



Πανεπιστήμιο Κρήτης
Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών
Τμήμα Βιολογίας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Μοριακή Βιολογία και Βιοτεχνολογία Φυτών»
Διατριβή Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης

Βιοενεργητική μελέτη της ακραιοφιλικής συμπεριφοράς του χλωροφύκου *Trebouxia crenulata* στα πλαίσια συμβίωσής του με μεθυλοβακτήριο

Λήδα-Ελένη Τύπα
Εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας
Επιβλέπων Καθηγητής: Καθ. Κυριάκος Κοτζαμπάσης

Ηράκλειο 2018

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Κυριάκος Κοτζαμπάσης,

Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Στέργιος Πυρίντσος,

Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Εμμανουήλ Φλεμετάκης,

Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας,

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μετά την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους με βοήθησαν να την διεκπεραιώσω.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Καθηγητή Κυριάκο Κοτζαμπάση, που με καθοδήγησε με υπομονή και μου παρείχε πολύτιμη θεωρητική και τεχνική υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, ενώ ταυτόχρονα με εμπιστεύθηκε και με ενθάρρυνε συνεχώς να υλοποιώ τις ιδέες μου.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τους Αναπληρωτές Καθηγητές Μανώλη Φλεμετάκη και Παναγιώτη Σαρρή, που με δέχτηκαν στα εργαστήριά τους για την πραγματοποίηση των πειραμάτων που απαιτούσαν τεχνικές μοριακής βιολογίας, καθώς και τον Καθηγητή Στέργιο Πυρίντσο, για την συμμετοχή του στην τριμελή μου επιτροπή αλλά και το δειγματοληπτικό υλικό που μου παρείχε για τις ανάγκες των πειραμάτων.

Ακόμη, δε θα μπορούσα να παραλείψω τον Σωτήρη Ζερβέα, την Μαρία Πατέλου, την Βίλλυ Μιχαλοπούλου, τον Βασίλη Σκαλτσογιάννη και την Ειρήνη Πατιτάκη καθώς και όλα τα μέλη των εργαστηρίων στα οποία εργάστηκα στο διάστημα εκπόνησης της εργασίας μου. Τους ευχαριστώ για τον χρόνο που μου αφιέρωσαν και την πραγματικά πολύτιμη βοήθειά τους.

Τέλος, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, καθώς και στον Λευτέρη Δαφέρμο

Λήδα Τύπα,

Οκτώβριος 2018

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
Abstract	7
Εισαγωγή.....	8
1.1 Λειχήνες: Ένα συμβιωτικό πρότυπο μικροοργανισμών	8
1.2 Βακτηριακές κοινότητες στο συμβιωτικό πλαίσιο του λειχήνα	10
1.3 Αλληλεπιδράσεις Βακτηρίων-Μικροφυκών	13
1.4 Φωτοσυνθετική διαδικασία.....	16
1.4.1 Δομική συγκρότηση του χλωροπλάστη	16
1.4.2 Δομή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.....	17
1.4.3 Μη κυκλική και κυκλική ροή ηλεκτρονίων	18
1.4.4 Φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου (H ₂) από χλωροφύκη.....	19
1.5 Βακτηριακή φωτοσύνθεση	21
1.5.1 Φωτοχημεία της βακτηριακής ανοξυγονικής φωτοσύνθεσης - Κυκλική ροή ηλεκτρονίων	21
1.6 Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας.....	22
Υλικά και Μέθοδοι	23
2.1 Το συμβιωτικό μονοκύτταρο χλωροφύκος <i>Trebouxia crenulata</i>	23
2.2 Μέτρηση Κυτταρικού Όγκου	25
2.3 Καταγραφή της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού - Μέτρηση Επαγωγικού Φθορισμού (JIP-test)	25
2.4 Εκχύλιση και Φασματικός Χαρακτηρισμός Χρωστικών.....	28
2.5 Ποιοτική και Ποσοτική Καταγραφή H ₂ , O ₂ και N ₂ με τη Χρήση GC-TCD	28
2.6 Μοριακός χαρακτηρισμός του συμβιωτικού βακτηρίου σε επίπεδο γένους.....	28
2.7 Μοριακός χαρακτηρισμός του συμβιωτικού μεθυλοβακτηρίου σε επίπεδο είδους 30	
Αποτελέσματα	32
3.1 Μελέτη της ακραιοφιλικής συμπεριφοράς του συμβιωτικού σχήματος του χλωροφύκου <i>Trebouxia crenulata</i> με βακτήριο	32
3.1.1 Έλεγχος της ανθεκτικότητας του χλωροφύκου <i>T. crenulata</i> (στο συμβιωτικό σχήμα) σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία και αφυδάτωση	33
3.1.2 Έλεγχος της ανθεκτικότητας του βακτηρίου σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία και αφυδάτωση	35
3.1.3 Έλεγχος της ανθεκτικότητας του χλωροφύκου <i>T. crenulata</i> (στο συμβιωτικό σχήμα) σε υψηλή αλατότητα.....	36
3.1.4 Έλεγχος της ανθεκτικότητας του βακτηρίου σε υψηλή αλατότητα.....	41

3.2	Βιοχημικός και μοριακός χαρακτηρισμός του βακτηρίου	42
3.2.1	Διαφοροποίηση των χρωστικών του συμβιωτικού σχήματος χλωροφύκους/βακτηρίου	42
3.2.2	Μοριακός χαρακτηρισμός του συμβιωτικού βακτηρίου.....	43
3.2.3	Μοριακός χαρακτηρισμός του συμβιωτικού βακτηρίου σε επίπεδο είδους ..	46
3.3	Καθαρισμός του χλωροφύκους <i>T. crenulata</i> από το μεθυλοβακτήριο	48
3.3.1	Έλεγχος ανθεκτικότητας του χλωροφύκους στα αντιβιοτικά που δοκιμάστηκαν στο μεθυλοβακτήριο.....	48
3.4	Σύγκριση του συμβιωτικού σχήματος (<i>T. crenulata</i> & μεθυλοβακτήριο) και του αξενικού χλωροφύκους <i>T. crenulata</i> ως προς την ακрайοφιλική συμπεριφορά	50
3.4.1	Σύγκριση του συμβιωτικού σχήματος και του αξενικού χλωροφύκους <i>T. crenulata</i> ως προς την ανθεκτικότητα σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία και αφυδάτωση	50
3.4.2	Σύγκριση του συμβιωτικού σχήματος και του αξενικού χλωροφύκους <i>T. crenulata</i> ως προς την ανθεκτικότητα σε υψηλή αλατότητα	51
3.5.	Σύγκριση του αξενικού χλωροφύκους <i>T. crenulata</i> και του συμβιωτικού σχήματος ως προς την ικανότητα παραγωγής H ₂	55
	Συζήτηση.....	57
	Βιβλιογραφία.....	61

Περίληψη

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η ακραιοφιλική συμπεριφορά του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Trebouxia crenulata*, που αποτελεί τον φωτοβιώτη των λειχήνων του είδους *Ramalina capitata*. Το απομονωμένο από τον λειχήνα χλωροφύκος, παρουσίασε μια απρόσμενη αλληλεπίδραση με χαρακτηριστικά συμβιωτικής σχέσης αμοιβαιότητας με ένα βακτήριο δυνητικά φωτοσυνθετικό, όπως φάνηκε από τον φασματικό χαρακτηρισμό των χρωστικών του. Οι πληθυσμοί χλωροφύκους και βακτηρίου συνυπήρχαν χωρίς η κυριαρχία του ενός να καταπονεί ή να εκμηδενίζει τον άλλο, ενώ η παρουσία του βακτηρίου παρατηρήθηκε να επιταχύνει τον κατά κανόνα χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης του χλωροφύκου. Διερευνήθηκε η απόκριση τόσο του συμβιωτικού σχήματος, όσο και του κάθε μικροοργανισμού ξεχωριστά, στην έκθεσή τους σε υψηλή αλατότητα και επιχειρήθηκε να εξακριβωθεί εάν η αλληλεπίδρασή τους έχει θετικό ή αρνητικό αντίκτυπο στην ανθεκτικότητα του χλωροφύκου. Το συμβιωτικό σχήμα επέδειξε αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα σε αλατότητα έως 50%, καθώς μετά από 66 ώρες επώασης ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός του χλωροφύκου δεν έδειξε σαφή ίχνη καταπόνησης και το βακτήριο αναπτύχθηκε κανονικά σε στερεές καλλιέργειες. Η ακραία χαμηλή θερμοκρασία (-196 °C/ 77K) και πλήρης αφυδάτωση είχε το ίδιο αποτέλεσμα, καταδεικνύοντας ένα παρόμοιο εύρος ανθεκτικότητας των δύο αλληλεπιδρώντων μικροοργανισμών. Ο μοριακός χαρακτηρισμός του βακτηρίου βάσει της αλληλούχισης τμήματος της 16S rRNA περιοχής του, έδειξε ότι ανήκει στο γένος *Methylobacterium*, ενώ η αλληλούχιση ειδικής για το είδος περιοχής του γονιδίου *rhoB* του μεθυλοβακτηρίου, έδειξε μεγάλη ομοιότητα (94%) του στελέχους με το *Methylobacterium populi*. Πρόκειται για ένα είδος με ικανότητα προώθησης της φυτικής ανάπτυξης μέσω παραγωγής αυξίνης (IAA) και αποτοξικοποίησης του περιβάλλοντός του. Η επανάληψη των παραπάνω πειραμάτων σε αξενικές καλλιέργειες χλωροφύκου *T. crenulata* (μετά τον επιτυχή διαχωρισμό του από το μεθυλοβακτήριο), ανέδειξε την αδυναμία του να ανταπεξέλθει στην καταπόνηση εξίσου καλά με το συμβιωτικό σχήμα. Τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν μια σαφώς θετική αλληλεπίδραση του μεθυλοβακτηρίου με το χλωροφύκος *T. crenulata* ως προς την ακραιοφιλική συμπεριφορά. Τόσο το συμβιωτικό σχήμα, όσο και η αξενική καλλιέργεια του χλωροφύκου αδυνατούν να παράγουν υδρογόνο (H₂) σε ανοξικές συνθήκες. Αυτό συμφωνεί με προηγούμενα δεδομένα του εργαστηρίου σύμφωνα με τα οποία λειχήνες του γένους *Ramalina* που εξετάστηκαν για την ικανότητα παραγωγής υδρογόνου, ήταν οι μοναδικοί που παρουσίασαν μηδενική ή πολύ περιορισμένη παραγωγή. Για να προταθεί στο μέλλον ένας σαφής μηχανισμός της συμβιωτικού τύπου αλληλεπίδρασης των δύο μικροοργανισμών, αλλά και να διαλευκανθεί η πιθανότητα συνύπαρξής τους και στο μικρο-οικοσύστημα του λειχήνα, απαιτείται περαιτέρω ενδεδειγμένη μελέτη, τόσο σε μοριακό, όσο και σε βιοχημικό επίπεδο.

Abstract

This work focuses on the extremophilic behavior of the unicellular green alga *Trebouxia crenulata*, which is the photobiont of *Ramalina capitata* lichen species. The algal strain that was isolated from the lichen thallus, showed an unexpected mutualistic interaction with a potentially photosynthetic bacterial strain, as derived from the spectral characterization of its pigments. The populations of the two interacting microorganisms coexisted and although each population outnumbered the other under different circumstances, both of them remained viable and robust. A rise in the bacterial population was able to accelerate the otherwise low growth rate of the algae. In order to elucidate whether the observed interaction affects the extremotolerance of the algae in a positive or negative fashion, we comparatively investigated the response of this mutualistic scheme to extreme salinity, low temperature and desiccation, in contrast to the response of each partner separately. Interestingly, the mutualistic scheme exhibited remarkable tolerance to salinity up to 50‰, since, after 66 hours of incubation in the respective medium, the photosynthetic apparatus of the algae remained completely functional, while the bacteria showed normal growth on petri dishes. Extreme low temperature (-196 °C/ 77K) and desiccation had the same effect on both microorganisms, indicating compatibility in their extremotolerance ranges. The bacterial strain belongs to the genus *Methylobacterium*, according to its 16S rRNA sequenced region, while its species specific *rpoB* region sequence shows 94% similarity with the respective region of *Methylobacterium populi*. This particular species has been described to promote plant growth through producing IAA and detoxifying its environment. In the repetition of the above abiotic stress experiments on axenic cultures of *T. crenulata* (after successfully isolating the strain), the algae failed to cope with the extreme conditions adequately to the mutualistic scheme. As is evident from the overall results, the studied bacterial-algal interaction has a positive impact on the extremotolerance of *T. crenulata*. Moreover, the mutualistic scheme as well as the axenic algal culture failed to produce hydrogen (H₂) in anaerobic conditions. This is in accordance with previous results from our lab, which indicate that lichen species of the genus *Ramalina* tested for hydrogen production, were the only ones that failed to exhibit considerable amounts of hydrogen. In order to propose a specific mechanism of the above mutualism, in addition to elucidating the possibility of the two microorganisms coexisting in lichen microecosystems, thorough molecular and biochemical analysis is to be performed.

Εισαγωγή

1.1 Λειχήνες: Ένα συμβιωτικό πρότυπο μικροοργανισμών

Η εμφάνιση και η εδραίωση της παρουσίας των λειχήνων στη φύση, συχνά περιγράφεται ως το πιο επιτυχές παράδειγμα συμβιωτικής σχέσης αμοιβαιότητας. Βάσει του παραδοσιακού ορισμού της, η συμβίωση αυτή προκύπτει από μορφολογικές και φυσιολογικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενός ετερότροφου μικροοργανισμού (μυκοβιώτη) και ενός ή περισσότερων φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών



Εικόνα 1. Θαλλοί διαφορετικών ειδών λειχήνων σε πετρώδες υπόστρωμα (<http://antarctica.gov.au>).

(φωτοβιώτων). Τον ρόλο του μυκοβιώτη έχει σχεδόν πάντα κάποιος ασκομύκητας, ενώ ο φωτοβιώτης μπορεί να είναι μονοκύτταρο χλωροφύκος (φυκοβιώτης) ή/και κυανοβακτήριο (κυανοβιώτης) (Honegger 1998). Το συμβιωτικό σχήμα που προκύπτει (ολοβιώτης) συγκροτεί τον θαλλό (Εικόνα 1). Ο λειχήνας κυρίαρχα συντηρείται μέσα από την αυτοτροφία του φυκοβιώτη και την τροφοδότηση του μυκοβιώτη με τις φωτοσυνθετικά παραγόμενες οργανικές ενώσεις, σε συνδυασμό με την παροχή α) προστασίας στον φωτοβιώτη εντός του μικροπεριβάλλοντος που συγκροτεί το μυκήλιο και β) ευκολότερης πρόσβασης σε νερό και ανόργανα στοιχεία. Τα χαρακτηριστικά του λειχήνα, όπως και το οικολογικό του εύρος διαφέρουν από αυτά των επιμέρους οργανισμών που τον συγκροτούν (Hawksworth 1988).

Πρόσφατα, το παραπάνω δόγμα της βασικής δομής των λειχήνων επαναπροσδιορίστηκε, με την ανακάλυψη της ύπαρξης και δεύτερου μυκοβιώτη, από την ομάδα των βασιδιομυκήτων, στο συμβιωτικό πλαίσιο μιας πληθώρας λειχήνων (Spribille et al. 2016). Παράλληλα, προηγούνται στην βιβλιογραφία δεδομένα για σταθερή συνύπαρξη βακτηριακών κοινοτήτων, κυρίως Alphaproteobacteria, με ειδικότητα ως προς τον ξενιστή και διακριτή δομή μέσα στον λειχήνα (Bates et al. 2011), ενώ υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για πολλαπλό λειτουργικό τους ρόλο στην συμβίωση. Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί η συμβολή των βακτηριακών κοινοτήτων στην παροχή και ανακύκλωση ανόργανων θρεπτικών, αλλά και στην αύξηση της ανθεκτικότητας του λειχήνα σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Liba et al. 2006, Grube et al. 2009, Grube et al. 2015).

Η εικόνα της συμβίωσης με βάση τα σημερινά δεδομένα καταδεικνύει ένα πολύπλοκο μικρο-οικοσύστημα που χαρακτηρίζεται από πληθώρα βιωτών, με σταθερές λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, απαραίτητες ώστε ο ιδιαίτερος, συντροφικού τύπου μεταβολισμός να διατηρείται σε ισορροπία (Grube et al. 2009, Casano et al. 2011, Grube et al. 2015).

Η λειχηνοποίηση αποτελεί μια εξαιρετικά επιτυχημένη εξελικτική επιλογή. Οι λειχήνες αποτελούν την κυρίαρχη μορφή ζωής στο 8% του πλανήτη.

Μπορούν να εποικίσουν σχεδόν κάθε τύπου ενδιαίτημα και υπόστρωμα (Εικόνα 2), καθώς χαρακτηρίζονται από μεγάλη ανθεκτικότητα σε ακραίες συνθήκες, όπως απόλυτη ξηρασία, ακραίες θερμοκρασίες, υψηλή αλατότητα και υψηλά επίπεδα ηλιακής ακτινοβολίας (Lutzoni & Miadlikowska 2009, Delmail et al. 2013). Τα προσαρμοστικά χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στην τόσο επιτυχημένη επιβίωσή τους, προκύπτουν από την μορφολογία και την ανατομία τους (Meeßen et al. 2013), το μεγάλο εύρος δευτερογενών ενώσεων που παράγουν (Meeßen et al. 2014) και την ικανότητά τους να μεταβαίνουν αντιστρεπτά σε μεταβολικά ανενεργή κατάσταση (Kranner et al. 2005) όταν οι συνθήκες είναι δυσμενείς. Θεωρείται ότι οι αποκρίσεις του συμβιωτικού σχήματος στις καταπονήσεις διαφοροποιούνται από αυτές των



Εικόνα 2. Λειχήνες επιβιώνουν με επιτυχία σε ενδιαίτηματα με ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως πολικό ψύχος και ολιγοτροφία (<http://antarctica.gov.au>).

αποτελούν ορισμένοι λειχήνες που έχουν πολύ μικρή ή μηδενική ικανότητα φωτοσυνθετικής παραγωγής H_2 , όπως για παράδειγμα λειχήνες του γένους *Ramalina*. Η ιδιότητα αυτή των λειχήνων για παραγωγή εκμεταλλεύσιμης πηγής ενέργειας σε συνδυασμό με την πρωτοφανή ακραιοφιλία τους, δημιουργεί ένα νέο πλαίσιο μελέτης τους με προοπτική για αστροβιολογικές και αστροβιοτεχνολογικές εφαρμογές (Parasyti et al. 2018).

Οι πιο κοινοί φυκοβιώτες που συναντώνται ακόμη και σε λειχήνες ακραίων ενδιαιτημάτων, όπως αυτά της Ανταρκτικής και των Άλπεων, είναι μονοκύτταρα χλωροφύκη που ανήκουν στο γένος *Trebouxia* (Tschermak-Woess 1988). Στην φύση εντοπίζονται κυρίως σε συμβιωτική κατάσταση στον λειχήνα. Παρότι υπάρχουν πολλές αναφορές για την παρουσία τους και σε ελεύθερη κατάσταση, παρουσιάζουν μορφολογικές διαφορές και δεν είναι το ίδιο αρμοστικά όπως στην τροποποιημένη, λειχνοποιημένη τους κατάσταση. Για το είδος *Trebouxia crenulata* γνωρίζουμε ότι σε ελεύθερη κατάσταση το μέγεθος του κυττάρου είναι διπλάσιο απ'ότι όταν βρίσκεται σε συμβιωτική κατάσταση (Ahmajian 1993). Διαθέτει μεγαλύτερο χλωροπλάστη και ένα πυρηνοειδές, συνθέτει περισσότερα σάκχαρα και λιγότερους πολυσακχαρίτες. Τέλος, απελευθερώνει λιγότερα φωτοσυνθετικά προϊόντα και τα κύτταρα έχουν την τάση να σχηματίζουν συσσωματώματα (Richardson 1968). Αξίζει να αναφερθεί, ότι βάσει σχετικών μελετών, φαίνεται ότι τόσο ο φωτοβιώτης όσο και ο μυκοβιώτης

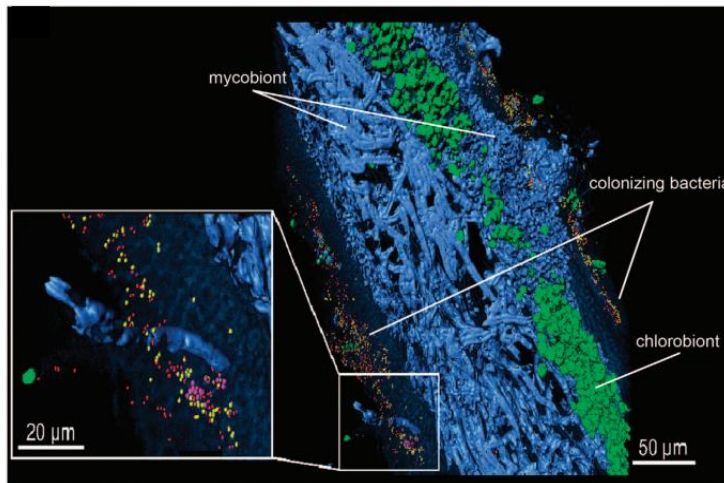
επιμέρους μικροοργανισμών (de Vera 2012, Delmail et al. 2013). Πρόσφατα έγινε γνωστή μια ακόμη αξιοσημείωτη ιδιότητα των λειχήνων, αυτή του να παράγουν μεγάλες ποσότητες H_2 σε κλειστό σύστημα, χρησιμοποιώντας κυρίως το μονοπάτι dark fermentation (Parazi et al. 2015). Εξαίρεση

αποτελούν ορισμένοι λειχήνες που έχουν πολύ μικρή ή μηδενική ικανότητα

παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε συμβιωτική κατάσταση απ' ό τι εάν βρίσκονταν απομονωμένοι (de Vera 2012).

1.2 Βακτηριακές κοινότητες στο συμβιωτικό πλαίσιο του λειχήνα

Μέχρι πρόσφατα, ενώ ήταν γνωστή η παρουσία ενδοθαλλικών, μη φωτοβιοτικών προκαρυωτών στους λειχήνες, δεν ήταν αποδεκτός ο συμβιωτικός τους ρόλος μέσα σε αυτούς. Αντιθέτως θεωρούνταν ευκαιριακός και λειτουργικά ασύνδετος με την συμβίωση. Σύμφωνα όμως με νεότερα δεδομένα από πολύ-ωμικές αναλύσεις, φαίνεται πως οι βακτηριακές κοινότητες συμμετέχουν σε μια σειρά σημαντικών



Εικόνα 3. Οπτικοποίηση βακτηριακών κοινοτήτων θαλλού λειχήνα με τεχνικές FISH και CLSM. Φαίνονται ο μυκοβιώτης και ο φωτοβιώτης, καθώς και τα Alphaproteobacteria (κίτρινο), Eubacteria (κόκκινο) και Betaproteobacteria (ροζ) (Grube et al. 2015).

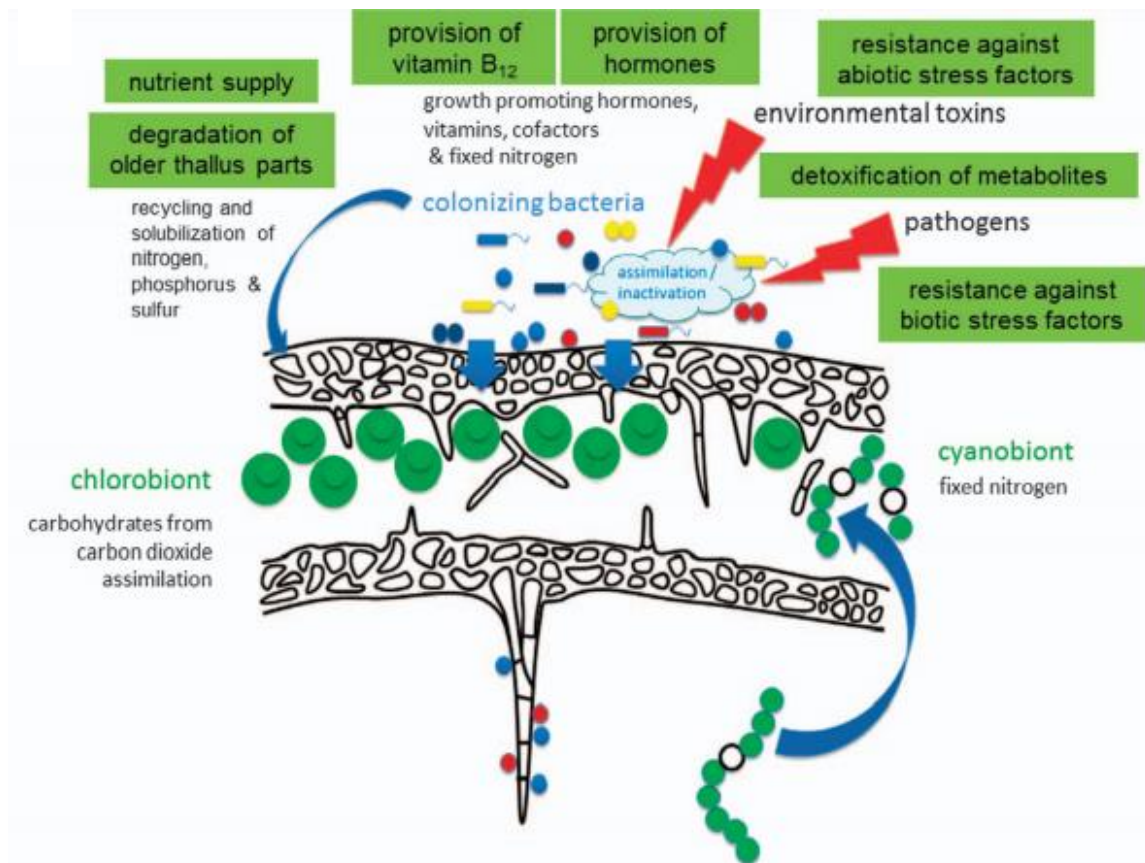
οικοφυσικολογικών διεργασιών και φέρουν αναπόσπαστο ρόλο στο συμβιωτικό πλαίσιο του λειχήνα (Εικόνες 3, 4). Αποδεδειγμένα επιτελούν λειτουργίες όπως πρόσληψη θρεπτικών, κινητοποίηση σιδήρου και φωσφορικών, λυτική δραστηριότητα σε γηρασμένα τμήματα του

λειχήνα (ενεργότητες κυτταρινάσης, ξυλανάσης και αμυλάσης), οξείδωση ενώσεων (αλειφατικές ή αρωματικές) και αξιοποίηση δυσδιάλυτων ουσιών μέσω τροποποίησης του pH των κυττάρων (Schneider et al. 2011, Cardinale et al. 2012, Sigurbjörnsdóttir 2015).

Οι βακτηριακές κοινότητες έχουν συχνά ρόλο αζωτοδεσμευτικό. Καθώς οι λειχήνες σε πολλά oligότροφα υποστρώματα δεν έχουν πρόσβαση στην απαραίτητη πηγή αζώτου (Brodo 1973), ιδιαίτερα όταν δεν περιλαμβάνεται κυανοβιώτης, είναι αναμενόμενο να προκύπτει η ανάγκη για αζωτοδέσμευση. Πράγματι πολλά αζωτοδεσμευτικά στελέχη έχουν απομονωθεί από λειχήνες (Sigurbjörnsdóttir 2014), ενώ η ανίχνευση στο θαλλό *nifH* γονιδίων που σχετίζονται με την αζωτοδέσμευση καταδεικνύει την συμμετοχή του μικροβιώματος σε αυτήν (Liba et al. 2006).

Η παραγωγή πτητικών οργανικών ενώσεων με αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση προς όφελος του λειχήνα έχει επίσης παρατηρηθεί από ορισμένα στελέχη. Εντυπωσιακά, έχει αναφερθεί σε λειχήνες και η παρουσία ριζοβακτηρίων με προωθητικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών (plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR). Συγκεκριμένα, ορισμένα τέτοια στελέχη παράγουν και εκκρίνουν φυτοορμόνες όπως ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA) (Liba et al. 2006, Grube et al. 2009, Sigurbjörnsdóttir 2015). Τέλος είναι γνωστή η ενίσχυση της ανθεκτικότητας του λειχήνα σε αβιοτικές καταπονήσεις μέσω μηχανισμών όπως η παροχή βιταμίνης B₁₂ και η αποτοξικοποίηση

του θαλλού (Grube et al. 2015). Παράλληλα, αναφορές για ψυχρόφιλα βακτηριακά ενδοθαλλικά στελέχη που αλληλεπιδρούν με αρκτικούς λειχήνες (Selbmann et al. 2009), δείχνουν ένα κοινό «παράθυρο» στην ανθεκτικότητα και πιθανή συνεργιστική δράση στην επίτευξη μιας σταθερής συμβίωσης με υψηλή αρμοστικότητα σε ακραία περιβάλλοντα. Αυτό άλλωστε θα εξηγούσε το φαινόμενο κατά το οποίο απουσία άλλων μικροοργανισμών, μυκοβιώτης και φωτοβιώτης δεν έχουν την ικανότητα να συγκροτήσουν θαλλό (Molins et al. 2013).

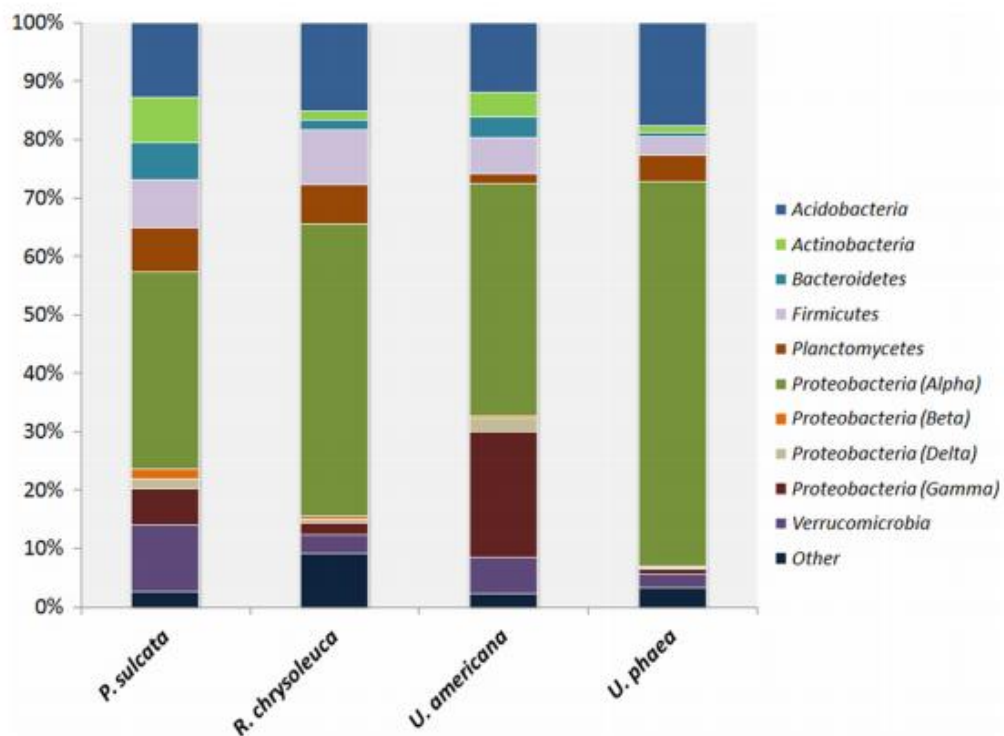


Εικόνα 4. Μοντέλο του δικτύου αλληλεπιδράσεων της συμβίωσης στον λειχήνα με έμφαση στους λειτουργικούς ρόλους των βακτηρίων του θαλλού, όπως αυτοί προέκυψαν από μετα-γενωμικές και μετα-πρωτεωμικές αναλύσεις (Grube et al. 2015).

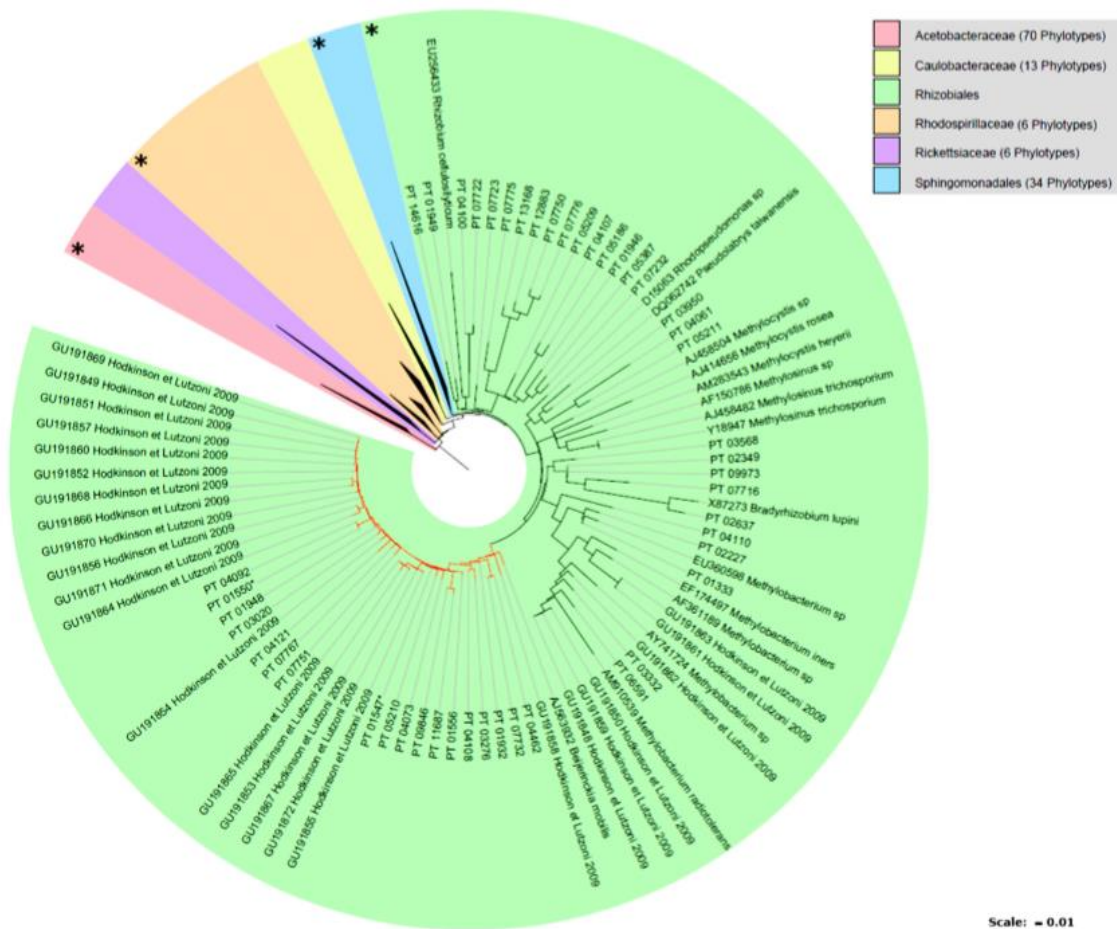
Η οπτικοποίηση των βακτηριακών κοινοτήτων στον θαλλό (Εικόνα 3) μπορεί να γίνει με φθορίζοντα *in situ* υβριδισμό (FISH) και συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με ακτίνες λέιζερ (CLSM), ενώ η ταυτοποίηση της σύστασής τους με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και αλληλούχιση των αμπλικονίων. Σχετικές μελέτες έχουν δείξει την παρουσία στελεχών από τις ταξινομικές ομάδες *Acetobacteraceae*, *Acidobacteriaceae*, Alphaproteobacteria, Bacteria, *Brucellaceae*, Gammaproteobacteria, *Methylobacterium*, Proteobacteria, *Rhizobiales* και *Rhodospirillales* (Hodkinson et al. 2009). Μέσα στα παραπάνω τάξα περιλαμβάνονται πολλά ακραιόφιλα στελέχη βακτηρίων, ενώ είναι σαφής (Εικόνα 5) η κυριαρχία των Alphaproteobacteria (Cardinale et al. 2008, Grube et al. 2009, Bates et al. 2011), που συνήθως σχηματίζουν

στον θαλλό δομές τύπου βιοφίλμ, και ιδιαίτερος των *Rhizobiales* (Εικόνα 6). Ωστόσο, η σύσταση των βακτηριακών κοινοτήτων διαφέρει ανάμεσα στα διαφορετικά είδη λειχήνων, ενώ οι διαφορές φαίνεται να οφείλονται κυρίως σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (Hodkinson et al. 2011).

Τα Alphaproteobacteria και τα *Rhizobiales* είναι σύνηθες να συμμετέχουν σε συμβιωτικές σχέσεις (όπως για παράδειγμα στα φυμάτια των ανώτερων φυτών ή σε υφές μυκήτων), πράγμα που κάνει ακόμη πιο αξιοσημείωτη την κυριαρχία τους στους λειχήνες (Bates et al. 2011). Μελέτες του λειχήνα *Lobaria pulmonaria* έδειξαν την οικογένεια *Methylobacteriaceae* ως την επικρατέστερη, ενώ ταυτόχρονα τα στελέχη της ήταν οι πρωταρχικά υπεύθυνοι οργανισμοί για την παραγωγή μεταβολιτών, όπως αντιμικροβιακές ουσίες (Aschenbrenner et al. 2016). Καθώς τα *Rhizobiales* είναι γνωστό ότι έχουν πολύ συχνά ωφέλιμη αλληλεπίδραση με φυτικούς οργανισμούς (παραγωγή αυξίνης, φολικού οξέος και βιταμινών), ενισχύεται η θέση πως το κάθε είδος λειχήνα εποικίζεται από συγκεκριμένα βακτήρια όχι με τρόπο τυχαίο, αλλά βάσει «στρατολόγησης» των στελεχών που τον ωφελούν (Hodkinson et al. 2011).



Εικόνα 5. Σχετικές αφθονίες βακτηριακών σειρών από διαφορετικά είδη λειχήνων, βάσει της αλληλούχισης των 16S rRNA αμπλικονίων τους. Η ομάδα που υπερτερεί είναι τα Alphaproteobacteria (Bates et al. 2011).



Εικόνα 6. Φυλογενετικό δένδρο για τις αλληλουχίες των βακτηριακών στελεχών που βρέθηκαν σε διάφορα είδη λειχήνων και ανήκουν στα *Alphaproteobacteria*. Η ομάδα που υπερτερεί είναι αυτή των *Rhizobiales* (Bates et al. 2011).

1.3 Αλληλεπιδράσεις Βακτηρίων-Μικροφυκών

Τα βακτήρια και τα μικροφύκη αλληλεπιδρούν και συνεξελίσσονται από τα πρώτα στάδια της ζωής, σε όλους τους τύπους οικοσυστημάτων. Μέσα στην συνύπαρξή τους σε αυτά, καλύπτεται όλο το φάσμα των πιθανών αλληλεπιδράσεων, συχνότερα όμως παρατηρείται ο παρασιτισμός και η αμοιβαιότητα. Άλλωστε, το φαινόμενο πρωτογενών και δευτερογενών ενδοσυμβιώσεων έχει προκύψει επανειλημμένα στην εξελικτική ιστορία των μικροφυκών (Ramanan et al. 2016).

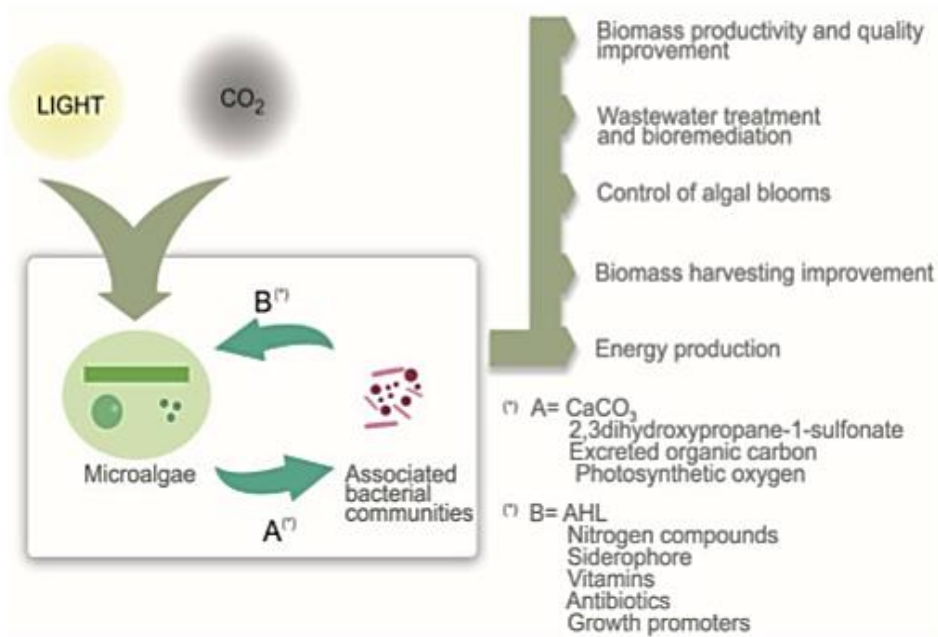
Τα χλωροφύκη ως αυτότροφοι οργανισμοί και παραγωγοί στα υδάτινα οικοσυστήματα τροφοδοτούν τα βακτήρια με διαλυμένες οργανικές ενώσεις, ενώ τα βακτήρια έχουν την ικανότητα ανακύκλωσης των θρεπτικών και παροχής με ανόργανα στοιχεία, όπως το άζωτο (Thompson et al. 2012). Ακόμη, υπάρχουν πολλά παραδείγματα σταθερών σχέσεων αμοιβαιότητας βακτηρίων και μικροφυκών, που συντονίζονται μεταβολικά μέσω αμοιβαίας παραγωγής σηματοδοτικών μορίων, όπως αμινοξέα ή ορμόνες (Limardo et al. 2015). Ταυτόχρονα, το χλωροπλαστικό κυρίως γονιδίωμα των μικροφυκών υπόκειται σε οριζόντια μεταφορά γονιδίων από βακτηριακά

γονιδιώματα (Brembu et al. 2014). Τα μεταφερόμενα γονίδια σχετίζονται συνήθως με την αύξηση αρμοστικότητας των φυκών σε μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα, με μεταβολικά μονοπάτια αποικοδόμησης βιταμινών και εκμετάλλευσης του αζώτου (Helliwell et al. 2011).

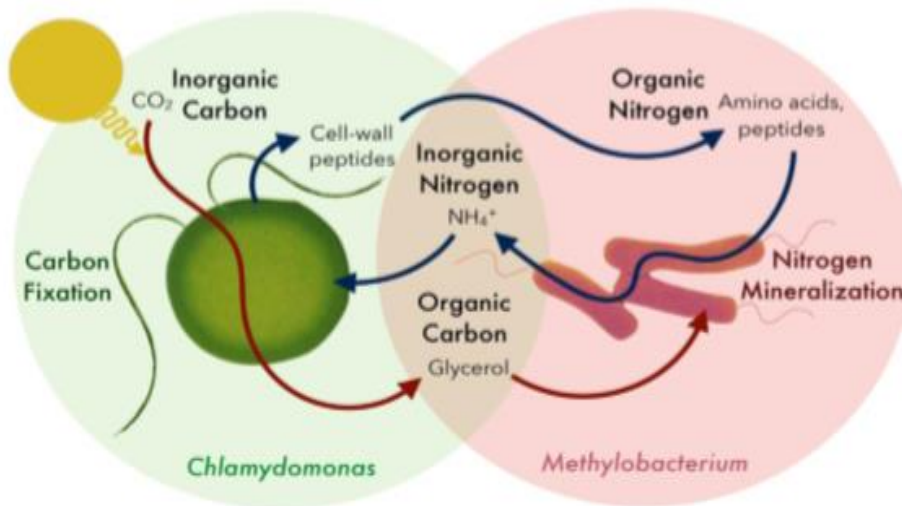
Επεκτείνοντας όμως το πλαίσιο της ειδικότητας των αλληλεπιδράσεων, είδη βακτηρίων και μικροφυκών μπορούν να σχετίζονται πιο σταθερά με τρόπο στοχευμένο δομικά και λειτουργικά. Σε περιπτώσεις εκμεταλλευτικών σχέσεων, όπως αυτή ορισμένων βακτηρίων του κλάδου *Roseobacter*, παρατηρείται η παροχή ανόργανων θρεπτικών στα μικροφύκη και ταυτόχρονα η προστασία τους από την εισβολή άλλων βακτηρίων με την παραγωγή αντιβιοτικών, ενώ τα ίδια τρέφονται με τις διαλυμένες οργανικές ουσίες των μικροφυκών και τα χρησιμοποιούν για εδραία διαβίωση (βιοφίλμ) (Geng et al. 2008). Ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες όμως μπορούν να υπόκεινται σε δομικές και μεταβολικές αλλαγές ώστε να ακολουθήσουν εδραία ή κινητή διαβίωση (Geng et al. 2010). Συχνά, ορισμένα είδη αυτού του κλάδου παρουσιάζουν διττή συμπεριφορά αμοιβαιότητας και παρασιτισμού προς τα μικροφύκη, καθώς μετά από κάποια αλλαγή στις συνθήκες και την σηματοδότηση, αντικαθιστούν την παροχή ωφέλιμων συστατικών στα μικροφύκη με την σύνθεση θανάσιμων τοξινών εναντίον τους (Seyedsayamdost et al. 2011).

Ωστόσο, μελέτες σχέσεων αμοιβαιότητας μεταξύ μικροφυκών-βακτηρίων έχουν αποκαλύψει σημαντικό θετικό αντίκτυπο της αλληλεπίδρασης στην ανάπτυξη των μικροφυκών (Εικόνα 7), με την έκκριση ενώσεων όπως IAA, βιταμίνης B₁₂ και σιδηροφορέων από τα βακτήρια. Ακόμη έχει αναφερθεί σε ενδοκυτταρικό επίπεδο η ενίσχυση των υδατανθράκων, λιπιδίων και χρωστικών των μικροφυκών (Fuentes et al. 2016). Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανακάλυψη μιας νέας σχέσης αμοιβαιότητας μεταξύ του είδους *Chlamydomonas reinhardtii* και ενός μεθυλοβακτηρίου (Εικόνα 8). Η ανάπτυξη και των δύο οργανισμών σε υπόστρωμα με αμινοξέα βελτιώνεται, καθώς το μεθυλοβακτήριο χρησιμοποιεί το αμινοξύ προλίνη, που δεν είναι εκμεταλλεύσιμο από το μικροφύκος, για να παράγει και να παρέχει αμμώνιο σε αυτό. Ταυτόχρονα το μικροφύκος τροφοδοτεί το μεθυλοβακτήριο με γλυκερόλη που συνθέτει από τα φωτοσυνθετικά του προϊόντα (Calatrava et al. 2018).

Τέλος, μια ακόμη πολύ ενδιαφέρουσα αλληλεπίδραση προέκυψε από τη μελέτη μονοκύτταρου χλωροφύκου του γένους *Trebouxia*, το οποίο, αφού απομονώθηκε από τον λειχήνα *Usnea hakonensis*, ανέπτυξε μια δευτερογενή σχέση με στέλεχος από τα Alphaproteobacteria. Ο υβριδισμός *in situ* έδειξε τον εντοπισμό του βακτηρίου στην επιφάνεια των μικροφυκών. Το βακτήριο φαίνεται πως χρησιμοποιεί τα σάκχαρα ριβιτόλη, γλυκόζη και μανιτόλη, που μάλιστα βρίσκονται σε αφθονία και στους λειχήνες. Έτσι καταδεικνύεται ένας πιθανός ρόλος του στην ανακύκλωση των θρεπτικών (Kono et al. 2017).



Εικόνα 7. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ βακτηρίων και μικροφυκών. Οι βασικοί χημικοί διαμεσολαβητές, A: CaCO₃ και B: AHL (acyl-homoserine lactone) (Fuentes et al. 2016).



Εικόνα 8. Μοντέλο μεταβολικής ανταλλαγής άνθρακα-αζώτου μεταξύ μικροφύκους του γένους *Chlamydomonas* και βακτηρίου *Methylobacterium* spp. (Calatrava et al. 2018).

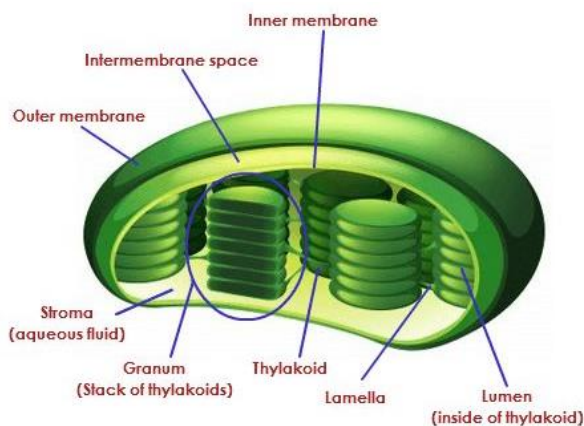
1.4 Φωτοσυνθετική διαδικασία

Η φωτοσύνθεση συνιστά την πιο σημαντική βιοχημική διαδικασία στον πλανήτη, καθώς σε αυτήν στηρίζεται η διατήρηση της ζωής. Πρόκειται για μία διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιείται η μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε χημική, που με τη σειρά της επενδύεται στην μετατροπή της ανόργανης ύλης σε οργανική. Τα φυτά αλλά και ορισμένα βακτηριακά στελέχη (Frenkel 1954) μέσω της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας έχουν την ικανότητα παραγωγής μοριακού οξυγόνου αλλά και δέσμευσης ατμοσφαιρικού CO₂ για την σύνθεση υδατανθρακικών ενώσεων (οξυγονική φωτοσύνθεση).

Η διαδικασία της φωτοσύνθεσης πραγματοποιείται σε δυο στάδια, τις φωτεινές και τις σκοτεινές αντιδράσεις (Arnon 1954, Arnon 1971). Στις φωτεινές αντιδράσεις πραγματοποιείται απορρόφηση της φωτονιακής ενέργειας, μεταφορά της στα κέντρα αντίδρασης και στη συνέχεια αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων και πρωτονίων που έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή NADPH και ATP. Οι σκοτεινές αντιδράσεις περιλαμβάνουν την αναγωγή του CO₂ και την σύνθεση υδατανθράκων, με την χρήση των NADPH και ATP που παράγονται κατά τις φωτεινές αντιδράσεις.

1.4.1 Δομική συγκρότηση του χλωροπλάστη

Η φωτοσυνθετική διαδικασία πραγματοποιείται στους χλωροπλάστες. Δομικά, περιβάλλονται από μια διπλή μεμβράνη, που ονομάζεται πλαστιδιακός φάκελος (Εικόνα 9). Οι μεμβράνες αυτές παρουσιάζουν διαφορετική

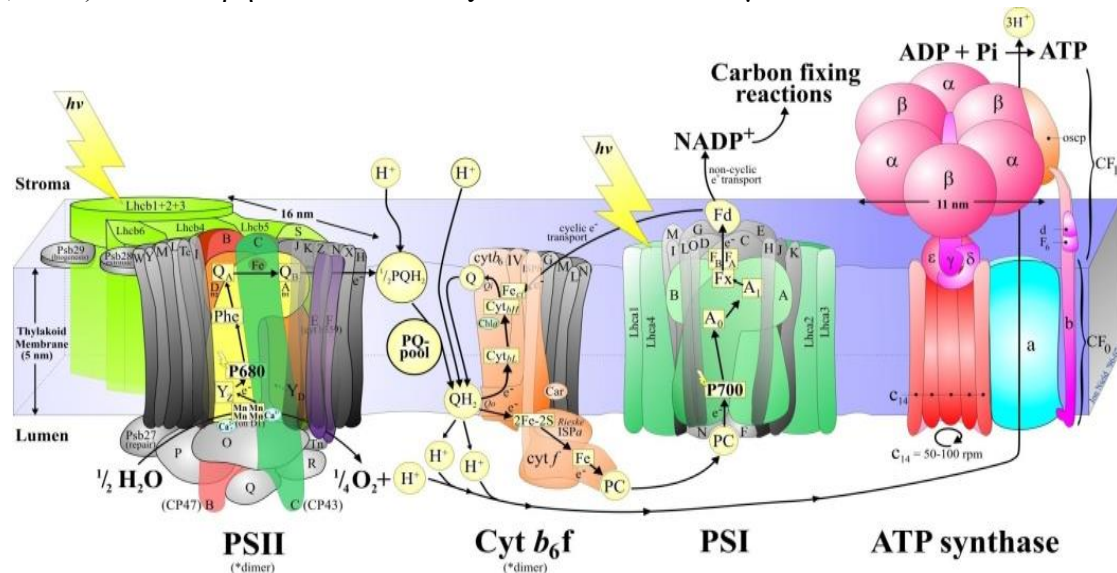


Εικόνα 9. Η δομή του χλωροπλάστη. Φαίνονται όλες οι εσωτερικές δομές του κυτταρικού οργανιδίου.

διαπερατότητα σε διάφορες οργανικές και ανόργανες ουσίες. Συγκεκριμένα, η εξωτερική μεμβράνη είναι διαπερατή κυρίως σε μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους, ενώ η εσωτερική παρουσιάζει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για τις περισσότερες ουσίες. Ωστόσο, και οι δύο μεμβράνες είναι διαπερατές από το CO₂, που αποτελεί υπόστρωμα για την σύνθεση υδατανθράκων κατά τις σκοτεινές αντιδράσεις. Ο χώρος που δημιουργείται μεταξύ των δυο αυτών μεμβρανών ονομάζεται διαμεμβρανικός χώρος, ενώ ο χώρος που περικλείεται από την εσωτερική μεμβράνη ονομάζεται στρώμα. Στο στρώμα υπάρχει ένα ανεπτυγμένο σύστημα μεμβρανών, το οποίο αποτελεί συνέχεια του πλαστιδιακού φακέλου. Οι μεμβρανώδεις σάκοι που δημιουργούνται ονομάζονται θυλακοειδή και ο εσωτερικός τους χώρος, μικροχώρος. Τα θυλακοειδή σχηματίζουν μεμβρανικές στοιβάδες, τα grana. Στις μεμβράνες των θυλακοειδών βρίσκονται οι φωτοσυνθετικές μονάδες, που συγκροτούνται από σύμπλοκα πρωτεϊνών/ χρωστικών (χλωροφύλλες και καροτενοειδή).

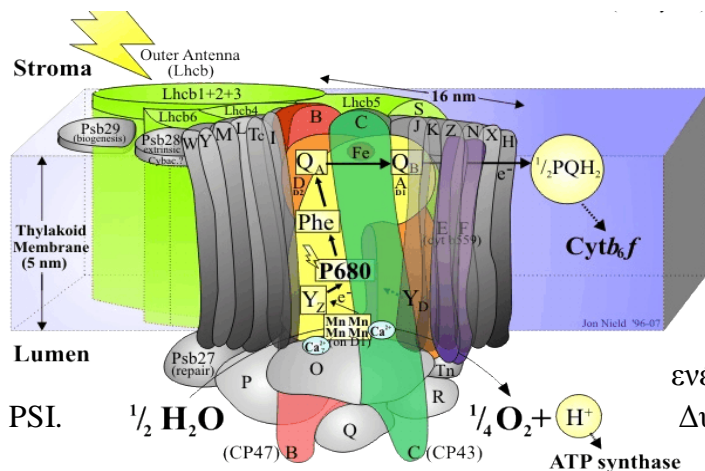
1.4.2 Δομή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού

Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός (Εικόνα 10) αποτελείται από τρία σύμπλοκα, το Φωτοσύστημα II (PSII), το Φωτοσύστημα I (PSI) και το κυτόχρωμα b6/f (cyt b6/f). Στο τέλος της σειράς συμπλόκων βρίσκεται μία ATP-συνθάση. Το PSII αποτελείται από το σύμπλοκο συλλογής φωτός (Light Harvesting Complex, LHCI) και τον πυρήνα του φωτοσυστήματος (PSII core). Το PSI, δομείται από το σύμπλοκο συλλογής φωτός (LHCI) και το πυρήνα του PSI. Το cyt b6/f είναι ένα ενδιάμεσο



Εικόνα 10. Δομική περιγραφή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, με τα τρία κύρια σύμπλοκα και την ATP-συνθάση. Τα βέλη αποτυπώνουν το μονοπάτι ροής ηλεκτρονίων και πρωτονίων (Anna et al. 2014).

πρωτεϊνικό σύμπλοκο μεταξύ του PSII και του PSI στη μη κυκλική μεταφορά ηλεκτρονίων, και απαρτίζεται από το κυτόχρωμα b6, το κυτόχρωμα f, την υπομονάδα IV και μία Fe – S πρωτεΐνη. Η φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων ξεκινά από το H₂O και μέσω του PSII, της δεξαμενής της πλαστοκινόνης (PQ), του cyt b6/f, της πλαστοκυανίνης (PC), του PSI και της φερρεδοξίνης (Fd) καταλήγει στο NADP⁺ (Εικόνα 10).

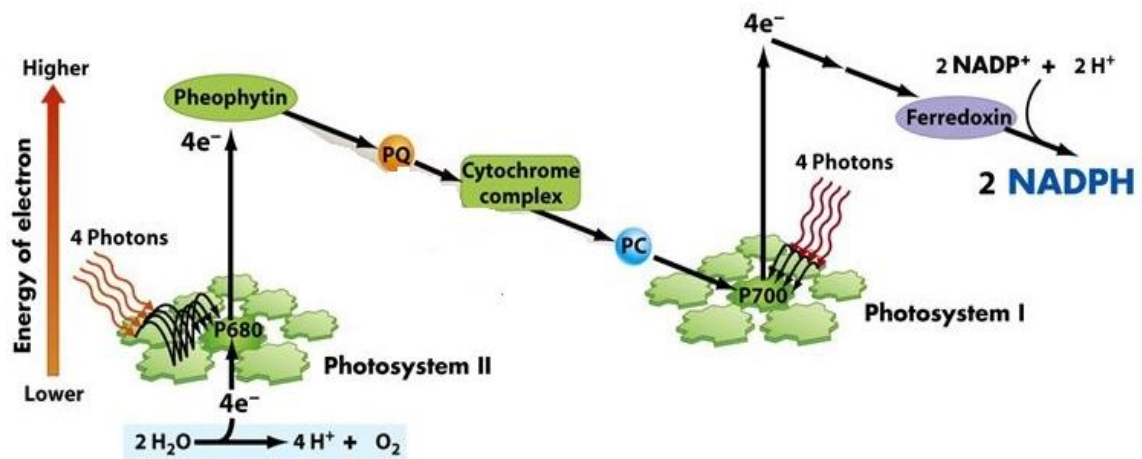


Εικόνα 11. Η δομή και του PSII. Διακρίνεται το LHC και ο πυρήνας του PSII (Nield, 1997).

Όσον αφορά στη δομή του PSII (Εικόνα 11), το LHCI είναι ένα σύστημα πρωτεϊνών και μορίων χλωροφύλλης a, χλωροφύλλης b και καροτενοειδών, που συνδέει τις μεμβράνες των θυλακοειδών και δρα ως διακόπτης για την ροή της ενέργειας μεταξύ του PSII και του Δυνητικά, μπορεί να αποσπαστεί από το PSII και να παρέχει ενέργεια στο PSI. Ο πυρήνας του PSII είναι ένα

πολυπεπτιδικό σύμπλοκο του κέντρου αντίδρασης και του συμπλόκου έκλυσης οξυγόνου. Η λειτουργία του συμπλόκου φωτόλυσης του νερού, που παράγει οξυγόνο, παρέχει στον μικροχώρο και πρωτόνια, δημιουργώντας μια διαβάθμιση συγκέντρωσης πρωτονίων με το στρώμα, παρέχοντας με αυτό τον τρόπο, βάσει της χημειωσμωτικής θεωρίας, τη δυνατότητα παραγωγής ATP από την ATP – συνθάση. Το PSI δομείται παρόμοια με το PSII από το LHCI και τον πυρήνα του PSI. Το LHCI διοχετεύει ενέργεια στο P₇₀₀, τον πρωτογενή ηλεκτρονιοδότη του κέντρου αντίδρασης, που βρίσκεται στον πυρήνα του PSI. Επιπροσθέτως, υπάρχουν χρωστικές και οξειδοαναγωγικοί παράγοντες που συμμετέχουν στην μεταφορά των ηλεκτρονίων στο PSI.

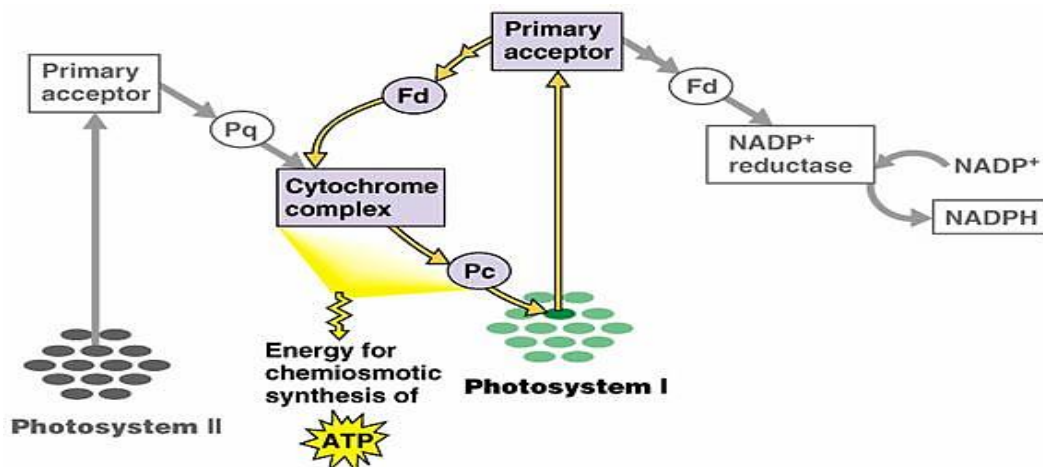
1.4.3 Μη κυκλική και κυκλική ροή ηλεκτρονίων



Εικόνα 12. Η μη κυκλική ροή ηλεκτρονίων. Η φωτονιακή ενέργεια διεγείρει τον πυρήνα του PSII και του κέντρου αντίδρασης P₆₈₀. Στη συνέχεια, ακολουθεί κατά σειρά η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου προς τη φαιοφυτίνη, την κινόνη Q_A και την κινόνη Q_B. Η τελευταία θα αναχθεί με την απορρόφηση ενός δεύτερου φωτονίου σε πλαστοκινόνη. Η μεταφορά ηλεκτρονίου συνεχίζεται στο κυτόχρωμα b6/f, στην πλαστοκυανίνη και στο PSI, το κέντρο αντίδρασης του οποίου έχει ήδη διεγερθεί και μεταφέρει το ηλεκτρόνιο στη φερρεδοξίνη για την αναγωγή του NADP⁺ σε NADPH.

Στη μη κυκλική ροή ηλεκτρονίων (Εικόνα 12) συμμετέχουν τα PSII και PSI (Walker 2002, Zerges 2002, Allen 2003). Οι χλωροφύλλες του LHCI απορροφούν την φωτονιακή ενέργεια και διεγείρονται. Η διέγερση αυτή μεταφέρεται μέχρι τον πυρήνα του PSII, στο κέντρο αντίδρασης P₆₈₀ με αποτέλεσμα τελικά την ενεργειακή του διέγερση (P₆₈₀*). Το P₆₈₀* μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο στη φαιοφυτίνη το οποίο αναπληρώνεται μέσω της διαδικασίας οξείδωσης του νερού απελευθερώνοντας μοριακό οξυγόνο και ιόντα υδρογόνου. Η ανηγμένη φαιοφυτίνη δίνει ένα ηλεκτρόνιο στην κινόνη Q_A και αυτή με τη σειρά της στη κινόνη Q_B μετατρέποντάς την σε ημικινόνη Q_B. Μετά την απορρόφηση ενός δεύτερου φωτονίου και με τη λήψη δυο πρωτονίων από το στρώμα, η ημικινόνη μετατρέπεται σε πλαστοκινόνη PQH₂. Η οξειδωμένη μορφή του P₆₈₀* θα αναχθεί από τα ηλεκτρόνια που θα προκύψουν από τη φωτόλυση

του νερού, ενώ τα κατιόντα υδρογόνου θα κατευθυνθούν στο μικροχώρο. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο κυτόχρωμα b6/f και στη συνέχεια στην πλαστοκυανίνη, ενώ τα H^+ μεταφέρονται στο μικροχώρο. Τα ηλεκτρόνια τελικά καταλήγουν στο PSI, όπου προηγήθηκε διέγερση του κέντρου αντίδρασης P_{700}^* , το οποίο του επέτρεψε να μεταφέρει ηλεκτρόνια στη φερεδοξίνη και από εκεί στο $NADP^+$, το οποίο ανάγει σε NADPH. Η διαφορά πρωτονιακής συγκέντρωσης που δημιουργείται μεταξύ στρώματος και μικροχώρου από τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, είναι η κινητήρια δύναμη (*pmf*, proton motive force) που θα ενεργοποιήσει την ATPάση και θα δημιουργήσει το ATP. Όταν οι απαιτήσεις του φωτοσυνθετικού μηχανισμού είναι μεγαλύτερες σε ATP απ'ότι σε NADPH, παράλληλα με την μη κυκλική ροή ηλεκτρονίων ενεργοποιείται και η κυκλική ροή (Εικόνα 13). Στην κυκλική ροή ηλεκτρονίων κεντρικό ρόλο έχει το PSI (Walker 2002, Zerges 2002, Allen 2003). Συγκεκριμένα τα ηλεκτρόνια που φτάνουν από το P_{700} στη φερεδοξίνη αντί να προωθηθούν στο $NADP^+$, μέσω της πλαστοκινόνης, του κυτοχρώματος b6/f, της πρωτεΐνης Rieske και της πλαστοκυανίνης καταλήγουν πάλι στο κέντρο αντίδρασης του PSI, το P_{700} . Λόγω της διαφοράς δυναμικού που δημιουργείται μεταξύ του μικροχώρου και του στρώματος (λόγω της εισόδου πρωτονίων από το στρώμα στον μικροχώρο, στο επίπεδο της δεξαμενής της πλαστοκινόνης), σχηματίζεται ATP (κυκλική φωσφορυλίωση. Η διαδικασία αυτή δεν συνοδεύεται από τη δημιουργία του οξειδωαναγωγικού παράγοντα NADPH.

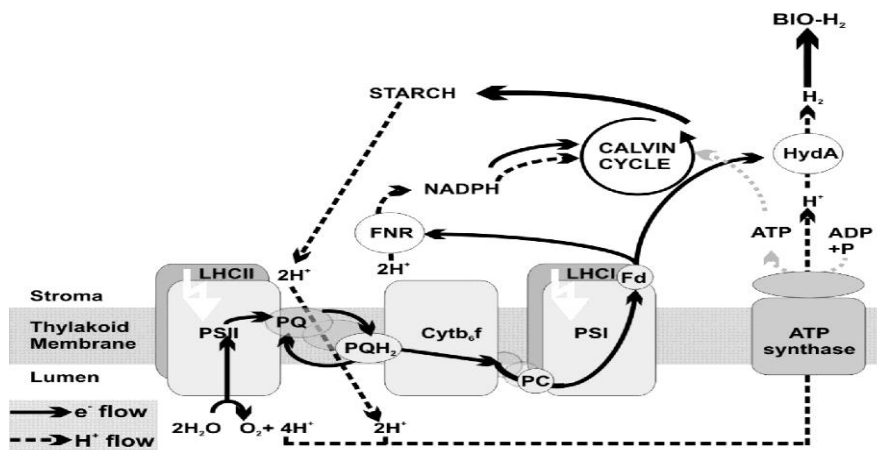


Εικόνα 13. Η κυκλική ροή ηλεκτρονίων. Τα ηλεκτρόνια, αντί να μεταφερθούν στη φερεδοξίνη για το σχηματισμό NADPH καταλήγουν μέσω της δεξαμενής της πλαστοκινόνης και πάλι στο PSI με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ATP.

1.4.4 Φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου (H_2) από χλωροφύκη

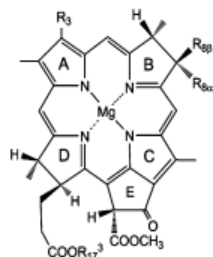
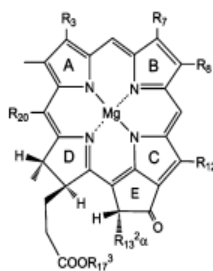
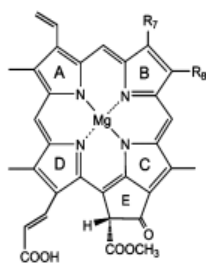
Τα χλωροφύκη έχουν την ικανότητα να παράγουν μοριακό υδρογόνο (Εικόνα 14). Συγκεκριμένα, κάτω από αναερόβιες συνθήκες καταλύουν την αντίδραση αναγωγής των ιόντων υδρογόνου σε μοριακό υδρογόνο με τη χρήση φωτονιακής ενέργειας και μιας οικογένειας ενζύμων, τις υδρογενάσες (Dubini 2014). Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν ένζυμα και σύμπλοκα πρωτεϊνών του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Συνεπώς, οι δυο αυτές διαδικασίες (φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων και παραγωγή H_2) είναι άρρηκτα συνδεδεμένες. Η σύγχρονη αντίληψη για την ύπαρξη του μηχανισμού

παραγωγής υδρογόνου είναι ότι αποτελεί εξελικτικό κατάλοιπο που δίνει την δυνατότητα στα χλωροφύκη να επιβιώνουν σε ανοξικές συνθήκες. Κεντρικός ρόλος του μηχανισμού είναι η διατήρηση της φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων σε οξειδωμένη κατάσταση προκειμένου να διατηρηθεί η φυσιολογική λειτουργία. Κάτω από αναερόβιες συνθήκες ενεργοποιείται η σύνθεση μια Fe-υδρογενάσης (Happe & Naber 1993), η οποία ανάγει τα πρωτόνια του χλωροπλάστη και παράγει αέριο υδρογόνο. Η υδρογενάση είναι συνδεδεμένη με την φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο επίπεδο της φερρεδοξίνης, από την οποία λαμβάνει τα απαραίτητα ηλεκτρόνια για την αναγωγή των πρωτονίων (Florin et al. 2001). Ο μηχανισμός αυτός συντηρείται σε αυστήρα αναερόβιες συνθήκες καθώς το οξυγόνο συνιστά ισχυρό αναστολέα της υδρογενάσης (Benemann et al. 1973, Ghirardi et al. 1997). Υπάρχουν δύο μονοπάτια για την παραγωγή υδρογόνου. Στο PSII εξαρτώμενο μονοπάτι τα απαραίτητα ηλεκτρόνια παρέχονται μέσω της διαδικασίας φωτόλυσης του νερού, όπου μέσω μορίων μεταφορέων μεταφέρονται από το PSII στη φερρεδοξίνη και καταλήγουν στην υδρογενάση. Στο δεύτερο μονοπάτι, το PSII ανεξάρτητο (Melis & Happe 2001, Antal et al. 2003), τα ηλεκτρόνια παρέχονται από τον καταβολισμό οργανικών ουσιών. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω σύζευξης της ροής ηλεκτρονίων στο επίπεδο της πλαστοκινόνης μέσω μιας NADPH οξειδοαναγωγάσης της πλαστοκινόνης. Η δυνατότητα των χλωροφυκών να παράγουν υδρογόνο, ανεξάρτητα από το μονοπάτι που ακολουθείται εξυπηρετεί στη διατήρηση μια μερικώς οξειδωμένης κατάστασης της φωτοσυνθετικής αλυσίδας και επομένως στην παραγωγή της ελάχιστης απαιτούμενης ενέργειας για να αποτραπεί η κατάρρευση της μιτοχονδριακής και χλωροπλαστικής δραστηριότητας (Melis & Happe 2001).



Εικόνα 14. Φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου στο μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*. Υπό αερόβιες συνθήκες τα ηλεκτρόνια από την φωτόλυση του νερού στο PSII μεταφέρονται μέσω της πλαστοκινόνης (PQ) στο κυτόχρωμα b_6f (Cyt b_6f), στο PSI και στη φερρεδοξίνη (Fd), και τελικά χρησιμοποιούνται για την παραγωγή NADPH και αμύλου. Η απελευθέρωση πρωτονίων από το PSII και τον κύκλο PQ/PQH₂ (ροή H⁺ η διακεκομμένη γραμμή) οδηγεί στη δημιουργία μιας διαβάθμισης πρωτονίων, η οποία οδηγεί στην παραγωγή ATP μέσω μιας ATP -συνθάσης. Υπό αναερόβιες συνθήκες ενεργοποιείται η υδρογενάση (HydA), η οποία μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων από την Fd παράγει μοριακό υδρογόνο (H₂) (Nguyen et al. 2008)

1.5 Βακτηριακή φωτοσύνθεση



Εικόνα 15. Οι χημικές δομές των διαφορετικών τύπων BChls (porphyrin-, chlorin- and bacteriochlorin-type) (Niedzwiedzki & Blankenship 2010)

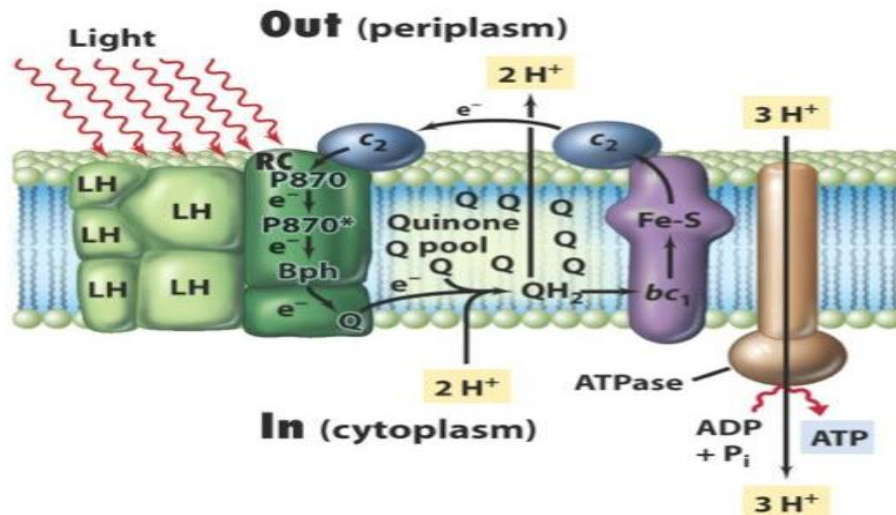
Τα φωτοσυνθετικά βακτήρια υπήρχαν πριν ακόμα σχηματιστεί η ατμόσφαιρα που μπορεί να συντηρήσει τη ζωή στον πλανήτη. Πρόκειται, για μικροοργανισμούς που φέρουν ειδικές χρωστικές για την απορρόφηση της φωτονιακής ενέργειας και κέντρα αντίδρασης που τους επιτρέπουν να την μετατρέπουν σε χημική. Τα βακτήρια που περιέχουν βακτηριοχλωροφύλλες δεν χρησιμοποιούν το νερό ως δότη ηλεκτρονίων και γ'αυτό δεν παρατηρείται παραγωγή οξυγόνου (ανοξυγονική φωτοσύνθεση). Οι βακτηριοχλωροφύλλες μοιάζουν με τις χλωροφύλλες των οργανισμών που πραγματοποιούν οξυγόνη φωτοσύνθεση, ωστόσο απορροφούν φωτονιακή ενέργεια μεγαλύτερου μήκους κύματος.

Οι βακτηριοχλωροφύλλες είναι χρωστικές που συμμετέχουν στη διαδικασία της ανοξυγονικής φωτοσύνθεσης και διαθέτουν πολλές δομικές ομοιότητες με τις χλωροφύλλες των ευκαρυωτικών οργανισμών. Από χημική άποψη, ορίζονται ως κυκλικά τετραπυρόλια με έναν πέμπτο ισοκυκλικό δακτύλιο. Η μεγάλη διαφορά που χαρακτηρίζει τις φασματικές ιδιότητες των διαφορετικών ειδών βακτηριοχλωροφύλλης είναι ο βαθμός ακορεστότητας του μακροκυκλικού δακτυλίου. Με βάση αυτό το χαρακτηριστικό, οι βακτηριοχλωροφύλλες διακρίνονται σε τρεις (Εικόνα 15) υποομάδες (Niedzwiedzki et al. 2010): στον τύπο πορφυρίνης (πλήρως ακόρεστος μακροκυκλικός δακτύλιος), στον τύπο χλωρίου (απλός δεσμός μεταξύ C-17 και C-18 στο μακροκυκλικό δακτύλιο) και στον τύπο παρόμοιο με αυτό της βακτηριοχλωρίνης (απλοί δεσμοί μεταξύ C-7 και C-8, καθώς και C-17 και C-18 στο μακροκυκλικό δακτύλιο). Ένα άλλο χαρακτηριστικό που χαρακτηρίζει τις BChls είναι το κεντρικό μέταλλο. Σχεδόν όλες οι BChls περιέχουν ένα άτομο Mg, ωστόσο, μόρια με Zn έχουν ανακαλυφθεί σε μερικά πορφυρά βακτήρια (Kobayashi et al. 2000).

1.5.1 Φωτοχημεία της βακτηριακής ανοξυγονικής φωτοσύνθεσης - Κυκλική ροή ηλεκτρονίων

Η απορρόφηση φωτός από τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό κατά την ανοξυγονική φωτοσύνθεση μη θειοαναγωγικών βακτηρίων έχει ως αποτέλεσμα τη διέγερση της BChl στην πρώτη ενεργειακή κατάσταση. Συγκεκριμένα, το φως απορροφάται από το κέντρο αντίδρασης και αρχίζει η μεταφορά ηλεκτρονίων από ένα ειδικό ζεύγος βακτηριοχλωροφυλλών, μέσω μιας σειράς αποδεκτών ηλεκτρονίων, στην αναγωγή της κινόνης Q_B . Η πλήρης αναγωγή της κινόνης απαιτεί τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων και συνδέεται με την πρόσληψη δυο πρωτονίων από το διάλυμα. Ακολουθεί η απελευθέρωση της ανηγμένης κινόνης από το κέντρο αντίδρασης στη μεμβράνη, όπου

επανοξειδώνεται από το σύμπλοκο του κυτοχρώματος bc, απελευθερώνοντας πρωτόνια στην αντίθετη πλευρά της μεμβράνης. Η μεταφορά πρωτονίων δια μέσου της μεμβράνης συνδέεται με την επιστροφή του ηλεκτρονίου στο κέντρο αντίδρασης μέσω ενός μορίου κυτοχρώματος C₂. Αυτή η φωτοεπαγόμενη αντλία πρωτονίων δημιουργεί μια διαμεμβρανική διαβάθμιση πρωτονίων που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση ATP (Εικόνα 16). Η κυκλική ροή ηλεκτρονίων ξεκινά όταν το κέντρο αντίδρασης P₈₇₀ διεγείρεται από την απορρόφηση της φωτονιακής ενέργειας. Το διεγερμένο P₈₇₀ θα δώσει στη συνέχεια ένα ηλεκτρόνιο στη βακτηριοφαιοφυτίνη, η οποία το μεταφέρει στην κινόνη Q_A και καταλήγει στην κινόνη Q_B (Okamura et al.2000).



Εικόνα 16. Η κυκλική ροή ηλεκτρονίων της ανοξυγονικής αερόβιας φωτοσυνθετικής δραστηριότητας. Η κυκλική ροή ηλεκτρονίων ξεκινά όταν το κέντρο αντίδρασης P₈₇₀ διεγείρεται από την απορρόφηση της φωτονιακής ενέργειας (<http://faculty.washington.edu>).

1.6 Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας

Η παρούσα ερευνητική εργασία έχει ως στόχο:

α) Τη μελέτη της ακραιοφιλικής συμπεριφοράς ενός συστήματος με χαρακτηριστικά συμβίωσης που συγκροτείται από το χλωροφύκος *Trebouxia crenulata* (μετά την απομάκρυνση του από τον λειχήνα *Ramalina capitata*) και ένα βακτηριακό στέλεχος, και την σύγκριση της ανθεκτικότητας του συστήματος χλωροφύκους-βακτηρίου με την ανθεκτικότητα του χλωροφύκους σε αξενική κατάσταση.

β) Τον μοριακό και βιοχημικό χαρακτηρισμό του βακτηρίου

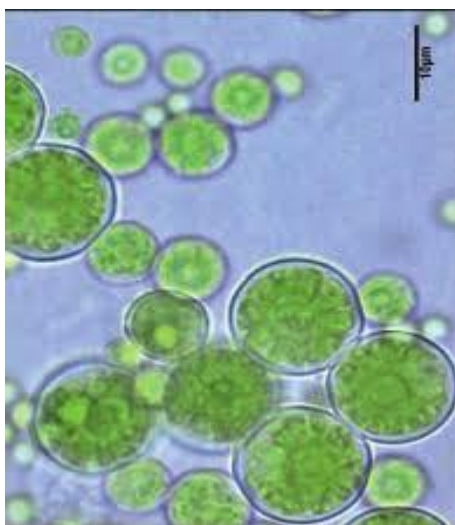
γ) Την διερεύνηση της ικανότητας παραγωγής H₂ σε κλειστά συστήματα από το χλωροφύκος *T. crenulata*, τόσο στο συμβιωτικό σύστημα, όσο και σε αξενική κατάσταση, και

δ) Την εξαγωγή συμπερασμάτων για τον τρόπο αλληλεπίδρασης των δύο μικροοργανισμών.

Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Το συμβιωτικό μονοκύτταρο χλωροφύκος *Trebouxia crenulata*

Το συμβιωτικό μονοκύτταρο χλωροφύκος *Trebouxia crenulata* αποτελεί τον φωτοβιώτη πολλών ειδών λειχήνων του γένους *Ramalina*, όπως το είδος *Ramalina capitata*. Η επιτυχής απομόνωση του έγινε από την CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa, Scotland, United Kingdom). Το στέλεχος 219/2 έχει απομονωθεί από λειχήνα στην περιοχή της Αγγλίας (Nyati et al. 2014), ενώ το ίδιο είδος έχει απομονωθεί από τον λειχήνα *Ramalina capitata* στην περιοχή της Αυστρίας (Tschaike et al. 2007). Πρόκειται για μονοκύτταρο, ευκαρυωτικό χλωροφύκος. Μορφολογικά τα κύτταρα είναι σφαιρικά και ελαφρώς ωοειδή με διάμετρο 10-16 μm (Εικόνα 17). Ο χλωροπλάστης διαιρείται σε πολλαπλούς λοβούς, στους οποίους υπάρχει άμυλο με τη μορφή κόκκων. Στο κέντρο του κυττάρου διακρίνεται ένα μεγάλο πυρηνοειδές (Tschaike et al. 2007). Η καλλιέργεια του φύκου έγινε αυτότροφα και μικτότροφα. Συγκεκριμένα, για την υγρή αυτότροφη καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο BBM (Bold's Basal Medium, Stein 1973) ενώ για την μικτότροφη BBM με προσθήκη γλυκόζης (5g/L), ή γλυκόζης (5g/L) και yeast extract (2,5 g/L). Η σύσταση των θρεπτικών φαίνεται στον Πίνακα 1. Όλες οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 20°C υπό ανάδευση, σε συνθήκες συνεχούς φωτισμού με ένταση 50 μmol·m⁻²·s⁻¹.



Βασίλειο: Plantae

Διαίρεση: Chlorophyta

Κλάση: Trebouxiophyceae

Τάξη: Trebouxiales

Οικογένεια: Trebouxiaceae

Γένος: *Trebouxia*

Είδος: *Trebouxia crenulata*

Εικόνα 17. Μικροσκοπική εικόνα κυττάρων του μονοκύτταρου χλωροφύκου *T. crenulata* όπως απομονώθηκαν από το λειχήνα *Ramalina capitata* (Tschaike et al. 2007).

Πίνακας 1: Η σύσταση του θρεπτικού μέσου *Bold's Basal Medium*.

Bold's Basal Medium	Stock Διάλυμα	ml/L
<i>KH₂PO₄</i>	8,75 g/500 ml	10
<i>CaCl₂·2H₂O</i>	1,25 g/500 ml	10
<i>MgSO₄·7H₂O</i>	3,75 g/500 ml	10
<i>NaNO₃</i>	12,5 g/500 ml	10
<i>K₂HPO₄</i>	3,75 g/500 ml	10
<i>NaCl</i>	1,25 g/500 ml	10
<i>Na₂EDTA</i>	10 g/L	1
<i>KOH</i>	6,2 g/L	1
<i>FeSO₄·7H₂O</i>	4,98 g/L	1
<i>H₂SO₄ (conc.)</i>	1 ml/L	1
<i>(Ιχνοστοιχεία)</i>		
<i>H₃BO₃</i>	2,8	1
<i>MnCl₂·4H₂O</i>	1,81	1
<i>ZnSO₄·7H₂O</i>	0,222	1
<i>Na MoO₄·5H₂O</i>	0,390	1
<i>CuSO₄·5H₂O</i>	0,079	1
<i>Co(NO₃)·6H₂O</i>	0,0494	1

2.2 Μέτρηση Κυτταρικού Όγκου

Δείγματα των 2 mL από τις καλλιέργειες του μικροφύκου φυγοκεντρήθηκαν σε βαθμονομημένο τριχοειδή σωλήνα (Εικόνα 18) για 5 λεπτά στα 1500 g, προκειμένου να καθιζήσουν. Η εκτίμηση της κυτταρικής συγκέντρωσης, παρουσιάζεται ως όγκος καθιζάμενων κυττάρων (Packed Cell Volume, PCV) ανά mL καλλιέργειας ($\mu\text{L PCV}/\text{mL}$ καλλιέργειας).

Εικόνα18. Διαβαθμισμένος σωλήνας PCV



2.3 Καταγραφή της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού - Μέτρηση Επαγωγικού Φθορισμού (JIP-test)

Για τη μέτρηση του επαγωγικού φθορισμού χρησιμοποιήθηκε το Handy Plant Efficiency Analyser, (Handy PEA, Hansatech Instruments, Εικόνα 19). Η συσκευή αυτή χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης μόνο ένα μέρος της ενέργειας που απορροφάται από τις χρωστικές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού χρησιμοποιείται για την φωτοχημεία της, ενώ το υπόλοιπο εκπέμπεται είτε ως θερμότητα είτε ως φθορισμός. Η διαδικασία της μέτρησης βασίζεται στο γεγονός ότι σε



Εικόνα 19. Η συσκευή Handy PEA για τον προσδιορισμό του επαγωγικού φθορισμού σε κύτταρα υγρής καλλιέργειας.

συνθήκες σκότους τα ενεργά κέντρα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού «αδειάζουν» από ηλεκτρόνια. Συνεπώς, όταν μετά το πέρας επαρκούς χρόνου που θα έχουν αδειάσει από ηλεκτρόνια βρεθούν σε κορεσμένο φωτονιακό περιβάλλον, τα επίπεδα φθορισμού μεταβαίνουν από ένα αρχικό επίπεδο (F_0) σε ένα μέγιστο επίπεδο (F_m) και έπειτα μειώνονται σταδιακά. Έτσι, μπορεί να εκτιμηθεί ο λόγος F_v/F_m (όπου $F_v = F_m - F_0$) ο οποίος σχετίζεται με τη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή (JIP test, Strasser & Strasser 1995) δίνει τη δυνατότητα μέτρησης και άλλων παραμέτρων που συνδέονται με τη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Πίνακας 2). Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού πραγματοποιήθηκαν αφού τα κύτταρα παρέμειναν στο σκοτάδι για 5 λεπτά, προκειμένου να αδειάσουν τα ενεργά κέντρα αντίδρασης και στη συνέχεια να γίνει η μέτρηση του JIP test. Οι μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού έγιναν με ανάλυση 10 μs σε χρονικό διάστημα 1 δευτερολέπτου. Ο φθορισμός μετρήθηκε με 12-bit ανάλυση και η διέγερση έγινε από 3 διόδους φωτισμού (LEDs) με ένταση ακτινοβολίας 3000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ερυθρού φωτός (650nm). Η επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από τις μετρήσεις έγινε με το λογισμικό Biolysen HP 4.0, σύμφωνα με τους Strasser & Strasser (1995).

Πίνακας 2: Φωτοσυνθετικές παράμετροι που αφορούν στην μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Μεταβλητή OJIP καμπύλης	Ορισμός
F_t	Τιμή φθορισμού σε χρόνο t μετά την ακτινοβολήση
$F_{50\mu s}$	Ένταση φθορισμού στα $50 \mu s$
$F_{300\mu s}$	Ένταση φθορισμού στα $300 \mu s$
$F_J=F_{2ms}$	Ένταση φθορισμού στο βήμα J ($2 ms$) της καμπύλης OJIP
$F_I=F_{30ms}$	Ένταση φθορισμού στο βήμα I ($30 ms$) της καμπύλης OJIP
$F_P(=F_m)$	Μέγιστη ένταση φθορισμού στο P της καμπύλης OJIP
t_{Fm}	Χρόνος σε (ms) που απαιτείται για να μεγιστοποιηθεί η ένταση του φθορισμού F_m
Area	Συνολική συμπληρωματική περιοχή ανάμεσα στην καμπύλη OJIP και την ευθεία που διέρχεται από το $F = F_m$
Παράμετροι JIP-test	
F_0	Ελάχιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί σε «ανοιχτά» κέντρα (open PSII RCs, $t = 0$)
F_m	Μέγιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί στο χρόνο όπου όλα τα κέντρα είναι «κλειστά» (closed PSII RCs, $t = t_{Fm}$)
F_v	Μεταβλητή τιμή φθορισμού τη χρονική στιγμή t
$F_v=F_m-F_0$	Μέγιστη τιμή μεταβλητής τιμής φθορισμού
$V_t=(F_t-F_0)/(F_m-F_0)$	Σχετική μεταβολή φθορισμού τη χρονική στιγμή t
$V_j=(F_j-F_0)/(F_m-F_0)$	Σχετική μεταβολή φθορισμού στο βήμα J
$M_0=(\Delta V/\Delta t)_0= 4(F_{300\mu s}-F_0)/(F_m-F_0)$	Αρχική κλίση σε ms της καμπύλης $V = f(t)$
$S_m=(Area)/(F_m-F_0)$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης OJIP (Area), ομαλοποιημένο ως προς F_v (αποτελεί μέτρο του αριθμού των οξειδοαναγωγικών κύκλων της Q_A)
$S_s=V_j/M_0$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης OJIP που αντιστοιχεί μόνο στην O_J φάση (διάστημα όπου η Q_A των RC ανάγεται μία φορά)
$N=S_m/S_s=S_m M_0(1/V_j)$	Μέτρο αριθμού κύκλων αναγωγής της Q_A στο διάστημα t_{Fm}
Ειδικές ροές ενέργειας (ανά κέντρο που ανάγει Q_A)	

$ABS/RC=M_0(1/V_j)(1/\Phi_{p0})$	<i>Μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής Κεραίας</i>
$TR_0/RC=M_0(1/V_j)$	<i>Ενέργεια που παγιδεύεται ανά κέντρο αντίδρασης ($t = 0$)</i>
$ET_0/RC=M_0(1/V_j)W_0$	<i>Ροή ηλεκτρονίων ανά κέντρο αντίδρασης ($t = 0$)</i>
$DI_0/RC=(ABS/RC)-(TR_0/RC)$	<i>Διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης ($t=0$)</i>
Αποδόσεις ή λόγοι επιμέρους ροών	
$\Phi_{p0}=TR_0/ABS=[1-(F_0/F_m)]$	<i>Μέγιστη κβαντική απόδοση της πρωτογενούς φωτοχημείας ($t = 0$)</i>
$\Psi_0=ET_0/TR_0=1-V_j$	<i>Πιθανότητα να προκαλέσει μια διέγερση τη μετακίνηση ενός ηλεκτρονίου κατά μήκος της αλυσίδας πέρα από την Q_A^- ($t = 0$)</i>
$\Phi E_0=ET_0/ABS=[1-(F_0/F_m)]\Psi_0$	<i>Κβαντική απόδοση της μεταφοράς ηλεκτρονίων ($t = 0$)</i>
$\Phi D_0=1-\Phi_{p0}=F_0/F_m$	<i>Κβαντική απόδοση της διάχυσης ηλεκτρονίων ($t = 0$)</i>
Εκτιμώμενες ροές ενέργειας ανά διεγερμένη περιοχή	
ABS/CS_0	<i>Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το F_0</i>
ABS/CS_m	<i>Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το F_m</i>
$TR_0/CS_0=FP_0(ABS/CS_0)$	<i>Παγιδευμένη ενέργεια ανά διεγερόμενη περιοχή της μεμβράνης (για $t = 0$)</i>
$ET_0/CS_0=(ABS/CS_0)$	<i>Ροή ηλεκτρονίων ανά περιοχή διέγερσης</i>
$DI_0/CS_0=(ABS/CS_0)-(TR_0/CS_0)$	<i>Διαχεόμενη ενέργεια ανά περιοχή διέγερσης</i>
Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης	
RC/CS_0	<i>Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης</i>
Δείκτες επίδοσης	
$PI_{ABS}=(RC/ABS)(\Phi_{p0/1}-\Phi_{p0})(\Psi_{0/1}-\Psi_0)$	<i>Επιδόσεις ανά απορροφώμενη ενέργεια</i>
$PI_{CS_0}=(RC/CS_0)(\Phi_{p0/1}-\Phi_{p0})(\Psi_{0/1}-\Psi_0)$	<i>Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης ($t = 0$)</i>
$PI_{CS_m}=(RC/CS_m)(\Phi_{p0/1}-\Phi_{p0})(\Psi_{0/1}-\Psi_0)$	<i>Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης ($t = t_{Fm}$)</i>
$SFI_{ABS}=(1-\Phi_{p0})(1-\Psi_0)$	<i>Δείκτης λειτουργικότητας</i>

2.4 Εκχύλιση και Φασματικός Χαρακτηρισμός Χρωστικών

Η εκχύλιση των ολικών χρωστικών πραγματοποιήθηκε υπό πράσινο φωτισμό χαμηλής έντασης, ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση των χλωροφυλλών. Φυγοκεντρήθηκαν 5-10ml υγρής καλλιέργειας στα 1500 g για 5 λεπτά. Αφού απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, τα κύτταρα αναμίχθηκαν με 1 ml μεθανόλη. Ακολούθησε καλή ανάδευση και θέρμανση για 2 λεπτά του δείγματος στους 65°C. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στα 1500g, για 5 λεπτά. Το μεθανολικό εκχύλισμα συλλέχθηκε και το ίζημα επανεκχυλίστηκε με μεθανόλη. Ο φασματικός χαρακτηρισμός του μεθανολικού εκχυλίσματος έγινε με το φασματοφωτόμετρο USB4000 της Ocean Optics, χρησιμοποιώντας ως UV-VIS-NIR πηγή φωτός την DH-2000-BAL της Mikropack.

2.5 Ποιοτική και Ποσοτική Καταγραφή H₂, O₂ και N₂ με τη Χρήση GC-TCD

Η δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου (H₂) από το χλωροφύκος *Trebouxia crenulata* σε κλειστό σύστημα ελέγχθηκε με Αέρια Χρωματογραφία Θερμικής Αγωγιμότητας GC-TCD (Shimadzu GC 2010 Plus, Kyoto, Japan), με φέρον αέριο αργό υπό πίεση 5 bar. Πραγματοποιήθηκε εισαγωγή 250 μL αερίου δείγματος στην GC-TCD με ειδική gas type σύριγγα, όπου και έγινε ο διαχωρισμός των αερίων (H₂, O₂ και N₂) με βάση τη διαφορά στη θερμική αγωγιμότητά τους. Η θερμική αγωγιμότητα του αργού είναι 0.0001772 W/cmK, του αζώτου 0.0002598 W/cmK, του οξυγόνου 0.0002674 W/cmK και του υδρογόνου 0.001815 W/cmK. Για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε μια τριχοειδής στήλη μεγάλου μήκους (30m, Ø 0,53 mm) της Vici Metronics MC (Poulsbo, USA), ενώ η θερμοκρασία του TCD ανιχνευτή ήταν 200°C, του φούρνου 120°C, και του σημείου εισόδου της ένεσης 180°C (Chader et al. 2009). Τα δείγματα που ελέγχθηκαν για την παραγωγή υδρογόνου επωάστηκαν σε μπουκάλια των 100 ml τα οποία έκλεισαν ερμητικά με septum και διατηρήθηκαν στους 22°C, σε συνθήκες χαμηλής έντασης φωτός (15 μmol m⁻²s⁻¹).

2.6 Μοριακός χαρακτηρισμός του συμβιωτικού βακτηρίου σε επίπεδο γένους

Καλλιέργεια δεκτικών κοττάρων E. coli DH5a

Οι καλλιέργειες *E. coli* αναπτύχθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο LB παρουσία X-Gal (20mg/mL), IPTG (0,1M) και αμικιλίνης (200μg/mL). Η επώαση έγινε για ένα βράδυ στους 30°C. Την επόμενη μέρα τα τρυβλία επωάστηκαν στους 37°C για τρεις ώρες.

Καλλιέργεια συμβιωτικού βακτηρίου

Οι καλλιέργειες του συμβιωτικού βακτηρίου αναπτύχθηκαν σε στερεό μικτότροφο θρεπτικό μέσο BBM με προσθήκη γλυκόζης 5g/L, σε θερμοκρασία δωματίου.

Απομόνωση βακτηριακού DNA

Από μικρό αριθμό αποικιών απομονώθηκε το ολικό βακτηριακό DNA με βρασμό (30 λεπτά, 95°C).

Ενίσχυση περιοχής 16S rRNA

Χρησιμοποιήθηκε ζεύγος παγκόσμιων εκκινητών, με αλληλουχία:

8F AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1350R GACGGGCGGTGTGTACAAG

Υποβλήθηκαν σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) δείγματα με DNA του μικροφύκου *Chlorella minutissima* και του συμβιωτικού βακτηρίου καθώς και δις απεσταγμένο H₂O ως αρνητικός μάρτυρας. Η σύσταση του μείγματος για κάθε δείγμα της αντίδρασης ήταν η παρακάτω:

PrimerF 0,7μl
PrimerR 0,7μl
dNTPs (10mM) 0,7μl
5x Taq Buffer (Sigma-Aldrich) 5μl
TaqDNAPol (Sigma-Aldrich) 1μl
DNA 1μl
ddH₂O 15,9 μl

Το πρόγραμμα της αντίδρασης ήταν το παρακάτω:

94 °C, 2 λεπτά	} 30 κύκλοι
94°C, 30 δευτ.	
57°C, 30 δευτ.	
72°C, 45 δευτ.	
72°C, 5 λεπτά	

Τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE και ως μάρτυρας μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε ο GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific). Η επιθυμητή ζώνη είχε μέγεθος 1,3 kb κατά προσέγγιση και απομονώθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης με χρήση του NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel).

Δημιουργία ανασυνδυασμένου πλασμιδίου

Προστέθηκαν Α στο καθαρισμένο προϊόν με επώαση για 10 λεπτά στους 72°C και έγινε εκ νέου καθαρισμός του προϊόντος. Η αντίδραση λιγοποίησης έγινε με χρήση του φορέα pGEM®-T Easy Vector (Promega), ο οποίος φέρει Τ στα άκρα, γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και γονίδιο lacZ που κωδικοποιεί το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση. Το προϊόν της αντίδρασης διατηρήθηκε για ένα βράδυ στους 4°C.

Μετασχηματισμός κυττάρων E. coli

Η μεταφορά του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου έγινε σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* (DH5α). Τα κύτταρα είχαν αναπτυχθεί παρουσία X-Gal ως μέσου επιλογής των μετασχηματισμένων αποικιών.

Αλληλούχιση 16S rRNA αμπλικονίου

Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις αποικίες του βακτηρίου, κλωνοποιημένες σε πλασμιδιακό φορέα pGEM-Teasy (Promega). Κάθε μια από αυτές αλληλουχήθηκε με τους εκκινητές T7 και SP6 αφού ο συγκεκριμένος φορέας περιέχει δύο υποκινητές, της T7 και SP6 RNA πολυμεράσης, οι οποίοι βρίσκονται στα δύο άκρα του πολυσυνδέτη. Τα δεδομένα που προέκυψαν από την αλληλούχιση της περιοχής 1,3 kb του 16S rRNA για το βακτήριο επεξεργάστηκαν με πολλαπλή ευθυγράμμιση χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο ClustalW, βάσει των αποτελεσμάτων του αλγορίθμου BLAST. Οι φυλογενετικές σχέσεις των αποικιών που αλληλουχήθηκαν, μελετήθηκαν επίσης με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανότητας (Maximum Likelihood) η οποία βασίστηκε στο μοντέλο Tamura-Nei. Το φυλογενετικό δένδρο προέκυψε με τη μέθοδο bootstrap για 500 επαναλήψεις. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε διαχωρισμό που αναπαράχθηκε από λιγότερο από 50% επαναλήψεις bootstrap καταρρίφθηκαν.

2.7 Μοριακός χαρακτηρισμός του συμβιωτικού μεθυλοβακτηρίου σε επίπεδο είδους

Καλλιέργειες μεθυλοβακτηρίου

Οι στερεές καλλιέργειες μεθυλοβακτηρίου αναπτύχθηκαν σε μη εκλεκτικό στερεό θρεπτικό μέσο NA και επωάστηκαν στους 28 °C, χωρίς φωτισμό.

Απομόνωση DNA μεθυλοβακτηρίου

Από μικρό αριθμό αποικιών απομονώθηκε το συνολικό βακτηριακό DNA με βρασμό (30 λεπτά, 95°C).

Απομόνωση DNA από λειχήνα Ramalina sp.

Χρησιμοποιήθηκαν 100mg λειχήνα *Ramalina* sp., όπου απολυμάνθηκε εξωτερικά με διαδοχικές εμβάπτισεις σε αιθανόλη 75% (1 λεπτό), χλωρίνη 4% (10 λεπτά), αιθανόλη 75% (30 δευτ.) και δις απεσταγμένο νερό και έπειτα λειοτριβήθηκε σε υγρό άζωτο. Ακολούθησε απομόνωση του ολικού DNA με τη χρήση μεθόδου με βάση το CTAB κατά τους Agar & Cansaran (2006), απουσία LiCl και PVPP.

Ενίσχυση περιοχής groB

Σχεδιάστηκε και χρησιμοποιήθηκε ζεύγος ειδικών εκκινητών, με αλληλουχία:

rpoB_F GGCATCATGAAGATGGTCAAGGTCTTCGTGG
rpoB_R AGTACGGGCCGATCGAGCGCGCGTG

Υποβλήθηκαν σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) δείγματα με ολικό DNA από λειχήνα και μεθυλοβακτήριο καθώς και δις απεσταγμένο H₂O ως αρνητικός μάρτυρας. Η σύσταση του μείγματος για κάθε δείγμα της αντίδρασης ήταν η παρακάτω:

PrimerF 2,5μl
PrimerR 2,5μl
dNTPs (10mM) 1 μl
10x Taq Buffer (Minotech) 5μl
TaqDNAPol (Minotech) 0,5 μl
DNA 10 μl
ddH₂O 28,5 μl

Το πρόγραμμα της αντίδρασης ήταν το παρακάτω:

94 °C, 2 λεπτά
94°C, 45 δευτ. }
64°C, 30 δευτ. } 35 κύκλοι
72°C, 45 δευτ. }
72°C, 5 λεπτά

Τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE και ως μάρτυρας μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε ο λDNA/ PstI Digest (Minotech). Η επιθυμητή ζώνη είχε μέγεθος 600 b κατά προσέγγιση και απομονώθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης με χρήση του NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel).

Αλληλούχιση rpoB αμπλικονίου

Η αλληλούχιση της 600b περιοχής έγινε με τον εκκινητή rpoB_F. Με βάση τα αποτελέσματα της αλληλούχισης κατασκευάστηκε φυλογενετικό δένδρο το οποίο περιλαμβάνει βακτηριακά στελέχη με πολύ υψηλή ομοιότητα (πάνω από 90% identity και cover) με την αλληλουχία του αμπλικονίου, σύμφωνα με τον αλγόριθμο BLAST και με τη χρήση του προγράμματος MEGA.

Αποτελέσματα

3.1 Μελέτη της ακραιοφιλικής συμπεριφοράς του συμβιωτικού σχήματος του χλωροφύκου *Trebouxia crenulata* με βακτήριο

Οι πιο κοινοί φυκοβιώτες σε λειχήνες είναι μονοκύτταρα χλωροφύκη του γένους *Trebouxia*. Για τις ανάγκες προηγούμενης μελέτης του εργαστηρίου σχετικά με την φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου από λειχήνες, έγινε προμήθεια του χλωροφύκου *Trebouxia crenulata* από την CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa, Scotland, United Kingdom). Το συγκεκριμένο είδος αποτελεί τον φωτοβιώτη του λειχήνα *Ramalina capitata*. Όλα τα είδη λειχήνων του γένους *Ramalina* τα οποία ελέγχθηκαν στα πλαίσια της παραπάνω μελέτης, ήταν τα μοναδικά που παρουσίασαν ελάχιστη έως μηδενική ικανότητα παραγωγής φωτοσυνθετικού H₂ (Parasyri et al. 2018).

Το χλωροφύκος αναπτύχθηκε αρχικά σύμφωνα με τις οδηγίες της CCAP σε αυτότροφο θρεπτικό μέσο BBM (Stein 1973). Σε αυτές τις συνθήκες, παρουσίασε έναν καθ' όλα λειτουργικό φωτοσυνθετικό μηχανισμό αλλά πολύ αργό ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με άλλα χλωροφύκη, δίνοντας την εικόνα ενός οργανισμού που δεν επενδύει την φωτοσυνθετικά παραγόμενη ενέργεια σε αύξηση και ανάπτυξη. Έτσι δοκιμάστηκε η ανάπτυξή του και σε μικτότροφο θρεπτικό μέσο, με την προσθήκη γλυκόζης στο προτεινόμενο θρεπτικό. Στην περίπτωση αυτή ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός παρέμεινε λειτουργικός, ενώ ο ρυθμός ανάπτυξης (εκφρασμένος σε κυτταρικό όγκο) παρουσίασε μικρή αύξηση σε σχέση με αυτόν της καλλιέργειας σε αυτότροφο θρεπτικό μέσο (αποτελέσματα πτυχακής εργασίας, Πατιτάκη 2017). Ακόμη, μεταξύ των δύο τύπων καλλιέργειας παρατηρήθηκε μια μη αναμενόμενη διαφοροποίηση στις χρωστικές, καθώς στην καλλιέργεια σε μικτότροφο θρεπτικό μέσο υπήρχαν περισσότερα καροτενοειδή αλλά και βακτηριοχλωροφύλλη. Αποκαλύφθηκε έτσι η παρουσία και δεύτερου μικροοργανισμού, ενός βακτηρίου με φωτοσυνθετική ικανότητα. Μάλιστα, η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο μικροοργανισμών επέδειξε μια ιδιαίτερη δυναμική, καθώς ο κάθε ένας πληθυσμός ευνοούταν μεν υπό συγκεκριμένες συνθήκες, χωρίς όμως να εκμηδενίζει τον άλλο. Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός του χλωροφύκου δεν παρουσίασε σημεία καταπόνησης, ακόμα και όταν στην καλλιέργεια υπήρχαν ελάχιστα κύτταρα λόγω της μεγάλης αύξησης του πληθυσμού του βακτηρίου. Διατυπώθηκε έτσι η υπόθεση πως το βακτήριο και το χλωροφύκος θα μπορούσαν να συγκροτούν ένα σταθερό σχήμα με χαρακτηριστικά συμβιωτικής σχέσης αμοιβαιότητας, το οποίο να επηρεάζει την φωτοσυνθετική δραστηριότητα και την διαχείριση της ενέργειας του χλωροφύκου. Υπάρχουν πολλά παραδείγματα σταθερών σχέσεων αμοιβαιότητας βακτηρίων και μικροφυκών, που συντονίζονται μεταβολικά μέσω αμοιβαίας παραγωγής σηματοδοτικών μορίων (Limardo et al. 2015). Μελέτες τέτοιων σχέσεων αμοιβαιότητας έχουν αποκαλύψει θετικό αντίκτυπο της αλληλεπίδρασης στην ανάπτυξη των μικροφυκών με την έκκριση ενώσεων, όπως IAA και βιταμίνης B₁₂ από τα βακτήρια. Άλλωστε, πολύ πρόσφατα αναφέρθηκε ένας παρόμοιος τύπος αλληλεπίδρασης χλωροφύκου του γένους *Trebouxia*, το οποίο, αφού απομονώθηκε

από λειχήνα ανέπτυξε μια δευτερογενή σχέση αμοιβαιότητας με στέλεχος από τα Alphaproteobacteria (Kono et al. 2017).

Καθώς το χλωροφύκος απομονώθηκε από θαλλό λειχήνα, το παραπάνω εύρημα παρουσιάζει ακόμα μεγαλύτερο ενδιαφέρον. Σύμφωνα με τα τελευταία δεδομένα από πολύ-ωμικές αναλύσεις, φαίνεται πως οι βακτηριακές κοινότητες του θαλλού συμμετέχουν σε μια σειρά σημαντικών οικοφυσιολογικών διαδικασιών και διαδραματίζουν αναπόσπαστο ρόλο στο συμβιωτικό πλαίσιο των λειχήνων (Schneider et al. 2011, Cardinale et al. 2012, Sigurbjörnsdóttir 2015). Άλλωστε, είναι γνωστό ότι κάποια βακτηριακά στελέχη φέρουν την ικανότητα ενίσχυσης της ανάπτυξης και συνεισφέρουν στην ανθεκτικότητα του λειχήνα σε αβιοτικές καταπονήσεις (Grube et al. 2015).

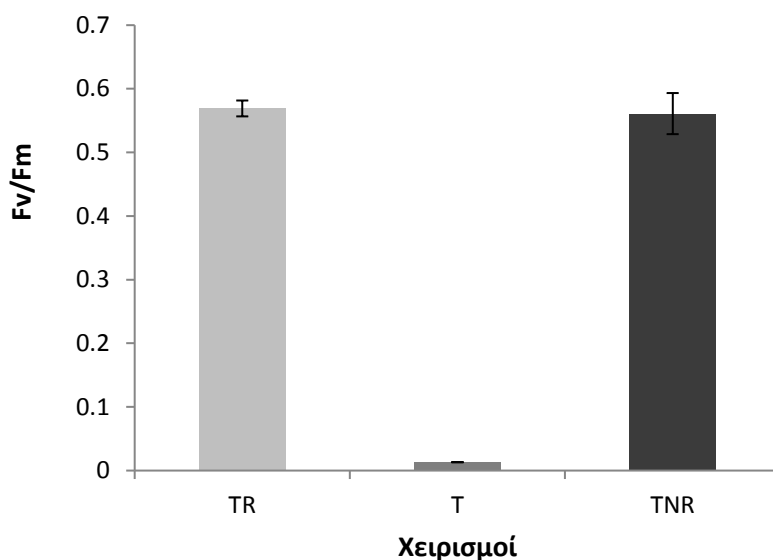


Εικόνα 20. Μετάβαση καλλιέργειας κυττάρων *T. crenulata*, από αυτότροφες (αριστερά) σε μικτότροφες συνθήκες (δεξιά) και μετάβαση από μικτότροφες σε αυτότροφες συνθήκες μετά την κατανάλωση των θρεπτικών του μικτότροφου θρεπτικού μέσου (κάτω) (Πατιτάκη 2017).

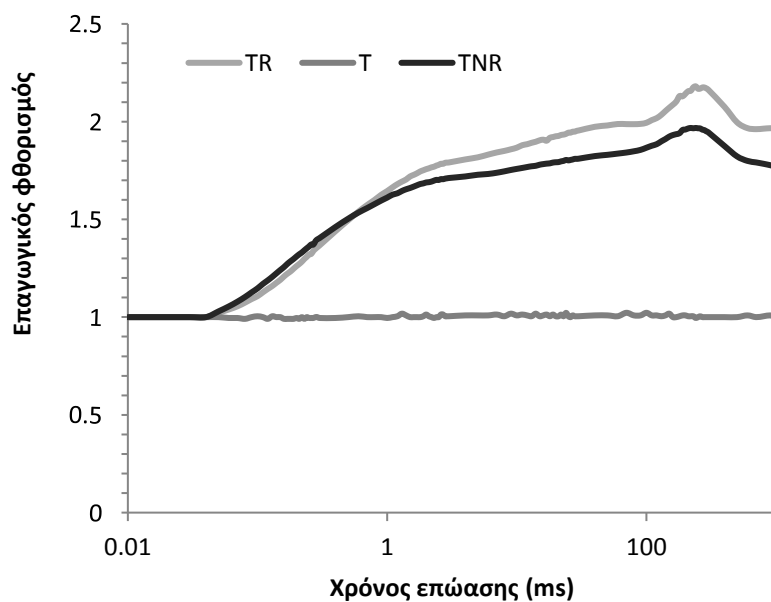
3.1.1 Έλεγχος της ανθεκτικότητας του χλωροφύκους *T. crenulata* (στο συμβιωτικό σχήμα) σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία και αφυδάτωση

Είναι γνωστό ότι οι λειχήνες παρουσιάζουν μεγάλη ανθεκτικότητα σε πληθώρα αβιοτικών καταπονήσεων όπως οι πολύ χαμηλές θερμοκρασίες, η απόλυτη ξηρασία και η υψηλή αλατότητα (Meeßen et al. 2013, Delmail et al. 2013, Parasyri et al. 2018). Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας επιχειρήθηκε αρχικά να εξεταστεί εάν ο απομονωμένος φωτοβιώτης *T. crenulata* διατηρεί αυτή την ιδιότητα. Ως εκ τούτου πραγματοποιήθηκε το παρακάτω πείραμα για να ελεγχθεί η ακραιοφιλία του. Δείγμα υγρής αυτότροφης καλλιέργειας μεταφέρθηκε σε φίλτρο Whatman (grade 6) (χειρισμός TR) και αφού αφαιρέθηκε η υγρασία από το φίλτρο και επήλθε πλήρης αφυδάτωση (χειρισμός T), εκτέθηκε σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία (-196°C/ 77K) για 30 λεπτά (χειρισμός TN). Στη συνέχεια, έγινε επαναφορά των ακινητοποιημένων κυττάρων σε θερμοκρασία δωματίου και επώαση στο ωσμωτικά κατάλληλο θρεπτικό μέσο BBM (χειρισμός TNR). Σε κάθε χειρισμό έγινε μέτρηση επαγωγικού φορισμού με χρήση της μεθόδου JIP-test για να εκτιμηθεί εάν επηρεάζεται η λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και κατ'επέκταση εάν τα κύτταρα παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στον παραπάνω συνδυασμό ακραίων καταπονήσεων.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 21, όταν το φύκος βρίσκεται σε κατάσταση απόλυτης ξηρασίας (T) έχει μηδενική τιμή φωτοσυνθετικής απόδοσης (εκφρασμένη ως Fv/Fm), δηλαδή είναι φωτοσυνθετικά ανενεργό. Ωστόσο, το χλωροφύκος ανακάμπτει πλήρως από την απόλυτη ξηρασία και την ακραία χαμηλή θερμοκρασία καθώς η φωτοσυνθετική απόδοση του χειρισμού TNR επανέρχεται στα επίπεδα της αρχικής καλλιέργειας (TR). Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το χλωροφύκος παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε μη λειηνοποιημένη κατάσταση, όπως ακριβώς έχει δείξει και για την λειηνοποιημένη (Parasyri et al. 2018). Ο πιο διαδεδομένος μηχανισμός απόκρισης στην παραπάνω αβιοτική καταπόνηση είναι η παραγωγή και η συγκέντρωση υψηλών συγκεντρώσεων σακχάρων στο εσωτερικό του κυττάρου. Ιδιαίτερα για ανθεκτικούς φωτοβιώτες του γένους *Trebouxia* από άλλα είδη λειχήνων, έχει αναφερθεί η παραγωγή ριβιτόλης και σακχαρόζης (Sadovsky et al. 2016).



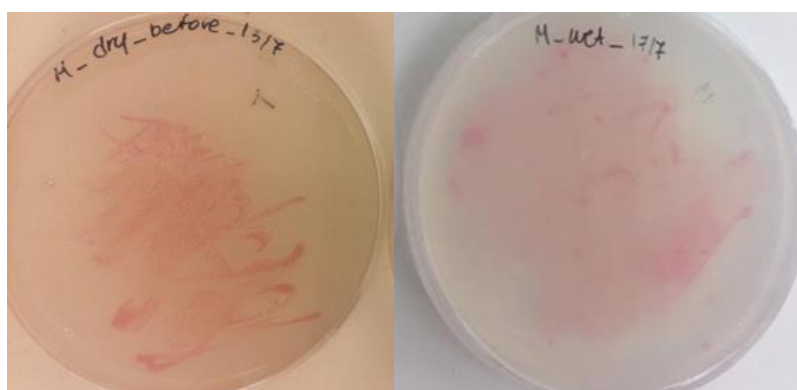
Εικόνα 21. Τιμές φωτοσυνθετικής απόδοσης Fv/Fm (πάνω) και καμπύλες επαγωγικού φθορισμού (κάτω) που μετρήθηκαν σε κύτταρα *T. crenulata* (εντός του συμβιωτικού σχήματος) σε τρεις διακριτές καταστάσεις: συνθήκες μάρτυρα (TR), μετά από πλήρη αφυδάτωση (T) και μετά από συνδυασμό πλήρους αφυδάτωσης και επώασης σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία (TNR).



3.1.2 Έλεγχος της ανθεκτικότητας του βακτηρίου σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία και αφυδάτωση

Μετά την επιβεβαίωση ότι ο φωτοβιώτης *T. crenulata*, ακόμα και σε μη λειχηνοποιημένη κατάσταση, παραμένει εξαιρετικά ανθεκτικός σε πλήρη αφυδάτωση και σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία, πραγματοποιήθηκε το αντίστοιχο πείραμα και για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας του βακτηρίου, με σκοπό να αντληθούν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την επικάλυψη του εύρους ανθεκτικότητάς τους αλλά και την αλληλεπίδρασή τους. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε μικτότροφη καλλιέργεια, στην οποία κυριαρχεί σχεδόν ολοκληρωτικά ο βακτηριακός πληθυσμός. Τα βακτηριακά κύτταρα μεταφέρθηκαν σε φίλτρο Whatman (grade 1). Στη συνέχεια, αφυδατώθηκαν πλήρως και εκτέθηκαν σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία (-196°C/ 77K) για 30 λεπτά. Ακολούθησε επαναφορά των ακινητοποιημένων κυττάρων σε θερμοκρασία δωματίου και επώαση σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο. Στη συνέχεια τα βακτήρια επιστρώθηκαν σε τρυβλία petri με στερεό μικτότροφο θρεπτικό μέσο για να εκτιμηθεί η επιβίωση τους. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 22, μετά από επώαση 2 εβδομάδων τόσο τα τρυβλία που μολύνθηκαν με τα βακτήρια μάρτυρες (βακτήρια που δεν εκτέθηκαν σε ακραίες συνθήκες) όσο και τα τρυβλία που μολύνθηκαν με βακτήρια που εκτέθηκαν σε αφυδάτωση και ακραία χαμηλή θερμοκρασία παρουσίασαν παρόμοια ανάπτυξη. Αυτό καταδεικνύει ότι και το συγκεκριμένο βακτήριο (όπως και το χλωροφύκος) παρουσιάζει ανθεκτικότητα στις παραπάνω ακραίες καταπονήσεις.

Συνήθως τα βακτήρια με αυτού του είδους την ανθεκτικότητα αποκρίνονται σε ακραίες συνθήκες συνθέτοντας/προσλαμβάνοντας ωσμωλύτες, τροποποιώντας την σύσταση των μεμβρανών τους (De Maayer 2014), χρησιμοποιώντας CSPs (cold-shock proteins), ενεργοποιώντας δευτερογενή μεταβολικά μονοπάτια και αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Tribelli & López, 2018) ή ειδικότερα συγκεντρώνοντας μαγγάνιο, που ενισχύει θετικά την υπεροξειδική δισμουτάση. Το ένζυμο αυτό φέρει κομβικό ρόλο στην επίτευξη ανθεκτικότητας στην ξηρασία (Shirkey et al. 2000, Daly et al. 2004). Ένα κοινό εύρος ανθεκτικότητας, με δεδομένο ότι συχνά οι αποκρίσεις κάποιων συμβιωτών σε καταπονήσεις διαφέρουν από την απόκριση του μικρο-οικοσυστήματος ενός λειχήνα σαν σύνολο (Kosugi et al. 2009), μπορεί να υποδηλώνει συνεξέλιξη και πιθανή συνεργιστική δράση των βιωτών στην επίτευξη αρμοστικότητας σε ακραία περιβάλλοντα. Υπάρχουν άλλωστε αναφορές για



Εικόνα 22. Ανάπτυξη βακτηρίου σε τρυβλία μετά από επώαση 2 εβδομάδων. Αριστερά, τρυβλία που μολύνθηκαν με βακτήρια που δεν εκτέθηκαν σε ακραίες συνθήκες. Δεξιά, τρυβλία που μολύνθηκαν με βακτήρια που εκτέθηκαν σε αφυδάτωση και ακραία χαμηλή θερμοκρασία.

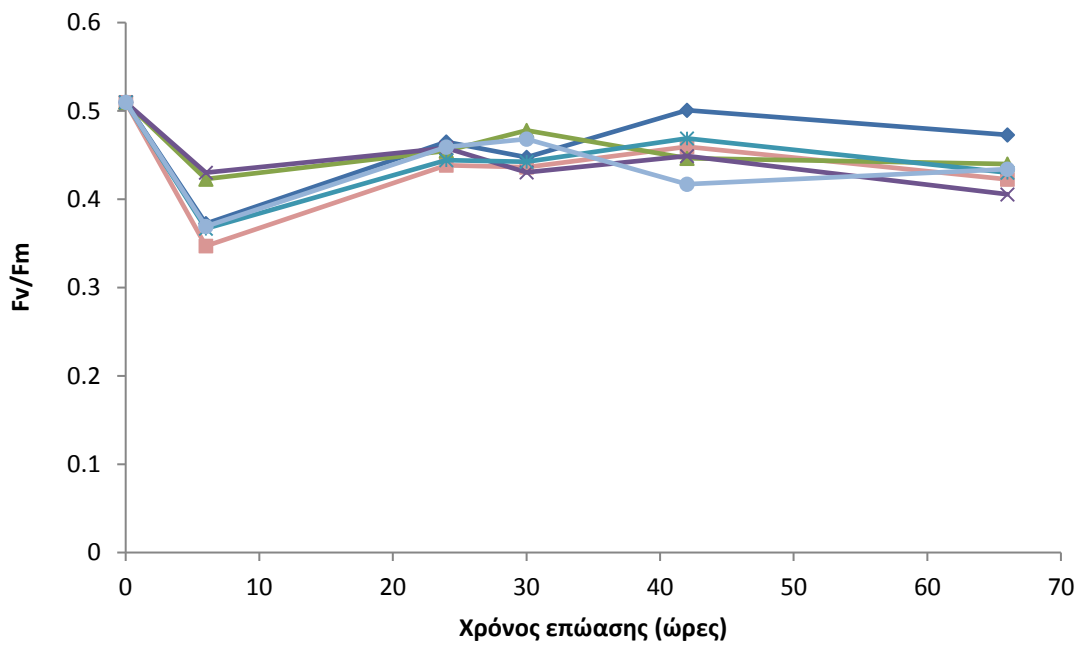
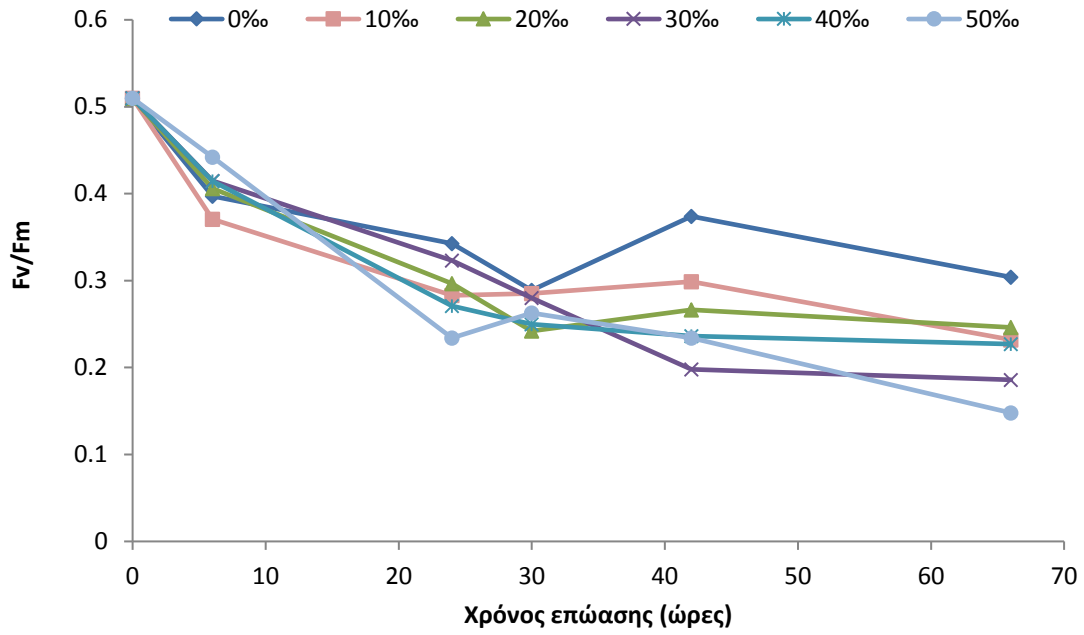
ψυχρόφιλα βακτηριακά ενδοθαλλικά στελέχη που αλληλεπιδρούν με αρκτικούς λειχήνες (Selbmann et al. 2009).

3.1.3 Έλεγχος της ανθεκτικότητας του χλωροφύκου *T. crenulata* (στο συμβιωτικό σχήμα) σε υψηλή αλατότητα

Οι λειχήνες είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην υψηλή αλατότητα (Delmail et al. 2013). Στο παρακάτω πείραμα, επιχειρήθηκε να εξακριβωθεί εάν το υπό μελέτη συμβιωτικό σχήμα χλωροφύκου και βακτηρίου είναι επίσης ανθεκτικό. Επιλέχθηκε υγρή αυτότροφη καλλιέργεια με κυτταρική συγκέντρωση 2μl PCV/ml, η οποία μοιράστηκε σε γυάλινα αποστειρωμένα μπουκαλάκια των 50mL που κλείνουν αεροστεγώς και περιείχαν θρεπτικό BBM με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl. Οι τελικές περιεκτικότητες των δειγμάτων σε NaCl ήταν 0, 10, 20, 30, 40 και 50 g/L. Η επώαση στα θρεπτικά με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικές εντάσεις φωτισμού: α) σε υψηλής έντασης φωτισμό ($140 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, HL) και β) σε χαμηλής έντασης φωτισμό ($15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, LL) με σκοπό να διερευνηθεί παράλληλα και ο ρόλος των συνθηκών φωτισμού στην απόκριση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του χλωροφύκου στην εν λόγω καταπόνηση. Για όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού με την μέθοδο JIP-test σε τακτικές χρονικές περιόδους της επώασης (0, 6, 24, 30, 42 και 66 ώρες).

Βάσει των μετρήσεων, διαμορφώθηκε μια εικόνα για την μεταβολή της κατάστασης της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Τα αποτελέσματα αναδεικνύουν, αρχικά, μια σαφώς αρνητική συνεισφορά της υψηλής έντασης φωτισμού στην ανθεκτικότητα του χλωροφύκου, ανεξαρτήτως της περιεκτικότητας σε NaCl. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 23, οι τιμές F_v/F_m όλων των δειγμάτων που επώαστηκαν υπό συνθήκες HL είναι χαμηλότερες από τις αντίστοιχες των δειγμάτων σε συνθήκες LL. Τα κύτταρα που επώαστηκαν σε HL συνθήκες παρουσιάζουν μια προσπάθεια ανάκαμψης του φωτοσυνθετικού τους μηχανισμού μετά από 42 ώρες επώασης, χωρίς όμως τελικά να την επιτυγχάνουν. Η φωτοαναστολή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του χλωροφύκου σε HL συνθήκες συνδυασμένη με την καταπόνηση (αυξημένη αλατότητα) έχει ως αποτέλεσμα την σταδιακή μείωση των τιμών F_v/F_m όσο αυξάνει η συγκέντρωση του άλατος στο θρεπτικό μέσο. Ο αρνητικός μάρτυρας (0% NaCl) δίνει την υψηλότερη τιμή F_v/F_m ενώ τα δείγματα με μεγάλη περιεκτικότητα σε NaCl (30, 40, 50%), τις χαμηλότερες.

Όσον αφορά στις καλλιέργειες του χλωροφύκου που επώαστηκαν σε LL συνθήκες, έδειξαν ότι σε όλες τις αλατότητες οι τιμές F_v/F_m παραμένουν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (66 ώρες) σχετικά σταθερά σε καλά επίπεδα δείχνοντας έναν λειτουργικό φωτοσυνθετικό μηχανισμό που αντέχει και σε ακραίες συνθήκες αλατότητας (50g/L).

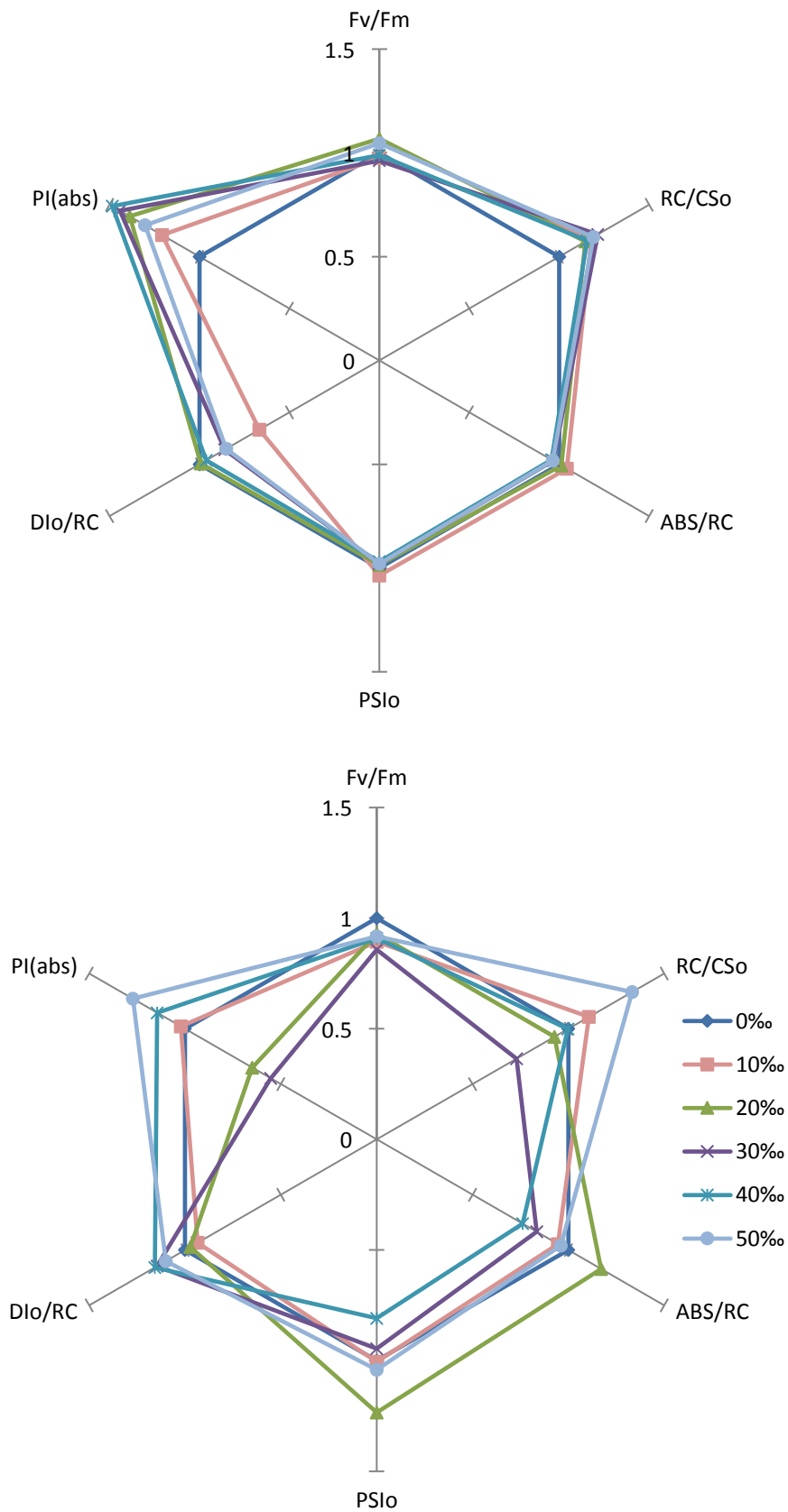


Εικόνα 23. Διαφοροποίηση των τιμών F_v/F_m μετά από διαφορετικές περιόδους επώασης κυττάρων *T. crenulata* (στο συμβιωτικό σχήμα) σε διαφορετικές αλατότητες (0, 10, 20, 30, 40 και 50 ‰ NaCl) και σε συνθήκες υψηλής (πάνω, HL) και χαμηλής (κάτω, LL) έντασης φωτός.

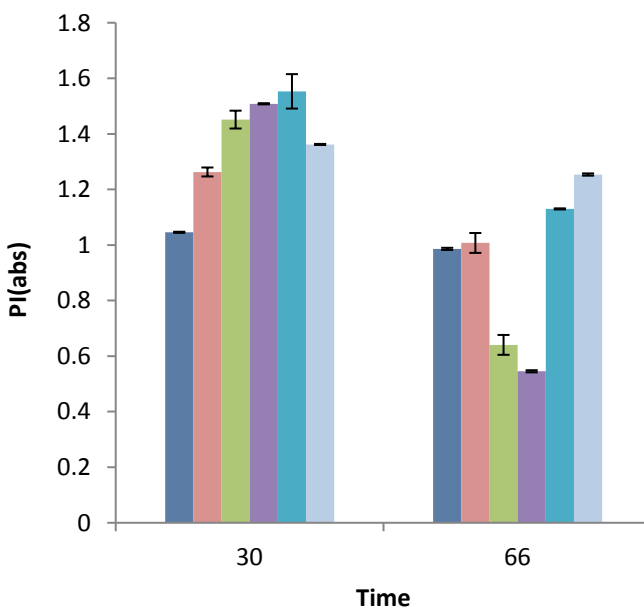
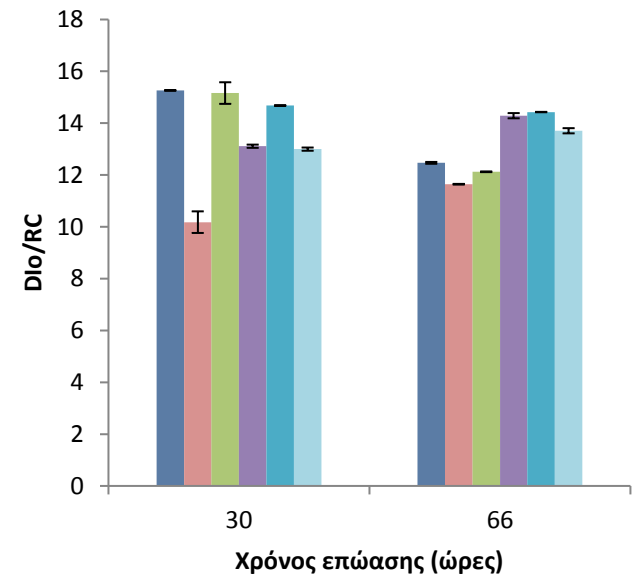
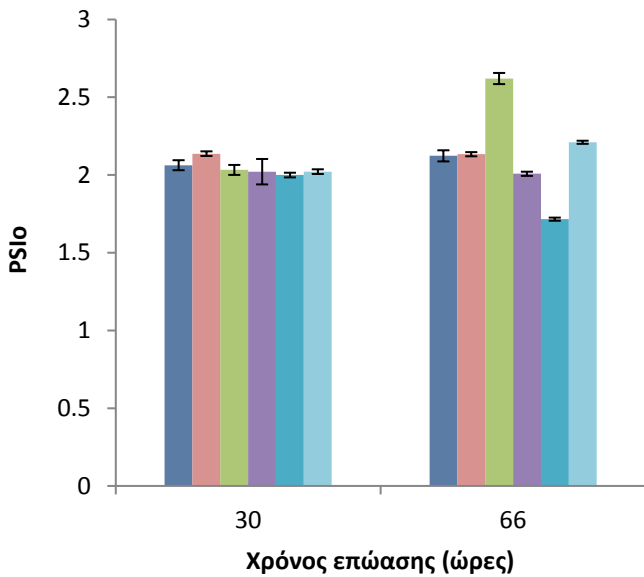
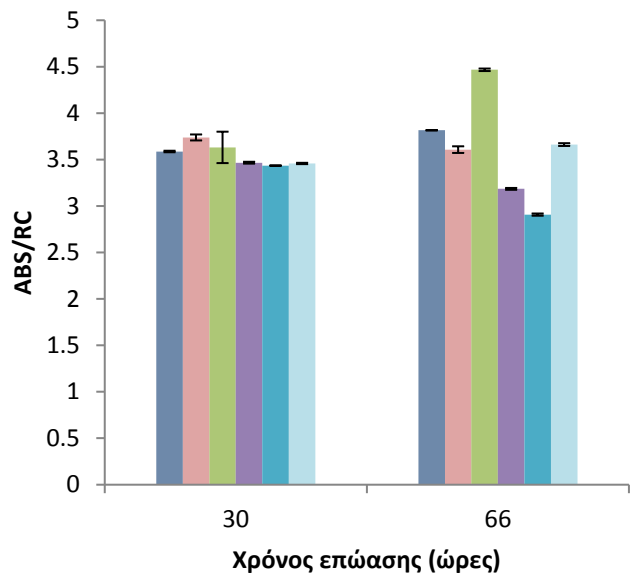
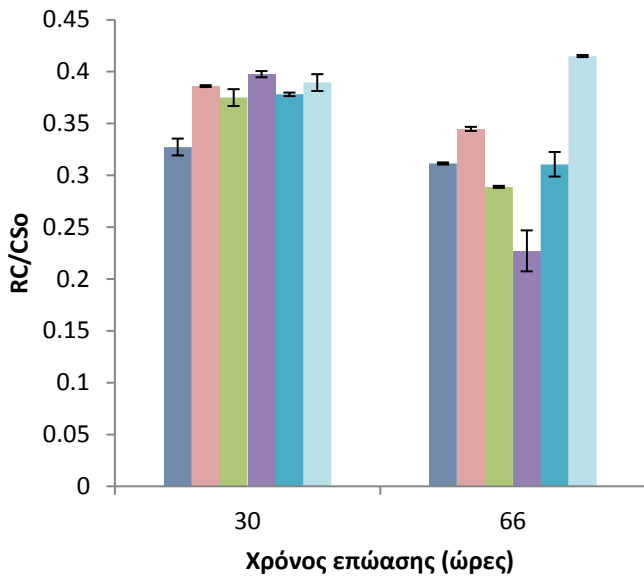
Η εικόνα που διαμορφώνεται από τις παραπάνω μετρήσεις καταδεικνύει ότι σε συνθήκες χαμηλής έντασης φωτός, τα κύτταρα του χλωροφύκου είναι ανθεκτικά ακόμη και στην στην ακραία υψηλή αλατότητα. Οι LL συνθήκες προσομοιάζουν ουσιαστικά τις συνθήκες φωτισμού που επικρατούν εντός του θαλλού ενός λειχήνα, με την σκίαση που παρέχουν οι υφές του μύκητα αλλά και με την παρουσία προστατευτικών χρωστικών (Kosugi et al. 2009).

Επειδή, η φωτοσυνθετική απόδοση εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, σε τακτά χρονικά διαστήματα (0, 30, 66 ώρες) της επώασης καταγράφηκαν και παρουσιάζονται συγκριτικά (Εικόνα 24) μία σειρά φωτοσυνθετικών παραμέτρων του χλωροφύκου, που παρέχουν πιο ειδικές πληροφορίες για την μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Συγκεκριμένα, οι παράμετροι Fv/Fm και PI(abs) αντιπροσωπεύουν την απόδοση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, ο λόγος ABS/RC αντιπροσωπεύει το μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας ανά κέντρο αντίδρασης, ο λόγος RC/CS₀ αφορά στην πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης, ο λόγος DIO/RC αναφέρεται στην ενέργεια που διαχέεται μη φωτοχημικά από τα ενεργά κέντρα και τέλος η παράμετρος PSIO σχετίζεται με την πρωτογενή φωτοχημεία του συστήματος. Είναι γνωστό ότι σε συνθήκες καταπόνησης μειώνονται τα ενεργά φωτοσυνθετικά κέντρα (RC/CS₀), αυξάνεται το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας ανά ενεργό κέντρο (ABS/RC), αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της πρωτογενούς φωτοχημείας (PSIO), την αύξηση της μη φωτοχημικής απόσβεσης της απορροφηθείσας ενέργειας (DIO/RC) και ως εκ τούτου την μείωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης εκφρασμένη ως PI(abs) ή ως Fv/Fm (Strasser & Strasser, 1995).

Τα πειραματικά δεδομένα, όπως παρουσιάζονται τόσο στα αραχνοειδή διαγράμματα (Εικόνα 24), όσο και στα ραβδογράμματα (Εικόνα 25), δείχνουν ξεκάθαρα ότι το χλωροφύκος (σε συμβίωση με το βακτήριο) όχι μόνο είναι ανθεκτικό ακόμη και σε ακραίες αλατότητες, αλλά η λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού του μηχανισμού αναβαθμίζεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος! Παρατηρώντας τους χειρισμούς με διαφορετικές αλατότητες μετά από 30 ώρες επώασης, βλέπουμε ότι ο παράγοντας RC/CS₀, δηλαδή η πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης αυξάνεται αυξανόμενης της αλατότητας, ενώ ταυτόχρονα το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (ABS/RC) δείχνει πτωτική τάση. Ως εκ τούτου και η απόδοση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού εκφρασμένη ως PI(abs) αυξάνεται αυξανόμενης της αλατότητας. Η τάση των παραπάνω παραμέτρων παραμένει ίδια και μετά από 66 ώρες επώασης για τα περισσότερα δείγματα. Τα παραπάνω αποτελέσματα συγκροτούν μια εντυπωσιακή εικόνα ανθεκτικότητας.



Εικόνα 24. Σχετικές φωτοσυνθετικές παράμετροι που μετρήθηκαν σε κύτταρα *T. crenulata* (στο συμβιωτικό σχήμα) μετά την επώασή τους για 30 ώρες (πάνω) και 66 ώρες (κάτω) σε θρεπτικά διαλύματα με αλατότητες 0, 10, 20, 30, 40 και 50 ‰ NaCl, σε συνθήκες χαμηλής έντασης φωτισμού (LL).

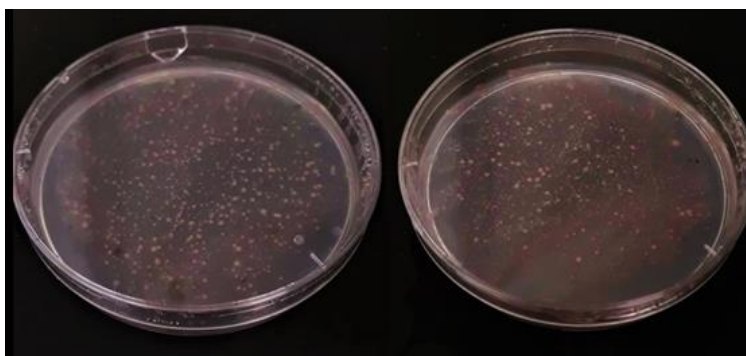


Εικόνα 25. Φωτοσυνθετικές παράμετροι που μετρήθηκαν σε κύτταρα *T. crenulata* (στο συμβιωτικό σχήμα) σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά τη έκθεσή τους σε θρεπτικά διαλύματα με αλατότητες 0, 10, 20, 30, 40 και 50 % NaCl, σε συνθήκες χαμηλής έντασης φωτός (LL)

3.1.4 Έλεγχος της ανθεκτικότητας του βακτηρίου σε υψηλή αλατότητα

Στη συνέχεια των πειραμάτων επιχειρήθηκε να εξακριβωθεί η ανθεκτικότητα του βακτηρίου στην καταπόνηση από υψηλή αλατότητα. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε υγρή μικτότροφη καλλιέργεια με κυτταρική συγκέντρωση 1μl PCV/ ml, η οποία μοιράστηκε σε γυάλινα αποστειρωμένα μπουκαλάκια των 50mL που κλείνουν αεροστεγώς και περιείχαν θρεπτικό BBM με προσθήκη γλυκόζης (5g/L) και διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (0, 10, 20, 30, 40 και 50 g/L). Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικές εντάσεις φωτισμού (LL και HL, όπως και με το χλωροφύκος *T. crenulata*). Δείγματα από όλες τις καλλιέργειες επιστρώθηκαν σε τρυβλία petri με στερεό μικτότροφο θρεπτικό μέσο, μετά από 66 ώρες επώασης. Όλα τα δείγματα παρουσίασαν την ίδια ανάπτυξη, γεγονός που επισημαίνει την ανθεκτικότητα του συγκεκριμένου βακτηρίου στις υψηλές συγκεντρώσεις άλατος. Ενδεικτικά στην Εικόνα 26 παρουσιάζεται η ανάπτυξη βακτηριακών αποικιών από καλλιέργειες που επώαστηκαν για 66 ώρες στην υψηλότερη συγκέντρωση άλατος (50g/L), τόσο σε συνθήκες LL όσο και HL.

Οι παρατηρήσεις αυτές παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον καθώς η ικανότητα επιβίωσης σε περιβάλλοντα με συγκεντρώσεις NaCl ίσες ή μεγαλύτερες από 50% απαιτεί εξειδικευμένες προσαρμογές που διαθέτουν οργανισμοί όπως τα αλόφιλα (Mayer 2018). Οι οργανισμοί αυτοί χρησιμοποιούν μηχανισμούς όπως η εισροή ιόντων K^+ και η σύνθεση/πρόσληψη ωσμολυτών στο εσωτερικό του κυττάρου ώστε το ωσμωτικό δυναμικό εκατέρωθεν της μεμβράνης να παραμένει σταθερό (Vreeland 1987, Sleator & Hill 2002). Τελικά, τα παραπάνω αποτελέσματα των πειραμάτων ακραιοφιλίας στους δύο συμβιωτικούς οργανισμούς καταδεικνύουν πράγματι ένα παρόμοιο εύρος ανθεκτικότητας στην υψηλή αλατότητα, όπως και στην ακραία χαμηλή θερμοκρασία και ξηρασία.

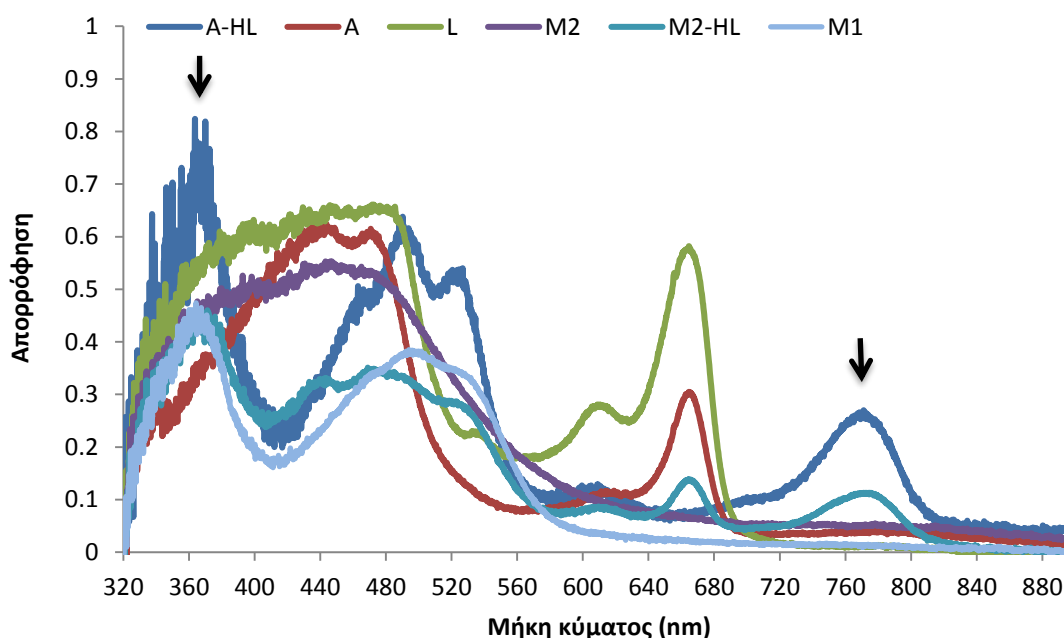


Εικόνα 26. Ανάπτυξη βακτηριακών αποικιών σε τρυβλία από καλλιέργειες που επώαστηκαν για 66 ώρες στην υψηλότερη συγκέντρωση άλατος (50g/L) σε συνθήκες HL (αριστερά) και LL (δεξιά).

3.2 Βιοχημικός και μοριακός χαρακτηρισμός του βακτηρίου

3.2.1 Διαφοροποίηση των χρωστικών του συμβιωτικού σχήματος χλωροφύκους/ βακτηρίου

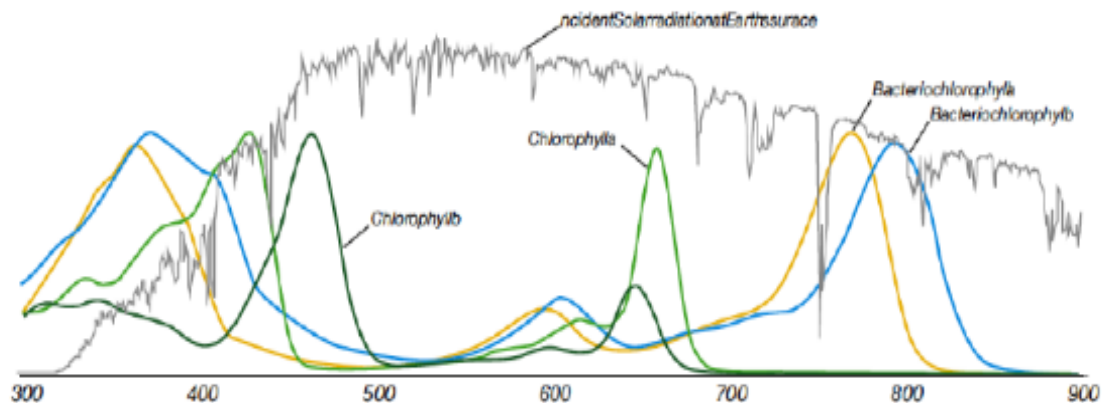
Για να αντληθούν περισσότερες πληροφορίες σε σχέση με το προφίλ των δύο μικροοργανισμών, πραγματοποιήθηκε απομόνωση των χρωστικών από όλες τις διαθέσιμες καλλιέργειες, που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες για μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι χειρισμοί που μελετήθηκαν περιλάμβαναν κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες αυτότροφες (A), αυτότροφες υπό υψηλή ένταση φωτισμού (A-HL), μικτότροφες (M1), μικτότροφες με διπλή πηγή άνθρακα, γλυκόζη και yeast extract (M2) και μικτότροφες με διπλή πηγή άνθρακα υπό υψηλή ένταση φωτισμού (M2-HL). Επίσης, έγινε απομόνωση χρωστικών από τον λειχήνα (L) *Pleurosticta acetabulum*, που έχει ως φωτοβιώτη μονοκύτταρο χλωροφύκος του γένους *Trebouxia*.



Εικόνα 27. Φάσματα απορρόφησης μεθανολικών εκχυλισμάτων των χρωστικών από λειχήνα (L) και διαφόρων τύπων καλλιέργειες *T. crenulata*: σε αυτότροφο θρεπτικό μέσο (A), σε αυτότροφο θρεπτικό και σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού (A-HL), σε μικτότροφο θρεπτικό μέσο (M1), σε μικτότροφο θρεπτικό με διπλή πηγή άνθρακα (M2), σε μικτότροφο θρεπτικό με διπλή πηγή άνθρακα και σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού (M2-HL).

Οι χρωστικές εκχυλίστηκαν με μεθανόλη και τα εκχυλίσματα φωτομετρήθηκαν για να ληφθούν τα φάσματα απορρόφησης τους (Εικόνα 27). Τα αποτελέσματα για τις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν σε αυτότροφες συνθήκες (A), έδειξαν ότι οι χρωστικές που διέθεταν είναι κυρίως καροτενοειδή, χλωροφύλλη a και χλωροφύλλη b. Τις ίδιες χρωστικές διέθετε και ο λειχήνας. Όσον αφορά στον χειρισμό M2-HL, εκτός από καροτενοειδή και χλωροφύλλες παρατηρήθηκε και μια ακόμα χρωστική με

μέγιστη απορρόφηση στα 780 και 365 nm. Τα μέγιστα αυτά συμπίπτουν με τα αντίστοιχα της βακτηριοχλωροφύλλης (Εικόνα 27 και 28). Οι χειρισμοί M1, M2 και A-HL εμφάνισαν καροτενοειδή αλλά όχι χλωροφύλλες, καθώς η ποσότητα κυττάρων χλωροφύκους ήταν πολύ μικρή και ο πληθυσμός του βακτηρίου δεν επένδυε στη φωτοσυνθετική διαδικασία τη στιγμή που το θρεπτικό ήταν πλούσιο σε οργανικά θρεπτικά. Στον χειρισμό A-HL εντοπίστηκε αρκετά υψηλή συγκέντρωση βακτηριοχλωροφύλλης σε σχέση με την μικρή συγκέντρωση χλωροφύλλης a και b, που αφορά στο χλωροφύκος *T. crenulata*. Πιθανότατα οι υψηλές εντάσεις



Εικόνα 28. Φάσματα απορρόφησης χλωροφυλλών και βακτηριοχλωροφυλλών. Οι βακτηριοχλωροφύλλες απορροφούν στην υπέρυθη ακτινοβολία.

ακτινοβολίας να προκαλούν φωτοαναστολή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του χλωροφύκους (όπως διαπιστώσαμε και στα παραπάνω πειράματα), με αποτέλεσμα να μην παράγεται φωτοσυνθετικά (από το χλωροφύκος) αρκετή οργανική ύλη που θα μπορούσε να εκμεταλευθεί για τις ανάγκες του το βακτήριο, και αυτό να αποτελεί το έναυσμα ώστε να επενδύσει στη δική του βακτηριακή φωτοσύνθεση και ως εκ τούτου στη βιοσύνθεση βακτηριοχλωροφύλλης. Η παρούσα λοιπόν ανάλυση των χρωστικών αναδεικνύει την λειτουργική/ βιοενεργητική πλαστικότητα του συγκεκριμένου βακτηρίου στα πλαίσια μίας επιτυχημένης συμβίωσης με το μικροφύκος.

3.2.2 Μοριακός χαρακτηρισμός του συμβιωτικού βακτηρίου σε επίπεδο γένους

Με σκοπό τον προσδιορισμό του γένους του συμβιωτικού βακτηρίου, πραγματοποιήθηκε DNA αλληλούχιση περιοχής του 16S rRNA, που κωδικοποιεί για τμήμα της 30S μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος των προκαρυωτών, και χρησιμοποιείται ευρέως για φυλογενετική ανάλυση. Από μικρό αριθμό αποικιών που είχαν αναπτυχθεί σε στερεό μικτότροφο θρεπτικό μέσο απομονώθηκε το συνολικό βακτηριακό DNA. Το DNA υποβλήθηκε σε PCR για την ενίσχυση της 16S rRNA περιοχής. Χρησιμοποιήθηκε ζεύγος παγκόσμιων εκκινητών. Σαν θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε DNA του μικροφύκους *Chlorella minutissima* ενώ σαν αρνητικός μάρτυρας δις απεσταγμένο H₂O. Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα

αγαρόζης και ακολούθησε διαδικασία αποκοπής της επιθυμητής ζώνης (μέγεθος 1,3Kb κατά

προσέγγιση, Εικόνα 29), έκλουσης και καθαρισμού.

Στη συνέχεια δημιουργήθηκε ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με την παρακάτω διαδικασία: Με νέα PCR προστέθηκαν A στο καθαρισμένο προϊόν και έγινε εκ νέου καθαρισμός του. Ακολούθησε

αντίδραση λιγοποίησης με φορέα ο οποίος φέρει T στα άκρα, γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικιλίνη και γονίδιο lacZ που κωδικοποιεί για το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση.

Τέλος, έγινε μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli*. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μεταφέρθηκε σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* (DH5α). Τα κύτταρα είχαν αναπτυχθεί παρουσία X-gal ως μέσου επιλογής των μετασχηματισμένων αποικιών. Το υπόστρωμα αυτό υδρολύεται από το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση και παράγει γαλάζιο προϊόν. Καθώς η ένθεση του τμήματος DNA διακόπτει το γονίδιο lacZ, τα βακτήρια που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο σχηματίζουν λευκές αποικίες στο θρεπτικό υλικό, που περιέχει αμικιλίνη και X-gal. Επιλέχθηκαν τέσσερις λευκές αποικίες. Κάθε μια από τις αποικίες αλληλουχήθηκε με τη χρήση δύο κατάλληλων εκκινήτων. Το αποτέλεσμα της αναζήτησης στις διαδικτυακές βάσεις δεδομένων των βακτηριακών 16S rRNA ήταν ίδιο για όλες τις αποικίες, ανεξαρτήτως με ποιά εκκινήτη προσδιορίστηκε η αλληλουχία τους, και είναι το ακόλουθο:

Επικράτεια: Bacteria

Φύλο: Proteobacteria

Κλάση: Alphaproteobacteria

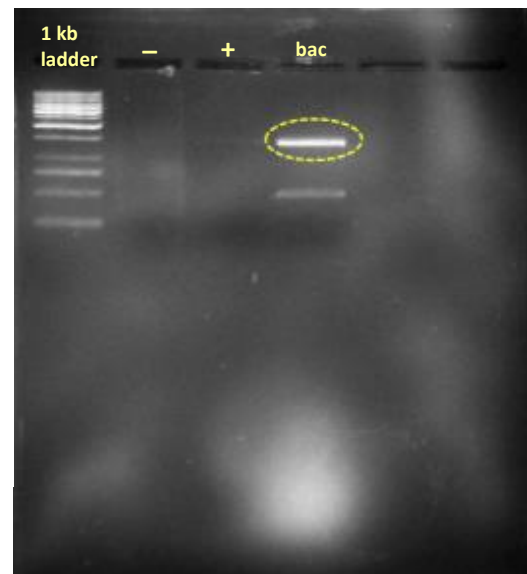
Τάξη: Rhizobiales

Οικογένεια: Methylobacteriaceae

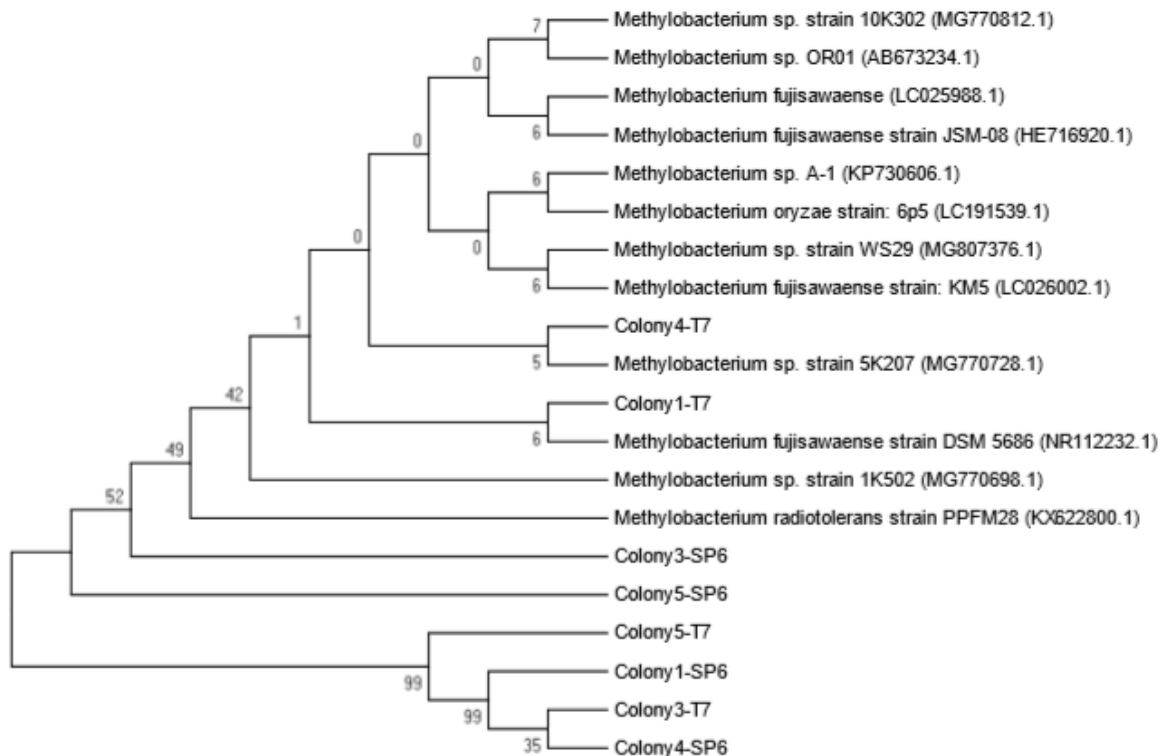
Γένος: Methylobacterium

Τα δεδομένα που προέκυψαν από την αλληλούχιση της περιοχής 16S rRNA για το βακτήριο επεξεργάστηκαν με πολλαπλή ευθυγράμμιση με βάση τον αλγόριθμο ClustalW. Εξετάστηκε ο βαθμός συντήρησης της αλληλουχίας μεταξύ των αποικιών, αλλά και σε σύγκριση με διάφορα στελέχη βακτηρίων τα οποία είχαν πολύ υψηλή

Εικόνα 29. Πήκτωμα αγαρόζης για την ανάλυση του αμπλικονίου 16S rRNA. (κατά σειρά: 1 kb Plus DNA ladder, αρνητικός μάρτυρας, θετικός μάρτυρας και βακτηριακό DNA. Η επιθυμητή ζώνη 1,3 kb διακρίνεται με κίτρινο περίγραμμα).



ομοιότητα (συνήθως 100% identity και cover) με αυτές, σύμφωνα με τον αλγόριθμο BLAST. Οι φυλογενετικές σχέσεις των αποικιών που αλληλουχήθηκαν, μελετήθηκαν επίσης με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανότητας (Maximum Likelihood) η οποία βασίστηκε στο μοντέλο Tamura-Nei. Το φυλογενετικό δένδρο (Εικόνα 30) προέκυψε με τη μέθοδο bootstrap για 500 επαναλήψεις. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε διαχωρισμό που αναπαράχθηκε από λιγότερο από 50% επαναλήψεις bootstrap καταρρίφθηκαν.



Εικόνα 30. Φυλογενετικό δένδρο με χρήση της μεθόδου μέγιστης πιθανότητας (Maximum Likelihood) με βάση το μοντέλο Tamura-Nei. Για κάθε αλληλουχία αναγράφεται ο κωδικός της GenBank (accession number).

Τα είδη του γένους *Methylobacterium* είναι αυστηρά αερόβια, προαιρετικά μεθυλοτροφικά, αργά αναπτυσσόμενα βακτήρια. Δημιουργούν μικρές αποικίες με ροζ χρωματισμό σε συνηθισμένα στερεά μέσα, όπως το θρεπτικό άγαρ. Η βέλτιστη ανάπτυξη τους παρατηρείται μεταξύ 25°C και 30°C μετά από 5 έως 7 ημέρες επώασης, με μέτρια ανάπτυξη στους 35°C και χωρίς αύξηση στους 42°C (Trotsenko et al. 2001). Η περιγραφή αυτή επαληθεύει τις φαινοτύπικες παρατηρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο και επιβεβαιώνεται από τη φυλογενετική και ταξινομική ανάλυση. Αξιοσημείωτο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με πολλά είδη του γένους *Methylobacterium*, όπου συχνά σχετίζονται με χερσαία και υδρόβια φυτά, εποικίζοντας τη ρίζα και τα φύλλα (Corpe & Rheem 1989, Trotsenko et al. 2001). Συγκεκριμένα, παράγουν φυτοορμόνες που ενεργοποιούν την αύξηση του φυτού (Ivanova et al. 2001, Lidstrom & Chistoserdova 2002, Koenig et al. 2002),

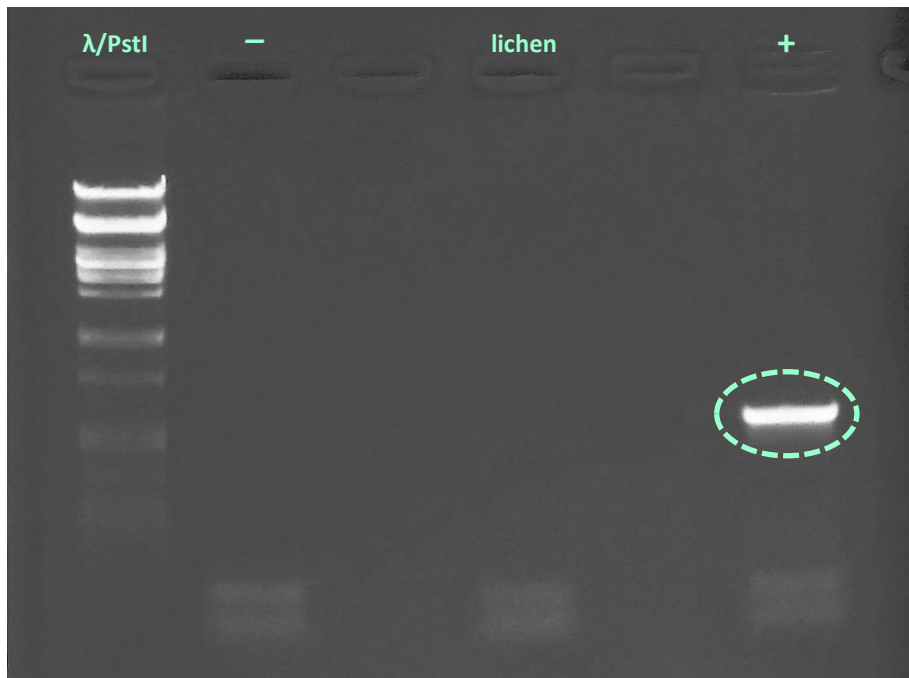
δεσμεύουν ατμοσφαιρικό άζωτο (Sy et al. 2001) ή ενισχύουν την άμυνα των φυτών ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς (Holland & Polacco 1994). Επίσης, μια πληθώρα μελών του γένους είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά στην αφυδάτωση, τον παγετό, την UV ακτινοβολία και τις υψηλές θερμοκρασίες (Trotsenko et al. 2001), ενώ συχνά είναι ικανά να μεταβολίζουν ένα μεγάλο εύρος τοξικών ουσιών (McDonald et al. 2001). Το γένος αυτό απαντάται σε αφθονία και στο θαλλό πολλών λειχήνων, όπου παράγει αντιμικροβιακές ουσίες (Hodkinson et al. 2009), ενώ υπάρχουν αναφορές και για θετική αλληλεπίδραση με χλωροφύκη, όπου τα βακτήρια τροφοδοτούμενα από τα φωτοσυνθετικά προϊόντα έχουν τη δυνατότητα να ανακυκλώνουν χημικές ουσίες προς όφελος του φύκου (Calatrava et al. 2018).

3.2.3 Μοριακός χαρακτηρισμός του συμβιωτικού βακτηρίου σε επίπεδο είδους

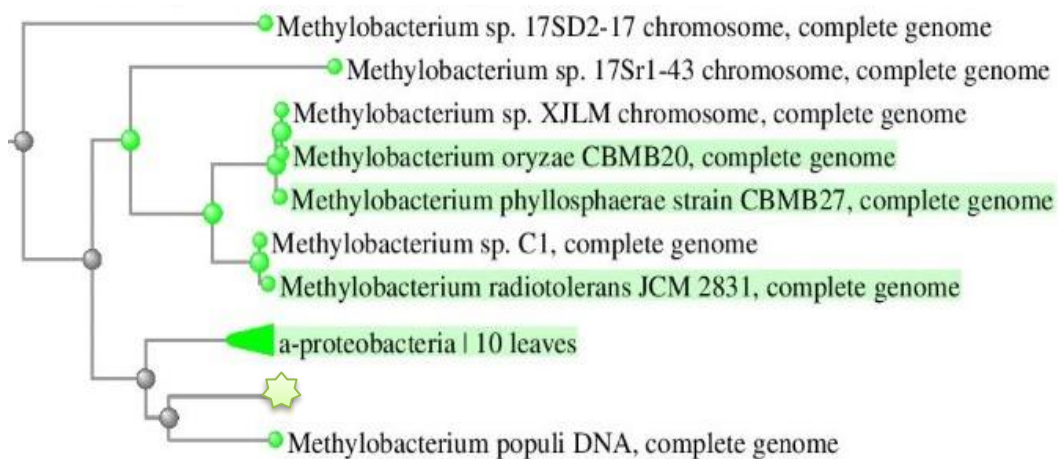
Για να προσδιοριστεί το μεθυλοβακτήριο στο επίπεδο του είδους, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση ειδικής για το γένος *Methylobacterium* περιοχής του γονιδίου *rpoB*, που κωδικοποιεί για την β-υπομονάδα της βακτηριακής RNA-πολυμεράσης και χρησιμοποιείται ευρέως για διαειδική διάκριση. Από μικρό αριθμό αποικιών που είχαν αναπτυχθεί σε στερεό μικτότροφο, μη εκλεκτικό θρεπτικό μέσο, απομονώθηκε το ολικό βακτηριακό DNA. Το DNA υποβλήθηκε σε PCR για την ενίσχυση της *rpoB* περιοχής, ενώ σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο H₂O. Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης και παρατηρήθηκε στο δείγμα η επιθυμητή ζώνη, η οποία είχε μέγεθος 600b κατά προσέγγιση (Εικόνα 31). Όλο το αμπλικόνιο ηλεκτροφορήθηκε, καθαρίστηκε και αλληλουχήθηκε με ειδικό εκκινητή.

Με τα αποτελέσματα της αλληλούχισης κατασκευάστηκε φυλογενετικό δένδρο (Εικόνα 32) το οποίο περιλαμβάνει βακτηριακά στελέχη με πολύ υψηλή ομοιότητα (πάνω από 90% identity και cover) με την αλληλουχία του αμπλικονίου, σύμφωνα με τον αλγόριθμο BLAST. Την μεγαλύτερη ομοιότητα (94%) με το στέλεχος υπό μελέτη έδειξε το είδος *Methylobacterium populi*.

Το είδος *M. populi* είναι είδος αερόβιο, κινητό, προαιρετικά μεθυλότροφο. Έχει αναφερθεί ως ενδοφυτικό σε δένδρα του γένους *Populus*, όπου λειτουργεί βιοαποικοδομώντας τοξικές χημικές ουσίες (Van Aken et al. 2011). Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν αναφορές σύμφωνα με τις οποίες το είδος αυτό επιδεικνύει πολλαπλές δραστηριότητες προώθησης της φυτικής αύξησης. Συγκεκριμένα, φέρει την ικανότητα να παράγει IAA και σιδηροφορείς, να διαλυτοποιεί τα φωσφορικά και να σχηματίζει προστατευτικό βιοφίλμ παρουσία τοξικών για το φυτό ουσιών. Ταυτόχρονα, έχει δείχτει και η ικανότητά του να βιοαποικοδομεί πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAH) (Ventorino et al. 2014), ουσίες τοξικές με μεταλλαξογόνο δράση. Οι PAH είναι ευρέως γνωστό ότι προσλαμβάνονται και συγκεντρώνονται στο εσωτερικό του θαλλού των λειχήνων, με άγνωστο προς το παρόν μηχανισμό (Augusto et al. 2015).



Εικόνα 31. Πήκτωμα αγαρόζης για την ανάλυση του προϊόντος PCR, όπου ενισχύθηκε περιοχή του γονιδίου *groB* με εκκινητές ειδικούς για το γένος *Methylobacterium*. (κατά σειρά: λDNA/*PstI* ladder, αρνητικός μάρτυρας, DNA *Ramalina sp.*, DNA μεθυλοβακτηρίου). Διακρίνεται η επιθυμητή ζώνη 600b.



Εικόνα 32. Τμήμα φυλογενετικού δένδρου βακτηριακών στελεχών με ομοιότητα πάνω από 90% στην αλληλουχημένη περιοχή του μεθυλοβακτηρίου. Με αστερίσκο σημειώνεται η θέση της αλληλουχίας του μεθυλοβακτηρίου υπό μελέτη.

Με σκοπό να ληφθούν σε πρώτο στάδιο κάποιες ενδείξεις για την παρουσία μεθυλοβακτηρίων σε λειχήνες του γένους *Ramalina*, πραγματοποιήθηκε το παρακάτω πείραμα. Μικρή ποσότητα λειχήνα *Ramalina* sp., που συλλέχθηκε από περιοχή της Κρήτης, απολυμάνθηκε εξωτερικά και έπειτα λειοτριβήθηκε σε υγρό άζωτο. Ακολούθησε απομόνωση του ολικού DNA με τη χρήση μεθόδου με βάση το CTAB (Aras & Cansaran 2006, τροποποιημένο). Το DNA που απομονώθηκε υποβλήθηκε σε διαγνωστική PCR για την ενίσχυση ειδικής για το γένος *Methylobacterium* αλληλουχίας του γονιδίου *proB*, με την χρήση ειδικών εκκινητών. Σαν θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ολικό DNA μεθυλοβακτηρίου, ενώ σαν αρνητικός μάρτυρας δίσ απεσταγμένο H₂O. Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 31, η επιθυμητή ζώνη μήκους 600b κατά προσέγγιση, εμφανίστηκε μόνο στον θετικό μάρτυρα και όχι στο DNA του συγκεκριμένου λειχήνα. Το πείραμα ωστόσο θα πρέπει να επαναληφθεί συγκεκριμένα για το είδος του ενδιαφέροντός μας (*R. capitata*) και πιθανότατα με διαφορετικό πρωτόκολλο απολύμανσης, ώστε να διατηρούνται οι βακτηριοβιώτες του λειχήνα.

3.3 Καθαρισμός του χλωροφύκου *T. crenulata* από το μεθυλοβακτήριο

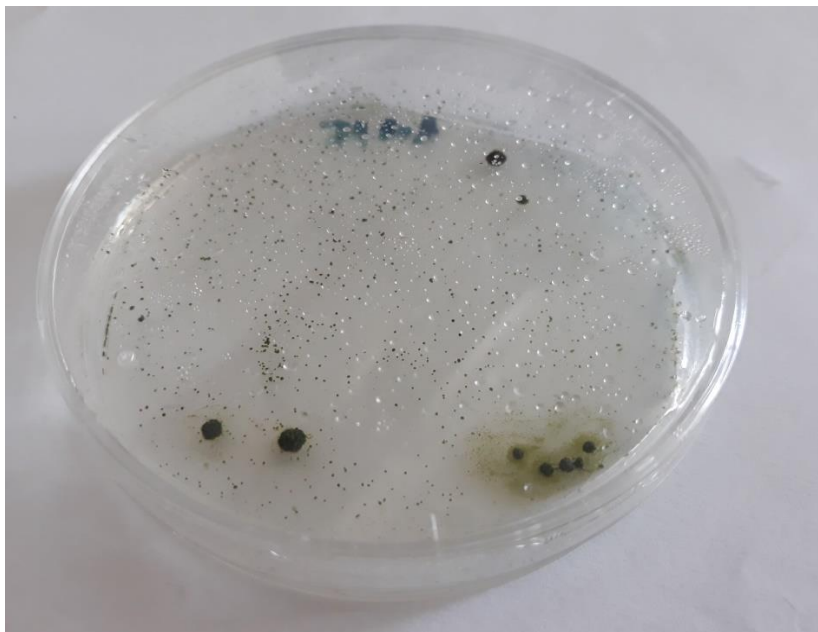
Στα πλαίσια της προσπάθειας μας να δώσουμε μία σαφή απάντηση στο ερώτημα που προκύπτει από τα μέχρι τώρα πειραματικά αποτελέσματα, εάν η ακραιοφιλική συμπεριφορά της καλλιέργειας οφείλεται στην συμβίωση των δύο οργανισμών ή όχι, επιχειρήθηκε ο καθαρισμός της καλλιέργειας από το συγκεκριμένο βακτήριο και η εξέταση της αξενικής καλλιέργειας του χλωροφύκου *T.crenulata* ως προς την ακραιοφιλική συμπεριφορά.

3.3.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας του χλωροφύκου στα αντιβιοτικά που δοκιμάστηκαν στο μεθυλοβακτήριο

Με σκοπό να μελετηθεί συγκριτικά η συμπεριφορά του χλωροφύκου *T. crenulata* σε αξενική κατάσταση και εντός του συμβιωτικού σχήματος, έγινε το παρακάτω τεστ αντιβιοτικών, ώστε να διαχωριστεί το χλωροφύκος από το βακτήριο. Σε πέντε αποστειρωμένους, κλειστούς δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκαν 2mL μη εκλεκτικού θρεπτικού μέσου με κατάλληλες συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών καναμυκίνη, αμπικιλίνη, τετρακυκλίνη, σπεκτινομυκίνη, ριφαμικίνη, όπως φαίνεται στην στον Πίνακα 3. Το βακτήριο δεν παρουσίασε ανθεκτικότητα σε κανένα από τα παραπάνω αντιβιοτικά.

Πίνακας 3. Τεστ αντιβιοτικών για το συμβιωτικό βακτήριο. Χρησιμοποιήθηκαν τα αντιβιοτικά καναμυκίνη (50 µg/ml), αμπικιλίνη (100 µg/ml), τετρακυκλίνη (10 µg/ml), σπεκτινομυκίνη (50 µg/ml) και ριφαμικίνη (50 µg/ml) σε βακτηριακές προκαλλιέργειες. Το βακτήριο δεν παρουσίασε ανθεκτικότητα σε κανένα αντιβιοτικό.

Αντιβιοτικό	Καναμυκίνη	Αμπικιλίνη	Τετρακυκλίνη	Σπεκτινομυκίνη	Ριφαμικίνη
Συγκέντρωση	50 µg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml
Ανάπτυξη	-	-	-	-	-



Εικόνα 33. Έλεγχος ανθεκτικότητας του χλωροφύκου *T. crenulata* στην σπεκτινομυκίνη, μετά από προσθήκη του αντιβιοτικού σε αυτότροφη καλλιέργεια και επίστρωση κυττάρων σε στερεό μικτότροφο υπόστρωμα. Παρατηρούνται αποικίες του χλωροφύκου ενώ δεν παρατηρούνται καθόλου αποικίες του μεθυλοβακτηρίου, που δεν παρουσιάζει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό.

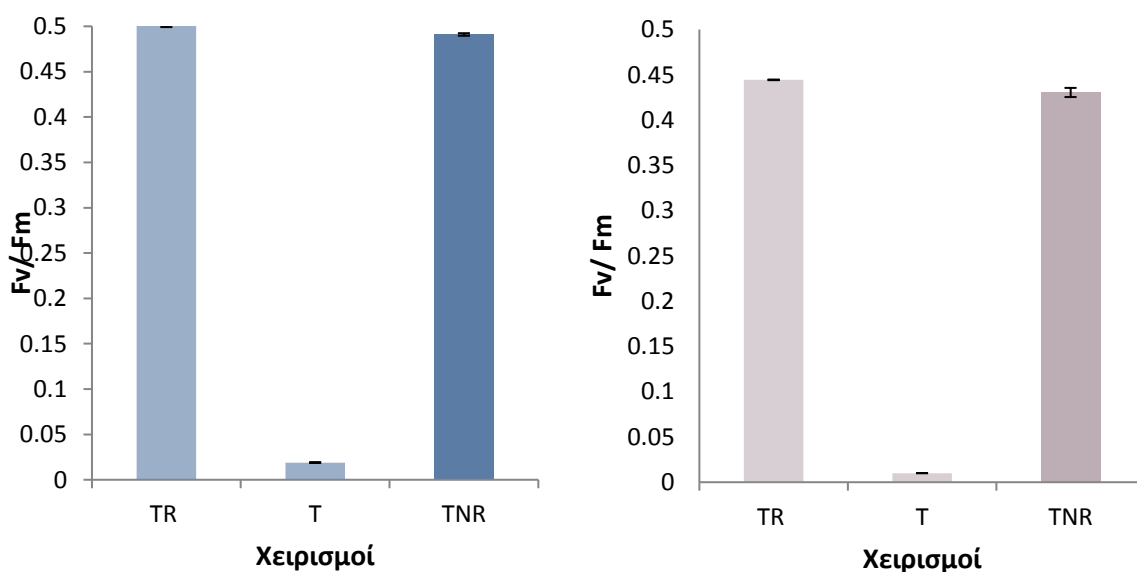
Στη συνέχεια, επαναλήφθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία σε κύτταρα *T. crenulata* στο συμβιωτικό σχήμα με το βακτήριο, σε αυτότροφο θρεπτικό μέσο. Μετά από 3 ημέρες, κάθε δείγμα επιστρώθηκε σε τρυβλίο petri με στερεό μικτότροφο θρεπτικό μέσο ώστε να εξακριβωθεί εάν το χλωροφύκος έχει την ικανότητα επιβίωσης σε κάποιο/α από τα αντιβιοτικά στις παραπάνω συγκεντρώσεις. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 33, το μόνο αντιβιοτικό στο οποίο το χλωροφύκος έδειξε ανθεκτικότητα στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η σπεκτινομυκίνη. Έτσι, από αξενικές αποικίες χλωροφύκου αναπτύχθηκαν αξενικές υγρές καλλιέργειες σε αυτότροφο θρεπτικό μέσο.

3.4 Σύγκριση του συμβιωτικού σχήματος (*T. crenulata* & μεθυλοβακτήριο) και του αξενικού χλωροφύκου *T. crenulata* ως προς την ακραιοφιλική συμπεριφορά

3.4.1 Σύγκριση του συμβιωτικού σχήματος και του αξενικού χλωροφύκου *T. crenulata* ως προς την ανθεκτικότητα σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία και αφυδάτωση

Μετά την ανάπτυξη αξενικών καλλιεργειών *T. crenulata*, ακολούθησε συγκριτικό πείραμα ανθεκτικότητας του αξενικού χλωροφύκου στην ακραία χαμηλή θερμοκρασία και αφυδάτωση. Δείγμα υγρής αξενικής αυτότροφης καλλιέργειας μεταφέρθηκε σε φίλτρο Whatman (grade 6) (χειρισμός TR) και αφού αφαιρέθηκε η υγρασία από το φίλτρο και επήλθε πλήρης ξηρασία (χειρισμός T), εκτέθηκε σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία (-196°C/ 77K) για 30 λεπτά (χειρισμός TN). Στη συνέχεια, έγινε επαναφορά των ακινητοποιημένων κυττάρων σε θερμοκρασία δωματίου και επώαση στο ωσμωτικά κατάλληλο θρεπτικό μέσο BBM (χειρισμός TNR). Σε κάθε χειρισμό έγινε μέτρηση επαγωγικού φθορισμού με χρήση της μεθόδου JIP-test για να εκτιμηθεί εάν επηρεάζεται η λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και κατ'επέκταση εάν τα κύτταρα παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στις παραπάνω καταπονήσεις. Ακριβώς η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και για μη αξενική καλλιέργεια ώστε να χρησιμοποιηθεί σαν μάρτυρας. Οι δύο συγκρινόμενες καλλιέργειες πριν την έναρξη του πειράματος είχαν αναπτυχθεί για τον ίδιο αριθμό ημερών, κάτω από τις ίδιες συνθήκες.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 34, όταν το αξενικό χλωροφύκος βρίσκεται σε κατάσταση απόλυτης ξηρασίας (T) έχει μηδενική τιμή F_v/F_m , δηλαδή είναι φωτοσυνθετικά ανενεργό. Ωστόσο, το χλωροφύκος ανακάμπτει πλήρως από την απόλυτη ξηρασία και την ακραία χαμηλή θερμοκρασία καθώς η φωτοσυνθετική απόδοση του χειρισμού TNR επανέρχεται στα επίπεδα της αρχικής καλλιέργειας (TR). Το ίδιο συμβαίνει και με την μη αξενική καλλιέργεια. Φαίνεται λοιπόν πως το



Εικόνα 34. Τιμές F_v/F_m για τις τρεις καταστάσεις του χλωροφύκου (στο συμβιωτικό σχήμα, αριστερά και σε αξενική κατάσταση, δεξιά) πριν (χειρισμός TR) και μετά (χειρισμοί T και TNR) την έκθεση σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία.

χλωροφύκος έχει ενδογενείς μηχανισμούς ανθεκτικότητας σε αυτού του είδους την καταπόνηση. Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, κάποια είδη *Trebouxia* αποκρίνονται σε χαμηλές θερμοκρασίες και ξηρασία με την παραγωγή και συγκέντρωση ωσμωλυτών στο εσωτερικό του κυττάρου (Sadowsky et al. 2016).

Στην συνέχεια και βάσει των συνολικών δεδομένων από το παραπάνω πείραμα, κατασκευάστηκαν συγκριτικά διαγράμματα φωτοσυνθετικών παραμέτρων που εκφράζουν την ανθεκτικότητα του χλωροφύκου σε συμβιωτική κατάσταση, σε σχέση με αυτή του αξενικού χλωροφύκου. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 35 (πρώτο σχήμα), η αξενική καλλιέργεια μετά την έκθεσή της σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία βρίσκεται σε κατάσταση καταπόνησης, με μειωμένη πρωτογενή φωτοχημεία (PSIo) και φωτοσυνθετική απόδοση (PI(abs)). Η καλλιέργεια του συμβιωτικού σχήματος μετά την έκθεση σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία (δεύτερο σχήμα), ανταποκρίνεται καλύτερα στην καταπόνηση από την αξενική καλλιέργεια, καθώς εμφανίζει μεγαλύτερη πρωτογενή φωτοχημεία (PSIo) και φωτοσυνθετική απόδοση (PI(abs)), αλλά και αύξηση των ενεργών φωτοσυνθετικών κέντρων (RC/CSo) σε σχέση με την αξενική.

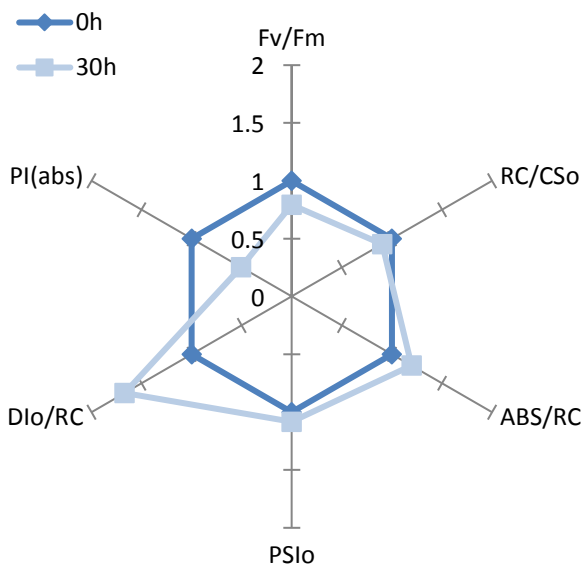
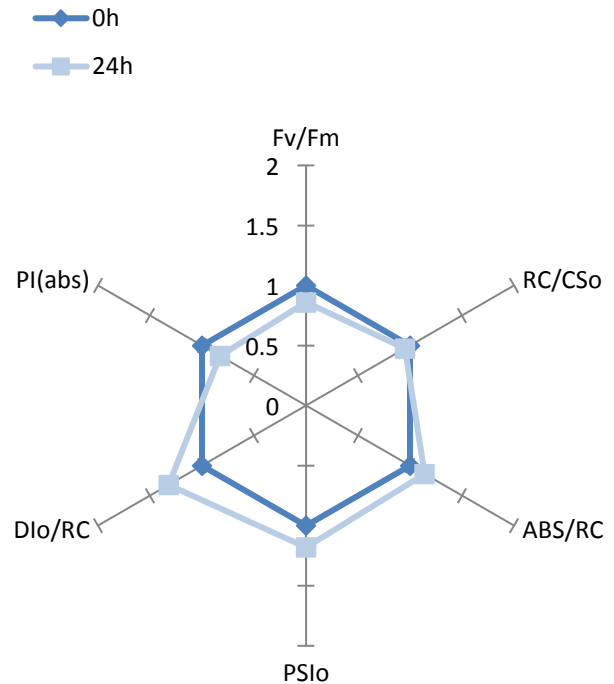
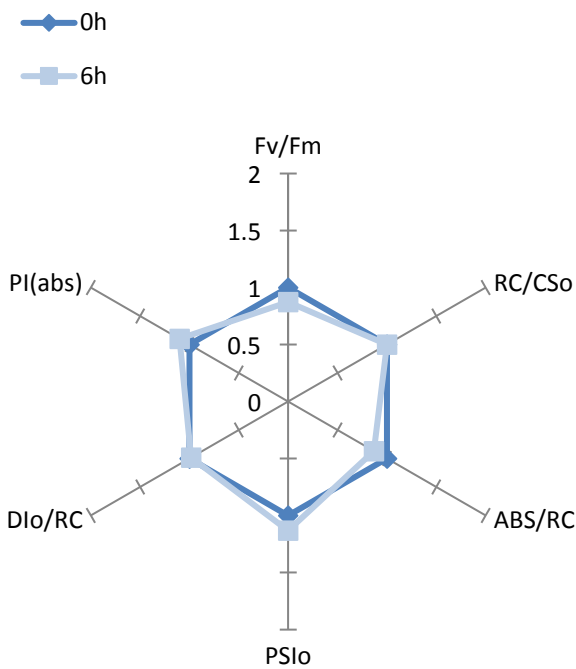
Τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον καθώς φαίνεται ότι τελικά το συμβιωτικό βακτήριο ενισχύει την ανθεκτικότητα του χλωροφύκου. Κάτι τέτοιο συμφωνεί με τα δεδομένα από τον μοριακό χαρακτηρισμό του βακτηρίου. Πέρα από το γεγονός ότι μια πληθώρα μελών του γένους *Methylobacterium* είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά στην αφυδάτωση και τον παγετό (Trotsenko et al. 2001), το γένος *Methylobacterium populi* έχει αναφερθεί ως στέλεχος που αλληλεπιδρά θετικά με φυτικά είδη, αυξάνοντας την ανθεκτικότητά τους σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις.

3.4.2 Σύγκριση του συμβιωτικού σχήματος και του αξενικού χλωροφύκου *T. crenulata* ως προς την ανθεκτικότητα σε υψηλή αλατότητα

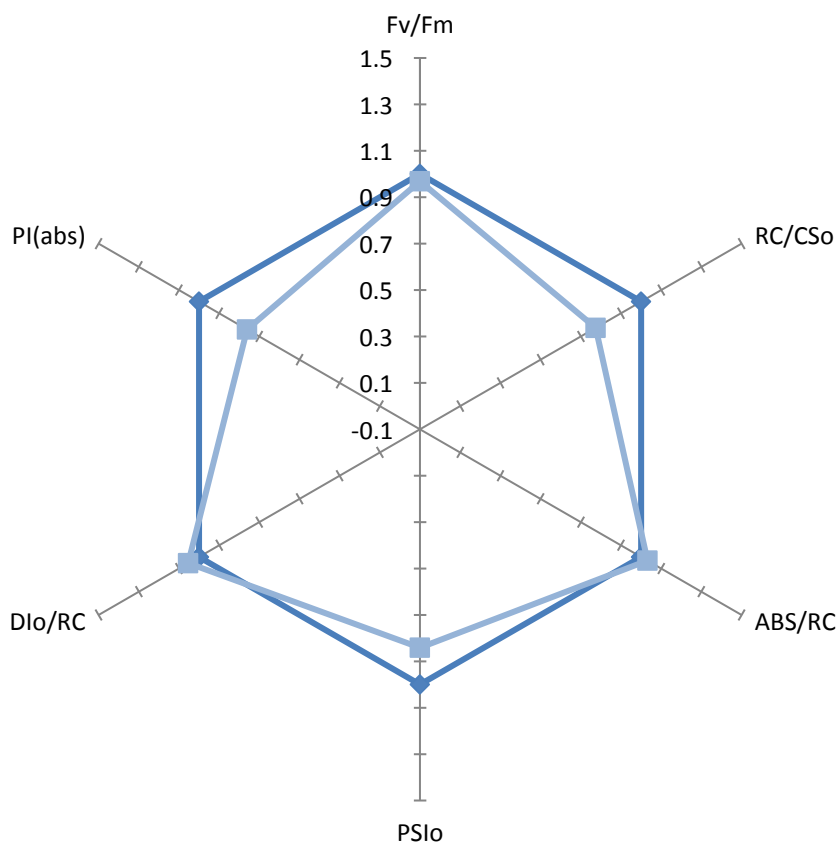
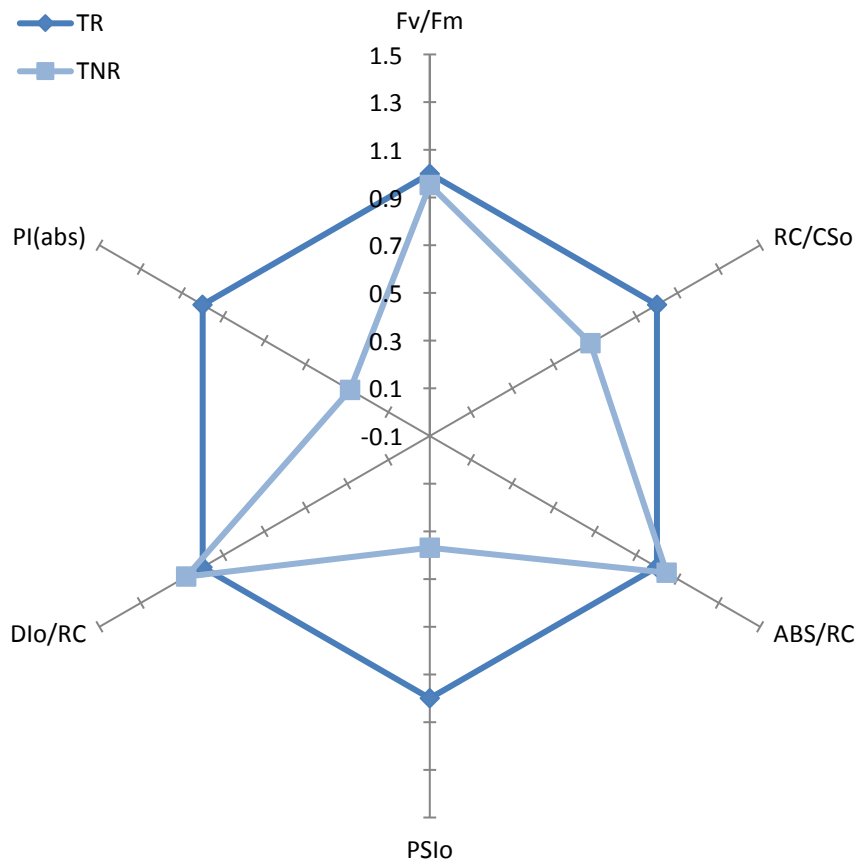
Με σκοπό να ολοκληρωθεί η συγκριτική μελέτη ακραιοφιλίας του αξενικού χλωροφύκου και του συμβιωτικού συστήματος, υγρή αξενική αυτότροφη καλλιέργεια με κυτταρική συγκέντρωση 2μl PCV/ ml, σε θρεπτικό BBM με προσθήκη NaCl (50 g/L) Η καλλιέργεια επώαστηκε σε ένταση φωτισμού 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (χαμηλή, LL) και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού με την μέθοδο JIP-test σε τακτά χρονικά διαστήματα (0, 6, 24, 30, 42 και 66 ώρες).

Η διαφοροποίηση της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού της αξενικής καλλιέργειας ήδη από τις πρώτες 30 ώρες επώασης σε συνθήκες υψηλής αλατότητας έδειξε σημαντική καταπόνηση (Εικόνα 35). Οι φωτοσυνθετικές παράμετροι της καλλιέργειας, όπως φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα, δεν συγκροτούν μια εικόνα ανθεκτικότητας. Σε σχέση με το χλωροφύκος στο συμβιωτικό σχήμα, το αξενικό χλωροφύκος καταπονείται όλο και περισσότερο στην πορεία του χρόνου. Παρατηρούμε σαφώς μια μείωση των ενεργών φωτοσυνθετικών κέντρων (RC/CSo), ενώ αυξάνεται το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας ανά ενεργό κέντρο (ABS/RC), αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της πρωτογενούς φωτοχημείας (PSIo), την αύξηση της μη φωτοχημικής απόσβεσης της απορροφηθείσας ενέργειας (DIO/RC) και ως εκ τούτου την μείωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης PI(abs).

Στην Εικόνα 37 συγκρίνονται οι δύο τύποι καλλιεργειών, δηλαδή η αξενική και αυτή του συμβιωτικού σχήματος, σύμφωνα με την κατάσταση του φωτοσυνθετικού τους μηχανισμού μετά από 30 ώρες επώασης σε θρεπτικό με 50% αλατότητα. Εδώ φαίνεται ξεκάθαρα το γεγονός ότι η πιο ανθεκτική μορφή του χλωροφύκους είναι αυτή εντός του συμβιωτικού σχήματος. Στο συμβιωτικό σχήμα βλέπουμε αύξηση των ενεργών φωτοσυνθετικών κέντρων (RC/CSo) και μείωση του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής κεραίας ανά ενεργό κέντρο (ABS/RC) με αποτέλεσμα την αύξηση της πρωτογενούς

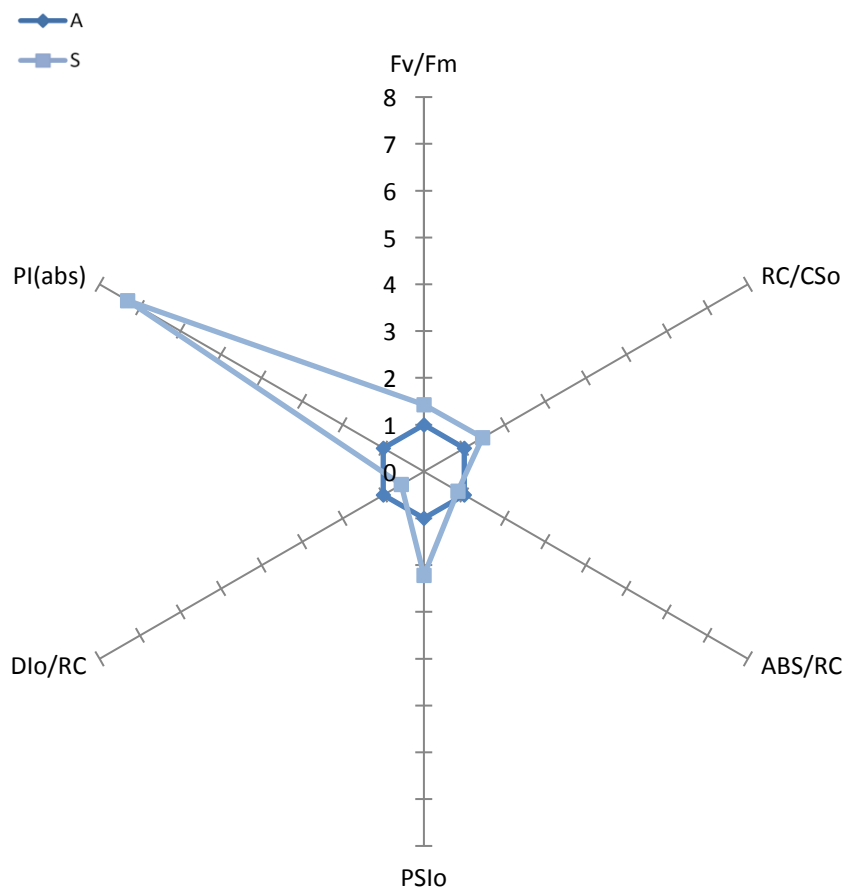


Εικόνα 35. Σχετικές φωτοσυνθετικές παράμετροι που μετρήθηκαν σε κύτταρα *T. crenulata* (σε αξενική κατάσταση) μετά από επώαση σε θρεπτικό δ/μα με αλατότητα 50 % NaCl, σε συνθήκες χαμηλής έντασης φωτός (LL), για τις χρονικές στιγμές 6, 24 και 30 ώρες.



Εικόνα 36. Σχετικές φωτοσυνθετικές παράμετροι που μετρήθηκαν σε καλλιέργειες *T. crepulata* σε αξενική κατάσταση (πάνω) και στο συμβιωτικό σχήμα (κάτω), πριν (TR) και μετά (TNR) την έκθεση σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία.

φωτοχημείας (PSIo), την μείωση της μη φωτοχημικής απόσβεσης της απορροφηθείσας ενέργειας (DIO/RC) και την αύξηση της φωτοσυνθετικής απόδοσης PI(abs). Όλα τα αποτελέσματα των συγκριτικών πειραμάτων ακрайοφιλίας καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι το φύκος σε αξενική μορφή, δεν είναι το ίδιο ανθεκτικό στην αλατότητα, την ακραία χαμηλή θερμοκρασία και την αφυδάτωση, όσο το συμβιωτικό σχήμα. Φαίνεται λοιπόν πως η αλληλεπίδραση των οργανισμών έχει σαφώς θετικό αντίκτυπο στο χλωροφύκος, πράγμα που συμφωνεί και με τον μοριακό χαρακτηρισμό του μεθυλοβακτηρίου.

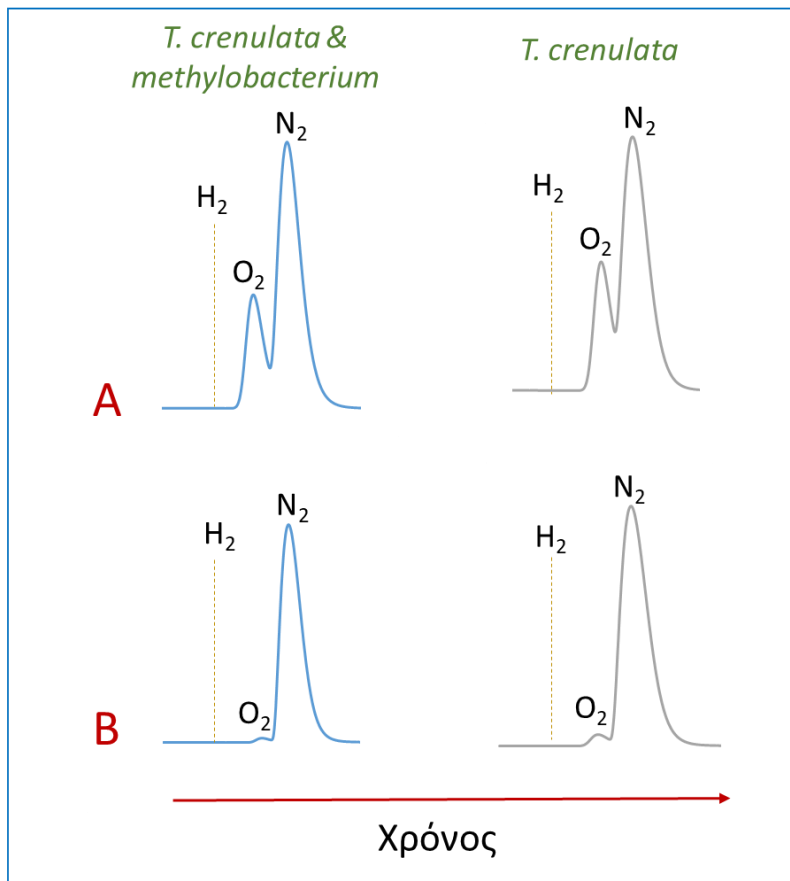


Εικόνα 37. Σχετικές φωτοσυνθετικές παράμετροι που μετρήθηκαν σε κύτταρα *T. crenulata* σε αξενική κατάσταση (A) και στο συμβιωτικό σχήμα (S) μετά από επώαση 30 ωρών σε θρεπτικό μέσο με αλατότητα 50 ‰ NaCl, σε συνθήκες χαμηλής έντασης φωτός (LL).

3.5. Σύγκριση του αξενικού χλωροφύκου *T. crenulata* και του συμβιωτικού σχήματος ως προς την ικανότητα παραγωγής H₂

Με σκοπό να διερευνηθεί η ικανότητα παραγωγής υδρογόνου από το χλωροφύκος *T. crenulata* πραγματοποιήθηκε η παρακάτω πειραματική σειρά. Σε κλειστά μπουκαλάκια με θρεπτικό BBM και προσθήκη γλυκόζης (5 g/L), επώστηκαν σε συνθήκες χαμηλής έντασης φωτισμό κύτταρα *T. crenulata* παρουσία μεθυλοβακτηρίου καθώς και καλλιέργειες του χλωροφύκου σε αξενική κατάσταση. Με τη χρήση της μεθόδου GC-TCD (Αέρια Χρωματογραφία Θερμικής Αγωγιμότητας), αναλύθηκε η σύσταση του αερίου των δειγμάτων μετά από τακτά χρονικά διαστήματα επώασης ώστε να ελεγχθεί ποιοτικά η ύπαρξη υδρογόνου. Οι μετρήσεις έγιναν μια, δύο και τρεις εβδομάδες μετά την έναρξη του πειράματος, ενώ την τρίτη εβδομάδα επώασης τα δείγματα είχαν εμπλουτιστεί με άζωτο ώστε να εγκαθιδρυθεί πλήρης ανοξία, η οποία επιταχύνει την παραγωγή υδρογόνου (Benemann et al. 1973, Ghirardi et al. 1997, Papazi et al. 2012). Τα αποτελέσματα της πρώτης και της δεύτερης βδομάδας έδειξαν ξεκάθαρα ότι και στους δύο χειρισμούς (συμβιωτικό σχήμα και αξενική καλλιέργεια) δεν έχουμε παραγωγή υδρογόνου, ενώ η συγκέντρωση O₂ παραμένει αρκετά υψηλή (Εικόνα 28). Ακόμη και στο συμβιωτικό σχήμα, όπου αναμέναμε λόγω της αναπνευστικής διαδικασίας και του μεθυλοβακτηρίου να είχαμε χαμηλότερα ή και μηδενικά επίπεδα O₂ (εγκαθίδρυση ανοξικών συνθηκών), δεν φαίνεται καμία ουσιαστική διαφοροποίηση με την αξενική καλλιέργεια. Μία αιτιολόγηση αυτού του αποτελέσματος είναι ότι το μεθυλοβακτήριο σε συνθήκες μείωσης του οξυγόνου περιορίζει δραματικά τον μεταβολικό του ρυθμό.

Για να εξετάσουμε αν η μη φωτοσυνθετική παραγωγή H₂ στους δύο χειρισμούς του χλωροφύκου είναι αποτέλεσμα της μη εγκαθίδρυσης ανοξικών συνθηκών στο κλειστό σύστημα ή αν πρόκειται για μεταβολική «επιλογή» του χλωροφύκου, επώστηκαν και οι δύο χειρισμοί για μία επιπλέον βδομάδα σε ατμόσφαιρα αζώτου (ανοξικές συνθήκες). Τα αποτελέσματα, όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 28 έδειξαν και πάλι καθαρά, ότι και σε αυτές τις συνθήκες και στους δύο χειρισμούς δεν έχουμε παραγωγή H₂. Αυτό παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς στην μεγάλη τους πλειοψηφία, τα χλωροφύκη έχουν την ικανότητα παραγωγής υδρογόνου υπό τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν στο παραπάνω πείραμα, σε αντίθεση με το μελετώμενο είδος. Φαίνεται λοιπόν να υπάρχει κάποια άγνωστη τροποποίηση στον μεταβολισμό του συγκεκριμένου χλωροφύκου που ενδεχομένως είναι λειτουργικά και βιονεργετικά συμβατή με ένα φυσικό πολύ-συμβιωτικό σύστημα των λειχήνων του γένους *Ramalina*. Παρόλο που δεν γνωρίζουμε αυτή τη στιγμή την ιδιαιτερότητα του συγκεκριμένου χλωροφύκου, τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με παλαιότερα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας, όπου όλοι οι λειχήνες που εξετάστηκαν παράγουν υψηλές ποσότητες H₂, εκτός από λειχήνες του γένους *Ramalina* που δεν παράγουν, ή παράγουν ελάχιστο H₂ (Papazi et al. 2012).



Εικόνα 38. Έλεγχος παραγωγής φωτοσυνθετικού υδρογόνου με τη χρήση GC-TCD από καλλιέργειες *T. crenulata* σε συμβίωση με μεθυλοβακτήριο (μπλέ) αλλά και σε αξενική μορφή (γκρί), μετά από επώαση για δύο εβδομάδες σε BBM θρεπτικό μέσο με προσθήκη γλυκόζης, σε συνθήκες χαμηλής έντασης φωτισμού (A) και μία επιπλέον εβδομάδα σε ατμόσφαιρα αζώτου (B).

Συζήτηση

Όλες οι πειραματικές προσεγγίσεις στα πλαίσια της παρούσας εργασίας εστιάζουν στην μελέτη της αλληλεπίδρασης του χλωροφύκου *Trebouxia crenulata* και ενός (αγνώστου κατ' αρχήν) βακτηριακού στελέχους, τα οποία φαίνεται να έχουν συγκροτήσει ένα λειτουργικό σχήμα με χαρακτηριστικά συμβίωσης. Το χλωροφύκος υπό μελέτη (*T. crenulata*), αποτελεί τον φωτοβιώτη του λειχήνα *Ramalina capitata*. Καθώς τα τελευταία χρόνια θεωρείται δεδομένος ο λειτουργικός ρόλος των βακτηρίων στην συγκρότηση και την διατήρηση του θαλλού ενός λειχήνα (Grube et al. 2015), το παραπάνω συμβιωτικό σχήμα αποκτά ακόμη μεγαλύτερο ενδιαφέρον, η μελέτη ωστόσο επικεντρώθηκε, σε αυτό το στάδιο, αποκλειστικά στην αλληλεπίδραση χλωροφύκου (μετά την απομάκρυνση του από το φυσικό του περιβάλλον, τον θαλλό του λειχήνα) και βακτηρίου. Μελετήθηκε η απόκριση των δύο μικροοργανισμών, τόσο εντός συμβιωτικού σχήματος, όσο και ξεχωριστά, σε πολύ-ακραιοφιλική καταπόνηση, ελέγχοντας την λειτουργική τους ανθεκτικότητα σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία (-196°C/ 77K), σε αφυδάτωση, καθώς επίσης και σε ακραία υψηλή αλατότητα (έως 50%). Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε να απαντηθούν τα παρακάτω βασικά ερωτήματα:

- **Είναι η ακραιοφιλική συμπεριφορά των λειχήνων (Parasyri et al. 2018) χαρακτηριστικό των επιμέρους οργανισμών; Ποια η συμπεριφορά των απομονωμένων βιωτών;**
- **Η αλληλεπίδραση του χλωροφύκου με το βακτήριο υπό μελέτη έχει θετικό ή αρνητικό αντίκτυπο στην ανθεκτικότητά του;**
- **Προκύπτουν στοιχεία που να καταδεικνύουν ότι η αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών (χλωροφύκος και βακτήριο) μπορεί να έχει λειτουργικό ρόλο και στο μικρο-οικοσύστημα του λειχήνα;**

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αναφορικά με το πρώτο ερώτημα, δείχνουν πως το απομονωμένο από τον θαλλό του λειχήνα χλωροφύκος *T. crenulata* παρουσιάζει αντίστοιχη με αυτή των λειχήνων ανθεκτικότητα σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία (-196°C/ 77K) και αφυδάτωση (Parasyri et al. 2018), αλλά και σε υψηλή αλατότητα (έως 50%). Ένας μηχανισμός ανθεκτικότητας σε αντίστοιχες καταπονήσεις είναι η παραγωγή και συγκέντρωση υψηλών συγκεντρώσεων σακχάρων στο εσωτερικό του κυττάρου, όπως ριβιτόλη και σακχαρόζη (Sadowsky et al. 2016). Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι η φαινομενικά και λειτουργικά αξενική καλλιέργεια του χλωροφύκου *T. crenulata* σε αυτότροφες συνθήκες, εμφανίζει μεταβαίνοντας σε μικτότροφες συνθήκες την δραματική αύξηση ενός και μοναδικού βακτηριακού συμβιώτη, πλούσιου σε καροτενοειδή και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και σε βακτηριοχλωροφύλλη (Εικόνα 27). Με αυτά τα δεδομένα το χλωροφύκος μετά την απομάκρυνση από τον μυκοβιώτη του λειχήνα, φαίνεται να συνεχίζει την συμβίωση του με το άγνωστο βακτήριο. Έτσι, το αρχικό ερώτημα αν η παραπάνω ανθεκτικότητα στην ακραία καταπόνηση είναι αποτέλεσμα της συμβίωσης ή όχι, επανατίθεται. Η απομόνωση του αγνώστου βακτηρίου από αυτή τη συμβιωτική σχέση έδειξε ότι το βακτήριο είναι επίσης ανθεκτικό στις παραπάνω ακραίες καταπονήσεις [ακραία χαμηλή θερμοκρασία

(-196 °C/77K), αφυδάτωση, υψηλή αλατότητα (έως 50%)], πράγμα που παρουσιάζει ακόμα μεγαλύτερο ενδιαφέρον καθώς το εύρος ανθεκτικότητάς του σε αυτές συμπίπτει με αυτό του χλωροφύκου (σε συμβιωτικό σχήμα) (Εικόνες 21-26). Με αυτό τον τρόπο αναδεικνύεται ένας μικροοργανισμός που διαθέτει προσαρμογές σε ακραίες συνθήκες, οι οποίες του επιτρέπουν να επιβιώνει σε κάποιο αντίστοιχο περιβάλλον. Ο μοριακός χαρακτηρισμός του βακτηρίου (Εικόνα 30), έδειξε ότι ανήκει στο γένος *Methylobacterium*, που περιλαμβάνει πληθώρα στελεχών ιδιαίτερα ανθεκτικών στην αφυδάτωση, τον παγετό, την UV ακτινοβολία και τις υψηλές θερμοκρασίες (Trotsenko et al. 2001).

Η συγκριτική μελέτη της ακραιοφιλίας μεταξύ του συμβιωτικού σχήματος και του απομονωμένου χλωροφύκου *T. crenulata* σε άξενική μορφή, μετά τον διαχωρισμό του από το μεθυλοβακτήριο με την χρήση κατάλληλου αντιβιοτικού (Πίνακας 3, Εικόνα 33), έδειξε σαφείς διαφορές. Το χλωροφύκος *T. crenulata* στο συμβιωτικό σχήμα όχι μόνο δεν αποδυναμώνεται από την αλληλεπίδρασή του με το βακτήριο αλλά επηρεάζεται θετικά (τόσο όσον αφορά στον ρυθμό ανάπτυξης της καλλιέργειας, όσο και την φωτοσυνθετική του απόδοση), ενώ σε καταστάσεις ακραίων καταπονήσεων η ανθεκτικότητά του ενισχύεται εμφανώς (Εικόνες 36, 37). Η φωτοσυνθετική του απόδοση μετά από έκθεση σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία και αφυδάτωση ανακάμπτει σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι όταν βρίσκεται σε άξενική κατάσταση, ενώ σε συνθήκες ακραία υψηλής αλατότητας το συμβιωτικό σύστημα παρουσιάζει εντυπωσιακή ανθεκτικότητα, πράγμα που δεν επιτυγχάνει το χλωροφύκος σε κατάσταση άξενική (Εικόνες 35, 36, 37). Αυτό θα μπορούσε να δικαιολογηθεί λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι είδη του γένους *Methylobacterium* έχουν πολύ συχνά προωθητικές ιδιότητες στην αύξηση φυτικών οργανισμών, παράγοντας την ορμόνη αυξίνη (IAA), σιδηροφορείς και βιταμίνη B₁₂, ενώ υπάρχουν συγκεκριμένες αναφορές θετικής αλληλεπίδρασης με χλωροφύκη, όπου τα βακτήρια τροφοδοτούμενα από τα φωτοσυνθετικά προϊόντα ανακυκλώνουν και διαλυτοποιούν χημικές ουσίες προς όφελος του φύκου (Calatrava et al. 2018). Άλλωστε, το είδος *Methylobacterium populi*, το οποίο παρουσίασε την μεγαλύτερη ομοιότητα (94%) βάσει της αλληλουχημένης περιοχής του συμβιωτικού βακτηριακού στελέχους (Εικόνα 32), χαρακτηρίζεται επίσης από ικανότητα παραγωγής IAA, και αποτοξικοποίησης βλαβερών ουσιών (Ventorino et al. 2014)

Ταυτόχρονα, είναι αξιοσημείωτο ότι τόσο το χλωροφύκος *T. crenulata* όσο και το συμβιωτικό μεθυλοβακτήριο, χαρακτηρίζονται από πολύ αργό ρυθμό ανάπτυξης. Σε μετρήσεις που έγιναν αναφορικά με την μεταβολή του κυτταρικού όγκου αυτότροφων καλλιεργειών του μικροφύκου, παρατηρήθηκε ότι ο ρυθμός ανάπτυξης στο συμβιωτικό σχήμα αυξάνει σε σχέση με την άξενική καλλιέργεια (αποτελέσματα πτυχιακής εργασίας, Πατιτάκη 2017). Καθώς το είδος *Methylobacterium populi*, είναι βακτήριο προωθητικό για την φυτική αύξηση με ικανότητα παραγωγής IAA, είναι εύλογο να υποθέσουμε ότι θα μπορούσε να ρυθμίζει θετικά την αύξηση του χλωροφύκου, όταν υπάρχει αυτή η ανάγκη.

Για να απαντηθεί το τρίτο ερώτημα, θα πρέπει να συγκεραστούν πληροφορίες από όλο το φάσμα των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας. Ο μοριακός χαρακτηρισμός του βακτηρίου σαφώς θα μπορούσε να υποστηρίξει το ενδεχόμενο παρουσίας του στο

θαλλό του λειχήνα. Η τάξη *Rhizobiales* (Bates et al. 2011) αλλά και ιδιαίτερα το γένος *Methylobacterium* (Hodkinson et al. 2009) αποτελούν κυρίαρχα τάξα σε πολλούς μελετημένους λειχήνες, ενώ ταυτόχρονα έχει αναφερθεί ότι στελέχη της οικογένειας *Methylobacteriaceae* εντός του θαλλού συγκεκριμένων λειχήνων είναι οι πρωταρχικά υπεύθυνοι οργανισμοί για την παραγωγή μεταβολιτών, όπως αντιμικροβιακές ουσίες (Aschenbrenner et al. 2016). Ακόμη, η ενδογενής παραγωγή IAA, ο σχηματισμός προστατευτικού βιοφίλμ και η ικανότητα αποτοξικοποίησης του περιβάλλοντος αποτελούν χαρακτηριστικά τόσο πολλών βακτηριοβιωτών σε θαλλούς λειχήνων (Liba et al. 2006, Grube et al. 2009, Grube et al. 2015), όσο και του είδους *Methylobacterium populi* στην αλληλεπίδρασή του με φυτικά είδη (Ventorino et al. 2014). Ακόμα πιο εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι, το παραπάνω είδος έχει την ικανότητά να βιοαποικοδομεί πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAH) (Ventorino et al. 2014), οι οποίοι είναι ευρέως γνωστό ότι προσλαμβάνονται και συγκεντρώνονται στο εσωτερικό του θαλλού των λειχήνων, με άγνωστο προς το παρόν μηχανισμό (Augusto et al. 2015). Επίσης, όπως φάνηκε από τα πειράματα ακραιοφιλίας στους δύο απομονωμένους μικροοργανισμούς (*T. crenulata* & μεθυλοβακτήριο), υπάρχει ένα κοινό εύρος ανθεκτικότητας. Με δεδομένο ότι συχνά οι αποκρίσεις βιωτών (σε μη συμβιωτική κατάσταση) σε καταπονήσεις διαφέρουν από την απόκριση του λειχήνα σαν σύνολο (Kosugi et al. 2009), το παραπάνω αποτέλεσμα είναι πιθανό να υποδηλώνει κάποιου είδους συνεξέλιξη των μελετώμενων μικροοργανισμών.

Σε αυτό το πλαίσιο, πολύ ενδιαφέρουσες υποθέσεις θα μπορούσαν να διατυπωθούν σχετικά με τον μηχανισμό αλληλεπίδρασης των δύο μικροοργανισμών, τόσο εντός του συμβιωτικού σχήματος στο εργαστήριο όσο και εντός του μικροπεριβάλλοντος ενός λειχήνα. Καθώς τα χλωροφύκη του γένους *Trebouxia* ως φωτοβιώτες φωτοσυνθέτουν και εκκρίνουν σάκχαρα, όπως ριβιτόλη, στο μικροπεριβάλλον του λειχήνα (Kendrick 1985), θα ήταν λογικό τα μεθυλοβακτήρια εντός του συμβιωτικού σχήματος να τα χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα, όπως συμβαίνει και σε παρόμοια συμβιωτικά σχήματα (Kono et al. 2017). Παράλληλα, ο πολύ αργός ρυθμός αύξησης του είδους *T. crenulata* σε συνδυασμό με την πιθανή παραγωγή IAA από το μεθυλοβακτήριο, ίσως υπονοεί έναν ρόλο διαχείρισης της αύξησης του χλωροφύκου, τόσο σε εργαστηριακές συνθήκες όσο και στο μικροπεριβάλλον ενός λειχήνα. Ο ρυθμός αύξησης ενός λειχήνα συνδέεται αντιστρόφως ανάλογα με την ανθεκτικότητά του σε ακραίες συνθήκες, καθώς επιτρέπει την διοχέτευση των πηγών άνθρακα για αυτό τον σκοπό (Armstrong & Bradwell 2010). Άλλωστε, ένας οριοθετημένος ρυθμός αύξησης του χλωροφύκου σε συμβιωτική μορφή είναι απαραίτητος για την διατήρηση της σταθερότητας του θαλλού του λειχήνα. Επιπλέον, η παρατήρηση στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, ότι το απομονωμένο χλωροφύκος *T. crenulata* (σε αντίθεση με την πλειοψηφία των χλωροφυκών) αδυνατεί να παράγει φωτοσυνθετικό υδρογόνο (H_2), μια λειτουργία που συνδέεται επίσης με την παραγωγή ενέργειας (ATP σε ανοξικές συνθήκες) και ως εκ τούτου και με τον έλεγχο του ρυθμού αύξησης των χλωροφυκών (Melis & Harpe 2001), φανερώνει μια ενδιαφέρουσα αλλαγή προς διερεύνηση στην διαχείριση της φωτοσυνθετικά παραγόμενης ενέργειας. Έχει άλλωστε προταθεί ότι στο εσωτερικό του λειχήνα η διαχείριση των πόρων επιτελείται εν μέρει από τους βακτηριοβιώτες (Schneider et al. 2011). Η μη παραγωγή H_2 από το χλωροφύκος, τόσο σε συμβιωτική

σχέση με το μεθυλοβακτήριο, όσο και σε αζενική μορφή, υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι λειχήνες του γένους *Ramalina* (από όπου απομονώθηκε η *T. crenulata*) επίσης δεν παράγουν H₂ (Parazi et al. 2012). Θα μπορούσαμε τέλος να πούμε ότι το συγκεκριμένο μεθυλοβακτήριο, καθώς φέρει φωτοσυνθετική ικανότητα, θα διέθετε εξελικτικό πλεονέκτημα σε δυσμενείς συνθήκες ολιγοτροφίας και μεταβολικά ανενεργής κατάστασης ενός λειχήνα, μεταβαίνοντας σε αυτότροφη κατάσταση και οργανώνοντας τον φωτοσυνθετικό του μηχανισμό (αυξημένη παραγωγή βακτηριοχλωροφύλλης). Έτσι θα μπορούσε να ανεξαρτητοποιείται ενεργειακά από τους συμβιώτες του, αλλά και από αποδέκτης ενέργειας σε ένα συμβιωτικό σχήμα να γίνεται προμηθευτής ενέργειας υπό τη μορφή οργανικής ύλης προς τους συμβιώτες του.

Σε κάθε περίπτωση, για να προταθεί ένας σαφής μηχανισμός αλληλεπίδρασης των μικροοργανισμών, απαιτείται ενδελεχής μελέτη και συγκέντρωση επιπλέον πληροφοριών, τόσο σε μοριακό, όσο και σε βιοχημικό επίπεδο. Μελλοντικά, θα ήταν χρήσιμο να αλληλουχηθεί ολόκληρο το γονιδίωμα του βακτηριακού στελέχους, ώστε να αποκαλυφθούν οι πιθανές λειτουργίες που θα μπορούσε να επιτελεί ως βακτηριοβιώτης. Είναι ακόμη πολύ σημαντικό να διερευνηθεί η παρουσία του εντός του θαλλού λειχήνων του είδους *Ramalina capitata* από διάφορους τύπους οικοσυστημάτων, καθώς αυτός ο παράγοντας διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στην «στρατολόγηση» από τον λειχήνα των εκάστοτε βακτηριοβιωτών (Hodkinson et al. 2011). Επίσης, προγραμματίζεται σε επόμενο στάδιο η διαλεύκανση του μεταβολικού προφίλ της αλληλεπίδρασης των δύο μικροοργανισμών και ιδιαίτερα η ανάλυση των σακχάρων, τα οποία φέρουν κομβικό ρόλο στην ρύθμιση της αύξησης, στην επίτευξη ανθεκτικότητας σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία, αφυδάτωση και αλατότητα, αλλά ακόμα πιο σημαντικά, στην σηματοδότηση και την τροφική αλληλεπίδραση μεταξύ χλωροφύκους και βακτηρίου.

Βιβλιογραφία

- **Ahmadjian V (1993).** *The Lichen Symbiosis*. John Willey & Sons Inc., New York
- **Allen JF (2003).** Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain. *Trends Plant Sci* 8:15-19
- **Anna JM, Scholes GD, van Grondelle RA (2014).** Little Coherence in Photosynthetic Light Harvesting. *BioScience* 64 (1): 1-12
- **Antal TK, Krendeleva TE, Laurinavichene TV, Makarova VV, Ghirardi ML et al (2003).** The dependence of algal H₂ production on Photosystem II and O₂ consumption activities in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Biochim Biophys Acta* 1607: 153–160
- **Aras S, Cansaran D (2006).** Isolation of DNA for sequence analysis from herbarium material of some lichen specimens. *Turkish Journal of Botany* 30: 449-453.
- **Armstrong R, Bradwell T (2010).** Growth Of Crustose Lichens: A Review. *Geografiska Annaler: Series A, Physical Geography* 92: 3-17.
doi:10.1111/j.1468-0459.2010.00374.x
- **Arnon DI et al (1954).** Photosynthesis by isolated chloroplasts. *Nature* 174: 394–396
- **Arnon DI et al (1971).** The Light Reactions of Photosynthesis. *Proc Nat Acad Sci*. 68: 2883-2892
- **Aschenbrenner IA, Cernava T, Berg G, Grube M (2016).** Understanding Microbial Multi-Species Symbioses. *Frontiers in Microbiology* 7:180.
doi:10.3389/fmicb.2016.00180
- **Augusto S, Sierra J, Nadal M, Schuhmacher M (2015).** Tracking polycyclic aromatic hydrocarbons in lichens: It's all about the algae. *Environmental Pollution* 207: 441-445
- **Bates ST, Cropsey GWG, Caporaso JG, Knight R., Fierer N (2011).** Bacterial communities associated with the lichen symbiosis. *Appl Environ Microbiol* 77(4): 1309-1314. doi: 10.1128/AEM.02257-10
- **Benemann JR, Berenson JA, Kaplan NO, Kamen MD (1973).** Hydrogen evolution by chloroplast-ferredoxin-hydrogenase system. *Proc Natl Acad Sci* 70: 2317–2320
- **Brembu T, Winge P, Tooming-Klunderud A, Nederbragt AJ, Jakobsen KS, Bones AM (2014).** The chloroplast genome of the diatom *Seminavis robusta*: new features introduced through multiple mechanisms of horizontal gene transfer. *Mar Genom* 16: 17–27
- **Brodo IM (1973).** The lichen genus *Coccotrema* in North America. *The Bryologist* 76: 260-270
- **Calatrava V, Llamas A, Fernández E, Galván A (2018).** OK, thanks! A new mutualism between *Chlamydomonas* and *Methylobacteria* facilitates growth on

amino acids and peptides. *FEMS Microbiology Letters* 365 (7)
doi:10.1093/femsle/fny021

- **Cardinale M, de Castro Jr JV, Muller H, Berg G, Grube, M (2008).** In situ analysis of the bacterial community associated with the reindeer lichen *Cladonia arbuscula* reveals predominance of Alphaproteobacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 66: 63–71. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00546.x
- **Casano L, Del Campo E, García Breijo FJ et al (2011).** Two *Trebouxia* algae with different physiological performances are ever present in lichen thalli of *Ramalina farinacea*. Coexistence versus Competition. *Environmental Microbiology*. 13(3): 806-818. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02386.x
- **Chader S, Hacene H, Agathos S (2009).** Study of hydrogen production by three strains of *Chlorella* isolated from the soil in the Algerian Sahara. *International Journal of Hydrogen Energy* 34 (11): 4941-4946
- **Corpe WA, Rheem S (1989).** Ecology of the methylotrophic bacteria on living leaf surfaces. *FEMS Microbiol Ecol* 62: 243–250.
- **Daly MJ, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Zhai M, Venkateswaran A, Hess M, Omelchenko MV, Kostandarithes HM, Makarova KS, et al (2004).** Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. *Science* 306 (5698): 1025–1028
- **De Maayer P, Anderson D, Cary C, Cowan DA (2014).** Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO Reports* 15(5): 508–517
- **De Vera JPP (2012).** Lichens as survivors in space and on Mars. *Fungal Ecology* 5: 472-479
- **Delmail D, Grube M, Parrot D, Cook-Moreau J, Boustie J, Labrousse, P, Tomasi S (2013).** Halotolerance in Lichens: Symbiotic Coalition Against Salt Stress. *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress* 115-148
- **Dubini AG (2014).** Engineering photosynthetic organisms for the production of biohydrogen. *Photosynth Res* 123: 241-253
- **Florin E, Tsokoglou A, Happe T (2001).** A Novel Type of Iron Hydrogenase in the Green Alga *Scenedesmus obliquus* Is Linked to the Photosynthetic Electron Transport Chain. *The J Biol Chem* 276: 6125–6132
- **Frenkel A (1954).** Light induced phosphorylation by cell-free preparations of photosynthetic bacteria. *J Am Chem Soc* 76: 5568–5569
- **Fuentes, JL, Garbayo I, Cuaresma M, Montero Z, González-del-Valle M, Vilchez C (2016).** Impact of Microalgae-Bacteria Interactions on the Production of Algal Biomass and Associated Compounds. *Marine Drugs* 14(5): 100.
- **Helliwell K, Wheeler G, Leptos K, Goldstein R, Smith A (2011).** Insights into the Evolution of Vitamin B₁₂ Auxotrophy from Sequenced Algal Genomes. *Molecular Biology and Evolution* 28 (10): 2921–2933
- **Holland MA, Polacco JC (1994).** PPFMs and other covert contaminants: is there more to plant physiology than just plant? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45: 197–209

- **Geng H, Bruhn JB, Nielsen KF, Gram L, Belas R (2008).** Genetic Dissection of Tropodithietic Acid Biosynthesis by Marine Roseobacters. *Appl Environ Microbiol* 74 (5): 1535-1545 doi: 10.1128/AEM.02339-07
- **Geng H, Belas R (2010).** Molecular mechanisms underlying roseobacter–phytoplankton symbioses. *Current Opinion in Biotechnology* 21(3): 332-338
- **Ghirardi, M, Togasaki R (1997).** Oxygen sensitivity of algal H₂-production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 63-65: 143-151
- **Grube M, Cardinale M, de Castro Jr JV, Mueller H, Berg G (2009).** Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. *Isme J* 3:1105–1115
- **Grube M, Cernava T, Soh J (2015).** Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics. *Isme J* 9 (2): 412-424. doi:10.1038/ismej.2014.138
- **Happe T, Naber D (1993).** Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem* 214: 475-481
- **Hawksworth DL (1988).** The variety of fungal- algal symbioses, their evolutionary significance, and the nature of lichens. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 96: 3-20. doi: 10.1111/j.1095-8339.1988.tb00623.x
- **Hodkinson BP, Lutzoni F (2009).** A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the *Rhizobiales*. *Symbiosis* 49: 16
- **Hodkinson BP, Gottel NR, Schadt CW, Lutzoni F (2011).** Photoautotrophic symbiont and geography are major factors affecting highly structured and diverse bacterial communities in the lichen microbiome. *Environ Microbiol* 14: 147–161
- **Honegger R (1998).** The lichen symbiosis-what is so spectacular about it? *Lichenologist* 30: 193–212
- **Ivanova EG, Doronina NV, Trotsenko YA (2001).** Aerobic Methylobacteria Are Capable of Synthesizing Auxins. *Microbiology* 70: 392trots
- **Kendrick, B (1985).** *The Fifth kingdom*. Waterloo, Ont., Canada: Mycologue Publications
- **Kobayashi M, Oh-oka H, Akutsu, S et al (2000).** The primary electron acceptor of green sulfur bacteria, bacteriochlorophyll 663, is chlorophyll a esterified with Δ 2,6-phytadienol. *Photosynthesis Research* 63: 269
- **Koenig RL, Morris RO, Polacco JC (2002).** tRNA Is the Source of Low-Level trans-Zeatin Production in *Methylobacterium* spp. *Journal of Bacteriology* 184(7): 1832–1842
- **Kono M, Tanabe H, Ohmura Y, Satta Y, Terai Y (2017).** Physical contact and carbon transfer between a lichen-forming *Trebouxia* alga and a novel *Alphaproteobacterium*. *Microbiology* 163: 678–691
- **Kosugi M, Arita M, Shizuma P, Moriyama Y, Yasuhiro Kashino, Hiroyuki Koike, Kazuhiko Satoh (2009).** Responses to Desiccation Stress in Lichens are Different from Those in Their Photobionts. *Plant and Cell Physiology* 50 (4): 879–888

- **Kranner I, Cram J, Zorn M, Wornik S, Yoshimura I, Stabentheiner E (2005).** Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (8) 3141-3146. doi:10.1073/pnas.0407716102
- **Liba CM et al (2006).** Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *J Appl Microbiol* 101: 1076–1086
- **Lidstrom ME, Chistoserdova L (2002).** Plants in the Pink: Cytokinin Production by *Methylobacterium*. *Journal of Bacteriology* 184(7)
- **Limardo AJ, Worden AZ (2015).** Exclusive networks in the sea. *Nature* 522: 36–7
- **Lutzoni F, Miadlikowska J (2009).** Lichens. *Current Biology* 19: R502–R503
- **McDonald IR, Doronina NV, Trotsenko YA, McAnulla C, Murrell JC (2001).** *Hyphomicrobium chloromethanicum* sp nov and *Methylobacterium chloromethanicum* sp. nov., chloromethane-utilizing bacteria isolated from a polluted environment. *Int J Syst Evol Microbiol*.51: 119-122
- **Mayer M (2018).** The Effects of Salt Concentration on Bacterial Growth. *Sciencing* <https://sciencing.com/effects-salt-concentration-bacterial-growth-5924409.html>
- **Meeßen, J, Sánchez FJ, Brandt A, Balzer EM, de la Torre R, Sancho LG, de Vera JPP, Ott S (2013).** Extremotolerance and resistance of lichens: comparative studies on five species used in astrobiological research I. Morphological and anatomical characteristics. *Orig Life Evol Biosph* 43: 283–303
- **Meeßen J, Backhaus T, Sadowsky A, Mrkalj M, Sánchez FJ, de la Torre R, Ott S (2014).** Effects of UVC254nm on the photosynthetic activity of photobionts from the astrobiologically relevant lichens *Buellia frigida* and *Circinaria gyrosa*. *International Journal of Astrobiology* 13: 340–352
- **Melis A, Happe T (2001).** Hydrogen production. Green algae as a source of energy. *Plant Physiol* 127: 740–748
- **Molins A, García-Breijo FJ, Reig-Armiñana, J., del Campo EM, Casano LM, Barreno E (2013).** Coexistence of different intrathalline symbiotic algae and bacterial biofilms in the foliose Canarian lichen *Parmotrema pseudotinctorum*. *Vieraea* 41: 349–370
- **Niedzwiedzki D, Blankenship R (2010).** Singlet and triplet excited state properties of natural chlorophylls and bacteriochlorophylls. *Photosynth Res* 106: 227–238
- **Nield J (2007-2011).** Mechanistic and Structural Biology. SBCS, Queen Mary, University of London
- **Nguyen AV, Thomas-Hall SR, Malnoë A (2008).** Transcriptome for Photobiological Hydrogen Production Induced by Sulfur Deprivation in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* 7 (11): 1965-1979. doi:10.1128/EC.00418-07

- **Nyati S, Scherrer S, & Werth S, Honegger R (2014).** Green algal photobiont diversity (*Trebouxia* spp.) in representatives of Teloschistaceae (Lecanoromycetes, lichen-forming ascomycetes). *The Lichenologist* 46: 189-212
- **Okamura MY, Paddock ML, Graige MS, Feher G (2000).** Proton and electron transfer in bacterial reaction centers. *Biochim Biophys Acta* 1458: 148–163
- **Papazi A, Andronis E, Ioannidis NE, Chaniotakis N, Kotzabasis K (2012).** High Yields of Hydrogen Production Induced by Meta-Substituted Dichlorophenols Biodegradation from the Green Alga *Scenedesmus obliquus*. *PLoS ONE* 7: 1-16
- **Papazi A, Kastanaki E, Pirintsos S, Kotzabasis K (2015).** Lichen Symbiosis : Nature’ s High Yielding Machines for Induced Hydrogen Production. *PLoS ONE* 10:1–22
- **Ramanan R, Kim B, Cho D, Oh HM, Kim HS (2016).** Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology Advances* 34 (1): 14-29
- **Richardson DHS, Hill DJ, Smith DC (1968).** Lichen physiology. XI. The role of the alga in determining the pattern of carbohydrate movement between lichen symbionts. *New Phytol* 67: 469-486
- **Sadowsky A, Mettler-Altmann T, Ott S (2016).** Metabolic response to desiccation stress in strains of green algal photobionts (*Trebouxia*) from two Antarctic lichens of southern habitats. *Phycologia* 55: 703–714
- **Schneider T, Schmid E, Vieira de Castro Junior J, Cardinale M, Eberl L, Grube M, Berg G, Riedel K (2011).** Structure and function of the symbiosis partners of the lung lichen *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. analyzed by metaproteomics. *Proteomics* 11: 2752–2756
- **Selbmann L, Zucconi L, Ruisi S, Grube M, Cardinale M, Onofri S (2009).** Culturable bacteria associated with Antarctic lichens: Affiliation and psychrotolerance. *Polar Biology* 33: 71-83
- **Seyedsayamdost MR, Case RJ, Kolter R, Clardy J (2011).** The Jekyll-and-Hyde chemistry of *Phaeobacter gallaeciensis*. *Nat Chem* 3: 331–335
- **Shirkey B, Kovarcik DP, Wright DJ, Wilmoth G, Prickett TF, Helm RF, Gregory EM, Potts M (2000).** Active Fe-containing superoxide dismutase and abundant sodF mRNA in *Nostoc commune* (Cyanobacteria) after years of desiccation. *J Bacteriol* 182: 189–197
- **Sigurbjornsdottir MA, Heidmarsson S, Jonsdottir AR, Vilhelmsson O (2014).** Novel bacteria associated with Arctic seashore lichens have potential roles in nutrient scavenging. *Canadian Journal of Microbiology* 2014 (60): 307–317. doi: 10.1139/cjm-2013-0888
- **Sigurbjornsdottir MA, Andresson OS, Vilhelmsson O (2015).** Analysis of the *Peltigera membranacea* metagenome indicates that lichen-associated bacteria are involved in phosphate solubilization. *Microbiology* 161: 989–996. doi: 10.1099/mic.0.000069
- **Sleator R, Hill C (2002).** Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol Rev* 26(1): 49–71

- **Spribille T, Tuovinen V, Resl P, Vanderpool D, Wolinski H, Aime MC, Schneider K, Stabentheiner E, Toome-Heller M, Thor G, Mayrhofer H, Johannesson H, McCutcheon JP (2016).** Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichen. *Science* 353: 488-492
- **Stein J (1973).** Culture methods and growth measurements. *Handbook of Phycological methods*. Cambridge University Press
- **Strasser BJ, Strasser RJ (1995).** Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test. *Photosynthesis: from light to biosphere*. Dordrecht: Kluwer Academic Press 977-980
- **Sy A, Giraud E, Jourand P, Garcia N, Willems A et al (2001).** Methylophilic *Methylobacterium* Bacteria Nodulate and Fix Nitrogen in Symbiosis with Legumes. *Journal of Bacteriology* 183(1): 214–220
- **Thompson A et al (2012).** Unicellular cyanobacterium symbiotic with a single-celled eukaryotic alga. *Science* 337 (6101): 1546-50
- **Tribelli PM, López NI (2018).** Reporting Key Features in Cold-Adapted Bacteria. *Life* 8(1): 8
- **Trotsenko YA, Ivanova EG, Doronina NV (2001).** *Microbiology* 70: 623
- **Tschaikner A, Ingolić E, Holzinger A, Gärtner G (2007).** Phycobionts of some species of *Evernia* and *Ramalina*. *Herzogia* 20: 53-60
- **Tschermak-Woess E (1989).** The Algal *Handbook of Lichenology* (I): 39–92. Boca Raton: CRC Press Partner.
- **Van Aken B, Tehrani R, Schnoor JL (2011).** Endophyte-Assisted Phytoremediation of Explosives in Poplar Trees by *Methylobacterium populi* BJ001T. Endophytes of Forest Trees. *Forestry Sciences* (80). Springer, Dordrecht
- **Ventorino V, Sannino F, Piccolo A, Cafaro V, Carotenuto R, Pepe O (2014).** *Methylobacterium populi* VP2: plant growth-promoting bacterium isolated from a highly polluted environment for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) biodegradation. *Sci World J*. doi: 10.1155/2014/9317932014
- **Vreeland R (1987).** Mechanisms of Halotolerance in Microorganisms. *Critical reviews in microbiology* 14: 311-56
- **Walker DA (2002).** The Z-scheme – down hill all the way. *Trends Plant Sci* 7: 183–185
- **Zerges W (2002).** Does complexity constrain organelle evolution? *Trends Plant Sci* 7: 175–182