άνθρακας εισέρχεται στον C3 κύκλο όπου η Rubisco καταλύει την καρβοξυλίωση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόξης για να παράγει 3-φωσφογλυκερικό οξύ .



Εικόνα 1.27. Απλοποιημένη σχηματική αναπαράσταση των μεταβολικών μονοπατιών κατά την αφομοίωση του οξικού οξέος από το *Chlamydomonas* [149].

1.12 Σκοπός της διατριβής

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της βιοαποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων από φωτοσυνθετικά μικροφύκη. Για να επιτευχθεί αυτός ο στόχος η εργασία χωρίστηκε σε τρία μέρη.

Στο πρώτο μέρος σκοπός ήταν η ανάπτυξη μιας βιοενεργητικής προσέγγισης για μελέτη της βιοαποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*. Στόχος ήταν να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες κάτω υπό τις οποίες το μικροφύκος μεταβολίζει αρχικά τη φαινόλη και η επίδραση αυτών των συνθηκών στην ανάπτυξη και δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μικροφύκου. Επίσης σκοπός ήταν η ανίχνευση ενδιάμεσων μεταβολιτών της διαδικασίας αποικοδόμησης της φαινόλης.

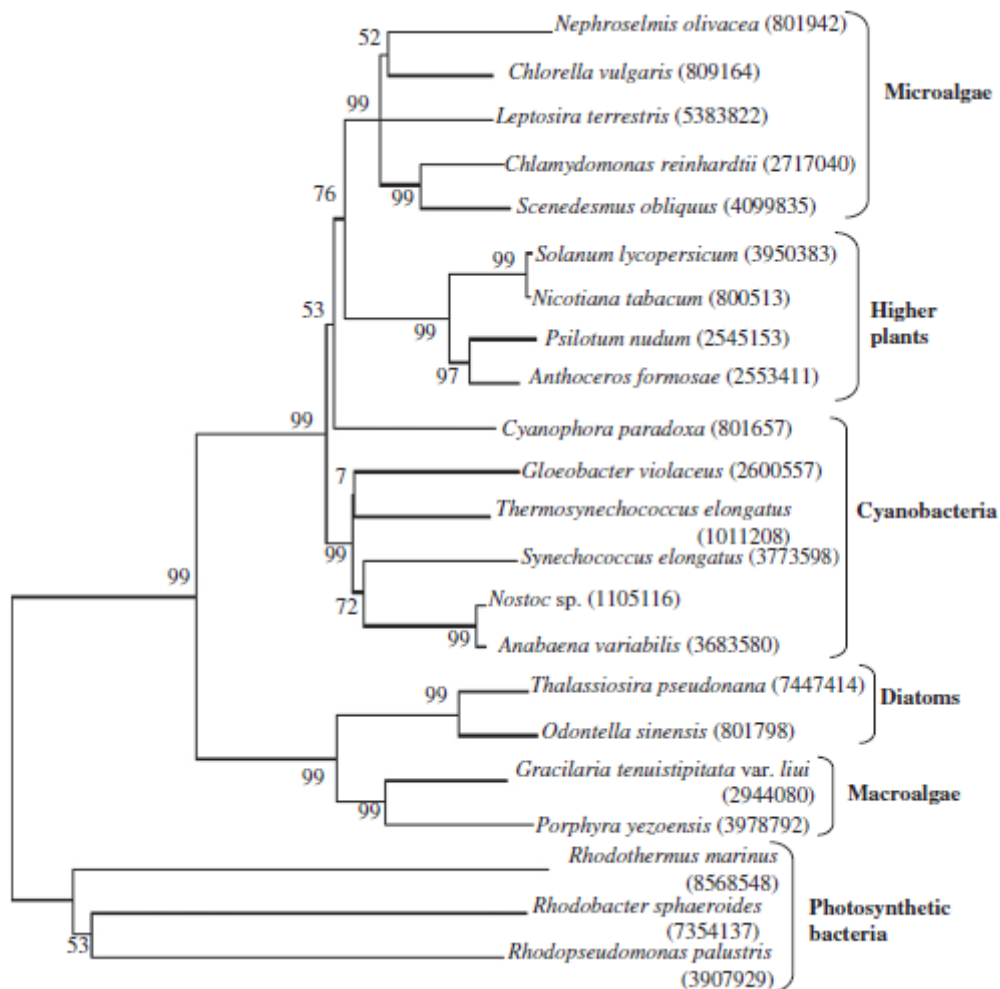
Στο δεύτερο μέρος σκοπός ήταν η μελέτη της αποικοδόμησης της φαινόλης από ακινητοποιημένα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* σε σφαιρίδια αλγινικού. Κύριος στόχος ήταν η μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του αλγινικού στα σφαιρίδια όσο αφορά την απόδοση των κυττάρων στη διαδικασία αποικοδόμησης συγκριτικά με τα ελεύθερα κύτταρα, προκειμένου να αναπτυχθεί ένα σύστημα που θα μπορεί να βρει εφαρμογή σε διαδικασίες *in situ* βιοαποκατάστασης.

Στο τρίτο μέρος σκοπός ήταν η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός ενός μικροφύκου ανθεκτικού σε υψηλές συγκεντρώσεις φαινόλης από ένα μολυσμένο σημείο. Επίσης σκοπός ήταν η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ του *Chlamydomonas reinhardtii* και του απομονωμένου μικροοργανισμού όσο αφορά την ανάπτυξη, τη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μικροφύκου και τις συνθήκες κάτω υπό τις οποίες αποικοδομεί τη φαινόλη αλλά και την ανθεκτικότητά του κάτω υπό συνθήκες χημικής καταπόνησης.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΒΙΟΕΝΕΡΓΗΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΤΟ
ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΣ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII***

2.1 Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1, το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* διαθέτει ένα ευέλικτο σύστημα μεταβολισμού του άνθρακα ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες καλλιέργειας. Το ερώτημα που εγείρεται είναι το γιατί στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αναφορές στην αποικοδόμηση της φαινόλης από το συγκεκριμένο μικροφύκος. Το γένος *Chlamydomonas* είναι εξελικτικά συγγενικό με τα γένη *Scenedesmus* και *Chlorella* τα οποία έχουν μελετηθεί εκτενώς στο πεδίο αποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων.



Εικόνα 2.1. Φυλογενετική ταξινόμηση βασισμένη στη μεγάλη υπομονάδα της RuBisCo [150].

2.2 Σκοπός

Η συγκεκριμένη πειραματική σειρά είχε σκοπό τη μελέτη αποικοδόμησης της φαινόλης υπό διάφορες συνθήκες που επηρεάζουν τη φωτοσύνθεση. Στόχος ήταν να μελετηθεί το βιοενεργητικό ισοζύγιο αυτών των συνθηκών μεταξύ της ανάπτυξης, της δομής

και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και της αποικοδόμησης της φαινόλης. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε ένα εύρος συγκεντρώσεων φαινόλης από 0,15- 4,00 mM. Επίσης μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας ή της απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα, της έντασης του παρεχόμενου φωτισμού και της παρουσίας ή απουσίας οξυγόνου. Επίσης στόχος ήταν η ανίχνευση ενδιάμεσων μεταβολιτών από τη διαδικασία αποικοδόμησης της φαινόλης. Σε επόμενη φάση στόχος ήταν να μελετηθεί η βιοαποικοδόμηση μονοϋποκατεστημένων μεθυλοφαινολών και τα αποτελέσματα να συγκριθούν με αυτά της φαινόλης. Οι στόχοι αποτυπώνονται συνοπτικά παρακάτω.

Βιοαποικοδόμηση της φαινόλης όταν είναι η μοναδική πηγή άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας.

- Σύγκριση θρεπτικών μέσων
- Επίδραση έντασης παρεχόμενου φωτισμού
- Επίδραση διαθεσιμότητας οξυγόνου
- Ανίχνευση και χαρακτηρισμός μεταβολιτών

Βιοαποικοδόμηση της φαινόλης παρουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας.

- Συγκριτική μελέτη της παρουσίας οργανικής (οξικό οξύ, 1048 mg/L) και ανόργανης πηγής (CO₂, 20% v/v) άνθρακα.
- Συγκριτική μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης εναλλακτικής πηγής άνθρακα.
- Μελέτη της επίδρασης της παρουσίας ή απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα στην παραγωγή μεταβολικών ενδιάμεσων.

Βιοαποικοδόμηση μονοϋποκατεστημένων μεθυλοφαινολών

- Μελέτη της επίδρασης παρουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα.
- Μελέτη της επίδρασης της θέσης του υποκαταστάτη στο φαινολικό δακτύλιο.

2.3 Πειραματικό μέρος

2.3.1. Οργανισμός και συνθήκες ανάπτυξης

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το αγρίου τύπου στέλεχος (wild type) *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125. Τα κύτταρα *Chlamydomonas* αναπτύχθηκαν ετερότροφα σε υγρό θρεπτικό μέσο TAP (Tris- Acetate- Phosphate) σε κωνικές φιάλες με συνεχή ανάδευση, για 4-5 ημέρες προκειμένου να μην κατακαθίσουν τα κύτταρα [141]. Όλα τα πειράματα εκτελέστηκαν σε δωμάτιο σταθερής θερμοκρασίας $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50\text{-}60\ \mu\text{mol}\ \text{φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ με την χρήση λευκών (cool white) λαμπών φθορισμού. Οι υγρές καλλιέργειες αυτές αποτέλεσαν μητρικές καλλιέργειες για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Η σύσταση του θρεπτικού μέσου TAP παρουσιάζεται στους ακόλουθους πίνακες.



Εικόνα 2.2. Στερεή καλλιέργεια *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125.

Πίνακας 2.1. Συστατικά υγρού θρεπτικού μέσου TAP (pH=7,2).

Διαλύματα	Ποσότητα
Trizma – base	2,42g/L
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών I (Phosphate buffer I)	1 mL/L
Διάλυμα ιχνοστοιχείων (Hutner's Trace Metals)	1 mL/L
Τροποποιημένο διάλυμα του Beijerinck (Solution A)	10 mL/L
Οξικό οξύ	1,048 g/L

Πίνακας 2.2. Συστατικά ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών I (*Phosphate buffer I*).

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

Πίνακας 2.3. Συστατικά διαλύματος ιχνοστοιχείων (*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

Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε με KOH έως το pH=6,5.

Πίνακας 2.4. Συστατικά τροποποιημένου διαλύματος του Beijerinck (*Solution A*).

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

Σε μία σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα απλό θρεπτικό μέσο υψηλής συγκέντρωσης αλάτων (Sueoka's High Salt Medium, HS medium). Η σύστασή του παρουσιάζεται στους ακόλουθους πίνακες [151].

Πίνακας 2.5. Συστατικά θρεπτικού μέσου υψηλής συγκέντρωσης αλάτων (HS medium).

Διαλύματα	Ποσότητα
Διάλυμα του Beijerinck	5,0 mL/L
Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών ΙΙ (Phosphate buffer II)	5,0 mL/L
Διάλυμα ιχνοστοιχείων (Hutner's Trace Metals)	1 mL/L

Πίνακας 2.6. Συστατικά διαλύματος του Beijerinck.

Συστατικά	Συγκέντρωση στο διάλυμα
NH ₄ Cl	100,0 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	4,0 g/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1,51 g/L

Πίνακας 2.7. Συστατικά ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών ΙΙ (*Phosphate buffer II*).

Συστατικά	Συγκέντρωση στο διάλυμα
K ₂ HPO ₄	288,0 g/L
KH ₂ PO ₄	144,0 g/L

Όλα τα θρεπτικά μέσα και τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο στους 120°C για 20-30 min για την αποφυγή μολύνσεων από άλλους μικροοργανισμούς. Όλα τα πειράματα παρασκευής καλλιέργειών διεξήχθησαν σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow hood), ο οποίος είχε προηγουμένως αποστειρωθεί με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας και αιθανόλη. Τα πειράματα έλαβαν χώρα παρουσία φλόγας.

2.3.2. Μέτρηση της κυτταρικής συγκέντρωσης

Η κυτταρική συγκέντρωση προσδιορίστηκε με μέτρηση του όγκου καθιζαμένων κυττάρων (Packed Cell Volume, PCV) ανά mL καλλιέργειας και εκφράστηκε σε $\mu\text{L PCV/mL}$ καλλιέργειας [152]. Πιο συγκεκριμένα δείγμα καλλιέργειας φυγοκεντρίθηκε για 5 λεπτά σε ειδικούς βαθμονομημένους πλαστικούς τριχοειδείς σωλήνες της TPP σε μία

φυγόκεντρο *Eppendorf Centrifuge 5412*. Ο όγκος καθιζαμένων κυττάρων ανά mL καλλιέργειας συσχετίστηκε με το ξηρό βάρος βιομάζας κυττάρων (Dry Cell Weight) με βάση την Εξίσωση 2.1 η οποία προσδιορίστηκε πειραματικά:

$$\text{Dry Cell Weight (mg/ mL)} = 0.340 \cdot \text{PCV (}\mu\text{L/ mL)} - 0.020, R^2 = 0.991 \text{ (Εξίσωση 2.1)}$$



Εικόνα 2.3. Βαθμονομημένος τριχοειδής σωλήνας για τη μέτρηση της κυτταρικής συγκέντρωσης.

2.3.3. Παρασκευή καλλιιεργειών για μελέτη αποικοδόμησης της φαινόλης

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν από τη μητρική καλλιέργεια στο τέλος της εκθετικής φάσης με φυγόκεντρωση στα 1000 g για 5 λεπτά. Έπειτα επαναιωρήθηκαν στο νέο μέσο καλλιέργειας και αφού η διαδικασία επαναλήφθηκε δύο επιπλέον φορές κατανεμήθηκαν σε ερμητικά κλειστά γυάλινα μπουκάλια με septa διαμέτρου 5 cm και ύψους 9,5 cm με 100 mL συνολική χωρητικότητα όγκου. Ο τελικός όγκος καλλιέργειας που προστέθηκε στο μπουκάλι ήταν 50 mL και η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ήταν ίση με 2 $\mu\text{L PCV/ mL}$ καλλιέργειας. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε δωμάτιο σταθερής θερμοκρασίας $25 \pm 1^\circ\text{C}$ υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50\text{-}60 \mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Η φαινόλη προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.8. Η φαινόλη είχε προηγουμένως διαλυθεί σε υπερκάθαρο (nanopure) νερό και το διάλυμα υπέστη φιλτράρισμα μέσω ενός φίλτρου σύριγγας $0,2 \mu\text{m}$. Η συγκέντρωση του διαλύματος ήταν $0,5 \text{ M}$. Το διάλυμα φυλάχθηκε στους 4°C και στο σκοτάδι ενώ ανά τακτά χρονικά διαστήματα ανανεωνόταν. Τέλος τα μπουκάλια τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό αναδευτήρα (shaker) για διάστημα 5 ημερών και αναδεύονταν κατά τη διάρκεια του πειράματος με συχνότητα 140 min^{-1} . Σε μία πειραματική σειρά που έλαβε χώρα υπό ατμόσφαιρα αζώτου, διοχετεύτηκε αέριο άζωτο στα μπουκάλια για 1 λεπτό ενώ σε μία σειρά παρουσία περίσσειας οξυγόνου διοχετεύτηκε στα μπουκάλια αέριο οξυγόνο για 30 δευτερόλεπτα.

Πίνακας 2.8. Συγκεντρώσεις φαινόλης που μελετήθηκαν στις καλλιέργειες *Chlamydomonas*.

α/α	Συγκέντρωση φαινόλης στο θρεπτικό μέσο	
	mM	mg/L
1	0,15	14,1
2	0,50	47,1
3	2,00	188,2
4	4,00	376,4



Εικόνα 2.4. Μπουκάλι των 100 mL που χρησιμοποιήθηκε ως βιοαντιδραστήρας κλεισμένο ερμητικά με septum.

2.3.4. Δειγματοληψία και υπολογισμοί για τη μέτρηση της ανάπτυξης

Κατά τη διάρκεια του πειράματος συλλέγονταν δείγματα του 0,5 mL από τις καλλιέργειες με τη χρήση αποστειρωμένης σύριγγας με βελόνα. Η δειγματοληψία πραγματοποιούνταν σε θάλαμο νηματικής ροής αέρα παρουσία φλόγας ενώ τα πώματα από τα μπουκάλια είχαν προηγουμένως απολυμανθεί εξωτερικά με αιθανόλη.

Από τις μετρήσεις ανάπτυξης υπολογίστηκε ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μ) για τις πρώτες 48 ώρες της καλλιέργειας με βάση την εξίσωση $\mu = \ln \frac{X-X_0}{t-t_0}$, όπου X είναι το ξηρό βάρος των κυττάρων σε χρόνο t και X_0 είναι το αρχικό ξηρό βάρος των κυττάρων σε χρόνο t_0 . Ο συντελεστής απόδοσης υπολογίστηκε την τελευταία ημέρα των πειραμάτων με βάση την εξίσωση $Y_{X/S} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t}$, όπου X_t είναι το ξηρό βάρος των κυττάρων την τελευταία πειραματική

ημέρα, X_0 είναι το αρχικό ξηρό βάρος των κυττάρων σε χρόνο t_0 , S_0 είναι η αρχική ποσότητα της φαινόλης και S_t είναι η ποσότητα φαινόλης που απέμεινε στο μέσο καλλιέργειας την τελευταία πειραματική ημέρα [153]. Όλες οι ποσότητες στους τύπους ήταν μετρημένες σε μονάδες mg.

2.3.5. Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού

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 [104]. Οι μετρήσεις έλαβαν χώρα σε δείγματα καλλιεργειών τα οποία αρχικά παρέμειναν στο σκοτάδι για 10 λεπτά, προκειμένου να όλα τα μόρια στα κέντρα αντίδρασης να βρίσκονται στη θεμελιώδη τους κατάσταση, και έπειτα 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 $3000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ερυθρού φωτός (650nm). Από τις μετρήσεις υπολογίστηκε ο λόγος F_v/F_m , που αποτελεί τη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση του φωτοσυστήματος II. Έπειτα με τη μελέτη τιμών φθορισμού που αντιστοιχούν σε καθορισμένα στάδια (J, I, P) της καμπύλης επαγωγικού φθορισμού πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί του JIP-test με χρήση του εξειδικευμένου λογισμικού BioLyzer HP3 και υπολογίστηκαν επιμέρους χαρακτηριστικά του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Πιο συγκεκριμένα υπολογίστηκαν ο λόγος RC/CS_0 που δείχνει την πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης, η κβαντική απόδοση της πρωταρχικής φωτοχημείας ($\phi_{P_0} = TR_0/ABS$), η πιθανότητα μίας διέγερσης να μετακινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την ανηγμένη μορφή της πλαστοκινόνης ($\psi_0 = ET_0/TR_0$), ο λόγος DIO/RC που ανταποκρίνεται στο ποσό ενέργειας που χάνεται ως θερμότητα ανά κέντρο αντίδρασης και ο λόγος ABS/RC που συνδέεται με το μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας του φωτοσυστήματος II.



Εικόνα 2.5. Συσκευή Handy PEA Plant Efficiency Analyser.

2.3.6. Ποσοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών

Για την ποσοτικοποίηση των φωτοσυνθετικών χρωστικών, 1 mL καλλιέργειας φυγοκεντρίθηκε για 5 λεπτά σε μία φυγόκεντρο *Eppendorf* και έπειτα από την απόρριψη του υπερκειμένου, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 mL διαλύματος 80% ακετόνης. Εφόσον τα δείγματα αναδεύτηκαν για 1-2 λεπτά στο σκοτάδι, υπέστησαν φυγοκέντριση προκειμένου να απομακρυνθούν τα ιζήματα και μετρήθηκε η απορρόφηση των υπερκειμένων σε συγκεκριμένα μήκη κύματος (470,0 nm, 646,8 nm και 663,2 nm) με χρήση ενός φασματοφωτομέτρου υπεριώδους- ορατού (*Shimadzu UV-2700*). Ο υπολογισμός έγινε με βάση γνωστές εξισώσεις από τη βιβλιογραφία οι οποίες παρουσιάζονται παρακάτω [154].

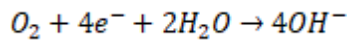
$$C_a (\mu\text{g/ml}) = 12.25 \cdot A_{663.2} - 2.79 \cdot A_{646.8} \quad (\text{Εξίσωση 2.2})$$

$$C_b (\mu\text{g/ml}) = 21.5 \cdot A_{646.8} - 5.1 \cdot A_{663.2} \quad (\text{Εξίσωση 2.3})$$

$$C_{x+c} (\mu\text{g/ml}) = \frac{1000 \cdot A_{470.0} - 1.82 \cdot C_a - 85.02 \cdot C_b}{198} \quad (\text{Εξίσωση 2.4})$$

2.3.7. Πολαρογραφικός προσδιορισμός ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου

Η μέτρηση του ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου πραγματοποιήθηκε με χρήση ενός επιλεκτικού ηλεκτροδίου οξυγόνου τύπου Clark [155]. Η διάταξη του ηλεκτροδίου αποτελείται από μια άνοδο αργύρου και μια κάθοδο πλατίνας, σε διάλυμα ηλεκτρολύτη KCl, όπου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Για τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ ανόδου και καθόδου χρησιμοποιείται οξυγόνο, το οποίο εισέρχεται επιλεκτικά στον ηλεκτρολύτη από το δείγμα μέσω μιας ημιπερατής μεμβράνης, και ανάγεται στην κάθοδο σύμφωνα με την ημιαντίδραση:



Για τις μετρήσεις έκλυσης οξυγόνου, δείγματα καλλιεργειών συλλέχθηκαν και φυγοκεντρίθηκαν για 5 min στα 1500g. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 4 mL ρυθμιστικού διαλύματος με το οποίο είχε προηγουμένως σταθεροποιηθεί το ηλεκτρόδιο (0,896% w/v Tricine και 0,034% w/v NaHCO₃, pH=7,6). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε υδρόψυκτη γυάλινη κυψελίδα σε θερμοκρασία 25°C η οποία ρυθμίστηκε με τη χρήση θερμοστάτη με κυκλοφορητή νερού. Για την αποφυγή θέρμανσης του δείγματος, το φως πριν φτάσει στο δείγμα διήλθε από κυψελίδα με αραιό διάλυμα CuSO₄ που απορροφούσε την υπέρυθη ακτινοβολία. Τέλος, το φως διήλθε από ένα κόκκινο φίλτρο, επιτρέποντας μόνο τα επιθυμητά μήκη κύματος να φτάσουν στο δείγμα [156]. Η κυτταρική συγκέντρωση στην κυψελίδα ήταν ίση με 2,5 μL PCV/ mL. Η μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα καταγράφηκε σε ένταση φωτισμού 500 μmol·m⁻²·s⁻¹ από μία λάμπα βολφραμίου για χρονικό διάστημα 45-60 s και τελικά εκφράστηκε σε μmol O₂ (mL PCV)⁻¹·h⁻¹.

2.3.8. Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC)

Για την ανάλυση των φαινολικών ενώσεων δείγματα καλλιεργειών υπέστησαν αρχικά φυγοκέντριση για 5 λεπτά σε μία φυγόκεντρο *Eppendorf* και έπειτα το υπερκείμενο διήλθε από φίλτρο σύριγγας 0,2 μm. Τα δείγματα αραιώθηκαν προκειμένου να αποκτήσουν τη σύσταση του διαλύτη. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης το οποίο αποτελούταν από μία αντλία υψηλής ακρίβειας (LC - 10AD Shimadzu), ένα θερμοστατούμενο κλίβανο Rigas Labs G5 που διατηρούσε σταθερή την θερμοκρασία της στήλης στους 25°C, έναν ανιχνευτή υπεριώδους- ορατού SPD 10AV της Shimadzu, μία προστήλη και μια χρωματογραφική στήλη Kromasil C18 (Grace Smart RP18, μήκους 250 mm, εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm και μεγέθους σωματιδίων 5 μm). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ισοκρατική μέθοδος έκλυσης με κινητή φάση μεθανόλη: νερό: οξικό οξύ σε αναλογία όγκων 50:49:1 και ταχύτητα ροής 1 mL/ min [120]. Η ανίχνευση των φαινολικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της απορρόφησης στα 279 nm ενώ η ποσοτικοποίηση έλαβε χώρα συσχετίζοντας το εμβαδό των κορυφών με γνωστές ποσότητες φαινολικών ενώσεων.

2.3.9. Ταυτοποίηση της παραγόμενης κατεχόλης με φασματομετρία μαζών ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού συζευγμένη με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (ESI-HPLC-MS) μέσω της μεθόδου παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (MRM)

Για την ταυτοποίηση της κατεχόλης πρότυπο διάλυμα της ουσίας συγκέντρωσης $500 \mu\text{g L}^{-1}$ (ppb) και άγνωστης συγκέντρωσης δείγμα καλλιέργειας αραιωμένο 100 φορές σε διαλύτη μεθανόλη: νερό: οξικό οξύ με αναλογία όγκων 50:49:1 εισήχθησαν με απευθείας έκχυση του δείγματος σε ένα φασματόμετρο μαζών LCQ Advantage της ThermoFinnigan με ροή $20 \mu\text{L}/\text{min}$ μέσω αντλίας σύριγγας. Ελήφθησαν φάσματα μάζας στον αρνητικό ιοντισμό μέσω της τεχνικής της συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (MS/MS) και έτσι προέκυψε το φάσμα MS/MS της κατεχόλης. Έπειτα γνωρίζοντας το μοτίβο θραυσματοποιήσεων της κατεχόλης, η τεχνική συζεύχθηκε με ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC-MS) με ισοκρατική μέθοδο έκλουσης, διαλύτη μεθανόλη: νερό: οξικό οξύ (50:49:1) και ταχύτητα ροής $0,5 \text{ mL}/\text{min}$. Μέσω της μεθόδου παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (Multiple Reaction Monitoring, MRM) πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση της κατεχόλης στο δείγμα συγκρίνοντας τις κορυφές του χρωματογραφήματος με αυτές της πρότυπης ουσίας.

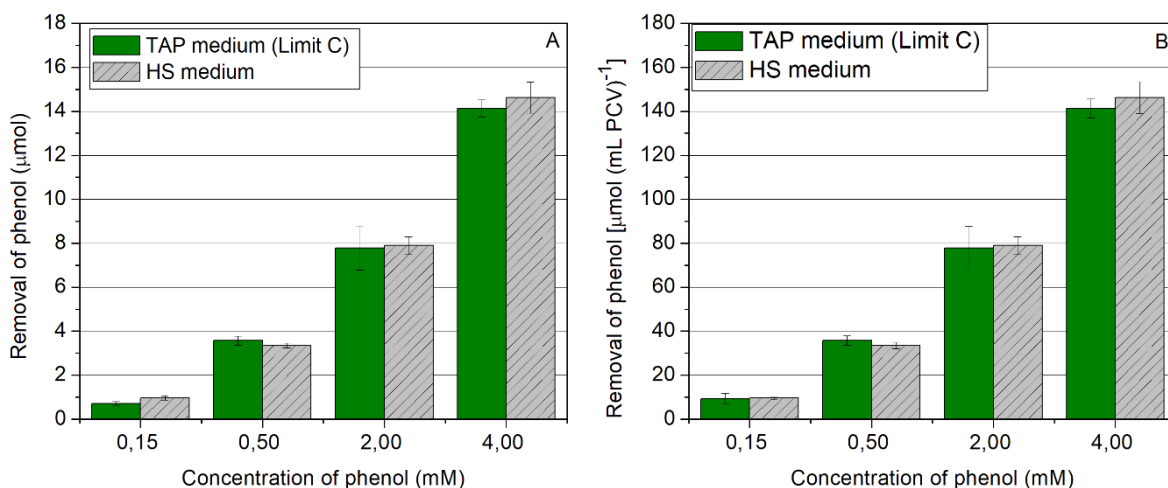
2.3.10. Παρατήρηση των κυττάρων με οπτική μικροσκοπία και μικροσκοπία φθορισμού

Για την παρατήρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το οπτικό μικροσκόπιο Nikon Eclipse E800. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση ενός ελαιοβυθιζόμενου αντικειμενικού φακού Plan Apo 60x και η λήψη των φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε με χρήση μίας CCD κάμερας ProgRes CF. Για τη μικροσκοπία φθορισμού η διέγερση προκλήθηκε από μια λάμπα UV και χρησιμοποιήθηκε ένα φίλτρο B-2A που επιτρέπει μόνο μήκη κύματος εύρους 450-490 nm να διέλθουν. Η εκπομπή του φθορισμού από τις φωτοσυνθετικές μονάδες του χλωροπλάστη αποτυπώθηκε με κόκκινο χρώμα.

2.4 Αποτελέσματα και συζήτηση

2.4.1. Μελέτη βιοαποικοδόμησης της φαινόλης από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* όταν είναι η μόνη πηγή άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας.

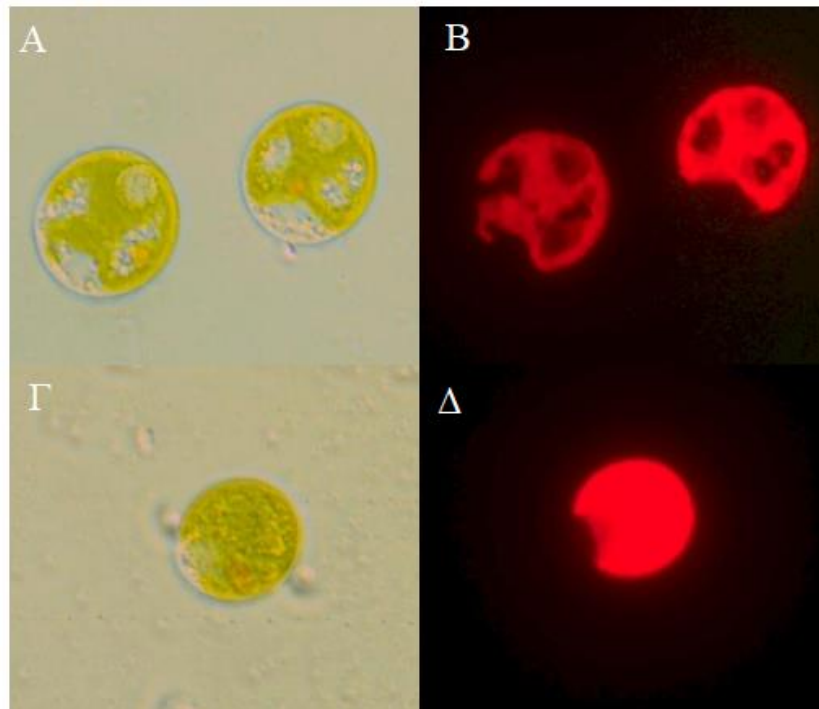
Σε αυτή την πειραματική σειρά πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη αποικοδόμησης της φαινόλης όταν ήταν η μόνη πηγή άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας. Για το λόγο αυτό η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικά θρεπτικά μέσα, το θρεπτικό μέσο TAP από το οποίο απουσίαζε το οξικό οξύ που από εδώ και στο εξής θα αναφέρεται ως Limit C συνθήκη και στο θρεπτικό μέσο συγκέντρωσης αλάτων του Suoekoa (θα αναφέρεται ως HS medium). Η Εικόνα 2.6 παρουσιάζει την απομάκρυνση της φαινόλης σε αυτά τα θρεπτικά μέσα έπειτα από χρονικό διάστημα 5 ημερών, υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 μmol φωτονίων· $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί ότι η απομάκρυνση της φαινόλης εκφράστηκε με δύο τρόπους. Αρχικά μετρήθηκε η απόλυτη ποσότητα φαινόλης που απομακρύνθηκε από το μέσο καλλιέργειας σε μονάδες μmol και έπειτα η απομάκρυνση ανάχθηκε ως προς την κυτταρική συγκέντρωση και εκφράστηκε ως $\mu\text{mol}\cdot(\text{mL PCV})^{-1}$. Η τελευταία αναγωγή εξυπηρετεί τη σύγκριση αποτελεσμάτων στις περιπτώσεις όπου παρατηρείται διαφορετική ανάπτυξη στις καλλιέργειες. Από τα αποτελέσματα υπάρχουν ενδείξεις αποικοδόμησης της φαινόλης από το μικροφύκος. Παρατηρείται μάλιστα μία τάση αύξησης της απομάκρυνσης της φαινόλης από το μέσο καλλιέργειας με αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της ουσίας. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι μία καλλιέργεια με επάρκεια αρχικής ποσότητας υποστρώματος παρουσιάζει μεγαλύτερη κατανάλωση του υποστρώματος σε σχέση με μία η οποία δεν είναι τόσο επαρκής σε υπόστρωμα [157]. Το σημαντικό είναι ότι και στα δύο θρεπτικά μέσα καλλιέργειας δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές. Ο λόγος που τα αρχικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν και στα δύο θρεπτικά μέσα είναι ότι το θρεπτικό μέσο TAP (από το οποίο έχουμε απομακρύνει το οξικό οξύ) παρασκευάζεται με χρήση οργανικού ρυθμιστικού διαλύματος (Trizma- base). Έτσι υπάρχει οργανικός άνθρακας μέσα στο διάλυμα ο οποίος απ' ότι φαίνεται δεν επηρεάζει τη διαδικασία αποικοδόμησης. Επίσης στο θρεπτικό μέσο HS παρατηρήθηκε έντονα το φαινόμενο της συσσωμάτωσης των κυττάρων κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε στο θρεπτικό μέσο TAP. Έτσι ήταν πολύ σημαντικό να μπορεί να χρησιμοποιηθεί το θρεπτικό μέσο TAP για τις υπόλοιπες πειραματικές σειρές διότι δεν είναι επιθυμητό να υπάρχουν δευτερογενή φαινόμενα (όπως π.χ. συσσωμάτωση των κυττάρων) τα οποία θα επηρέαζαν τις μετρήσεις φωτοσυνθετικής δραστηριότητας.



Εικόνα 2.6. Απομάκρυνση της φαινόλης από το θρεπτικό μέσο την 5^η ημέρα διεξαγωγής του πειράματος υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Η απομάκρυνση εκφράστηκε Α) ως την απόλυτη ποσότητα που απομακρύνθηκε μετρημένη σε μmol και Β) ως την ποσότητα που απομακρύνθηκε ανά μονάδα κυτταρικής συγκέντρωσης μετρημένη σε $\mu\text{mol}\cdot(\text{mL PCV})^{-1}$.

Σε καμία από τις παραπάνω περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε αύξηση της κυτταρικής συγκέντρωσης. Επιπλέον την 5^η πειραματική ημέρα ελήφθησαν φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο και μικροσκόπιο φθορισμού (Εικόνα 2.7). Από τα αποτελέσματα της μικροσκοπίας, στα κύτταρα από τις καλλιέργειες μάρτυρες, παρατηρήθηκε η ύπαρξη κενών περιοχών που περιλαμβάνουν μικρά κυστίδια. Το αντίστοιχο φαινόμενο δεν παρατηρήθηκε στα κύτταρα από τις καλλιέργειες που είχαν φαινόλη στο μέσο καλλιέργειας. Αυτές οι κενές περιοχές, στην παρατήρηση με μικροσκοπία φθορισμού όπου η φαίνεται η εκπομπή ακτινοβολίας χρώματος κόκκινου χρώματος από τις χλωροφύλλες του χλωροπλάστη, διακρίνονται πιο έντονα. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να συνδεθεί με το φαινόμενο της αυτοφαγίας (autophagy). Η αυτοφαγία είναι μια ενδοκυττάρια καταβολική διαδικασία η οποία επιτρέπει στα κύτταρα να ανακυκλώνουν αχρείαστο ή κατεστραμμένο κυτταρικό υλικό προκειμένου να διατηρήσουν την ομοιόστασή τους [158]. Οι μηχανισμοί αυτής της διαδικασίας έχουν αναλυθεί στη βιβλιογραφία [159-162]. Η διαδικασία περιλαμβάνει το σχηματισμό ειδικών κυστιδίων (αυτοφαγώσώματα) για να μεταφερθεί το «αχρείαστο» κυτταρικό υλικό σε ειδικές κενές περιοχές του κυττάρου (vacuoles). Σε κύτταρα του γένους

Chlamydomonas έχει βρεθεί ότι η διαδικασία αυτή είναι πιο έντονη σε συνθήκες στέρησης θρεπτικών όπως άνθρακα και αζώτου [163-166].

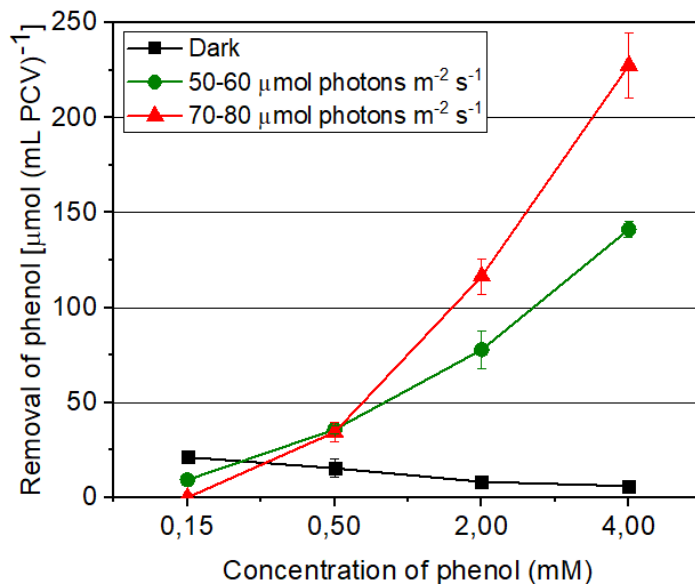


Εικόνα 2.7. Φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο (A και Γ) και μικροσκόπιο φθορισμού (B και Δ) των κυττάρων *Chlamydomonas* την 5^η πειραματική ημέρα με χρήση ελαιοκαταδυσόμενου φακού 60x. Οι εικόνες A και B παρουσιάζουν κύτταρα από καλλιέργεια-μάρτυρα (control) ενώ η εικόνες Γ και Δ παρουσιάζουν κύτταρο από καλλιέργεια που περιείχε 4 mM αρχική συγκέντρωση φαινόλης.

Στη δική μας περίπτωση είναι λογικό λαμβάνει χώρα αυτό αν ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι τα κύτταρα στις καλλιέργειες μάρτυρες έχουν παραμείνει για πέντε ημέρες στο βιοαντιδραστήρα χωρίς την παροχή άνθρακα και ακολούθως ενεργοποιείται η διαδικασία. Αντίθετα στις καλλιέργειες με τη φαινόλη δεν παρατηρείται κάτι αντίστοιχο. Αν η παραπάνω παρατήρηση συνδυαστεί με τις μετρήσεις απομάκρυνσης της φαινόλης, φαίνεται πως **τα κύτταρα εισέρχονται στη διαδικασία αποικοδόμησης της φαινόλης για να καλύψουν τις ανάγκες τους σε άνθρακα προκειμένου να διατηρηθεί η ακεραιότητα της ομοιόστασης και της κυτταρικής δομής.**

2.4.2. Μελέτη της επίδρασης της έντασης του φωτισμού και της διαθεσιμότητας οξυγόνου στην αποικοδόμηση της φαινόλης.

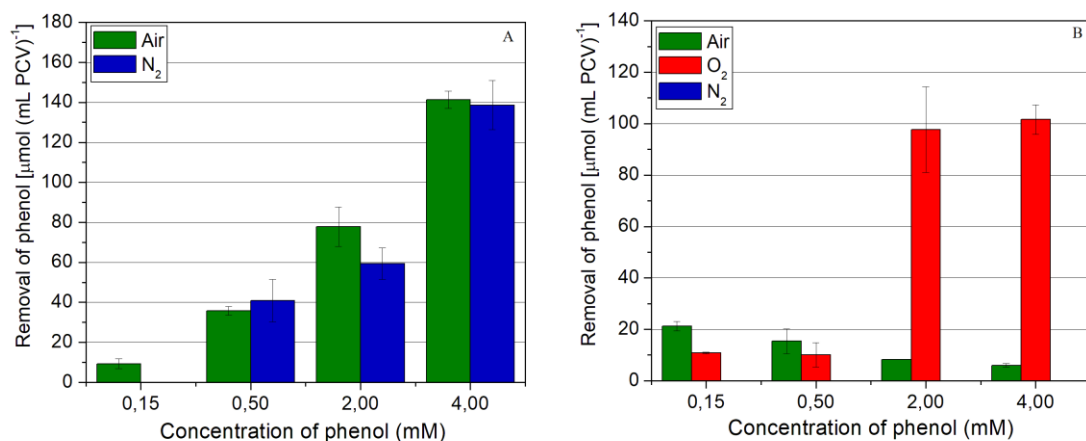
Στη βιβλιογραφία έχει προταθεί ότι η αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων είναι μία φωτοελεγχόμενη διαδικασία [130]. Για το λόγο αυτό τα πειράματα επαναλήφθηκαν σε υψηλότερη ένταση φωτισμού ($70-80 \mu\text{mol photons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) όπως επίσης και στο απόλυτο σκοτάδι. Σε όλες τις πειραματικές σειρές από εδώ και στο εξής έχει χρησιμοποιηθεί θρεπτικό μέσο TAP το οποίο δεν περιέχει οξικό οξύ (Limit C συνθήκη). Όπως φαίνεται από τα συγκριτικά αποτελέσματα στις δύο εντάσεις φωτισμού και στο σκοτάδι, σε υψηλές συγκεντρώσεις φαινόλης παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην αποικοδόμηση της φαινόλης σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού, ενώ αντίθετα η αποικοδόμηση της φαινόλης ήταν αμελητέα στο σκοτάδι. Στην περίπτωση που η αρχική συγκέντρωση της φαινόλης ήταν μικρή ($0,15 \text{ mM}$) παρατηρήθηκε υψηλότερη αποικοδόμηση στο σκοτάδι. Βέβαια και πάλι ήταν πάρα πολύ μικρή σε σχέση με τις ποσότητες που έχει δυνατότητα ο μικροοργανισμός να αποικοδομήσει. Αυτό το γεγονός μπορεί να αποδοθεί ότι σε υψηλότερες εντάσεις φωτονιακής ακτινοβολίας (που σημαίνει μεγαλύτερο ποσό παρεχόμενης ενέργειας για τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα) η αποικοδόμηση της φαινόλης υποβοηθάται.



Εικόνα 2.8. Απομάκρυνση της φαινόλης από το θρεπτικό μέσο την 5^η ημέρα διεξαγωγής του πειράματος στο σκοτάδι και υπό διάφορες εντάσεις φωτονιακής ακτινοβολίας ($50-60$ και $70-80 \mu\text{mol photons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Η απομάκρυνση εκφράστηκε ως την ποσότητα που απομακρύνθηκε ανά μονάδα κυτταρικής συγκέντρωσης μετρημένη σε $\mu\text{mol}\cdot(\text{mL PCV})^{-1}$.

Είναι σημαντικό ότι τα μικροφύκη έχουν την ικανότητα να επιτυγχάνουν υψηλότερα ποσά αποικοδόμησης σε συγκεντρώσεις οι οποίες είναι υψηλές, χρησιμοποιώντας το φως, μία οικονομική και άφθονη πηγή ενέργειας. Στο σκοτάδι αντίθετα, όπου δεν λαμβάνει χώρα η φωτοσύνθεση, το *Chlamydomonas* πρέπει να χρησιμοποιήσει τη φαινόλη καθώς είναι ο μόνος τρόπος να προσλάβει άνθρακα. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως είναι πιο εύκολο για τα κύτταρα να επιτύχουν αυτή τη λειτουργία σε χαμηλές συγκεντρώσεις της ουσίας αλλά όχι σε υψηλές όπου είναι ανασταλτικές για το μικροοργανισμό.

Όπως αναλύθηκε στο κεφάλαιο της εισαγωγής, έχει αποδειχθεί ότι η βιοαποικοδόμηση της φαινόλης από τα μικροφύκη είναι μία αερόβια διαδικασία με υψηλές απαιτήσεις σε οξυγόνο καθώς τα ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό (π.χ. μονοοξυγενάση της φαινόλης, 2,3-διοξυγενάση της κατεχόλης) χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως υπόστρωμα [118, 131]. Για το λόγο αυτό τα πειράματα επαναλήφθηκαν τόσο σε ατμόσφαιρα αζώτου όσο και παρουσία περίσσειας οξυγόνου.



Εικόνα 2.9. Απομάκρυνση της φαινόλης από το θρεπτικό μέσο την 5^η ημέρα διεξαγωγής του πειράματος. Α) Σύγκριση μεταξύ ατμόσφαιρας αέρα και ατμόσφαιρας αερίου αζώτου κατά την έναρξη του πειράματος υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 μmol φωτονίων·m⁻²·s⁻¹. Β) Σύγκριση μεταξύ ατμόσφαιρας αέρα, ατμόσφαιρας αζώτου και περίσσειας οξυγόνου κατά την έναρξη του πειράματος στο απόλυτο σκοτάδι.

Στην περίπτωση όπου ο βιοαντιδραστήρας πληρώθηκε με αέριο άζωτο στο φως (Εικόνα 2.9.Α) δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην αποικοδόμηση της φαινόλης σε σχέση με τις συνθήκες όπου υπήρχε ατμοσφαιρικός αέρας. Αυτό το αποτέλεσμα ήταν

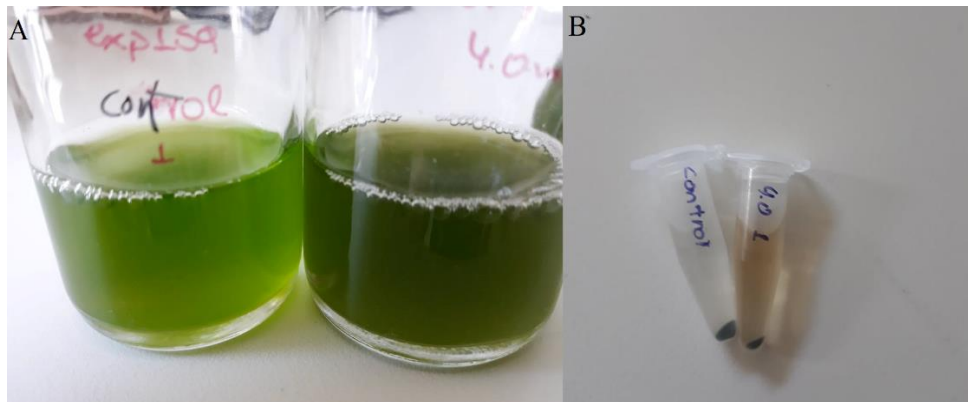
αναμενόμενο διότι το οξυγόνο το οποίο απαιτείται μπορεί να παράγεται φωτοσυνθετικά. Από την άλλη μεριά όταν η ίδια σειρά επαναλήφθηκε στο απόλυτο σκοτάδι (Εικόνα 2.9.B) δεν παρατηρήθηκε βιοαποικοδόμηση της φαινόλης, ακόμα και στις χαμηλές συγκεντρώσεις. Για να επιβεβαιωθεί αυτή η παρατήρηση, το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε αλλά αυτή τη φορά διοχετεύοντας στους βιοαντιδραστήρες περίσσεια οξυγόνου. Στην τελευταία αυτή συνθήκη παρατηρήθηκε σημαντική αποικοδόμηση της φαινόλης σε υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις της ουσίας. Αυτά τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι **η βιοαποικοδόμηση της φαινόλης από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* ακολουθεί αερόβιο μονοπάτι αποικοδόμησης.**

Απαραίτητο είναι να αναφερθεί ότι σε όλες τις παραπάνω συνθήκες αλλά και σε αυτές που θα ακολουθήσουν πραγματοποιήθηκαν παράλληλα πειράματα χωρίς κύτταρα για να διερευνηθεί τυχόν αβιοτική απομάκρυνση της φαινόλης (π.χ. λόγω αντιδράσεων φωτοξείδωσης). Σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης της φαινόλης από το μέσο καλλιέργειας. Έτσι φαίνεται πως η αποικοδόμηση της φαινόλης είναι μια δυναμική βιοενεργητική διαδικασία που επηρεάζεται από τις εκάστοτε συνθήκες καλλιέργειας ώστε τα μικροφύκη να ενεργοποιήσουν τους κατάλληλους μηχανισμούς για να διασπάσουν την ουσία.

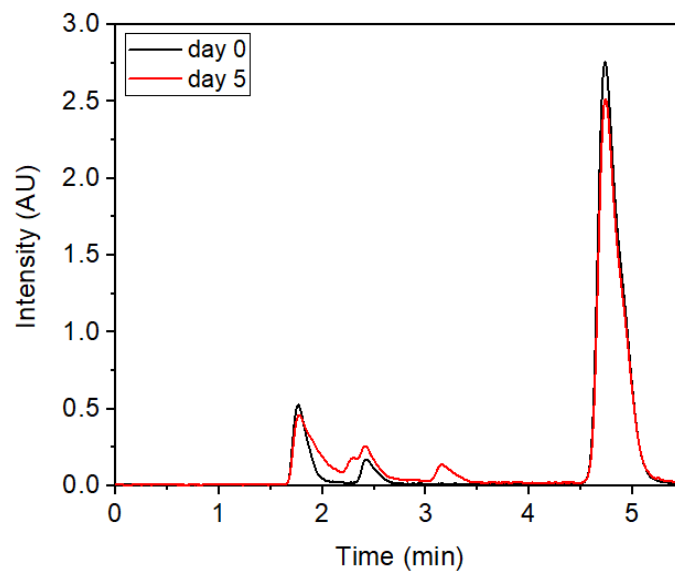
2.4.3. Ταυτοποίηση της παραγόμενης κατεχόλης

Εφόσον από τα παραπάνω πειράματα αποδείχθηκε ότι η αποικοδόμηση της φαινόλης ακολουθεί αερόβιο μονοπάτι, επόμενο ήταν να προκύψει το ερώτημα για την ύπαρξη μεταβολικών ενδιάμεσων στο διάλυμα. Μεταξύ των καλλιεργειών- μάρτυρα και των καλλιεργειών οι οποίες είχαν εμβολιαστεί με φαινόλη παρατηρήθηκε χρωματική διαφορά μεταξύ τέταρτης και πέμπτης ημέρας, με τις τελευταίες να έχουν μία ελαφριά καφέ απόχρωση. Μάλιστα η διαφορά αυτή δεν παρατηρήθηκε στις καλλιεργείες οι οποίες είχαν μικρές συγκεντρώσεις φαινόλης αλλά μόνο σε αυτές οι οποίες είχαν υψηλές. Όταν τα κύτταρα φυγοκεντρίθηκαν, αυτή η χρωματική διαφορά παρατηρήθηκε στο υπερκείμενο των καλλιεργειών, και όχι στο ίζημα (Εικόνα 2.10). Αυτή η παρατήρηση πιθανώς συνδέεται παραγωγή κάποιου μεταβολικού ενδιάμεσου. Για το λόγο αυτό η μακροσκοπική παρατήρηση αυτή συνοδεύτηκε και από μεταβολή του προφίλ του χρωματογραφήματος της HPLC την 5^η πειραματική ημέρα με την εμφάνιση νέων κορυφών με πιο έντονη αυτή με χρόνο κατακράτησης 3,15 λεπτά (Εικόνα 2.11). Οι κορυφές που εμφανίζονται πριν τα 3 λεπτά είναι

εξαιτίας συστατικών του θρεπτικού ΤΑΡ όπως συγκρίθηκαν με αντίστοιχα χρωματογραφικά προφίλ καλλιέργειών μάρτυρα.

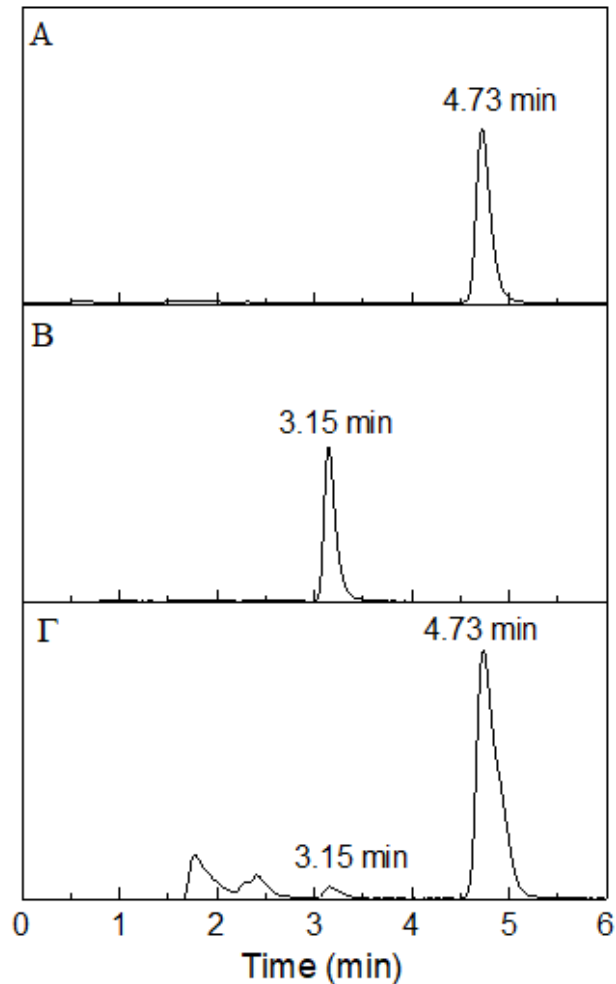


Εικόνα 2.10. Α) Φωτογραφίες από τις καλλιέργειες *Chlamydomonas reinhardtii* στους βιοαντιδραστήρες την 5^η πειραματική ημέρα. Αριστερά καλλιέργεια μάρτυρας και δεξιά καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση 4,00 mM φαινόλης. Β) Υπερκείμενα των καλλιεργειών την 5^η πειραματική ημέρα. Αριστερά υπερκείμενο από καλλιέργεια μάρτυρα και δεξιά υπερκείμενο από καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση φαινόλης 4,00 mM. Τα κύτταρα φαίνονται και στις δύο περιπτώσεις ως πράσινο ίζημα.



Εικόνα 2.11. Χρωματογραφικά προφίλ κατά την έναρξη του πειράματος (day 0) και την 5^η πειραματική ημέρα (day 5) από υπερκείμενα καλλιέργειας με αρχική συγκέντρωση φαινόλης 4,00 mM. Οι μονάδες έντασης είναι σε αυθαίρετες μονάδες του ανιχνευτή.

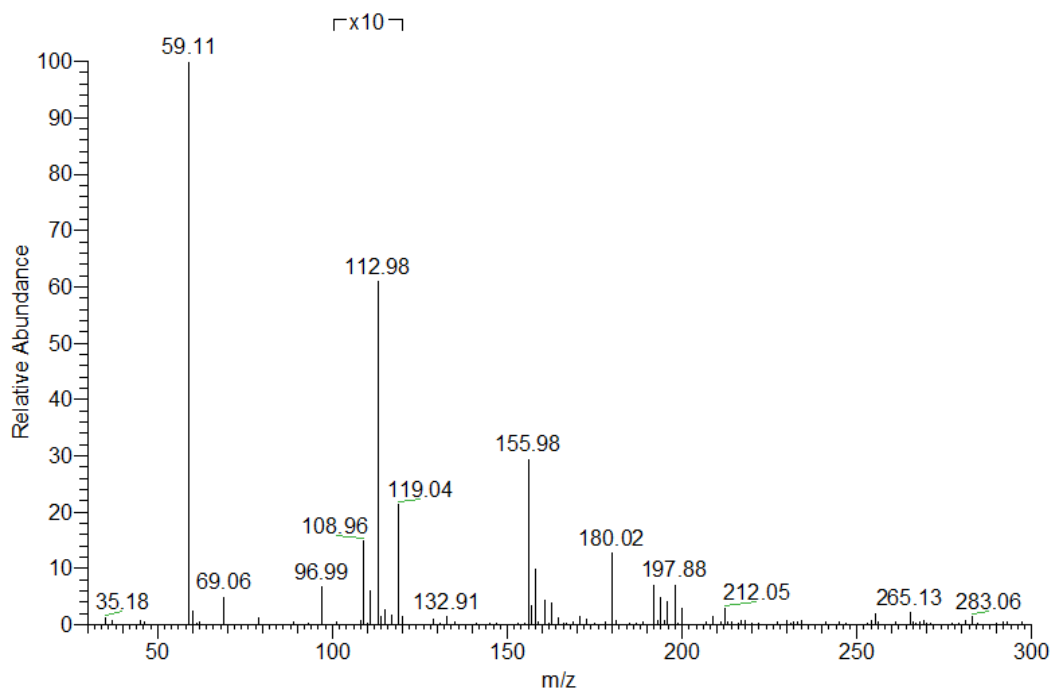
Γνωρίζοντας από τα προηγούμενα αποτελέσματα ότι το *Chlamydomonas* ακολουθεί το αερόβιο μονοπάτι αλλά και από τη βιβλιογραφία ότι το πρώτο μεταβολικό ενδιάμεσο του αερόβιου μονοπατιού είναι η κατεχόλη, συγκρίθηκαν τα χρωματογραφικά προφίλ με αυτά πρότυπων διαλυμάτων φαινόλης και κατεχόλης (Εικόνα 2.12).



Εικόνα 2.12. Χρωματογραφικά προφίλ προτύπου διαλύματος φαινόλης (A), προτύπου διαλύματος κατεχόλης (B) και υπερκειμένου καλλιέργειας την 5^η ημέρα με αρχική συγκέντρωση φαινόλης 4,00 mM (Γ).

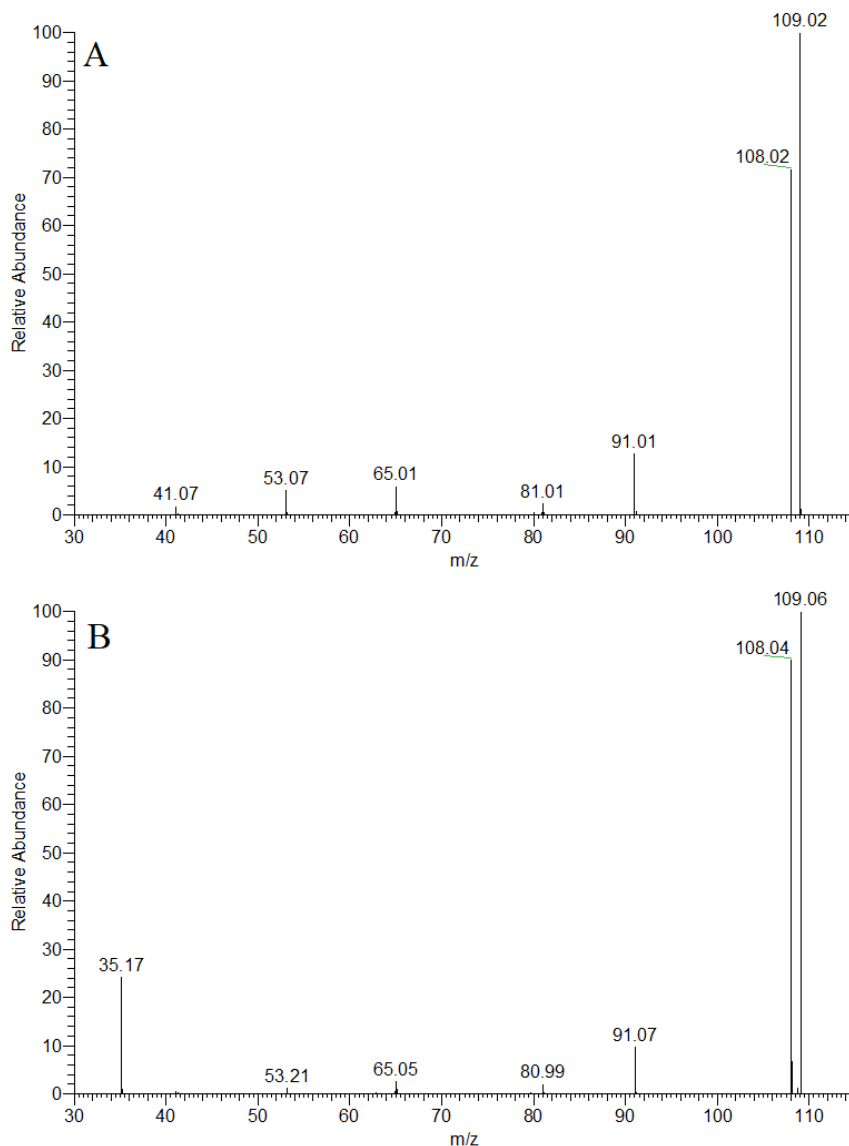
Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως η κορυφή στα 3,15 min αντιστοιχεί πιθανότατα στην κατεχόλη η οποία παράγεται από το μικροφύκος και απελευθερώνεται στο θρεπτικό μέσο. Φυσικά μόνο από το χρόνο κατακράτησης με μία χρωματογραφική στήλη δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί πλήρως αυτή η υπόθεση. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε επιπλέον ανάλυση με φασματομετρία μάζας για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη κατεχόλης στο μέσο καλλιέργειας.

Από την απευθείας έγχυση του δείγματος στο φασματομέτρο μάζας ελήφθη αρχικά το φάσμα μάζας πλήρους σάρωσης αρνητικών ιόντων, σε περιοχή m/z 30-300. Στο φάσμα μάζας φαίνεται η κορυφή με $m/z=108,96$ που αντιστοιχεί στην αποπρωτονιωμένη κατεχόλη. Η έντονη κορυφή σε τιμή $m/z=59,11$ αντιστοιχεί στο οξικό οξύ της κινητής φάσης.



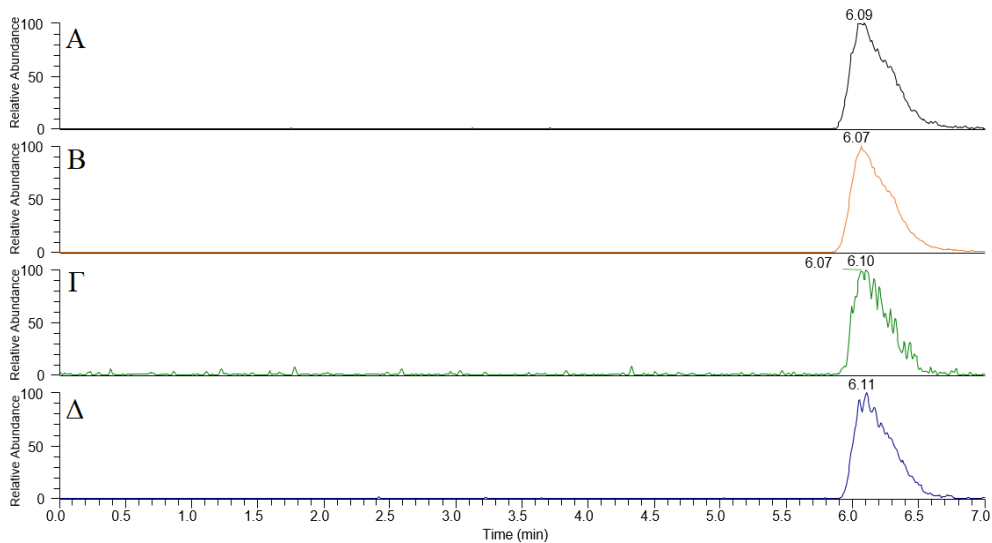
Εικόνα 2.13. Φάσμα μάζας πλήρους σάρωσης αρνητικών ιόντων του αραιωμένου υπερκειμένου της καλλιέργειας την 5^η πειραματική ημέρα.

Για την περαιτέρω μελέτη ελήφθησαν τα φάσματα MS/MS της κορυφής με $m/z=109$ τόσο για το υπερκείμενο της καλλιέργειας όσο και για πρότυπο διάλυμα κατεχόλης (Εικόνα 2.14). Από τα μοτίβα θραυσματοποιήσεων παρατηρείται η εμφάνιση των ίδιων θυγατρικών κορυφών σε τιμές m/z ίσες με 109, 108, 91, 81, 65 και 53 οι οποίες συμφωνούν και με προηγούμενη μελέτη στη βιβλιογραφία [167]. Η διαφορά είναι ότι στο πρότυπο διάλυμα εμφανίζεται και η κορυφή με τιμή $m/z=41$ η οποία δεν εμφανίζεται στο δείγμα από την καλλιέργεια. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι εξαιτίας του γεγονότος ότι στο δείγμα από την καλλιέργεια η συγκέντρωση της κατεχόλης είναι πολύ μικρότερη από το πρότυπο διάλυμα και ούτως η άλλως η ένταση αυτής της κορυφής είναι πολύ μικρή. Από την άλλη στο δείγμα από την καλλιέργεια εμφανίζεται μία κορυφή με τιμή $m/z=35$. Αυτή πιθανώς να οφείλεται σε κάποιο από τα συστατικά του θρεπτικού μέσου το οποίο τυχαίνει να έχει τιμή $m/z=109$.



Εικόνα 2.14. Φάσμα μάζας σάρωσης αρνητικών ιόντων της θραυσματοποίησης σε σειρά (MS/MS) της κορυφής με $m/z=109$. Α) πρότυπο διάλυμα κατεχόλης 500 ppb και Β) δείγμα από καλλιέργεια την 5^η πειραματική ημέρα.

Παρόλα αυτά για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα πραγματοποιήθηκε ανάλυση με τη χρήση της μεθόδου παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (MRM) για τις θραυσματοποιήσεις $109 \rightarrow 108$ και $109 \rightarrow 91$ τόσο για το πρότυπο διάλυμα όσο και για το υπερκείμενο των καλλιεργιών. Από τη σύζευξη της τεχνικής αυτής με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ελήφθησαν και συγκρίθηκαν τα χρωματογραφικά προφίλ της παρακολούθησης των επιλεγμένων θραυσματοποιήσεων (Εικόνα 2.15).



Εικόνα 2.15. Χρωματογραφικά προφίλ της τεχνικής ESI-HPLC-MS/MS με κινητή φάση μεθανόλη: νερό: οξικό οξύ (50:49:1) και ταχύτητα ροής 0,5 mL/min. Παρακολούθηση της αντίδρασης (A) 109→91 και (B) 109→108 σε πρότυπο διάλυμα κατεχόλης 500 ppb. Παρακολούθηση της αντίδρασης (Γ) 109→91 και (Δ) 109→108 σε δείγμα από καλλιέργεια την 5^η πειραματική ημέρα.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται ο ίδιος χρόνος εμφάνισης της κορυφής των επιλεγμένων θραυσματοποιήσεων σε όλες τις περιπτώσεις τόσο στο πρότυπο διάλυμα όσο και στο δείγμα από την καλλιέργεια γεγονός που ταυτοποιεί πλήρως την κατεχόλη στο διάλυμα και ως συνέπεια την παρουσία μεταβολικής δράσης από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*. Να σημειωθεί ότι τα δείγματα από την καλλιέργεια ήταν πολύ αραιά και για αυτό το λόγο οι κορυφές εμφανίζουν θόρυβο.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως **το μικροφύκος προσλαμβάνει τη φαινόλη, την οξειδώνει σε κατεχόλη και ένα μέρος της κατεχόλης το απελευθερώνει στο διάλυμα.** Μηχανιστικά αυτό έχει πολύ μεγάλη σημασία καθώς πρέπει να ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι η διάσπαση της κατεχόλης είναι το καθοριστικό βήμα για το μεταβολικό μονοπάτι. Η διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου είναι μία απαιτητική διαδικασία που απαιτεί υψηλά ποσά ενέργειας εξαιτίας της σταθερότητάς του. Επιπλέον η παραγωγή της κατεχόλης αιτιολογεί πλήρως και τα αποτελέσματα των πειραμάτων σε ατμόσφαιρα αζώτου (όπου στο σκοτάδι δεν παρατηρήθηκε αποικοδόμηση εξαιτίας της απουσίας του συμπαραγόντα των οξειδωτικών ενζύμων) και περίσσειας οξυγόνου (όπου στο σκοτάδι παρατηρήθηκε σημαντική αποικοδόμηση). Εδραιώνεται ξεκάθαρα ότι **η διαδικασία αποικοδόμησης της φαινόλης**

από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* ακολουθεί το αερόβιο μονοπάτι. Είναι η πρώτη φορά στη βιβλιογραφία που πραγματοποιείται μελέτη της αποικοδόμησης της φαινόλης από το συγκεκριμένο μικροοργανισμό και παρέχονται στοιχεία για το μηχανισμό αποικοδόμησης. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι σε όλες τις περιπτώσεις έλαβαν χώρα παράλληλα πειράματα απουσία κυττάρων στις ίδιες συνθήκες για να ελεγχθεί εάν λαμβάνει χώρα αβιοτική απομάκρυνση της φαινόλης από το μέσο καλλιέργειας (π.χ. λόγω φωτοξείδωσης). Ωστόσο από τις μετρήσεις δεν παρατηρήθηκε να συμβαίνει κάτι τέτοιο καθώς η διαφορά ήταν στα όρια του πειραματικού σφάλματος της HPLC.

2.4.4. Μελέτη βιοαποικοδόμησης της φαινόλης από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* παρουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας.

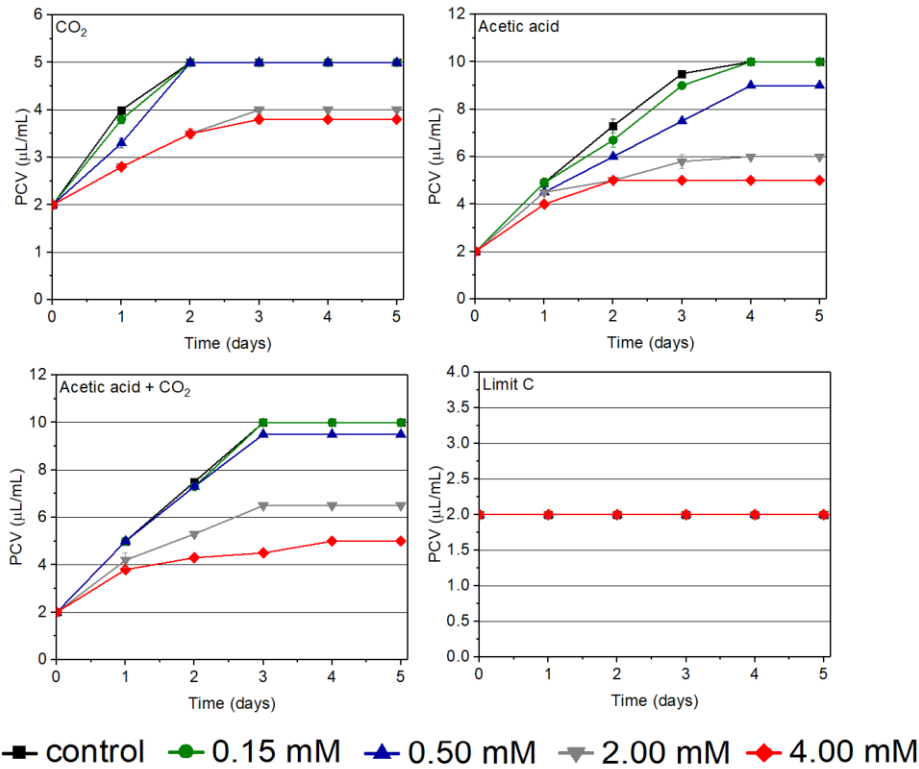
Με τα μέχρι τώρα αποτελέσματα της διατριβής εδραιώνεται ότι το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* έχει την ικανότητα να αποικοδομεί τη φαινόλη. Παρόλα αυτά δεν μπορεί να μη ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι, σε καμία από τις μέχρι τώρα περιπτώσεις που μελετήθηκαν, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Για το λόγο αυτό η σειρά πειραμάτων επαναλήφθηκε υπό την παρουσία είτε οργανικής πηγής άνθρακα (οξικό οξύ), είτε ανόργανης (διοξειδίου του άνθρακα) είτε συνδυαστικά και οι δύο πηγές προκειμένου να μελετηθεί η ανάπτυξη του μικροφύκου αλλά και η επίδραση στην αποικοδόμηση της φαινόλης. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά της συνθήκης όπου απουσίαζε η εναλλακτική πηγή άνθρακα (συνθήκη Limit C). Συγκεντρωτικά οι συνθήκες που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.9. Η χρονική διάρκεια των πειραμάτων ήταν 5 ημέρες. Από τις μετρήσεις ανάπτυξης (Εικόνα 2.16) φαίνεται καθαρά ότι η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη συγκέντρωση της φαινόλης έχουν ισχυρή επιρροή στην ανάπτυξη των καλλιεργειών. Πιο συγκεκριμένα ανεξάρτητα από την παρουσία ή απουσία φαινόλης υψηλότερη ανάπτυξη παρατηρήθηκε παρουσία οξικού οξέος ως εναλλακτική πηγή άνθρακα. Υπό την απουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα (Limit C συνθήκη) δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Τα αποτελέσματα της ανάπτυξης όσο αφορά τις καλλιέργειες μάρτυρες (control) είναι αναμενόμενα αν ληφθούν υπόψη δύο παράγοντες. Αρχικά το οξικό οξύ είναι μία πηγή άνθρακα που παρέχει στο μικροοργανισμό υψηλά αποθέματα ενέργειας και ως συνέπεια ευνοεί την αύξηση της βιομάζας και δεύτερον το διοξείδιο του άνθρακα προστέθηκε στους βιοαντιδραστήρες μόνο στην έναρξη του πειράματος και η ανάπτυξη σταμάτησε όταν καταναλώθηκε.

Πίνακας 2.9. Συνθήκες παρουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα που μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη πειραματική σειρά.

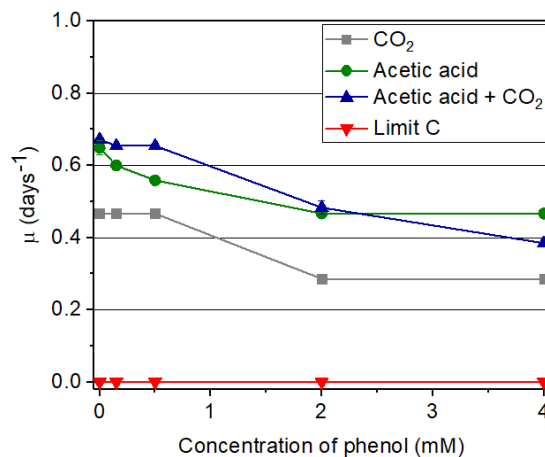
Συνθήκη	Πηγή άνθρακα	Συγκέντρωση στο θρεπτικό μέσο
Acetic acid	Οξικό οξύ	1048 mg/L
CO ₂	Διοξείδιο του άνθρακα	20% v/v
Acetic acid+CO ₂	Οξικό οξύ Διοξείδιο του άνθρακα	1048 mg/L 20% v/v
Limit C	-	-

Στις συνθήκες όπου υπάρχουν συνδυαστικά και οι δύο πηγές άνθρακα φαίνεται πως την ανάπτυξη ορίζει το οξικό οξύ γεγονός που επιβεβαιώνει την παροχή υψηλών ποσών ενέργειας στο μικροοργανισμό. Κάτω υπό όλες τις συνθήκες, ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις φαινόλης δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη μεγαλύτερη από την καλλιέργεια-μάρτυρα. Το φαινόμενο είναι πιο έντονο όταν η συγκέντρωση της φαινόλης ξεπερνάει τα 2,00 mM στο μέσο καλλιέργειας.

Από τις μετρήσεις της μεταβολής του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης είναι φανερό ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της φαινόλης στο μέσο καλλιέργειας προκαλεί σημαντική μείωση η οποία στη μέγιστη συγκέντρωση της ουσίας (4,00 mM) κυμαίνεται από 26% έως 43%. Όπως είναι φανερό από τις καμπύλες ανάπτυξης, μόνο η καλλιέργειες που περιέχουν συγκεντρώσεις φαινόλης μέχρι 0,50 mM φτάνουν τη συνολική βιομάζα της καλλιέργειας μάρτυρα. Στις μεγάλες συγκεντρώσεις η διαφορά στη βιομάζα είναι σημαντική. Μάλιστα στην περίπτωση παρουσίας οξικού οξέος στο μέσο καλλιέργειας, όπου η ανάπτυξη της καλλιέργειας μάρτυρα είναι πολύ πιο έντονη, η παραγωγή βιομάζας στις καλλιέργειες με 4,00 mM φαινόλης είναι μειωμένη κατά 50%. **Τα αποτελέσματα αυτά αποκαλύπτουν την ανασταλτική επίδραση που έχουν οι μεγάλες συγκεντρώσεις της φαινόλης στην ανάπτυξη** και αιτιολογούν το λόγο που δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη στη συνθήκη Limit C στην προηγούμενη σειρά πειραμάτων.

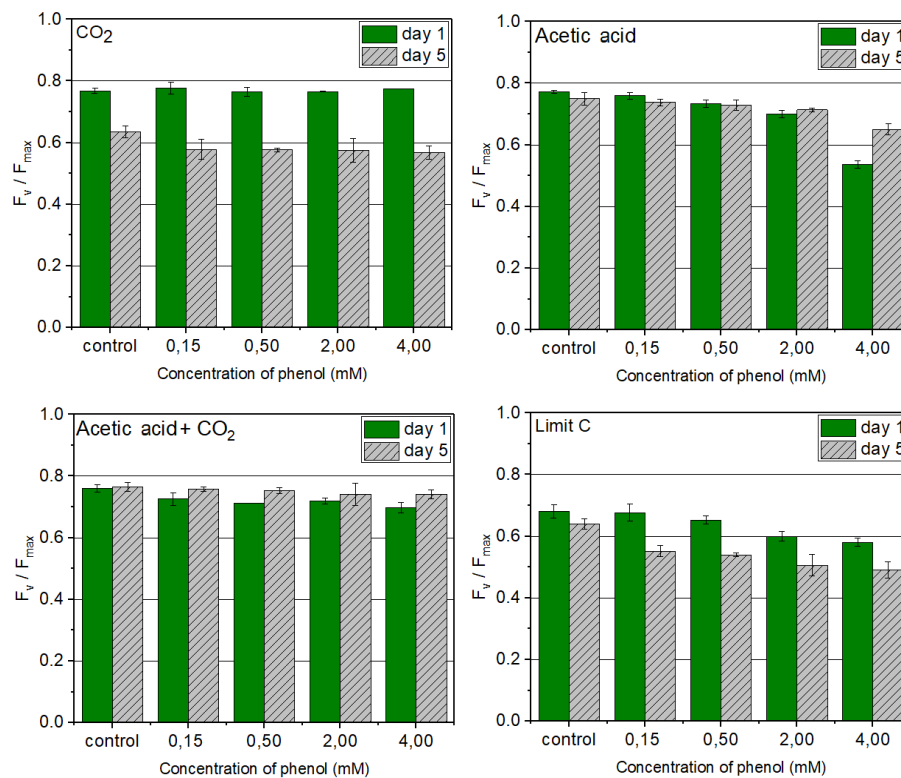


Εικόνα 2.16. Καμπύλες ανάπτυξης καλλιεργιών του *Chlamydomonas reinhardtii* υπό την παρουσία διαφόρων πηγών άνθρακα υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ υπό την παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων φαινόλης. Η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ήταν ίση με 2 $\mu\text{L PCV/mL}$.



Εικόνα 2.17. Μεταβολή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ) τις πρώτες 48 ώρες σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την παρουσία διάφορων εναλλακτικών πηγών άνθρακα υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

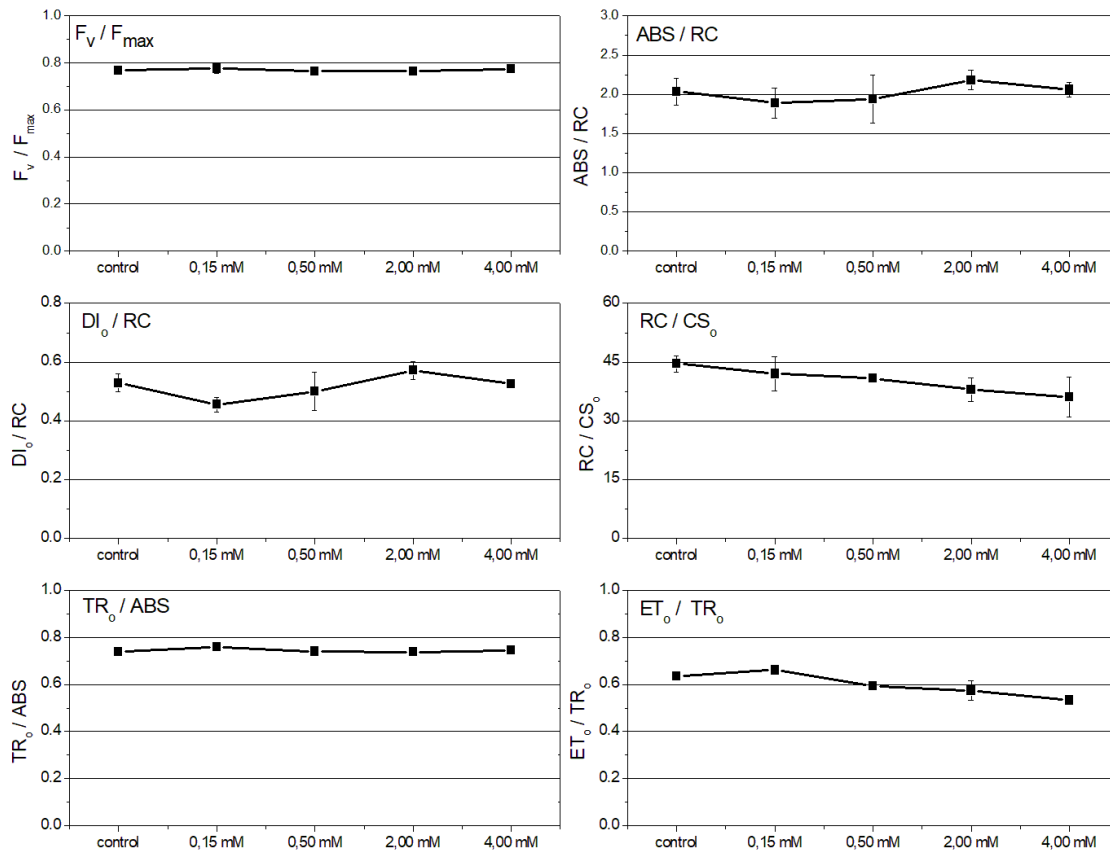
Για να μελετηθούν οι επιπτώσεις της παρουσίας της φαινόλης στη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μικροφύκου, έλαβαν χώρα μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού, υπολογισμός των παραμέτρων του JIP-test, μέτρηση φωτοσυνθετικών χρωστικών και μέτρηση του ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στις Εικόνες 2.18-2.22.



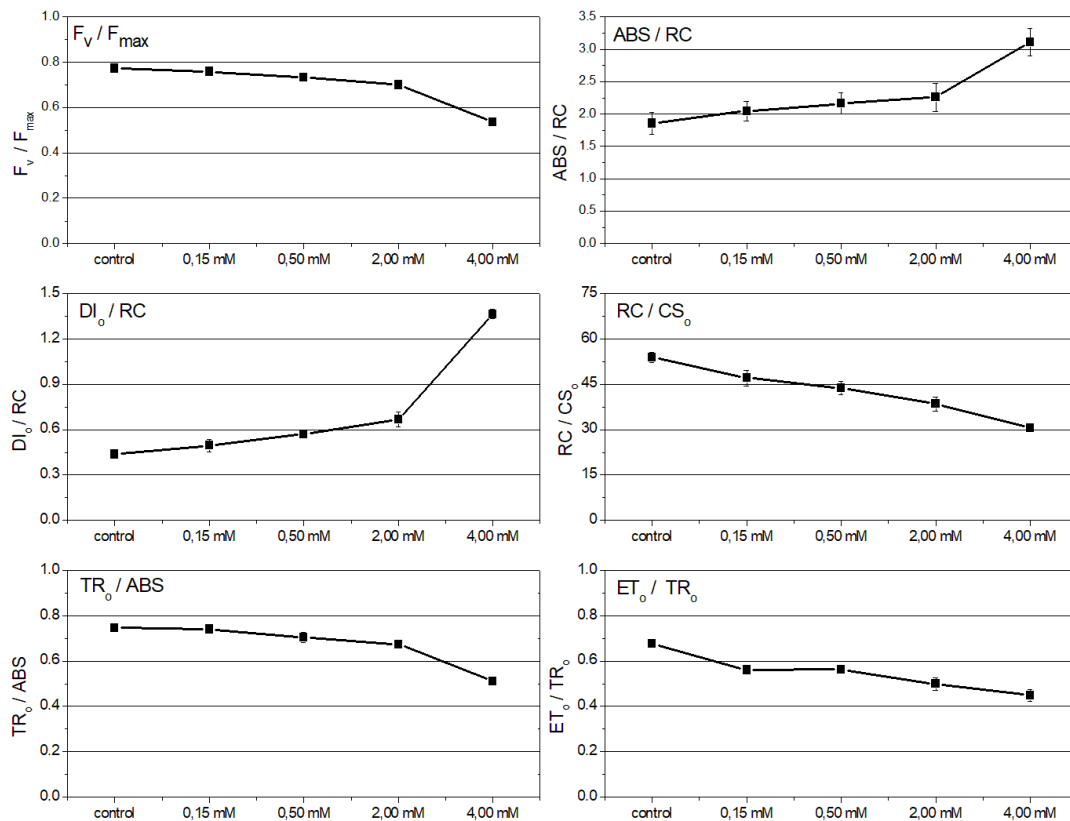
Εικόνα 2.18. Μεταβολή της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (F_v/F_{max}) των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* την 1^η (24 ώρες) και 5^η πειραματική ημέρα σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την παρουσία διάφορων εναλλακτικών πηγών άνθρακα υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50-60 \mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται η σημασία της παρουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας. Παρουσία διοξειδίου του άνθρακα δεν παρατηρείται μείωση της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης το πρώτο εικοσιτετράωρο. Στις καλλιέργειες οι οποίες περιέχουν οξικό οξύ παρατηρείται μία σταδιακή μείωση της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης, της πυκνότητας των ενεργών κέντρων αντίδρασης του φωτοσυστήματος II, της κβαντικής απόδοσης πρωταρχικής φωτοχημείας και της πιθανότητας μίας διέγερσης να

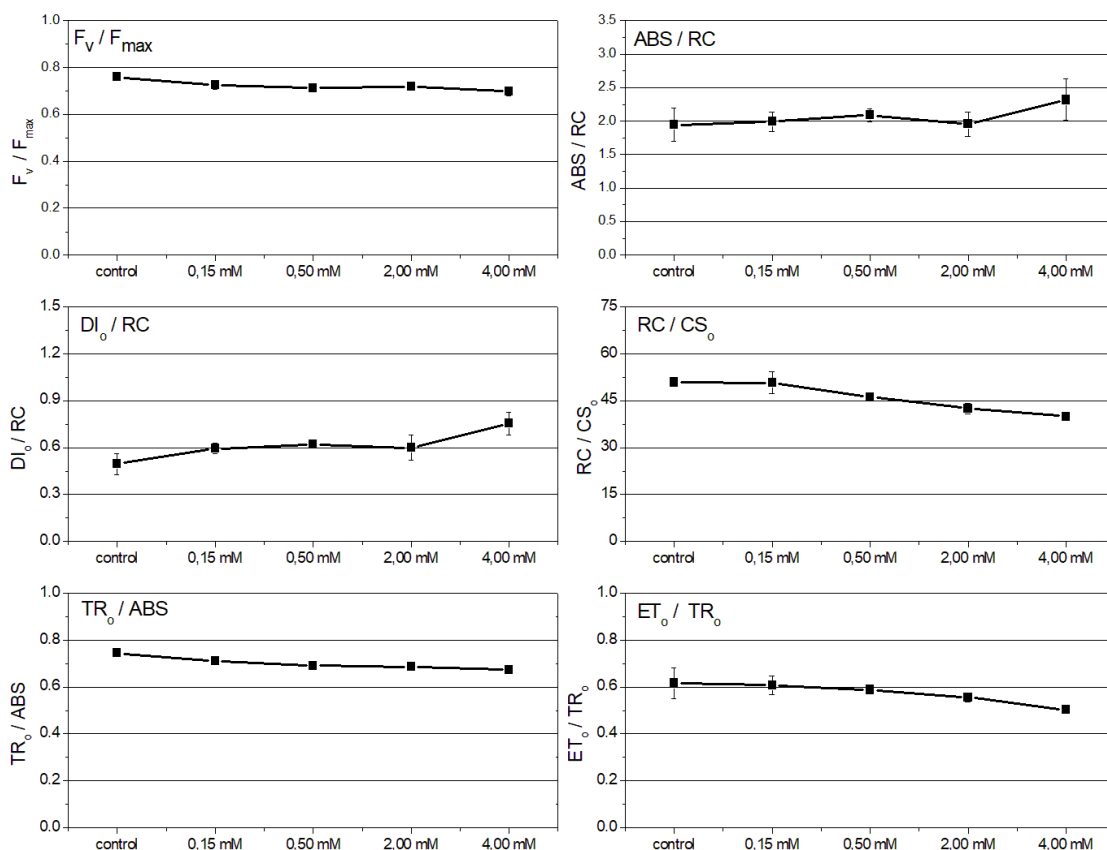
μετακινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την ανηγμένη μορφή της πλαστοκινόνης. Επιπρόσθετα καταγράφηκε μία αύξηση της λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας και της ενέργειας που διαχέεται υπό μορφή θερμότητας ανά κέντρο αντίδρασης.



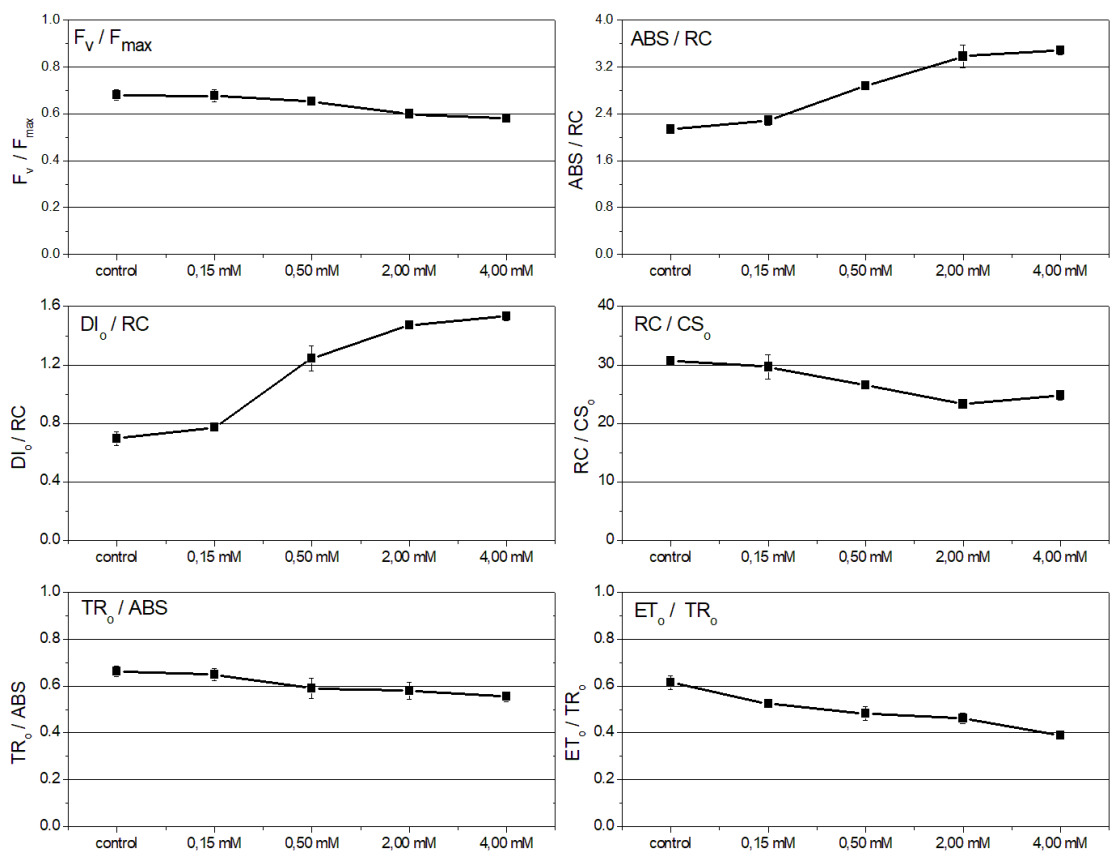
Εικόνα 2.19. Μεταβολή των παραμέτρων του JIP-test που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* 24 ώρες από την έναρξη του πειράματος σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την παρουσία 20% CO₂ υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 μmol φωτονίων·m⁻²·s⁻¹. F_v/F_{max} : φωτοσυνθετική απόδοση, ABS/RC: μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας, DI_o/RC : ενέργεια που διαχέεται υπό μορφή θερμότητας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης, RC/ CS_o : πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης, TR_o/ABS : κβαντική απόδοση πρωταρχικής φωτοχημείας, ET_o/TR_o : πιθανότητα μίας διέγερσης να μετακινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την ανηγμένη μορφή της πλαστοκινόνης.



Εικόνα 2.20. Μεταβολή των παραμέτρων του JIP-test που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* 24 ώρες από την έναρξη του πειράματος σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την παρουσία 1048 mg/L οξικού οξέος υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. F_v/F_{max} : φωτοσυνθετική απόδοση, ABS/RC: μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας, DI_o/RC: ενέργεια που διαχέεται υπό μορφή θερμότητας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης, RC/CS_o: πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης, TR_o/ABS: κβαντική απόδοση πρωταρχικής φωτοχημείας, ET_o/TR_o: πιθανότητα μίας διέγερσης να μετακινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την ανηγμένη μορφή της πλαστοκινόνης.



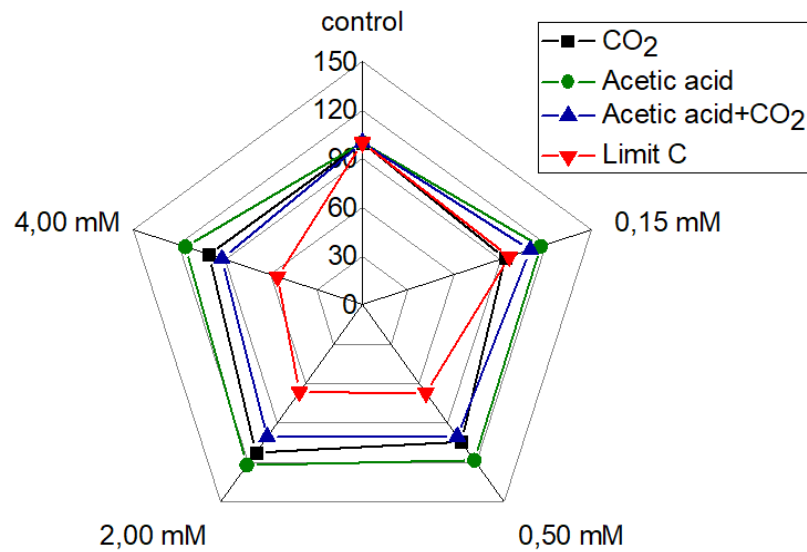
Εικόνα 2.21. Μεταβολή των παραμέτρων του JIP-test που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* 24 ώρες από την έναρξη του πειράματος σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την παρουσία 1048 mg/L οξικού οξέος και 20% CO_2 υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. F_v/F_{max} : φωτοσυνθετική απόδοση, ABS/RC: μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας, DI_o/RC : ενέργεια που διαχέεται υπό μορφή θερμότητας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης, RC/ CS_o : πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης, TR_o/ABS : κβαντική απόδοση πρωταρχικής φωτοχημείας, ET_o/TR_o : πιθανότητα μίας διέγερσης να μετακινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την ανηγμένη μορφή της πλαστοκινόνης.



Εικόνα 2.22. Μεταβολή των παραμέτρων του JIP-test που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* 24 ώρες από την έναρξη του πειράματος σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την απουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. F_v/F_{max} : φωτοσυνθετική απόδοση, ABS/RC: μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας, DI_o/RC: ενέργεια που διαχέεται υπό μορφή θερμότητας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης, RC/CS_o: πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης, TR_o/ABS: κβαντική απόδοση πρωταρχικής φωτοχημείας, ET_o/TR_o: πιθανότητα μίας διέγερσης να μετακινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την ανηγμένη μορφή της πλαστοκινόνης.

Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται και στη συνθήκη όπου απουσιάζει η εναλλακτική πηγή άνθρακα από το μέσο καλλιέργειας. (Limit C). Αυτές οι μεταβολές έχουν παρουσιαστεί προηγουμένως στη βιβλιογραφία και παρέχουν μία τυπική εκτίμηση αντιδράσεων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης (stress) όπως για παράδειγμα παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων όζοντος, θερμικής καταπόνησης και στην παρουσία υποκατεστημένων φαινολικών ενώσεων [107, 130, 168]. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι όταν το οξικό οξύ είναι η μόνη εναλλακτική πηγή άνθρακα αυτές οι αντιδράσεις εκδηλώνονται πιο έντονα το πρώτο εικοσιτετράωρο, ενώ υπό την παρουσία συνδυαστικά οξικού οξέος και διοξειδίου του άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας οι αντιδράσεις αυτές εκδηλώνονται με πιο ήπιο τρόπο, επιβεβαιώνοντας τις παρατηρήσεις στη συνθήκη όπου το διοξείδιο του άνθρακα ήταν η μόνη εναλλακτική πηγή. Σε όλες τις περιπτώσεις υπήρξε σημαντική μείωση των ενεργών κέντρων αντίδρασης (RC/CS_0) και της πιθανότητας μίας διέγερσης να μετακινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την ανηγμένη μορφή της πλαστοκινόνης (ET_0/TR_0), ανεξάρτητα με το αν εκδηλώθηκαν οι υπόλοιπες μεταβολές. Μία ακόμη σημαντική παρατήρηση ήταν ότι όταν το οξικό οξύ βρισκόταν στο μέσο καλλιέργειας η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση (F_v/F_{max}) επιστρέφει σε υψηλές τιμές, ιδιαίτερα στις καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση φαινόλης 4,00 mM. Αντίθετα, απουσία οξικού οξέος, η φωτοσυνθετική απόδοση μειώνεται σημαντικά την τελευταία πειραματική ημέρα. Από τα αποτελέσματα φαίνεται καθαρά **η σημασία της παρουσίας μίας επιπλέον οργανικής πηγής άνθρακα η οποία όταν διασπαστεί παρέχει υψηλά αποθέματα ενέργειας στο μικροφύκος**. Πάντως σε όλες τις περιπτώσεις οι καλλιέργειες οι οποίες περιέχουν φαινόλη εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές του λόγου F_v/F_{max} την τελευταία ημέρα.

Από τα αποτελέσματα του φωτοσυνθετικού ρυθμού παραγωγής οξυγόνου (Εικόνα 2.23) στις πρώτες 24 ώρες φαίνεται για άλλη μία φορά η σημασία της παρουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας. Στις περιπτώσεις όπου υπάρχει εναλλακτική πηγή άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας παρατηρείται ίσος ή μεγαλύτερος ρυθμός φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου σε σχέση με την καλλιέργεια μάρτυρα. Αντίθετα στη συνθήκη όπου απουσιάζει η εναλλακτική πηγή άνθρακα από το μέσο καλλιέργειας παρατηρείται σημαντική μείωση που φτάνει έως και 45%. Για άλλη μία φορά υπογραμμίζεται η σημασία της παρουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας όταν τα κύτταρα βρίσκονται υπό συνθήκες καταπόνησης εξαιτίας της παρουσίας της φαινόλης.



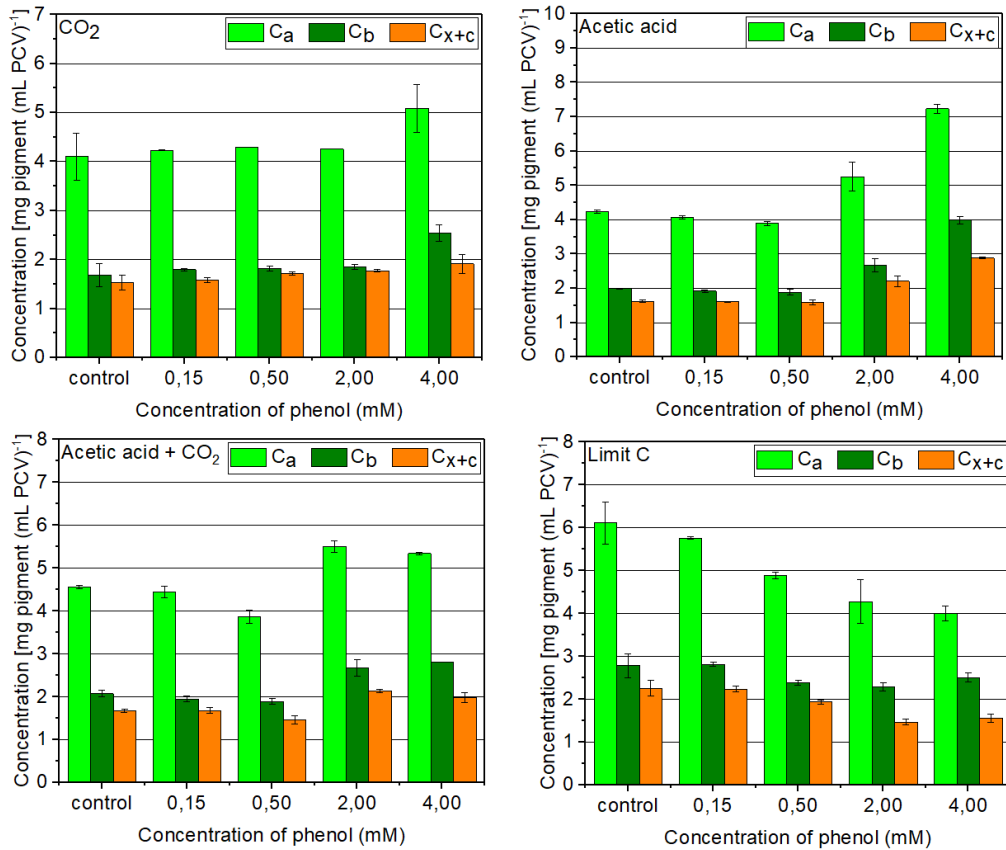
Εικόνα 2.23. Ποσοστιαία μεταβολή του μέγιστου ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου που μετρήθηκε πολωρογραφικά σε καλλιέργειες του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* τις πρώτες 24 ώρες από την έναρξη του πειράματος σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης και εναλλακτικών πηγών άνθρακα υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50-60 \mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Όλα τα αποτελέσματα είναι ανηγμένα ως προς ποσοστό επί της καλλιέργειας μάρτυρα (control) η οποία έχει τιμή 100%.

Το ίδιο ακριβώς μοτίβο δείχνουν και οι φωτοσυνθετικές χρωστικές οι οποίες μετρήθηκαν την 5^η πειραματική ημέρα. Στις μετρήσεις αυτές παρατηρείται μία βαθμιαία πτώση της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης-a με αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της φαινόλης στη συνθήκη όπου απουσιάζει εναλλακτική πηγή άνθρακα από το μέσο καλλιέργειας (Εικόνα 2.24). Αντίθετα αυτή η τάση δεν ακολουθείται στις άλλες περιπτώσεις. Ο λόγος είναι ότι οι καλλιέργειες μάρτυρες και οι καλλιέργειες με μικρές συγκεντρώσεις φαινόλης έδειξαν μεγαλύτερη αύξηση βιομάζας σε σχέση με αυτές που περιείχαν υψηλές συγκεντρώσεις της ξενοβιοτικής ουσίας. Αποτέλεσμα ήταν να λαμβάνουν χώρα φαινόμενα σκίασης των κυττάρων και να μην προσλαμβάνουν αποτελεσματικά το φως λόγω υψηλής κυτταρικής συγκέντρωσης και άρα να μειωθεί το περιεχόμενο της χλωροφύλλης-a. Γι αυτό το λόγο είναι πιο αντικειμενικό η σύγκριση να πραγματοποιηθεί με βάση το λόγο χλωροφύλλης-a προς χλωροφύλλη-b (Εικόνα 2.25). Σε όλες τις περιπτώσεις ο λόγος αυτός μειώνεται στις καλλιέργειες που περιείχαν φαινόλη σε σύγκριση με την καλλιέργεια μάρτυρα. Αυτή η μείωση μπορεί να αποδοθεί στη μείωση

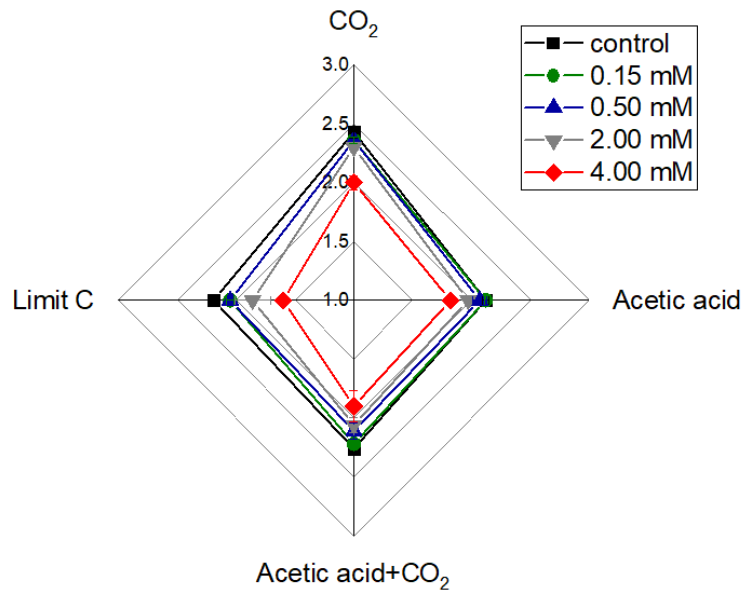
των ενεργών κέντρων αντίδρασης με την ταυτόχρονη αύξηση της φωτοσυνθετικής κεραίας. Υπενθυμίζεται ότι η χλωροφύλλη-a είναι μία χρωστική που είναι κυρίως προσδεσμένη στα κέντρα αντίδρασης ενώ η χλωροφύλλη-b είναι κυρίως μία χρωστική της φωτοσυνθετικής κεραίας. Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν τη **συνδυαστική επίδραση της συγκέντρωσης της φαινόλης και της παρουσίας ή απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα στη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii*.**

Η απομάκρυνση της φαινόλης από τις καλλιέργειες μετά από διάστημα 5 ημερών παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.26. Η απομάκρυνση εκφράστηκε με δύο τρόπους, ως προς την απόλυτη ποσότητα φαινόλης που απομακρύνθηκε από την καλλιέργεια μετρημένη σε μmol και ως προς την ποσότητα ανά μονάδα κυτταρικής συγκέντρωσης μετρημένη σε μmol ανά mL PCV.

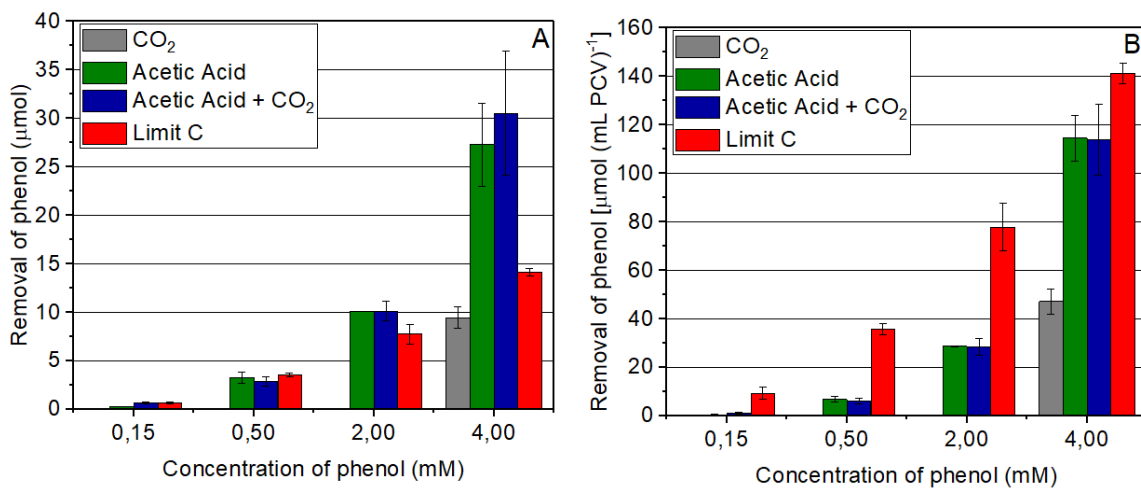
Είναι ξεκάθαρο ότι σε κάθε ξεχωριστή συνθήκη η αποικοδόμηση της φαινόλης αυξάνεται με αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της ουσίας. Υπό την παρουσία ανόργανης πηγής άνθρακα, ως μόνη εναλλακτική πηγή άνθρακα, βιοαποικοδόμηση παρατηρείται μόνο εκεί που έχουμε τη μέγιστη αρχική συγκέντρωση φαινόλης και είναι σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με τις υπόλοιπες αντίστοιχες συνθήκες. Φαίνεται λοιπόν πως η παρουσία ανόργανης πηγής άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας δε βοηθάει την αποικοδόμηση της φαινόλης. Αυτό υποστηρίζεται περαιτέρω από το γεγονός ότι στις μειξοτροφικές συνθήκες (οξικό οξύ και διοξειδίο του άνθρακα) η αποικοδόμηση της φαινόλης είναι ακριβώς ίδια με την ετεροτροφική συνθήκη (οξικό οξύ). Σε όρους απόλυτης αποικοδόμησης της φαινόλης, η παρουσία οξικού οξέος φαίνεται πως βοηθάει τη διαδικασία καθώς απομακρύνεται σχεδόν η διπλάσια ποσότητα φαινόλης από την καλλιέργεια σε σχέση με τη Limit C συνθήκη. Στην πραγματικότητα όμως αυτή η παρατήρηση δεν είναι αληθής καθώς πρέπει να ληφθεί υπόψη η σημαντική αύξηση της βιομάζας σε σχέση με τις υπόλοιπες συνθήκες. Γι αυτό το λόγο τα αποτελέσματα πρέπει να συγκριθούν με βάση την αναγωγή ανά μονάδα βιομάζας από τη στιγμή που στη Limit C συνθήκη δεν παρατηρείται ανάπτυξη. Με βάση αυτή το κριτήριο, σε συγκεντρώσεις από 2,00 mM και κάτω, είναι αισθητή η μείωση στην απομάκρυνση της φαινόλης από το μέσο καλλιέργειας σε ποσοστά από 63-93,5%.



Εικόνα 2.24. Περιεχόμενο φωτοσυνθετικών χρωστικών των καλλιεργειών του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την παρουσία διαφορετικών εναλλακτικών πηγών άνθρακα την 5^η πειραματική ημέρα υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50-60 \mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Όλες οι χρωστικές έχουν εκφραστεί σε mg χρωστικής ανά mL PCV. C_a: συγκέντρωση χλωροφύλλης-a, C_b: συγκέντρωση χλωροφύλλης-b, C_{x+c}: συγκέντρωση συνολικών καροτενοειδών (ξανθοφύλλες και καροτένια).



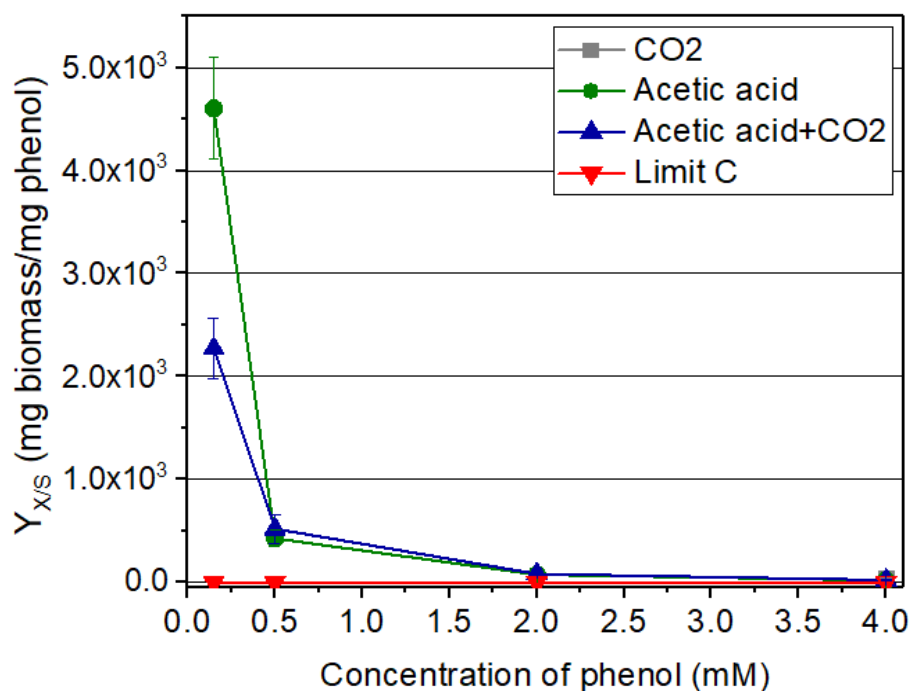
Εικόνα 2.25. Μεταβολή του λόγου χλωροφύλλης-a προς χλωροφύλλη-b των καλλιέργειων του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την παρουσία διαφορετικών εναλλακτικών πηγών άνθρακα την 5^η πειραματική ημέρα υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50-60 \mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.



Εικόνα 2.26. Απομάκρυνση της φαινόλης από καλλιέργειες του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* υπό την παρουσία διαφορετικών συνδυασμών εναλλακτικών πηγών άνθρακα την 5^η πειραματική ημέρα υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50-60 \mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Η απομάκρυνση εκφράστηκε (A) ως απόλυτη ποσότητα σε μmol και (B) ως η ποσότητα που απομακρύνθηκε ανά μονάδα κυτταρικής συγκέντρωσης $[\mu\text{mol}\cdot(\text{mL PCV})^{-1}]$.

Σε συνθήκες απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα από το μέσο καλλιέργειας τα κύτταρα προσπαθούν να προσαρμόσουν το μεταβολισμό τους ώστε να μεταβολίσουν τον άνθρακα που παρέχεται από τη φαινόλη και ταυτόχρονα να αποτοξικοποιήσουν το περιβάλλον τους. Παρόμοιες παρατηρήσεις αποτυπώθηκαν και σε καλλιέργειες του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* όταν επώαστηκε σε 0,15 mM φαινόλης [130]. Βρέθηκε ότι αποικοδομεί τη φαινόλη μόνο σε συνθήκες απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα και για αυτό το σκοπό χρησιμοποιούσε τη φαινόλη.

Βέβαια η συμπεριφορά αυτή του μικροοργανισμού αλλάζει όταν στο μέσο καλλιέργειας υπάρχει η μέγιστη ποσότητα φαινόλης που εξετάστηκε (4,00 mM). Εκεί παρατηρήθηκε μόνο 20% πτώση στην αποικοδόμηση της φαινόλης ανά μονάδα κυτταρικής συγκέντρωσης.



Εικόνα 2.27. Γράφημα που συσχετίζει τη μεταβολή συντελεστή απόδοσης ($Y_{x/s}$) σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση της φαινόλης στις τέσσερις πειραματικές συνθήκες που μελετήθηκαν, την 5^η πειραματική ημέρα, υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50-60 \mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Λαμβάνοντας υπόψη την παρατηρούμενη αναστολή στην ανάπτυξη υπολογίστηκε ο συντελεστής απόδοσης ($Y_{X/S}$). Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως η αποικοδόμηση της φαινόλης μειώνει σημαντικά την κυτταρική ανάπτυξη. Σύμφωνα με τη θεωρία του Pirt αυτό το γεγονός μπορεί να αποδοθεί στην κατάσταση μικροβιακής συντήρησης, δηλαδή η κατανάλωση του επιπλέον οργανικού υποστρώματος που αποτελεί την εύκολη πηγή ενέργειας να μη χρησιμοποιείται για τη σύνθεση βιομάζας αλλά για άλλες λειτουργίες [96]. Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι εφόσον η συντήρηση είναι μία διαδικασία η οποία μειώνει την ανάπτυξη, η παρουσία της συντήρησης είναι περισσότερο αισθητή όταν οι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης είναι πιο χαμηλοί, κάτι που υποστηρίζεται πλήρως από τον υπολογισμό του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης στις καλλιέργειες του *Chlamydomonas* στην παρούσα διατριβή [169]. Σε προηγούμενη μελέτη σε καλλιέργειες βακτηρίων έχει αναφερθεί ο παράγοντας αποσύζευξης της ενέργειας μεταξύ καταβολισμού και αναβολισμού. Είχε προταθεί ότι αυτή είναι μία παράμετρος η οποία οδηγεί στη μείωση της ικανότητας μετατροπής της ενέργειας σε βιομάζα ακόμα και υπό επάρκεια υποστρώματος. Αντίθετα το υπόστρωμα καταναλώνεται από τους μικροοργανισμούς για να σχηματίσει διάφορους ενδοκυττάριους μεταβολίτες και ATP. Οι μεταβολίτες αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή βιομάζας, μεταβολικών προϊόντων και στη μικροβιακή συντήρηση. Στην τελευταία περίπτωση υπάρχει απώλεια ενέργειας εξαιτίας περίπλοκων μεταβολικών κύκλων [93]. Στη δική μας περίπτωση οι παραπάνω υποθέσεις υποστηρίζονται από τα δεδομένα των μετρήσεων ανάπτυξης. Οι καλλιέργειες από τις οποίες απουσίαζε εναλλακτική πηγή άνθρακα δεν επέδειξαν καθόλου ανάπτυξη παρά την υψηλότερη αποικοδόμηση της φαινόλης σε σχέση με τις υπόλοιπες συνθήκες, επομένως η ενέργεια καταναλώνεται κατά το μεταβολισμό της ξενοβιοτικής ουσίας και όχι στη σύνθεση της βιομάζας. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι παρατηρήθηκε απελευθέρωση κατεχόλης στο μέσο καλλιέργειας υπό αυτές τις συνθήκες. Η διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου είναι μία διαδικασία που απαιτεί υψηλά ποσά ενέργειας εξαιτίας της σταθερότητας του αρωματικού συστήματος. Έτσι τα κύτταρα απελευθερώνουν εξωκυττάρια την περίσσεια κατεχόλης την οποία δε μπορούν να μεταβολίσουν. Αν ληφθούν υπόψη τα δεδομένα της αποικοδόμησης της φαινόλης σε συνθήκες παρουσίας οξικού οξέος όπως επίσης και το γεγονός της αύξησης της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (F_v/F_{max}) την τελευταία πειραματική ημέρα στην ίδια συνθήκη, φαίνεται πως η αποικοδόμηση της φαινόλης λαμβάνει χώρα προκειμένου τα μικροφύκη να αποτοξικοποιήσουν το περιβάλλον τους. Επίσης φαίνεται πως η ενέργεια που παράγεται από την κατανάλωση του οξικού οξέος

διοχετεύεται σε μεγάλο βαθμό προς την πλήρη διάσπαση της ξενοβιοτικής ουσίας. Σημαντικό στοιχείο που ενισχύει αυτή την υπόθεση είναι ο αυξημένος ρυθμός φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου υπό αυτές τις συνθήκες, το οποίο χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα από τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησης της φαινόλης και δείχνει τη συνολική ενεργοποίηση του μεταβολισμού. Αντίθετα στις καλλιέργειες της Limit C συνθήκης παρόλο που λαμβάνει χώρα μείωση της συγκέντρωσης της ξενοβιοτικής ουσίας, τα επίπεδα της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης δεν επιστρέφουν σε υψηλές τιμές. Αυτή η συμπεριφορά δείχνει τη σημασία της παρουσίας μίας πηγής υψηλής ενέργειας στο μέσο καλλιέργειας όπως είναι το οξικό οξύ. **Επομένως ο ρόλος του οξικού οξέος δεν πρέπει να υποτιμηθεί διότι είναι φανερό ότι επιτρέπει στα μικροφύκη να επανέλθουν από τις έντονες συνθήκες καταπόνησης που μετρήθηκαν το πρώτο εικοσιτετράωρο εξαιτίας της ύπαρξης φαινόλης ανεξάρτητα από την κυτταρική ανάπτυξη.** Επίσης η απόλυτη ποσότητα φαινόλης που αποικοδομείται είναι περίπου διπλάσια σε σχέση με τη συνθήκη Limit C. Φαίνεται λοιπόν ξεκάθαρα ότι **η αυξημένη καταπόνηση (stress) οδηγεί σε αυξημένη αποικοδόμηση της φαινόλης.**

2.4.5. Μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης εναλλακτικής πηγής άνθρακα στην αποικοδόμηση της φαινόλης από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*.

Από τα μέχρι τώρα αποτελέσματα αποδुकνείται η σημασία της ύπαρξης εναλλακτικής πηγής άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας όσο αφορά την αποικοδόμηση της φαινόλης. Παρατηρήθηκαν δύο διαφορετικά φαινόμενα. Από τη μία η παρουσία διοξειδίου του άνθρακα η οποία φαίνεται πως αναστέλει την αποικοδόμηση της φαινόλης, και από την άλλη η παρουσία οξικού οξέος η οποία φαίνεται πως στις μεγάλες συγκεντρώσεις φαινόλης υποβοηθάει την αποικοδόμηση ενώ ταυτόχρονα εξαλείφει τα συμπτώματα του στρες που προκαλεί αυτή. Για το σκοπό αυτό κρίθηκε απαραίτητο να μελετηθεί ένα εύρος συγκεντρώσεων διοξειδίου του άνθρακα και οξικού οξέος με σκοπό να παρατηρηθούν οι μεταβολές που προκαλούνται στην ανάπτυξη, τη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού καθώς και στην αποικοδόμηση της φαινόλης. Για άλλη μία φορά χρησιμοποιήθηκε το ίδιο εύρος συγκεντρώσεων φαινόλης (0,15-4,00 mM). Οι συγκεντρώσεις διοξειδίου του άνθρακα και οξικού οξέος παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.10.

Πίνακας 2.10. Συγκεντρώσεις εναλλακτικής πηγής άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη πειραματική σειρά.

Συγκέντρωση οξικού οξέος (mg/L)	Συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα (% v/v)
0*	0*
262	5
524	10
786	15
1048**	20***

* Η συγκέντρωση αντιστοιχεί στη συνθήκη Limit C που μελετήθηκε στην προηγούμενη πειραματική σειρά.

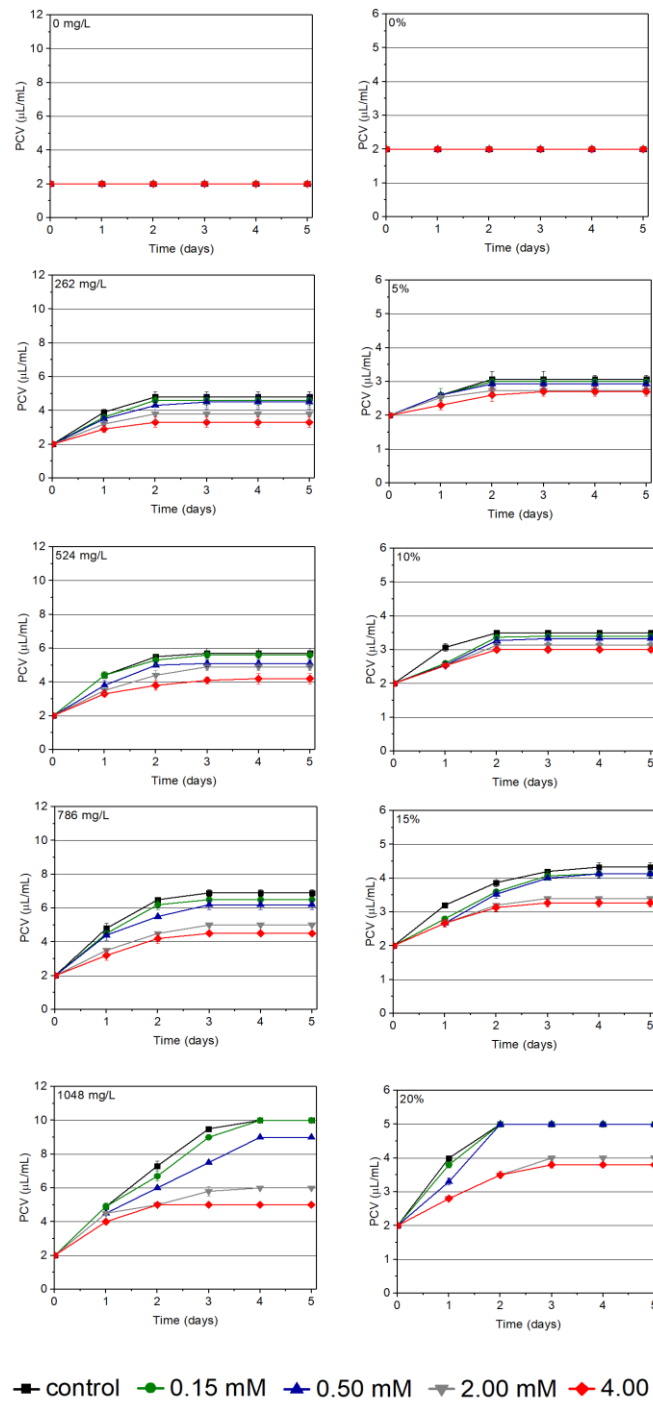
** Η συγκέντρωση αντιστοιχεί στη συνθήκη Acetic Acid που μελετήθηκε στην προηγούμενη πειραματική σειρά.

*** Η συγκέντρωση αντιστοιχεί στη συνθήκη CO₂ που μελετήθηκε στην προηγούμενη πειραματική σειρά.

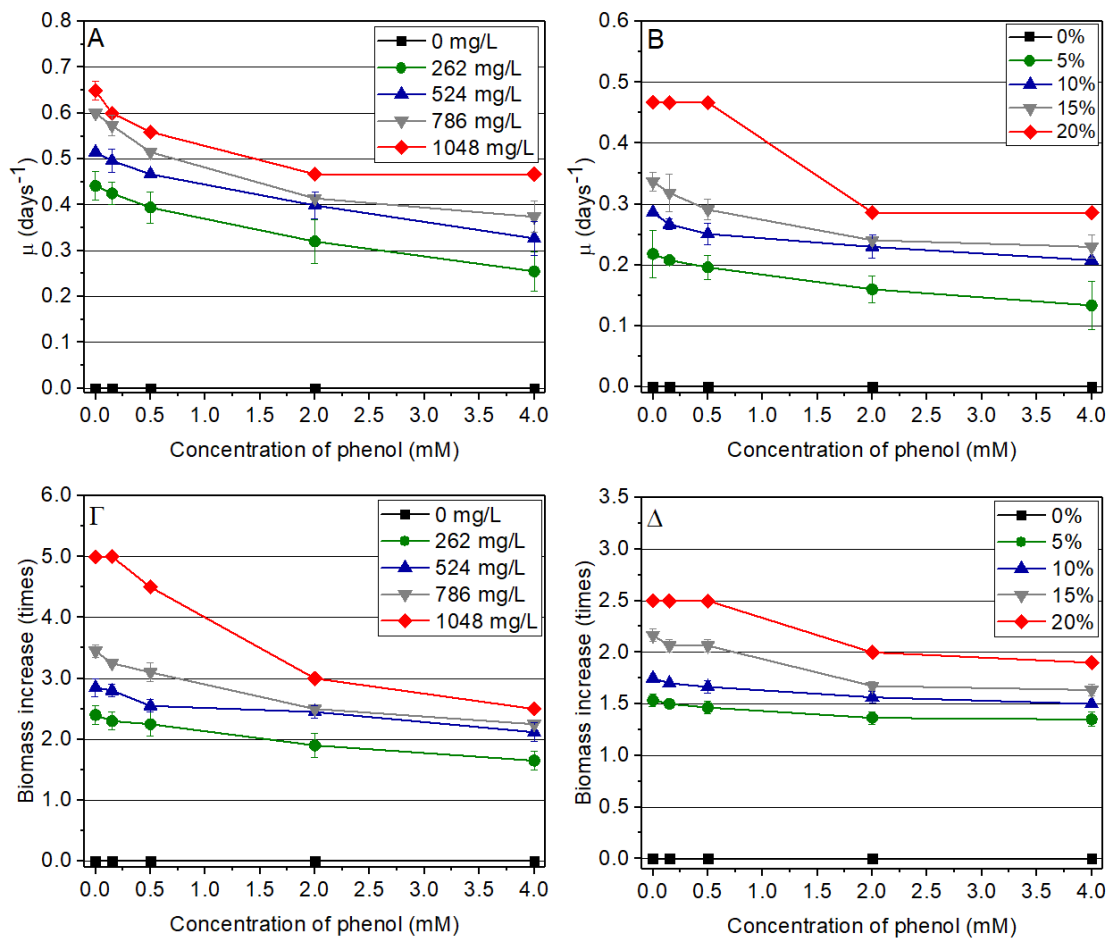
Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων ανάπτυξης (Εικόνα 2.28) φαίνεται πως η συγκέντρωση της εναλλακτικής πηγής άνθρακα σε συνδυασμό με τη συγκέντρωση της φαινόλης επηρέαζε σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Ανεξάρτητα από την παρουσία ή απουσία φαινόλης, η αύξηση της βιομάζας συσχετιζόταν άμεσα με τη συγκέντρωση της εναλλακτικής πηγής άνθρακα. Σε κάθε συγκέντρωση οξικού οξέος ξεχωριστά, παρατηρήθηκε πως η αύξηση της συγκέντρωσης της φαινόλης οδηγούσε σε μείωση της ανάπτυξης των καλλιέργειών. Παρόμοια συμπεριφορά εκδηλώθηκε και στις διάφορες συγκεντρώσεις του διοξειδίου του άνθρακα. Για άλλη μία φορά παρατηρήθηκε μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης τις πρώτες 48 ώρες η οποία κυμαινόταν από 28-63% στις καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση φαινόλης ίση με 4,00 mM. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι αυτή η μείωση ήταν πιο έντονη στις καλλιέργειες με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις οξικού οξέος στις οποίες οι καλλιέργειες μάρτυρες παρουσιάζουν πιο έντονη ανάπτυξη. Σημαντική είναι και η μεταβολή στη συνολική αύξηση της βιομάζας σε σχέση με την έναρξη του πειράματος. Στις καλλιέργειες με συγκέντρωση οξικού οξέος από 524 mg/L και πάνω η συνολική αύξηση της βιομάζας έφτασε σε ένα μέγιστο σημείο στην περίπτωση που στο μέσο καλλιέργειας υπήρχαν 4,00 mM φαινόλης δείχνοντας με emphaticό τρόπο την ανασταλτική δράση της. Σε εκείνη την περίπτωση η ανάπτυξη επηρεαζόταν περισσότερο από την υψηλή συγκέντρωση της φαινόλης παρά από την εναλλακτική πηγή άνθρακα όπως υποδηλώνουν τα αποτελέσματα. Στις καλλιέργειες με διοξείδιο του άνθρακα ως εναλλακτική πηγή παρατηρήθηκε επίσης αναστολή στην ανάπτυξη. Στις χαμηλές συγκεντρώσεις διοξειδίου του άνθρακα οι διαφορές δεν ήταν τόσο έντονες γιατί έτσι και αλλιώς

καταγράφηκε χαμηλή ανάπτυξη εξαιτίας της γρήγορης εξάντλησης των αποθεμάτων του διοξειδίου του άνθρακα από τον βιοαντιδραστήρα. Αντίθετα, στις δύο υψηλότερες συγκεντρώσεις (15 και 20%), η διαφορά στην ανάπτυξη ανάμεσα στην καλλιέργεια μάρτυρα και την καλλιέργεια με 4,00 mM φαινόλης ήταν έντονη.

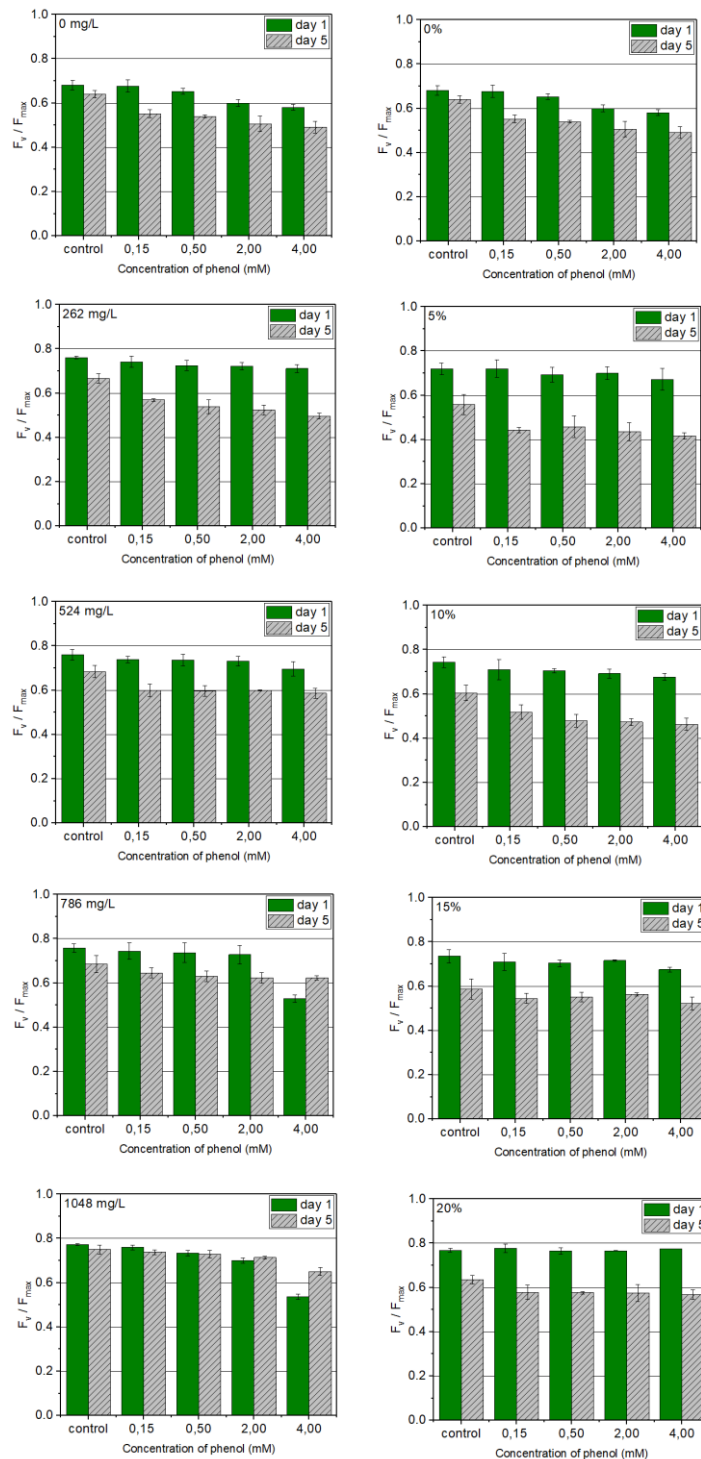
Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων επαγωγικού φθορισμού και υπολογισμού των παραμέτρων του JIP-test φαίνεται για άλλη μία φορά η συνδυαστική επίδραση της εναλλακτικής πηγής άνθρακα σε συνδυασμό με τη φαινόλη. Υπό την παρουσία διοξειδίου του άνθρακα φαίνεται πως την πρώτη ημέρα δεν υπάρχουν συμπτώματα έντονης καταπόνησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μικροφύκου παρά μόνο μικρές μεταβολές όσο αφορά την αύξηση της ποσότητας ενέργειας που χάνεται υπό μορφή θερμότητας, η μείωση της πυκνότητας των ενεργών κέντρων αντίδρασης, η αύξηση του μεγέθους της λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας και της πιθανότητας μίας διέγερσης να μετακινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την ανηγμένη μορφή της πλαστοκινόνης. Φαίνεται ότι ακολουθείται η ίδια τάση με αυτή που καταγράφηκε σε συγκέντρωση 20% διοξειδίου του άνθρακα στην προηγούμενη πειραματική σειρά. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι της 5^η πειραματική ημέρα σε όλες τις περιπτώσεις υπάρχει σημαντική πτώση της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης. Η διαφορά αυτή στη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση είναι αναμενόμενη λόγω της εξάντλησης του διοξειδίου του άνθρακα στο βιοαντιδραστήρα. Αντίθετα στις διάφορες συγκεντρώσεις οξικού οξέος οι μεταβολές στις παραμέτρους του JIP-test είναι πολύ πιο έντονες, ιδιαίτερα στην περίπτωση όπου στο μέσο καλλιέργειας υπάρχει η μέγιστη συγκέντρωση της φαινόλης. Αξιοσημείωτο είναι ότι σε αυτή την περίπτωση οι τιμές της μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας επιστρέφουν σε υψηλά επίπεδα την 5^η πειραματική ημέρα όταν η συγκέντρωση του οξικού είναι μεγαλύτερη από 524 mg/L. Για άλλη μία φορά υπογραμμίζεται η σημασία της ύπαρξης επαρκούς ποσότητας οργανικής εναλλακτικής πηγής άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας σε συνθήκες έντονης καταπόνησης.



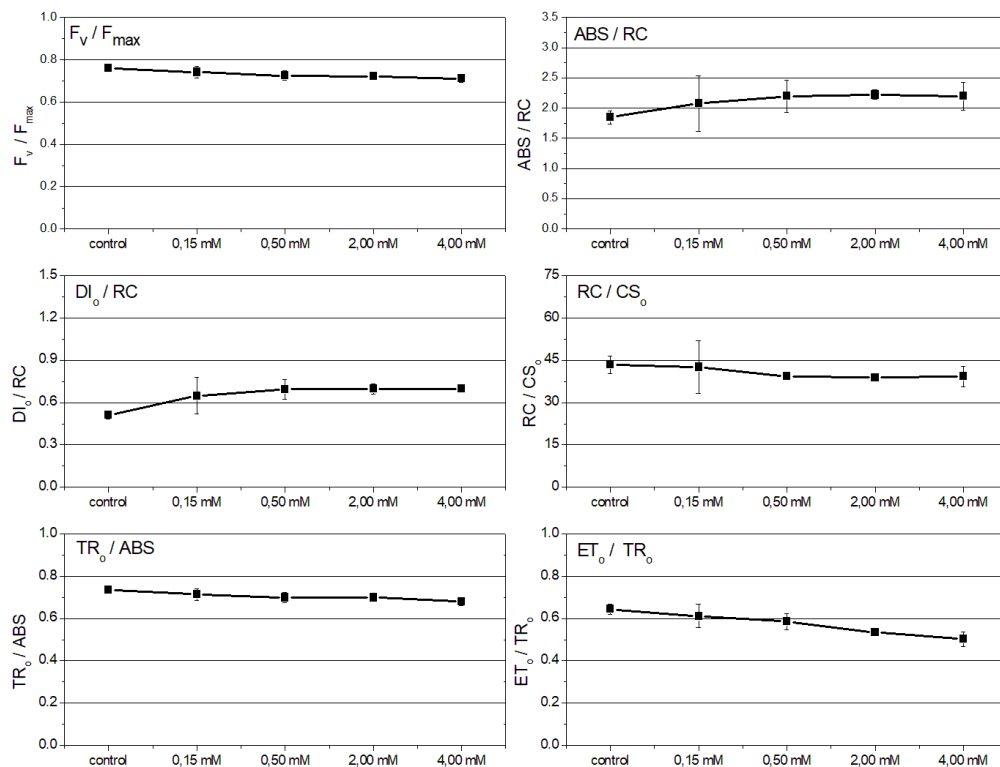
Εικόνα 2.28. Καμπύλες ανάπτυξης καλλιιεργειών του *Chlamydomonas reinhardtii* υπό την παρουσία ενός εύρους συγκεντρώσεων εναλλακτικών πηγών άνθρακα και φαινόλης και υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50-60 \mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ήταν ίση με $2 \mu\text{L PCV/mL}$. Τα γραφήματα της πρώτης σειράς αναφέρονται στις διάφορες συγκεντρώσεις οξικού οξέος και τα γραφήματα της δεύτερης σειράς στις διάφορες συγκεντρώσεις διοξειδίου του άνθρακα.



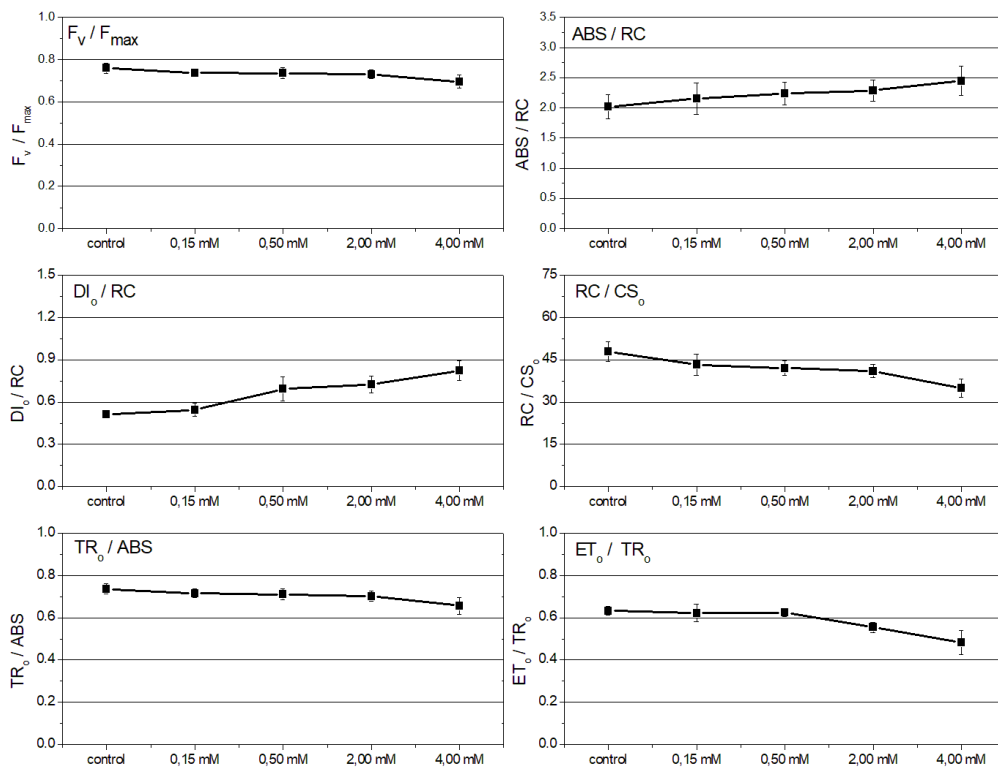
Εικόνα 2.29. Μεταβολή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ) τις πρώτες 48 ώρες και συνολική αύξηση της βιομάζας υπό την παρουσία ενός εύρους συγκεντρώσεων εναλλακτικών πηγών άνθρακα και φαινόλης και υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50\text{-}60 \mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Α. Μεταβολή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ) τις πρώτες 48 ώρες σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων οξικού οξέος. Β. Συνολικές φορές αύξησης της βιομάζας την 5^η ημέρα σε σχέση με την έναρξη του πειράματος σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων οξικού οξέος. Γ. Μεταβολή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ) τις πρώτες 48 ώρες σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων διοξειδίου του άνθρακα. Β. Συνολικές φορές αύξησης της βιομάζας την 5^η ημέρα σε σχέση με την έναρξη του πειράματος σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων διοξειδίου του άνθρακα.



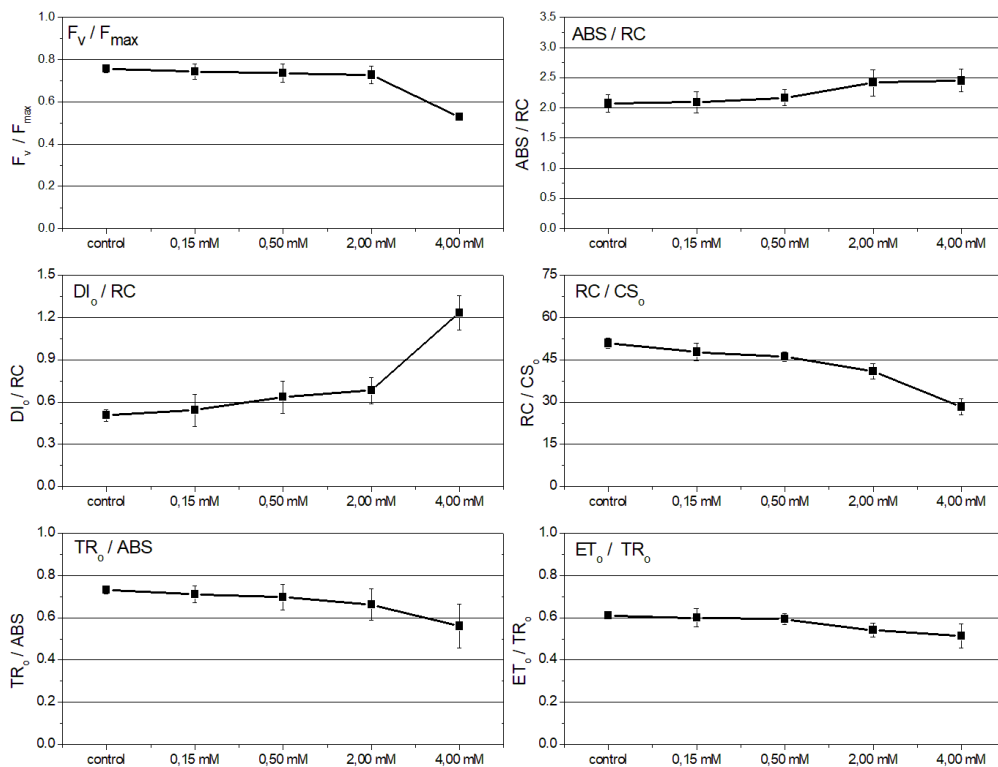
Εικόνα 2.30. Μεταβολή της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (F_v/F_{max}) των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* την 1^η (24 ώρες) και 5^η πειραματική ημέρα υπό την παρουσία ενός εύρους συγκεντρώσεων εναλλακτικών πηγών άνθρακα και φαινόλης και υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50-60 \mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Τα γραφήματα της πρώτης σειράς αναφέρονται στις διάφορες συγκεντρώσεις οξικού οξέος και τα γραφήματα της δεύτερης σειράς στις διάφορες συγκεντρώσεις διοξειδίου του άνθρακα.



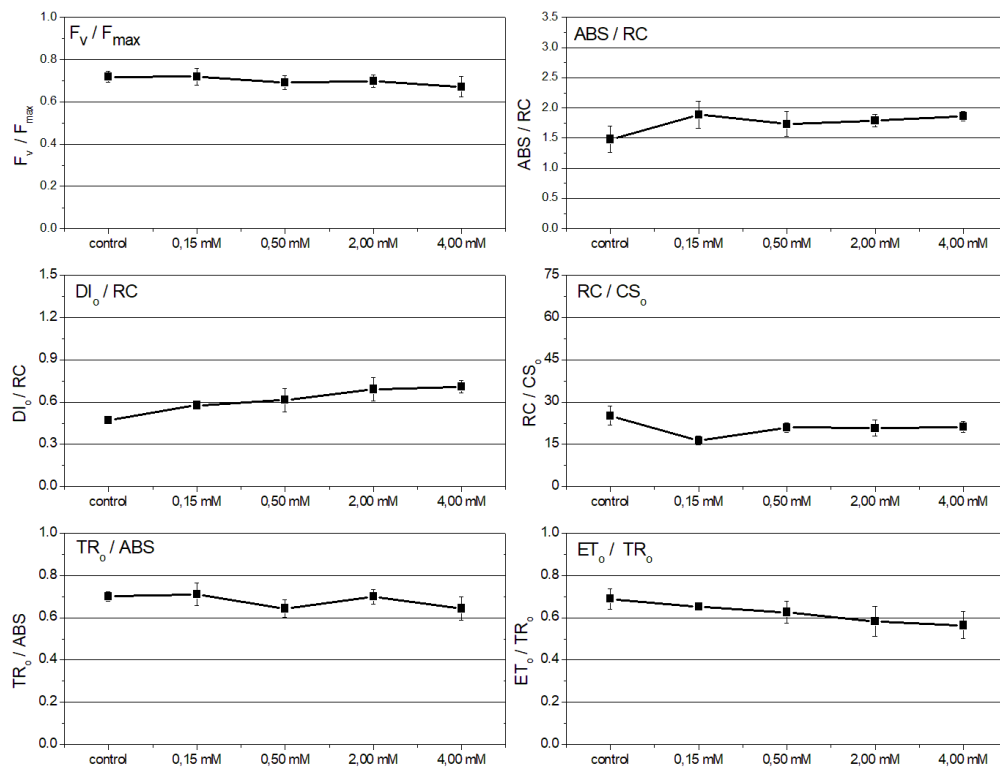
Εικόνα 2.31. Μεταβολή των παραμέτρων του JIP-test που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* 24 ώρες από την έναρξη του πειράματος σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την παρουσία 262 mg/L οξικού οξέος υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. F_v/F_{max} : φωτοσυνθετική απόδοση, ABS/RC: μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας, DI_o/RC : ενέργεια που διαχέεται υπό μορφή θερμότητας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης, RC/ CS_o : πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης, TR_o/ABS : κβαντική απόδοση πρωταρχικής φωτοχημείας, ET_o/TR_o : πιθανότητα μίας διέγερσης να μετακινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την ανηγμένη μορφή της πλαστοκινόνης.



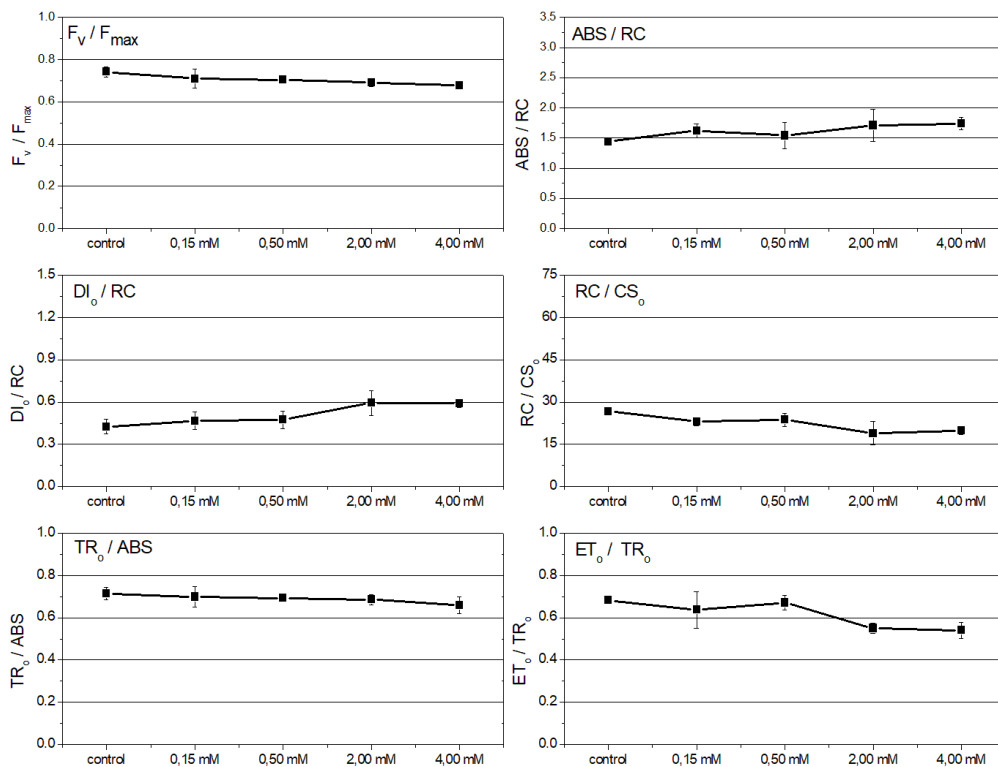
Εικόνα 2.32. Μεταβολή των παραμέτρων του JIP-test που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* 24 ώρες από την έναρξη του πειράματος σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την παρουσία 524 mg/L οξικού οξέος υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. F_v/F_{max} : φωτοσυνθετική απόδοση, ABS/RC: μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας, DI_o/RC : ενέργεια που διαχέεται υπό μορφή θερμότητας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης, RC/ CS_o : πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης, TR_o/ABS : κβαντική απόδοση πρωταρχικής φωτοχημείας, ET_o/TR_o : πιθανότητα μίας διέγερσης να μετακινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την ανηγμένη μορφή της πλαστοκινόνης.



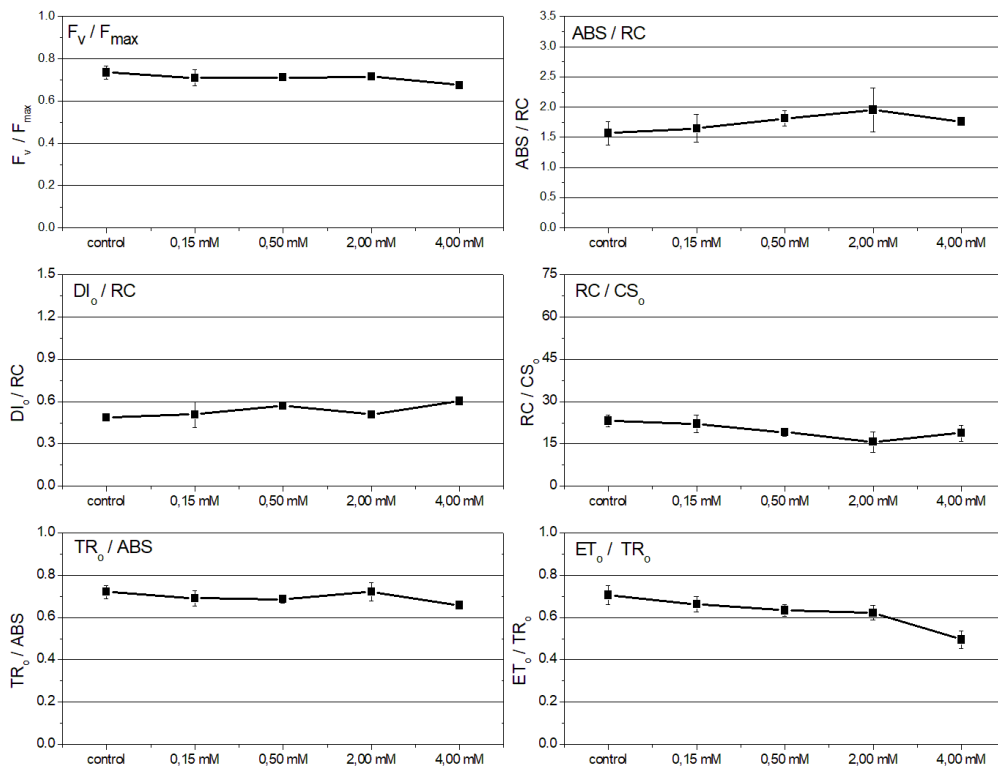
Εικόνα 2.33. Μεταβολή των παραμέτρων του JIP-test που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* 24 ώρες από την έναρξη του πειράματος σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την παρουσία 786 mg/L οξικού οξέος υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. F_v/F_{max} : φωτοσυνθετική απόδοση, ABS/RC: μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας, DI_o/RC : ενέργεια που διαχέεται υπό μορφή θερμότητας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης, RC/ CS_o : πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης, TR_o/ABS : κβαντική απόδοση πρωταρχικής φωτοχημείας, ET_o/TR_o : πιθανότητα μίας διέγερσης να μετακινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την ανηγμένη μορφή της πλαστοκινόνης.



Εικόνα 2.34. Μεταβολή των παραμέτρων του JIP-test που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* 24 ώρες από την έναρξη του πειράματος σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την παρουσία 5% v/v διοξειδίου του άνθρακα υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. F_v/F_{max} : φωτοσυνθετική απόδοση, ABS/RC: μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας, DI_o/RC : ενέργεια που διαχέεται υπό μορφή θερμότητας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης, RC/ CS_o : πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης, TR_o/ABS : κβαντική απόδοση πρωταρχικής φωτοχημείας, ET_o/TR_o : πιθανότητα μίας διέγερσης να μετακινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την ανηγμένη μορφή της πλαστοκινόνης.



Εικόνα 2.35. Μεταβολή των παραμέτρων του JIP-test που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* 24 ώρες από την έναρξη του πειράματος σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την παρουσία 10% v/v διοξειδίου του άνθρακα υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. F_v/F_{max} : φωτοσυνθετική απόδοση, ABS/RC: μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας, DI_o/RC : ενέργεια που διαχέεται υπό μορφή θερμότητας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης, RC/ CS_o : πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης, TR_o/ABS : κβαντική απόδοση πρωταρχικής φωτοχημείας, ET_o/TR_o : πιθανότητα μίας διέγερσης να μετακινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την ανηγμένη μορφή της πλαστοκινόνης.

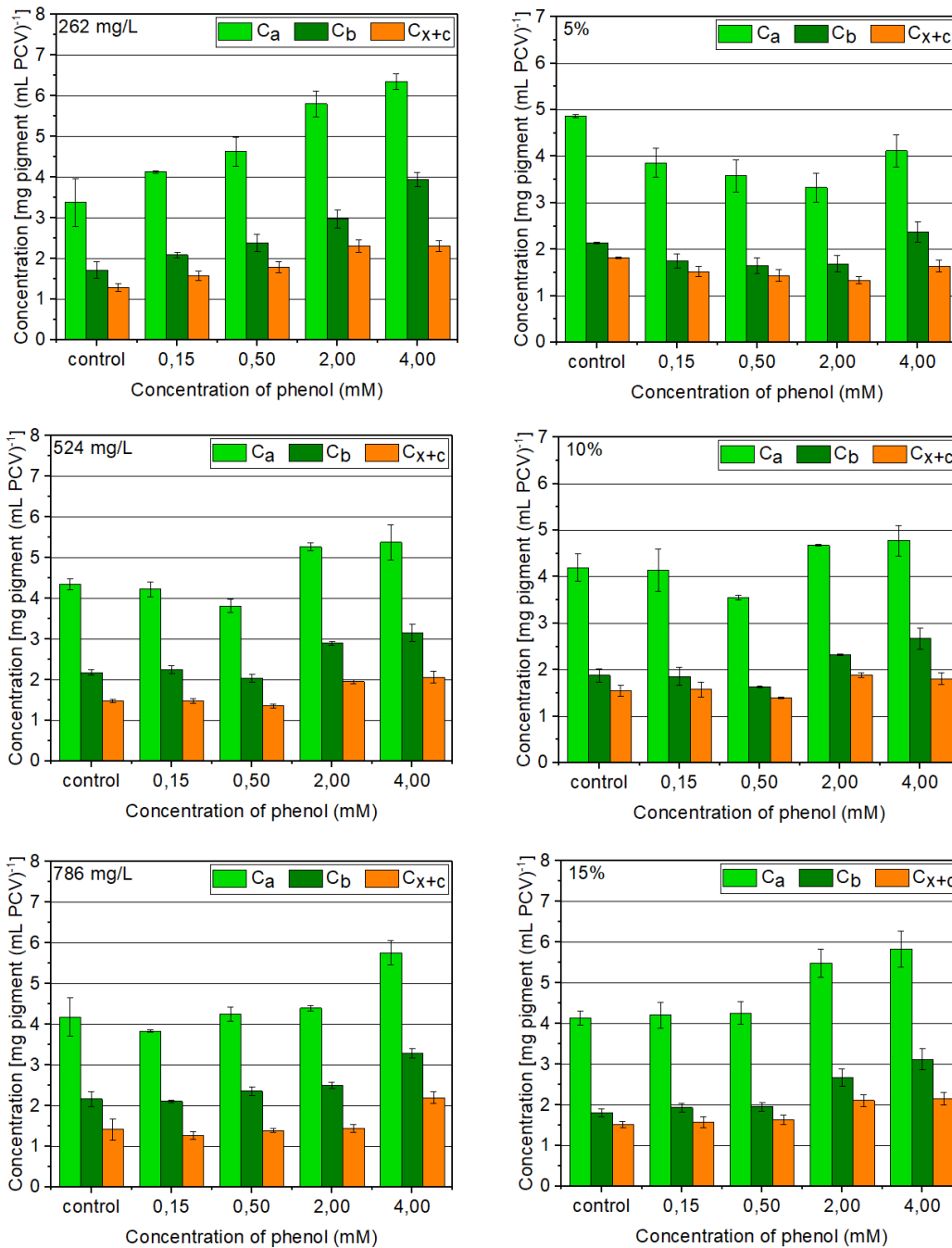


Εικόνα 2.36. Μεταβολή των παραμέτρων του JIP-test που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* 24 ώρες από την έναρξη του πειράματος σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την παρουσία 15% v/v διοξειδίου του άνθρακα υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. F_v/F_{max} : φωτοσυνθετική απόδοση, ABS/RC: μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας, DI_o/RC : ενέργεια που διαχέεται υπό μορφή θερμότητας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης, RC/ CS_o : πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης, TR_o/ABS : κβαντική απόδοση πρωταρχικής φωτοχημείας, ET_o/TR_o : πιθανότητα μίας διέγερσης να μετακινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την ανηγμένη μορφή της πλαστοκινόνης.

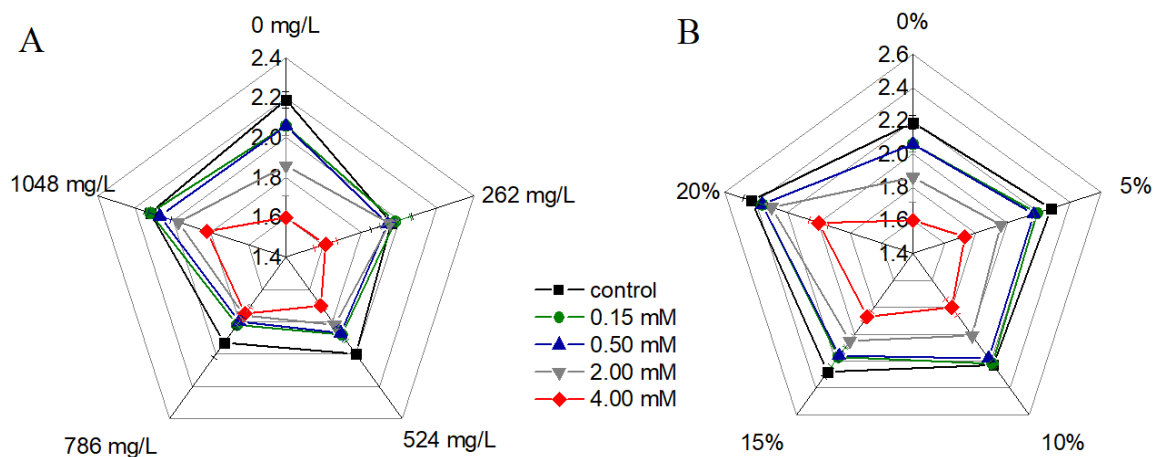
Από τις μετρήσεις φωτοσυνθετικών χρωστικών και συγκεκριμένα του υπολογισμού του λόγου χλωροφύλλης-a προς χλωροφύλλη-b αποδεικνύεται για άλλη μία φορά η σημασία της ύπαρξης εναλλακτικής πηγής άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας. Η μείωση αυτή είναι πολύ έντονη στη μέγιστη συγκεντρωση της φαινόλης που χρησιμοποιήθηκε κυριώς στις χαμηλές συγκεντρώσεις οξικού οξέος και σε όλες τις συγκεντρώσεις διοξειδίου του άνθρακα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ότι η μείωση αυτή είναι σχεδόν 37% στη συνθήκη όπου απουσιάζει εναλλακτική πηγή άνθρακα, περίπου 22% στη συνθήκη που έχουμε τη μέγιστη συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα ενώ είναι μόλις 14% στη συνθήκη όπου έχουμε τη μέγιστη συγκέντρωση οξικού οξέος.

Με τη συσχέτιση των δεδομένων μεταξύ μετρήσεων ανάπτυξης, επαγωγικού φθορισμού και φωτοσυνθετικών χρωστικών δηλώνεται εμφατικά η σημασία της παρουσίας ενός υποστρώματος το οποίο προωθεί την ανάπτυξη στο μέσο καλλιέργειας και προκαλεί απόσβεση των συνθηκών αβιοτικής καταπόνησης. Η Εικόνα 2.37 παρουσιάζει τη μεταβολή της συγκέντρωσης των φωτοσυνθετικών χρωστικών στο μέσο καλλιέργειας την 5^η πειραματική ημέρα σε καλλιέργειες με διάφορες συγκεντρώσεις οξικού οξέος και διοξειδίου του άνθρακα και η Εικόνα 2.38 παρουσιάζει τη μεταβολή του λόγου χλωροφύλλης-a προς χλωροφύλλη-b σε όλες τις πειραματικές συνθήκες. Από την Εικόνα 2.37 έχουν ληφθεί οι συγκεντρώσεις 0 mg/L οξικού οξέος και 0% v/v διοξειδίου του άνθρακα (Limit C συνθήκη), η συγκέντρωση 1048 mg/L οξικού οξέος (Acetic acid συνθήκη) και η συγκέντρωση 20% v/v διοξειδίου του άνθρακα (CO₂ συνθήκη) οι οποίες παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.24.

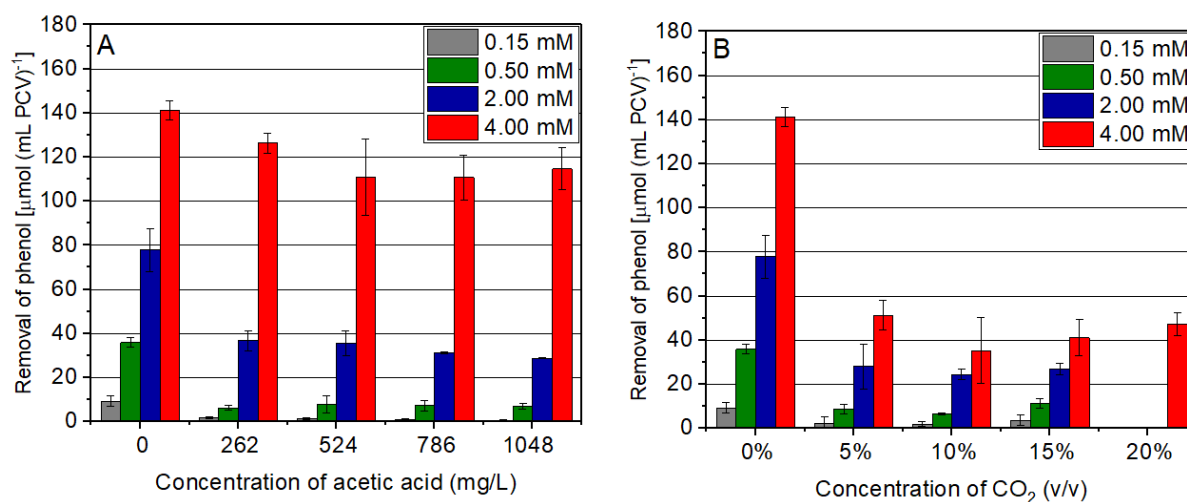
Όσο αφορά τα αποτελέσματα αποικοδόμησης παρατηρούνται δύο διαφορετικές τάσεις ανάλογα με την εναλλακτική πηγή άνθρακα. Από τη μία, η παρουσία του διοξειδίου του άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας αναστέλει σημαντικά τη διαδικασία αποικοδόμησης της φαινόλης ακόμα και όταν το αέριο βρίσκεται σε μικρό ποσοστό στο θρεπτικό μέσο. Η μείωση αυτή φτάνει μέχρι και το 80% στις μικρές συγκεντρώσεις φαινόλης ενώ είναι περίπου 70% στις μεγαλύτερες. Βασικό συμπέρασμα είναι ότι το διοξείδιο του άνθρακα δεν είναι κατάλληλο βοηθητικό υπόστρωμα για συμμεταβολισμό της φαινόλης. Αφενός η γρήγορη εξαντλήσή του από το θρεπτικό μέσο δε βοηθάει την αύξηση της βιομάζας και αφετέρου μειώνει σε μεγάλο βαθμό την ικανότητα αποικοδόμησης της φαινόλης από το μικροφύκος.



Εικόνα 2.37. Περιεχόμενο φωτοσυνθετικών χρωστικών των καλλιεργειών του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την παρουσία 262, 524 και 786 mg/L οξικού οξέος (αριστερά) και 5%, 10% και 15% v/v διοξειδίου του άνθρακα (δεξιά) την 5^η πειραματική ημέρα υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Όλες οι χρωστικές έχουν εκφραστεί σε mg χρωστικής ανά mL PCV. C_a: συγκέντρωση χλωροφύλλης-α, C_b: συγκέντρωση χλωροφύλλης-β, C_{x+c}: συγκέντρωση συνολικών καροτενοειδών (ξανθοφύλλες και καροτένια).



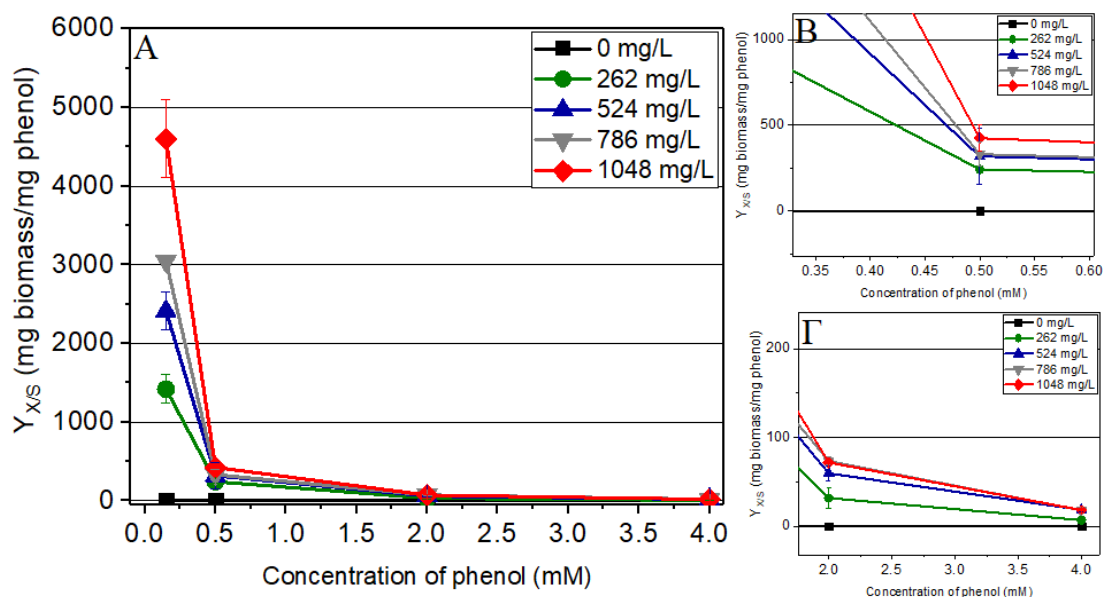
Εικόνα 2.38. Μεταβολή του λόγου χλωροφύλλης-α προς χλωροφύλλη-β των καλλιέργειων του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την παρουσία (A) διαφόρων συγκεντρώσεων οξικού οξέος και (B) διαφόρων συγκεντρώσεων διοξειδίου του άνθρακα, την 5^η πειραματική ημέρα υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50\text{-}60 \mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.



Εικόνα 2.39. Απομάκρυνση της φαινόλης από καλλιέργειες του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* υπό την παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων (A) οξικού οξέος και (B) διοξειδίου του άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας την 5^η πειραματική ημέρα, υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50\text{-}60 \mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Η απομάκρυνση είναι εκφρασμένη ως η ποσότητα που απομακρύνθηκε ανά μονάδα κυτταρικής συγκέντρωσης [$\mu\text{mol}\cdot(\text{mL PCV})^{-1}$].

Αντίθετα, υπό την παρουσία οξικού οξέος, παρατηρείται μία σημαντική διαφοροποίηση ανάλογα με τη συγκέντρωση της φαινόλης. Στις μικρές συγκεντρώσεις φαινόλης (0,15 και 0,50 mM) η μείωση στην ικανότητα αποικοδόμησης ανά μονάδα κυτταρικής συγκέντρωσης παρουσία οξικού οξέος κυμαίνεται από 80-94% περίπου, στα 2,00 mM φτάνει το 60% αλλά στη μεγαλύτερη συγκέντρωση φτάνει μόνο έως 20%. Αυτό το γεγονός, σε συνδυασμό με τη μειωμένη ανάπτυξη δείχνει την ενεργοποίηση του μεταβολισμού του μικροφύκου για να αποικοδομήσει τη φαινόλη. Αυτό ενισχύεται από την παρατήρηση ότι σε περίπτωση που στο μέσο καλλιέργειας η αρχική συγκέντρωση της φαινόλης ήταν 4,00 mM η ανάπτυξη έφτανε σε ένα μέγιστο ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του οξικού οξέος στο μέσο καλλιέργειας.

Είναι πιθανό ότι στις μεγάλες συγκεντρώσεις φαινόλης λαμβάνει χώρα και συμμαβολική αποικοδόμηση της ουσίας. Ο συνδυασμός όλων των παραμέτρων που υπολογίστηκαν δείχνει πως το οξικό οξύ είναι μία εύκολη πηγή ενέργειας για τα μικροφύκη και βοηθάει την εξάλειψη των συνθηκών αβιοτικής καταπόνησης που προκαλούνται από τις υψηλές συγκεντρώσεις φαινόλης στο μέσο καλλιέργειας. Τα παραπάνω συμπεράσματα υποστηρίζονται πλήρως και από τον υπολογισμό του συντελεστή απόδοσης (Εικόνα 2.40). Παρουσιάζεται μία σημαντική μείωση του συντελεστή υπό την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων φαινόλης που σχετίζεται αφενός με τη μειωμένη ανάπτυξη και αφετέρου από την αυξημένη αποικοδόμηση. Μάλιστα όσο αυξάνεται η αρχική συγκέντρωση της φαινόλης τόσο οι τιμές του συντελεστή έχουν περισσότερο κοντινές τιμές σε συγκεντρώσεις οξικού οξέος από 2,00 mM και άνω. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αντιπροσωπευτικά της στρατηγικής που ακολουθεί το μικροφύκος. Όταν βρίσκεται σε συνθήκες έντονης καταπόνησης επιλέγει να επενδύσει τα ενεργειακά του αποθέματα στην αποικοδόμηση της ξενοβιοτικής ουσίας παρά στην ανάπτυξη, προκειμένου να μειώσει τα επίπεδα της ουσίας σε “ανεκτά” όρια για αυτό. Αυτό αποτυπώνεται και από τα αποτελέσματα των μετρήσεων επαγωγικού φθορισμού. **Το σύνολο των αποτελεσμάτων αυτών δείχνει πως το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* λειτουργεί ως μια έξυπνη, καλοκουρδισμένη βιοενεργητική μηχανή και προσαρμόζει το μεταβολισμό του ώστε να επιβιώσει στις εκάστοτε συνθήκες.**



Εικόνα 2.40. Γράφημα που συσχετίζει τη μεταβολή συντελεστή απόδοσης ($Y_{X/S}$) σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση της φαινόλης υπό την παρουσία ενός εύρους συγκεντρώσεων οξικού οξέος την 5^η πειραματική ημέρα, υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. (A) Πλήρες γράφημα, (B) Εστίαση στην περιοχή που αναφέρεται σε αρχική συγκέντρωση φαινόλης 0,50 mM, (Γ) Εστίαση στην περιοχή που αναφέρεται σε αρχικές συγκεντρώσεις φαινόλης 2,00 και 4,00 mM.

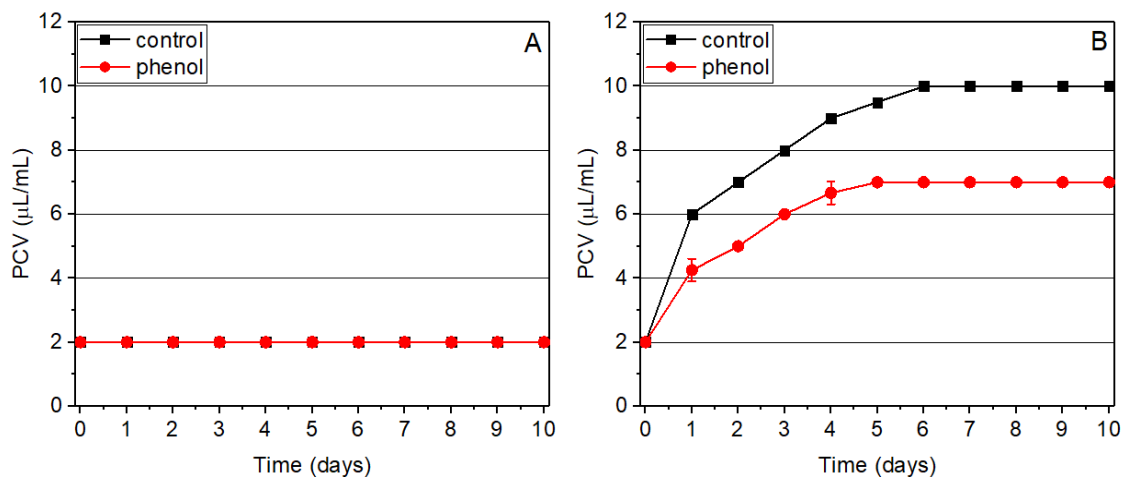
2.4.6. Μελέτη της επίδρασης της παρουσίας ή απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα στο βιοενεργητικό ισοζύγιο παραγωγής κατεχόλης κατά την αποικοδόμηση της φαινόλης από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*.

Από τα μέχρι τώρα αποτελέσματα είναι φανερό ότι η αποικοδόμηση της φαινόλης ρυθμίζεται από ένα σύνολο βιοενεργητικών παραμέτρων. Προχωρώντας ένα βήμα ακόμα μελετήθηκε η παραγωγή του μεταβολικού ενδιάμεσου σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας οξικού οξέος υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 70-80 $\mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Τα πειράματα αυτή τη φορά έλαβαν χώρα σε κωνικές φιάλες των 100 mL με όγκο καλλιέργειας 50 mL, προκειμένου το σύστημα να μην είναι ερμητικά κλειστό και διήρκεσαν 10 ημέρες. Επίσης μελετήθηκε μόνο η μέγιστη συγκέντρωση φαινόλης (4,00 mM). Έλαβαν χώρα μετρήσεις ανάπτυξης, επαγωγικού φθορισμού και μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής

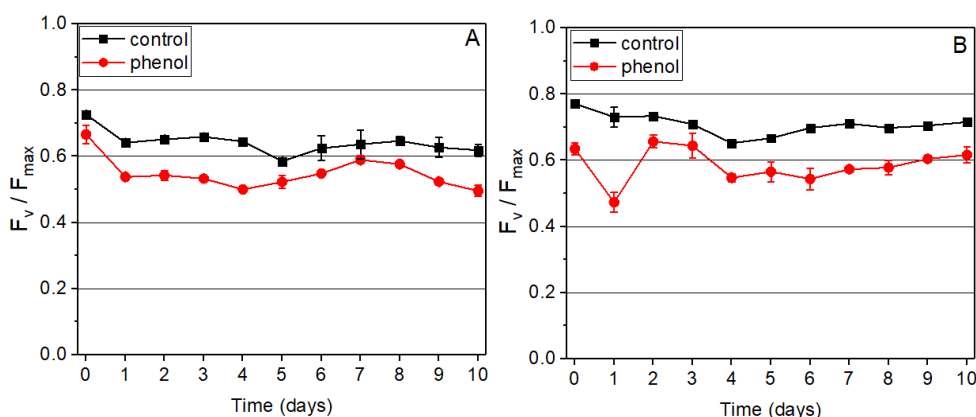
απόδοσης αντίστροφης φάσης μελετήθηκε η απομάκρυνση της φαινόλης από το μέσο καλλιέργειας και η ταυτόχρονη παραγωγή κατεχόλης.

Από τις μετρήσεις ανάπτυξης για άλλη μία φορά επιβεβαιώνεται πως η φαινόλη είναι ένα υπόστρωμα που δεν ευνοεί την ανάπτυξη. Απουσία οξικού οξέος δεν καταγράφηκε αύξηση της βιομάζας ενώ παρουσία οξικού οξέος παρουσιάστηκε αναστολή στην ανάπτυξη παρουσία 4,00 mM φαινόλης. Από τις μετρήσεις της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης φαίνεται πως στις καλλιέργειες παρουσία οξικού οξέος στις πρώτες 24 ώρες καταγράφηκε μία απότομη μείωση στο λόγο F_v/F_{max} , ο οποίος όμως επανέρχεται σε υψηλές τιμές την επόμενη ημέρα. Αντίθετα στη συνθήκη όπου απουσιάζει η εναλλακτική πηγή άνθρακα από το μέσο καλλιέργειας η μείωση του λόγου συνεχίζεται ως την 4^η ημέρα.

Οι μετρήσεις αποικοδόμησης της φαινόλης και παραγωγής κατεχόλης έδειξαν για άλλη μια φορά τη σημασία της παρουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας. Στην περίπτωση όπου απουσιάζει η εναλλακτική πηγή άνθρακα παρουσιάζεται έντονη μεταβολική δραστηριότητα από την αρχή του πειράματος.



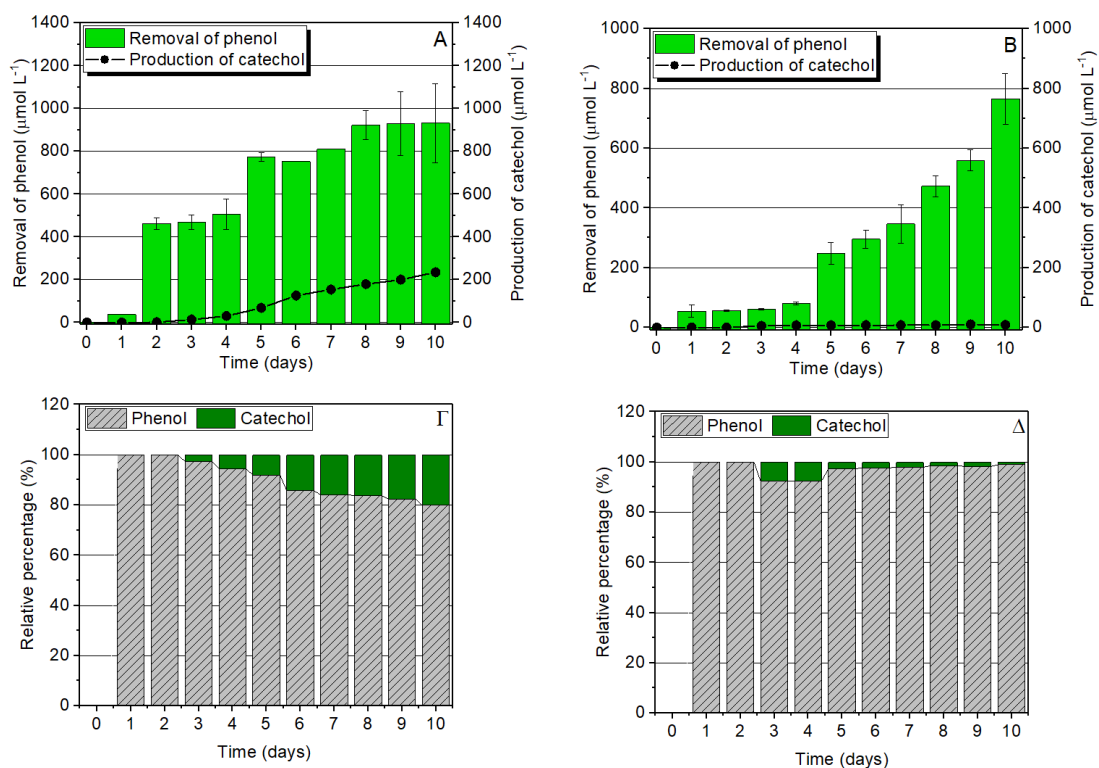
Εικόνα 2.41. Καμπύλες ανάπτυξης καλλιιεργειών του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* σε συνθήκες (A) απουσίας και (B) παρουσίας οξικού οξέος παρουσία 4,00 mM φαινόλης, συγκριτικά με την καλλιέργεια -μάρτυρα (control), υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $70-80 \mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ήταν ίση με $2 \mu\text{L PCV/mL}$.



Εικόνα 2.42. Μεταβολή της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (F_v/F_{max}) των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* σε συνθήκες (A) απουσίας και (B) παρουσίας οξικού οξέος παρουσία 4,00 mM φαινόλης, συγκριτικά με την καλλιέργεια μάρτυρα (control) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $70-80 \mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

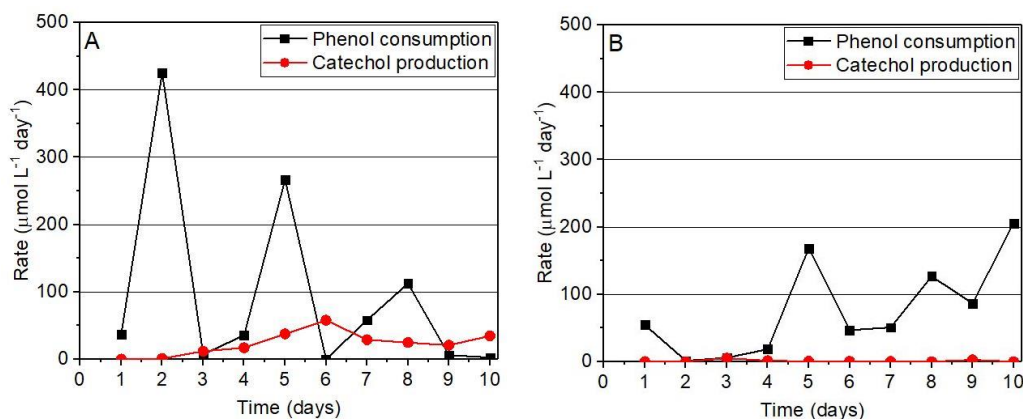
Χαρακτηριστικό είναι ότι στο πρώτο 48ώρο καταγράφηκε ο μέγιστος ρυθμός κατανάλωσης της φαινόλης. Τα κύτταρα προσλαμβάνουν τη φαινόλη προκειμένου να τη μεταβολίσουν για να ανακτήσουν αποθέματα άνθρακα. Σημαντικό όσο αφορά το ρυθμό κατανάλωσης της φαινόλης είναι ότι αυτός πραγματοποιείται σε κύκλους κατά τους οποίους εμφανίζονται μέγιστα τις ημέρες 2, 5 και 8. Επίσης αξιοσημείωτη είναι κάθε φορά η πτωτική τάση που παρουσιάζει ο μέγιστος αυτός ρυθμός. Αυτό οφείλεται στην ταυτόχρονη αύξηση του ρυθμού παραγωγής της κατεχόλης. Η κατεχόλη αρχίζει να εμφανίζεται στο μέσο καλλιέργειας την 3^η ημέρα. Μάλιστα η παραγωγή της συνοδεύεται με εξαφάνιση της κατανάλωσης της φαινόλης εκείνη την ημέρα. Ο ρυθμός παραγωγής της κατεχόλης φτάνει στη μέγιστη τιμή του την 6^η ημέρα και συνοδεύεται με μηδενικό ρυθμό κατανάλωσης της φαινόλης. Από εκεί και πέρα η κατεχόλη συνεχίζει να παράγεται με σταθερό ρυθμό μέχρι τη λήξη του πειράματος. Η κατανάλωση της φαινόλης σταματάει μετά την 9^η ημέρα. Από εκείνο το σημείο και μετά το μικροφύκος δεν παρουσιάζει δυνατότητα βιοαποικοδόμησης της φαινόλης. Σημαντικό είναι και το φαινόμενο της συσσώρευσης της κατεχόλης στο μέσο καλλιέργειας. Η συσσώρευση του μεταβολικού ενδιάμεσου ξεκινάει από την 3^η πειραματική ημέρα και συνεχίζεται με αυξητική τάση έως τη λήξη του πειράματος. Μάλιστα την τελευταία πειραματική ημέρα φτάνει να αποτελεί το 20% της συνολικής ποσότητας φαινόλης που καταναλώθηκε. Από τα αποτελέσματα είναι φανερό πως το *Chlamydomonas*, έχοντας εξαντλήσει πλήρως τα αποθέματα ενέργειας δεν μπορεί πλέον να διασπάσει παιρετέρω το

σταθερό αρωματικό δακτύλιο. Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν πως η διάσπαση της κατεχόλης είναι το καθοριστικό και ενεργειακά απαιτητικό βήμα στην αποικοδόμηση της φαινόλης. Από την άλλη πλευρά παρουσία οξικού οξέος η βιοαποικοδόμηση της φαινόλης δεν ξεκινάει άμεσα. Τα κύτταρα προσλαμβάνουν ένα μικρό ποσό φαινόλης την πρώτη ημέρα και έπειτα δεν λαμβάνει χώρα καμία μεταβολική δράση. Έντονη μεταβολική δραστηριότητα ξεκινάει από την 5^η ημέρα, όταν ξεκινάει η στατική φάση. Σε εκείνη τη φάση έχουν καταναλωθεί τα περισσότερα αποθέματα οξικού οξέος στο μέσο καλλιέργειας και τα κύτταρα αρχίζουν να αποικοδομούν τη φαινόλη στην οποία παρατηρείται συνεχόμενη μείωση της συγκέντρωσης.



Εικόνα 2.43. Κινητική απομάκρυνσης της φαινόλης (πράσινες μπάρες) και παραγωγής της κατεχόλης (μαύρη γραμμή) από καλλιέργειες του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* σε συνθήκες (A) απουσίας και (B) παρουσίας οξικού οξέος από το μέσο καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε μολι ανά λίτρο καλλιέργειας. Τα γραφήματα Γ και Δ δείχνουν το σχετικό ποσοστό της φαινόλης που απομακρύνθηκε από το μέσο καλλιέργειας και της κατεχόλης που παράχθηκε σε αυτό σε συνθήκες απουσίας (Γ) και παρουσίας (Δ) οξικού οξέος στο μέσο καλλιέργειας, υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας

70-80 μολι φωτονίων·m⁻²·s⁻¹.



Εικόνα 2.44. Μεταβολή του ρυθμού κατανάλωσης της φαινόλης (μαύρη γραμμή) και παραγωγής της κατεχόλης (κόκκινη γραμμή) από καλλιέργειες του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* σε συνθήκες (A) απουσίας και (B) παρουσίας οξικού οξέος από το μέσο καλλιέργειας υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $70\text{-}80 \mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Οι ρυθμοί με τους οποίους πραγματοποιείται η αποικοδόμηση είναι χαμηλότεροι όσο αφορά τα μέγιστα που παρουσιάζονται (5^η, 8^η και 10^η ημέρα). Σημαντικό είναι όμως ότι η παραγωγή κατεχόλης στο μέσο καλλιέργειας είναι αμελητέα (περίπου 1% συγκριτικά με τη φαινόλη που καταναλώθηκε) και μάλιστα πολύ κοντά στα όρια ανίχνευσης. Αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι **τα μικροφύκη επιλέγουν να αποικοδομήσουν τη φαινόλη πλήρως έχοντας διαθέσιμα αποθέματα ενέργειας τα οποία οφείλονται στην κατανάλωση του βοηθητικού οργανικού υποστρώματος**. Φαίνεται λοιπόν πως ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες λειτουργούν προς το ενεργειακό τους συμφέρον προσαρμόζοντας κάθε φορά το μεταβολισμό τους για να επιτύχουν το καλύτερο βιοενεργητικό ισοζύγιο. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν ένα πολύ καλό παράδειγμα της μεταβολικής ευελιξίας των φωτοσυνθετικών μικροφυκών υπό συνθήκες καταπόνησης (stress) το οποίο μπορεί να οδηγήσει στην εκμετάλλευσή τους για την αποκατάσταση των μολυσμένων περιοχών αλλά και για την παραγωγή προϊόντων της βιομάζας που μπορούν να βρουν βιομηχανικές εφαρμογές.

Ο Πίνακας 2.11 παραθέτει συγκριτικά τα βέλτιστα αποτελέσματα αποικοδόμησης της φαινόλης της παρούσας διατριβής σε σχέση με αναφορές στη βιβλιογραφία.

Πίνακας 2.11. Συγκριτικά αποτελέσματα της παρούσας διατριβής σε σχέση με προηγούμενες αναφορές στη βιβλιογραφία στη χρήση φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών στην αποικοδόμηση της φαινόλης.

Γένος/Είδος	Αρχική συγκέντρωση		Βιοαποικοδόμηση		Συνθήκες	Αναφορά
	mM	mg/L	mM	mg/L		
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	4,00	376,44	0,931	46,54	Κωνική φιάλη, 70-80 μmol φωτονίων· $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 10 ημέρες	Παρούσα διατριβή
<i>Chlorella sp.</i>	4,25	400	4,25	400	Κωνική φιάλη, 6 ημέρες	[122]
<i>Scenedesmus sp.</i>						
<i>Ochromonas danica</i>	0,50	47,06	0,50	47,06	150 μmol φωτονίων· $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 3 ημέρες	[118]
<i>Thalassiosira sp.</i>	1,00	94,11	0,019	1,79	60 μmol φωτονίων· $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 9 ημέρες	[120]
<i>Synechococcus PCC7002</i>	1,06	100	1,06	100	Κωνική φιάλη, σκοτάδι, 5 ημέρες	[170]
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0,15	14,11	0,15	14,11	Κλειστός βιοαντιδραστήρας, 100-120 μmol φωτονίων· $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 5 ημέρες	[130]
<i>Spirulina maxima</i>	4,25	400	4,25	400	Κωνικές φιάλες, 200-230 μmol φωτονίων· $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 6 ημέρες	[171]
<i>Chlorella sp.</i> ¹	5,31	500	5,31	500	Υάλινες φιάλες, 117,67 μmol φωτονίων· $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 7 ημέρες	[172]

¹Το στέλεχος που είχε την ικανότητα να αποικοδομεί τη φαινόλη προέκυψε ύστερα από προχωρημένη εργαστηριακή εξέλιξη (Advanced Laboratory Evolution, ALE). Το αρχικό στέλεχος δεν είχε την ικανότητα αποικοδόμησης της φαινόλης.

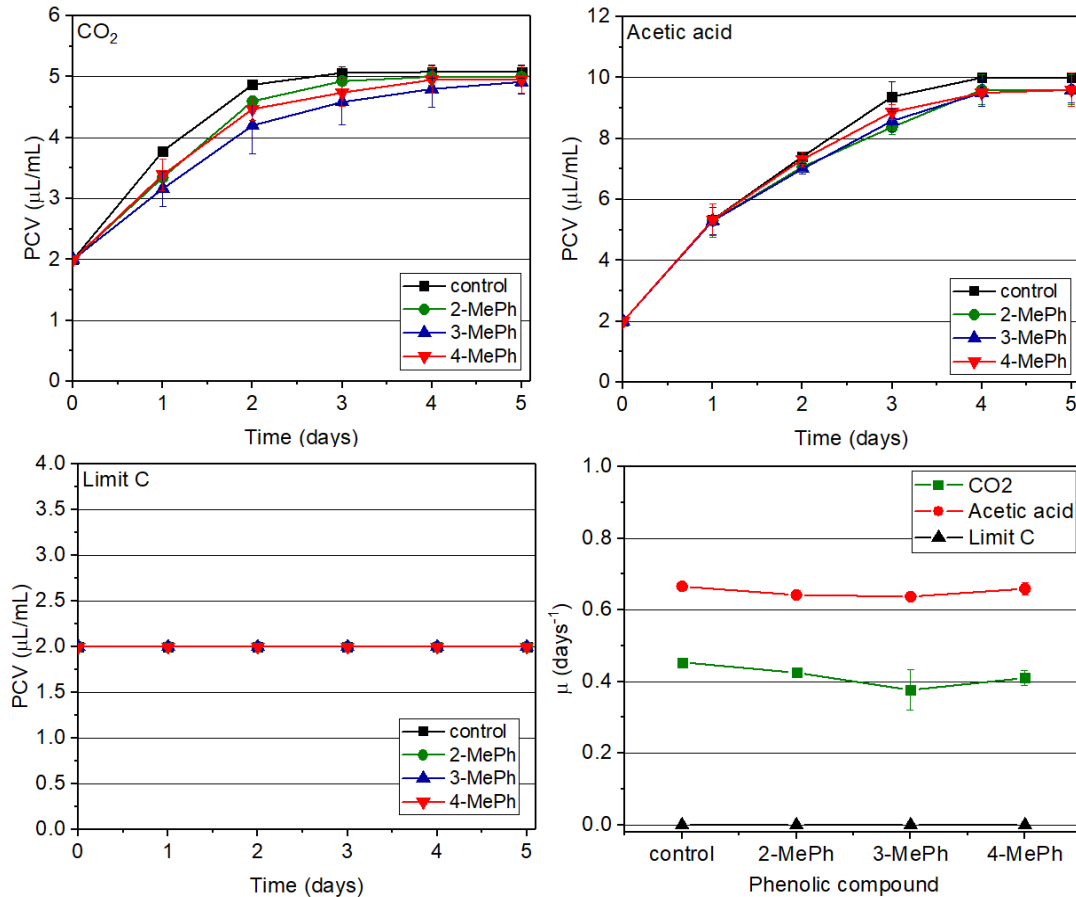
2.4.7. Μελέτη της βιοαποικοδόμησης μονοϋποκατεστημένων μεθυλοφαινολών από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*.

Εφόσον το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* επέδειξε την ικανότητα να αποικοδομεί τη φαινόλη και διερευνήθηκαν οι συνθήκες αυτές υπό τις οποίες λαμβάνει χώρα η αποικοδόμηση, επόμενο βήμα ήταν η μελέτη της επίδρασης ενός ακόμα υποκαταστάτη στο φαινολικό δακτύλιο. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν να μελετηθούν οι μονοϋποκατεστημένες μεθυλοφαινόλες. Τα πειράματα έλαβαν χώρα στα μπουκάλια που χρησιμοποιήθηκαν ως βιοαντιδραστήρες (βλ. παράγραφος 2.3.3) με τελικό όγκο καλλιέργειας 50 mL, ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ και αρχική κυτταρική συγκέντρωση 2,0 $\mu\text{L PCV/mL}$ για χρονικό διάστημα πέντε ημερών. Η τελική συγκέντρωση των μεθυλοφαινολών που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0,15 mM. Εξαιτίας του γεγονότος ότι οι μεθυλοφαινόλες παραλήφθηκαν από την εταιρεία σε μεθανολικό διάλυμα, αρχικά παρασκευάστηκε αραιωμένο διάλυμα συγκέντρωσης 0,50 M. Ο όγκος που προστέθηκε σε κάθε καλλιέργεια ήταν 15 μL και για το λόγο αυτό στις καλλιέργειες μάρτυρες (control) προστέθηκαν 15 μL καθαρής μεθανόλης. Όσο αφορά την παρουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα μελετήθηκαν οι ακόλουθες πειραματικές συνθήκες:

- ✓ CO₂: 20% v/v διοξείδιο του άνθρακα
- ✓ Acetic acid: 1048 mg/L οξικό οξύ
- ✓ Limit C: απουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα από το μέσο καλλιέργειας.

Από τις μετρήσεις ανάπτυξης φαίνεται πως ακόμα και προσθήκη μικρής ποσότητας μεθυλοφαινολών στο θρεπτικό μέσο προκάλεσε αναστολή στην ανάπτυξη των κυττάρων. Για άλλη μία φορά καθοριστικός παράγοντας στην ανάπτυξη ήταν η παρουσία μίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα. Όσο αφορά τις καλλιέργειες μάρτυρες (control) επέδειξαν παρόμοια αποτελέσματα στην ανάπτυξη με αυτές της πειραματικής σειράς της φαινόλης. Αυτό είναι σημαντικό γιατί δείχνει πως η μεθανόλη που προστέθηκε σε αυτή την πειραματική σειρά, αν και σε πολύ μικρή ποσότητα, δεν επηρεάζει τη συμπεριφορά των καλλιεργειών. Για άλλη μία φορά η μεγαλύτερη ανάπτυξη παρουσιάστηκε στην περίπτωση όπου υπήρχε οξικό οξύ ως εναλλακτική πηγή άνθρακα ενώ στη συνθήκη υπό απουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα δεν παρουσιάστηκε ανάπτυξη. Στις συνθήκες που παρουσιάστηκε ανάπτυξη φάνηκε πως το μετα υποκατεστημένο ισομερές προκαλεί αναστολή σε λίγο μεγαλύτερο βαθμό, ιδιαίτερα στη συνθήκη με παρουσία διοξειδίου του άνθρακα. Σε γενικές γραμμές οι μεταβολές σε σχέση με

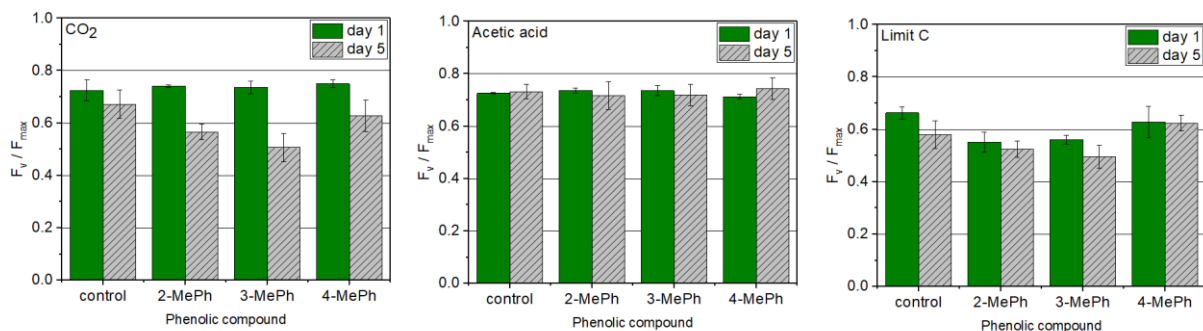
την καλλιέργεια μάρτυρα δεν είναι τόσο σημαντικές. Επίσης η διαφοροποίηση γίνεται πιο έντονη στην περίπτωση όπου έχουμε οξικό οξύ διότι παρουσιάζεται μεγαλύτερη αύξηση βιομάζας.



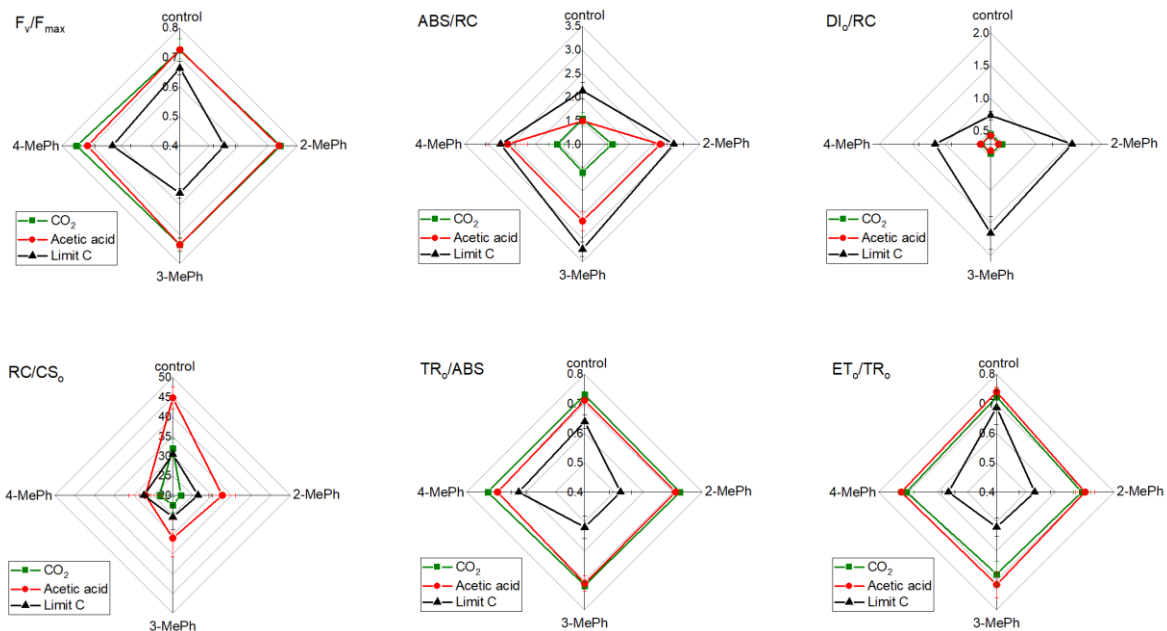
Εικόνα 2.45. Καμπύλες ανάπτυξης καλλιεργειών του *Chlamydomonas reinhardtii* υπό την παρουσία διαφόρων πηγών άνθρακα και μονοϋποκατεστημένων μεθυλοφαινόλων, υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50-60 \mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ήταν ίση με $2 \mu\text{L PCV/mL}$. Το γράφημα κάτω δεξιά παρουσιάζει τη μεταβολή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ) για τις πρώτες 48 ώρες.

Από τις μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού επιβεβαιώνεται για άλλη μία φορά η σημασία της παρουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας. Στις συνθήκες παρουσίας διοξειδίου του άνθρακα και οξικού οξέος δεν παρουσιάστηκε μείωση του λόγου F_v/F_{max} τις πρώτες 24 ώρες του πειράματος. Αντίθετα στη συνθήκη απουσία εναλλακτικής

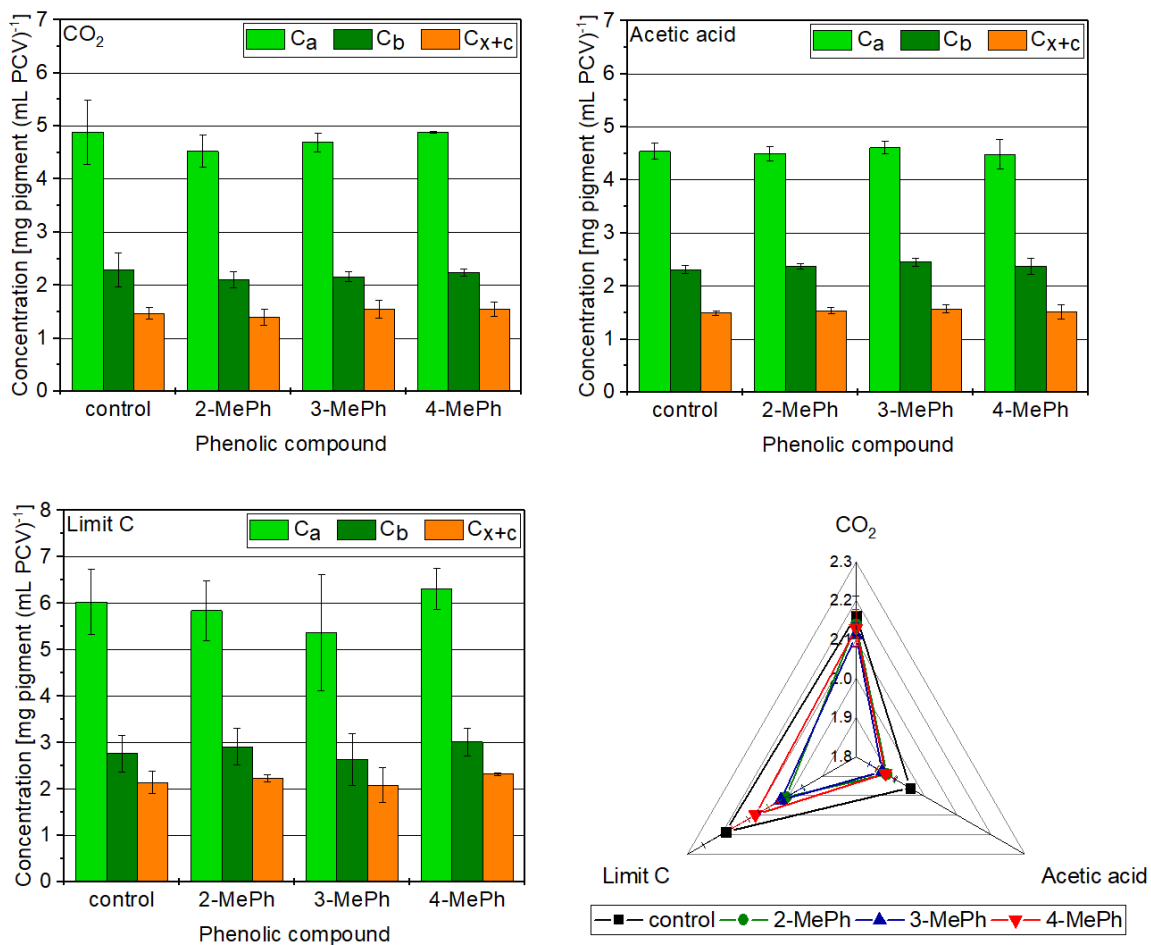
πηγής άνθρακα καταγράφηκε μείωση της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης υπό την παρουσία των *ortho* και *meta* ισομερών των μεθυλοφαινόλων. Η ίδια μεταβολή παρουσιάστηκε και την 5^η πειραματική ημέρα στη συνθήκη με το διοξείδιο του άνθρακα το οποίο είχε καταναλωθεί πλήρως. Αντίθετα στη συνθήκη όπου υπήρχε οξικό οξύ στο μέσο καλλιέργειας δεν παρουσιάστηκαν μεταβολές σε σχέση με την καλλιέργεια μάρτυρα. Για άλλη μία φορά επιβεβαιώνεται ο επικουρικός ρόλος της παρουσίας οργανικής πηγής άνθρακα όσο αφορά τη διατήρηση της ομοιόστασης από τα μικροφύκη. Από τον υπολογισμό των παραμέτρων του JIP-test για τις πρώτες 24 ώρες παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των ενεργών κέντρων σε όλες της περιπτώσεις παρουσίας μεθυλοφαινόλων στο μέσο καλλιέργειας. Τα συμπτώματα καταπόνησης εκφράστηκαν άλλη μία φορά με το μοτίβο αύξησης της λειτουργικής φωτοσυνθετικής κεραίας, αύξηση του ποσού ενέργειας που διαχέεται υπό μορφή θερμότητας, μείωσης της κβαντικής απόδοσης της πρωταρχικής φωτοχημείας και μείωσης της πιθανότητας μίας διέγερσης να μετακινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την ανηγμένη μορφή της πλαστοκινόνης. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι οι μεταβολές αυτές ήταν αμελητέες στην περίπτωση παρουσίας διοξειδίου του άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της φαινόλης. Αντίθετα αυτές οι μεταβολές ήταν πολύ έντονες στην περίπτωση απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα από το μέσο καλλιέργειας.



Εικόνα 2.46. Μεταβολή της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (F_v/F_{max}) των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* την 1^η (24 ώρες) και 5^η πειραματική ημέρα υπό την παρουσία διαφόρων πηγών άνθρακα και μονοϋποκατεστημένων μεθυλοφαινόλων, υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50-60 \mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.



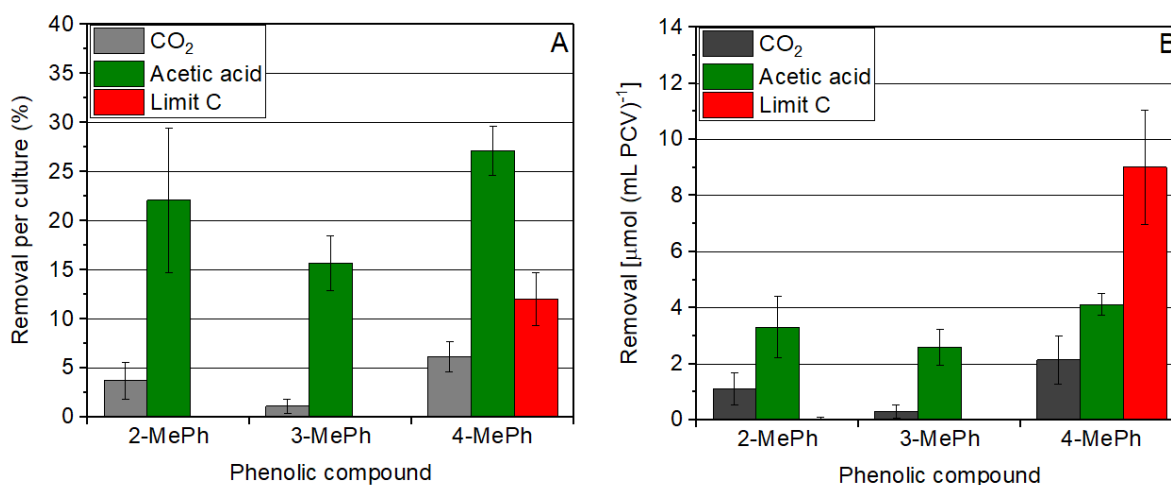
Εικόνα 2.47. Μεταβολή των παραμέτρων του JIP-test που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* 24 ώρες από την έναρξη του πειράματος υπό την παρουσία διαφόρων πηγών άνθρακα και μονοϋποκατεστημένων μεθυλοφαινολών, υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. F_v/F_{\max} : φωτοσυνθετική απόδοση, ABS/RC : μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας, DI_o/RC : ενέργεια που διαχέεται υπό μορφή θερμότητας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης, RC/CS_o : πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης, TR_o/ABS : κβαντική απόδοση πρωταρχικής φωτοχημείας, ET_o/TR_o : πιθανότητα μίας διέγερσης να μετακινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την ανηγμένη μορφή της πλαστοκινόνης.



Εικόνα 2.48. Περιεχόμενο φωτοσυνθετικών χρωστικών των καλλιεργειών του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* την 5^η πειραματική ημέρα υπό την παρουσία διαφόρων πηγών άνθρακα και μονοϋποκατεστημένων μεθυλοφαινολών, υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Όλες οι χρωστικές έχουν εκφραστεί σε mg χρωστικής ανά mL PCV. C_a: συγκέντρωση χλωροφύλλης-a, C_b: συγκέντρωση χλωροφύλλης-b, C_{x+c}: συγκέντρωση συνολικών καροτενοειδών (ξανθοφύλλες και καροτένια). Το γράφημα κάτω δεξιά δείχνει τη μεταβολή του λόγου χλωροφύλλης-a προς χλωροφύλλη-b υπό αυτές τις συνθήκες.

Από τις μετρήσεις φωτοσυνθετικών χρωστικών και τον υπολογισμό του λόγου χλωροφύλλης-a προς χλωροφύλλη-b φαίνεται για άλλη μία φορά πως η ανασταλτική δράση των μεθυλοφαινολών είναι πιο έντονη σε συνθήκες απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα. Σε όλες τις συνθήκες μεγαλύτερη μείωση του λόγου παρουσιάστηκε υπό την παρουσία του *μετα* υποκατεστημένου ισομερούς. Οι ισχυρή επίδραση των *μετα* υποκατεστημένων φαινολικών ενώσεων, συγκριτικά με τα άλλα δύο ισομερή, έχει παρουσιαστεί προηγουμένως στη βιβλιογραφία σε μελέτες στο μικροφύκος *Scenedesmus obliquus* παρουσία αλογοφαινολών, μεθυλοφαινολών και νιτροφαινολών [128, 130].

Η απομάκρυνση των μεθυλοφαινολών από το μέσο καλλιέργειας παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.49. Από τα αποτελέσματα είναι φανερό η επίδραση της σχετικής θέσης των υποκαταστατών στον αρωματικό δακτύλιο σε συνδυασμό με την παρουσία ή απουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα. Για άλλη μία φορά, όπως και στη φαινόλη, παρουσία διοξειδίου του άνθρακα παρουσιάζεται αμελητέα αποικοδόμηση σε σχέση με την παρουσία οξικού οξέος. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν πως το διοξείδιο του άνθρακα δεν είναι κατάλληλο βοηθητικό υπόστρωμα για το μεταβολισμό των φαινολικών ενώσεων.



Εικόνα 2.49. Απομάκρυνση των μεθυλοφαινολών από καλλιέργειες του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* υπό την παρουσία 20% CO₂, 1048 mg/L οξικού οξέος ή απουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα (Limit C) την 5^η πειραματική ημέρα υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 μmol φωτονίων·m⁻²·s⁻¹. Η απομάκρυνση εκφράστηκε (A) ως ποσοστό σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση και (B) ως η ποσότητα που απομακρύνθηκε ανά μονάδα κυτταρικής συγκέντρωσης [μmol·(mL PCV)⁻¹].

Στις συνθήκες που μελετήθηκαν υπό την παρουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα, η σχετική σειρά αποικοδόμησης είναι *μετα*<*ορθο*<*παρα* ενώ απουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα μεταβολίζεται μόνο το *παρα*-ισομερές. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι το *μετα* ισομερές οξειδώνεται μεταβολικά πολύ πιο αργά σε σχέση με τα άλλα δύο ισομερή. Αυτό έχει παρατηρηθεί τόσο σε βακτήρια μέσω συγκριτικών πειραμάτων κινητικής των ενζύμων χωρίς να εξηγηθεί περαιτέρω, όσο και σε μικροφύκη [128, 173]. Μία πιθανή εξήγηση έχει να κάνει με τις στερεοχημικές παρεμποδίσεις λόγω της σχετικής θέσης των ομάδων στο δακτύλιο και τη δυσκολία σχηματισμού του ενδιάμεσου της *ορθο*-μεθυλοκατεχόλης από το ενεργό κέντρο των ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του συγκεκριμένου. Να αναφερθεί ότι η *ορθο* θέση ανάμεσα από τους δύο υποκαταστάτες είναι η περισσότερο ενεργοποιημένη προκειμένου να λάβει χώρα η υδροξυλίωση. Από την άλλη μεριά στο *ορθο* ισομερές υπάρχει μια μικρή στερεοχημική παρεμπόδιση αλλά η οξείδωση λαμβάνει χώρα σε *μετα* θέση ως προς την μεθυλομάδα και αυτή δεν είναι τόσο έντονη. Επιπλέον στην *ορθο*-κρεσόλη έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ο πιθανός σχηματισμός μίας πολύ ασθενούς ενδομοριακής δύναμης τύπου δεσμού υδρογόνου μεταξύ του πρωτονίου της ομάδας υδροξειδίου και του άνθρακα της μεθυλομάδας με την ενέργεια να έχει υπολογιστεί στα 0,83 kcal/mol [174] που έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της ηλεκτρονιακής πυκνότητας του δακτυλίου και επηρεάζει την ικανότητα αποικοδόμησης. Αντίθετα στην περίπτωση του *παρα* ισομερούς, όπου δεν υπάρχουν στερεοχημικές παρεμποδίσεις κοντά στην ομάδα υδροξειδίου, λαμβάνουν χώρα και τα μεγαλύτερα ποσά αποικοδόμησης. Σε εκείνη την περίπτωση η *ορθο* θέση ως προς το υδροξείδιο είναι ελεύθερη από στερεοχημικές παρεμποδίσεις ενώ ταυτόχρονα είναι ισχυρά ενεργοποιημένη λόγω του ισχυρού συζυγιακού φαινομένου που ασκείται από την ομάδα υδροξειδίου. Φαίνεται λοιπόν πως τα αποτελέσματα της βιοαποικοδόμησης οφείλονται τόσο στα φαινόμενα επίδρασης των υποκαταστατών στο δακτύλιο όσο και στις σχετικές παρεμποδίσεις καθώς θα πρέπει να ληφθεί υπόψη γιατί όλες οι αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα ενζυμικά στα βιολογικά συστήματα. Ιδιαίτερα στην τελευταία εξήγηση συνηγορεί και το γεγονός ότι το *μετα* ισομερές οξειδώνεται πιο αργά από τα άλλα δύο.

Στις παραπάνω παρατηρήσεις έρχεται να προστεθεί και η σημασία της ύπαρξης εναλλακτικής πηγής άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας. Παρουσία οργανικής πηγής άνθρακα εμφάνισαν σημαντικά ποσοστά αποικοδόμησης τόσο το *ορθο* όσο και το *μετα* ισομερές. Αρχικά η διάσπαση του οξικού οξέος παρέχει υψηλά αποθέματα ενέργειας στα μικροφύκη.

Εξαιτίας αυτού παρουσιάζεται πιο έντονη ανάπτυξη και άρα μεγαλύτερο αριθμός κυττάρων που οξειδώνουν τις μεθυλοφαινόλες. Γι αυτό το λόγο και αν τα αποτελέσματα συγκριθούν ανά μονάδα κυτταρικής συγκέντρωσης δεν παρουσιάζονται αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των τριών ισομερών παρουσία οξικού οξέος. Σε αυτά τα αποτελέσματα συνηγορούν και οι υπολογισμοί των υπολοίπων παραμέτρων. Οι μεταβολές που αφορούν τη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (μέσω υπολογισμού των παραμέτρων του JIP-test) καθώς και η σχετική μεταβολή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης, υπό την παρουσία των ισομερών σχετίζεται με την αποικοδόμηση. Πιο συγκεκριμένα κατά την αποικοδόμηση του *para* ισομερούς υπολογίστηκαν ελαφρώς υψηλότερες τιμές του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης καθώς και οι μεταβολές των περισσότερων παραμέτρων του JIP-test δεν ήταν τόσο έντονες όσο στα άλλα δύο ισομερή. Φαίνεται λοιπόν πως το μικροφύκος δαπανάει σημαντικά ποσά ενέργειας, τα οποία κερδίζει από την παρουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα, στην προσπάθεια αποικοδόμησης των περισσότερο απαιτητικών υποστρωμάτων. Για άλλη μία φορά τα αποτελέσματα δείχνουν πως **η αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* είναι μία βιοενεργητική διαδικασία που επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τα ενεργειακά αποθέματα του μικροοργανισμού.**

2.5 Συμπεράσματα

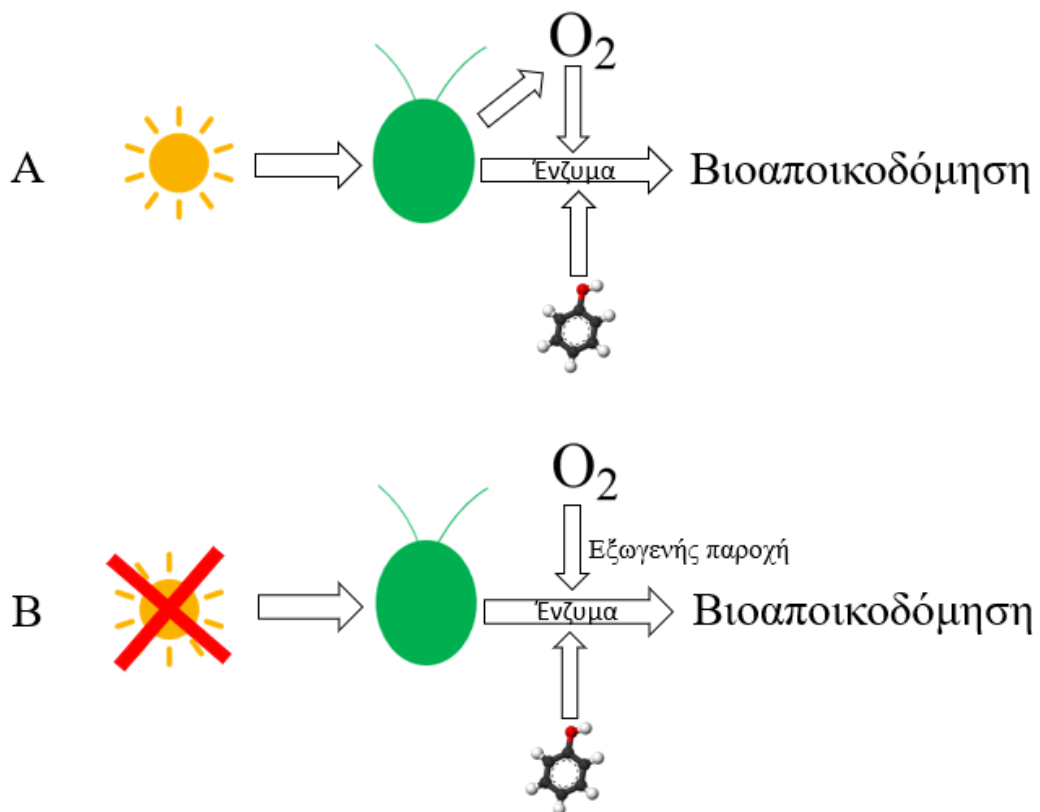
Από τα αποτελέσματα του κεφαλαίου αποτυπώνεται πως η αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* είναι μία αυστηρά βιοενεργητική διαδικασία. Σε συνθήκες έλλειψης εναλλακτικής πηγής άνθρακα το μικροφύκος βρέθηκε να αποικοδομεί τη φαινόλη κυρίως για να εξασφαλίσει αποθέματα άνθρακα. Σημαντικό ήταν το γεγονός ότι τα κύτταρα από τις καλλιέργειες μάρτυρες εκείνης της συνθήκης εμφάνισαν το φαινόμενο της αυτοφαγίας. Η βιοαποικοδόμηση υψηλών συγκεντρώσεων φαινόλης φάνηκε να επηρεάζεται από την ένταση του παρεχόμενου φωτισμού γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το μικροφύκος κερδίζει αποθέματα ενέργειας για τη διαδικασία αυτή μέσω της φωτοσύνθεσης. Η φωτοσύνθεση είχε διττό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία. Εκτός από την παροχή σε ενεργειακά αποθέματα, είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή οξυγόνου, το οποίο είναι απαραίτητο υπόστρωμα για τα ένζυμα του μεταβολικού μονοπατιού αποικοδόμησης της φαινόλης. Γι αυτό το λόγο το μικροφύκος αποικοδόμησε τη φαινόλη στο σκοτάδι μόνο όταν του παρασχεθεί εξωγενώς το απαιτούμενο οξυγόνο.

Ο δεύτερος παράγοντας που επηρεάζει την αποικοδόμηση της φαινόλης έχει να κάνει με την παρουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα στο θρεπτικό μέσο. Από τα αποτελέσματα της διατριβής φαίνεται καθαρά πως η παρουσία διοξειδίου του άνθρακα ως εναλλακτική πηγή σχεδόν εξαφάνισε την ικανότητα του μικροφύκου να αποικοδομήσει τη φαινόλη. Αντίθετα σημαντική ήταν η παρουσία του οξικού οξέος στο θρεπτικό μέσο. Το οξικό οξύ διετέλεσε επικουρικό ρόλο ώστε το μικροφύκος να αποικοδομήσει τη φαινόλη όταν αυτή βρισκόταν σε υψηλές συγκεντρώσεις ενώ ταυτόχρονα βοήθησε στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επιπλέον ώθησε τα μικροφύκη να αντιμετωπίσουν τα συμπτώματα αβιοτικής καταπόνησης που προκλήθηκαν από την ύπαρξη της φαινόλης. Η αναστολή στην ανάπτυξη, συγκριτικά με τις καλλιέργειες μάρτυρες, υπό αυτές τις συνθήκες σε συνδυασμό με την απουσία της σε συνθήκες έλλειψης εναλλακτικής πηγής άνθρακα δείχνει την είσοδο του μικροβιακού μεταβολισμού σε κατάσταση συντηρησης (maintenance). Αυτό επιβεβαιώθηκε πλήρως και από την καταγραφή παραγωγής κατεχόλης στο μέσο καλλιέργειας σε συνθήκες απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα. Η διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου της κατεχόλης είναι μία διαδικασία που απαιτεί ενέργεια. Σε συνθήκες απουσίας οξικού οξέος περίπου το 1/5 της φαινόλης που οξειδώθηκε απελευθερώθηκε ως κατεχόλη στο μέσο καλλιέργειας ως αποτέλεσμα της αδυναμίας των κυττάρων να διασπάσουν το δακτύλιο. Αντίθετα παρουσία οξικού οξέος αυτό το ποσοστό ήταν αμελητέο. Φαίνεται λοιπόν πως το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* λειτουργεί ως μία «καλοκοιμισμένη βιοενεργητική μηχανή» που διαχειρίζεται με το βέλτιστο γι αυτό τρόπο τα αποθέματα ενέργειας που του παρέχονται και βρίσκει το κατάλληλο ισοζύγιο ανάμεσα στην ανάπτυξη, την αντιμετώπιση της καταπόνησης και τη βιοαποικοδόμηση της φαινόλης. Οι εικόνες που ακολουθούν παρουσιάζουν σχηματικά τα παραπάνω συμπεράσματα.

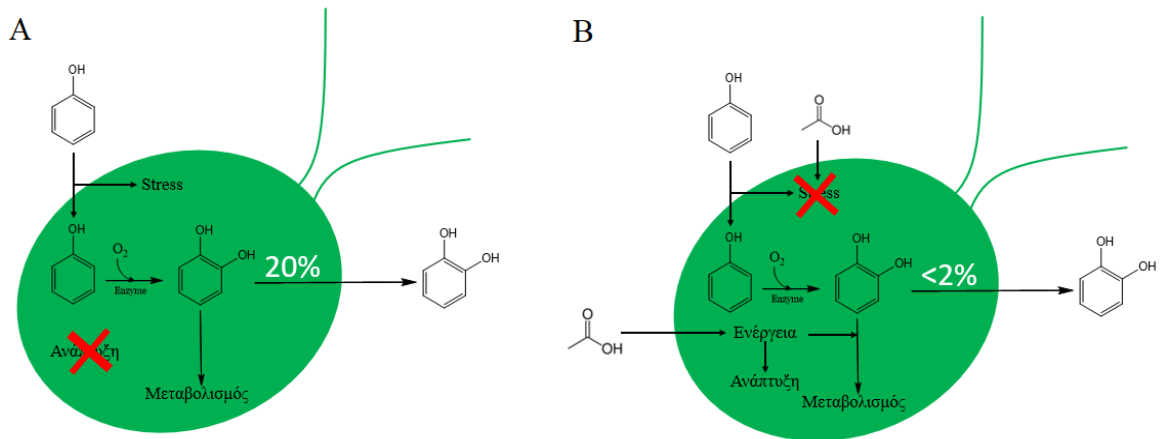
Όσο αφορά την αποικοδόμηση των μονοϋποκατεστημένων μεθυλοφαινολών σημαντικό ρόλο διαδραμάτισε η σχετική θέση των υποκαταστατών σε συνδυασμό με την παροχή ή όχι εναλλακτικής πηγής άνθρακα. Απουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα το μικροφύκος αποικοδόμησε μερικώς μόνο την 4-μεθυλοφαινόλη. Τα *ορθο* και *μετα* ισομερή επέδειξαν αποικοδόμηση μόνο παρουσία οξικού οξέος. Το οξικό οξύ και σε αυτή την περίπτωση έπαιξε καταλυτικό ρόλο στην εξαφάνιση των συμπτωμάτων αβιοτικής καταπόνησης.

Συνολικά αποδείχθηκε πως η αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* είναι μία βιοενεργητική διαδικασία που εξαρτάται

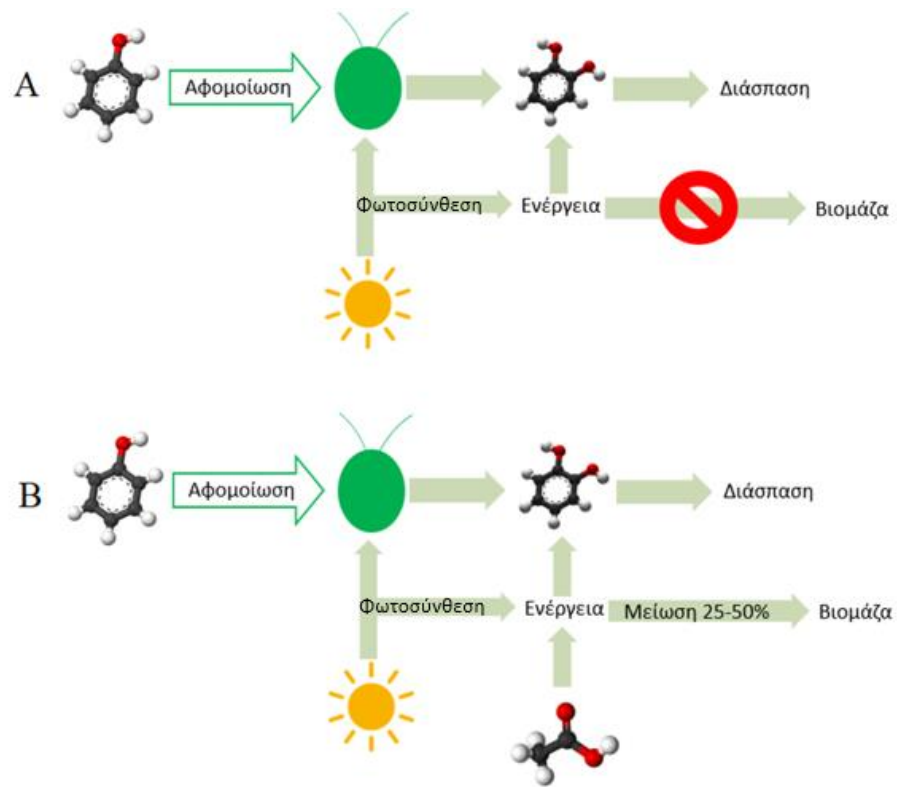
από τις εκάστοτε συνθήκες καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα αυτού του κεφαλαίου παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τη ρύθμιση των παραμέτρων ενός βιοαντιδραστήρα με σκοπό την εφαρμογή της *ex situ* βιοαποκατάστασης.



Εικόνα 2.50. Βιοενεργητικό μοντέλο επίδρασης του φωτισμού και της παροχής οξυγόνου στην αποικοδόμηση της φαινόλης από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*.



Εικόνα 2.51. Επίδραση της απουσίας (A) και της παρουσίας (B) οξικού οξέος στο βιοενεργητικό ισοζύγιο μεταβολισμού της φαινόλης, παραγωγής κατεχόλης, ανάπτυξης και αβιοτικής καταπόνησης (stress).



Εικόνα 2.52. Μοντέλο μικροβιακής συντήρησης σε συνθήκες απουσίας (A) και παρουσίας (B) οξικού οξέος στην αποικοδόμηση της φαινόλης από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΗΣ
ΦΑΙΝΟΛΗΣ ΑΠΟ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ
CHLAMYDOMONAS REINHARDTII ΣΕ ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ
ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ**

3.1 Εισαγωγή

3.1.1. Ακίνητοποίηση κυττάρων σε πολυμερικές μήτρες.

Η ακίνητοποίηση ολόκληρων κυττάρων ορίζεται ως ο φυσικός περιορισμός ή εντοπισμός άθικτων κυττάρων σε συγκεκριμένη περιοχή του χώρου χωρίς την απώλεια της επιθυμητής βιολογικής δραστηριότητας [175]. Όταν τα βιολογικά δείγματα ενθυλακώνονται σε ένα σύστημα ακίνητοποίησης χρησιμοποιείται ο όρος «βιοενθυλάκωση» ή «μικροενθυλάκωση» ανάλογα με το μέγεθος του υλικού. Η καταλληλότητα ενός δεδομένου συστήματος ακίνητοποίησης εξαρτάται άμεσα από το είδος της εφαρμογής καθώς και τα φυσικοχημικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του εκάστοτε φορέα ακίνητοποίησης. Γενικότερα μερικά επιθυμητά χαρακτηριστικά του φορέα ακίνητοποίησης είναι να έχει μεγάλη χωρητικότητα για ακίνητοποίηση κυτταρικής βιομάζας, να επιτρέπει τη διέλευση θρεπτικών συστατικών, να μην είναι τοξικό, να είναι βιοσυμβατό, να μπορεί να αποστειρωθεί και να επαναχρησιμοποιηθεί καθώς επίσης να είναι οικονομικά βιώσιμο [176]. Στη βιβλιογραφία έχουν ανασκοπηθεί διάφορες τεχνικές ακίνητοποίησης ολόκληρων κυττάρων. Οι κυριότερες κατηγορίες μεθόδων ακίνητοποίησης είναι:

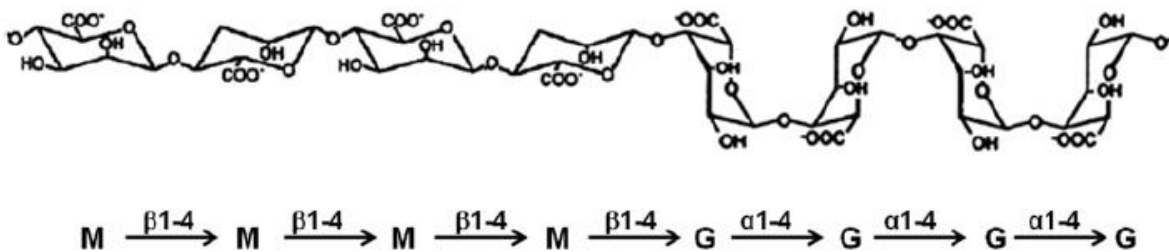
1. Επιφανειακή προσκόλληση (φυσική ή επαγόμενη από παράγοντες σύνδεσης)
2. Παγίδευση μέσα σε πορώδεις μήτρες (γέλες από φυσικά και συνθετικά πολυμερή)
3. Περιορισμός με χρήση φραγμών (π.χ. συνθετικές μεμβράνες)
4. Συσσωμάτωση (φυσική είτε χημική με χρήση παραγόντων σύνδεσης).

Η παγίδευση σε πολυμερείς γέλες (polymer gels) είναι πλέον μία από τις πιο δημοφιλείς μεθόδους ακίνητοποίησης και χρησιμοποιείται με επιτυχία στην ακίνητοποίηση ζωντανών βακτηρίων, μυκήτων, φυκών καθώς και φυτικών και ζωικών κυττάρων. Για το σκοπό αυτό έχει χρησιμοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός από διαφορετικά πολυμερή. Οι γέλες σχηματίζονται παρουσία των κυττάρων και για το σκοπό αυτό απαιτείται μία ήπια και μη τοξική τεχνική ακίνητοποίησης. Τα υλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι τόσο φυσικά όσο και συνθετικά. Τα φυσικά πολυμερή αποτελούνται από πολυσακχαρίτες ή πρωτεΐνες. Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί στη βιβλιογραφία ανάλογα με το υλικό που χρησιμοποιείται και περιλαμβάνουν το σχηματισμό ιονοτροπικών γελών (αλγινικό, χιτοζάνη), σχηματισμό θερμικών γελών (άγαρ, αγαρόζη, κολλαγόνο κτλ), γέλες από καταβύθιση (κυτταρίνη), πολυμερισμός με διαμοριακή σύνδεση (πολυακρυλαμίδιο) και άλλους [176].

3.1.2. Αλγινικά πολυμερή

Το αλγινικό είναι ένας φυσικός ανιονικός και υδρόφιλος πολυσακχαρίτης. Πρόκειται για ένα από τα πιο άφθονα βιοσυνθετικά προερχόμενα υλικά που υπάρχουν στη φύση και βρίσκεται κυρίως στα καφέ φύκη (όπου αποτελούν περίπου το 40% του ξηρού βάρους τους) και σε κάποια βακτήρια [177, 178].

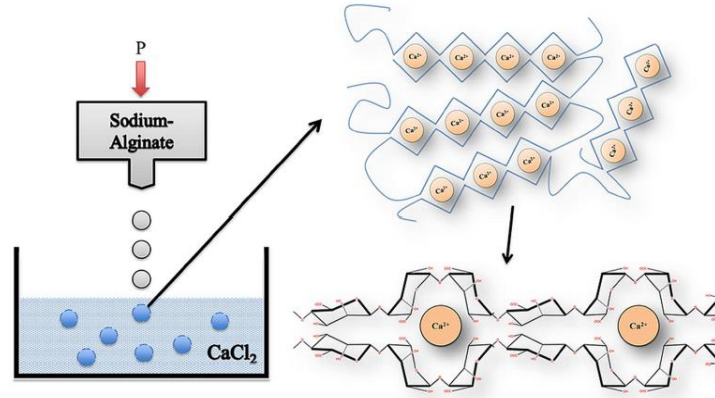
Τα αλγινικά πολυμερή είναι γραμμικοί πολυσακχαρίτες σχηματιζόμενοι από β -D-μαννουρονικό (M) και α -L-γουλουρονικό οξύ (G). Το πολυμερές είναι χτισμένο από μονάδες GG, GM και MM. Οι μονάδες MM και MG συνδέονται μεταξύ τους με β -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό ενώ οι μονάδες GG με α -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Οι περιοχές του πολυμερούς όπου υπάρχει α -L-γουλουρονικό οξύ (G- περιοχές) κάμπτονται σχηματίζοντας μία κοιλότητα, ενώ οι περιοχές όπου συναντώνται μονάδες β -D-μαννουρονικού οξέος (M- περιοχές) έχουν ευθύγραμμη διάταξη. Έτσι όταν δύο G-περιοχές έρθουν σε επαφή μεταξύ τους σχηματίζεται μία κοιλότητα όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.1 [179]. Οι διαστάσεις της κοιλότητας είναι ιδανικές σε μέγεθος για τη συνεργατική δέσμευση κατιόντων μετάλλων. Αυτές οι μονάδες βρίσκονται σε διαφορετικές αναλογίες ανάλογα με τον οργανισμό αλλά και την προετοιμασία του πολυμερούς, γεγονός που προσδίδει στα πολυμερή διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά [180-182].



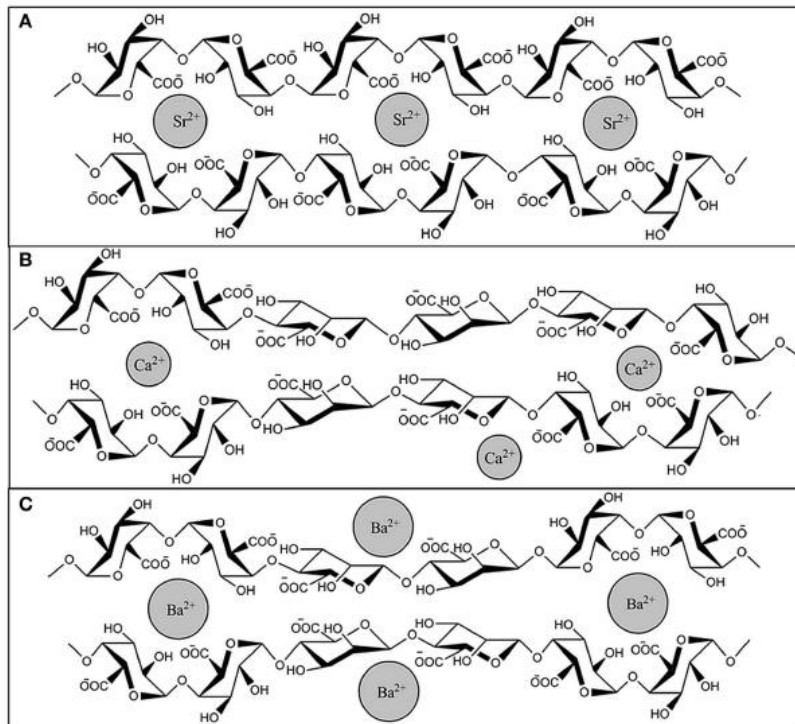
Εικόνα 3.1. Χημική δομή των αλγινικών. Με M συμβολίζεται το β -D-μαννουρονικό οξύ και με L συμβολίζεται το α -L-γουλουρονικό οξύ. Επιπλέον παρουσιάζεται ο τρόπος σύνδεσης των μονάδων αυτών.

Η πιο σημαντική ιδιότητα των αλγινικών είναι να σχηματίζουν γέλες (gels) κατά την αντίδρασή τους με δισθενή κατιόντα. Τα αλγινικά σφαιρίδια παρασκευάζονται προσθέτοντας διάλυμα αλγινικού νατρίου σε διάλυμα δισθενών κατιόντων όπως Ca^{2+} , Sr^{2+} ή Ba^{2+} . Δισθενή κατιόντα που μπορούν επίσης να σχηματίσουν γέλη είναι τα Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} και Mn^{2+} , αλλά δεν χρησιμοποιούνται λόγω της τοξικότητάς τους. Για το σχηματισμό

γέλης οι μονάδες του αλγινικού δεσμεύουν τα κατιόντα σε ένα μοντέλο αυγού-θήκης. Ο τρόπος δέσμησης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του δισθενούς κατιόντος που θα χρησιμοποιηθεί. Πιο συγκεκριμένα το Ba^{2+} δεσμεύεται τόσο στις μονάδες GG όσο και στις MM, το Ca^{2+} στις GG και MG μονάδες ενώ το Sr^{2+} μόνο στις GG μονάδες [183].



Εικόνα 3.2. Διαδικασία σχηματισμού ιονοτροπικής γέλης στο αλγινικό. Σταγόνα διαλύματος αλγινικού νατρίου αποτίθεται σε διάλυμα $CaCl_2$ για να σχηματίσει ένα σφαιρίδιο με βάση το μοντέλο «αυγού-θήκης».



Εικόνα 3.3. Τρόπος δέσμησης Sr^{2+} , Ca^{2+} και Ba^{2+} στα αλγινικά πολυμερή.

Τα μονοσθενή κατιόντα δεν επάγουν το σχηματισμό γέλης [184]. Η δημιουργία της γέλης και η διασύνδεση του πολυμερούς επιτυγχάνεται κυρίως με ανταλλαγή των ιόντων νατρίου του γουλουρονικού νατρίου με τα δισθενή κατιόντα που προαναφέρθηκαν, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ιονοτροπικών γελών. Η δέσμευση των κατιόντων αυτών και οι ιδιότητες της σχηματιζόμενης γέλης εξαρτάται κυρίως από τη σύσταση και την αλληλουχία του αλγινικού οξέος [185]. Το μέγεθος και το σχήμα των σφαιριδίων εξαρτάται κυρίως από το ιξώδες του διαλύματος του αλγινικού νατρίου, το μέγεθος της βελόνας που χρησιμοποιείται και το ύψος μεταξύ της βελόνας και του διαλύματος του CaCl_2 . Σφαιρίδια μεγάλου μεγέθους μπορούν να παρασκευαστούν με τη χρήση βελόνας μεγάλης διαμέτρου και διάλυμα αλγινικών με υψηλό ιξώδες. Η σχετική αναλογία των μονάδων, η φύση του μετάλλου που θα χρησιμοποιηθεί για το σχηματισμό της γέλης, η συγκέντρωση του διαλύματος αλγινικού και η συγκέντρωση του κατιόντος του μετάλλου επηρεάζουν τις μηχανικές ιδιότητες του υλικού καθώς και τη διαπεραστική ικανότητα χημικών ουσιών. Υψηλή περιεκτικότητα σε γουλουρονικό οξύ προσδίδει πιο ισχυρές μηχανικές ιδιότητες στο αλγινικό, ενώ αντίθετα χαμηλή προσδίδει μεγαλύτερη ελαστικότητα [186]. Μάλιστα αν το ποσοστό του γουλουρονικού είναι πάνω από 70% το υλικό εμφανίζει τη μέγιστη μηχανική σταθερότητα, μικρότερη συρρίκνωση, υψηλότερη σταθερότητα έναντι μονοσθενών κατιόντων και υψηλό πορώδες [187]. Επίσης η σταθερότητα και ακαμψία της γέλης αυξάνεται όσο αυξάνεται η ιονική ακτίνα του μεταλλικού ιόντος της II_A ομάδας [188]. Αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος αλγινικού νατρίου επάγει τη δημιουργία σφαιριδίων περισσότερο ομοιόμορφων και σφαιρικών. Οι λεπτομερείς ιδιότητες αυτών των πολυμερών έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία [189]. Τα αλγινικά πολυμερή έχουν εφαρμογές και στην φαρμακευτική όπου χρησιμοποιούνται σε χάπια κατάπωσης, στην οδοντιατρική και σε κάποιους επιδέσμους τραυμάτων [190]. Το χαρακτηριστικό που κάνει τα αλγινικά ιδανικά υλικά ως μήτρες παγίδευσης είναι το ότι οι διασυνδέσεις των πολυμερών παρέχουν το απαραίτητο τρισδιάστατο πλέγμα και δίκτυο πόρων ώστε να συγκρατήσουν τα κύτταρα σε μία περιοχή, ενώ ταυτόχρονα επιτρέπεται η μεταφορά θρεπτικών ουσιών, προϊόντων του μεταβολισμού και άλλων απαραίτητων μορίων. Τα τελευταία χρόνια, η παγίδευση κυττάρων σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου έχει γίνει η πιο διαδεδομένη τεχνική για την ακινητοποίηση ζωντανών ή νεκρών κυττάρων, ενζύμων και πρωτεϊνών αλλά και για ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων [191].

3.1.3. Παγίδευση κυττάρων σε αλγινικά πολυμερή για χρήση σε διάφορες εφαρμογές.

Η παγίδευση των κυττάρων σε σφαιρίδια αλγινικού είναι πλέον πολύ διαδεδομένη. Αντικείμενο μελέτης έχει αποτελέσει ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζεται η φυσιολογία των κυττάρων κατά τη διαδικασία ακινητοποίησης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται πολλές τεχνικές με την ηλεκτρονική μικροσκοπία να είναι η πιο σημαντική [191]. Συνήθως οι μικροοργανισμοί που έχουν ακινητοποιηθεί σε μία γέλη παρουσιάζουν ανάπτυξη σε μικρο-αποικίες. Έχει βρεθεί ότι η μορφολογία των κυττάρων σε μία αποικία μπορεί να είναι αξιοσημείωτα διαφορετική σε σχέση με αυτή σε κύτταρα που αναπτύσσονται ελεύθερα. Επιπλέον οι αποικίες αυτές περικλείονται από μία «μεμβράνη» του υλικού [192, 193]. Επίσης όταν τα κύτταρα βρίσκονταν υπό την επίδραση χημικών ουσιών φάνηκε πως το πολυμερές αυτό τα προστάτευε έναντι των τοξικών επιδράσεων όπως έχει αναφερθεί στην περίπτωση της φαινόλης στη βιβλιογραφία [194]. Ακινητοποιημένα κύτταρα έχουν χρησιμοποιηθεί για μετρήσεις τοξικότητας χημικών ουσιών είτε σε εργαστηριακά πειράματα, είτε σε *in situ* εφαρμογές [195].

Η ακινητοποίηση μικροοργανισμών βρίσκει πολλαπλές εφαρμογές στα πεδία παραγωγής φυσικών προϊόντων υψηλής βιομηχανικής σημασίας καθώς και σε χρήση σε εφαρμογές βιοαποκατάστασης (π.χ. ιόντα, βαρέα μέταλλα, οργανικοί ρύποι). Το μεγάλο ερώτημα που εγείρεται σε κάθε τέτοια μελέτη είναι το κατά πόσο τα κύτταρα διατηρούν τη βιολογική και μεταβολική τους δραστηριότητα όταν είναι παγιδευμένα στον εκάστοτε φορέα ακινητοποίησης. Ακινητοποιημένα κύτταρα του γένους *Pseudomonas* σε σφαιρίδια αλγινικού βρέθηκαν να είναι αποτελεσματικά στην αποικοδόμηση της φαινόλης και της παρα-κρεσόλης [196-198]. Μάλιστα η πολυμερική μήτρα βρέθηκε πως προστάτευε τα κύτταρα από την τοξική επίδραση της φαινόλης [194]. Επιπλέον έχουν χρησιμοποιηθεί ακινητοποιημένα βακτήρια για την απομάκρυνση του τριχλωροαιθυλενίου και του φαινανθρενίου [199, 200]. Επιπλέον έχουν χρησιμοποιηθεί μεικτά συστήματα ακινητοποίησης που περιλαμβάνουν δύο οργανισμούς όπως π.χ. το μικροφύκος *Chlorella vulgaris* και το συμβιωτικό βακτήριο που προωθεί την ανάπτυξη *Azospirillum brasiliense* ακινητοποιήθηκαν μαζί προκειμένου να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα της εκάστοτε βιοτεχνολογικής εφαρμογής [201, 202].

Όσο αφορά την ακινητοποίηση μικροφυκών, η ακινητοποίηση κυττάρων *Botryococcus braunii* σε σφαιρίδια αλγινικού οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής υδρογονανθράκων σε σχέση με ελεύθερα κύτταρα και μάλιστα τα ακινητοποιημένα κύτταρα εμφάνισαν υψηλότερη φωτοσυνθετική δραστηριότητα [203, 204]. Σε συγκριτικές μελέτες του

μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης μεταξύ ελεύθερων και ακινητοποιημένων κυττάρων του γένους *Chlorella vulgaris* σε αλγινικό δεν παρατηρήθηκε διαφορά [205]. Αυτό που έχει αναφερθεί είναι ότι σε γενικές γραμμές η διαδικασία της ακινητοποίησης επιφέρει θετικές επιδράσεις τόσο στην κυτταρική όσο και στους μεταβολικούς ρυθμούς των κυττάρων με ελάχιστες εξαιρέσεις, όπως έχει παρουσιαστεί προηγουμένως στη βιβλιογραφία [206].

Ακινητοποιημένα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii*, σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου, βρέθηκαν να είναι εξίσου αποτελεσματικά με ελεύθερα στην παραγωγή γλυκερόλης [207]. Έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία η ικανότητα ακινητοποιημένων μικροφυκών να απομακρύνουν αποτελεσματικά φωσφορικά, αμμωνιακά και άλλα ιόντα από απόβλητα τα οποία είτε έχουν υποστεί πρωτογενή επεξεργασία είτε μη επεξεργασμένα. Επιπλέον κύτταρα του γένους *Chlamydomonas* ακινητοποιημένα σε αλγινικό εμφάνισαν μεγαλύτερη απόδοση στην προσρόφηση ιόντων υδραργύρου, μολύβδου, νικελίου και ψευδαργύρου σε σχέση με ελεύθερα κύτταρα όπως επίσης αύξηση στην ικανότητα πρόσληψης νιτρικών ιόντων και φωτοπαραγωγής αμμωνίου, δείχνοντας ταυτόχρονα υψηλότερη φωτοσυνθετική ικανότητας χωρίς η αναπνευστική τους δραστηριότητα να διαφοροποιείται σημαντικά [114, 208, 209].

Από τα παραπάνω αντιπροσωπευτικά παραδείγματα φαίνεται πως η ακινητοποίηση μικροοργανισμών είναι μία διαδικασία που καθιστά πιο εύκολο τον έλεγχο της βιομάζας εφόσον βρίσκεται περιορισμένη σε ένα υλικό και διευκολύνει μια πιθανή βιοτεχνολογική εφαρμογή.

3.2 Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης πειραματικής σειράς ήταν η μελέτη αποικοδόμησης της φαινόλης από ακινητοποιημένα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου καθώς και η μελέτη της βιωσιμότητας του συστήματος αλλά και της απελευθέρωσης των κυττάρων κάτω υπό αυτές τις συνθήκες με απώτερο στόχο μία πιθανή βιοτεχνολογική εφαρμογή για *in situ* βιοαποκατάσταση.

3.3 Πειραματικό μέρος

3.3.1. Οργανισμός και συνθήκες ανάπτυξης

Στην παρούσα πειραματική σειρά χρησιμοποιήθηκε το αγρίου τύπου στέλεχος (wild type) *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125. Τα κύτταρα *Chlamydomonas* αναπτύχθηκαν ετερότροφα σε υγρό θρεπτικό μέσο TAP (Tris- Acetate- Phosphate) σε κωνικές φιάλες με συνεχή ανάδευση, για 4-5 ημέρες προκειμένου να μην κατακαθίσουν τα κύτταρα [141]. Όλα τα πειράματα εκτελέστηκαν σε δωμάτιο σταθερής θερμοκρασίας 25 ± 1 °C. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 μmol φωτονίων·s⁻¹ με την χρήση λευκών (cool white) λαμπών φθορισμού. Οι υγρές καλλιέργειες αυτές αποτέλεσαν μητρικές καλλιέργειες για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Όλα τα θρεπτικά μέσα και τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο στους 120°C για 20-30 min για την αποφυγή μολύνσεων από άλλους μικροοργανισμούς. Όλα τα πειράματα παρασκευής καλλιεργειών διεξήχθησαν σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow hood) ο οποίος είχε προηγουμένως αποστειρωθεί με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας και αιθανόλη. Τα πειράματα έλαβαν χώρα παρουσία φλόγας.

3.3.2. Μέτρηση της κυτταρικής συγκέντρωσης

Η κυτταρική συγκέντρωση προσδιορίστηκε με μέτρηση του όγκου καθιζαμένων κυττάρων (Packed Cell Volume, PCV) ανά mL καλλιέργειας και εκφράστηκε σε μL PCV/mL καλλιέργειας [152]. Πιο συγκεκριμένα δείγμα καλλιέργειας φυγοκεντρίθηκε για 5 λεπτά σε ειδικούς βαθμονομημένους πλαστικούς τριχοειδείς σωλήνες της TPP σε μία φυγόκεντρο *Eppendorf*.

3.3.3. Ακινητοποίηση των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν από τη μητρική καλλιέργεια στο τέλος της εκθετικής φάσης με φυγοκέντρωση στα 1000g για 5 λεπτά. Έπειτα επαναιωρήθηκαν σε 5 mL θρεπτικού μέσου TAP χωρίς οξικό οξύ (Limit C) και η κυτταρική συγκέντρωση προσαρμόστηκε ώστε να είναι ίση με 20 μL PCV/mL καλλιέργειας. Παράλληλα είχαν παρασκευαστεί διαλύματα αλγινικού νατρίου (Alginate sodium salt from brown algae, Fluka) όγκου 5 mL και περιεκτικότητας 6%, 8%, 10% και 12% w/v τα οποία αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο στους 120°C για

20-30 min για την αποφυγή μολύνσεων από άλλους μικροοργανισμούς. Έπειτα τα διαλύματα κυττάρων αναμείχθηκαν με τα διαλύματα του αλγινικού προκειμένου να προκύψουν διαλύματα τελικής περιεκτικότητας αλγινικού ίσης με 3%, 4%, 5% και 6% w/v. Τα διαλύματα υπέστησαν ήπια ανάδευση με χρήση μαγνητικού αναδευτήρα για 10-15 λεπτά προκειμένου να γίνουν ομογενή. Έπειτα σε θάλαμο νηματικής ροής αέρα παρουσία φλόγας τα διαλύματα αυτά προστέθηκαν στάγδην, με χρήση tip 1000 μL , σε διάλυμα CaCl_2 περιεκτικότητας 2% w/v το οποίο αναδευόταν αργά για να μην υποστούν μηχανική καταστροφή τα σφαιρίδια. Στη συνέχεια αφέθηκαν υπό ήπια ανάδευση για μία ώρα προκειμένου να σκληρύνουν. Μετά το πέρας της διαδικασίας σκλήρυνσης εκπλύθηκαν δύο φορές με αποστειρωμένο ύδωρ για να απομακρυνθεί η περίσσεια CaCl_2 που δεν είχε δεσμευτεί. Τέλος εκπλύθηκαν δύο φορές με θρεπτικό μέσο TAP από το οποίο απουσίαζε το οξικό οξύ (συνθήκη Limit C) και μεταφέρθηκαν σε κωνικές φιάλες των 100 mL με όγκο θρεπτικού 50 mL και συγκέντρωση φαινόλης ίση με 4,0 mM. Η τελική κυτταρική συγκέντρωση αντιστοιχούσε σε 2 μL PCV/mL καλλιέργειας ($3,633 \cdot 10^7 \pm 5,279 \cdot 10^6$ κύτταρα/mL, δηλαδή συνολικά $1,817 \cdot 10^9 \pm 2,639 \cdot 10^8$ κύτταρα). Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό αναδευτήρα (shaker) με συχνότητα ανάδευσης 140 min^{-1} υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας ίσης με 70-80 $\mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Έπειτα από την πάροδο 10 ημερών τα σφαιρίδια συλλέχθηκαν από το θρεπτικό μέσο και πλύθηκαν με θρεπτικό μέσο TAP. Έπειτα τοποθετήθηκαν εκ νέου σε θρεπτικό μέσο TAP, σε κωνικές φιάλες των 100 mL με όγκο θρεπτικού 50 mL. Τα σφαιρίδια που στην προηγούμενη πειραματική σειρά αποτελούσαν τις καλλιέργειες μάρτυρες (control) συνέχισαν στην ίδια συνθήκη ενώ τα σφαιρίδια που είχαν βρεθεί προηγουμένως υπό την επίδραση της φαινόλης τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό μέσο TAP με εκ νέου προσθήκη φαινόλης σε τελική συγκέντρωση ίση με 4,0 mM.

3.3.4. Δειγματοληψία

Κατά τη διάρκεια του πειράματος συλλέχθηκαν δείγματα του 1,0 mL από τις καλλιέργειες με τη χρήση αποστειρωμένου tip των 1000 μL . Η δειγματοληψία πραγματοποιούνταν σε θάλαμο νηματικής ροής αέρα παρουσία φλόγας. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε δύο μέρη, το ένα μέρος χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φαινόλης και της παραγόμενης κατεχόλης και το άλλο για τη μέτρηση των κυττάρων τα οποία είχαν απελευθερωθεί από τα σφαιρίδια μέσα στο διάλυμα.

3.3.5. Μέτρηση αριθμού κυττάρων που απελευθερώθηκαν από τα σφαιρίδια

Για τη μέτρηση των κυττάρων που απελευθερώθηκαν από τα σφαιρίδια 10 μL υγρού που συλλέχθηκε από την κωνική φιάλη εισήχθη σε μία πλάκα μέτρησης κυττάρων (Improved Neubauer Cell Counting Chamber, Milliscience), βάθους 0,1000 mm και επιφάνειας μικρού τετραγώνου 0,0025 mm^2 . Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε οπτικό ανάστροφο μικροσκόπιο Nikon με χρήση αντικειμενικού φακού 40x. Τα τελικά αποτελέσματα ανάχθηκαν σε αριθμό κυττάρων ανά mL καλλιέργειας.

3.3.6. Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού

Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού έγιναν με τη φορητή συσκευή Plant Efficiency Analyser (Handy PEA Hansatech Instruments) σε άθικτα σφαιρίδια που περιείχαν ακινητοποιημένα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii*. Τα δείγματα παρέμειναν στο σκοτάδι για 10 λεπτά, προκειμένου να όλα τα μόρια στα κέντρα αντίδρασης να βρίσκονται στη θεμελιώδη τους κατάσταση, και έπειτα διεγέρθηκαν. Η μέθοδος αυτή βασίζεται σε μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού με ανάλυση 10 μs , 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 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 φωτοσυστήματος II.

3.3.7. Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της φαινόλης και της κατεχόλης πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης με βάση το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στις προηγούμενες πειραματικές σειρές και περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.8.

3.3.8. Παρατήρηση σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)

Για την παρατήρηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία, τα σφαιρίδια αρχικά υπέστησαν δύο δεκάλεπτες πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα διμεθυλαρσινικού νατρίου (sodium cacodylate buffer, SCB) συγκέντρωσης 0,1 M και pH=7,4. Έπειτα μονιμοποιήθηκαν με χρήση διαλύματος 2% w/v γλουταραλδεΐδης (GDA) και 2% w/v παραφορμαλδεΐδης (PFA) σε διάλυμα SCB συγκέντρωσης 0,08 M και pH=7,4 για 45 λεπτά. Οι μονιμοποιητές απομακρύνθηκαν με δύο δεκάλεπτες πλύσεις με διάλυμα SCB 0,1 M και pH=7,4. Έπειτα τα σφαιρίδια υπέστησαν αφυδάτωση χρησιμοποιώντας διαδοχικές δεκάλεπτες πλύσεις με 30%, 50%, 70%, 90% και 100% αιθανόλη. Κατά τη διάρκεια της κάθε πλύσης τα δείγματα φυλάσσονταν σε θερμοκρασία 4°C. Έπειτα πλύθηκαν με ξηρή αιθανόλη για 10 λεπτά και υπέστησαν ξήρανση με χρήση μίας συσκευής ξήρανσης κρίσιμου σημείου του διοξειδίου του άνθρακα (BAL-TEC, CPD 030 Critical Point Dryer) προκειμένου να αφυδατωθούν πλήρως. Έπειτα τα δείγματα επικολλήθηκαν σε ύαλο με χρήση αγωγίμης ταινίας άνθρακα (carbon tape) και επικαλύφθηκαν με πάχος 20 nm χρυσό με χρήση ενός Sputter Coater (SCD 050) της BAL-TEC προκειμένου να γίνουν ηλεκτρικά αγωγά. Η παρατήρηση στο SEM πραγματοποιήθηκε σε διαφορά δυναμικού δέσμης ηλεκτρονίων 20 kV.

3.4 Αποτελέσματα και συζήτηση

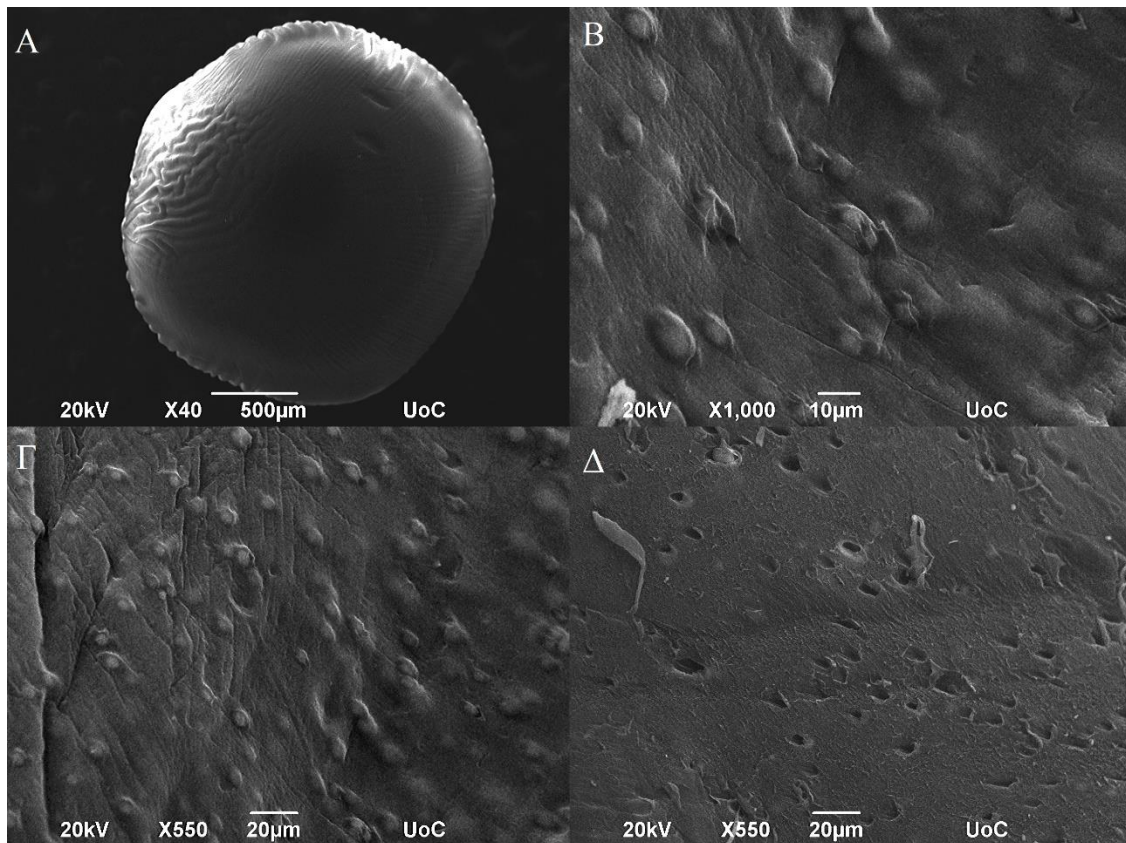
3.4.1. Παρατήρηση ακινητοποιημένων κυττάρων σε σφαιρίδια διαφορετικής συγκέντρωσης αλγινικού.

Αμέσως μετά την παρασκευή τους τα σφαιρίδια με τα ακινητοποιημένα κύτταρα *Chlamydomonas* παρατηρήθηκαν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM). Τα σφαιρίδια τα οποία περιείχαν ακινητοποιημένα κύτταρα είχαν αποκτήσει πράσινο χρώμα, όπως ήταν αναμενόμενο εξαιτίας του περιεχομένου της χλωροφύλλης των *Chlamydomonas*, ενώ αντίθετα τα σφαιρίδια που δεν είχαν κύτταρα ήταν διάφανα.

Πριν από την προετοιμασία τους για μονιμοποίηση και ξήρανση για παρατήρηση με SEM κάποια σφαιρίδια τεμαχίστηκαν με νυστέρι κάτω από στερεοσκόπιο προκειμένου να ληφθεί εικόνα από την κατανομή των κυττάρων στο εσωτερικό τους. Οι φωτογραφίες από τα σφαιρίδια κατά την έναρξη του πειράματος παρουσιάζονται στις Εικόνες 3.4-3.7. Από τις

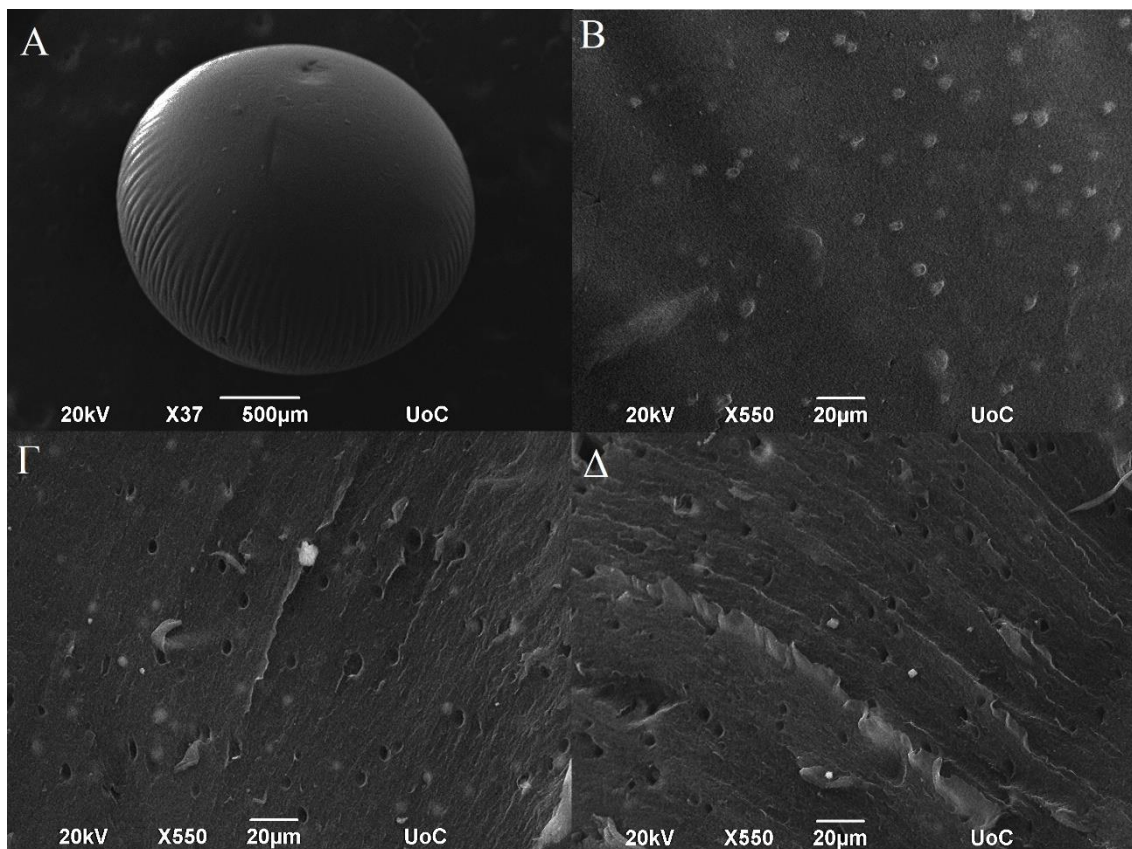
φωτογραφίες είναι φανερή η διαφορά του σχήματος του σφαιριδίου ανάλογα με την περιεκτικότητα του αλγινικού που χρησιμοποιήθηκε.

Τα σφαιρίδια που παρασκευάστηκαν είχαν διάμετρο από 2-3 mm η οποία εξαρτήθηκε από τη συγκέντρωση αλγινικού. Μάλιστα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλγινικού η μέση διάμετρος είναι περίπου 25% μεγαλύτερη. Αυτό έχει να κάνει κυρίως με την αύξηση του ιξώδους του διαλύματος που οδηγεί στο σχηματισμό σταγόνας μεγαλύτερου μεγέθους. Τα καλύτερα σχηματισμένα σφαιρίδια παρασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις αλγινικού 4 και 5%. Στο διάλυμα περιεκτικότητας 6% υπήρχε μία παραμόρφωση στη δομή εξαιτίας του μεγάλου ιξώδους του διαλύματος το οποίο δεν επέτρεψε το σχηματισμό ομοιόμορφης σταγόνας κατά την παρασκευή των σφαιριδίων. Αντίθετα στο διάλυμα 3% αλγινικού το διάλυμα είχε πάρα πολύ μικρό ιξώδες και για το λόγο αυτό υπάρχει μεγάλη απόκλιση από το σφαιρικό σχήμα.



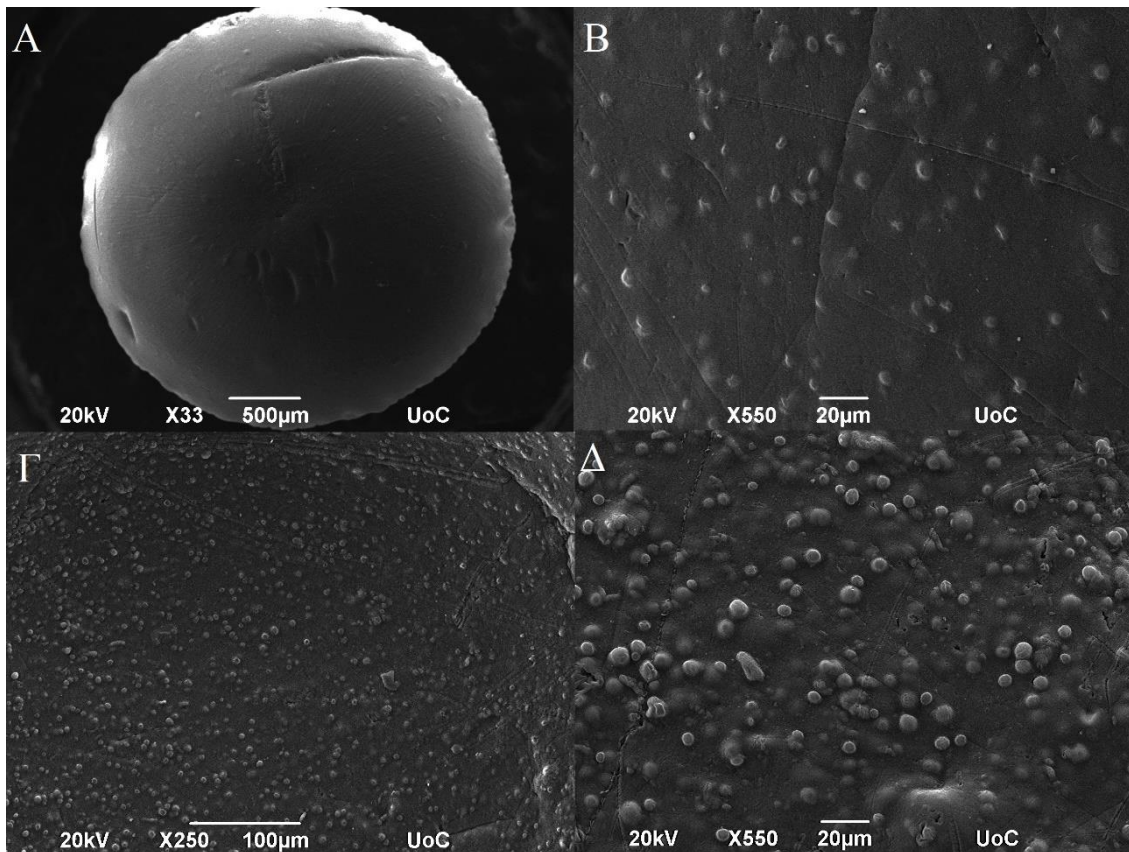
Εικόνα 3.4. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης των σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου που παρασκευάστηκαν από διάλυμα συγκέντρωσης 3%, αμέσως μετά την παρασκευή τους. Α. Ολόκληρο σφαιρίδιο, Β και Γ. Εξωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου, Δ. Εσωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου.

Όσο αφορά την κατανομή των κυττάρων στα σφαιρίδια εμφανίζεται να είναι ομοιόμορφη τόσο στην εξωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου όσο και στο εσωτερικό του. Σημαντική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι στα σφαιρίδια με συγκεντρώσεις αλγινικού 5 και 6% τα κύτταρα είναι πιο σφικτά προσδεδεμένα στην πολυμερική μήτρα. Για το λόγο αυτό, από την τομή των σφαιριδίων αλλά και την προετοιμασία των δειγμάτων για την παρατήρηση με SEM, στις περιπτώσεις που η συγκέντρωση αλγινικού είναι 3 ή 4% τα κύτταρα απομακρύνονται από το εσωτερικό και φαίνονται μόνο οι οπές στην επιφάνεια. Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρείται στα σφαιρίδια 5 και 6% αλγινικού. Επίσης στις φωτογραφίες με μεγέθυνση 550 φορές και πάνω είναι εμφανής η διαφορά στο πόσο ισχυρά η μήτρα συγκρατεί τα κύτταρα στο πολυμερές.

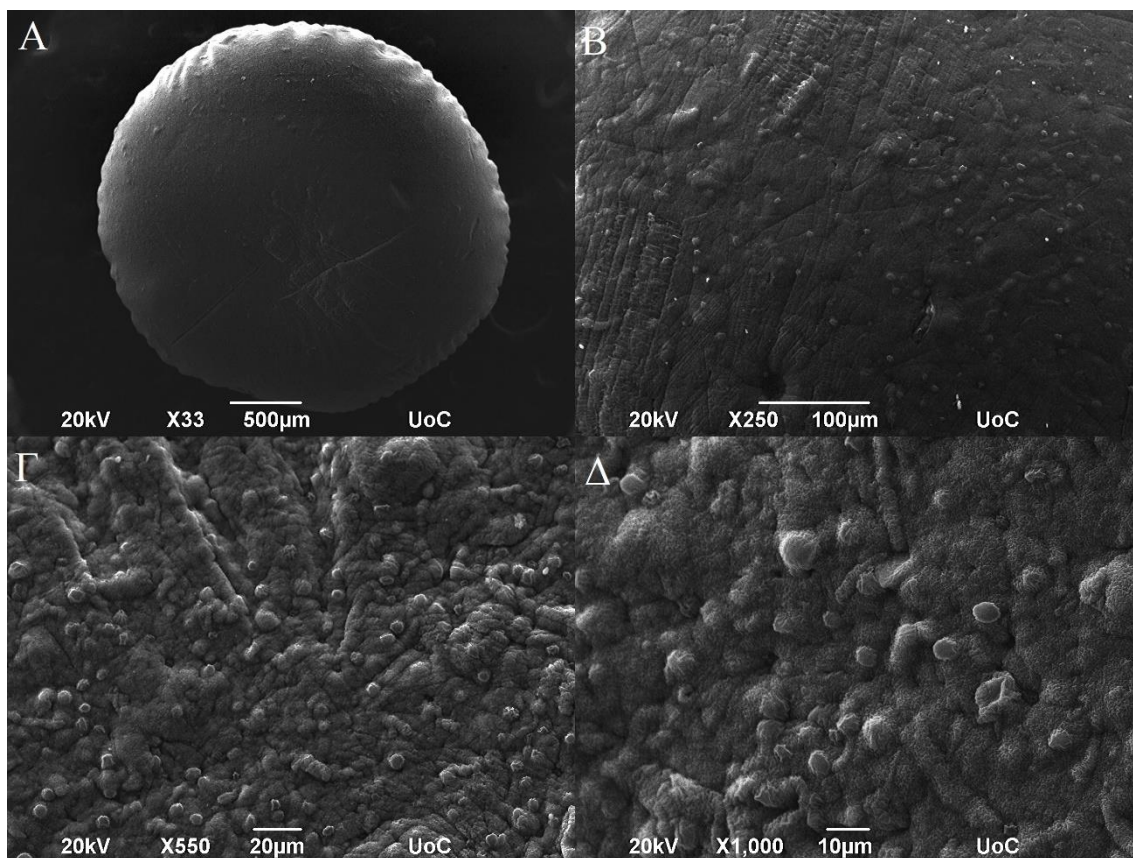


Εικόνα 3.5. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης των σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου που παρασκευάστηκαν από διάλυμα συγκέντρωσης 4%, αμέσως μετά την παρασκευή τους. Α. Ολόκληρο σφαιρίδιο, Β. Εξωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου, Γ και Δ. Εσωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου.

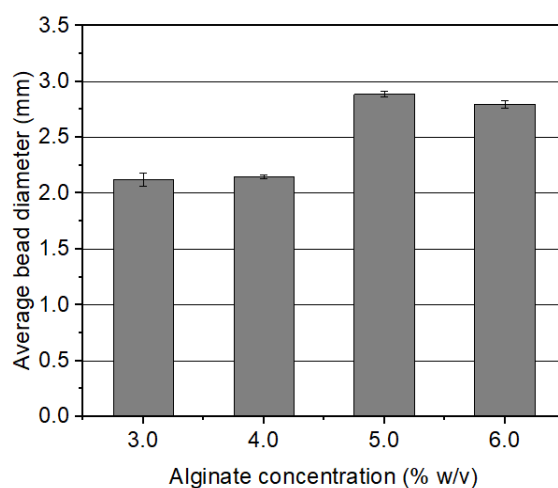
Στις φωτογραφίες που ελήφθησαν με πολύ μεγάλη μεγέθυνση φαίνεται πως το πολυμερές περικλείει τα κύτταρα ως ένας μανδύας. Αυτό το φαινόμενο γίνεται πιο έντονο όσο αυξάνεται η αρχική συγκέντρωση του διαλύματος αλγινικού. Η επικάλυψη των κυττάρων από το πολυμερές κατά τη διαδικασία ακινητοποίησης έχει παρατηρηθεί στη βιβλιογραφία, όπου έχει αναφερθεί πως τα κύτταρα περικλείονται από μία «μεμβράνη» του υλικού ακινητοποίησης [192, 193].



Εικόνα 3.6. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης των σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου που παρασκευάστηκαν από διάλυμα συγκέντρωσης 5%, αμέσως μετά την παρασκευή τους. Α. Ολόκληρο σφαιρίδιο, Β. Εξωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου, Γ και Δ. Εσωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου.



Εικόνα 3.7. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης των σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου που παρασκευάστηκαν από διάλυμα συγκέντρωσης 6%, αμέσως μετά την παρασκευή τους. Α. Ολόκληρο σφαιρίδιο, Β. Εξωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου, Γ και Δ. Εσωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου.



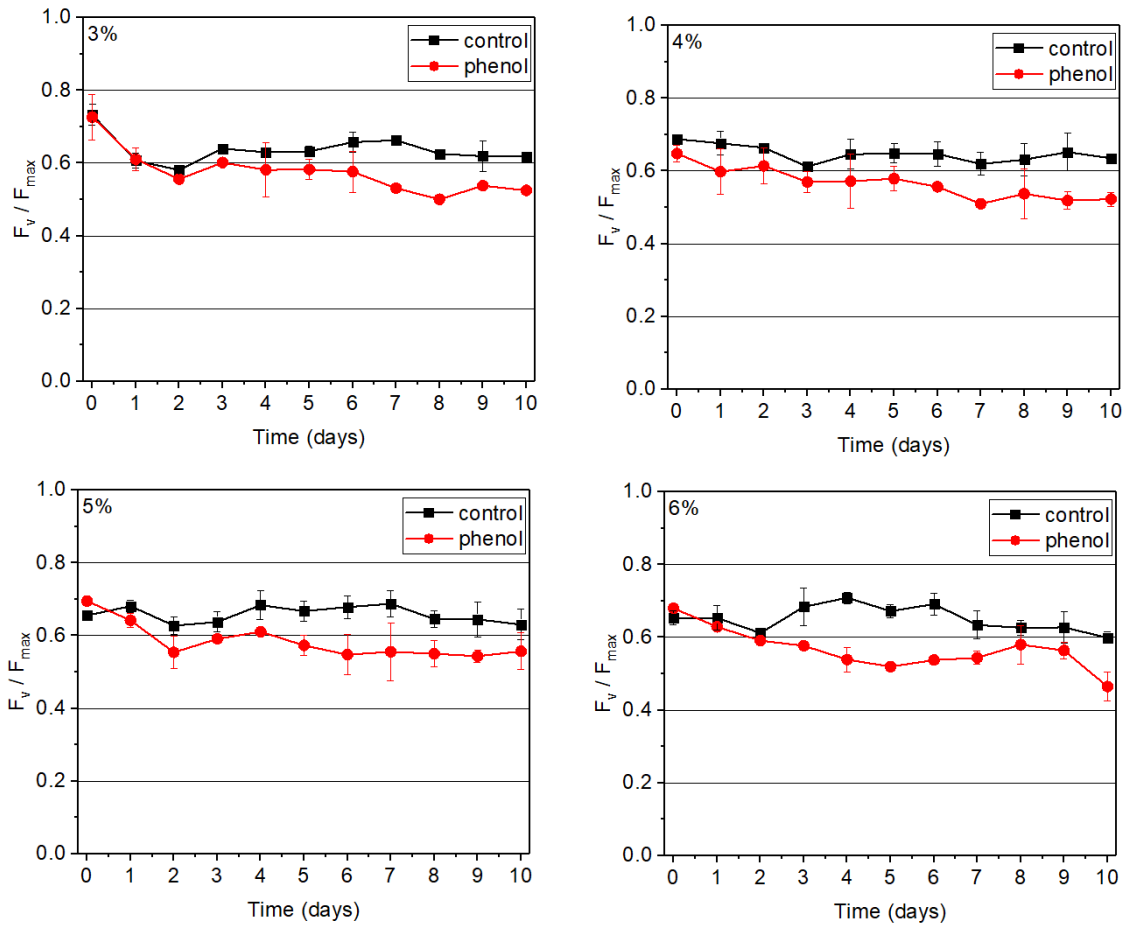
Εικόνα 3.8. Μέσος όρος διαμέτρου των σφαιριδίων που παρασκευάστηκαν από διάφορες συγκεντρώσεις διαλύματος αλγινικού.

3.4.2. Μελέτη αποικοδόμησης της φαινόλης, παραγωγής κατεχόλης και απελευθέρωσης των κυττάρων έπειτα από παραμονή των σφαιριδίων σε θρεπτικό μέσο TAP απουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα (Limit C) για διάστημα 10 ημερών παρουσία 4,0 mM φαινόλης.

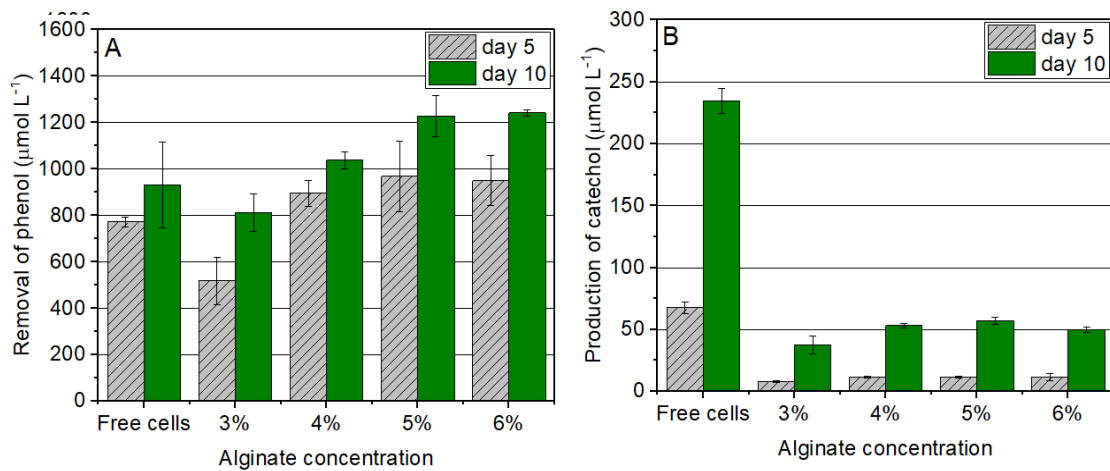
Κατά τη διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού για να μελετηθεί η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση των ακινητοποιημένων κυττάρων. Από τις μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού φαίνεται πως η μεταβολή της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης ακολουθεί αυτή που παρουσιάστηκε και στα ελεύθερα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* κάτω υπό τις ίδιες συνθήκες (Εικόνα 2.42). Η φαινόλη φάνηκε να αναστέλλει σε μικρό βαθμό τη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση των ακινητοποιημένων κυττάρων. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι οι διαφορές δεν ήταν τόσο έντονες σε σχέση με την καλλιέργεια μάρτυρα (control) παρά μόνο στην περίπτωση που η μήτρα είχε παρασκευαστεί από 6% αλγινικό. Φαίνεται λοιπόν πως η πολυμερική μήτρα προσφέρει κάποιου είδους προστασία στα μικροφύκη απέναντι στην επίδραση της φαινόλης.

Όσο αφορά την αποικοδόμηση της φαινόλης η οποία μετρήθηκε μετά από 5 και 10 ημέρες καλλιέργειας φαίνεται πως τα ακινητοποιημένα κύτταρα έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν τη φαινόλη εξίσου ή και περισσότερο σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα καταγράφηκε μια τάση αύξησης της αποικοδόμησης της φαινόλης με αύξηση της συγκέντρωσης του αλγινικού. Τα ακινητοποιημένα κύτταρα σε σφαιρίδια με 6% αλγινικό αποικοδόμησαν 50% περισσότερη φαινόλη από αυτά σε 3% αλγινικό.

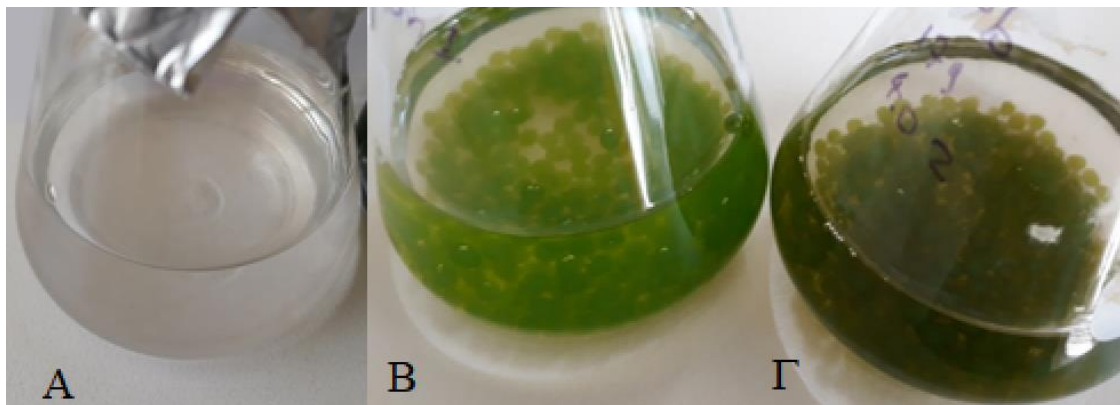
Και στην περίπτωση των ακινητοποιημένων κυττάρων, το μεγαλύτερο μέρος της φαινόλης, η οποία συνολικά απομακρύνθηκε από το μέσο καλλιέργειας στο διάστημα των 10 ημερών, αποικοδομείται μέχρι την 5^η πειραματική ημέρα, όπως δηλαδή και με τα ελεύθερα κύτταρα στο προηγούμενο κεφάλαιο. Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι τα πειράματα έλαβαν χώρα και με σφαιρίδια αλγινικού χωρίς ακινητοποιημένα κύτταρα σε όλες τις συγκεντρώσεις όπου η μείωση της συγκέντρωσης της φαινόλης ήταν στα όρια του σφάλματος της μεθόδου και δεν παρουσιάζεται στα γραφήματα. Στα πλαίσια αυτά μετρήθηκε και η παραγωγή κατεχόλης στο μέσο καλλιέργειας. Καταγράφηκε εντυπωσιακή διαφορά στη συγκέντρωση της κατεχόλης που παράχθηκε στο μέσο καλλιέργειας σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα η οποία σε πολλές περιπτώσεις ήταν μειωμένη σε ποσοστό πάνω από 80%. Σε συνδυασμό με την παραπάνω παρατήρηση, τα σφαιρίδια τα οποία περιείχαν κύτταρα τα οποία βρίσκονταν υπό την παρουσία φαινόλης απέκτησαν μία καφέ απόχρωση.



Εικόνα 3.9. Μεταβολή της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (F_v/F_{max}) των ακινητοποιημένων κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου 3-6%, απουσία οξικού οξέος και παρουσίας 4,00 mM φαινόλης, συγκριτικά με την καλλιέργεια μάρτυρα (control) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $70-80 \mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.



Εικόνα 3.10. (Α) Απόμάκρυνση της φαινόλης από το μέσο καλλιέργειας και (Β) παραγωγή της κατεχόλης από ελεύθερα και ακινητοποιημένα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* σε συνθήκες απουσίας οξικού οξέος από το μέσο καλλιέργειας, την 5^η (ανοιχτή γκρι μπάρα) και 10^η (πράσινη μπάρα) πειραματική ημέρα, υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 70-80 μmol φωτονίων·m⁻²·s⁻¹. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε μmol ανά λίτρο καλλιέργειας.



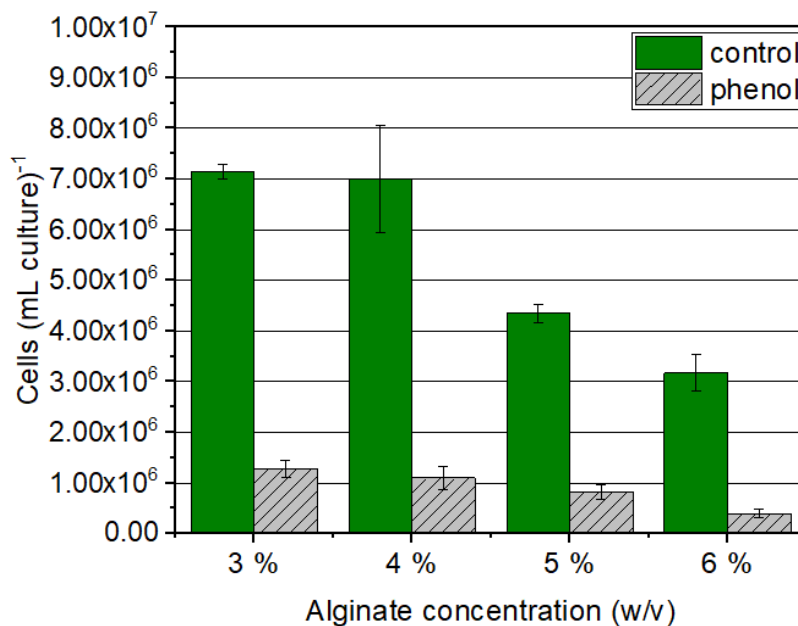
Εικόνα 3.11. Σφαιρίδια 4% αλγινικού σε συνθήκες απουσίας οξικού οξέος από το μέσο καλλιέργειας, την 10^η πειραματική ημέρα. Α. Σφαιρίδια χωρίς κύτταρα, Β. καλλιέργεια μάρτυρας, Γ. καλλιέργεια που είχε αρχική συγκέντρωση φαινόλης ίση με 4,0 mM. Τα σφαιρίδια στις καλλιέργειες Β και Γ περιέχουν ακινητοποιημένα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii*.

Από τις παραπάνω παρατηρήσεις είναι σαφές πως η αποικοδόμηση της φαινόλης λαμβάνει χώρα από τα κύτταρα τα οποία είναι ακινητοποιημένα πάνω στα σφαιρίδια. Μάλιστα τα κύτταρα παράγουν την κατεχόλη η οποία απ' ότι φαίνεται παραμένει

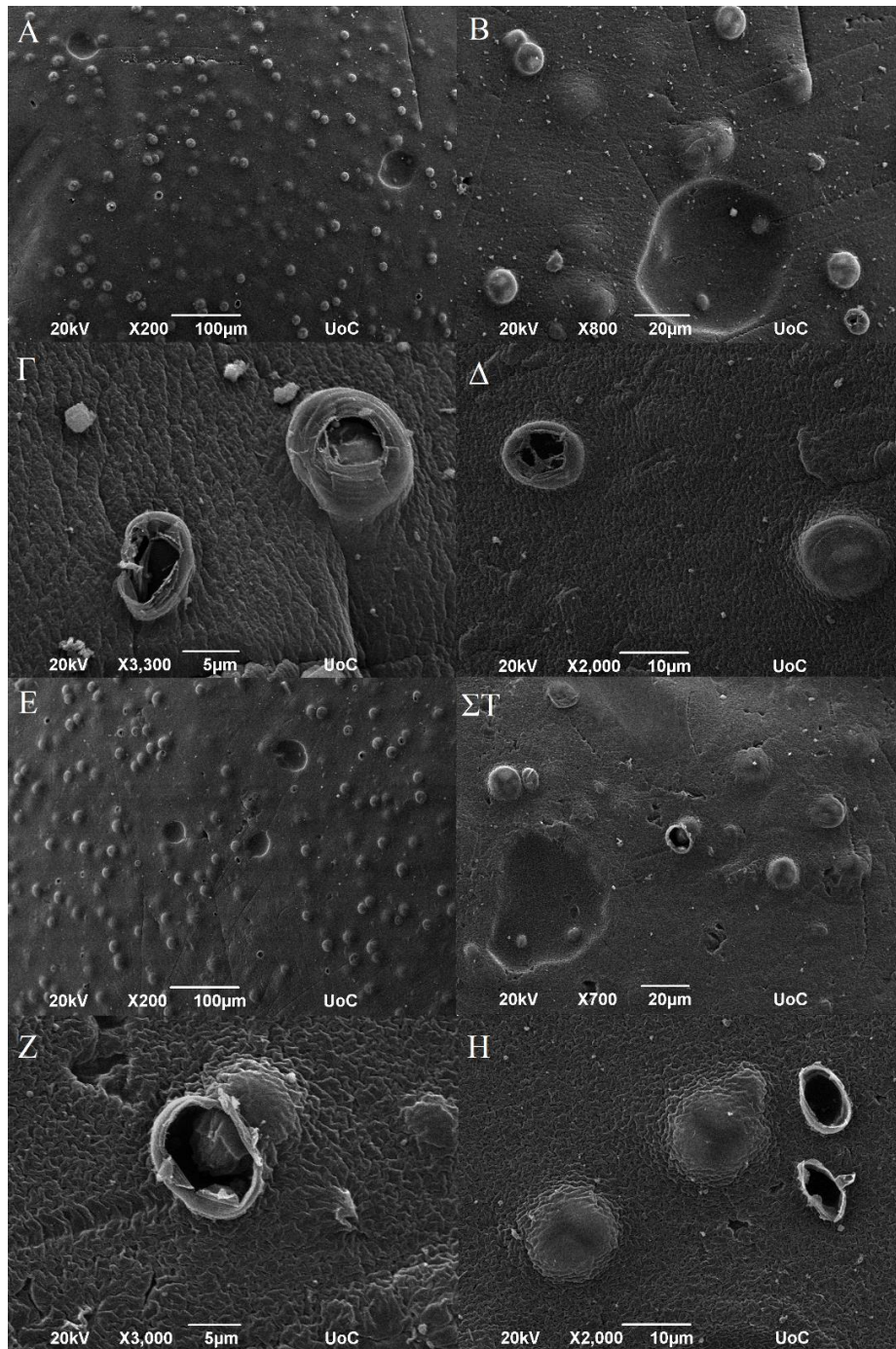
προσκολλημένη στα σφαιρίδια και για το λόγο αυτό αλλάζουν χρώμα. Αυτό αποτελεί ένα σημαντικό πλεονέκτημα της χρήσης ακινητοποιημένων κυττάρων διότι ο μεταβολίτης, ο οποίος είναι και αυτός μια φαινολική ένωση, απελευθερώνεται σε μικρότερο βαθμό στο διάλυμα και παραμένει προσκολλημένος πάνω στο σφαιρίδιο. Σε εφαρμογές βιοαποκατάστασης είναι σημαντικό πρόβλημα η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών από τα κύτταρα οι οποίοι σε κάποιες περιπτώσεις είναι εξίσου οι περισσότεροι τοξικοί από την αρχική ουσία και οι μικροοργανισμοί αδυνατούν να μεταβολίσουν περαιτέρω [40]. Φαίνεται λοιπόν πως με τη χρήση ακινητοποιημένων μικροοργανισμών αυτό το πρόβλημα μπορεί να μειωθεί σημαντικά καθώς τα σφαιρίδια είναι εύκολο να συλλεχθούν και να απομακρυνθούν. Αυτό το γεγονός σε συνδυασμό με τους υψηλότερους μεταβολικούς ρυθμούς που φάνηκαν να έχουν τα ακινητοποιημένα κύτταρα σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα αποτελεί συνδυαστικά πολύ σημαντικό πλεονέκτημα. Πάντως και στην περίπτωση των ακινητοποιημένων κυττάρων οι μεταβολικοί ρυθμοί είναι χαμηλότεροι μετά την 5^η ημέρα όπως φαίνεται και από την ποσότητα φαινόλης που απομακρύνθηκε από το μέσο καλλιέργειας.

Η απελευθέρωση των κυττάρων από τα σφαιρίδια φάνηκε να επηρεάζεται από δύο παράγοντες. Όπως ήταν αναμενόμενο η συγκέντρωση του αλγινικού έπαιξε καθοριστικό ρόλο με την απελευθέρωση στα σφαιρίδια 6% αλγινικού να είναι περισσότερο από 80% μειωμένη σε σχέση με τα σφαιρίδια σε συγκέντρωση 3 και 4% αλγινικού. Μάλιστα στις καλλιέργειες μάρτυρες ήταν μειωμένη κατά 82% ενώ στις καλλιέργειες που περιείχαν φαινόλη έφτασε το 87%. Ο δεύτερος σημαντικός παράγοντας έχει να κάνει με την ύπαρξη ή όχι της φαινόλης στο θρεπτικό μέσο. Η απελευθέρωση των κυττάρων από σφαιρίδια τα οποία βρίσκονταν σε θρεπτικό υπό την παρουσία φαινόλης ήταν πολύ μικρότερη σε σχέση με τα αντίστοιχα στις καλλιέργειες μάρτυρες (control). Πιο συγκεκριμένα ο αριθμός κυττάρων που απελευθερώθηκαν στις καλλιέργειες μάρτυρες αντιστοιχεί περίπου στο 19% σε σχέση με τον αρχικό αριθμό κυττάρων στα σφαιρίδια 3% αλγινικού και περίπου στο 8% στα σφαιρίδια 6% αλγινικού. Αυτό πιθανώς σχετίζεται με το γεγονός ότι στις συνθήκες όπου υπάρχει φαινόλη στο μέσο καλλιέργειας, τα κύτταρα βρίσκονται σε ένα περισσότερο τοξικό περιβάλλον, επομένως οι συνθήκες της καλλιέργειας δεν ευνοούν την απελευθέρωσή τους εξαιτίας της προστασίας που τους παρέχει η μήτρα. Όσο αφορά τις παρατηρήσεις από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης αρχικά φαίνεται ο τρόπος με τον οποίο λαμβάνει χώρα η απελευθέρωση. Παρατηρείται ο σχηματισμός οπών στην επιφάνεια του πολυμερούς. Οι οπές αυτές προκύπτουν πιθανώς εξαιτίας της μηχανικής δύναμης που ασκείται κατά τη διαίρεση

των κυττάρων. Στις συνθήκες αυτές (απουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα) οι οπές αυτές εμφανίζονται σε αραιά διαστήματα στην επιφάνεια. Το αποτέλεσμα αυτό είναι λογικό διότι κάτω από αυτές τις πειραματικές συνθήκες δεν ευνοείται η ανάπτυξη. Σημαντική είναι και η παρατήρηση ότι η επιφάνεια των σφαιριδίων δεν υφίσταται σημαντικές φθορές κατά την παραμονή του στο θρεπτικό μέσο και το υλικό διατηρεί τη δομική του ακεραιότητα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Επίσης τα κύτταρα διατηρούν τις βιολογικές τους λειτουργίες, όπως αποδείχθηκε από τις μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού και αποικοδόμησης της φαινόλης. Το πιο σημαντικό ερώτημα που τίθεται όμως είναι εάν η διαδικασία αποικοδόμησης πραγματοποιείται από το σύνολο των κυττάρων του σφαιριδίου ή μόνο από τα κύτταρα της εξωτερικής επιφάνειας και πιθανώς η φαινόλη να μην μπορεί να εισέλθει στο εσωτερικό των σφαιριδίων. Το παραπάνω ερώτημα προέκυψε από την παρατήρηση ότι σε κωνικές φιάλες με σφαιρίδια που δεν περιείχαν ακινητοποιημένα κύτταρα, η μείωση της συγκέντρωσης της φαινόλης από το μέσο καλλιέργειας ήταν στα όρια του σφάλματος της μεθόδου και πιθανώς η φαινόλη να μη εισέρχεται στο εσωτερικό του πολυμερούς.

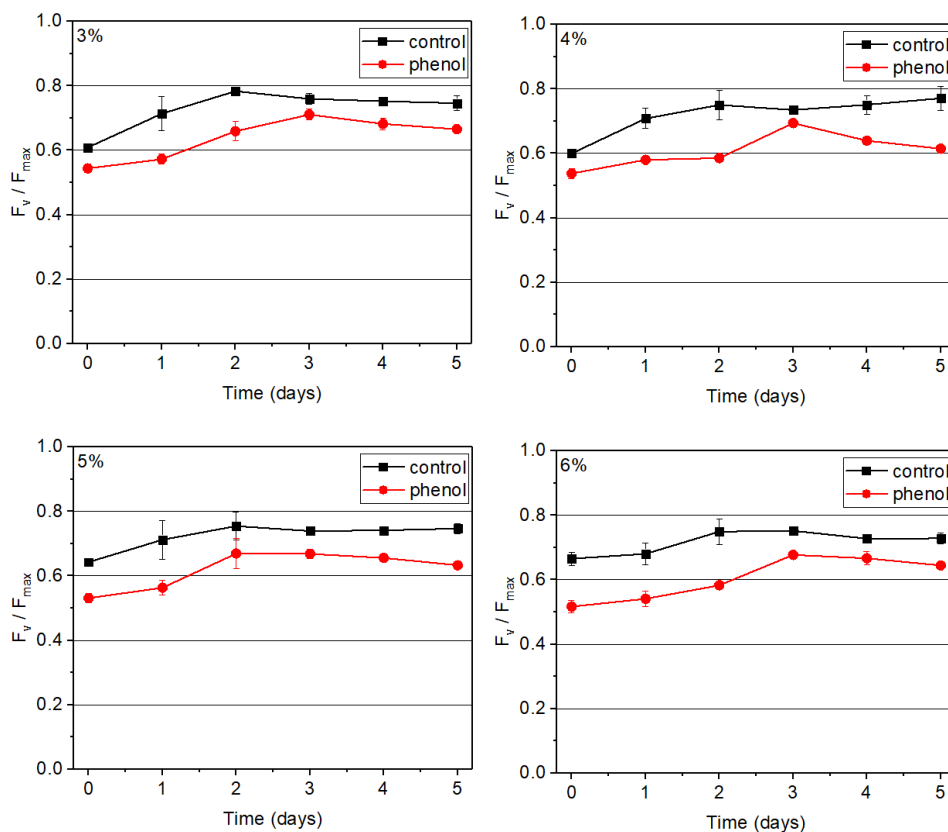


Εικόνα 3.12. Απελευθέρωση των κυττάρων από τα σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου την 10^η πειραματική ημέρα σε καλλιέργειες μάρτυρες (control) και σε καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση 4,0 mM φαινόλης.



Εικόνα 3.13. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης της εξωτερικής επιφάνειας των σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου με ακινητοποιημένα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* την 10^η πειραματική ημέρα σε συνθήκες απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα. Α,Β. σφαιρίδιο 4% αλγινικού από καλλιέργεια μάρτυρα (control), Γ. σφαιρίδιο 4% αλγινικού από καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση 4,0 mM φαινόλης, Δ. σφαιρίδιο 6% αλγινικού από καλλιέργεια μάρτυρα (control), Ε-Η: σφαιρίδιο 6% αλγινικού από καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση 4,0 mM φαινόλης.

Για να διαπιστωθεί αν η παραπάνω υπόθεση είναι πραγματική, τα σφαιρίδια συλλέχθηκαν και εκπλύθηκαν με θρεπτικό μέσο TAP. Έπειτα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό μέσο TAP για 5 ημέρες προκειμένου τα κύτταρα να έρθουν σε συνθήκες ανάπτυξης. Έτσι κατέστη δυνατό να πραγματοποιηθεί σύγκριση μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού του σφαιριδίου. Οι καλλιέργειες μάρτυρες (control) συνέχισαν να αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο TAP ενώ στις καλλιέργειες που είχαν βρεθεί υπό την επίδραση της φαινόλης τοποθετήθηκαν εκ νέου 4,0 mM τελική συγκέντρωση φαινόλης. Ο λόγος που πραγματοποιήθηκε αυτός ο χειρισμός βασίστηκε στην υπόθεση ότι τα κύτταρα, εφόσον είχαν αποικοδομήσει μερικώς τη φαινόλη σε συνθήκες απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα, είχαν ήδη εκφράσει τα απαραίτητα ένζυμα για το μεταβολισμό της ξενοβιοτικής ουσίας και θα ήταν αποτελεσματικά.



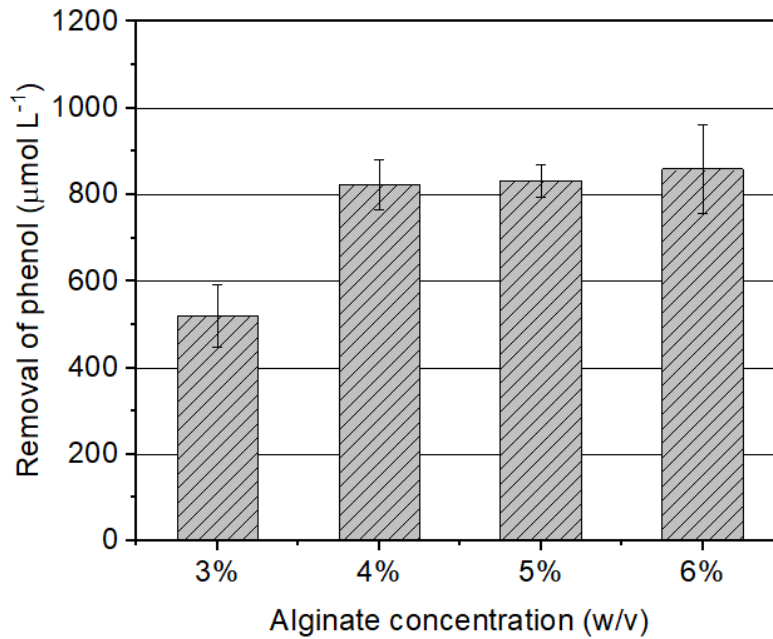
Εικόνα 3.14. Μεταβολή της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (F_v/F_{max}) των ακινητοποιημένων κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου 3-6%, μετά την επαναϊώρησή τους σε θρεπτικό μέσο TAP και παρουσία 4,00 mM φαινόλης, συγκριτικά με την καλλιέργεια μάρτυρα (control) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $70-80 \mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Από τις μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού φαίνεται πως η φωτοσυνθετική ικανότητα των ακινητοποιημένων κυττάρων *Chlamydomonas* αυξάνεται σημαντικά τις πρώτες 48 ώρες μετά την τοποθέτηση τους στο νέο θρεπτικό μέσο. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο αν ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι τα κύτταρα έχουν παραμείνει για διάστημα 10 ημερών σε θρεπτικό μέσο που είτε απουσιάζει εναλλακτική πηγή άνθρακα (control) είτε η μόνη πηγή άνθρακα είναι η φαινόλη η οποία δεν παρέχει στα κύτταρα τα απαραίτητα ενεργειακά αποθέματα, και όπως αποδείχθηκε σε προηγούμενα μέρη της εργασίας προκαλεί αναστολή στη μέγιστη φωτοσυνθετική ικανότητα. Έτσι η παρουσία οξικού οξέος βοηθάει τα κύτταρα να επανέλθουν σε φυσιολογική κατάσταση.

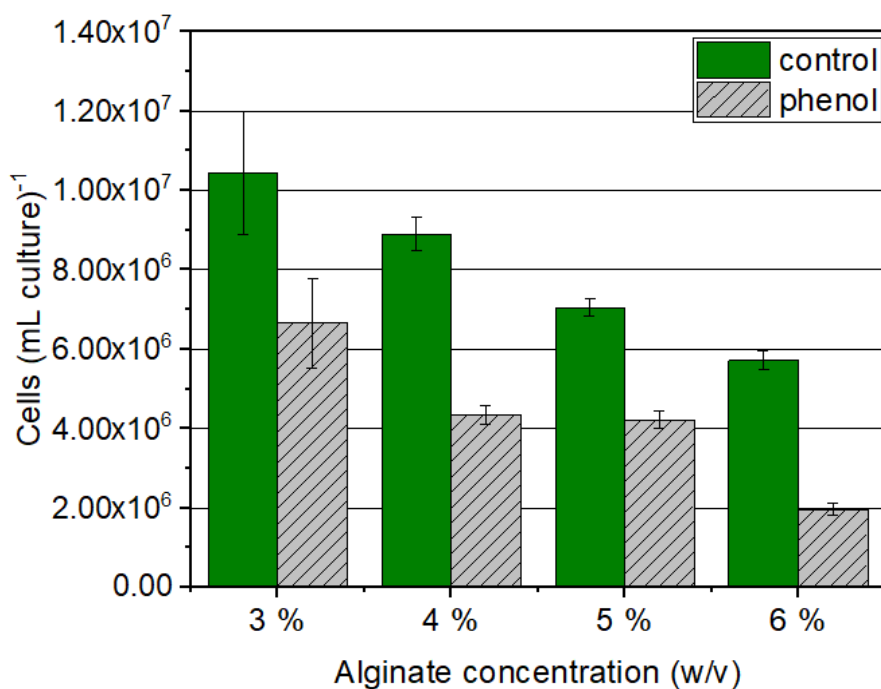
Από τις μετρήσεις αποικοδόμησης της φαινόλης φαίνεται πως παρατηρείται η ίδια τάση με τις μετρήσεις σε συνθήκες απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα. Πιο συγκεκριμένα η μεγαλύτερη απομάκρυνση της φαινόλης καταγράφηκε από κύτταρα ακινητοποιημένα σε σφαιρίδια με υψηλές συγκεντρώσεις αλγινικού. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι η απομάκρυνση που καταγράφηκε είναι συγκρίσιμη με αυτή που σημειώθηκε στο ίδιο διάστημα σε συνθήκες απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα από ακινητοποιημένα κύτταρα *Chlamydomonas*. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα κύτταρα έχουν ήδη ενεργοποιήσει την έκφραση ενζύμων για την αποικοδόμηση της φαινόλης στο προηγούμενο διάστημα και μπορούν με γρήγορο ρυθμό να αρχίσουν να αποικοδομούν την ξενοβιοτική ουσία. Σημαντική ήταν η παρατήρηση ότι δεν ανιχνεύτηκε κατεχόλη στο μέσο καλλιέργειας γεγονός που δείχνει για άλλη μία φορά τη σημασία της παρουσίας του οξικού οξέος ως πηγή ενέργειας στο μέσο καλλιέργειας προκειμένου το μικροφύκος να μπορέσει να ολοκληρώσει τη διάσπαση του δακτυλίου.

Στην περίπτωση παρουσίας οξικού οξέος στο μέσο καλλιέργειας καταγράφηκε σημαντικά μεγαλύτερος αριθμός απελευθερωμένων κυττάρων στο θρεπτικό μέσο σε σχέση με την προηγούμενη πειραματική σειρά. Για άλλη μία φορά η απελευθέρωση στις καλλιέργειες μάρτυρες είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τις αντίστοιχες καλλιέργειες που περιέχουν φαινόλη. Επίσης η απελευθέρωση επηρεάστηκε από τη συγκέντρωση του διαλύματος αλγινικού που χρησιμοποιήθηκε όπως ήταν αναμενόμενο από τα προηγούμενα αποτελέσματα. Η μεγαλύτερη αυτή απελευθέρωση σε σχέση με την προηγούμενη πειραματική σειρά μπορεί να οφείλεται σε δύο παράγοντες, αφενός το μεγάλο χρονικό διάστημα παραμονής του αλγινικού στο θρεπτικό μέσο (συνολικά 15 ημέρες) που μπορεί να έχει προκαλέσει φθορά στο υλικό και αφετέρου στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων πάνω

στο υλικό, που οδηγεί σε απελευθέρωση. Επιπλέον πρέπει να ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι τα κύτταρα που απελευθερώθηκαν από το υλικό έχουν τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού στο μέσο καλλιέργειας και άρα μπορεί να αυξάνεται ο πληθυσμός τους. Για να διερευνηθεί περαιτέρω αυτή η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε μελέτη των σφαιριδίων με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης την τελευταία πειραματική ημέρα.

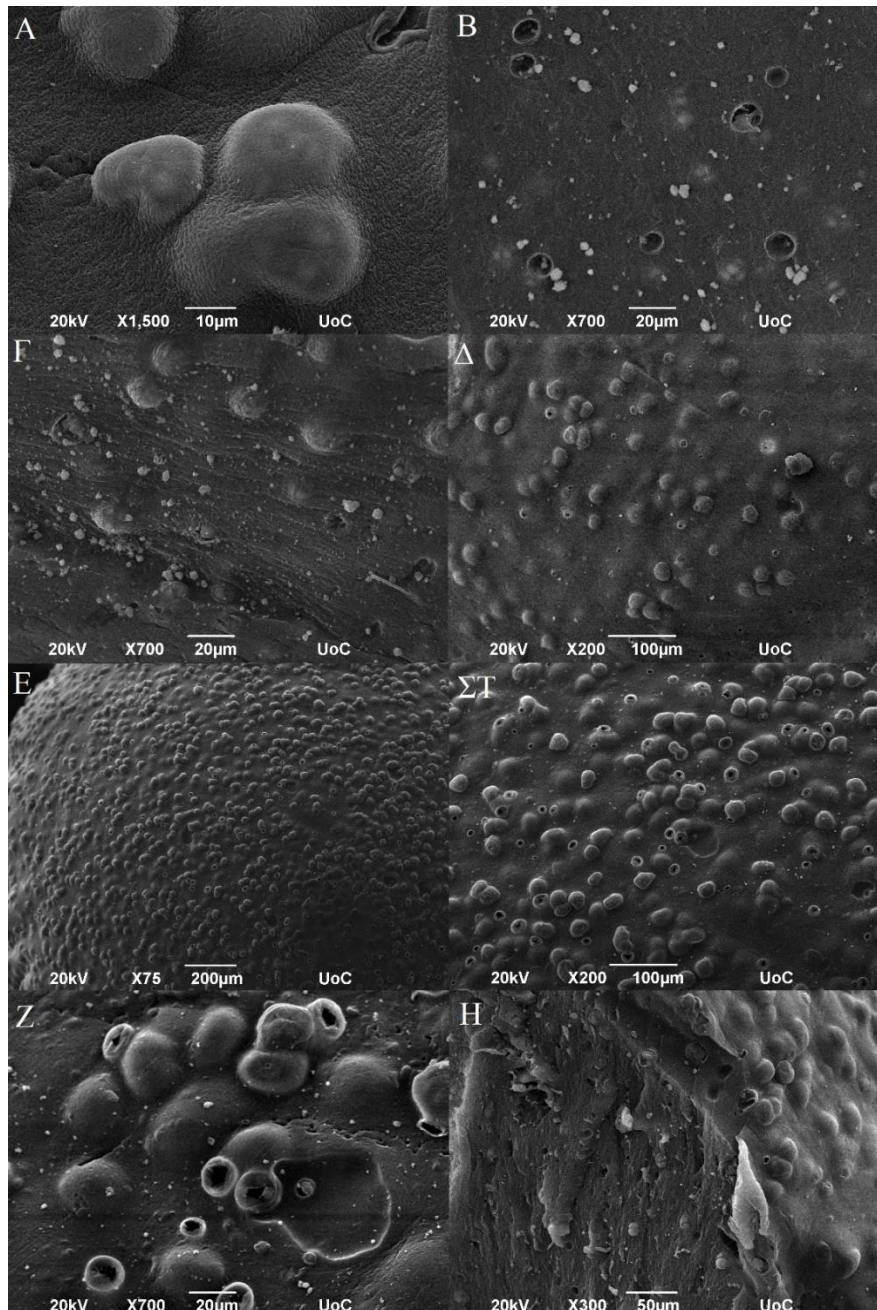


Εικόνα 3.15. (Α) Απόμάκρυνση της φαινόλης από το μέσο καλλιέργειας από ακινητοποιημένα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* παρουσία οξικού οξέος από το μέσο καλλιέργειας, την 5^η πειραματική ημέρα μετά την επαναιώρηση σε θρεπτικό μέσο TAP με αρχική συγκέντρωση φαινόλης ίση με 4,0 mM, υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 70-80 μmol φωτονίων·m⁻²·s⁻¹. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε μmol ανά λίτρο καλλιέργειας.



Εικόνα 3.16. Απελευθέρωση των κυττάρων από τα σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου την 5^η πειραματική ημέρα μετά την επαναιώρηση σε θρεπτικό μέσο TAP με αρχική συγκέντρωση φαινόλης ίση με 4,0 mM, υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 70-80 $\mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Από τις φωτογραφίες που ελήφθησαν από το SEM (Εικόνα 3.17) λαμβάνονται πολλές πληροφορίες που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αρχικά φαίνεται ότι τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται στην επιφάνεια του σφαιριδίου καλυμμένα από μία μεμβράνη του υλικού. Αυτό είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία όπου έχει αναφερθεί ότι συνήθως οι μικροοργανισμοί που έχουν ακινητοποιηθεί σε μία γέλη παρουσιάζουν ανάπτυξη σε μικρο-αποικίες. Έχει βρεθεί ότι η μορφολογία των κυττάρων σε μία αποικία μπορεί να είναι αξιοσημείωτα διαφορετική σε σχέση με αυτή σε κύτταρα που αναπτύσσονται ελεύθερα. Επιπλέον οι αποικίες αυτές περικλείονται από μία «μεμβράνη» του υλικού [192, 193]. Από την παρατήρηση των οπών που σχηματίζονται στην επιφάνεια του σφαιριδίου φαίνεται πως ασκείται μηχανική πίεση στο υλικό κατά τη διαίρεση των κυττάρων και αυτό προκαλεί τοπική καταστροφή στην πολυμερική μήτρα με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των κυττάρων.



Εικόνα 3.17. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης των σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου με ακινητοποιημένα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* την 5^η πειραματική ημέρα μετά την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό TAP. Εξωτερική (Α) και εσωτερική (Β) επιφάνεια σφαιριδίου 4% αλγινικού από καλλιέργεια μάρτυρα (control), Εσωτερική (Γ) και εξωτερική (Δ) επιφάνεια σφαιριδίου 4% αλγινικού από καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση 4,0 mM φαινόλης. Ε-Ζ: Εξωτερική επιφάνεια σφαιριδίου 4% αλγινικού από καλλιέργεια μάρτυρα (control). Η: Συγκριτική φωτογραφία εσωτερικής και εξωτερικής επιφάνειας σφαιριδίου 6% αλγινικού.

Προφανώς η παραπάνω παρατήρηση εξηγεί το λόγο που στην περίπτωση παρουσίας οξικού οξέος στο μέσο καλλιέργειας καταγράφεται μεγαλύτερη απελευθέρωση των κυττάρων. Στην τελευταία περίπτωση έχουμε έντονο πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε σχέση με τη συνθήκη απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα. Αυτό είναι εμφανές αν συγκριθεί η κατανομή των κυττάρων στην Εικόνα 3.7.B και την Εικόνα 3.13.E με την Εικόνα 3.17.E όπου στην τελευταία παρατηρείται ποιο πυκνή κατανομή εξαιτίας του πολλαπλασιασμού των κυττάρων στο εξωτερικό του σφαιριδίου. Από την ανάλυση των εικόνων προκύπτει και άλλη μία σημαντική παρατήρηση. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων στην επιφάνεια των σφαιριδίων είναι πολύ πιο έντονος σε σχέση με αυτών στο εσωτερικό. Ιδιαίτερα η Εικόνα 3.17.H παρουσιάζει συγκριτικά τη διαφορά στο ίδιο σφαιρίδιο. Το αποτέλεσμα αυτό είναι λογικό και έχει να κάνει σε μεγάλο βαθμό με την ικανότητα διάχυσης των θρεπτικών συστατικών στο εσωτερικό της πολυμερικής μήτρας. Η μήτρα παρεμποδίζει τα θρεπτικά να φτάσουν στον πυρήνα του σφαιριδίου και έτσι τα κύτταρα στο εσωτερικό δεν μπορούν να τα προσλάβουν. Η παραπάνω παρατήρηση έχει παρατηρηθεί βιβλιογραφικά και σε ακινητοποιημένα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* σε σφαιρίδια από άγαρ όπου επιπλέον η μειωμένη ανάπτυξη οφείλεται και σε φαινόμενα σκίασης που δημιουργούν οι σχηματιζόμενες μικρο-αποικίες της επιφάνειας του σφαιριδίου σε κύτταρα του πυρήνα [210]. Αυτό το τελευταίο αποτέλεσμα οδηγεί και στο συμπέρασμα ότι πιθανώς μόνο τα κύτταρα της επιφάνειας των σφαιριδίων βιοαποικοδομούν τη φαινόλη διότι η τελευταία πιθανώς δεν φτάνει στο εσωτερικό. Άρα η ενεργός επιφάνεια των σφαιριδίων περιορίζεται μόνο στο εξωτερικό μέρος τους, γεγονός που εν τέλει γεννάει την ανάγκη ανάπτυξης μεθοδολογίας για την παρασκευή μικρότερου μεγέθους σφαιριδίων μέσω αυτοματοποιημένου συστήματος. Σε αυτό έρχεται να προστεθεί και το γεγονός ότι τελικά ο αριθμός των κυττάρων που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση της φαινόλης είναι μικρότερος σε σχέση με αυτών στις καλλιέργειες με ελεύθερα κύτταρα όσο αφορά τα αποτελέσματα που λήφθηκαν σε συνθήκες απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα. Υπενθυμίζεται ότι τα ακινητοποιημένα κύτταρα κατέγραψαν ίση ή μεγαλύτερη αποικοδόμηση της φαινόλης σε σχέση με τα ελεύθερα. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως η περαιτέρω μελέτη και βελτιστοποίηση των συνθηκών και παραμέτρων ενός συστήματος ακινητοποίησης θα επιφέρει χρήσιμα αποτελέσματα για την εκμετάλλευσή ακινητοποιημένων κυττάρων σε σφαιρίδια αλγινικού σε εφαρμογές βιοαποκατάστασης διότι πρόκειται για ένα οικονομικό υλικό.

3.5 Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα αυτού του κεφαλαίου φαίνεται πως τα ακινητοποιημένα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου είναι σε θέση να αποικοδομήσουν τη φαινόλη εξίσου ή περισσότερο αποτελεσματικά στις περισσότερες περιπτώσεις σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα. Από τις μετρήσεις της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης αποδείχθηκε πως η πολυμερική μήτρα προσέφερε προστασία στα κύτταρα από την επίδραση της φαινόλης. Η απελευθέρωση των κυττάρων υπό την παρουσία φαινόλης στο μέσο καλλιέργειας ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με τις καλλιέργειες μάρτυρες (control). Όταν τα σφαιρίδια τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό μέσο παρουσία οξικού οξέος παρατηρήθηκε έντονη ανάπτυξη των κυττάρων στην εξωτερική επιφάνεια των σφαιριδίων που συνοδεύτηκε από αυξημένη απελευθέρωση των κυττάρων στο διάλυμα εξαιτίας της μηχανικής καταστροφής που προκαλούν στο υλικό κατά τον πολλαπλασιασμό τους. Τα κύτταρα και σε αυτή την τελευταία συνθήκη εμφάνισαν υψηλή αποικοδόμηση της φαινόλης. Επιπλέον σημαντικό πλεονέκτημα ήταν η υψηλότερη μεταβολική δράση κατά την αποικοδόμηση της φαινόλης των ακινητοποιημένων κυττάρων σε σφαιρίδια συγκέντρωσης αλγινικού 6% έναντι της μικρότερης συγκέντρωσης (3%) διότι σε αυτή την περίπτωση καταγράφηκε απελευθέρωση των κυττάρων στο θρεπτικό σε μικρότερο βαθμό γεγονός που καθιστά το σύστημα περισσότερο αποδοτικό και ελεγχόμενο ταυτόχρονα. Επιπλέον τα κύτταρα παρέμειναν ενεργά για ένα συνολικό διάστημα 15 ημερών. Τέλος απ' ότι φαίνεται μόνο τα κύτταρα της εξωτερικής επιφάνειας συμμετέχουν στη διαδικασία αποικοδόμησης της φαινόλης γεγονός που γεννάει την ανάγκη μείωσης του μεγέθους των σφαιριδίων προκειμένου να αυξηθεί η ενεργή επιφάνεια.

Η βιομάζα που είναι ακινητοποιημένη σε πολυμερικές μήτρες μπορεί να συλλεχθεί πιο εύκολα από το σημείο σε περίπτωση εφαρμογής *in situ* βιοαποκατάστασης σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτού του κεφαλαίου προσφέρουν την προοπτική αύξησης του μεγέθους εφαρμογής των ακινητοποιημένων κυττάρων *Chlamydomonas* σε σφαιρίδια αλγινικού από μία κωνική φιάλη σε ένα βιοαντιδραστήρα εργαστηριακών διαστάσεων με σκοπό την περαιτέρω εκμετάλλευσή τους.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΝΟΣ
ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΥΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΟΤΑΜΟ ΓΙΟΦΥΡΟ- ΜΕΛΕΤΗ
ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΠΕΝΑΝΤΙ ΣΕ ΧΗΜΙΚΟΥΣ
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΗΣ
ΦΑΙΝΟΛΗΣ**

4.1 Εισαγωγή

4.1.1. Μικροοργανισμοί από ακραία και υποβαθμισμένα περιβάλλοντα.

Σε εφαρμογές βιοαποκατάστασης είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν τρεις διαφορετικές κατηγορίες μικροοργανισμών: εργαστηριακά στελέχη, γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί ή μικροοργανισμοί της ενδογενούς μικροβιακής κοινότητας. Η τελευταία περίπτωση έχει βρεθεί ότι είναι και η πιο αποτελεσματική. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί που μπορούν και αναπτύσσονται σε ακραίες περιβάλλοντα αναπτύσσουν κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά [211].

Σημαντικό παράδειγμα αποτελεί ένα σύνολο βιβλιογραφικών αναφορών από συναθροίσματα μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σε ακραία και μολυσμένα περιβάλλοντα και χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές βιοαποκατάστασης [212-214]. Μικροοργανισμοί από τα φύλα *Pseudomonaceae* και *Acinetobacteraceae*, προερχόμενοι από μία λίμνη στο Ιράν με υψηλό φαιολικό φορτίο είχαν τη δυνατότητα να αποικοδομούν αποτελεσματικά τη φαινόλη [215]. Βακτήρια που απομονώθηκαν από έδαφος στην περιοχή της ριζόσφαιρας των φυτών στην οποία βρίσκονται φαιολικές ενώσεις που εκκρίνονται από τα φυτά, αποικοδόμησαν τη φαινόλη, χωρίς καμία περίοδο προσαρμογής, ενώ ταυτόχρονα η φαινόλη αποτέλεσε τη μοναδική πηγή άνθρακα στα πειράματα [216]. Αν και η αποτελεσματικότητα των παραπάνω συστημάτων είναι μεγάλη, δεν παύει να εγκυμονεί κινδύνους για τη δημόσια υγεία καθώς μέσα σε αυτές τις μικροβιακές κοινότητες βρίσκονται και παθογόνοι μικροοργανισμοί [217, 218]. Για το λόγο αυτό κρίνεται σημαντική η λεπτομερής μελέτη και γενετικός χαρακτηρισμός των μικροοργανισμών πριν από την εκάστοτε εφαρμογή.

Αντίθετα η χρήση μικροφυκών πλεονεκτεί έναντι των βακτηρίων καθώς η βιομάζα μπορεί να είναι εκμεταλλεύσιμη μετά το πέρας της διαδικασίας βιοαποκατάστασης διότι τα μικροφύκη παράγουν υψηλά ποσά σημαντικών βιομηχανικά προϊόντων όπως είναι χρωστικές, λιπαρά οξέα, υδατάνθρακες και πρωτεΐνες [219]. Πολλοί φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί προκειμένου να επιβιώσουν σε ακραία περιβάλλοντα έχουν την ικανότητα παραγωγής εξωκυττάριων ουσιών όπως κάποιες μήτρες από εξωπολυσακχαρίτες (EPS). Αυτές οι εξωκυττάρια μήτρες περικλείουν τα κύτταρα και τα προστατεύουν κατά τη διάρκεια της διαίρεσης. Επιπλέον χρησιμοποιούνται από τα κύτταρα για να προσκολλώνται

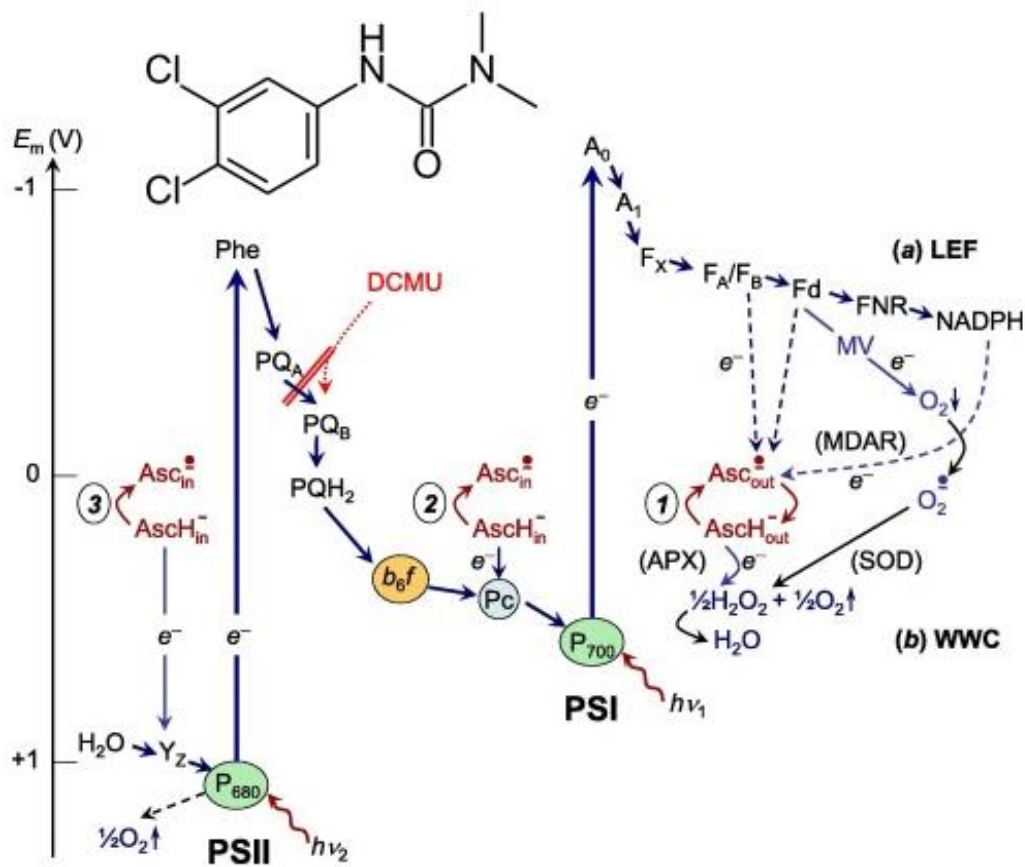
μεταξύ τους ή με άλλους οργανισμούς κατά την αλληλεπίδρασή τους καθώς και για το σχηματισμό βιολογικών υμενίων (biofilms) [220].

Τα μικροφύκη και τα κυανοβακτήρια θεωρούνται μικροοργανισμοί οι οποίοι έχουν αναπτύξει ευέλικτα μεταβολικά μονοπάτια για να μπορούν να προσαρμόζονται σε ακραία περιβάλλοντα είτε αυτό αφορά περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. θερμοκρασία, υψηλή υπεριώδη ακτινοβολία, αλατότητα) είτε αφορά αυξημένες συγκεντρώσεις από ξενοβιοτικές ουσίες. Παράδειγμα αποτελεί το μονοκύτταρο μικροφύκος *Dictyosphaerium chlorelloides* που εμφάνισε αυθόρμητες μεταλλάξεις όταν εκτέθηκε σε σχεδόν θανατηφόρες συγκεντρώσεις του ζιζανιοκτόνου DCMU [221]. Φαίνεται λοιπόν πως η προσαρμογή προκύπτει εξαιτίας αυθόρμητων μεταλλάξεων μέσω της διαδικασίας της φυσικής επιλογής [222, 223]. Δείγματα από φυτοπλαγκτόν που συλλέχθηκαν από ύδατα μολυσμένα από ουράνιο μπορούσαν να επιβιώσουν εξαιτίας αυθόρμητων μεταλλάξεων που εμφάνισαν στο γενετικό τους υλικό [224]. Επιπλέον ένα μείγμα από *Chlorella vulgaris* και *Coenochloris pyrenoidosa* που απομονώθηκαν από μία δεξαμενή όπου απορρίπτονταν απόβλητα φάνηκε να είναι αποτελεσματικό στο να αναπτύσσεται παρουσία παρα-χλωροφαινόλης και να την αποικοδομεί αποτελεσματικά [125]. Επιπλέον το μικροφύκος *Dictyosphaerium chlorelloides* εμφάνισε τυχαίες μεταλλάξεις και είχε την ικανότητα να προσαρμοστεί σε αυξανόμενες ποσότητες 2,4,6-τρινιτροτολουολίου [225]. Αυτό που έχει αναφερθεί σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις προσαρμογής μικροφυκών απέναντι σε ακραίες περιβαλλοντικές αλλαγές είναι ότι τα στελέχη που προκύπτουν από τις τυχαίες μεταλλάξεις εμφανίζουν μειωμένους φωτοσυνθετικούς ρυθμούς και χαμηλή ανάπτυξη [226]. Για όλους τους παραπάνω λόγους φαίνεται πως η μελέτη των φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών που έχουν προσαρμοστεί σε ακραία περιβάλλοντα μπορεί να προσφέρει πολλαπλά οφέλη, από εφαρμογές βιοαποκατάστασης έως και την παραγωγή φυσικών προϊόντων από τη βιομάζα.

4.1.2. Το ζιζανιοκτόνο DCMU

Τα ζιζανιοκτόνα είναι χημικές ενώσεις που δρουν ως αναστολείς της φωτοσύνθεσης, παρεμποδίζοντας την λειτουργία είτε του φωτοσυστήματος II είτε του φωτοσυστήματος I. Οι αναστολείς του φωτοσυστήματος II διακόπτουν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ενώ οι αναστολείς του φωτοσυστήματος I παρεκκλίνουν την πορεία των ηλεκτρονίων προς τους τελικούς αποδέκτες παρέχοντας παρακαμπτήριες πορείες [101].

Η DCMU (3-(3,4-διχλωροφαινυλο)-1,1-διμεθύλο-ουρία) είναι ένα ζιζανιοκτόνο το οποίο δρα ως αναστολέας του φωτοσυστήματος II. Ο μηχανισμός δράσης της βασίζεται στην παρεμπόδιση πρόσδεσης της πλαστοκινόνης στην θέση Q_B της υπομονάδας D1 του φωτοσυστήματος II, εμποδίζοντας έτσι την αναγωγή της σε πλαστοκινόλη και κατ' επέκταση την διακοπή της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων [227]. Η DCMU είναι εμπορικά διαθέσιμη με το όνομα Diuron . Είναι μια χημική ένωση η οποία, έκτος από την χρήση της ως ζιζανιοκτόνο έχει αποτελέσει σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη και κατανόηση της λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

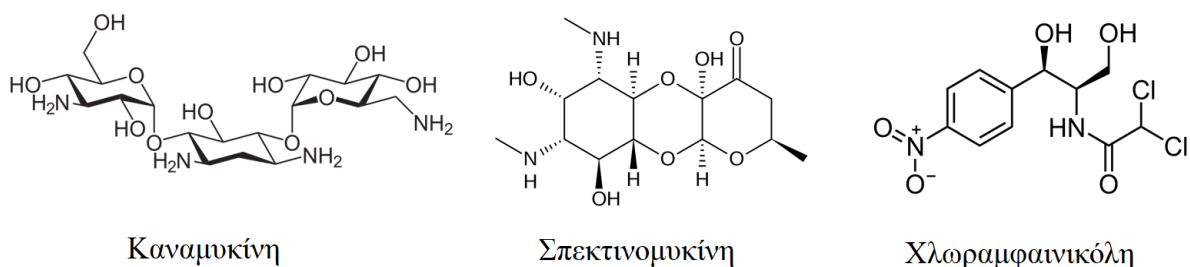


Εικόνα 4.1. Σκελετική δομή της DCMU και σημείο στο οποίο παρεμποδίζει την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων [228].

4.1.3. Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά είναι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία ή την πρόληψη βακτηριακών λοιμώξεων. Η ταξινόμηση των αντιβιοτικών γίνεται με βάση τον μηχανισμό δράσης τους, της χημικής δομής τους ή το φάσμα δράσης τους. Συνήθως, τα αντιβιοτικά δρουν παρεμποδίζοντας διάφορες λειτουργίες των βακτηρίων οδηγώντας τα στον θάνατο ή αναστέλλοντας την ανάπτυξή τους [229]. Μερικές τάξεις αντιβιοτικών στοχεύουν είτε στο κυτταρικό τοίχωμα και την πλασματική μεμβράνη είτε παρεμποδίζουν απαραίτητα ένζυμα (βακτηριοκτόνα). Άλλες τάξεις αντιβιοτικών αναστέλλουν την πρωτεϊνσύνθεση των βακτηρίων (βακτηριοστατικά) [230]. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα αντιβιοτικά καναμυκίνη, σπεκτινομυκίνη και χλωραμφαινικόλη τα οποία είναι αναστολείς της πρωτεϊνσύνθεσης.

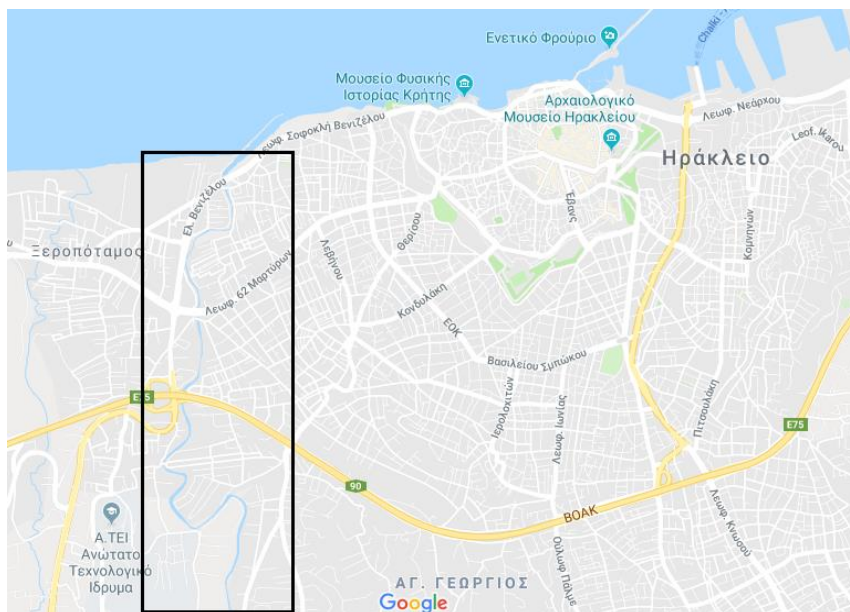
Η καναμυκίνη είναι ένα αντιβιοτικό το οποίο ανήκει στους αμινογλυκοσίδες. Η καναμυκίνη αλληλεπιδρά με τις 16S και 30S υπομονάδες του ριβοσώματος οδηγώντας σε λανθασμένη ανάγνωση των κωδικίων και συνεπώς οι πρωτεΐνες που παράγονται δεν μπορούν να μεταφερθούν στη σωστή τοποθεσία για τη λειτουργία τους [231, 232]. Η σπεκτινομυκίνη είναι ένα υψηλά υδατοδιαλυτό αντιβιοτικό και ανήκει στην κατηγορία των αμινοκυκλιτολών. Ο μηχανισμός δράσης της συμπεριλαμβάνει την δέσμευσή της στην 30S υπομονάδα του ριβοσώματος, παρεμποδίζοντας έτσι την πρωτεϊνσύνθεση [233]. Η χλωραμφαινικόλη είναι ένα αντιβιοτικό το οποίο χρησιμοποιείται για την θεραπεία πληθώρας βακτηριακών λοιμώξεων. Η χλωραμφαινικόλη παρεμποδίζει την επιμήκυνση της πρωτεϊνικής αλυσίδας αναστέλλοντας την δράση της πεπτιδίο-τρανσφεράσης. Συγκεκριμένα προσδένεται σε κατάλοιπα του 23S rRNA της 50S υπομονάδας, παρεμποδίζοντας τον σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού [234, 235].



Εικόνα 4.2. Σκελετικές δομές της καναμυκίνης, σπεκτινομυκίνης και χλωραμφαινικόλης.

4.1.4. Ο Ποταμός Γιόφυρος.

Ο Ποταμός Γιόφυρος πηγάζει από την ένωση διάφορων παραποτάμων που βρίσκονται δυτικά του Ψηλορείτη και διαρρέει τις κοιλάδες της Αγίας Βαρβάρας, Προφήτη Ηλία, Δαφνών και των Μαλάδων αφού ενωθεί με άλλο ένα μεγάλο ρέμα. Ο ποταμός εκβάλλει στα βόρεια του Νομού Ηρακλείου, στο δυτικό τμήμα της πόλης δίπλα από το Παγκρήτιο Στάδιο. Στο σημείο που διασχίζει την πόλη του Ηρακλείου η ροή του ποταμού χαμηλώνει σημαντικά ιδιαίτερα μετά το πέρας της περιόδου των βροχοπτώσεων και αυτό οδηγεί στην ανάπτυξη φαινομένων ευτροφισμού τα οποία οδηγούν σε περιβαλλοντική και αισθητική υποβάθμιση των περιοχών τριγύρω από την κύτη του ποταμού.



Εικόνα 4.3. Τμήμα του Γιόφυρου Ποταμού που διασχίζει δυτικά το Δήμο Ηρακλείου και εκβάλλει στο βορειοδυτικό τμήμα της παραλιακής λεωφόρου της πόλης.

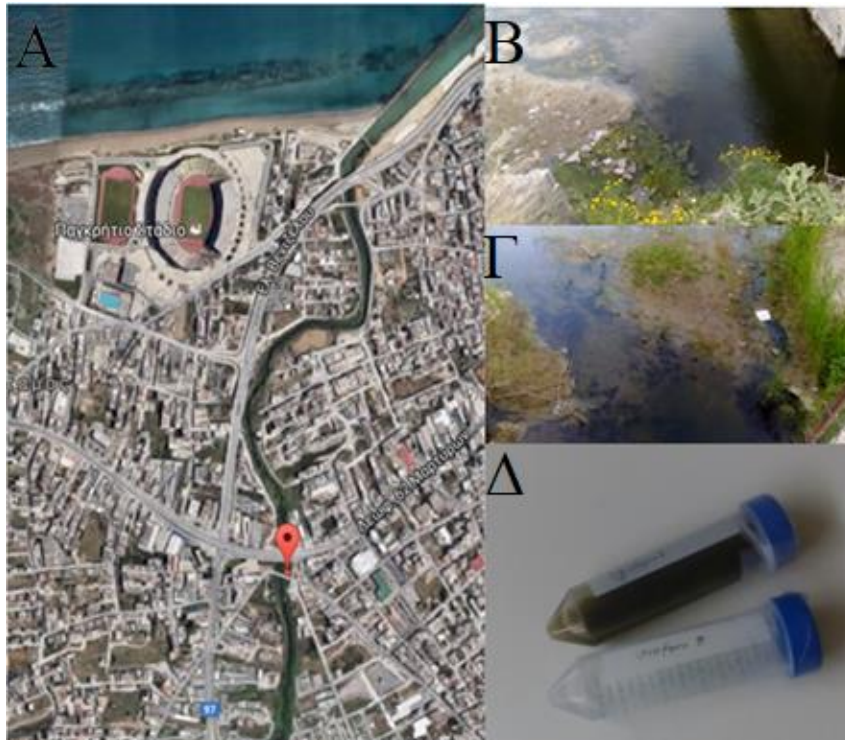
4.2 Σκοπός

Σκοπός αυτής της πειραματικής σειράς ήταν η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός ενός φωτοσυνθετικού μικροοργανισμού από τον Γιόφυρο Ποταμό ο οποίος θα εμφάνιζε ανθεκτικότητα απέναντι σε μία σειρά χημικών αναστολέων όπως η DCMU και τα αντιβιοτικά. Επόμενος στόχος ήταν η μελέτη της ικανότητας του οργανισμού να αναπτύσσεται παρουσία φαινόλης και η μελέτη αποικοδόμησης της ουσίας.

4.3 Πειραματικό μέρος

4.3.1. Δειγματοληψία

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στις 20/4/2016 από το σημείο στη γέφυρα επί της οδού Μεσσαράς. Με χρήση αποστειρωμένων σωλήνων των 50 mL (Falcon tubes, Sarstedt) συλλέχθηκε δείγμα από ένα σημείο όπου είχε δημιουργηθεί ένα επιφανειακό βιολογικό υμένιο (biofilm)-*Γιόφυρο 1*- και δείγμα ύδατος -*Γιόφυρο 2*-. Τα δείγματα αφού σφραγίστηκαν μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο.



Εικόνα 4.4. Α. Εικόνα από δορυφόρο του σημείου δειγματοληψίας, Β,Γ. Σημεία δειγματοληψίας (το σημείο Β αντιστοιχεί στη συνθήκη *Γιόφυρο 1* και το σημείο Γ στη συνθήκη *Γιόφυρο 2*), Δ. Δείγματα που μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο (πράσινο δείγμα *Γιόφυρο 1*, Διαφανές δείγμα *Γιόφυρο 2*).

4.3.2. Διαδικασία απομόνωσης καθαρών αποικιών του φωτοσυνθετικού μικροοργανισμού

Ποσότητα ίση με 50 μ L από κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν στα υγρά θρεπτικά μέσα τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1. Θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μικροοργανισμών από τα δείγματα του ποταμού.

Θρεπτικό μέσο	Γιόφυρο 1	Γιόφυρο 2
TAP	-	+
TAP + 50 ppm σπεκτινομυκίνη	+	+
TAP (Limit C) + 4,00 mM φαινόλη	+	+
TAP (Limit C) + 50 ppm σπεκτινομυκίνη+ 4,00 mM φαινόλη	+	+
Θρεπτικό μέσο BG ₁₁ με αερισμό	-	+
Θρεπτικό μέσο υψηλής συγκέντρωσης αλάτων (HS medium) με αερισμό	-	+

Μέσα σε διάστημα 24 ωρών τα δείγματα από το δείγμα *Γιόφυρο 1* ήταν θολά εξαιτίας της ανάπτυξης μεγάλου βακτηριακού πληθυσμού ο οποίος ήταν προσκολλημένος πάνω στο υμένιο του δείγματος. Το ίδιο συνέβη και για τα δείγματα από το *Γιόφυρο 2* στις συνθήκες οι οποίες δεν περιείχαν αντιβιοτικό ή/και φαινόλη και εν τέλει απορρίφθηκαν. Τα υπόλοιπα δείγματα αφέθηκαν για ανάπτυξη. Έπειτα από διάστημα 15 ημερών είχε παρατηρηθεί ανάπτυξη μικροοργανισμών σε όλες τις περιπτώσεις. Τα θρεπτικά μέσα ήταν θολά με μία πράσινη απόχρωση γεγονός που υποδηλώνει την ταυτόχρονη ανάπτυξη βακτηρίων και φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών. Το λιγότερο θολό αιώρημα ήταν αυτό που είχε αναπτυχθεί στη συνθήκη TAP (Limit C) + 50 ppm σπεκτινομυκίνη+ 4,00 mM φαινόλη, όπου όπως είναι λογικό αναπτύχθηκαν πολύ λιγότερα βακτήρια. Για την απομόνωση καθαρών αποικιών, ποσότητα 50 μ L από το αιώρημα αυτή της συνθήκης μεταφέρθηκαν σε 3 πιατάκια Petri με θρεπτικό μέσο TAP με 1% w/v άγαρ παρουσία 50 ppm σπεκτινομυκίνης. Έπειτα από διάστημα μίας εβδομάδας παρατηρήθηκε ο σχηματισμός διακριτών λευκών και πράσινων αποικιών. Για τον περαιτέρω διαχωρισμό των αποικιών και για να είναι σίγουρο ότι θα απομονωθεί μόνο ο φωτοσυνθετικός μικροοργανισμός απαλλαγμένος από βακτήρια, ανά διάστημα τριών ημερών πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές μεταφορές των πράσινων αποικιών σε πιατάκια petri. Τέλος μερικές αποικίες μεταφέρθηκαν σε πιατάκια petri με θρεπτικό μέσο

TAP με 1% w/v άγαρ και συγκέντρωση φαινόλης ίση με 4,0 mM προκειμένου να αναπτυχθούν οι πιο ανθεκτικοί μικροοργανισμοί. Έπειτα από τρεις διαδοχικές ανακαλλιέργειες, απομονώθηκαν καθαρές αποικίες οι οποίες ελέγχθηκαν με χρήση του οπτικού αναστρόφου μικροσκοπίου Nikon με χρήση αντικειμενικού φακού 40x και ελαιοβυθιζόμενου αντικειμενικού φακού 100x. Η μορφολογία των μικροοργανισμών κάτω από το μικροσκόπιο παρατηρήθηκε ότι ήταν ίδια.

4.3.3. Μελέτη της ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε θρεπτικό μέσο TAP

Καλλιέργεια όγκου 300 mL σε κωνική φιάλη όγκου 500 mL, αρχικής οπτικής πυκνότητας (OD) ίσης με 0,004 τοποθετήθηκε σε ένταση φωτισμού 30-40 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ υπό ήπια και συνεχή ανάδευση με χρήση μαγνητικού αναδευτήρα. Ως ένδειξη της ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας. Για τη μελέτη της ανάπτυξης του μικροοργανισμού λαμβανόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα ποσότητα δείγματος ίση με 1 mL από την καλλιέργεια. Στο δείγμα πραγματοποιούνταν μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 750 nm με χρήση ενός φασματοφωτομέτρου υπεριώδους-ορατού (Shimadzu UV-2700). Όπου ήταν απαραίτητο πραγματοποιούνταν κατάλληλη αραιώση ώστε η απορρόφηση να μην ξεπερνάει την τιμή 1,000.

4.3.4. Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών του μικροοργανισμού.

Για τη μελέτη του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών αρχικά φυγοκεντρίθηκε γνωστή ποσότητα καλλιέργειας. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε ποσότητα 1 mL θερμής μεθανόλης (50°C) και επώαστηκε στους 50°C για 5 λεπτά. Το αιώρημα που προέκυψε υπέστη φυγοκέντριση προκειμένου να απομακρυνθούν τα ιζήματα. Έπειτα ελήφθη φάσμα σε μήκη κύματος 400-700 nm. Ο ποιοτικός χαρακτηρισμός των φωτοσυνθετικών χρωστικών πραγματοποιήθηκε με χρήση χρωματογραφίας χάρτου [236]. Το μεθανολικό εκχύλισμα απλώθηκε σε μία λεπτή γραμμή σε χρωματογραφικό χαρτί κυτταρίνης (Whatman 3MM) σε απόσταση περίπου 1,5 cm από τη βάση του έως ότου η γραμμή αποκτήσει σχετικά έντονο χρώμα. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε με χρήση συστήματος διαλυτών πετρελαϊκού

αιθέρα και ακετόνης σε αναλογία όγκων 9:1. Η ανάπτυξη σταμάτησε όταν ο διαλύτης έφτασε 0,5 cm από την κορυφή του χρωματογραφικού χαρτιού. Μετά το πέρας της διαδικασίας το χαρτί αφέθηκε να στεγνώσει και εν συνεχεία οι ζώνες που είχαν σχηματιστεί αποκόπηκαν και εκχυλίστηκαν με χρήση ακετόνης. Τέλος ελήφθησαν φάσματα στην περιοχή 400-700 nm με χρήση ενός φασματομέτρου υπεριώδους- ορατού (Shimadzu UV-2700).

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φωτοσυνθετικών χρωστικών μετρήθηκε η απορρόφηση του μεθανολικού εκχυλίσματος σε συγκεκριμένα μήκη κύματος (470,0 nm, 646,8 nm και 663,2 nm). Ο υπολογισμός έγινε με βάση γνωστές εξισώσεις από τη βιβλιογραφία οι οποίες παρουσιάζονται παρακάτω [154].

$$C_a (\mu\text{g/ml}) = 16.72 \cdot A_{665.2} - 9.16 \cdot A_{652.4} \quad (\text{Εξίσωση 4.1})$$

$$C_b (\mu\text{g/ml}) = 34.09 \cdot A_{652.4} - 15.28 \cdot A_{665.2} \quad (\text{Εξίσωση 4.2})$$

$$C_{x+c} (\mu\text{g/ml}) = \frac{1000 \cdot A_{470.0} - 1.63 \cdot C_a - 104.96 \cdot C_b}{221} \quad (\text{Εξίσωση 4.3})$$

4.3.5. Μελέτη της μορφολογίας του μικροοργανισμού με χρήση οπτικής μικροσκοπίας

Για την παρατήρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το οπτικό μικροσκόπιο Nikon Eclipse E800. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση ενός ελαιοβυθιζόμενου αντικειμενικού φακού Plan Apo 60x και η λήψη των φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε με χρήση μίας CCD κάμερας ProgRes CF. Για τη μικροσκοπία φθορισμού η διέγερση προκλήθηκε από μια λάμπα UV και χρησιμοποιήθηκε ένα φίλτρο B-2A που επιτρέπει μόνο μήκη κύματος εύρους 450-490 nm να διέλθουν. Η εκπομπή του φθορισμού από τις φωτοσυνθετικές μονάδες του χλωροπλάστη αποτυπώνεται με κόκκινο χρώμα. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε χρώση των κυττάρων με το αντιδραστήριο Lugol (υδατικό διάλυμα 0,125% w/v I₂ και 0,5% w/v KI) για την διαπίστωση τυχόν η ύπαρξη αμύλου. Τέλος πραγματοποιήθηκε χρώση των κυττάρων με τη φθορίζουσα χρωστική Nile red για να διαπιστωθεί τυχόν η ύπαρξη ουδέτερων λιπιδίων μέσω μικροσκοπίας φθορισμού όπως περιγράφεται παραπάνω [237].

4.3.6. Μελέτη της μορφολογίας του μικροοργανισμού με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM).

Για την παρατήρηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, ποσότητα 1 mL καλλιέργειας στο τέλος της εκθετικής φάσης φυγοκεντρίθηκε σε μία φυγόκεντρο *Eppendorf Centrifuge 5412* για 5 λεπτά. Το ίζημα υπέστη δύο δεκάλεπτες πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα διμεθυλαρσινικού νατρίου (sodium cacodylate buffer, SCB) συγκέντρωσης 0,1 M και pH=7,4. Έπειτα μονιμοποιήθηκε με χρήση διαλύματος 2% w/v γλουταραλδεΐδης (GDA) και 2% w/v παραφορμαλδεΐδης (PFA) σε διάλυμα SCB συγκέντρωσης 0,08 M και pH=7,4 για 45 λεπτά. Οι μονιμοποιητές απομακρύνθηκαν με δύο δεκάλεπτες πλύσεις με διάλυμα SCB 0,1 M και pH=7,4. Έπειτα τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε φίλτρο Whatman 0,2 μm και υπέστησαν αφυδάτωση χρησιμοποιώντας διαδοχικές δεκάλεπτες πλύσεις με 30%, 50%, 70%, 90% και 100% αιθανόλη. Κατά τη διάρκεια της κάθε πλύσης τα δείγματα φυλάσσονταν σε θερμοκρασία 4°C. Έπειτα πλύθηκαν με ξηρή αιθανόλη για 10 λεπτά και υπέστησαν ξήρανση με χρήση μίας συσκευής ξήρανσης κρίσιμου σημείου του διοξειδίου του άνθρακα (BAL-TEC, CPD 030 Critical Point Dryer) προκειμένου να αφυδατωθούν πλήρως. Έπειτα τα φίλτρα επικολλήθηκαν σε ύαλο με χρήση αγωγίμης ταινίας άνθρακα (carbon tape) και επικαλύφθηκαν με πάχος 10 nm χρυσό με χρήση ενός Sputter Coater (SCD 050) της BAL-TEC προκειμένου να γίνουν ηλεκτρικά αγωγά. Η παρατήρηση στο SEM πραγματοποιήθηκε σε διαφορά δυναμικού δέσμης ηλεκτρονίων 20 kV. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε και μελέτη των δειγμάτων με χρήση φασματοσκοπίας ακτίνων X με ενεργειακή διασπορά (Energy dispersive X-ray spectroscopy, EDS) η οποία επιτρέπει τη μέτρηση της στοιχειακής σύστασης του δείγματος.

4.3.7. Παρασκευή πειραματικών καλλιεργειών για τη συγκριτική μελέτη της επίδρασης του ζιζανιοκτόνου DCMU και μίας σειράς αντιβιοτικών στην ανάπτυξη του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* και του μικροφύκου που απομονώθηκε από τον ποταμό Γιόφυρο.

Για τη μελέτη επίδρασης της DCMU τα κύτταρα συλλέχθηκαν από τη μητρική καλλιέργεια στο τέλος της εκθετικής φάσης με φυγοκέντριση στα 1000g για 5 λεπτά. Έπειτα επαναιωρήθηκαν στο νέο μέσο καλλιέργειας σε φρέσκο θρεπτικό μέσο TAP και αφού η διαδικασία επαναλήφθηκε δύο επιπλέον φορές κατανεμήθηκαν σε ερμητικά κλειστά γυάλινα μπουκάλια με septa διαμέτρου 5 cm και ύψους 9,5 cm με 100 mL συνολική χωρητικότητα

όγκου. Ο τελικός όγκος καλλιέργειας που προστέθηκε στο μπουκάλι ήταν 50 mL και η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ήταν ίση με 2 μL PCV/ mL καλλιέργειας για τα κύτταρα *Chlamydomonas* και 1 μL PCV/ mL καλλιέργειας για τα κύτταρα από τον ποταμό Γιόφυρο. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε δωμάτιο σταθερής θερμοκρασίας 25 ± 1 °C υπό ένταση φωtonιακής ακτινοβολίας 50-60 μmol φωtonίων· $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Η DCMU προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις εύρους 0,25-2,00 ppm. Η DCMU είχε προηγουμένως διαλυθεί σε μεθανόλη και το διάλυμα υπέστη φιλτράρισμα μέσω ενός φίλτρου σύριγγας 0,2 μm . Η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος ήταν 2500 ppm το οποίο υπέστη τις απαραίτητες αραιώσεις. Το διάλυμα φυλάχθηκε στους 4°C και στο σκοτάδι. Στις μητρικές καλλιέργειες προστέθηκε η αντίστοιχη ποσότητα μεθανόλης. Τέλος τα μπουκάλια τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό αναδευτήρα για διάστημα 3 ημερών και αναδεύονταν κατά τη διάρκεια του πειράματος με συχνότητα 140 min^{-1} . Μετά το πέρας των 3 ημερών τα κύτταρα από κάθε συνθήκη συλλέχθηκαν με φυγοκέντριση και αφού υπέστησαν δύο πλύσεις με θρεπτικό μέσο TAP, επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό μέσο TAP με αρχική κυτταρική συγκέντρωση 2 μL PCV/mL για τα κύτταρα *Chlamydomonas* και 1 μL PCV/ mL καλλιέργειας για τα κύτταρα από τον ποταμό Γιόφυρο και αφέθηκαν να αναπτυχθούν κάτω υπό τις ίδιες συνθήκες για διάστημα τριών ημερών προκειμένου να μελετηθεί η ανάκαμψή τους από την επίδραση της DCMU.

Για τη μελέτη της επίδρασης των αντιβιοτικών πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές πειραματικές σειρές. Σε όλες τα αντιβιοτικά που μελετήθηκαν ήταν αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η επίδραση της σπεκτινομυκίνης, της καναμυκίνης και της χλωραμφαινικόλης. Τα δύο πρώτα ήταν διαλυμένα σε νερό ενώ η χλωραμφαινικόλη σε αιθανόλη. Η αρχική συγκέντρωση ήταν 100 mg/mL για την σπεκτινομυκίνη, 50 mg/mL για την καναμυκίνη και 30 mg/mL για την χλωραμφαινικόλη. Τα αντιβιοτικά προστέθηκαν στο μέσο καλλιέργειας σε τελικές συγκεντρώσεις 50 ppm για τη σπεκτινομυκίνη, 25 ppm για την καναμυκίνη και 15 ppm για τη χλωραμφαινικόλη. Σε πρώτη φάση επαναλήφθηκε η διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω για τη DCMU (για διάστημα τριών ημερών) ώστε να μελετηθεί η επίδραση των αντιβιοτικών σε καλλιέργειες με σχετικά υψηλή αρχική κυτταρική συγκέντρωση (2 μL PCV/mL για τα κύτταρα *Chlamydomonas* και 1 μL PCV/mL για τα κύτταρα από τον ποταμό Γιόφυρο). Έπειτα η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για υγρές καλλιέργειες με μικρή αρχική κυτταρική συγκέντρωση στις ίδιες

συνθήκες με όγκο καλλιέργειας 20 mL οι οποίες αφέθηκαν για ανάπτυξη για διάστημα πέντε ημερών.

4.3.8. Παρασκευή καλλιεργιών για μελέτη αποικοδόμησης της φαινόλης

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν από τη μητρική καλλιέργεια στο τέλος της εκθετικής φάσης με φυγοκέντριση στα 1000g για 5 λεπτά. Έπειτα επαναιωρήθηκαν στο νέο μέσο καλλιέργειας και αφού η διαδικασία επαναλήφθηκε δύο επιπλέον φορές κατανεμήθηκαν σε ερμητικά κλειστά γυάλινα μπουκάλια με septa διαμέτρου 5 cm και ύψους 9,5 cm με 100 mL συνολική χωρητικότητα όγκου. Ο τελικός όγκος καλλιέργειας που προστέθηκε στο μπουκάλι ήταν 50 mL και η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ήταν ίση με 1 μL PCV/ mL καλλιέργειας. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε δωμάτιο σταθερής θερμοκρασίας $25\pm 1^\circ\text{C}$ υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 μmol φωτονίων· $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Η φαινόλη προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2. Η φαινόλη είχε προηγουμένως διαλυθεί σε υπερκάθαρο (nanopure) νερό και το διάλυμα υπέστη φιλτράρισμα μέσω ενός φίλτρου σύριγγας 0,2 μm . Η συγκέντρωση του διαλύματος ήταν 0,5 M. Το διάλυμα φυλάχθηκε στους 4°C και στο σκοτάδι ενώ ανά τακτά χρονικά διαστήματα ανανεωνόταν. Τέλος τα μπουκάλια τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό αναδευτήρα (shaker) για διάστημα 5 ημερών και αναδεύονταν κατά τη διάρκεια του πειράματος με συχνότητα 140 min^{-1} .

Πίνακας 4.2. Συγκεντρώσεις φαινόλης που μελετήθηκαν στις καλλιέργειες *Chlamydomonas*.

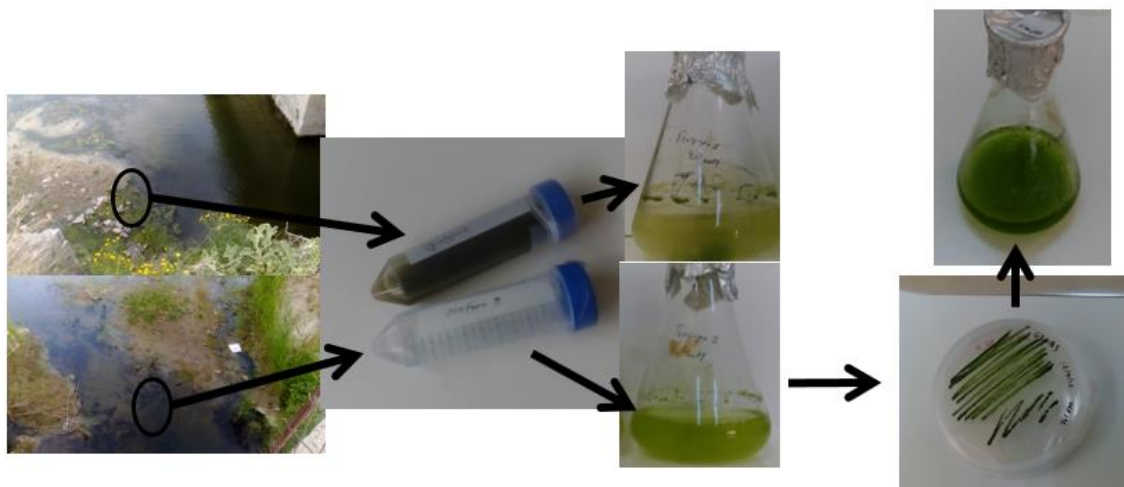
Συγκέντρωση φαινόλης στο θρεπτικό μέσο	
mM	mg/L
0,50	47,1
1,00	94,1
2,00	188,2
3,00	282,3
4,00	376,4

Οι αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα έχουν περιγραφεί στο Κεφάλαιο 2. Πιο συγκεκριμένα οι μετρήσεις ανάπτυξης πραγματοποιήθηκαν με τη μέτρηση του όγκου καθιζαμένων κυττάρων ανά mL καλλιέργειας ($\mu\text{L PCV/mL}$) όπως στην παράγραφο 2.3.2, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού και υπολογισμός των παραμέτρων του JIP-test (παράγραφος 2.3.5), μετρήσεις του φωτοσυνθετικού ρυθμού παραγωγής οξυγόνου, μετρήσεις φωτοσυνθετικών χρωστικών και μετρήσεις απομάκρυνσης της φαινόλης από το μέσο καλλιέργειας με χρήση HPLC (παράγραφος 2.3.7).

4.4 Αποτελέσματα και συζήτηση

4.4.1. Απομόνωση καθαρών αποικιών του μικροοργανισμού από τον Γιόφυρο Ποταμό.

Η διαδικασία απομόνωσης παρουσιάστηκε στην παράγραφο 4.3.2. Η Εικόνα 4.5 δείχνει τα βασικά βήματα από τη στιγμή της δειγματοληψίας μέχρι και την τελική καλλιέργεια του μικροοργανισμού στο εργαστήριο.



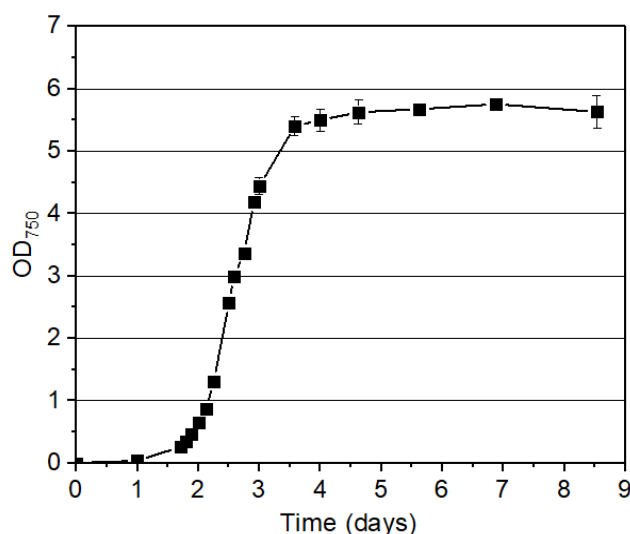
Εικόνα 4.5. Συνοπτικά αναπαράσταση βημάτων απομόνωσης καθαρών αποικιών του μικροοργανισμού από τον ποταμό Γιόφυρο. Το δείγμα από το οποίο απομονώθηκαν οι αποικίες ήταν το *Γιόφυρο 2* (κάτω αριστερά εικόνα).

Όπως φαίνεται από τα διαδοχικά βήματα, στο δείγμα *Γιόφυρο 1* παρουσιάστηκε εξ' αρχής υψηλό βακτηριακό φορτίο το οποίο επιβεβαιώθηκε και από τις παρατηρήσεις στο

οπτικό μικροσκόπιο. Έτσι η διαδικασία απομόνωσης καθαρών αποικιών συνεχίστηκε μόνο για το δείγμα *Γιόφυρο 2*. Η Εικόνα 4.5 δείχνει στο τέλος την καθαρή καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε θρεπτικό TAP με παρουσία 50 ppm σπεκτινομυκίνης και την υγρή προκαλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο TAP όπως αναλύθηκε στην παράγραφο 4.3.2.

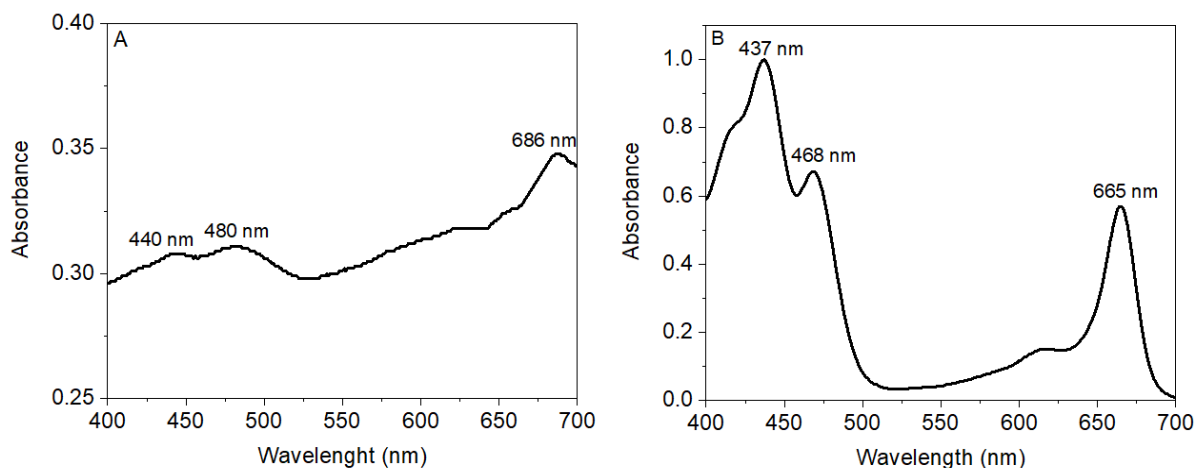
4.4.2. Χαρακτηρισμός του φωτοσυνθετικού μικροοργανισμού

Η ενδεικτική καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού με μέτρηση οπτικής πυκνότητας σε θρεπτικό μέσο TAP σε ένταση φωτισμού $30-40 \mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.6. Από την καμπύλη φαίνονται οι διακριτές φάσεις ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Πιο συγκεκριμένα η λανθάνουσα φάση έχει διάρκεια 40 ώρες. Έπειτα η καλλιέργεια εισέρχεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης η οποία διαρκεί περίπου 45 ώρες και έκτοτε ως το τέλος των μετρήσεων τα κύτταρα παραμένουν στη στατική φάση. Από την καμπύλη ανάπτυξης φαίνεται πως ο μικροοργανισμός μπορεί και αναπτύσσεται με ταχείς ρυθμούς στο θρεπτικό μέσο TAP ακόμα και κάτω υπό συνθήκες χαμηλού φωτισμού.



Εικόνα 4.6. Μεταβολή της οπτικής πυκνότητας στα 750 nm καλλιεργειών του μικροοργανισμού που απομονώθηκε από τον Γιόφυρο Ποταμό σε θρεπτικό μέσο TAP με αρχική οπτική πυκνότητα ίση με 0,004 και ένταση φωτισμού $30-40 \mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

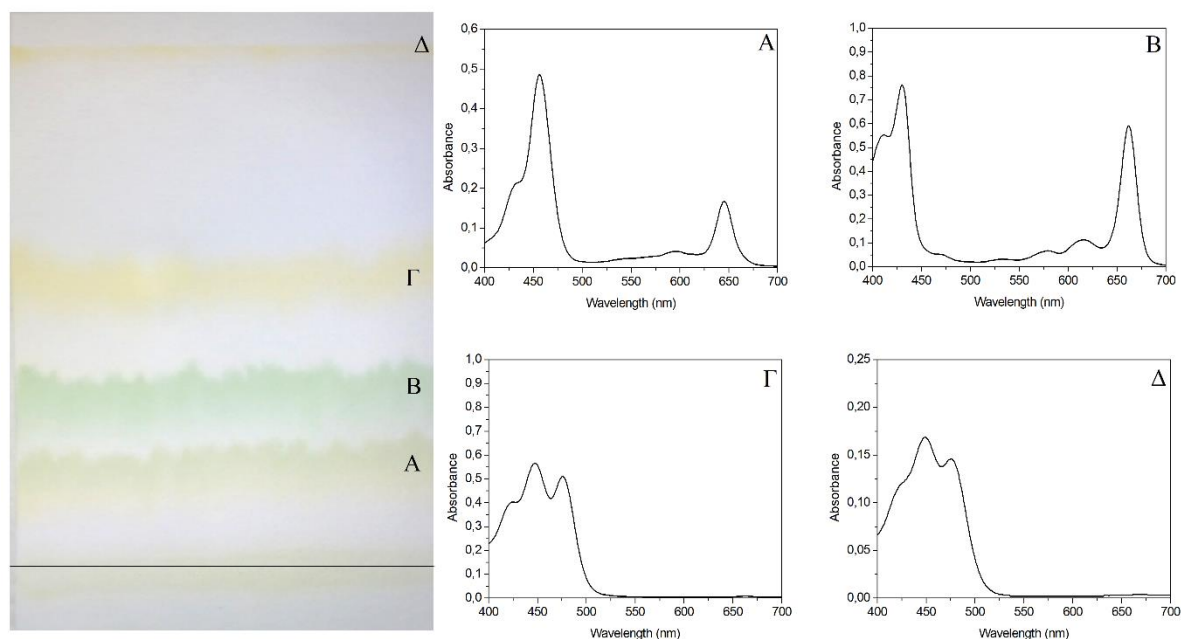
Από τα φάσματα στην περιοχή του ορατού των ολικών κυττάρων και του μεθανολικού εκχυλίσματος φαίνεται πως οι κυρίαρχες χρωστικές είναι οι χλωροφύλλες λόγω των χαρακτηριστικών απορροφήσεων που εμφανίζονται.



Εικόνα 4.7. Φάσμα στην περιοχή του ορατού (A) αιωρήματος ολόκληρων κυττάρων και (B) μεθανολικού εκχυλίσματος κυττάρων.

Στα φάσματα διακρίνονται χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν στις χλωροφύλλες-a και b τις κορυφές Soret που εμφανίζονται στην περιοχή μηκών κύματος του κυανού (440 και 480 nm για τα ολόκληρα κύτταρα και 437 και 468 nm για το μεθανολικό εκχύλισμα) καθώς και τις ταινίες Q (686 nm για τα ολόκληρα κύτταρα και 665 nm για το μεθανολικό εκχύλισμα) [238]. Το φάσμα των ολόκληρων κυττάρων δεν έχει μεγάλη διακριτική ικανότητα γεγονός που είναι λογικό αν αναλογιστούμε τον όγκο που καταλαμβάνουν τα ολόκληρα κύτταρα και τα φαινόμενα σκέδασης τα οποία πιθανώς δημιουργούν στη διερχόμενη ακτινοβολία. Παρόλα αυτά λαμβάνεται μία πολύ σημαντική πληροφορία η οποία έχει να κάνει με την έλλειψη της φυκοκυανίνης. Σε φάσματα από ολόκληρα κύτταρα *Synechocystis*, το οποίο είναι ένα κυανοβακτήριο, εμφανίζεται μία επιπλέον κορυφή στα 630 nm περίπου η οποία αντιστοιχεί στη φυκοκυανίνη [239]. Η φυκοκυανίνη είναι ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών και χρωστικών που συναντάται στα κυανοβακτήρια και τους προσδίδει το μπλε χρώμα. Επιπλέον από το μεθανολικό εκχύλισμα φαίνεται και η ύπαρξη χλωροφύλλης-b η οποία δεν εντοπίζεται στα κυανοβακτήρια [240, 241]. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι κατά την εκχύλιση με τη μεθανόλη το ίζημα που προέκυψε είναι λευκό. Αντίθετα όταν η ίδια επεξεργασία πραγματοποιείται στα κυανοβακτήρια το ίζημα που παραμένει μετά από την εκχύλιση των χρωστικών με μεθανόλη είναι κυανό λόγω της ύπαρξης φυκοκυανίνης. Επίσης το συνολικό μεθανολικό εκχύλισμα περιέχει τόσο κορυφές χαρακτηριστικές για τη χλωροφύλλη a όσο και για τη χλωροφύλλη b.

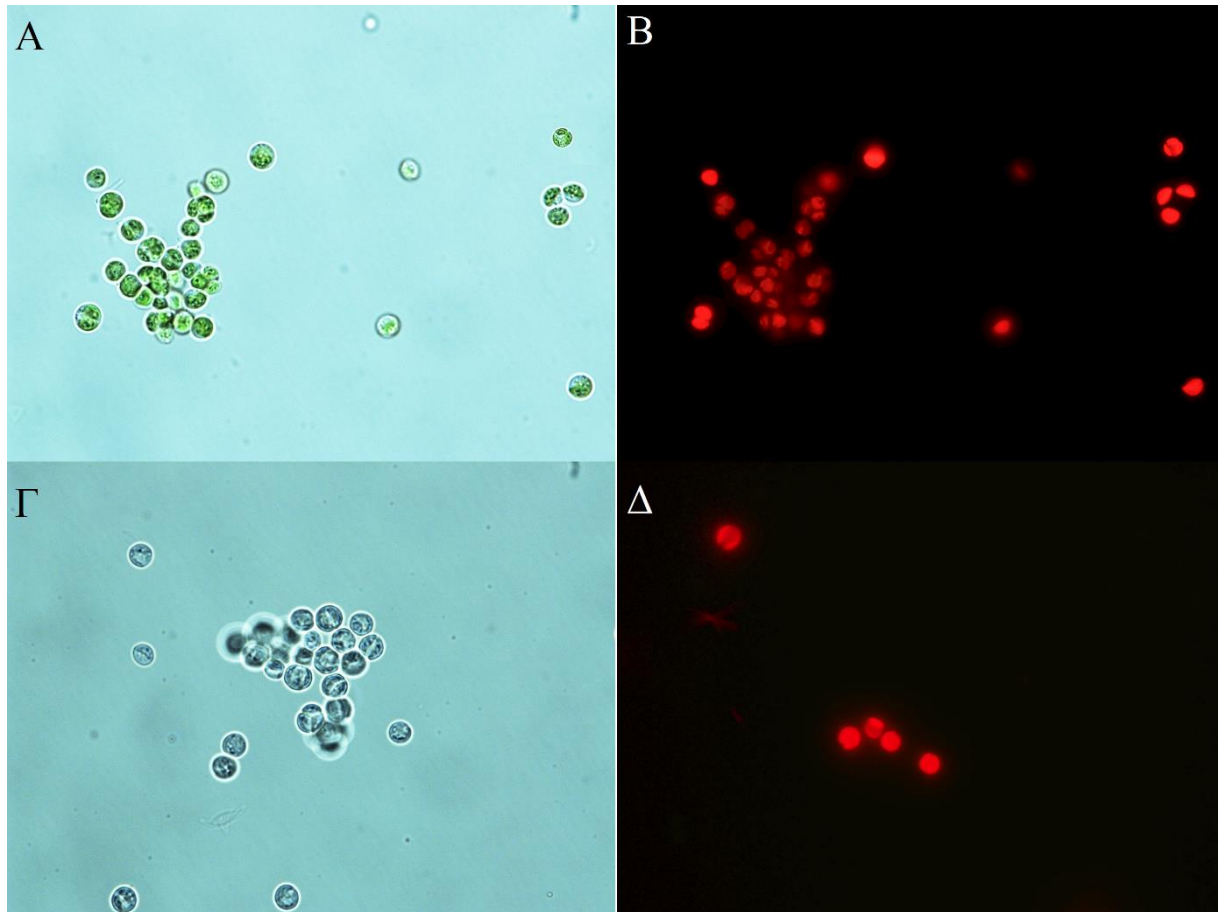
Για την περισσότερο λεπτομερή ανάλυση των φωτοσυνθετικών χρωστικών πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των χρωστικών με χρήση παρασκευαστικής χρωματογραφίας χάρτου όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.2.4. Από το διαχωρισμό των χρωστικών προέκυψαν τέσσερις διακριτές ζώνες.



Εικόνα 4.8. Διαχωρισμός χρωστικών μεθανολικού εκχυλίσματος με χρωματογραφία χάρτου με στατική φάση κυτταρίνης και κινητή φάση πετρελαϊκό αιθέρα: ακετόνη (9:1). Αριστερά παρουσιάζονται οι τέσσερις διακριτές ζώνες. Με μαύρη γραμμή δίνεται το σημείο της γραμμής εκκίνησης. Το μέτωπο του διαλύτη έφτασε στο ύψος της ζώνης Δ. Δεξιά παρουσιάζονται τα φάσματα στην περιοχή 400-700 nm των τεσσάρων ζωνών. Α) χλωροφύλλη-b, Β) χλωροφύλλη-a, Γ) Ξανθοφύλλες, Δ) Καροτένια. Οι χρωστικές από το χαρτί εκχυλίστηκαν σε ακετόνη.

Οι ζώνες Α και Β αντιστοιχούν σε χλωροφύλλες και οι ζώνες Γ και Δ αντιστοιχούν σε καροτενοειδή όπως φαίνεται τόσο από το χρώμα τους όσο και από τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά τους. Οι χλωροφύλλες (φάσματα Α και Β) εμφανίζουν τη χαρακτηριστική Soret κορυφή στην περιοχή του κυανού και τις ταινίες Q. Εμφανίζουν χαρακτηριστικές απορροφήσεις στις περιοχές του κυανού και του ερυθρού. Επιπλέον είναι περισσότερο πολικές από τα καροτενοειδή και είναι λογικό να συγκρατούνται από τη στατική φάση σε χαμηλά R_f . Επίσης τα καροτενοειδή εμφανίζουν χαρακτηριστικές απορροφήσεις σε μήκη

κύματος 350-500 nm [236]. Από το περιεχόμενο των φωτοσυνθετικών χρωστικών φαίνεται πως ο μικροοργανισμός εντάσσεται στα πράσινα μικροφύκη. Για την περαιτέρω επιβεβαίωση αυτών των παρατηρήσεων πραγματοποιήθηκαν μελέτες οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.

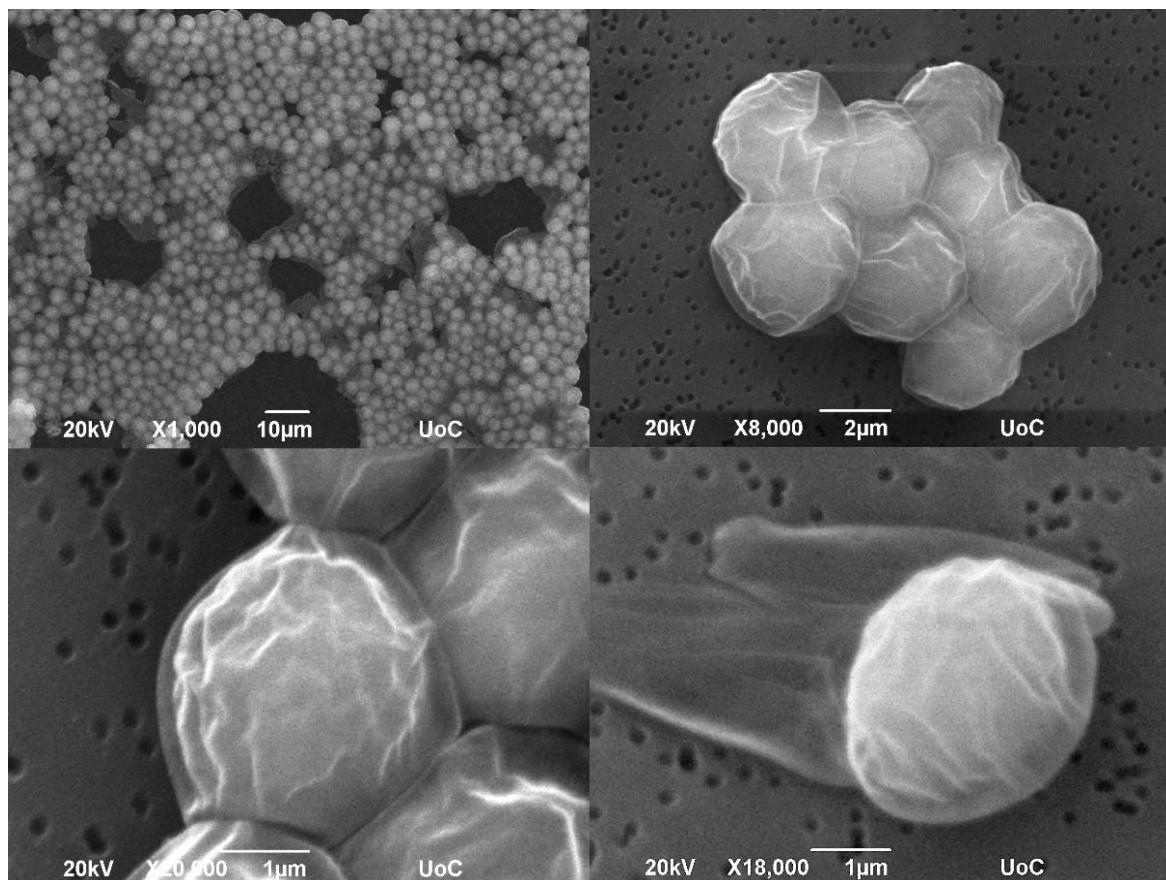


Εικόνα 4.9. Φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο και μικροσκόπιο φθορισμού των κυττάρων από τον ποταμό Γιόφυρο. Α. Άθικτα κύτταρα από την καλλιέργεια έπειτα από 48 ώρες ανάπτυξης, Β. Φθορισμός των χλωροφυλλών από άθικτα κύτταρα έπειτα από 48 ώρες ανάπτυξης, Γ. Χρώση των κυττάρων με το αντιδραστήριο Lugol's, Δ. Χρώση των κυττάρων με τη χρωστική Nile red και παρατήρησή τους κάτω από μικροσκόπιο φθορισμού.

Από τα αποτελέσματα της οπτικής μικροσκοπίας και μικροσκοπίας φθορισμού φαίνεται η παρουσία ενός μεγάλου κυπελλοειδούς χλωροπλάστη στα κύτταρα. Επιπλέον στις εικόνες από το οπτικό μικροσκόπιο φαίνεται η παρουσία μίας λευκής εξωκυττάριας μήτρας. Από τις χρώσεις με τα αντιδραστήρια Lugol's και Nile red η μήτρα αυτή δεν αποτελείται από άμυλο ή λιπίδια. Το άμυλο χρωματίζεται μπλε από το αντιδραστήριο Lugol's και τα λιπίδια

εκπέμπουν φθορισμό κίτρινου ή κόκκινου χρώματος ανάλογα με τη φύση τους (πολικά ή ουδέτερα). Επίσης από τις Εικόνες 4.9.A και 4.9.B φαίνεται και ο σχηματισμός ζυγοσπορίων κατά τη διαίρεση των κυττάρων (πάνω δεξιά μέρος της εικόνας) όπου φαίνεται ο διαχωρισμός του γλωροπλάστη κατά τη διαίρεση.

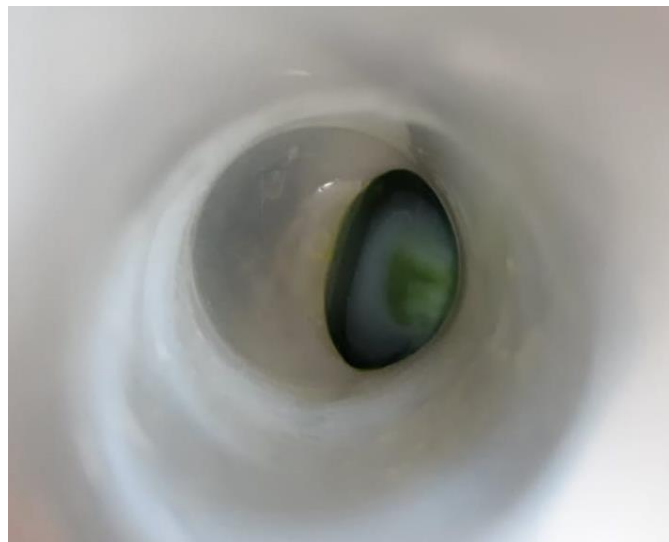
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρουσία αυτής της εξωκυττάριας μήτρας γύρω από τα κύτταρα η οποία φαίνεται καθαρά στις φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.



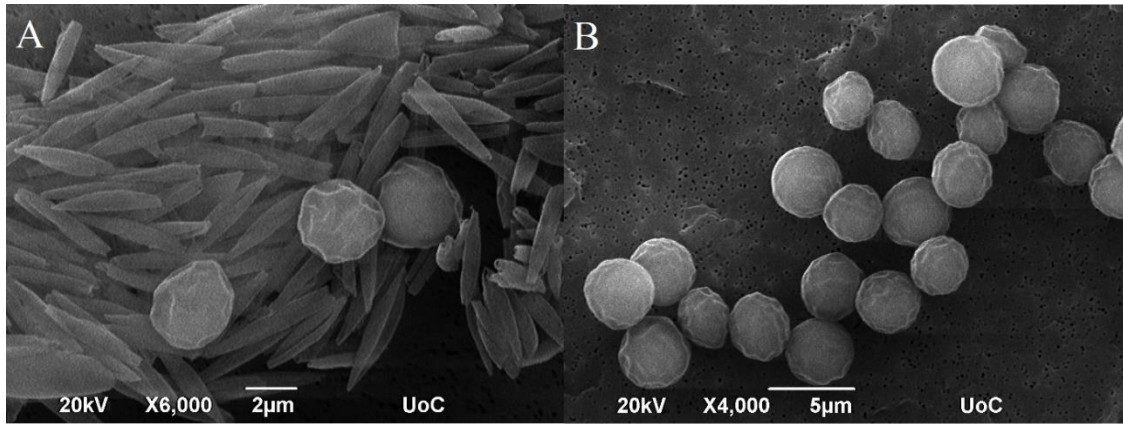
Εικόνα 4.10. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) των κυττάρων από τον ποταμό Γιόφυρο.

Η μήτρα μάλιστα μπορεί να διαχωριστεί μερικώς από τα κύτταρα μηχανικά με μία απλή φυγοκέντριση εφόσον τα κύτταρα εκπλυθούν αρχικά με απλό νερό όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.10. Ο διαχωρισμός αυτός είναι εμφανής και στις φωτογραφίες από το ηλεκτρονικό

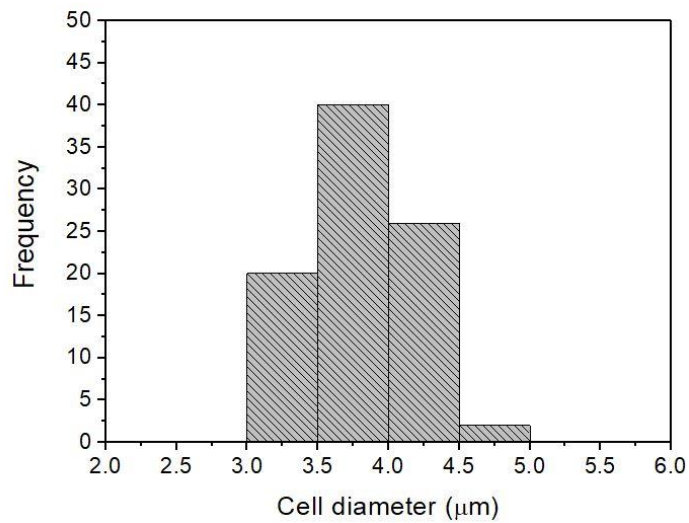
μικροσκόπιο σάρωσης (Εικόνα 4.12). Η κατανομή των μεγεθών των κυττάρων φαίνεται στην Εικόνα 4.12. Από τις μετρήσεις φαίνεται πως η μέση διάμετρος των κυττάρων είναι $3,81 \pm 0,37 \mu\text{m}$. Από τα μέχρι τώρα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά που παρουσιάστηκαν για το μικροοργανισμό φαίνεται πως είναι ένα μικροφύκος. Το γεγονός ότι διαθέτει ένα κυπελλοειδή γλωροπλάστη, σχηματίζει ζυγospόρια κατά τη διαίρεσή του αλλά και η εξωτερική μορφολογία των κυττάρων το πιθανώς το κατατάσσουν στο γένος *Chlorella* όπως μπορεί να συγκριθεί με δεδομένα που έχουν παρουσιαστεί προηγουμένως στη βιβλιογραφία [242-249]. Αυτή τη στιγμή πραγματοποιείται περαιτέρω ανάλυση της φυσιολογίας του μικροοργανισμού από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας και έχουν ληφθεί φωτογραφίες από τομές του μικροοργανισμού με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (TEM).



Εικόνα 4.11. Φωτογραφία του ιζήματος έπειτα από φυγοκέντριση κυττάρων του μικροφύκους που απομονώθηκε από τον ποταμό Γιόφυρο. Φαίνεται ο διαχωρισμός των κυττάρων (πράσινο ίζημα) με την εξωκυττάρια μήτρα (λευκό ίζημα).



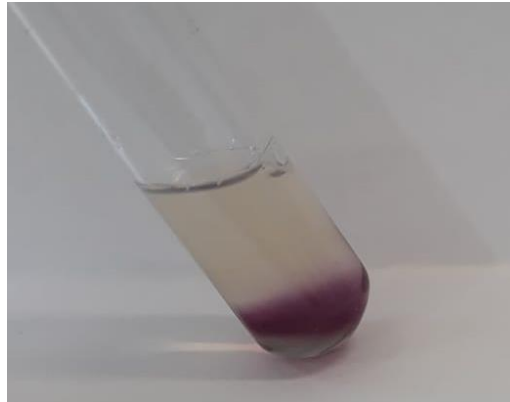
Εικόνα 4.12. Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης του ιζήματος της εικόνας 4.10. Α. Λευκό μέρος του ιζήματος, Β. Πράσινο μέρος του ιζήματος.



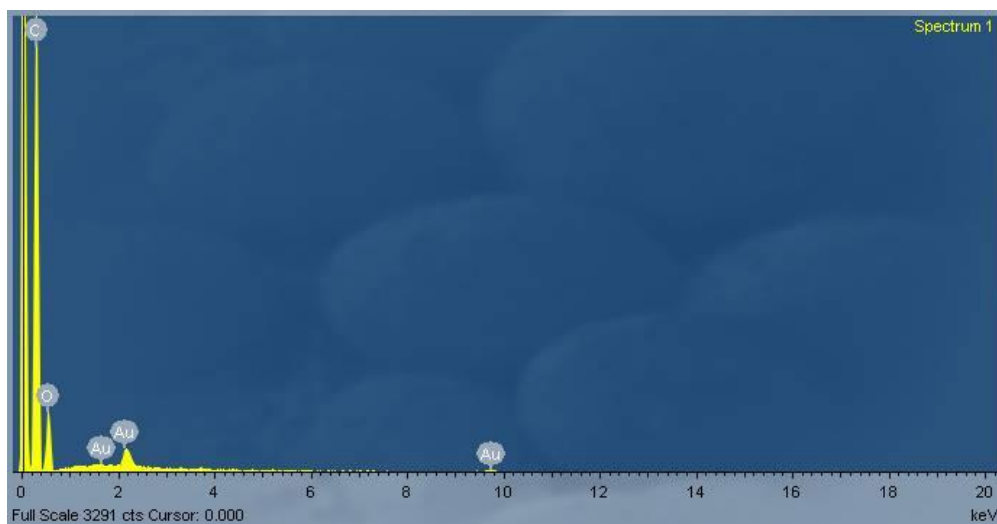
Εικόνα 4.13. Κατανομή των διαμέτρων των κυττάρων που απομονώθηκαν από τον ποταμό Γιόφυρο. Η μέση διάμετρος βρέθηκε να είναι $3,81 \pm 0,37 \mu\text{m}$.

Όσο αφορά την εξωκυττάρια μήτρα, όπως φάνηκε από τις φωτογραφίες του οπτικού μικροσκοπίου με τις χρώσεις, αυτή δεν αποτελείται ούτε από άμυλο ούτε είναι λιπιδικής φύσεως. Για το λόγο αυτό διαχωρίστηκε από τα κύτταρα και υπεβλήθη στην ανίχνευση με τη

μέθοδο Molisch για την εύρεση της παρουσίας σακχάρων. Το συγκεκριμένο τεστ βασίζεται αρχικά στην υδρόλυση του πολυμερούς με χρήση θειϊκού οξέος και τη μετατροπή των υδατανθράκων σε παράγωγα φουρφουράλης. Τα παράγωγα αυτά αντιδρούν με το δακτύλιο της α-ναφθόλης για να σχηματίσουν ένα ιώδους χρώματος σύμπλοκο [250]. Το τεστ έδωσε θετικό αποτέλεσμα λόγω του σχηματισμού του χαρακτηριστικού ιώδους δακτυλίου. Υπάρχουν ενδείξεις ότι αυτή η μήτρα αποτελείται κυρίως από πολυσακχαρίτες. Εδώ πρέπει να αναφερθεί το γεγονός ότι ακόμα και οι γλυκοπρωτεΐνες δίνουν θετικό αποτέλεσμα στη μέθοδο αυτή. Επιπλέον από τη στοιχειακή ανάλυση του φάσματος EDS της εξωκυττάριας μήτρας, αυτή φαίνεται να αποτελείται από άνθρακα και οξυγόνο. Ο χρυσός που εμφανίζεται είναι από την επικάλυψη του δείγματος για να γίνει ηλεκτρικά αγωγίμο κατά την προετοιμασία του. Τα αποτελέσματα παρέχουν αρχικές ενδείξεις για την ύπαρξη μιας μήτρας εξωπολυσακχαρίτη που περιβάλλει τα κύτταρα. Παρόλα αυτά οι ενδείξεις αυτές δεν αποτελούν συμπέρασμα. Για το λόγο αυτό διεξάγονται περαιτέρω μελέτες από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου για το λεπτομερή χαρακτηρισμό της δομής αυτής της εξωκυττάριας μήτρας.



Εικόνα 4.14. Θετικό αποτέλεσμα της μεθόδου Molisch για την ποιοτική ανίχνευση ύπαρξης υδατανθράκων στην εξωκυττάρια μήτρα των κυττάρων από τον ποταμό Γιόφυρο.



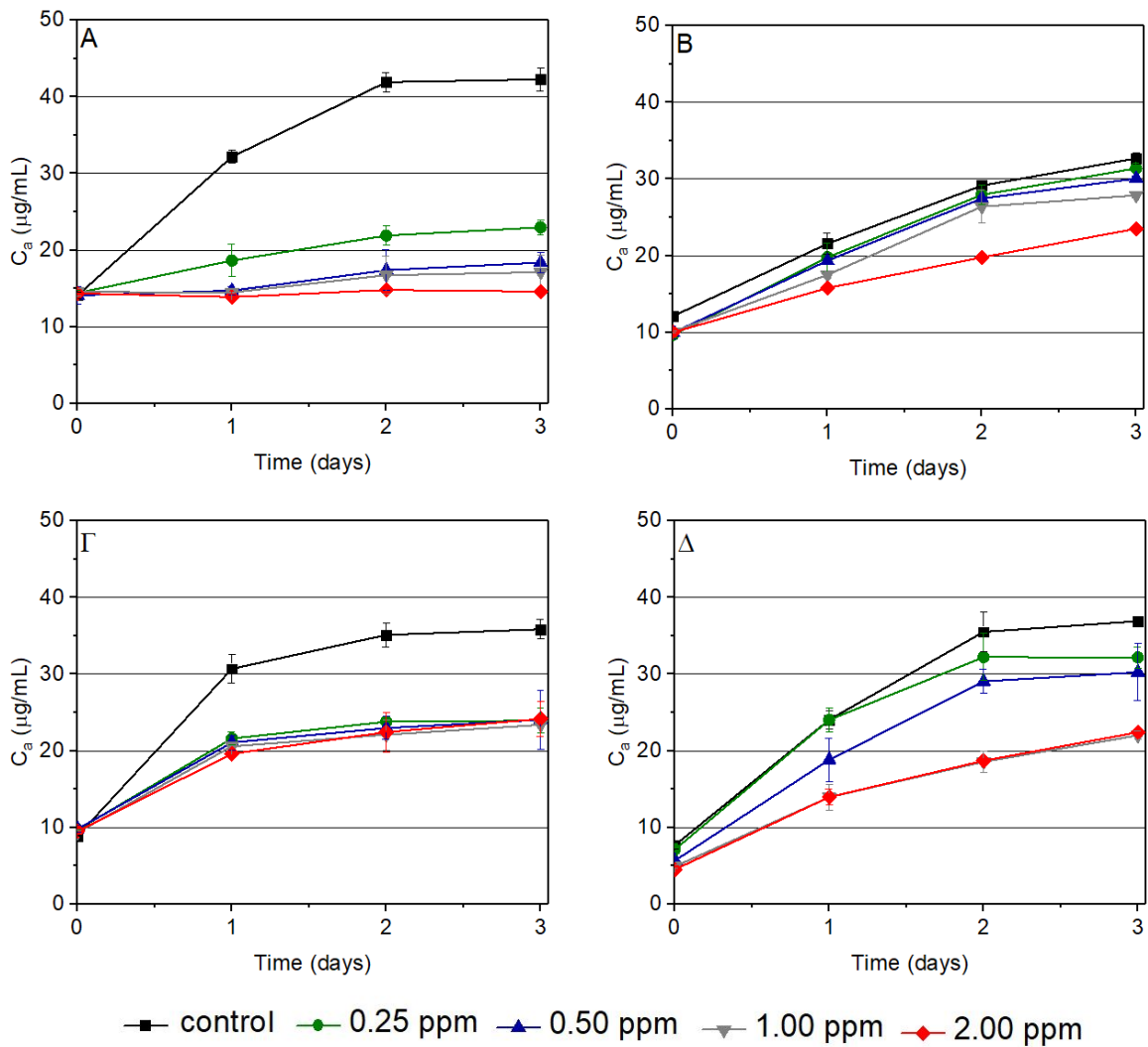
Εικόνα 4.15. Φάσμα EDS της εξωκυττάριας μήτρας όπως διαχωρίστηκε κατά τη φυγοκέντριση.

Οι μήτρες εξωπολυσακχαριτών δεν είναι κάτι νέο φυσικά. Τα μικροφύκη τα οποία ζουν σε επιβαρυσμένα περιβάλλοντα έχουν την ικανότητα να απελευθερώνουν αυτές τις ουσίες. Σε παραδείγματα στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι αυτές οι εξωκυττάρια μήτρες περιέχουν κυρίως υδατάνθρακες και πρωτεΐνες ενώ δεν περιέχουν λιπίδια. Παραδείγματα για τη σύστασή τους έχουν ανασκοπηθεί στη βιβλιογραφία [251]. Έχει αναφερθεί η σημασία τους στον κύκλο του άνθρακα στα οικοσυστήματα, τη μικροβιακή ποικιλότητα, την προώθηση της ανάπτυξης βακτηρίων τα οποία απελευθερώνουν χρήσιμες ανόργανες ενώσεις για τα μικροφύκη όπως επίσης και το σχηματισμό συμπλόκων με ιόντα τα οποία μπορεί να είναι επικίνδυνα για τα οικοσυστήματα [252-254]. Επίσης τα κύτταρα παράγουν υψηλές ποσότητες εξωπολυσακχαριτών σε συνθήκες οι οποίες δεν είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξή τους για την προστασία του κυττάρου [220, 255]. Η παραγωγή τους είναι πολλές φορές αποτέλεσμα αντίδρασης σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες όπως θερμοκρασία, πίεση και υψηλή ένταση φωτός [256]. Τα πολυμερή αυτά μπορούν είτε να βρεθούν ελεύθερα μέσα στο διάλυμα είτε σαν μία επιπλέον στοιβάδα γύρω από το κυτταρικό τοίχωμα [257]. Στην παρούσα διατριβή το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στη μελέτη της που προσφέρει αυτή η εξωκυττάρια μήτρα στα κύτταρα απέναντι σε χημικούς αναστολείς όπως είναι το ζιζανιοκτόνο DCMU και τα αντιβιοτικά. Επιπλέον στόχος της διατριβής ήταν η μελέτη αποικοδόμησης της φαινόλης από το μικροφύκος αυτό.

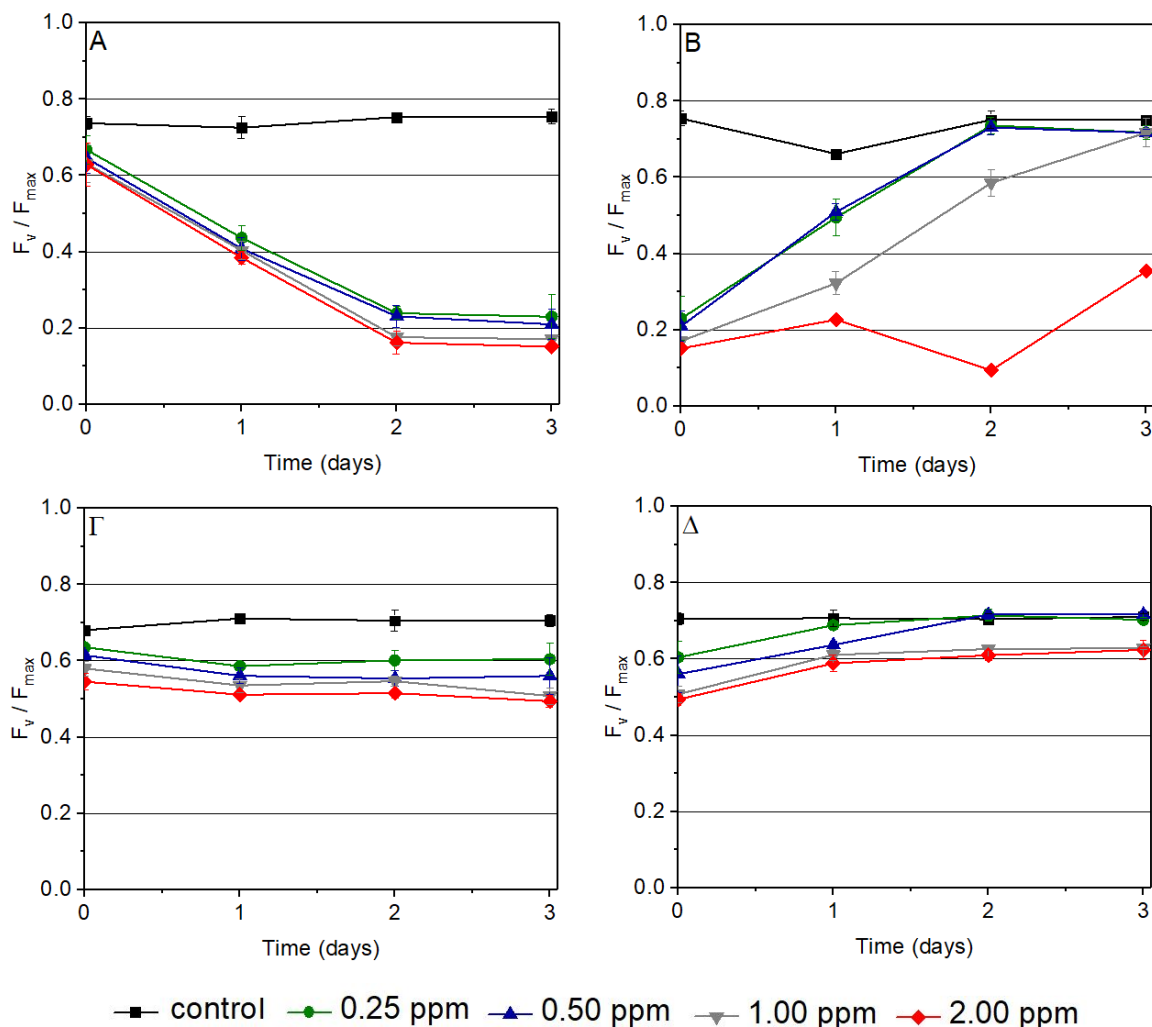
4.4.3. Μελέτη της επίδρασης της DCMU και μίας σειράς αντιβιοτικών στην ανάπτυξη του μικροφύκου από τον ποταμό Γιόφυρο συγκριτικά με το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*.

Η DCMU είναι ένας αναστολέας ο οποίος προσδένεται ανταγωνιστικά ως προς την πλαστοκινόνη στη D1 υπομονάδα του φωτοσυστήματος II και εμποδίζει την αναγωγή της σε πλαστοκινόλη. Στην παρούσα πειραματική σειρά μελετήθηκε η συγκριτική επίδραση της DCMU στο εργαστηριακό στέλεχος *Chlamydomonas reinhardtii* και στο μικροφύκος που απομονώθηκε από τον ποταμό Γιόφυρο. Ως δείκτης της ανάπτυξης μετρήθηκε η συγκέντρωση της χλωροφύλλης-*a*. Επιπλέον υπολογίστηκε και η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση των κυττάρων. Καλλιέργειες κυττάρων *Chlamydomonas* αρχικής συγκέντρωσης 2 μL PCV/mL και κυττάρων από τον ποταμό Γιόφυρο αρχικής συγκέντρωσης 1 μL PCV/mL αφήθηκαν να αναπτυχθούν για διάστημα τριών ημερών σε ένα εύρος συγκεντρώσεων του αναστολέα από 0,25- 2,00 ppm. Οι συγκεντρώσεις αυτές είναι συγκριτικά πολύ υψηλότερες από αυτές που έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες. Για παράδειγμα σε κύτταρα του γένους *Chlorella* έχει βρεθεί ότι η ποσότητα που αναστέλλει την ανάπτυξη κυμαίνεται μεταξύ 0,0043 και 0,142 ppm [258, 259], σε κύτταρα *Scenedesmus* κυμαίνεται μεταξύ 0,0019 και 0,005 ppm [260], στο μικροφύκος *Raphidocelis subcapitata* έχει βρεθεί να είναι 0,00963 ppm [261] ενώ σε μικροφύκη αλμυρών υδάτων είναι περίπου 0,004 ppm [262]. Όσο αφορά το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* η αντίστοιχη ποσότητα έχει βρεθεί να είναι 0,14 ppm για την ανάπτυξη και 0,093 ppm για τη φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου [263].

Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως οι καλλιέργειες του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* εμφανίζουν ανάπτυξη μικρότερη από την καλλιέργεια μάρτυρα, όπως είναι αναμενόμενο μιας και οι συγκεντρώσεις της DCMU που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι πολύ υψηλότερες από τις τιμές IC_{50} που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Σε καμία περίπτωση δεν καταγράφηκε εκθετική φάση ανάπτυξης ενώ μάλιστα στη μέγιστη συγκέντρωση DCMU τα κύτταρα παραμένουν στη λανθάνουσα φάση.



Εικόνα 4.16. Μεταβολή της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης-α στο μέσο καλλιέργειας σε καλλιέργειες *Chlamydomonas reinhardtii* (A,B) και κυττάρων από τον ποταμό Γιόφυρο (Γ και Δ) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50-60 \mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ υπό την παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων DCMU. Οι καμπύλες A και Γ παρουσιάζουν την μεταβολή της συγκέντρωσης σε καλλιέργειες οι οποίες βρίσκονται υπό την έκθεση του αναστολέα ενώ οι καμπύλες B και Δ καλλιέργειες οι οποίες έχουν επαναιωρηθεί σε θρεπτικό μέσο TAP έπειτα από αρχική έκθεση τριών ημερών και έχουν αφεθεί να ανακάμψουν.

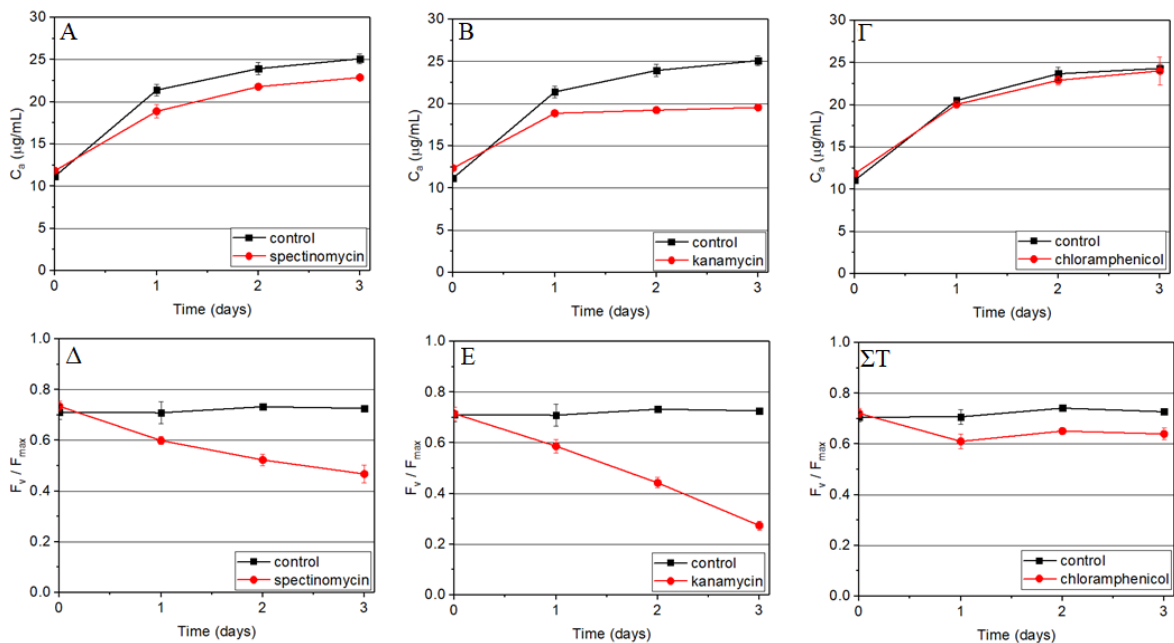


Εικόνα 4.17. Μεταβολή της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* (A,B) και κυττάρων από τον ποταμό Γιόφυρο (Γ και Δ) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50-60 \mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ υπό την παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων DCMU. Οι καμπύλες A και Γ παρουσιάζουν την μεταβολή της παραμέτρου σε καλλιέργειες οι οποίες βρίσκονται υπό την έκθεση του αναστολέα ενώ οι καμπύλες B και Δ καλλιέργειες οι οποίες έχουν επαναιωρηθεί σε θρεπτικό μέσο TAP έπειτα από αρχική έκθεση τριών ημερών και έχουν αφεθεί να ανακάμψουν.

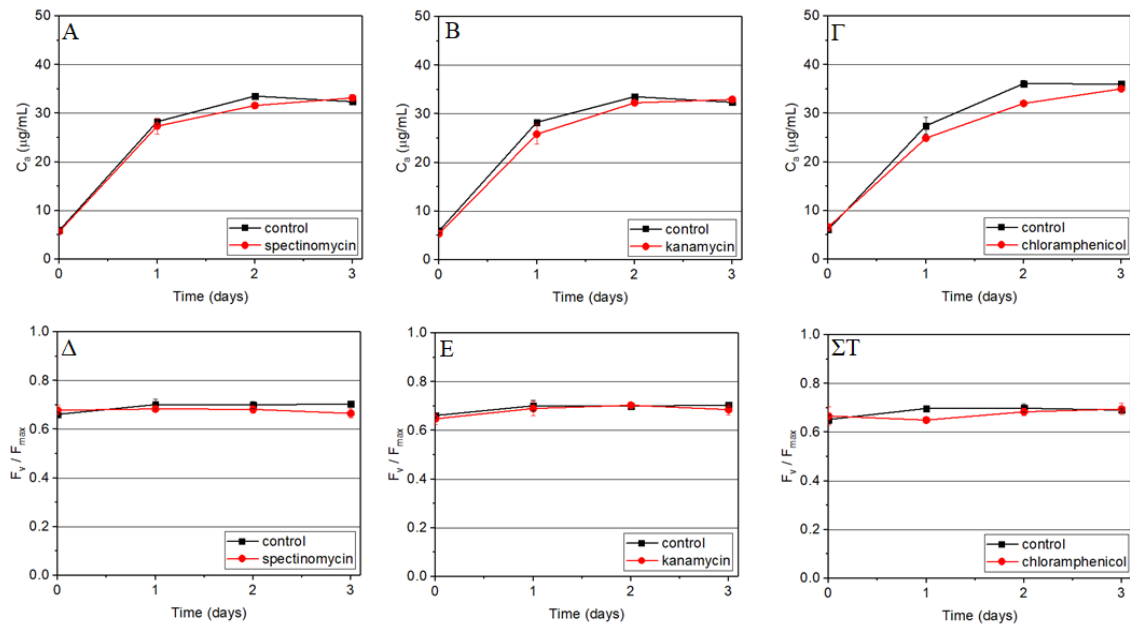
Ισχυρή είναι και η επίδραση στη μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα αφού μετά από διάστημα τριών ημερών έκθεσης στον αναστολέα η παράμετρος είναι μειωμένη σε ποσοστό περίπου 80% συγκριτικά με τις καλλιέργειες μάρτυρες. Αντίθετα στα μικροφύκη από τον ποταμό Γιόφυρο παρατηρείται ανάπτυξη σε όλες τις συγκεντρώσεις της DCMU. Αξίζει να σημειωθεί ότι ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση της ουσίας που χρησιμοποιήθηκε, τα κύτταρα από τον ποταμό Γιόφυρο εμφάνισαν μια σταθερή αναστολή στην ανάπτυξη ίση με περίπου 30% σε σχέση με τις καλλιέργειες μάρτυρες. Σημαντικό είναι και το εύρημα ότι η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση εμφανίζει αναστολή 30% στη μέγιστη συγκέντρωση της ουσίας, ποσοστό σημαντικά μικρότερο σε σχέση με τα κύτταρα *Chlamydomonas*. Επίσης η παράμετρος F_v/F_{max} σε κάθε ανεξάρτητη συνθήκη διατηρήθηκε σταθερή σε όλη τη διάρκεια των τριών ημερών. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν εμφατικά το ρόλο τον οποίο διαδραματίζει η εξωκυττάρια μήτρα στα κύτταρα από τον ποταμό Γιόφυρο όσο αφορά τη διατήρηση της ομοιόστασής τους. Φυσικά σε αυτή την περίπτωση τίθεται το ερώτημα εάν η ανθεκτικότητα των κυττάρων από τον ποταμό Γιόφυρο οφείλεται αποκλειστικά στην παρουσία της μήτρας αυτής ή εάν έχουν υποστεί κάποιου είδους φυσική μετάλλαξη που τους προσδίδει ανθεκτικότητα απέναντι στον αναστολέα. Για το λόγο αυτό τα κύτταρα εκπλύθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό μέσο TAP. Αυτό που φαίνεται από τα αποτελέσματα είναι ότι παρουσιάζεται ανάπτυξη τόσο στα κύτταρα *Chlamydomonas* όσο και στα κύτταρα από τον ποταμό Γιόφυρο μετά την απομάκρυνση της DCMU. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι η ανάπτυξη και στους δύο μικροοργανισμούς που είχαν προηγουμένως εκτεθεί στη μεγαλύτερη συγκέντρωση του αναστολέα πραγματοποιείται με χαμηλότερο ρυθμό σε σχέση με τις υπόλοιπες συνθήκες. Όσο αφορά τα κύτταρα *Chlamydomonas* που έχουν εκτεθεί στα 2,00 ppm του αναστολέα, η φωτοσυνθετική απόδοση τους δεν επανέρχεται εύκολα σε υψηλά επίπεδα. **Τα συγκριτικά αποτελέσματα για τους δύο μικροοργανισμούς δείχνουν πως η εξωκυττάρια μήτρα των μικροφυκών από τον ποταμό Γιόφυρο δρα ως μία ασπίδα προστασίας ελέγχοντας τη μεταφορά ουσιών μέσα και έξω από τα κύτταρα.**

Για να διαπιστωθεί αυτή η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε η ίδια σειρά πειραμάτων σε καλλιέργειες των δύο μικροφυκών υπό την έκθεση σε τρία διαφορετικά αντιβιοτικά. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις Εικόνες 4.18 και 4.19 φαίνεται πως η σπεκτινομυκίνη και η καναμυκίνη προκαλούν σημαντική μείωση στη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση των κυττάρων *Chlamydomonas* ενώ η χλωραμφαινικόλη μικρότερη. Βεβαίως εδώ

αξίζει να αναφερθεί πως οι παραπάνω ουσίες δεν είναι αναστολείς της φωτοσύνθεσης. Όμως πρόκειται για ουσίες αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης και όπως είναι λογικό διακόπτουν μία σημαντική διαδικασία για την επιβίωση του κυττάρου η οποία έχει άμεσες επιπτώσεις και σε άλλες παραμέτρους. Παρόμοια αναστολή καταγράφηκε και στη μεταβολή της συγκέντρωσης χλωροφύλλης-a στο μέσο καλλιέργειας. Αντίθετα στα κύτταρα από τον ποταμό Γιόφυρο η επίδραση των αντιβιοτικών είναι αμελητέα. Σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν τα αποτελέσματα των παραμέτρων που μελετήθηκαν είναι πανομοιότυπα μεταξύ καλλιεργειών μάρτυρα και της εκάστοτε δοκιμής με το αντιβιοτικό. Για άλλη μία φορά αποδεικνύεται ο ρόλος της εξωκυττάριας μήτρας στη διατήρηση της ομοιότητας του κυττάρου.

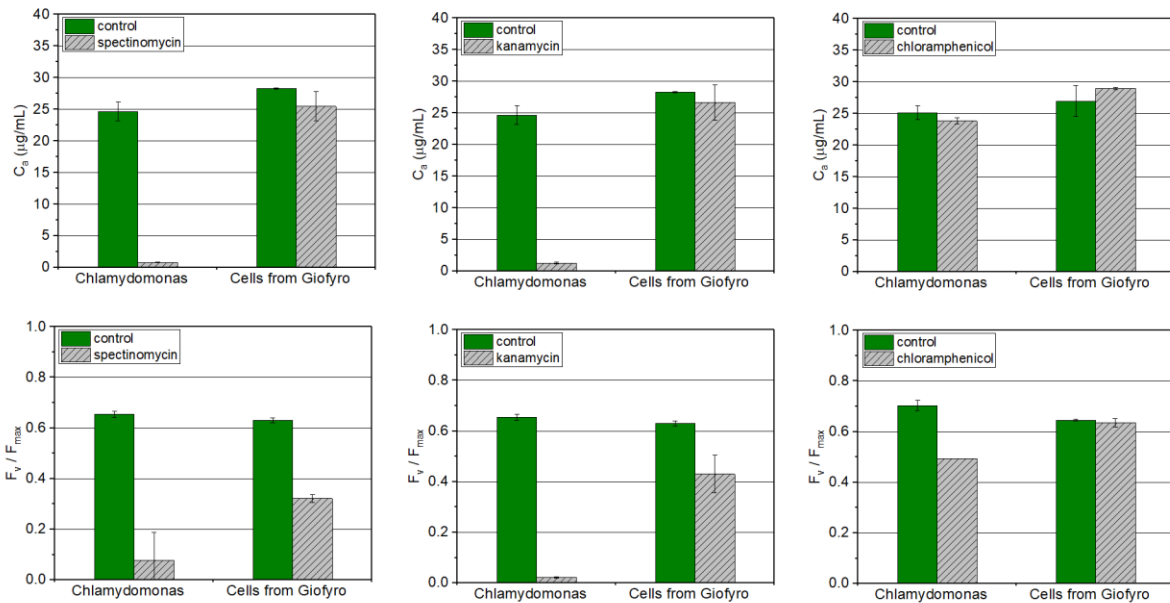


Εικόνα 4.18. Μεταβολή της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης-a (A-Γ) και της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (Δ -ΣΤ) σε καλλιέργειες κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50\text{-}60 \mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ υπό την παρουσία 50 ppm σπεκτινομυκίνης (A, Δ), 25 ppm καναμυκίνης (B,E) και 15 ppm χλωραμφαινικόλης (Γ, ΣΤ).



Εικόνα 4.19. Μεταβολή της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης-a (Α-Γ) και της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (Δ-ΣΤ) σε καλλιέργειες κυττάρων που απομονώθηκαν από τον ποταμό Γιόφυρο υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50-60 \mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ υπό την παρουσία 50 ppm σπεκτινομυκίνης (Α,Δ), 25 ppm καναμυκίνης (Β,Ε) και 15 ppm χλωραμφαινικόλης (Γ, ΣΤ).

Για να διερευνηθεί περαιτέρω αυτός ο προστατευτικός ρόλος της εξωκυττάριας μήτρας, τα πειράματα επαναλήφθηκαν άλλη μία φορά με τη διαφορά ότι κατά την εκκίνησή τους η συγκέντρωση της χλωροφύλλης-a ήταν $0,28 \mu\text{g/mL}$ καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων μετά από 5 ημέρες καλλιέργειας δείχνουν ότι τα κύτταρα *Chlamydomonas* δεν είχαν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν παρουσία σπεκτινομυκίνης και χλωραμφαινικόλης. Αντίθετα τα κύτταρα από τον ποταμό Γιόφυρο αναπτύχθηκαν όπως ακριβώς και οι καλλιέργειες μάρτυρες. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν και τη σημασία της προστασίας την οποία παρέχει αυτή η εξωκυττάρια μήτρα και κατά την αναπαραγωγή των κυττάρων. Είναι πολύ πιθανό να προστατεύει τα ζυγοσπόρια των κυττάρων κατά την αναπαραγωγή τους όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως και στη βιβλιογραφία όπου σε κάποια είδη οι ουσίες αυτές συσσωρεύονται γύρω από το κυτταρικό τοίχωμα και προστατεύουν τα μικροφύκη από την επίδραση χημικών ουσιών κατά τη διαίρεσή τους [264, 265]. Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι φανερός ο προστατευτικός ρόλος του ιδιαίτερου αυτού χαρακτηριστικού που έχει αναπτύξει ένας μικροοργανισμός ο οποίος συλλέχθηκε από ένα μολυσμένο περιβάλλον.

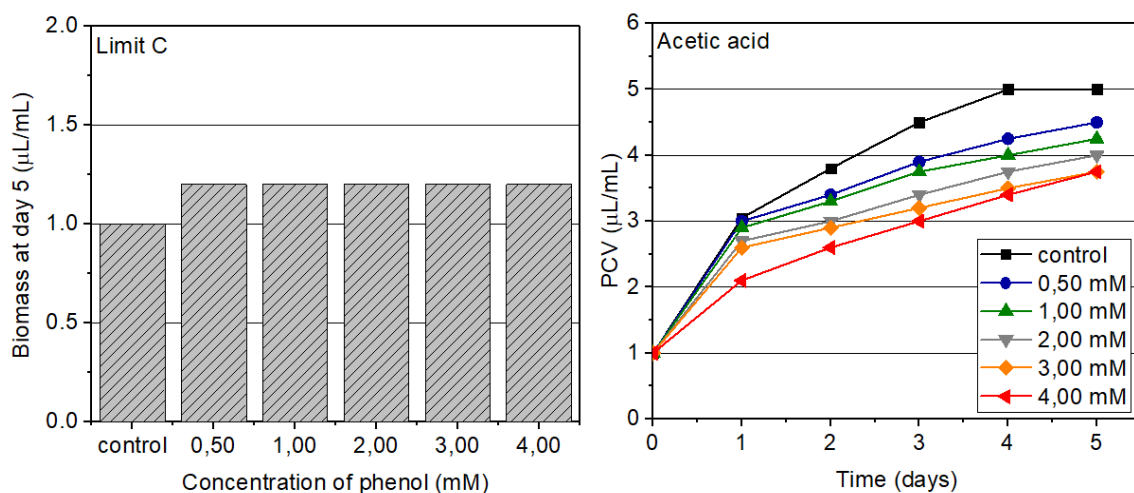


Εικόνα 4.20. Συγκέντρωση της χλωροφύλλης-a (Α-Γ) και μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση (Δ-ΣΤ) σε καλλιέργειες κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* και κυττάρων από τον ποταμό Γιόφυρο υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50\text{-}60 \mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ υπό την παρουσία 50 ppm σπεκτινομυκίνης (Α,Δ), 25 ppm καναμυκίνης (Β,Ε) και 15 ppm χλωραμφαινικόλης (Γ, ΣΤ) την 5^η πειραματική ημέρα. Η αρχική συγκέντρωση της χλωροφύλλης-a ήταν $0,28 \mu\text{g/mL}$ καλλιέργειας.

4.4.4. Μελέτη της αποικοδόμησης της φαινόλης από καλλιέργειες του μικροφύκου από τον ποταμό Γιόφυρο παρουσία και απουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα.

Με τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα της διατριβής έχει αποδειχθεί πως το μικροφύκος που απομονώθηκε από τον ποταμό Γιόφυρο εμφανίζει ανθεκτικότητα απέναντι σε μία σειρά χημικών αναστολέων εξαιτίας της παρουσίας μιας εξωκυττάριας μήτρας πολυσακχαρίτη. Επόμενο βήμα της εργασίας ήταν η μελέτη της αποικοδόμησης της φαινόλης. Με βάση τα αποτελέσματα στα προηγούμενα κεφάλαια κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η αποικοδόμηση της φαινόλης κάτω υπό συνθήκες απουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα και κάτω υπό συνθήκες παρουσίας οξικού οξέος ως εναλλακτική πηγή άνθρακα. Επιπλέον μελετήθηκε η επίδραση της φαινόλης στην ανάπτυξη και τη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μικροοργανισμού.

Από τις μετρήσεις ανάπτυξης φαίνεται πως η παρουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα παίζει καθοριστικό ρόλο. Οι καλλιέργειες οι οποίες είχαν τη φαινόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα παρουσίασαν αύξηση της βιομάζας μόνο κατά 20% της αρχικής κυτταρικής συγκέντρωσης σε αντίθεση με την καλλιέργεια μάρτυρα (control) η οποία δεν εμφάνισε ανάπτυξη όπως ήταν λογικό. Σημαντική είναι η συμπεριφορά που παρουσιάζουν στην ανάπτυξη οι καλλιέργειες οι οποίες περιείχαν οξικό οξύ ως εναλλακτική πηγή άνθρακα. Η μόνη καλλιέργεια η οποία φτάνει σε στατική φάση ανάπτυξης είναι η καλλιέργεια μάρτυρας. Οι καλλιέργειες οι οποίες περιείχαν φαινόλη συνέχισαν να εμφανίζουν ανάπτυξη ακόμα καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος. Αυτή η συμπεριφορά στην ανάπτυξη είναι σε μεγάλο βαθμό διαφορετική από αυτή που εμφάνισε το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*. Υπενθυμίζεται ότι σε ανάλογες συνθήκες, καλλιέργειες του *Chlamydomonas* αφενός δεν παρουσίασαν ανάπτυξη σε συνθήκες απουσίας οξικού οξέος και αφετέρου έφτασαν στη στατική φάση παρουσία οξικού οξέος μετά την τρίτη πειραματική ημέρα.

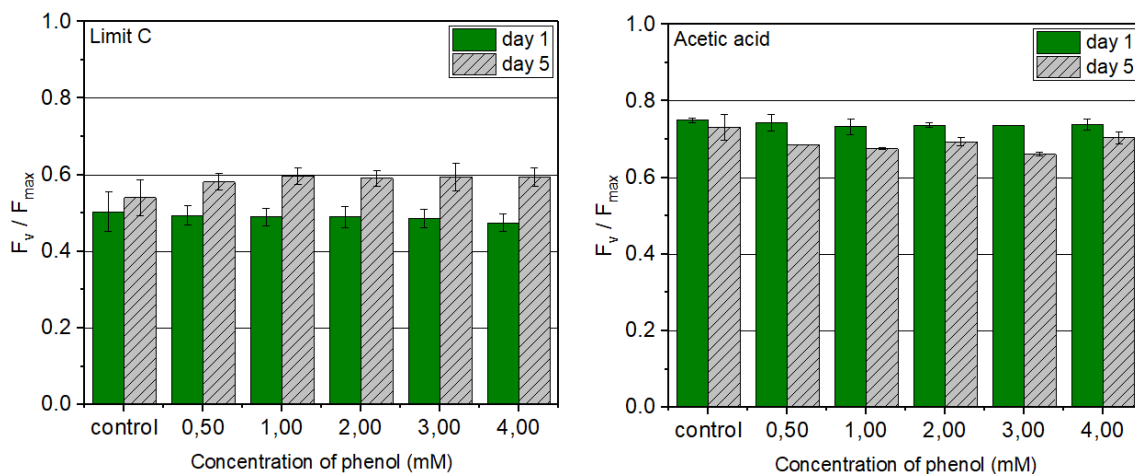


Εικόνα 4.21. Καμπύλες ανάπτυξης καλλιεργειών των κυττάρων από τον ποταμό Γιόφυρο υπό την απουσία ή παρουσία οξικού οξέος ως εναλλακτική πηγή άνθρακα, υπό ένταση φωtonιακής ακτινοβολίας $50-60 \mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, υπό την παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων φαινόλης. Η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ήταν ίση με $1 \mu\text{L PCV/mL}$.

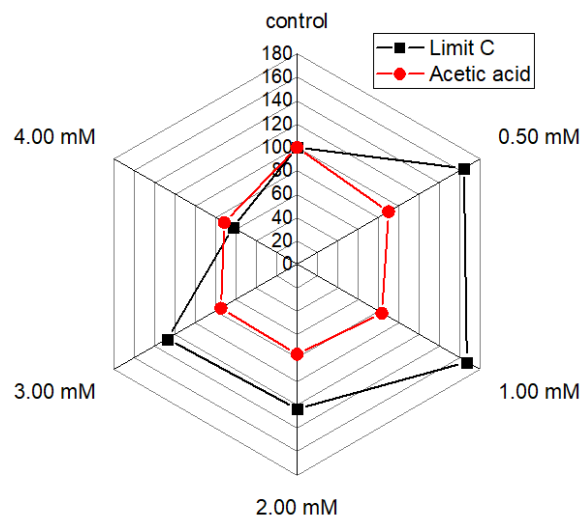
Για τη μελέτη των επιπτώσεων της παρουσίας της φαινόλης στη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μικροφύκου έλαβαν χώρα μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού, υπολογισμός των παραμέτρων του JIP-test, μέτρηση φωτοσυνθετικών χρωστικών και μέτρηση του ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου. Από τις μετρήσεις

επαγωγικού φθορισμού την πρώτη και πέμπτη πειραματική ημέρα φαίνεται πως την ισχυρότερη επίδραση στη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού ασκεί η παρουσία ή όχι του οξικού οξέος. Οι καλλιέργειες από τις οποίες απουσίαζε το οξικό οξύ εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση σε σχέση με αυτές στις οποίες η ουσία υπήρχε στο μέσο καλλιέργειας. Από την άλλη πλευρά η παρουσία της φαινόλης φάνηκε να μην επηρεάζει σημαντικά τη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση του μικροφύκους μιας και οι διαφορές ήταν στα πλαίσια των τυπικών αποκλίσεων. Σημαντικό είναι επίσης το στοιχείο ότι στη συνθήκη όπου απουσίαζε το οξικό οξύ, οι καλλιέργειες οι οποίες περιείχαν τη φαινόλη εμφάνισαν σημαντική αύξηση στη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση την πέμπτη πειραματική ημέρα.

Από τον υπολογισμό των παραμέτρων του JIP-test την πρώτη πειραματική ημέρα φαίνεται το τυπικό μοτίβο μεταβολών που αναφέρεται σε εμφάνιση συμπτωμάτων καταπόνησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (αύξηση του μεγέθους της λειτουργικής φωτοσυνθετικής κεραίας, αύξηση της ενέργειας που διαχέεται υπό μορφή θερμότητας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης, μείωση της πυκνότητας των ενεργών κέντρων αντίδρασης, μείωση της κβαντικής απόδοσης πρωταρχικής φωτοχημείας και μείωση της πιθανότητας μίας διέγερσης να μετακινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την ανηγμένη μορφή της πλαστοκινόνης) του μικροφύκους οι οποίες όμως δεν είναι έντονες στο βαθμό που ήταν για τα κύτταρα *Chlamydomonas*. Η πιο σημαντική μεταβολή έχει να κάνει κυρίως με τη μείωση του αριθμού των ενεργών κέντρων ανά μονάδα επιφάνειας σε σύγκριση με την καλλιέργεια μάρτυρα. Στις παραπάνω παρατηρήσεις συμφωνούν και οι μετρήσεις του ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως παρουσία οξικού οξέος η μέγιστη μείωση που καταγράφηκε συγκριτικά με τις καλλιέργειες μάρτυρες είναι μόλις 20% ενώ αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε συνθήκες απουσίας οξικού οξέος καταγράφηκε αύξηση της μέγιστης φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου έως και 60% συγκριτικά με την καλλιέργεια μάρτυρα. Επιπλέον και ο λόγος χλωροφύλλης-a προς χλωροφύλλη-b δεν εμφάνισε σημαντικές διαφορές σε σχέση με την καλλιέργεια μάρτυρα σε καμία από τις δύο συνθήκες. Συνολικά λοιπόν φαίνεται η διαφοροποίηση της συμπεριφοράς του μικροοργανισμού αυτού συγκριτικά με το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* όσο αφορά την απόκρισή του σε υψηλές συγκεντρώσεις φαινόλης που δείχνει σε μεγάλο βαθμό τη σημασία ύπαρξης της εξωκυττάριας μήτρας για την προστασία του.



Εικόνα 4.22. Μεταβολή της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (F_v/F_{max}) των κυττάρων από τον ποταμό Γιόφυρο υπό την απουσία ή παρουσία οξικού οξέος ως εναλλακτική πηγή άνθρακα, την 1^η (24 ώρες) και 5^η πειραματική ημέρα σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 μmol φωτονίων· $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

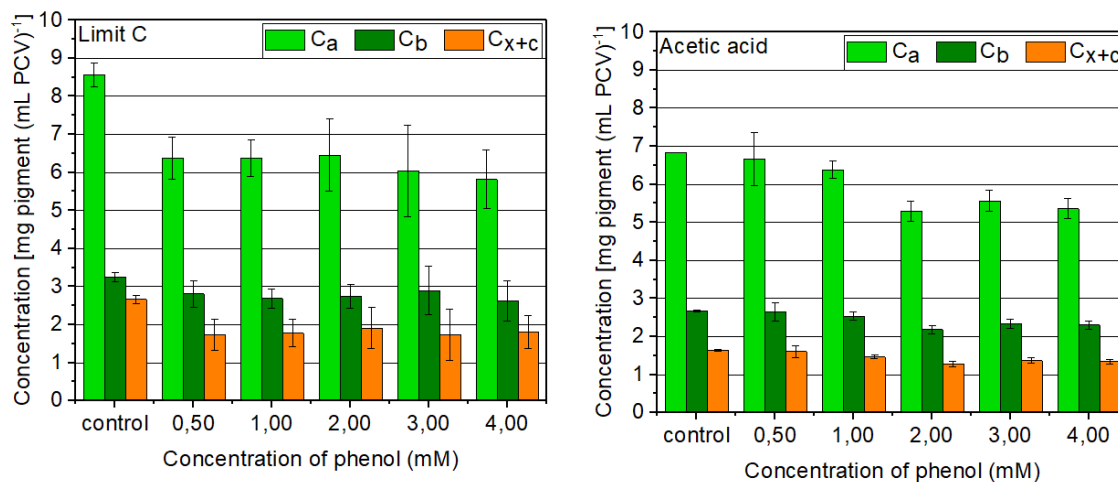


Εικόνα 4.23. Ποσοστιαία μεταβολή του μέγιστου ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου που μετρήθηκε πολωρογραφικά σε καλλιέργειες του μικροφύκου από τον ποταμό Γιόφυρο τις πρώτες 24 ώρες από την έναρξη του πειράματος σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης, παρουσία και απουσία οξικού οξέος, υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 μmol φωτονίων· $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Όλα τα αποτελέσματα είναι ανηγμένα ως προς ποσοστό επί της καλλιέργειας μάρτυρα (control) η οποία έχει τιμή 100%.

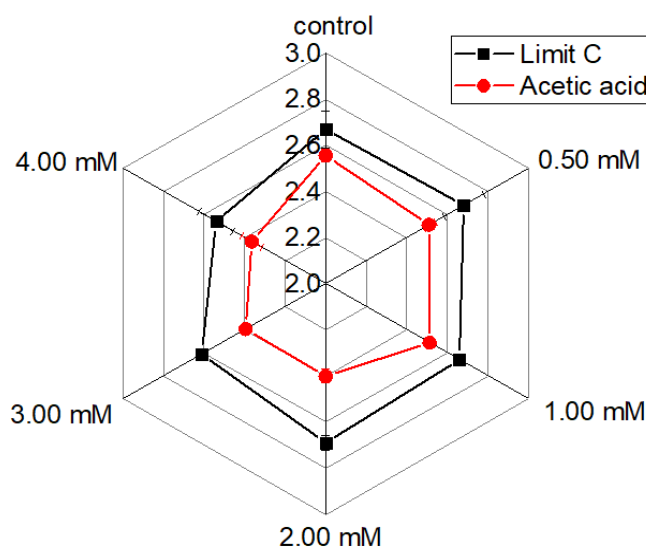
Πίνακας 4.3. Μεταβολή των παραμέτρων του JIP-test που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των κυττάρων από τον ποταμό Γιόφυρο 24 ώρες από την έναρξη του πειράματος σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την παρουσία ή απουσία οξικού οξέος, υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Acetic acid						
	F_v/F_{max}	TR_o/ABS	ET_o/TR_o	ABS/RC	DI_o/RC	RC/CS_o
control	0,750	0,708	0,486	2,661	0,756	57,037
0,50 mM	0,743	0,704	0,482	2,687	0,779	52,674
1,00 mM	0,734	0,688	0,437	2,796	0,872	51,990
2,00 mM	0,737	0,689	0,359	2,735	0,873	49,982
3,00 mM	0,737	0,687	0,382	2,885	0,903	47,930
4,00 mM	0,739	0,684	0,338	2,908	0,932	47,294
Limit C						
	F_v/F_{max}	TR_o/ABS	ET_o/TR_o	ABS/RC	DI_o/RC	RC/CS_o
control	0,504	0,490	0,346	5,276	2,820	26,614
0,50 mM	0,493	0,451	0,282	5,314	2,857	25,266
1,00 mM	0,490	0,455	0,263	5,411	2,991	23,195
2,00 mM	0,490	0,448	0,256	5,361	3,001	22,225
3,00 mM	0,486	0,439	0,242	5,436	3,162	22,159
4,00 mM	0,475	0,433	0,198	5,434	3,130	21,950

F_v/F_{max}: φωτοσυνθετική απόδοση, TR_o/ABS: κβαντική απόδοση πρωταρχικής φωτοχημείας, ET_o/TR_o: πιθανότητα μίας διέγερσης να μετακινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την ανηγμένη μορφή της πλαστοκινόνης. ABS/RC: μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας, DI_o/RC: ενέργεια που διαχέεται υπό μορφή θερμότητας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης, RC/CS_o: πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης. Τυπικές αποκλίσεις: F_v/F_{max}: 0,1-10,1%, TR_o/ABS: 0,5-8,2%, ET_o/TR_o: 3,7-12,8%. ABS/RC: 0,1-8,2%, DI_o/RC: 1,6-20,7%, RC/CS_o: 1,5-15,2%.

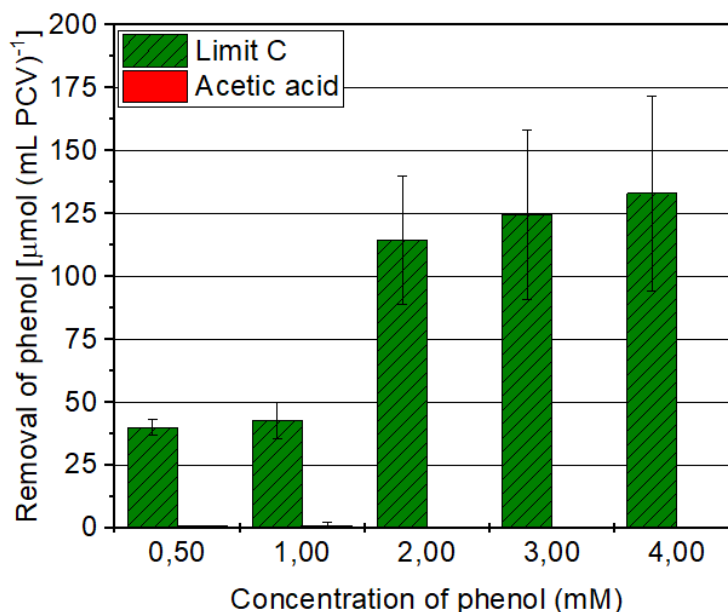


Εικόνα 4.24. Περιεχόμενο φωτοσυνθετικών χρωστικών σε καλλιέργειες του μικροφύκου από τον ποταμό Γιόφυρο σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την παρουσία και απουσία οξικού οξέος, την 5^η πειραματική ημέρα υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Όλες οι χρωστικές έχουν εκφραστεί σε mg χρωστικής ανά mL PCV. C_a: συγκέντρωση χλωροφύλλης-a, C_b: συγκέντρωση χλωροφύλλης-b, C_{x+c}: συγκέντρωση συνολικών καροτενοειδών (ξανθοφύλλες και καροτένια).



Εικόνα 4.25. Μεταβολή του λόγου χλωροφύλλης-a προς χλωροφύλλη-b σε καλλιέργειες του μικροφύκου από τον ποταμό Γιόφυρο σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινόλης υπό την παρουσία και απουσία οξικού οξέος, την 5^η πειραματική ημέρα υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Οι μετρήσεις απομάκρυνσης της φαινόλης από το μέσο καλλιέργειας παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.26.



Εικόνα 4.26. Απομάκρυνση της φαινόλης από καλλιέργειες του μικροφύκου που απομονώθηκε από τον ποταμό Γιόφυρο υπό την παρουσία ή απουσία οξικού οξέος, την 5^η πειραματική ημέρα υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60 $\mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Η απομάκρυνση εκφράστηκε ως η ποσότητα που απομακρύνθηκε ανά μονάδα κυτταρικής συγκέντρωσης [$\mu\text{mol}\cdot(\text{mL PCV})^{-1}$].

Από τις μετρήσεις φαίνεται πως απομάκρυνση της ουσίας παρουσιάστηκε μόνο σε συνθήκες απουσίας οξικού οξέος στο μέσο καλλιέργειας. Παρουσία οξικού οξέος δεν εμφανίστηκε απομάκρυνση της φαινόλης σε καμία περίπτωση. Αυτό το αποτέλεσμα είναι συγκρίσιμο με τη βιβλιογραφία σε προηγούμενη μελέτη στο μικροφύκος *Scenedesmus obliquus* το οποίο αποικοδομούσε τη φαινόλη μόνο όταν απουσίαζε οποιαδήποτε εναλλακτική πηγή άνθρακα από το μέσο καλλιέργειας [130]. **Από αυτά τα αποτελέσματα φαίνεται πως ο μικροοργανισμός αυτός χρησιμοποιεί τη φαινόλη ως πηγή άνθρακα μόνο στην περίπτωση που δεν έχει διαθέσιμα άλλα αποθέματα.** Αυτό το αποτέλεσμα έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα για το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* το οποίο αποικοδομούσε τη φαινόλη σε σημαντικό βαθμό τόσο υπό την παρουσία οξικού τόσο και υπό την απουσία του εξαιτίας των συμπτωμάτων καταπόνησης (stress) που προκαλούσε η ύπαρξη

της ξενοβιοτικής ουσίας. **Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται η σημαντική διαφορά ενός μικροοργανισμού που έχει απομονωθεί από ένα σχετικά επιβαρυνόμενο περιβάλλον και ενός στελέχους εργαστηρίου.** Απ' ότι φαίνεται ο μικροοργανισμός από τον ποταμό Γιόφυρο καταναλώνει τη φαινόλη για να εκμεταλλευτεί τον άνθρακα. Η διαδικασία αυτή οδηγεί και σε μικρή αύξηση στη βιομάζα του. Από την άλλη όταν έχει διαθέσιμο το οξικό οξύ δεν μπαίνει στη διαδικασία να αποικοδομήσει τη φαινόλη και επιλέγει την κατανάλωση του υποστρώματος που του προσφέρει τα μεγαλύτερα ενεργειακά αποθέματα. Από τη στιγμή που ο μικροοργανισμός είναι «θωρακισμένος» από την εξωκυττάρια μήτρα και η φαινόλη δεν τον επηρεάζει αισθητά, δεν καταναλώνει τη φαινόλη. Σημαντικό είναι να ληφθεί υπόψη πως απουσία οξικού οξέος όπου παρουσιάζεται απομάκρυνση της φαινόλης, η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση την πέμπτη πειραματική ημέρα είναι υψηλότερη σε σχέση με την καλλιέργεια μάρτυρα. Οι μεγάλες τυπικές αποκλίσεις που εμφανίζονται στις μεγάλες συγκεντρώσεις φαινόλης έχουν να κάνουν πιθανώς με το γεγονός ότι η ουσία δε μπορεί να περάσει με ευκολία την εξωκυττάρια μήτρα και για αυτό το λόγο από καλλιέργεια σε καλλιέργεια παρουσιάζονται αυτές οι διαφοροποιήσεις.

Οι παρατηρήσεις αυτές συνολικά επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα των προηγούμενων κεφαλαίων της διατριβής, δηλαδή ότι αφενός τα μικροφύκη εκμεταλλεύονται τη φαινόλη ως πηγή άνθρακα στην περίπτωση που δεν έχουν άλλο ενεργειακό απόθεμα διαθέσιμο και αφετέρου η αποικοδόμηση λαμβάνει χώρα στην περίπτωση που δημιουργεί δυσμενές περιβάλλον για το μικροοργανισμό ακόμα και υπό την παρουσία μίας δεύτερης οργανικής πηγής άνθρακα.

4.5 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό μελετήθηκε ένας μικροοργανισμός που απομονώθηκε από τον ποταμό Γιόφυρο σε ένα σχετικά επιβαρυνόμενο σημείο από αστική ρύπανση. Από την ανάλυση του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών του φαίνεται πως ανήκει στα πράσινα μικροφύκη. Από τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του (κυπελλοειδής χλωροπλάστης, σχήμα, μέγεθος) φαίνεται πως πιθανώς ανήκει στο γένος *Chlorella*. Βασικό χαρακτηριστικό του ήταν η παρουσία μίας εξωκυττάριας μήτρας που περιβάλλει το κυτταρικό τοίχωμα η οποία πρόκειται πιθανώς για έναν εξωπολυσακχαρίτη. Από τα αποτελέσματα φάνηκε πως αυτή η μήτρα προστατεύει τα κύτταρα από την παρουσία διάφορων αναστολέων όπως είναι η DCMU και τα αντιβιοτικά. Το μικροφύκος εμφάνισε την ικανότητα να αναπτυχθεί σε αυτούς

τους αναστολείς και ταυτόχρονα να κρατήσει ενεργή τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του. Απ' ότι φαίνεται αυτή η εξωκυττάρια μήτρα αποτελεί ένα φυσικό φραγμό ο οποίος αφήνει επιλεκτικά τις ουσίες να εισέρχονται στα κύτταρα προκειμένου να διατηρήσουν την ομοιόστασή τους.



Εικόνα 4.27. Σχηματική αναπαράσταση της προστασίας που προσφέρει η εξωκυττάρια μήτρα στα κύτταρα από τον ποταμό Γιόφυρο ως μέσο ρύθμισης της ποσότητας των αναστολέων που εισάγονται στο κύτταρο.

Όσο αφορά τη μελέτη απομάκρυνσης της φαινόλης ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάστηκε στη σύγκριση των αποτελεσμάτων του μικροοργανισμού με το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*. Η φαινόλη δεν είχε ισχυρή επίδραση στο μικροφύκος από τον ποταμό Γιόφυρο όπως φάνηκε από τις μετρήσεις που αφορούν τη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού του μηχανισμού. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι σε αυτή την περίπτωση παρουσιάστηκε μικρή ανάπτυξη σε συνθήκες απουσίας οξικού στις καλλιέργειες που περιείχαν φαινόλη γεγονός που δείχνει πως ο μικροοργανισμός εκμεταλλεύεται τη φαινόλη ως τη μοναδική πηγή άνθρακα και να αυξήσει τη βιομάζα του. Παρουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα δεν παρουσιάστηκε μείωση της συγκέντρωσης της ουσίας. Αυτό το γεγονός σε σύγκριση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα για το *Chlamydomonas reinhardtii* δείχνουν πως οι κυριότεροι λόγοι για να αποικοδομήσουν τη φαινόλη οι μικροοργανισμοί είναι δύο, αρχικά να αποκτήσουν αποθέματα άνθρακα σε συνθήκες όπου τα στερούνται και δεύτερον να μειώσουν τη συγκέντρωση της ουσίας σε όρια «ανεκτά» για την ομοιόστασή τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων από δύο φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς. Το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* που αποτελεί ένα εργαστηριακό στέλεχος και οργανισμό μοντέλο και ένα μικροφύκος που απομονώθηκε από ένα επιβαρυμένο σημείο στον ποταμό Γιόφυρο στην πόλη του Ηρακλείου.

Από τα αποτελέσματα της διατριβής αποδείχθηκε πως η αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* είναι μία αυστηρά βιοενεργητική διαδικασία. Σε συνθήκες έλλειψης εναλλακτικής πηγής άνθρακα το μικροφύκος βρέθηκε να αποικοδομεί τη φαινόλη κυρίως για να εξασφαλίσει αποθέματα άνθρακα ενώ ταυτόχρονα η βιοαποικοδόμηση υψηλών αρχικών συγκεντρώσεων φαινόλης φάνηκε να είναι μία αερόβια και φωτοελεγχόμενη διαδικασία. Κατά την αποικοδόμηση της φαινόλης ανιχνεύθηκε ως μεταβολικό ενδιάμεσο η κατεχόμενη γεγονός που επιβεβαιώνει ότι ο μικροοργανισμός ακολουθεί το αερόβιο μονοπάτι αποικοδόμησης. Το μικροφύκος μπόρεσε να αποικοδομήσει τη φαινόλη στο σκοτάδι μόνο όταν του παρασχέθηκε εξωγενώς το απαιτούμενο οξυγόνο.

Ο δεύτερος παράγοντας που επηρέασε την αποικοδόμηση της φαινόλης είχε να κάνει με την παρουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα στο θρεπτικό μέσο. Η παρουσία διοξειδίου του άνθρακα ως εναλλακτική πηγή σχεδόν εξαφάνισε την ικανότητα του μικροφύκου να αποικοδομήσει τη φαινόλη ενώ αντίθετα σημαντική ήταν η παρουσία του οξικού οξέος στο θρεπτικό μέσο. Το οξικό οξύ διετέλεσε επικουρικό ρόλο ώστε το μικροφύκος να αποικοδομήσει τη φαινόλη όταν αυτή βρισκόταν σε υψηλές συγκεντρώσεις ενώ ταυτόχρονα βοήθησε στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στην ανακούφιση του μικροοργανισμού από τα συμπτώματα αβιοτικής καταπόνησης που προκλήθηκαν από την ύπαρξη της φαινόλης. Η αναστολή στην ανάπτυξη, συγκριτικά με τις καλλιέργειες μάρτυρες, υπό αυτές τις συνθήκες σε συνδυασμό με την απουσία της σε συνθήκες έλλειψης εναλλακτικής πηγής άνθρακα έδειξε πως η φαινόλη προκάλεσε την είσοδο του μεταβολισμού του μικροφύκου *Chlamydomonas* σε κατάσταση συντηρησης (maintenance). Το οξικό οξύ φάνηκε ότι διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο στην ικανότητα των μικροφυκών να προκαλέσουν διάσπαση του κατεχολικού δακτυλίου και να προχωρήσουν την περαιτέρω οξειδωσή του σε σχέση με καλλιέργειες από τις οποίες απουσίαζε.

Όσο αφορά την αποικοδόμηση των μονοϋποκατεστημένων μεθυλοφαινολών σημαντικό ρόλο διαδραμάτισε η σχετική θέση των υποκαταστατών σε συνδυασμό με την παροχή ή όχι εναλλακτικής πηγής άνθρακα. Τα *ορθο* και *μετα* ισομερή επέδειξαν

ανθεκτικότητα στην αποικοδόμηση σε σχέση με το αντίστοιχο *para* ισομερές. Το οξικό οξύ και σε αυτή την περίπτωση έπαιξε καταλυτικό ρόλο στην εξαφάνιση των συμπτωμάτων αβιοτικής καταπόνησης.

Τα πειράματα που έλαβαν χώρα σε ακινητοποιημένα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου έδειξαν ότι τα ακινητοποιημένα κύτταρα είναι σε θέση να αποικοδομήσουν τη φαινόλη εξίσου ή περισσότερο αποτελεσματικά στις περισσότερες περιπτώσεις σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα. Από τις μετρήσεις της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης αποδείχθηκε πως η πολυμερική μήτρα προσέφερε προστασία στα κύτταρα από την επίδραση της φαινόλης. Τα κύτταρα παρέμειναν μεταβολικά ενεργά για ένα συνολικό διάστημα 15 ημερών. Τέλος από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι μόνο τα κύτταρα της εξωτερικής επιφάνειας συμμετέχουν στη διαδικασία αποικοδόμησης της φαινόλης γεγονός που γεννάει την ανάγκη μείωσης του μεγέθους των σφαιριδίων προκειμένου να αυξηθεί η ενεργή επιφάνεια. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της πολυμερικής μήτρας προσφέρουν ένα περισσότερο σταθερό περιβάλλον στα κύτταρα στο οποίο εμφανίζονται μεταβολικά ενεργά και ο βαθμός απελευθέρωσής τους στο μέσο καλλιέργειας είναι σημαντικά μικρότερος. Τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν την προοπτική χρήσης των κυττάρων *Chlamydomonas* σε πιθανή εφαρμογή *in situ* βιοαποκατάστασης ή ακόμη και σε βιοαντιδραστήρα (αρχικά εργαστηριακών προδιαγραφών) για εφαρμογή *ex situ* βιοαποκατάστασης καθώς η βιομάζα βρίσκεται σε ένα ελεγχόμενο περιβάλλον.

Στο τρίτο και τελευταίο μέρος μελετήθηκε ένα φωτοσυνθετικό μικροφύκος που απομονώθηκε από τον ποταμό Γιόφυρο. Το μικροφύκος αυτό φέρει μια εξωκυττάρια μήτρα που περιβάλλει το κυτταρικό τοίχωμα, η οποία λειτουργεί ως φυσικός φραγμός και το προστατεύει όπως αποδείχθηκε από μία σειρά χημικών αναστολέων που μελετήθηκαν όπως τα αντιβιοτικά και η DCMU. Το μικροφύκος εμφάνισε την ικανότητα να αναπτυχθεί σε αυτούς τους αναστολείς και ταυτόχρονα να κρατήσει ενεργή τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του. Όσο αφορά τη μελέτη απομάκρυνσης της φαινόλης ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάστηκε στη σύγκριση των αποτελεσμάτων του μικροοργανισμού με το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*. Η φαινόλη δεν είχε ισχυρή επίδραση στο μικροφύκος από τον ποταμό Γιόφυρο εξαιτίας της προστασίας που του παρέχει η εξωκυττάρια μήτρα. Το μικροφύκος εμφάνισε ικανότητα αποικοδόμησης της φαινόλης μόνο απουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα από το μέσο καλλιέργειας. Η μελέτη της εξωκυττάριας μήτρας του μικροοργανισμού αυτού παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον όσο

αφορά τη χημική σύστασή της με προοπτική σε βιομηχανικές εφαρμογές (π.χ. βιομηχανία τροφίμων, φαρμακοβιομηχανίες) αλλά και το σύνολο των συνθηκών κάτω υπό τις οποίες παράγεται. Επιπλέον η ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού αυτού απέναντι σε αναστολείς δίνει τη δυνατότητα μελέτης της ανάπτυξής του σε μία σειρά από διαφορετικά βιομηχανικά απόβλητα (π.χ. υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων, απόβλητα τυροκομείων, απόβλητα φαρμακοβιομηχανιών κτλ) με σκοπό τη συνδυαστική μελέτη βιομετατροπής των αποβλήτων και παραγωγής εκμεταλλεύσιμης βιομάζας (π.χ. βιοντίζελ, υδατάνθρακες κτλ).

Συνολικά στην παρούσα διατριβή αποδείχθηκε πως η αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων από τους φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς είναι μία βιοενεργητική διαδικασία που εξαρτάται από τις εκάστοτε συνθήκες καλλιέργειας και τα χαρακτηριστικά του εκάστοτε οργανισμού. Οι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί λειτουργούν ως *«καλοκουρδισμένες βιοενεργητικές μηχανές»* που διαχειρίζονται με το βέλτιστο τρόπο τα παρεχόμενα αποθέματα ενέργειας βρίσκουν το κατάλληλο ισοζύγιο ανάμεσα στην ανάπτυξη, το στρες και τη βιοαποικοδόμηση των ξενοβιοτικών ουσιών. Αυτή η μεταβολική ευελιξία των συγκεκριμένων βιολογικών συστημάτων μπορεί να ανοίξει δρόμους στην εκμεταλλεύσή του σε διάφορους τομείς, από τη βιοαποκατάσταση του περιβάλλοντος έως τη βιομηχανική εκμετάλλευση της βιομάζας.

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι. ΑΝΤΙΓΡΑΦΟ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗΣ
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗΣ**

Metabolism of xenobiotics by *Chlamydomonas reinhardtii*: Phenol degradation under conditions affecting photosynthesis

Theocharis T. Nazos¹ · Emmanouel J. Kokarakis¹ ·
Demetrios F. Ghanotakis¹

Received: 15 June 2016 / Accepted: 6 July 2016 / Published online: 15 July 2016
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2016

Abstract In the present work, the biodegradation of phenol by axenic cultures of the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii* was investigated. Biodegradation proved to be a dynamic bioenergetic process, affected by changes in the culture conditions. Microalgae biodegraded defined amounts of phenol, as a result of the induced stress caused at high concentrations, despite the fact that this process proved to be energy demanding and thus affected growth of the culture. High levels of biodegradation were observed both in the absence of an alternative carbon source and in the presence of acetate as a carbon source. Biodegradation of phenol by *Chlamydomonas* proved to be an aerobic, photoregulated process. This is the first time that *Chlamydomonas reinhardtii* has been used for bioremediation purposes. This study has demonstrated that the most important factor in the biodegradation of phenol is the selection of the appropriate culture conditions (presence or absence of alternative carbon source, light intensity, and oxygen availability) that provide the best bioenergetic balance among growth, induced stress, and biodegradation of phenol.

Keywords *Chlamydomonas reinhardtii* · Phenol · Biodegradation · Photosynthesis · Bioenergetics · Stress

Abbreviations

PCV Packed cell volume
Acetate Treatment with acetate as carbon source carried out into light

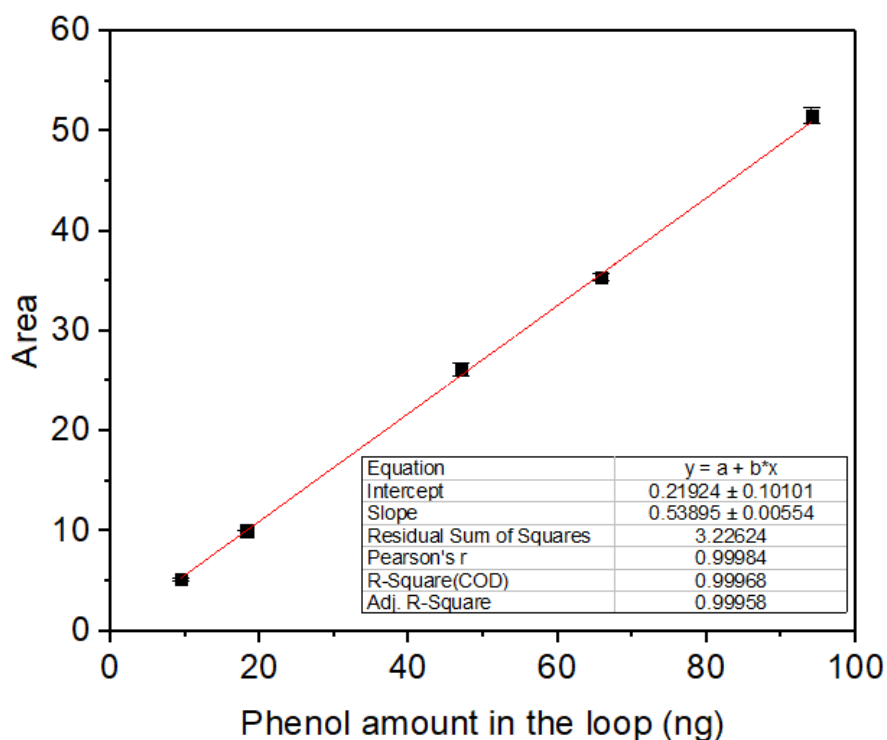
✉ Demetrios F. Ghanotakis
ghanotakis@uoc.gr

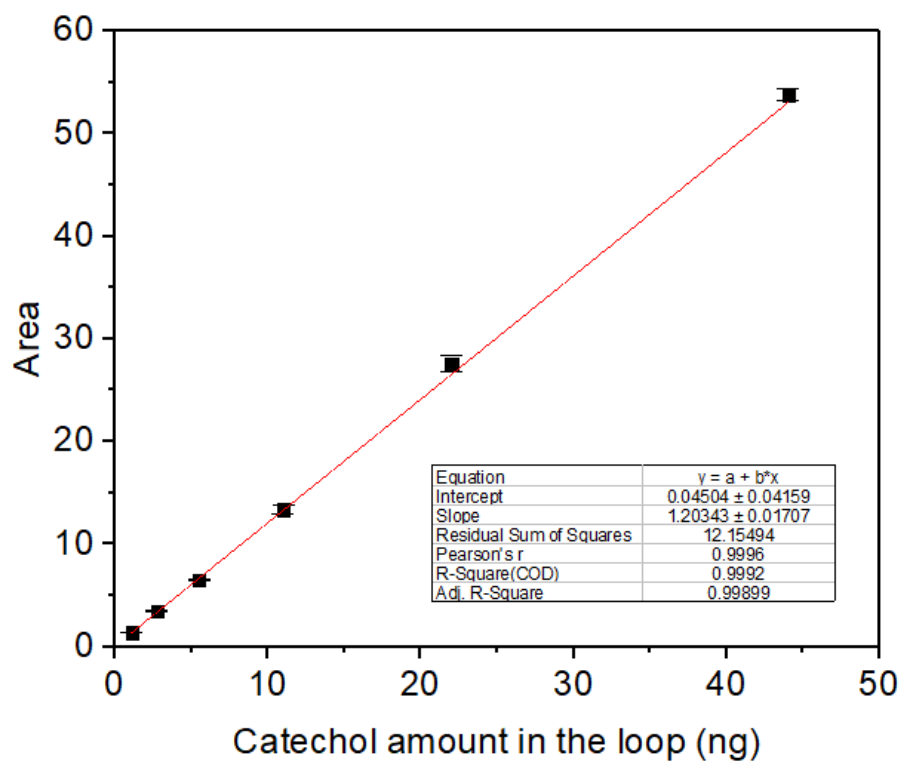
¹ Department of Chemistry, University of Crete, Vasilika Voutes, 70013 Heraklion, Crete, Greece

CO ₂	Treatment with carbon dioxide as carbon source carried out into light
Acetate + CO ₂	Treatment with both acetate and CO ₂ as carbon sources carried out into light
Limit C	Treatment with limited carbon source carried out into light
<i>t</i>	Time in days
X ₀	Total initial cell biomass in the culture (mg) at the beginning of the experiment
X	Total cell biomass in the culture (mg) at time <i>t</i>
S ₀	Total initial amount (mg) of phenol at the beginning of the experiment
S	Total amount (mg) of phenol at time <i>t</i>
μ	Specific growth rate
Y _{X/S}	Observed growth yield calculated according to the equation $Y_{X/S} = (X - X_0)/(S_0 - S)$
F ₀	Minimum fluorescence that corresponds to the time that all photosynthetic reaction centers are open
F _{max}	Maximal fluorescence that corresponds to the time that all reaction centers are closed
F _v	Variable fluorescence (F _{max} - F ₀)
F _v /F _{max}	Photosynthetic efficiency
ABS/RC	Size of the functional antenna per active reaction center
DI ₀ /R C	Dissipation energy per active reaction center
RC/CS ₀	Active reaction center density
TR ₀ /ABS	Quantum yield of primary photochemistry
C _a	Concentration of chlorophyll-a
C _b	Concentration of chlorophyll-b

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ. ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΕΣ ΚΑΜΠΥΛΕΣ
ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ ΦΑΙΝΟΛΗΣ ΚΑΙ ΚΑΤΕΧΟΛΗΣ**

Για τη μέτρηση της αποικοδόμησης της φαινόλης και της παραγωγής κατεχόλης με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης ήταν απαραίτητη η κατασκευή πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης της κάθε ουσίας. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης το οποίο αποτελούταν από μία αντλία υψηλής ακρίβειας (LC - 10AD Shimadzu), ένα θερμοστατούμενο κλίβανο Rigas Labs G5 που διατηρούσε σταθερή την θερμοκρασία της στήλης στους 25°C, έναν ανιχνευτή υπεριώδους- ορατού SPD 10AV της Shimadzu, μία προστήλη και μια χρωματογραφική στήλη Kromasil C18 (Grace Smart RP18, μήκους 250 mm, εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm και μεγέθους σωματιδίων 5 μm). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ισοκρατική μέθοδος έκλουσης με κινητή φάση μεθανόλη: νερό: οξικό οξύ σε αναλογία όγκων 50:49:1 και ταχύτητα ροής 1 mL/ min. Η εισαγωγή του δείγματος πραγματοποιήθηκε με χρήση βρόγχου (loop) όγκου 20 μL. Η ανίχνευση των φαινολικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της απορρόφησης στα 279 nm. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι πριν από την έναρξη της κάθε σειράς αναλύσεων η διαδικασία κατασκευής καμπύλης βαθμονόμησης επαναλαμβανόταν. Η κατασκευή των καμπυλών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Origin 2017® Οι πρότυπες καμπύλες και οι υπολογιζόμενοι παράμετροι παρουσιάζονται παρακάτω.





BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wilson, J.T., J.F. McNabb, J.W. Cochran, T.H. Wang, M.B. Tomson, and P.B. Bedient, Influence of microbial adaptation on the fate of organic pollutants in ground-water. *Environ Toxicol Chem*, **1985**. 4(6): 721-726.
2. Croom, E., Metabolism of xenobiotics of human environments. *Prog Mol Biol Transl Sci*, **2012**. 112: 31-88.
3. Varsha, Y.M., C.H. Naga Deepthi, and S. Chenna, An emphasis on xenobiotic degradation in environmental clean up. *J Bioremed Biodegrad*, **2011**. S11(1).
4. Haritash, A.K. and C.P. Kaushik, Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J Hazard Mater*, **2009**. 169(1-3): 1-15.
5. Michalowicz, J. and R.O.W. Duda, Analysis of chlorophenols, chlorocatechols, chlorinated methoxyphenols and monoterpenes in communal sewage of Lodz and in the Ner River in 1999-2000. *Water Air Soil Poll*, **2005**. 164(1-4): 205-222.
6. Laine, M.M. and K.S. Jorgensen, Straw compost and bioremediated soil as inocula for the bioremediation of chlorophenol-contaminated soil. *Appl Environ Microb*, **1996**. 62(5): 1507-1513.
7. Schmid, S., Biodegradation of diaryl ether pesticides, in *Biodegradation of dioxins and furans*, R. Wittich, Editor., Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Jointly published with Landes Bioscience, Georgetown, USA. **1998**. 978-3-662-06068-1.
8. Swarts, H.J., F.J.M. Verhagen, J.A. Field, and J.B.P.A. Wijnberg, Trichlorinated phenols from *hypholoma elongatum*. *Phytochemistry*, **1998**. 49(1): 203-206.
9. Budavari, S., The Merck Index, 13th ed., ed. W. station. NJ, **2001**: Merck Co. 0-911910-13-1.
10. Schmidt, R.J., Industrial catalytic processes - phenol production. *Appl Catal a-Gen*, **2005**. 280(1): 89-103.
11. Michalowicz, J. and W. Duda, Phenols – Sources and Toxicity. *Pol J Environ Stud*, **2007**. 16(3): 347-362.
12. Bruce, R.M., J. Santodonato, and M.W. Neal, Summary review of the health effects associated with phenol. *Toxicol Ind Health*, **1987**. 3(4): 535-568.

13. Ertani, A., M. Schiavon, A. Altissimo, C. Franceschi, and S. Nardi, Phenol-containing organic substances stimulate phenylpropanoid metabolism in *Zea mays*. *J Plant Nutr Soil Sc*, **2011**. 174(3): 496-503.
14. Moiseeva, O.V., I.P. Solyanikova, S.R. Kaschabek, J. Groning, M. Thiel, L.A. Golovleva, and M. Schlomann, A new modified ortho cleavage pathway of 3-chlorocatechol degradation by *Rhodococcus opacus* 1CP: genetic and biochemical evidence. *J Bacteriol*, **2002**. 184(19): 5282-5292.
15. Michalowicz, J., The occurrence of chlorophenols, chlorocatechols and chlorinated methoxyphenols in drinking water of the largest cities in Poland. *Pol J Environ Stud*, **2005**. 14(3): 327-333.
16. Czaplicka, M., Sources and transformations of chlorophenols in the natural environment. *Sci Total Environ*, **2004**. 322(1-3): 21-39.
17. Hovander, L., T. Malmberg, M. Athanasiadou, I. Athanassiadis, S. Rahm, A. Bergman, and E.K. Wehler, Identification of hydroxylated PCB metabolites and other phenolic halogenated pollutants in human blood plasma. *Arch Environ Contam Toxicol*, **2002**. 42(1): 105-117.
18. Keith, L.H. and W.A. Telliard, Priority Pollutants I-a Perspective View. *Environ Sci Technol*, **1979**. 13(4): 416-423.
19. Pocurull, E., R.M. Marce, and F. Borrull, Determination of phenolic compounds in natural waters by liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detection after on-line trace enrichment. *J Chromatogr A*, **1996**. 738(1): 1-9.
20. Tallur, P.N., V.B. Megadi, C.M. Kamanavalli, and H.Z. Ninnekar, Biodegradation of p-cresol by *Bacillus sp.* strain PHN 1. *Curr Microbiol*, **2006**. 53(6): 529-533.
21. D'Ari, L. and H.A. Barker, p-Cresol formation by cell-free extracts of *Clostridium difficile*. *Arch Microbiol*, **1985**. 143(3): 311-312.
22. Re-Poppi, N. and M.R. Santiago-Silva, Identification of polycyclic aromatic hydrocarbons and methoxylated phenols in wood smoke emitted during production of charcoal. *Chromatographia*, **2002**. 55(7-8): 475-481.
23. Fiorentino, A., A. Gentili, M. Isidori, P. Monaco, A. Nardelli, A. Parrella, and F. Temussi, Environmental effects caused by olive mill wastewaters: Toxicity comparison of low-molecular-weight phenol components. *J Agr Food Chem*, **2003**. 51(4): 1005-1009.

24. McNamara, C.J., C.C. Anastasiou, V. O'Flaherty, and R. Mitchell, Bioremediation of olive mill wastewater. *Int Biodeter Biodegr*, **2008**. 61(2): 127-134.
25. Amaral, C., M. Lucas, A. Sampaio, J. Peres, A. Dias, F. Peixoto, R. Anjos, and C. Pais, Biodegradation of olive mill wastewaters by a wild isolate of *Candida oleophila*. *Int Biodeter Biodeg*, **2012**. 68: 45-50.
26. Hansch, C., S.C. McKarns, C.J. Smith, and D.J. Doolittle, Comparative QSAR evidence for a free-radical mechanism of phenol-induced toxicity. *Chem Biol Interact*, **2000**. 127(1): 61-72.
27. Boyd, E.M., K. Killham, and A.A. Meharg, Toxicity of mono-, di- and tri-chlorophenols to lux marked terrestrial bacteria, *Burkholderia* species Rasc c2 and *Pseudomonas fluorescens*. *Chemosphere*, **2001**. 43(2): 157-166.
28. Moridani, M.Y., A. Siraki, T. Chevaldina, H. Scobie, and P.J. O'Brien, Quantitative structure toxicity relationships for catechols in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact*, **2004**. 147(3): 297-307.
29. Tsutsui, T., N. Hayashi, H. Maizumi, J. Huff, and J.C. Barrett, Benzene-, catechol-, hydroquinone- and phenol-induced cell transformation, gene mutations, chromosome aberrations, aneuploidy, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells. *Mutat Res- Fund Mol M*, **1997**. 373(1): 113-123.
30. Hansch, C., S.C. McKarns, C.J. Smith, and D.J. Doolittle, Comparative QSAR evidence for a free-radical mechanism of phenol-induced toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, **2000**. 127(1): 61-72.
31. Patty, F.A., Industrial Hygiene and Toxicology. 2nd Revised Edition. Vol. II. Toxicology. **1963**: New York. London: John Wiley & Sons Ltd., Glen House, Stag Place, S.W.1. xxxi + 831-2377 pp.
32. Ford, M.D., L.J. Ling, R.L. Erickson, and K.A. Delany, Clinical Toxicology. W. B. Saunders Company: Philadelphia, pp. 753. **2001**.
33. Painter, R.B. and R. Howard, The Hela DNA-synthesis inhibition test as a rapid screen for mutagenic carcinogens. *Mutat Res*, **1982**. 92(1-2): 427-437.
34. Schweigert, N., A.J. Zehnder, and R.I. Eggen, Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environ Microbiol*, **2001**. 3(2): 81-91.

35. Amaral, C., M.S. Lucas, J. Coutinho, A.L. Crespi, M.D. Anjos, and C. Pais, Microbiological and physicochemical characterization of olive mill wastewaters from a continuous olive mill in Northeastern Portugal. *Bioresour Technol*, **2008**. 99(15): 7215-7223.
36. Asfi, M., G. Ouzounidou, S. Panajiotidis, I. Therios, and M. Moustakas, Toxicity effects of olive-mill wastewater on growth, photosynthesis and pollen morphology of spinach plants. *Ecotoxicol Environ Saf*, **2012**. 80: 69-75.
37. DellaGreca, M., P. Monaco, G. Pinto, A. Pollio, L. Previtiera, and F. Temussi, Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill waste waters. *Bull Environ Contam Toxicol*, **2001**. 67(3): 352-359.
38. Martins, F., J. Gomes-Laranjo, C. Amaral, J. Almeida, and F. Peixoto, Evaluation of olive oil mill wastewaters acute toxicity: A study on the mitochondrial bioenergetics. *Ecotoxicol Environ Saf*, **2008**. 69(3): 480-487.
39. Mekki, A., A. Dhouib, and S. Sayadi, Polyphenols dynamics and phytotoxicity in a soil amended by olive mill wastewaters. *J Environ Manage*, **2007**. 84(2): 134-140.
40. Vidali, M., Bioremediation. An overview. *Pure Appl Chem*, **2001**. 73(7): 1163-1172.
41. Mueller, J.G., C.E. Cerniglia, and P.H. Pritchard, Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons, in *Bioremediation: Principles and Applications*. Campridge University Press: Campridge. **1996** 125-194.
42. Boopathy, R., Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresour Technol*, **2000**. 74(1): 63-67.
43. Azubuike, C.C., C.B. Chikere, and G.C. Okpokwasili, Bioremediation techniques-classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World J Microbiol Biotechnol*, **2016**. 32(11): 180.
44. Frutos, F.J., R. Perez, O. Escolano, A. Rubio, A. Gimeno, M.D. Fernandez, G. Carbonell, C. Perucha, and J. Laguna, Remediation trials for hydrocarbon-contaminated sludge from a soil washing process: evaluation of bioremediation technologies. *J Hazard Mater*, **2012**. 199-200: 262-271.
45. Pandey, B. and M.H. Fulekar, Bioremediation technology: A new horizon for environmental clean-up (review). *Biology and Medicine*, **2012**. 4(1): 51-59.
46. Garcia-Delgado, C., I. Alfaro-Barta, and E. Eymar, Combination of biochar amendment and mycoremediation for polycyclic aromatic hydrocarbons

- immobilization and biodegradation in creosote-contaminated soil. *J Hazard Mater*, **2015**. 285: 259-266.
47. Dash, S. and H. Dash, Microbial Bioremediation: A Potential Tool for Restoration of Contaminated Areas, in *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, D. Surajit, Editor., Elsevier. **2014** 11-12. 978-0-12-800021-2.
 48. Paul, D., G. Pandey, J. Pandey, and R.K. Jain, Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. *Trends Biotechnol*, **2005**. 23(3): 135-142.
 49. Van Hamme, J., Bioavailability and biodegradation of organic pollutants - A microbial perspective, in *Biodeg Bioremed*. Springer-Vedag: New York. **2004** 37-39. 978-3-642-05929-2.
 50. Alexander, M., Biodegradation and Bioremediation 2nd edition, ed. A. Press. San Diego, **1999**. 9780080916378.
 51. Diaz, E., Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int Microbiol* **2004**. 7: 173-180.
 52. Ellis, L.B., C.D. Hershberger, E.M. Bryan, and L.P. Wackett, The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: emphasizing enzymes. *Nucleic Acids Res*, **2001**. 29(1): 340-343.
 53. Van Schie, P.M. and L.Y. Young, Biodegradation of Phenol: Mechanisms and Applications. *Bioremediat J*, **2000**. 4(1): 1-18.
 54. Gurujeyalekshmi, G. and P. Oreil, Isolation of phenol degrading *Bacillus stearothermophilus* and partial characterization of the phenol hydroxylase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1988**. 55(2): 500-502.
 55. Burton, S.G., J.R. Duncan, P.T. Kaye, and P.D. Rose, Activity of mushroom polyphenol oxidase in organic medium. *Biotechnol Bioeng*, **1993**. 42(8): 938-944.
 56. Shashirekha, S., L. Uma, and G. Subramanian, Phenol degradation by the marine cyanobacterium *Phormidium valderianum* BDU 30501. *J Ind Microbiol Biot*, **1997**. 19(2): 130-133.
 57. Garzillo, A.M.V., M.C. Colao, C. Caruso, C. Caporale, D. Celletti, and V. Buonocore, Laccase from the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Appl Microbiol Biot*, **1998**. 49(5): 545-551.

58. Li, L. and J.C. Steffens, Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*, **2002**. 215(2): 239-247.
59. Johjima, T., M. Ohkuma, and T. Kudo, Isolation and cDNA cloning of novel hydrogen peroxide-dependent phenol oxidase from the basidiomycete *Termitomyces albuminosus*. *Appl Microbiol Biot*, **2003**. 61(3): 220-225.
60. Ghioureliotis, M. and J.A. Nicell, Assessment of soluble products of peroxidase-catalyzed polymerization of aqueous phenol. *Enzyme Microb Tech*, **1999**. 25(3-5): 185-193.
61. Kadhim, H., C. Graham, P. Barratt, C.S. Evans, and R.A. Rastall, Removal of phenolic compounds in water using *Coriolus versicolor* grown on wheat bran. *Enzyme Microb Tech*, **1999**. 24(5-6): 303-307.
62. Schneider, P., M.B. Caspersen, K. Mondorf, T. Halkier, L.K. Skov, P.R. Ostergaard, K.M. Brown, S.H. Brown, and F. Xu, Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. *Enzyme Microb Tech*, **1999**. 25(6): 502-508.
63. Hublik, G. and F. Schinner, Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme Microb Tech*, **2000**. 27(3-5): 330-336.
64. Robles, A., R. Lucas, G.A. de Cienfuegos, and A. Galvez, Phenol-oxidase (laccase) activity in strains of the hyphomycete *Chalara paradoxa* isolated from olive mill wastewater disposal ponds. *Enzyme Microb Tech*, **2000**. 26(7): 484-490.
65. Quan, X.C., H.C. Shi, Y.M. Zhang, H.L. Wang, and Y. Qian, Biodegradation of 2,4-dichlorophenol and phenol in an airlift inner-loop bioreactor immobilized with *Achromobacter sp.* *Sep Purif Technol*, **2004**. 34(1-3): 97-103.
66. Zhou, W.G., W.B. Guo, H.B. Zhou, and X.H. Chen, Phenol degradation by *Sulfobacillus acidophilus* TPY via the meta-pathway. *Microbiol Res*, **2016**. 190: 37-45.
67. Williams, P.A. and J.R. Sayers, The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. *Biodegradation*, **1994**. 5(3-4): 195-217.
68. Hsieh, F.M., C. Huang, T.F. Lin, Y.M. Chen, and J.C. Lin, Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation. *Process Biochem*, **2008**. 43(1): 83-92.

69. El-Naas, M.H., S. Al-Zuhair, and S. Makhlof, Continuous biodegradation of phenol in a spouted bed bioreactor (SBBR). *Chem Eng J*, **2010**. 160(2): 565-570.
70. Loh, K.C. and B. Cao, Paradigm in biodegradation using *Pseudomonas putida* - A review of proteomics studies. *Enzyme Microb Tech*, **2008**. 43(1): 1-12.
71. Fuchs, G., M. El Said Mohamed, U. Altenschmidt, J. Koch, A. Lack, R. Brackmann, C. Lochmeyer, and B. Oswald, Biochemistry of anaerobic biodegradation of aromatic compounds, in *Biochemistry of microbial degradation*, C. Ratledge, Editor., Springer Netherlands: Dordrecht. **1994** 513-553. 978-94-011-1687-9.
72. Lack, A. and G. Fuchs, Evidence that phenol phosphorylation to phenylphosphate is the first step in anaerobic phenol metabolism in a denitrifying *Pseudomonas sp.* *Arch Microbiol*, **1994**. 161(2): 132-139.
73. Koch, J. and G. Fuchs, Enzymatic reduction of benzoyl-CoA to alicyclic compounds, a key reaction in anaerobic aromatic metabolism. *Eur J Biochem*, **1992**. 205(1): 195-202.
74. Field, J.A., A.J. Stams, M. Kato, and G. Schraa, Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **1995**. 67(1): 47-77.
75. Nakagawa, H. and Y. Takeda, Phenol hydroxylase. *Biochim Biophys Acta*, **1962**. 62: 423-426.
76. Ahamad, P.Y.A., A.A.M. Kunhi, and S. Divakar, New metabolic pathway for o-cresol degradation by *Pseudomonas sp.* CP4 as evidenced by ¹H NMR spectroscopic studies. *World J Microbiol Biotechnol*, **2001**. 17: 371-377.
77. Dagley, S. and D.T. Gibson, The Bacterial Degradation of Catechol. *Biochem J*, **1965**. 95: 466-474.
78. Bayly, R.C., S. Dagley, and D.T. Gibson, The metabolism of cresols by species of *Pseudomonas*. *Biochem J*, **1966**. 101(2): 293-301.
79. Bayly, R.C. and S. Dagley, Oxoenic acids as metabolites in the bacterial degradation of catechols. *Biochem J*, **1969**. 111(3): 303-307.
80. Ribbons, D.W., Metabolism of omicron-cresol by *Pseudomonas aeruginosa* strain T1. *J Gen Microbiol*, **1966**. 44(2): 221-231.

81. Wojcieszńska, D., K. Hupert-Kocurek, I. Greń, and U. Guzik, High activity catechol 2,3-dioxygenase from the cresols – Degrading *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2. *Int Biodeter Biodeg*, **2011**. 65(6): 853-858.
82. Fritsche, W. and M. Hofrichter, Aerobic Degradation by Microorganisms, in *Biotechnology Set*. **2008**.
83. Tsai, S.Y. and R.S. Juang, Biodegradation of phenol and sodium salicylate mixtures by suspended *Pseudomonas putida* CCRC 14365. *J Hazard Mater*, **2006**. 138(1): 125-132.
84. Thomas, J.M. and C.H. Ward, Biotechnology for in situ restoration of ground water contaminated by the petroleum industry. *Schriftenr Ver Wasser Boden Lufthyg*, **1989**. 80: 345-365.
85. Annadurai, G., L.Y. Ling, and J.F. Lee, Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *J Hazard Mater*, **2008**. 151(1): 171-178.
86. Gibson, D. and V. Subramanian, Microbial Degradation of aromatic hydrocarbons., in *Microbial Degradation of Organic Compounds*, G. DT, Editor., Marcel Dekker: New York. **1984** 361-369.
87. Subashchandrabose, S.R., B. Ramakrishnan, M. Megharaj, K. Venkateswarlu, and R. Naidu, Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential. *Biotechnol Adv*, **2011**. 29(6): 896-907.
88. Nicholls, D.G. and S.J. Ferguson, Introduction to Part 1, in *Bioenergetics (Fourth Edition)*, D.G. Nicholls and S.J. Ferguson, Editors., Academic Press: Boston. **2013** 1-2. 978-0-12-388425-1.
89. Madigan, M.T., Brock biology of microorganisms. **2012**. 9780321649638 032164963X 9780321726759 0321726758.
90. Maier, R.M., Chapter 3 - Bacterial growth, in *Environmental Microbiology (Second Edition)*, R.M. Maier, I.L. Pepper, and C.P. Gerba, Editors., Academic Press: San Diego. **2009** 37-54. 978-0-12-370519-8.
91. Yates, G.T. and T. Smotzer, On the lag phase and initial decline of microbial growth curves. *J Theor Biol*, **2007**. 244(3): 511-517.

92. Neidhardt, J., L. Ingraham, and M. Schaechter, Physiology of the bacterial cell. A molecular approach., ed. S. associate. Vol. 20. Sunderland, MA., **1992**. 124-125. 0–87893–608–4.
93. Liu, Y., Bioenergetic interpretation on the So/Xo ratio in substrate-sufficient batch culture. . *Water Res*, **1996**. 30(11): 2766-2770.
94. Al-Khalid, T. and M.H. El-Naas, Aerobic biodegradation of phenols: A comprehensive review. *Crit Rev Env Sci Tec*, **2012**. 42(16): 1631-1690.
95. López Buriticá, K., S. Casanova Trujillo, C. Acosta-Medina, and H. Granada D, Dynamical analysis of a continuous stirred-tank reactor with the formation of biofilms for wastewater treatment. *Math Probl Eng*, **2015**. 2015: 1-10.
96. Pirt, S.J., The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **1965**. 163(991): 224-231.
97. Russell, J. and G. Cook, The maintenance energy of bacteria in growing cultures. Proceedings of the Royal Society of London Series B. *Microbiol Rev*, **1995**. 59(1): 48-62.
98. Liu , Y., G. Chen, and E. Paul, Effect of the So/Xo ratio on energy uncoupling in substrate-sufficient batch culture of activated sludge. . *Water Res*, **1998**. 32(10): 2883-2888.
99. G. Marr, A., E. H. Nilson, and D. J. Clark, The maintenance requirement of *Escherichia coli*. *Ann. NY Acad Sci*, **2006**. 102(3): 536-548.
100. Van Bodegom, P., Microbial maintenance: a critical review on its quantification. *Microb Ecol*, **2007**. 53(4): 513-523.
101. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, Βιοχημεία, ed. Π.Ε. Κρήτης. Ηράκλειο, **2001**.
102. Reece, J.B., L.A. Urry, M.L. Cain, S.A. Wasserman, P.V. Minorsky, R.B. Jackson, and N.A. Campbell, Campbell Biology. 10th ed. Boston, **2014**: Pearson. 978-0321775658.
103. Campbell, M.K. and S.O. Farrell, Biochemistry. 6th ed. United States, **2009**: Thomson. 9780495390411.
104. Strasser , B. and R. Strasser, Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test Vol V. Kluwer Academic Press, Dordrecht. **1995**.

105. Strasser, R., A. Srivastava, and M. Tsimilli-Michael, The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. *Probing photosynthesis : mechanism, regulation & adaptation*, **2000**.
106. Kautsky, H. and A. Hirsch, Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften*, **1931**. 19(96).
107. Strasser, B.J. and R.J. Strasser, Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP test., in *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, P. Mathis, Editor., Kluwer Academic: The Netherlands. **1995** 977–980.
108. Laisk, A. and V. Oja, Kinetics of photosystem II electron transport: a mathematical analysis based on chlorophyll fluorescence induction. *Photosynth Res*, **2018**. 136(1): 63-82.
109. Kalaji, H.M., et al., Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynth Res*, **2014**. 122(2): 121-158.
110. Leliaert, F. and et al., Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Crit Rev Plant Sci*, **2012**. 31(1): 1-46.
111. Gantt, E. and S.F. Conti, The ultrastructure of *Porphyridium cruentum*. *J Cell Biol*, **1965**. 26(2): 365-381.
112. Edvardsen, B., W. Eikrem, J.C. Green, R.A. Andersen, S.Y.M. Van der Staay, and L.K. Medlin, Phylogenetic reconstructions of the Haptophyta inferred from 18S ribosomal DNA sequences and available morphological data. *Phycologia*, **2000**. 39(1): 19-35.
113. Oswald, W. and H.B. Gotaas, Photosynthesis in sewage treatment. *Trans. A. Soc. Civil Eng.*, **1957**. 122: 73-105.
114. De-Bashan, L.E. and Y. Bashan, Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresour Technol*, **2010**. 101(6): 1611-1627.
115. Park, J.B., R.J. Craggs, and A.N. Shilton, Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresour Technol*, **2011**. 102(1): 35-42.
116. Tikoo, V., A.H. Scragg, and S.W. Shales, Degradation of pentachlorophenol by microalgae. *J Chem Tech Biotechnol*, **1997**. 68: 425-431.
117. Ellis, B.E., Degradation of phenolic compounds by fresh-water algae. *Plant Science Letters*, **1977**. 8: 213-216.

118. Semple, K.T. and R.B. Cain, Biodegradation of phenols by the alga *Ochromonas danica*. *Appl Environ Microbiol*, **1996**. 62(4): 1265-1273.
119. Thies, F., T. Backhaus, B. Bossmann, and L.H. Grimme, Xenobiotic biotransformation in unicellular green algae. Involvement of cytochrome P450 in the activation and selectivity of the pyridazinone pro-herbicide metflurazon. *Plant Physiol*, **1996**. 112(1): 361-370.
120. Lovell, C.R., N.T. Eriksen, A.J. Lewitus, and Y.P. Chen, Resistance of the marine diatom *Thalassiosira sp.* to toxicity of phenolic compounds. *Mar Ecol Prog Ser*, **2002**. 229: 11-18.
121. Pinto, G., A. Pollio, L. Previtiera, and F. Temussi, Biodegradation of phenols by microalgae. *Biotechnol Lett*, **2002**. 24: 2047-2051.
122. Klekner, V. and N. Kosaric, Degradation of phenolic mixtures by *Chlorella*. *Environ Technol*, **1992**. 13: 503-506.
123. Hirooka, T., Y. Akiyama, N. Tsuji, T. Nakamura, H. Nagase, K. Hirata, and K. Miyamoto, Removal of hazardous phenols by microalgae under photoautotrophic conditions. *J Biosci Bioeng*, **2003**. 95(2): 200-203.
124. Tsuji, N., T. Hirooka, H. Nagase, K. Hirata, and K. Miyamoto, Photosynthesis-dependent removal of 2,4-dichlorophenol by *Chlorella fusca* var. *vacuolata*. *Biotechnol Lett*, **2003**. 25(3): 241-244.
125. Lima, S.A., M.F. Raposo, P.M. Castro, and R.M. Morais, Biodegradation of p-chlorophenol by a microalgae consortium. *Water Res*, **2004**. 38(1): 97-102.
126. Nakajima, N., T. Teramoto, F. Kasai, T. Sano, M. Tamaoki, M. Aono, A. Kubo, H. Kamada, Y. Azumi, and H. Saji, Glycosylation of bisphenol A by freshwater microalgae. *Chemosphere*, **2007**. 69(6): 934-941.
127. Zhou, G.J., F.Q. Peng, B. Yang, and G.G. Ying, Cellular responses and bioremoval of nonylphenol and octylphenol in the freshwater green microalga *Scenedesmus obliquus*. *Ecotoxicol Environ Saf*, **2013**. 87: 10-16.
128. Papazi, A. and K. Kotzabasis, Inductive and resonance effects of substituents adjust the microalgal biodegradation of toxic phenolic compounds. *J Biotechnol*, **2008**. 135(4): 366-373.

129. 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): e51852.
130. 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): 706-716.
131. Lika, K. and I.A. Papadakis, Modeling the biodegradation of phenolic compounds by microalgae. *J Sea Res*, **2009**. 62: 135-146.
132. Ji, M.-K., A.N. Kabra, J. Choi, J.-H. Hwang, J.R. Kim, R.A.I. Abou-Shanab, Y.-K. Oh, and B.-H. Jeon, Biodegradation of bisphenol A by the freshwater microalgae *Chlamydomonas mexicana* and *Chlorella vulgaris*. *Ecol Eng*, **2014**. 73: 260-269.
133. Das, B., T.K. Mandal, and S. Patra, A Comprehensive Study on *Chlorella pyrenoidosa* for Phenol Degradation and its Potential Applicability as Biodiesel Feedstock and Animal Feed. *Appl Biochem Biotechnol*, **2015**. 176(5): 1382-1401.
134. Delrue, F., P. Álvarez-Díaz, S. Fon-Sing, G. Fleury, and J.-F. Sassi, The environmental biorefinery: Using microalgae to remediate wastewater, a win-win paradigm. *Energies*, **2016**. 9: 132-151.
135. Otto, B. and D. Schlosser, First laccase in green algae: purification and characterization of an extracellular phenol oxidase from *Tetracystis aeria*. *Planta*, **2014**. 240(6): 1225-1236.
136. Papazi, A. and K. Kotzabasis, "Rational" management of dichlorophenols biodegradation by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *PLoS One*, **2013**. 8(4): e61682.
137. Papazi, A., E. Andronis, N.E. Ioannidis, N. Chaniotakis, and K. Kotzabasis, High yields of hydrogen production induced by meta-substituted dichlorophenols biodegradation from the green alga *Scenedesmus obliquus*. *PLoS One*, **2012**. 7(11): e49037.
138. Papazi, A., A. Ioannou, M. Symeonidi, G. Doulis Andreas, and K. Kotzabasis, Bioenergetic strategy of microalgae for the biodegradation of tyrosol and hydroxytyrosol. *Z Naturforsch C*, **2017**. 72(5-6): 227-236.

139. Goodenough, U.W., E.V. Armbrust, A.M. Campbell, and P.J. Ferris, Molecular-genetics of sexuality in *Chlamydomonas*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **1995**. 46: 21-44.
140. Merchant, S.S., et al., The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, **2007**. 318(5848): 245-250.
141. Harris, E., The *Chlamydomonas* sourcebook: Introduction to *Chlamydomonas* and its laboratory use., in *The Chlamydomonas sourcebook*. Academic Press: Canada. **2009**.
142. Rochaix, J., A. Goldschmidt- Clermont, and S. Merchant, The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in *Chlamydomonas*, in *Advances in Photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Netherlands. **1998** 7.
143. Johnson, X. and J. Alric, Central carbon metabolism and electron transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch. *Eukaryot Cell*, **2013**. 12(6): 776-793.
144. Hippler, M., K. Redding, and J.D. Rochaix, *Chlamydomonas* genetics, a tool for the study of bioenergetic pathways. *Biochim Biophys Acta*, **1998**. 1367(1-3): 1-62.
145. Catalanotti, C., W. Yang, M.C. Posewitz, and A.R. Grossman, Fermentation metabolism and its evolution in algae. *Front Plant Sci*, **2013**. 4: 150.
146. Heifetz, P.B., B. Forster, C.B. Osmond, L.J. Giles, and J.E. Boynton, Effects of acetate on facultative autotrophy in *Chlamydomonas reinhardtii* assessed by photosynthetic measurements and stable isotope analyses. *Plant Physiol*, **2000**. 122(4): 1439-1445.
147. Endo, T. and K. Asada, Dark Induction of the non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence by acetate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol*, **1996**. 37(4): 551-555.
148. Kodru, S., T. Malavath, E. Devadasu, S. Nellaepalli, A. Stirbet, R. Subramanyam, and Govindjee, The slow S to M rise of chlorophyll a fluorescence reflects transition from state 2 to state 1 in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth Res*, **2015**. 125(1-2): 219-231.
149. Johnson, X. and J. Alric, Interaction between starch breakdown, acetate assimilation, and photosynthetic cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem*, **2012**. 287(31): 26445-26452.

150. Subashchandrabose, S.R., B. Ramakrishnan, M. Megharaj, K. Venkateswarlu, and R. Naidu, Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation. *Environ Int*, **2013**. 51: 59-72.
151. Sueoka, N., Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardi*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1960**. 46(1): 83-91.
152. Senger, H. and G. Brinkmann, Protochlorophyll(ide) accumulation and degradation in the dark and photoconversion to chlorophyll in the light in pigment mutant C-2A' of *Scenedesmus obliquus*. *Physiol Plantarum*, **1986**. 68: 119-124.
153. Basak, B., B. Bhunia, S. Dutta, S. Chakraborty, and A. Dey, Kinetics of phenol biodegradation at high concentration by a metabolically versatile isolated yeast *Candida tropicalis* PHB5. *Environ Sci Pollut Res*, **2014**. 21: 1444-1454.
154. Wellburn, A., The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution *J Plant Physiol*, **1994**. 144: 307-313.
155. Clark, L.C., Jr., R. Wolf, D. Granger, and Z. Taylor, Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J Appl Physiol*, **1953**. 6(3): 189-193.
156. Delieu, T., Walker, D.A., Polarographic measurements of photosynthetic oxygen evolution by leaf disks. *New Phytol*, **1981**. 89: 165-178.
157. Forrest, W.W., Energetic aspects of microbial growth, in *Microbial Energetics*. Cambridge University Press: London. **1969** 65-86.
158. Couso, I., M.E. Pérez-Pérez, E. Martínez-Force, H.-S. Kim, Y. He, J.G. Umen, and J.L. Crespo, Autophagic flux is required for the synthesis of triacylglycerols and ribosomal protein turnover in *Chlamydomonas*. *J Exp Bot.*, **2018**. 69(6): 1355-1367.
159. He, C. and D.J. Klionsky, Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*, **2009**. 43: 67-93.
160. Mizushima, N., T. Yoshimori, and Y. Ohsumi, The role of ATG proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **2011**. 27: 107-132.
161. Li, F. and R.D. Vierstra, Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends Plant Sci*, **2012**. 17(9): 526-537.
162. Liu, Y. and D.C. Bassham, Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annu Rev Plant Biol*, **2012**. 63: 215-237.

163. Perez-Perez, M.E., I. Couso, and J.L. Crespo, Carotenoid deficiency triggers autophagy in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Autophagy*, **2012**. 8(3): 376-388.
164. Goodson, C., R. Roth, Z.T. Wang, and U. Goodenough, Structural correlates of cytoplasmic and chloroplast lipid body synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and stimulation of lipid body production with acetate boost. *Eukaryot Cell*, **2011**. 10(12): 1592-1606.
165. Goodenough, U., et al., The path to triacylglyceride obesity in the sta6 strain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell*, **2014**. 13(5): 591-613.
166. Davey, M.P., I. Horst, G.H. Duong, E.V. Tomsett, A.C. Litvinenko, C.J. Howe, and A.G. Smith, Triacylglyceride production and autophagous responses in *Chlamydomonas reinhardtii* depend on resource allocation and carbon source. *Eukaryot Cell*, **2014**. 13(3): 392-400.
167. W. Binkley, R., G. W. Dillow, T. Flechtner, W. Winnik, and M. J. S. Tevesz, Fragmentation of collisionally activated hydroxyphenoxide anions in the gas phase. *Org Mass Spectrom*, **1994**. 29(9): 491-495.
168. Navakoudis, E., C. Lutz, C. Langebartels, U. Lutz-Meindl, and K. Kotzabasis, Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines. *BBA-Gen Subjects*, **2003**. 1621(2): 160-169.
169. Russell, J.B. and G.M. Cook, Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol Rev*, **1995**. 59(1): 48-62.
170. Wurster, M., S. Mundt, E. Hammer, F. Schauer, and U. Lindequist, Extracellular degradation of phenol by the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7002. *J Appl Phycol*, **2003**. 15(2): 171-176.
171. Lee, H.-C., M. Lee, and W. Den, *Spirulina maxima* for phenol removal: study on its tolerance, biodegradability and phenol-carbon assimilability. *Water Air Soil Poll*, **2015**. 226(12): 395-406.
172. Wang, L., C. Xue, L. Wang, Q. Zhao, W. Wei, and Y. Sun, Strain improvement of *Chlorella* sp. for phenol biodegradation by adaptive laboratory evolution. *Bioresour Technol*, **2016**. 205: 264-268.
173. Hopper, D.J. and D.G. Taylor, Pathways for the degradation of *m*-cresol and *p*-cresol by *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol*, **1975**. 122(1): 1-6.

174. Fujii, A., E. Fujimaki, T. Ebata, and N. Mikami, A new type of intramolecular hydrogen bonding: hydroxyl–methyl interactions in the *o*-cresol cation. *J Am Chem Soc*, **1998**. 120(50): 13256-13257.
175. Karel, S.F., S.B. Libicki, and C.R. Robertson, The immobilization of whole cells: Engineering principles. *Chem Eng Sci*, **1985**. 40(8): 1321-1354.
176. Willaert, R., Cell Immobilization and its applications in biotechnology, in *Fermentation Microbiology and Biotechnology*, E.M.T. El-Mansi, C.F.A. Bryce, A.L. Demain, and A.R. Allman, Editors., CRC Press: Boca Raton. **2011** 313-367. 978-1-4398-5579-9.
177. Sun, J. and H. Tan, Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. *Materials (Basel)*, **2013**. 6(4): 1285-1309.
178. Matsubara, Y., R. Kawada, K.-I. Iwasaki, Y. Kimura, T. Oda, and T. Muramatsu, Cloning and sequence analysis of a gene (aly PG) encoding poly(α -l-gulonate)lyase from *Corynebacterium sp.* strain ALY-1. *J Biosci Bioeng*, **2000**. 89(2): 199-202.
179. Meera, G. and T.E. Abraham, Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *J Control Release*, **2006**. 114(1): 1-14.
180. Wee, S. and W.R. Gombotz, Protein release from alginate matrices. *Adv Drug Deliv Rev*, **1998**. 31(3): 267-285.
181. Østgaard, K., S.H. Knutsen, N. Dyrset, and I.M. Aasen, Production and characterization of guluronate lyase from *Klebsiella pneumoniae* for applications in seaweed biotechnology. *Enzyme Microb Tech*, **1993**. 15(9): 756-763.
182. De Vos, P., H.A. Lazarjani, D. Poncelet, and M.M. Faas, Polymers in cell encapsulation from an enveloped cell perspective. *Adv Drug Deliver Rev*, **2014**. 67-68: 15-34.
183. Paredes, J.G.A., M. Spasojevic, M.M. Faas, and P. De Vos, Immunological and technical considerations in application of alginate-based microencapsulation systems. *Front Bioeng Biotechnol*, **2014**. 2(26): 1-15.
184. Rees, D.A. and E.J. Welsh, Secondary and Tertiary Structure of Polysaccharides in Solutions and Gels. *Angew Chem Int Edit*, **1977**. 16(4): 214-223.
185. Smidsrod, O., A. Haug, and B. Lian, Properties of poly(1,4-haxuronates) in the gel state. I. Evaluation of a method for the determination of stiffness. *Acta Chem. Scand.*, **1972**. 26: 71-78.

186. Kim, H.S., C.-G. Lee, and E.Y. Lee, Alginate lyase: Structure, property, and application. *Biotechnol Bioproc E*, **2011**. 16(5): 843-851.
187. Martinsen, A., G. Skjåk-Bræk, and O. Smidsrød, Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng*, **1989**. 33(1): 79-89.
188. Smidsrød, O., Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state. *Faraday Discuss Chem Soc*, **1974**. 57(0): 263-274.
189. Badwan, A.A., A. Abumaloo, E. Sallam, A. Abukalaf, and O. Jawan, A sustained-release drug delivery system using calcium alginate beads. *Drug Dev Ind Pharm*, **1985**. 11(2-3): 239-256.
190. Nandini, V., K. Venkatesh, and K. Nair, Alginate impressions: A practical perspective. *J Conserv Dent*, **2008**. 11(1): 37-41.
191. Willaert Ronnie, G. and V. Baron Gino, Gel entrapment and micro-encapsulation: methods, applications and engineering principles. *Rev Chem Eng*, **1996**. 12(1-2): 1-205.
192. Shapiro, J.A., Scanning electron microscope study of *Pseudomonas putida* colonies. *J Bacteriol*, **1985**. 164(3): 1171-1181.
193. Shapiro, J.A., Organization of developing *Escherichia coli* colonies viewed by scanning electron microscopy. *Journal of Bacteriology*, **1987**. 169(1): 142-156.
194. Keweloh, H., H.-J. Heipieper, and H.-J. Rehm, Protection of bacteria against toxicity of phenol by immobilization in calcium alginate. *Appl Microb Biot*, **1989**. 31(4): 383-389.
195. Moreira, S.M., M. Moreira-Santos, L. Guilhermino, and R. Ribeiro, Immobilization of the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum* in alginate for in situ experiments: Bead stability and suitability. *Enzyme Microb Tech*, **2006**. 38(1): 135-141.
196. Bandhyopadhyay, K., D. Das, P. Bhattacharyya, and B.R. Maiti, Reaction engineering studies on biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* MTCC 1194 immobilized on calcium alginate. *Biochem Eng J*, **2001**. 8(3): 179-186.
197. Nul Hakim, L., R. Rochmadi, and S. Sutijan, Phenol biodegradation by immobilized *Pseudomonas putida* FNCC-0071 cells in alginate beads. *AIP Conference Proceedings*, **2017**. 1855(1): 050004.050001-050009.

198. Surkatti, R. and M.H. El-Naas, Biological treatment of wastewater contaminated with p-cresol using *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel. *J Wat Proc Eng*, **2014**. 1: 84-90.
199. Uchiyama, H., K. Oguri, M. Nishibayashi, E. Kokufuta, and O. Yagi, Trichloroethylene degradation by cells of a methane-utilizing bacterium, *Methylocystis sp M*, immobilized in calcium alginate. *J Ferment Bioeng*, **1995**. 79(6): 608-613.
200. Zhang, K., Y. Xu, X. Hua, H. Han, J. Wang, J. Wang, Y. Liu, and Z. Liu, An intensified degradation of phenanthrene with macroporous alginate–lignin beads immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem Eng J*, **2008**. 41(3): 251-257.
201. De-Bashan, L., Y. Bashan, M. Moreno Legorreta, V. K Lebsky, and J. Bustillos, Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella spp.* when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can J Microbiol*, **2002**. 48(6): 514-521.
202. De-Bashan, L.E., J.-P. Hernandez, T. Morey, and Y. Bashan, Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Res*, **2004**. 38(2): 466-474.
203. Bailliez, C., C. Largeau, and E. Casadevall, Growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* immobilized in calcium alginate gel. *Appl Microb Biot*, **1985**. 23(2): 99-105.
204. Bailliez, C., C. Largeau, C. Berkaloff, and E. Casadevall, Immobilization of *Botryococcus braunii* in alginate: influence on chlorophyll content, photosynthetic activity and degeneration during batch cultures. *Appl Microb Biot*, **1986**. 23(5): 361-366.
205. Lau, P.S., N.F.Y. Tam, and Y.S. Wong, Effect of carrageenan immobilization on the physiological activities of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technol*, **1998**. 63(2): 115-121.
206. Mallick, N., Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *Biometals*, **2002**. 15(4): 377-390.

207. León, R., J.A. Pizzano, and F. Galván, Studies of cell viability of immobilized *Chlamydomonas reinhardtii* and glycerol photoproduction, in *Progress in Biotechnology*, R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke, and J. Tramper, Editors., Elsevier. **1996** 221-228. 0921-0423.
208. Santos-Rosa, F. and F. Galván, Ammonium photoproduction by free and immobilized cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Microbiol Biot*, **1989**. 31(1): 55-58.
209. Santos-Rosa, F., F. Galván, and J.M. Vega, Biological viability of *Chlamydomonas reinhardtii* cells entrapped in alginate beads for ammonium photoproduction. *J Biotechnol*, **1989**. 9(3): 209-219.
210. Vílchez, M.J., J. Vígara, I. Garbayo, and C. Vílchez, Electron microscopic studies on immobilized growing *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Enzyme MicrobTech*, **1997**. 21(1): 45-47.
211. Marrot, B., A. Barrios-Martinez, P. Moulin, and N. Roche, Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an immersed membrane bioreactor. *Biochem Eng J*, **2006**. 30(2): 174-183.
212. Monica, S., K. Loganathan, S. Mythili, and S. A., Formulation of effective microbial consortia and its application for sewage treatment. *J Microb Biochem Technol*, **2011**. 3: 51-55.
213. Korrapati, N., P. Sreenivasa Rao, and V. A.Venu, Isolation and identification of bacterial strains and study of their resistance to heavy metals and antibiotics. *J Microbial Biochem Technol*, **2010**. 2: 74-76.
214. Baek, S.H., K.H. Kim, C.R. Yin, C.O. Jeon, W.T. Im, K.K. Kim, and S.T. Lee, Isolation and characterization of bacteria capable of degrading phenol and reducing nitrate under low-oxygen conditions. *Curr Microbiol*, **2003**. 47(6): 462-466.
215. Kafilzadeh, F., M.S. Farhangdoost, and Y. Tahery, Isolation and identification of phenol degrading bacteria from Lake Parishan and their growth kinetic assay. *Afr J Biotechnol*, **2010**. 9(40): 6721-6726.
216. Ajaz, M., N. Noor, S.A. Rasool, and S.A. Khan, Phenol resistant-bacteria from soil: Identification-characterization and genetical studies. *Pak J Bot*, **2004**. 36(2): 415-424.
217. Lu, X., X.-X. Zhang, Z. Wang, K. Huang, Y. Wang, W. Liang, Y. Tan, B. Liu, and J. Tang, Bacterial pathogens and community composition in advanced sewage treatment

- systems revealed by metagenomics analysis based on high-throughput sequencing. *Plos One*, **2015**. 10(5): e0125549.
218. Shchegolkova, N.M., G.S. Krasnov, A.A. Belova, A.A. Dmitriev, S.L. Kharitonov, K.M. Klimina, N.V. Melnikova, and A.V. Kudryavtseva, Microbial Community Structure of Activated Sludge in Treatment Plants with Different Wastewater Compositions. *Front Microbiol*, **2016**. 7(90): 1-15.
219. Perez-Garcia, O., F.M.E. Escalante, L.E. De-Bashan, and Y. Bashan, Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res*, **2011**. 45(1): 11-36.
220. Liu, L., G. Pohnert, and D. Wei, Extracellular metabolites from industrial microalgae and their biotechnological potential. *Mar Drugs*, **2016**. 14(10): 191-210.
221. Costas, E., E. Carrillo, L.M. Ferrero, M. Agrelo, L. Garcia-Villada, J. Juste, and V. López-Rodas, Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: the ecological genetics of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea herbicide. *Phycologia*, **2001**. 40(5): 391-398.
222. Lopez-Rodas, V., E. Carrillo, L. Ferrero, A. Larrauri, E. Costas, M. Agrelo, and L. Martín-Otero, Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *Eur J Phycol*, **2001**. 36: 179-190.
223. Belfiore, N.M. and S.L. Anderson, Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutat Res-Rev Mutat*, **2001**. 489(2): 97-122.
224. García-Balboa, C., B. Baselga-Cervera, A. García-Sánchez, J.M. Igual, V. Lopez-Rodas, and E. Costas, Rapid adaptation of microalgae to bodies of water with extreme pollution from uranium mining: An explanation of how mesophilic organisms can rapidly colonise extremely toxic environments. *Aquat Toxicol*, **2013**. 144-145: 116-123.
225. García-Villada, L., V. López-Rodas, E. Bañares-España, A. Flores-Moya, M. Agrelo, L. Martín-Otero, and E. Costas, Evolution of microalgae in highly stressing environments: an experimental model analyzing the rapid adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* (chlorophyceae) from sensitivity to resistance against 2,4,6-trinitrotoluene by rare preselective mutations. *J Phycol*, **2002**. 38(6): 1074-1081.

226. López-Rodas, V., E. Costas, and E. Maneiro, Adaptation of cyanobacteria and microalgae to extreme environmental changes derived from anthropogenic pollution. *Limnetica*, **2006**. 25(1-2): 403-410.
227. Lavergne, J., Mode of action of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea. Evidence that the inhibitor competes with plastoquinone for binding to a common site on the acceptor side of Photosystem II. *BBA-Bioenergetics*, **1982**. 682(3): 345-353.
228. Trubitsin, B.V., A.V. Vershubskii, V.I. Priklonskii, and A.N. Tikhonov, Short-term regulation and alternative pathways of photosynthetic electron transport in *Hibiscus rosa-sinensis* leaves. *J Photoc Photobio B*, **2015**. 152: 400-415.
229. Schwalbe, R., L. Steele-Moore, and A.C. Goodwin, Antimicrobial susceptibility testing protocols. New York, **2007**: CRC Press.
230. Finberg, R.W., et al., The importance of bactericidal drugs: future directions in infectious disease. *Clin Infect Dis*, **2004**. 39(9): 1314-1320.
231. Misumi, M. and N. Tanaka, Mechanism of inhibition of translocation by kanamycin and viomycin: A comparative study with fusidic acid. *Biochem Bioph Res Com*, **1980**. 92(2): 647-654.
232. Konno, K., K. Oizumi, N. Kumano, and S. Oka, Mode of action of kanamycin on *Mycobacterium bovis* BCG. *American Review of Respiratory Disease*, **1973**. 108(1): 101-107.
233. Papich, M.G., Spectinomycin, spectinomycin dihydrochloride pentahydrate, in *Saunders Handbook of Veterinary Drugs (Fourth Edition)*, M.G. Papich, Editor., W.B. Saunders: St. Louis. **2016** 735-736. 978-0-323-24485-5.
234. Van Bambeke, F., M.-P. Mingeot-Leclercq, Y. Glupczynski, and P.M. Tulkens, Mechanisms of action, in *Infectious Diseases (Fourth Edition)*, J. Cohen, W.G. Powderly, and S.M. Opal, Editors., Elsevier: New York. **2017** 1162-1180.e1161. 978-0-7020-6285-8.
235. Jardetzky, O., Studies on the mechanism of action of chloramphenicol. I. The conformation of chloramphenicol in solution. *J Biol Chem*, **1963**. 238: 2498-2508.
236. Boyer, R.F., Isolation and spectrophotometric characterization of photosynthetic pigments. *Biochem Educ*, **1990**. 18(4): 203-206.
237. Greenspan, P., E.P. Mayer, and S.D. Fowler, Nile red: A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol*, **1985**. 100(3): 965-973.

238. Reimers, J.R., Z.-L. Cai, R. Kobayashi, M. Rätsep, A. Freiberg, and E. Krausz, Assignment of the Q-Bands of the Chlorophylls: Coherence Loss via Qx – Qy Mixing. *Sci Rep*, **2013**. 3: Article No: 2761.
239. Chaves, J.E., H. Kirst, and A. Melis, Isoprene production in *Synechocystis* under alkaline and saline growth conditions. *J Appl Phycol*, **2015**. 27(3): 1089-1097.
240. Chen, M. and R.E. Blankenship, Expanding the solar spectrum used by photosynthesis. *Trends Plant Sci*, **2011**. 16(8): 427-431.
241. Nielsen, E.S., The pigments found in the various taxonomic groups of plants and their importance for photosynthesis, in *Marine Photosynthesis*, E.S. Nielsen, Editor., Elsevier. **1975** 33-42. 0422-9894.
242. Luo, W., S. Pflugmacher, T. Proschold, N. Walz, and L. Krienitz, Genotype versus phenotype variability in *Chlorella* and *Micractinium* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Protist*, **2006**. 157(3): 315-333.
243. Shihira, I. and R.W. Krauss, *Chlorella*: physiology and taxonomy of forty-one isolates. College Park, Maryland, **1965**: University of Maryland
244. Azaman, S.N.A., N. Nagao, F.M. Yusoff, S.W. Tan, and S.K. Yeap, A comparison of the morphological and biochemical characteristics of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella zofingiensis* cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions. *PeerJ*, **2017**. 5: e3473.
245. Bock, C., L. Krienitz, and T. Proschold, Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea*, **2011**. 11(2): 293-312.
246. Luo, W., L. Krienitz, S. Pflugmacher, and N. Walz, Genus and species concept in *Chlorella* and *Micractinium* (Chlorophyta, Chlorellaceae): Genotype versus phenotypical variability under ecosystem conditions. *Verh Internat Verein Limnol*, **2005**. 29: 170-173.
247. Gärtner, G., B. Uzunov, E. Ingolic, W. Kofler, G. Gacheva, P. Pilarski, L. Zagorchev, M. Odjakova, and M. Stoyneva, Microscopic investigations (LM, TEM and SEM) and identification of *Chlorella* isolate R-06/2 from extreme habitat in Bulgaria with a strong biological activity and resistance to environmental stress factors. *Biotechnol Biotec Eq*, **2015**. 29(3): 536-540.

248. Safi, C., B. Zebib, O. Merah, P.-Y. Pontalier, and C. Vaca-Garcia, Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renew Sust Energ Rev*, **2014**. 35: 265-278.
249. Xue, L., H. Shang, P. Ma, X. Wang, X. He, J. Niu, and J. Wu, Analysis of growth and lipid production characteristics of *Chlorella vulgaris* in artificially constructed consortia with symbiotic bacteria. *J Basic Microb*, **2018**. 58(4): 358-367.
250. Elzagheid, M.I., Laboratory activities to introduce carbohydrates qualitative analysis to college students. *World Journal of Chemical Education*, **2018**. 6(2): 82-86.
251. Xiao, R. and Y. Zheng, Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnol Adv*, **2016**. 34(7): 1225-1244.
252. El-Sheekh, M., H. Khairy, and R. El-Shenody, Algal production of extra- and intracellular polysaccharides as an adaptive response to the toxin crude extract of *Microcystis aeruginosa*. *Iran J Environ Healt*, **2012**. 9(10): 1-7.
253. Giroldo, D., P.I.C. Ortolano, and A.A.H. Vieira, Bacteria–algae association in batch cultures of phytoplankton from a tropical reservoir: the significance of algal carbohydrates. *Freshwater Biol*, **2007**. 52(7): 1281-1289.
254. De Philippis, R., R. Paperi, and C. Sili, Heavy metal sorption by released polysaccharides and whole cultures of two exopolysaccharide-producing cyanobacteria. *Biodegradation*, **2007**. 18(2): 181-187.
255. Angelis, S., A.C. Novak, E.B. Sydney, V.T. Soccol, J.C. Carvalho, A. Pandey, M.D. Nosedá, J.L. Tholozan, J. Lorquin, and C.R. Soccol, Co-culture of microalgae, cyanobacteria, and macromycetes for exopolysaccharides production: Process preliminary optimization and partial characterization. *Appl Biochem Biotech*, **2012**. 167(5): 1092-1106.
256. Donot, F., A. Fontana, J.C. Baccou, and S. Schorr-Galindo, Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydr Polym*, **2012**. 87(2): 951-962.
257. Bernaerts, T.M.M., L. Gheysen, C. Kyomugasho, Z. Jamsazzadeh Kermani, S. Vandionant, I. Foubert, M.E. Hendrickx, and A.M. Van Loey, Comparison of microalgal biomasses as functional food ingredients: Focus on the composition of cell wall related polysaccharides. *Algal Res*, **2018**. 32: 150-161.

258. Camuel, A., B. Guieysse, C. Alcántara, and Q. Béchet, Fast algal eco-toxicity assessment: Influence of light intensity and exposure time on *Chlorella vulgaris* inhibition by atrazine and DCMU. *Ecotox Environ Safe*, **2017**. 140: 141-147.
259. Ma, J., L. Xu, S. Wang, R. Zheng, S. Jin, S. Huang, and Y. Huang, Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotox Environ Safe*, **2002**. 51(2): 128-132.
260. Fallahi, M., S.H. Rahbary, and M. Shamsaii, Determination of optimum concentration of Diuron for the growth and bloom of the algae (*Scenedesmus obliquus*) *in vitro* condition. *Iran J Fish Sci*, **2014**. 13(3): 739-747.
261. Mansano, A.S., R.A. Moreira, H.C. Dornfeld, E.C. Freitas, E.M. Vieira, H. Sarmento, O. Rocha, and M.H.R. Selegim, Effects of diuron and carbofuran and their mixtures on the microalgae *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotox Environ Safe*, **2017**. 142: 312-321.
262. DeLorenzo, M.E., G.I. Scott, and P.E. Ross, Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review. *Environ Toxicol Chem*, **2001**. 20(1): 84-98.
263. Tellenbach, M., A. Gerber, and A. Boschetti, Herbicide-binding to thylakoid membranes of a DCMU-resistant mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters*, **1983**. 158(1): 147-150.
264. Zhou, K., Y. Hu, L. Zhang, K. Yang, and D. Lin, The role of exopolymeric substances in the bioaccumulation and toxicity of Ag nanoparticles to algae. *Sci Rep*, **2016**. 12(6).
265. Baudelet, P.-H., G. Ricochon, M. Linder, and L. Muniglia, A new insight into cell walls of Chlorophyta. *Algal Res*, **2017**. 25: 333-371.