

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ



Διιδρυματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών



Διαφοροποίηση της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus* κατά την έκθεση του σε ατμόσφαιρες διαφορετικής σύστασης

ΚΥΔΩΝΑΚΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

Μεταπτυχιακή Εργασία Ειδίκευσης

Εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας Επιβλέπων Καθηγητής: Καθ. Κυριάκος Κοτζαμπάσης

Ηράκλειο, Μάρτιος 2020



UNIVERSITY OF CRETE , DEPARTMENT OF BIOLOGY HELLENIC CENTRE FOR MARINE RESEARCH





Differentiation of the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus of the microalga *Scenedesmus obliquus* in atmospheres of different composition

KYDONAKIS EVANGELOS

Master Thesis

Laboratory of Plant Biochemistry and Photobiology

Supervisor: Prof. Kiriakos Kotzabasis

Heraklion, March 2020

Η εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο **Βιοχημείας Φυτών & Φωτοβιολογίας** του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστήμιου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Κυριάκου Κοτζαμπάση και του υποψήφιου διδάκτορα Σωτήρη Ζερβέα.

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Κυριάκος Κοτζαμπάσης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας Στέργιος Πυρίντσος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας Παναγιώτης Σαρρής, Επικ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης κατά το ακαδημαϊκό έτος 2018 – 2019. Έτσι, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς όλες και όλους εκείνους που συνέβαλαν στην υλοποίησή της.

Αρχικά θα ήθελα εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα μου, καθηγητή Κυριάκο Κοτζαμπάση για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω στο εργαστήριο του αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη την διάρκεια της συνεργασίας μας. Επίσης, τον ευχαριστώ από καρδιάς για την συνεχή καθοδήγηση, τις συμβουλές, την υπομονή, την επιμονή και την στήριξη.

Επίσης, ευχαριστώ τον Καθ. Στέργιο Πυρίντσο και τον Επικ. Καθ. Παναγιώτη Σαρρή που δέχθηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Σωτήρη Ζερβέα για τον χρόνο που αφιέρωσε στην εκπαίδευση, τη γνωριμία μου με το εργαστήριο, τις διαφορετικές οπτικές που προσέφερε και για την καθοδήγηση του σε όλες τις πειραματικές προσεγγίσεις.

Ακόμη, δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς συναδέλφους του εργαστηρίου, Μελπομένη –Σοφία Μέντε, Φανούρη Μουντουράκη, Γεράσιμο Τζίβρα, Χρόνη Μουτίδη για την παρουσία και την βοήθεια σε κομβικές στιγμές, αλλά και την γραμματεία του Τμήματος Βιολογίας, ιδιαίτερα την κα. Ευφροσύνη Μπερβανάκη για την στήριξη και τη διάθεση για βοήθεια.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την στήριξη, τους κοντινούς μου ανθρώπους και φίλους που μου κράτησαν συντροφιά, για την υπομονή και τη στήριξη τους στις δύσκολες στιγμές που προέκυψαν και για τη δύναμη που μου έδωσαν να συνεχίσω απτόητα ως το τέλος.

<u>Περιεχόμενα</u>

Περίληψη	6
<u>Summary</u>	7
<u>1.Εισαγωγή</u>	8
<u>1.1.Ηλιακή ενέργεια</u>	8
<u>1.2. Η φωτοσυνθετική διαδικασία</u>	9
<u>1.2.1.Δομική συγκρότηση του χλωροπλάστη</u>	9
<u>1.2.2. Δομή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού</u>	10
<u>1.2.3. Φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων</u>	<u>11</u>
<u>1.3.Η Αναπνευστική Διαδικασία</u>	<u> </u>
<u>1.4.Φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου (H₂) από χλωροφύκη</u>	<u>16</u>
<u>1.5. Γήινη ατμόσφαιρα και ατμόσφαιρες άλλων πλανητών</u>	17
<u>1.6. Σκοπός της εργασίας</u>	<u>19</u>
2. Υλικά και μέθοδοι	$\frac{1}{20}$
2.1.Οργανισμός	$\frac{\underline{}}{\underline{20}}$
2.2.Συνθήκες καλλιέργειας	$\frac{\underline{-}}{22}$
$2.2.1.\Delta$ ιαδικασιες	<u>=</u> 22
2.2.2Ατμόσφαιρες διαφορετικής σύστασης	$\frac{}{22}$
2.3.Καταγραφή της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού - Μέτρηση Επαγωγικού Φθορισμού (JIP-test) 2.4.Αέρια χρωματογραφία θερμικής αγωγιμότητας (GC-TCD)	$\frac{\underline{23}}{\underline{27}}$
2.5.Μέτρηση pH	$\frac{1}{28}$
<u>2.6.Μέτρηση Κυτταρικού Όγκου</u>	$\frac{\underline{\underline{3}}}{\underline{28}}$
<u>3.Αποτελέσματα</u>	<u>29</u>
 3.1.Καταγραφή της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε ατμόσφαιρα ηλίου και αζώτου 3.2.Καταγραφή της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε ατμόσφαιρες αντίστοιχες άλλων πλανητών 3.3. Μπορεί ένας φωτοσυνθετικός οργανισμός σε ανοξική ατμόσφαιρα να δημιουργήσει οξυγονική ατμόσφαιρα 	<u>29</u> <u>37</u> <u>45</u> <u>54</u>
<u>5.Βιβλιογραφία</u>	<u>57</u>

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δυνατότητα επιβίωσης ενός φωτοσυνθετικού μικροφύκους (Scenedesmus obliquus), που στηρίζεται στην οξυγονική φωτοσύνθεση, σε κλειστά συστήματα με ατμόσφαιρες χωρίς O₂ και CO₂, διαφορετικής σύστασης (ατμόσφαιρες N₂, He, H₂+5%He, H₂+15%He, κ.α.), και ο τρόπος διαμόρφωσης της ατμόσφαιρας ενός κλειστού συστήματος προς όφελος του οργανισμού, μέσω της φωτοσυνθετικής διαχείρισης της ηλιακής ακτινοβολίας.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα μονοκύτταρα χλωροφύκη που θα εκτεθούν σε μία ανοξική ατμόσφαιρα (χωρίς O₂ και CO₂) σε συνθήκες επαρκούς φωτισμού, θα την αντιμετωπίσουν με ορθολογικό τρόπο. Η παντελής έλλειψη CO₂ φαίνεται να αντιμετωπίζεται με τον καταβολισμό οργανικής ύλης (από τα υπάρχοντα κυτταρικά αποθέματα, π.χ. άμυλο) μέσω της αναπνευστικής διαδικασίας για να παραχθεί CO₂ που θα υποστηρίξει την φωτοσυνθετική διαδικασία η οποία με τη σειρά της θα παράγει O₂, μέρος του οποίου στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθεί για την αναπνευστική διαδικασία. Αυτή η ανατροφοδότηση αναπνοής – φωτοσύνθεσης, επιτρέπει την επιβίωση, αλλά περιορίζει σε ένα αυτότροφο περιβάλλον την περίσσεια CO₂ που θα μπορούσε να επενδυθεί για την παραγωγή οργανικής ύλης και ως εκ τούτου και βιομάζας.

Εάν εμπλουτίσουμε την ανοξική ατμόσφαιρα με CO₂ (ή γλυκόζη που θα χρησιμοποιηθεί από την αναπνευστική διαδικασία για την παραγωγή CO₂) [χειρισμοί: N₂+10%CO₂, N₂+glc, N₂+10%CO₂+glc], τότε το μικροφύκος φαίνεται να ξεπερνά και αυτό τον περιορισμό, και έχει τη δυνατότητα ένα μεγάλο μέρος του ανόργανου άνθρακα (CO₂) να τον επενδύσει για την φωτοσυνθετική μετατροπή του σε οργανικό άνθρακα και βιομάζα αυξάνοντας ταυτόχρονα την φωτοσυνθετική δραστηριότητα και την παραγωγή O₂. Ο ρυθμός αύξησης του επιπέδου O₂ στην ατμόσφαιρα, κάτω από αυτές τις συνθήκες, φαίνεται να εξαρτάται απλώς από την ένταση του φωτός και τείνει να δημιουργήσει μία ατμόσφαιρα που προσεγγίζει τη σύσταση της γήινης ατμόσφαιρας, τουλάχιστον όσον αφορά το επίπεδο του O₂.

SUMMARY

In the current study we examined the possibility of survival of a green alga (*Scenedesmus obliquus*) in closed systems with atmospheres of different composition without O_2 and CO_2 (N₂, He, H₂+5%He, H₂+15%He atmospheres, etc.) and the way to form an atmosphere for the benefit of the algae, through the photosynthetic management of solar radiation.

The results showed that the microalgae, which were exposed to anoxic atmospheric conditions (without O_2 and CO_2) under adequate illumination, could cope with those conditions in a rational way. The complete absence of CO_2 seems to be addressed by catabolism of organic matter (from existing cell stocks, e.g., starch) through the respiration process that produce CO_2 . This CO_2 supports the photosynthetic process, which in turn will produce O_2 , part of which will then be used by the respiration process itself. This respiration-photosynthesis feedback allows the survival, but limits the amount of CO_2 that could be invested in the production of organic matter, and therefore biomass, in an autotrophic environment.

In case that we enrich the anoxic atmosphere with CO_2 (or glucose to be used by the produce CO_2) [treatments: respiration process to $N_2 + 10\% CO_2$, N_2+glc , $N_2+10\%CO_2+gc$, the microalga appears to overcome this limitation, and a large portion of inorganic carbon (CO_2) will be invested in the photosynthetic conversion to organic carbon and biomass. In parallel, the photosynthetic activity and O_2 production will be increased. The rate of increase in O_2 level, under these conditions, seems to depend simply on the intensity of light and have the tendency to create an atmosphere with a composition approximate to that of the earth's atmosphere, at least as far as O₂ level is concerned.

1.Εισαγωγή

1.1 Ηλιακή ενέργεια

Ηλιακή ενέργεια αποτελεί το σύνολο των διαφόρων μορφών ενέργειας που προέρχονται από τον Ήλιο. Τέτοιες είναι η φωτονιακή ενεργεία, η θερμότητα καθώς και ενέργεια ακτινοβολίας. Η ηλιακή ενέργεια είναι ανανεώσιμη πηγή ενεργείας, αφού προέρχεται από τον ήλιο, πράγμα που σημαίνει ότι δεν υπάρχουν περιορισμοί χώρου και χρόνου στην μετάδοση της και κατ επέκταση στην εκμετάλλευσή της. Μέσω πυρηνικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στον ήλιο παράγονται φωτόνια που διαχέονται προς όλες τις κατευθύνσεις του διαστήματος. Κάθε δευτερόλεπτο περίπου 655 εκατομμύρια τόνοι υδρογόνου από τη μάζα του ήλιου μετατρέπονται σε 650 εκατομμύρια τόνοις ηλίου (He) που συνεχίζουν να αποτελούν μάζα του Ήλιου. Από τη διαφορά αυτή 4,6 εκατομμύρια τόνοι μετατρέπονται σε ενέργεια.

Η σημασία του Ήλιου στην εξέλιξη και την διατήρηση της ζωής στη Γη είναι ζωτική, καθώς δίνει την απαραίτητη ενέργεια για τη θεμελιώδη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, προσφέροντας την απαραίτητη ενέργεια για την ανάπτυξη των φυτών και από αυτά όλων των ζωντανών οργανισμών και διατηρεί την επιφανειακή θερμοκρασία της Γης σε ανεκτά για τη ζωή επίπεδα. Το φως του ήλιου καθορίζει τα μετεωρολογικά φαινόμενα δηλαδή τον καιρό και το κλίμα, επηρεάζει τα γεωχημικά γεγονότα και διαμορφώνει τους βιολογικούς κύκλους.

Η φωτοσύνθεση είναι η μοναδική βιολογική διαδικασία που μετατρέπει την ηλιακή ενέργεια σε εκμεταλλεύσιμη χημική ενέργεια, που με τη σειρά της επενδύεται για την μετατροπή της ανόργανης ύλης σε οργανική. Συμβαίνει τόσο σε προκαρυωτικούς όσο και ευκαρυωτικούς φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς. Είναι γνωστό ότι περίπου το 40% της προσπίπτουσας ακτινοβολίας απορροφάται επιλεκτικά από την στρατόσφαιρα και από την ατμόσφαιρα . Από το υπόλοιπο 60%, μόνο ένα μικρό τμήμα του προσπίπτει πάνω σε φωτοσυνθετικούς οργανισμούς και μόνο το 5% αυτής της ακτινοβολίας είναι εκμεταλλεύσιμη φωτοσυνθετικά. Η ενέργεια του ορατού φωτός είναι αρκετή για να προκαλέσει αλλαγές στην ενεργειακή κατάσταση των φωτοσυνθετικών χρωστικών με αποτέλεσμα την μετατροπή της φωτεινής ενέργειας σε χημική, επιτρέποντας την εξέλιξη σύνθετων βιολογικών συστημάτων, χρησιμοποιώντας το φως ως την απόλυτη πηγή ενέργειας (Lawlor 2001).

1.2 Φωτοσυνθετική διαδικασία

Η φωτοσύνθεση είναι η μοναδική βιολογική διαδικασία που μετατρέπει την ηλιακή ενέργεια σε εκμεταλλεύσιμη χημική ενέργεια, που με τη σειρά της επενδύεται για την μετατροπή της ανόργανης ύλης σε οργανική. Τόσο προκαρυωτικοί όσο και ευκαρυωτικοί φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί, όπως τα μικροφύκη χρησιμοποιούν ως πρωτογενή πομπό ηλεκτρονίων το H₂O με αποτέλεσμα την απελευθέρωση μοριακού οξυγόνου (O₂), που συνέβαλε καθοριστικά στη δημιουργία της παρούσας ατμόσφαιρας του πλανήτη μας, που αποτελείται από 21% O₂ και υποστηρίζει την βιόσφαιρα

$12H_2O + 6CO_2 - h.v \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2 + 6H_2O$

Το 99% της βιομάζας στη γη προέρχεται από τη φωτοσυνθετική διαδικασία και υπολογίζεται ότι ανέρχεται στους 1,87.10¹²t ξηρής οργανικής μάζας. Το 32% αυτής της παραγωγής λαμβάνει χώρα στις θάλασσες και τους ωκεανούς, το 64% στην ξηρά και το υπόλοιπο 4% στους ποταμούς και τις λίμνες.

Η φωτοσύνθεση χωρίζεται σε δυο διαδικασίες :

- Φωτεινές αντιδράσεις: Είναι οι αντιδράσεις οι οποίες περιλαμβάνουν την δέσμευση της ηλιακής ακτινοβολίας και μεταφορά της στα φωτοσυνθετικά κέντρα προκαλώντας μια αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρόνιων και πρωτονίων παράγοντας NADPH, ATP και O2
- Σκοτεινές αντιδράσεις: Είναι οι αντιδράσεις οι οποίες χρησιμοποιούν τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης (NADPH, ATP) για να μετατρέψουν το δεσμευόμενο από την ατμόσφαιρα CO₂ σε οργανική ύλη (παράγωγη υδατανθράκων) μέσω του κύκλου του Calvin/Benson.

1.2.1 Δομική συγκρότηση του χλωροπλάστη

Στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς η φωτοσύνθεση πραγματοποιείται στο οργανίδιο τον χλωροπλάστη. Αναλυτικά αποτελείται από ένα εκτεταμένο σύστημα εσωτερικών μεμβρανών που είναι γνώστες ως θυλακοειδή. Εδώ πραγματοποιούνται οι φωτεινές αντιδράσεις όπου γίνεται δέσμευση του φωτός από τις χλωροφύλλες και η μετατροπή της φωτεινής ενέργειας σε χημική. Οι σκοτεινές αντιδράσεις λαμβάνουν χωρά στο στρώμα του χλωροπλάστη , περιοχή έξω από τα θυλακοειδή. Τα θυλακοειδή διακρίνονται σε grana, που είναι στοιβαγμένες μεμβράνες θυλακοειδών και σε φυλακοειδή στρώματος. Στις μεμβράνες των θυλακοειδών βρίσκονται οι φωτοσυνθετικές μονάδες, που συγκροτούνται από σύμπλοκα πρωτεϊνών/χρωστικών (χλωροφύλλες και καροτενοειδή).





Ο πλαστιδιακός φάκελος αποτελείται από δύο μεμβράνες. 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. Ο χλωροπλάστης περιέχει το δικά του DNA ,RNA και ριβοσωμάτια. Πολλές από τις πρωτεΐνες των χλωροπλαστών μεταγράφονται και μεταφράζονται μέσα στον ίδιο τον χλωροπλάστη, ενώ άλλες κωδικοποιούνται από το πυρήνα και συντίθεται στο κυτταρόπλασμα και στη συνεχεία εισέρχονται στο χλωροπλάστη.

1.2.2. Δομή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού

Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός (Εικόνα 2) αποτελείται από τέσσερα σύμπλοκα, το Φωτοσύστημα II (PSII), το Φωτοσύστημα I (PSI), το κυτόχρωμα b6/f (cyt b6/f), και την ATP–συνθάση. Το PSII αποτελείται από το σύμπλοκο συλλογής φωτός (Light Harvesting Complex, LHCII) και τον πυρήνα του φωτοσυστήματος (με ενεργό κέντρο P680). το LHCII 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 PSI. Το PSI, δομείται από το σύμπλοκο συλλογής φωτός (LHCI) και το πυρήνα του PSI (με ενεργό κέντρο P700). Το LHCI διοχετεύει ενέργεια στο P700, τον πρωτογενή ηλεκτρονιοδότη του κέντρου αντίδρασης, Το cyt b₆/f είναι ένα ενδιάμεσο 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 στο PSII με τη συμβολή της φωτονιακής ενεργείας τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται μέσω της δεξαμενής της πλαστοκινόνης (PQ), του cyt b₆/f, της πλαστοκυανίνης (PC), του PSI και της φερρεδοξίνης (Fd) στο NADP⁺ (Εικόνα 2). Μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων επάγεται η μεταφορά πρωτονίων από το στρώμα στο μικροχώρο και συμβάλουν στην ηλεκτροχημική διαβάθμιση των πρωτονίων η όποια επάγει τη δράση της ATP συνθάσης με συνέπεια την παράγωγη ATP.



Εικόνα 2. Δομική περιγραφή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, με τα τρία κύρια σύμπλοκα χρωστικών/πρωτεϊνών και την ΑΤΡ–συνθάση. Τα βέλη αποτυπώνουν το μονοπάτι ροής ηλεκτρονίων και πρωτονίων (Allen et al. 2011).

1.2.3. Φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων

Μη κυκλική ροή ηλεκτρονίων: Στη μη κυκλική ροή ηλεκτρονίων (Εικόνα 3) συμμετέχουν τα PSII και PSI (Walker 2002, Zerges et.al 2002, Allen 2003). Οι χλωροφύλλες του LHCII απορροφούν την φωτονιακή ενέργεια και διεγείρονται. Αυτή η διέγερση μεταφέρεται μέχρι τον πυρήνα του PSII, στο κέντρο αντίδρασης P₆₈₀ με αποτέλεσμα τελικά την διέγερση του. Το P₆₈₀ μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο στη φαιοφυτίνη το οποίο αναπληρώνεται μέσω της διαδικασίας οξείδωσης του

νερού απελευθερώνοντας μοριακό οξυγόνο και ιόντα υδρογόνου (H⁺). 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 (H⁺) από το στρώμα, η ημικινόνη μετατρέπεται σε πλαστοκινόνη PQH₂. Η οξειδωμένη πρωτεΐνη Rieske (FeS_R) προσλαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο από την PQH₂ και το μεταφέρει στο κυτόχρωμα f. Κατόπιν το κυτόχρωμα f μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο στην πλαστοκυανίνη η όποια ανάγει το οξειδωμένο P700 του PSI από το οποίο μεταφέρονται ηλεκτρόνια στη φερρεδοξίνη και από εκεί στο NADP⁺, το οποίο ανάγεται σε NADPH.



Εικόνα 3. Μή κυκλική και κυκλική φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων. Αριστερά φαίνεται το οξειδοαναγωγικό δυναμικό των επιμέρους ηλεκτρονιομεταφορέων. Μεταξύ των ηλεκτρονιομεταφορέων που συμμετέχουν συμπεριλαμβάνονται η τυροζίνη Z (Z), η φαιοφυτίνη (Phaeo), κινόνες (QA & QB), η δεξαμενή της πλαστοκινόνης (PQ), κυτοχρώματα b6(Cytb6) και f (Cytf), κέντρα Fe-S της πρωτείνης Rieske (FeSR), η πλαστοκυανίνη (PC) και η φερρεδοξίνη (Fd). P680: Κέντρο αντίδρασης του φωτοσυστήματος II, P700: Κέντρο αντίδρασης του φωτοσυστήματος I. (Koning and Ross 1994)

 Κυκλική ροή ηλεκτρονίων: 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. Στην κυκλική ροή ηλεκτρονίων κεντρικό ρόλο έχει το PSI (Walker 2002, Zerges et al. 2002, Allen et al. 2003). Συγκεκριμένα τα ηλεκτρόνια που φτάνουν από το P₇₀₀ στη φερρεδοξίνη 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 P₇₀₀. Λόγω της διαφοράς δυναμικού που δημιουργείται μεταξύ του μικροχώρου και του στρώματος (λόγω της εισόδου H⁺ από το στρώμα στον μικροχώρο, στο επίπεδο της δεξαμενής της πλαστοκινόνης), σχηματίζεται ATP (κυκλική φωτοφωσφορυλίωση). Η διαδικασία αυτή δεν συνοδεύεται από τη δημιουργία του οξειδωαναγωγικού παράγοντα NADPH.

1.3. Η Αναπνευστική Διαδικασία

Με τον όρο αναπνοή εννοούμε τη διεργασία σταδιακής και ελεγχόμενης οξείδωσης οργανικών μορίων προς νερό και CO2 με ταυτόχρονη παραγωγή ATP, αναγωγικών ισοδύναμων και δομικών βιομορίων που απαιτούνται για όλες τις φυσιολογικές και βιοχημικές λειτουργίες των κυττάρων. Η αναπνοή σε βασικές γραμμές είναι ίδια στα ζωικά και τα φυτικά κύτταρα και επιτελείται σε τρία στάδια: την γλυκόλυση, τον κύκλο του Krebs και την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Κατά την οξειδωτική φωσφωρυλίωση στα μιτοχόνδρια παρατηρείται ροή ηλεκτρόνιων κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδίων από το NADH (πομπός ηλεκτρονίων) στο O2 (τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων) με συνέπεια, μέσω της δημιουργίας διαφοράς δυναμικού, την παραγωγή ATP, νερού και NAD⁺. Η διαδικασία της αναπνοής εντοπίζεται χωροταξικά στα μιτοχόνδρια των κυττάρων και στο κυτταρόπλασμα κοντά στα μιτοχόνδρια (Εικόνα 4). Το ATP παράγεται από τις αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος, που γίνεται στη μιτοχονδριακή μήτρα και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης η οποία γίνεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου.

Η γλυκόλυση είναι το πρώτο στάδιο της αναπνοής στο οποίο διασπάτε η γλυκόζη σε δυο μόρια σακχάρων με τρία άτομα άνθρακα .Κατόπιν αυτά τα σάκχαρα οξειδώνονται και επαναδιατάσσονται για να δώσουν δυο μόρια πυροσταφιλικού οξέος. Στον κύκλο του κιτρικού οξέος έχουμε πλήρη οξείδωση του πυροσταφυλικού οξέος στη μήτρα του μιτοχονδρίου με παράγωγη ATP, NADH και CO₂. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση περιλαμβάνει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή το FADH₂ σε ένα μόριο οξυγόνου (O₂), μέσω μιας πρωτονιακής διαβάθμισης που δημιουργείται κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης. Στη διαδικασία αυτή εμπλέκονται τέσσερα διαμεμβρανικά σύμπλοκα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται διαμέσου αυτών των συμπλόκων, με αποτέλεσμα την άντληση πρωτονίων έξω από τη μήτρα του μιτοχονδρίου, στο διαμεμβρανικό χώρο και τη δημιουργία της διαφοράς δυναμικού. Τα πρωτόνια επιστρέφουν στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου με τη βοήθεια μιας ATP συνθάσης (F₀F₁ - ATPase), με ταυτόχρονη παραγωγή ATP.



Εικόνα 4. Κυτταρική αναπνοή: α) Γλυκόλυση, διάσπαση της γλυκόζης γίνεται στο κυτταρόπλασμα με παράγωγη δύο μορίων πυροσταφυλικού οξέος. Το κέρδος του κυττάρου σε ενέργεια από αυτή τη διαδικασία είναι δύο μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (2 ATP) και NADH. β) Κύκλος του Krebs : πλήρης οξείδωση του πυροσταφυλικού οξέος στη μήτρα του μιτοχονδρίου με παράγωγη ATP ,NADH και CO₂.γ) Οξειδωτική Φωσφορυλίωση: Γίνεται στις αναδιπλώσεις της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων καθώς και στον μεσομεμβρανικό χώρο. Η εσωτερική μεμβράνη διαθέτει μεταφορείς ηλεκτρονίων που μεταβιβάζουν ηλεκτρόνια από τα NADH και τα FADH2 στο οξυγόνο με συνέπεια παραγωγή ATP από ADP Pi τη και vepoú(https://www.sedelco.org/cms/lib02/PA01001902/Centricity/Domain/506/08_lectur e animation ppt.pdf)

Η μεταφορά των ηλεκτρονίων γίνεται μέσω κινονών, φλαβινών, σύμπλοκα σιδήρουθείου, ομάδες αίμης στο κυτόχρωμα c και ιόντα χαλκού. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADH στην προσθετική ομάδα FMN της NADH-οξειδοαναγωγάσης (Σύμπλοκο Ι). Τα ηλεκτρόνια από το σύμπλοκο Ι και το σύμπλοκο της αναγωγάσης του ηλεκτρικού (Σύμπλοκο ΙΙ) μεταφέρονται και ανάγουν την ουμπικινόνη (UQH₂) και από εκεί μεταφέρονται στην οξειδοαναγωγάση του κυτοχρώματος c (Σύμπλοκο ΙΙΙ).



Εικόνα 5: Τα τέσσερα σύμπλοκα μεταφοράς ηλεκτρονίων και η ΑΤΡ συνθάση κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου κατά τη διαδικασία της αναπνοής (Taiz and Zeiger (2015).

Το τελευταίο ανάγει το κυτόχρωμα c και αυτό μεταφέρει ηλεκτρόνια στην οξειδάση του κυτοχρώματος c (Σύμπλοκο IV). Τελικά, η οξειδάση μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο O₂ και σχηματίζεται H₂O. Η ροή ηλεκτρονίων από τα Σύμπλοκα I, III και IV οδηγεί στη μεταφορά πρωτονίων από τη μήτρα προς τον διαμεμβρανικό χώρο, δημιουργώντας μία κινητήρια δύναμη πρωτονίων *pmf* (proton-motive force) από τη διαβάθμιση pH και ένα δυναμικό μεμβράνης, που επάγει στην επιστροφή των πρωτονίων στη μήτρα μέσω της ATP συνθάσης, παράγοντας ATP. Παρουσία μορίων γλυκόζης, αυτά οξειδώνονται σε CO₂ και H₂O, συνεισφέροντας στη σύνθεση 30 μορίων ATP ανά μόριο γλυκόζης. Η αναπνοή είναι ένας τρόπος χρήσης της οργανικής ύλης που παράχθηκε από την ενέργεια της φωτοσύνθεσης (σκοτεινές αντιδράσεις) στους αυτότροφους οργανισμούς. *Φωτοσύνθεση*: CO₂ + H₂O + ηλιακή ενέργεια ---- βιολογικοί καταλύτες--> CO₂ + H₂O

Οπότε, η φωτοσύνθεση και η αναπνοή είναι αντίθετες διαδικασίες και σχηματίζουν ένα κυκλικό, κλειστό λειτουργικό σύστημα. Η φυσική ενέργεια του φωτός μέσω της φωτοσύνθεσης μετατρέπεται σε χημική ενέργεια (ATP) και επενδύεται για την

μετατροπή ανόργανης ύλης σε οργανική και τελικά μέσω της αναπνευστικής διαδικασίας η οργανική ύλη (υδατάνθρακες) μπορούν να διασπαστούν και να απελευθερώσουν ενέργεια (ATP) που μπορεί με τη σειρά της να χρησιμοποιηθεί από το κύτταρο κατάλληλα. Επίσης γίνεται η κατανάλωση του O₂, που παρήχθει από τη φωτοσύνθεση, με αποτέλεσμα τη παραγωγή CO₂ το όποιο μπορεί να τροφοδοτήσει ξανά τις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης (κύκλος του Calvin).

1.4. Φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου (H₂) από χλωροφύκη

Τα χλωροφύκη έχουν τη δυνατότητα να παράγουν αέριο υδρογόνο σε ανοξικές συνθήκες μέσω του φωτοσυνθετικού μηχανισμού τους (Gaffron and Rubin, 1942). Αυτες προκαλούνται από συνθήκες γαμηλού φωτισμού είτε αυξημένων επίπεδων κυτταρικών υδατανθράκων με συνέπεια η αναπνοή να λειτουργεί πιο γρήγορα από τη φωτοσύνθεση, συντηρώντας σε ένα κλειστό σύστημα ανοξικές (ή υποξικές) συνθήκες. Κάτω από αναερόβιες συνθήκες τα χλωροφύκη ενεργοποιούν μια Fe-υδρογενάση (Happe and Naber, 1993), που καταλύει την αντίστροφη αναγωγή των πρωτονίων σε μοριακό υδρογόνο H₂. Στα χλωροφύκη, η υδρογενάση εδράζει στο χλωροπλάστη (Happe et al., 1994) και λαμβάνει ηλεκτρόνια κατευθείαν από την φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και πιο συγκεκριμένα από την ανηγμένη φερρεδοξίνη για τη δημιουργία υδρογόνου. Ένας άλλος δρόμος παραγωγής Η2 από μικροφύκη (κυρίως από χλωροφύκη ενσωματωμένα στον θαλλό ενός λειχήνα) είναι ο μηχανισμός της dark fermentation (φωτοανεξάρτητη ζύμωση), όπου από το μονοπάτι μετατροπής υδατανθράκων σε λιπαρά οξέα, μεταφέρονται ηλεκτρόνια στην φερρεδοξίνη (χωρίς να χρησιμοποιεί την φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων), την ανάγουν και αυτή με τη σειρά της τα μεταφέρει στην υδρογενάση για την παραγωγή μοριακού Η2. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός που συναντάται σπάνια στα χλωροφύκη είναι ο κύριος μηχανισμός παραγωγής υδρογόνου στους λειχήνες (Papazi et. al. 2015).

Η φωτοσυνθετική παραγωγή του υδρογόνου μπορεί να είναι το αποτέλεσμα δύο διαφορετικών μονοπατιών αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Το πρώτο είναι εξαρτώμενο από το PSII και εμπλέκει τη φωτόλυση του νερού ως τη μοναδική πηγή ηλεκτρονίων για το PSI, τη φερρεδοξίνη και τη Fe-υδρογενάση. Το δεύτερο είναι ανεξάρτητο του PSII και χρησιμοποιεί τον καταβολισμό των ενδογενών οργανικών υποστρωμάτων ως αναγωγική πηγή ενέργειας (Melis and Happe, 2001). Ο καταβολισμός οργανικής ύλης (υδατανθράκων) εξασφαλίζει ηλεκτρόνια για τη φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο επίπεδο της πλαστοκινόνης, κυρίως από το μονοπάτι της χλωροαναπνοής (Melis et al., 2000; Hemschemeier et al., 2009).





1.5. Γήινη ατμόσφαιρα και ατμόσφαιρες άλλων πλανητών

Η ατμόσφαιρα της Γης είναι το αέριο σώμα που περιβάλλει τη Γη και συγκρατείται λόγω της βαρύτητάς της, φτάνοντας πρακτικά σε ύψος 3.500 χιλιόμετρα. Το όριο ανάμεσα στην ατμόσφαιρα και το διάστημα δεν είναι αυστηρά καθορισμένο. Καθώς μεγαλώνει η απόσταση της από τη Γη η ατμόσφαιρα σταδιακά εξασθενεί και εξαφανίζεται σιγά σιγά στο διάστημα. Το υψόμετρο των 122 χλμ. ορίζει το σημείο που τα ατμοσφαιρικά φαινόμενα γίνονται αισθητά. Η ατμόσφαιρα προστατεύει τη ζωή στη Γη με το να απορροφά την υπεριώδη ηλιακή ακτινοβολία, να θερμαίνει την επιφάνεια της με την παρακράτηση της θερμότητας (φαινόμενο του θερμοκηπίου) και να μειώνει τις αυξομειώσεις της θερμοκρασίας ανάμεσα στη μέρα και τη νύχτα. Ο ξηρός αέρας αποτελείται κατά 78,08 % από άζωτο (N₂), 20,95% από οξυγόνο (O₂), 0,93% από αργό, 0,0395% από διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) και από ίχνη άλλων αερίων. Η σύσταση της ατμόσφαιρας από την επιφάνεια της θάλασσας και μέχρι τα 80-100 χιλιόμετρα ύψος, παραμένει σχεδόν αμετάβλητη. Αντίθετα η πυκνότητά της ατμόσφαιρας ελαττώνεται πολύ γρήγορα, έτσι ώστε η αναπνοή στη κορυφή του Έβερεστ (8.848 μ.) να είναι πολύ δύσκολη μέχρι αδύνατη, αφού η πυκνότητά της εκεί, φθάνει μόλις τα 1/3 της πυκνότητας που παρατηρείται στην επιφάνεια της θάλασσας.

Ο πλανήτης μας δημιουργήθηκε πριν από περίπου 4,6.109 χρόνια. Η ατμόσφαιρα που κάλυπτε τότε τον πλανήτη μας, περιείγε κυρίως υδρογόνο, μεθάνιο, μονοξείδιο του άνθρακα, αμμωνία, άζωτο, υδρόθειο, υδροκυάνιο και υδρατμούς. Οι πρώτοι οργανισμοί, που αναπτύχθηκαν, ήταν ετερότροφοι και επιζούσαν εκμεταλλευόμενοι τα υπάργοντα οργανικά αποθέματα. Πριν περίπου 3.10⁹ χρόνια κάποια βακτήρια, που ζούσαν μέχρι τότε ετερότροφα και σε αναερόβιες συνθήκες (η ατμόσφαιρα δεν περιείχε οξυγόνο), κατάφεραν να δεσμεύσουν και να εκμεταλλευτούν την ηλιακή ενέργεια ανεξαρτητοποιώντας τον εαυτό τους από τα οργανικά αποθέματα. Οι πρώτοι αυτοί φωτοσυνθετικοί οργανισμοί χρησιμοποίησαν, ως πρωτογενή ηλεκτρονιοδότη το υδρόθειο. Πολύ αργότερα, εμφανίσθηκαν φωτοσυνθετικοί οργανισμοί, που γρησιμοποιούν νερού τα μόρια του ως πρωτογενείς ηλεκτρονιοδότες ,απελευθερώνοντας κατά την φωτοσυνθετική διαδικασία οξυγόνο ως παραπροϊόν. Έτσι, η ατμόσφαιρα εμπλουτίστηκε σε οξυγόνο, γεγονός, που συντέλεσε στη δημιουργία του στρατοσφαιρικού μανδύα όζοντος (O3). Επίσης ο εμπλουτισμός της ατμόσφαιρας σε O2 έδωσε τη δυνατότητα για την εξέλιξη της αναπνοής με τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων το O_2 .

Αν πάρουμε υπόψη τη σύσταση της ατμόσφαιρας ορισμένων πλανητών του ηλιακού μας συστήματος, χωρίς φυσικά να πάρουμε υπόψη την πυκνότητα, θα δούμε ότι είναι τελείως διαφορετική από αυτή της Γής. Ενδεικτικά:

- Τιτάνας: Άζωτο 98,4 %, Μεθάνιο 1,4 %, Υδρογόνο 0,2%
- Κρόνος: Υδρογόνο 96%, Ήλιο 3%, Μεθάνιο 0,4%, Αμμωνία 0,01%, Αιθάνιο 0,0007%
- Ουρανός: Υδρογόνο 83%, Ήλιο 15%, Μεθάνιο 2,3%
- Ποσειδώνας: Υδρογόνο 80%, Ήλιο 19%, Μεθάνιο 1,5%, Αιθάνιο 0,00015%

1.6. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μελετήσουμε: α) Τη δυνατότητα επιβίωσης ενός φωτοσυνθετικού μικροφύκους (Scenedesmus obliquus), που στηρίζεται στην οξυγονική φωτοσύνθεση, σε κλειστά συστήματα με ανοξικές ατμόσφαιρες (ατμόσφαιρες που δεν έχουν στη σύσταση τους οξυγόνο) διαφορετικής σύστασης, αντίστοιχης με αυτές άλλων πλανητών του ηλιακού μας συστήματος, και β) Τον τρόπο διαμόρφωσης της ατμόσφαιρας ενός κλειστού συστήματος προς όφελος του οργανισμού, μέσω της φωτοσυνθετικής διαχείρισης της ηλιακής ακτινοβολίας.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Scenedesmus obliquus

Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήσαμε το μονοκύτταρο χλωροφύκος Scenedesmus obliquus wild type D3 (Gafrron, 1939).

Η φυλογενετική του ταξινόμηση είναι η εξής:

- **Βασίλειο:** Φυτά
- *Φύλλο:* Χλωρόφυτα
- *Κλάση*: Χλωροφύκη
- *Τάξη:* Chlorococcales
- Γένος: Scenedesmus
- *Είδος:* Scenedesmus obliquus





Αποτελεί μονοκύτταρο ευκαρυωτικό οργανισμό ελλειψοειδούς σχήματος με μέγεθος περίπου 5-10 μm. Έχει κύκλο ζωής με διάρκεια γύρω στις 20-24 ώρες. Στη διάρκεια αυτή, διαιρείται μία φορά δίνοντας 4-8 θυγατρικά κύτταρα, τα οποία μόλις σχηματιστούν πλήρως, συνήθως αποκόπτονται μεταξύ τους (δεν σχηματίζουν κοινόβια). Εξελικτικά, βρίσκεται πολύ κοντά στα άλλα δύο, γνωστά στο ερευνητικό πεδίο φύκη- μοντέλα, τη Χλαμυδομονάδα (Chlamydomonas) και τη Χλωρέλλα (Chlorella). Επίσης αποτελεί ένα από τα γνωστά φύκη που χρησιμοποιούνται για τη παράγωγη βιοντιζελ. Είναι αρκετά εύχρηστο στη διαχείριση του με υψηλές αντοχές σε οποιοδήποτε καταπόνηση.

Είναι πολύ γνωστό για τις υψηλές του ικανότητες στη βιοαποικοδόμηση τοξικών ενώσεων όπως οι διχλωροφαινόλες με ταυτόχρονη παράγωγη υδρογόνου. Πρόκειται για φωτοσυνθετικό μικροοργανισμό, που παράγει οξυγόνο κατά τη φωτοσύνθεσή του.



Εικόνα 8: Ανοιχτές καλλιέργειες μικροφύκους Sc. obliquus 250 ml με σταθερή ροή αερα.

Εικόνα 9: Κλειστές αεροστεγείς καλλιέργειες μικροφύκους Sc. obliquus 50 ml.

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

Συστατικά	Περιεκτικότητα (σε g/L)
CaCl2 x $2H_2O$	1,50
KNO3	80,0
MgSO₄x7H₂O	24,6
NaCl	47,0
Na₂HPO₄ x2H₂O	17,8
NaH₂PO₄ x1H₂O	40,5
FeSO₄ x1H₂O	0,06
Fe(III)citrate	0,24
H_3BO_3	2,86
MnCl ₂ x4H ₂ O	1,81
ZnSO₄ x7H₂O	0,222
CuSO₄ x5H₂O	0,079
MoO₃ (85%-99.5%)	0,0177

Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά της φωτοσυνθετικής του δραστηριότητας μοιάζει με τα γυμνόσπερμα φυτά. Ο άγριος τύπος έχει την ικανότητα βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης και στο σκοτάδι, όπως και στο φως. Δηλαδή, ακόμα και σε ετερότροφες συνθήκες έχει

διαμορφωμένους χλωροπλάστες και ενεργά φωτοσυστήματα Ι και ΙΙ.Τα χλωροφύκη αναπτύχτηκαν σε επιμήκεις γυάλινους σωλήνες (5cm X 50 cm), όγκου 250mL, με ειδικό στόμιο στο κάτω μέρος του σωλήνα, που επιτρέπει τον αερισμό της καλλιέργειας, (Εικόνα 8). Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε ενυδρείο σταθερής θερμοκρασίας 30°C, μπροστά από λάμπες λευκού φωτισμού, με ρυθμιζόμενη ένταση (Εικόνα 8). Η καλλιέργεια έγινε σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο (Bishop and Senger, 1971). Η σύσταση του θρεπτικού μέσου παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Η ανάπτυξη του χλωροφύκους είχε διάρκεια σε αυτές τις συνθήκες για 4-5 ημέρες, κι στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ως μητρική καλλιέργεια για τη διεξαγωγή του πειράματος.

2.2. Συνθήκες καλλιέργειας

2.2.1. Πειραματικές διαδικασίες

Οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε κλειστά συστήματα (Εικόνα 9). Πιο συγκεκριμένα σε γυάλινα μπουκαλάκια 125 mL, τα όποια αντέχουν σε υψηλές πιέσεις, με αεροστεγές κλείσιμο με septum. Η καλλιέργεια των μικροφυκών καταλάμβανε όγκο 50ml. Η ένταση της ακτινοβολίας σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες ήταν σταθερή στα 60 μmol.m⁻².s⁻¹ Και η θερμοκρασία σταθερή στους 28°C. Τα θρεπτικά πάντα πριν την τοποθέτηση τους με τα κύτταρα στα μπουκάλια φυγοκεντρούνταν στις 2500 στροφές για πέντε λεπτά για να αφαιρεθούν όλα τα αέρια μέσα από το υγρό. Στη συνεχεία προστίθενται τα διάφορα αέρια με συνεχή ροή για 3-4 λεπτά ώστε να γίνει 100% η επιζητούμενη ατμόσφαιρα, ενώ στη περίπτωση μιγμάτων αερίων, μετά το γέμισμα με το πρώτο αέριο, αφαιρούνταν οι κατάλληλες ποσότητες και συμπληρώνονταν οι ανάλογες ποσότητες από τα αντίστοιχα αέρια που θέλαμε να προσθέσουμε στο μίγμα.

2.2.2. Ατμόσφαιρες διαφορετικής σύστασης

Η πλήρωση με τα κατάλληλα αέρια γινόταν από ειδικές μπουκάλες για τρία λεπτά. Στη περίπτωση των μειγμάτων αφαιρούνταν τα ποσοστά που θέλαμε, μετά την ολική πλήρωση από το κυρίως αέριο, με ένεση από το μπουκάλι και προσθετόταν η αντίστοιχη ποσότητα που αφαιρέθηκε από το άλλο αέριο. Έτσι χρησιμοποιήθηκαν στις διάφορες πειραματικές προσεγγίσεις, μπουκάλια που περιείχαν τις εξής προσομοιωμένες ατμόσφαιρες (όλες σε κανονική πίεση 1 ατμόσφαιρας):

➤ 100% αέρας (21% O₂, 79% N₂, 0,04% CO₂)

- ➤ 100% N₂
- ➢ 90% N₂ + 10% CO₂
- ➤ 100% He
- ➢ 95% H₂ +5% He
- ➢ 85% H₂ +15% He

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

Κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης μόνο ένα μέρος της ενέργειας που απορροφάται από τις χρωστικές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού χρησιμοποιείται για τη φωτοχημεία της. Το υπόλοιπο εκπέμπεται είτε ως θερμότητα είτε ως φθορισμός. Η επαγωγή του φθορισμού από φωτοσυνθετικούς οργανισμούς παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τους Kautsky & Hirsch (1931). Η επαγωγή του φθορισμού από τα φυτά πραγματοποιείται σε δύο φάσεις, εκ των οποίων η πρώτη είναι ταχεία και η δεύτερη αργή. Σήμερα, η μελέτη της καμπύλης του επαγωγικού φθορισμού – ιδιαίτερα της ταχείας χρησιμοποιείται για την μέτρηση της απόδοσης και της λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Η διαδικασία της μέτρησης βασίζεται στο γεγονός ότι σε συνθήκες σκότους τα ενεργά κέντρα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού «αδειάζουν» από ηλεκτρόνια.

Άρα , όταν μετά από το πέρας του κατάλληλου χρόνου, που θα έχουν αδειάσει από ηλεκτρόνια τα κέντρα, βρεθούν σε κορεσμένο φωτονιακό περιβάλλον, τα επίπεδα φθορισμού μεταβαίνουν από ένα αρχικό επίπεδο (Fo) σε ένα μέγιστο επίπεδο (Fm) και έπειτα μειώνονται σταδιακά. Έτσι, μπορεί να εκτιμηθεί ο λόγος Fv/Fm, όπου Fv=Fm-Fo, ο οποίος μας δείχνει την μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή (OJIP test, Strasser and Strasser, 1995) δίνει τη δυνατότητα μέτρησης και άλλων παραμέτρων που συνδέονται με τη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Πίνακας 2). Οι μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού γίνονται με ανάλυση 10 μs σε χρονικό διάστημα 1 δευτερολέπτου. Ο φθορισμού (LEDs) με ένταση ακτινοβολίας μέχρι 3000 μmol m⁻² s⁻¹ ερυθρού φωτός (650nm). Με αυτό τον τρόπο μπορούμε να παρακολουθήσουμε οποιεσδήποτε διαφοροποιήσεις στη φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων. Η μέτρηση του επαγωγικού φθορισμού πραγματοποιήθηκε αφού τα κύτταρα παρέμειναν στο σκοτάδι για 10 λεπτά, προκειμένου να αδειάσουν τα ενεργά κέντρα αντίδρασης.



Εικόνα 10: Τυπική καμπύλη επαγωγικού φθορισμού.



Εικόνα 11: Συσκευή Handy PEA, που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού (OJIP test).

Πίνακας 2: Παράμετροι που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και καταγράφηκαν από το OJIP-test.

Μεταβλητή OJIP καμπύλης	Ορισμός
Ft	Τιμή φθορισμού σε χρόνο t μετά την ακτινοβόληση
F _{50µs}	Ένταση φθορισμού στα 50 μs
F _{300µs}	Ένταση φθορισμού στα 300 μs
F _J =F _{2ms}	Ένταση φθορισμού στο βήμα J (2 ms) της καμπύλης OJIP
FI=F30ms	Ένταση φθορισμού στο βήμα Ι (30 ms) της καμπύλης OJIP
F _P (=F _m)	Μέγιστη ένταση φθορισμού στο Ρ της καμπύλης ΟJIP
t _{Fm}	Χρόνος σε (ms) που απαιτείται για να μεγιστοποιηθεί η ένταση του φθορισμού Fm
Area	Συνολική συμπληρωματική περιοχή ανάμεσα στην καμπύλη ΟJIP και την ευθεία που διέρχεται από το F = Fm
Παράμετροι JIP-test	
Fo	Ελάχιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί σε «ανοιχτά» κέντρα (open PSII RCs, t = 0)
Fm	Μέγιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί στο χρόνο όπου όλα τα κέντρα είναι «κλειστά» (closed PSII RCs, t = tFm)
Fv	Μεταβλητή τιμή φθορισμού τη χρονική στιγμή t
F _v =F _m -F₀	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 =(ΔV/Δt) ₀ = 4(F _{300μ} -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 Ο _{JIP} (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 Ο _{JIΡ} που αντιστοιχεί μόνο στην Ο _J φάση (διάστημα όπου η Q _Α των RC ανάγεται μία φορά)
$N=Sm/S_{s}=S_{m}M_{0}(1/V_{j})$	Μέτρο αριθμού κύκλων αναγωγής της Q _A στο διάστημα tFm

Ειδικές ροές ενέργειας (ανά κέντρο που ανάγει Q _A)		
ABS/RC=M₀(1/V _j)(1/Φp₀)	Μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής Κεραίας	
TR₀/RC=M₀(1/VJ)	Ενέργεια που παγιδεύεται ανά κέντρο αντίδρασης (t = 0)	
ET ₀ /RC=M0(1/V _J)W ₀	Ροή ηλεκτρονίων ανά κέντρο αντίδρασης (t = 0)	
DI₀/RC=(ABS/RC)-(TR₀/RC)	Διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης (t=0)	
Αποδόσεις ή λόγοι επιμέρους ροών		
Φp₀=TR₀/ABS=[1-(F₀/Fm)]	Μέγιστη κβαντική απόδοση της πρωτογενούς φωτοχημείας (t = 0)	
Ψ₀=ET₀/TR₀=1-V」	Πιθανότητα να προκαλέσει μια διέγερση τη μετακίνηση ενός ηλεκτρονίου κατά μήκος της αλυσίδας πέρα από την Q _A - (t = 0)	
ΦE₀=ET₀/ABS=[1-(F₀/Fm)]Ψ₀	Κβαντική απόδοση της μεταφοράς ηλεκτρονίων (t = 0)	
$\Phi D_0=1-\Phi P_0=F_0/F_m$	Κβαντική απόδοση της διάχυσης ηλεκτρονίων (t = 0)	
Εκτιμώμενες ροές ενέργειας ανά διεγερμένη περιοχή		
ABS/CS ₀	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το F₀	
ABS/CS _m	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το F _m	
TR₀/CS₀=FP₀(ABS/CS₀)	Παγιδευμένη ενέργεια ανά διεγειρόμενη περιοχή της μεμβράνης (για t = 0)	
ET ₀ /CS ₀ =(ABS/CS ₀)	Ροή ηλεκτρονίων ανά περιοχή διέγερσης	
DI ₀ /CS ₀ =(ABS/CS ₀)-(TR ₀ /CS ₀)	Διαχεόμενη ενέργεια ανά περιοχή διέγερσης	
Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης		
RC/CS₀	Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης	
Δείκτες επίδοσης		
PI _{ABS} =(RC/ABS)(Φ _{P0/1} -Φ _{P0})(Ψ _{0/1} -Ψ ₀)	Επιδόσεις ανά απορροφώμενη ενέργεια	
PI _{CS0} =(RC/CS ₀)(Φ _{P0/1} -Φ _{P0})(Ψ _{0/1} -Ψ ₀)	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης (t = 0)	
PI _{CSm} =(RC/CSm)(Φ _{P0/1} -Φ _{P0})(Ψ _{0/1} -Ψ ₀)	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης (t = t _{Fm})	
SFI _{ABS} =(1-Φ _{P0})(1-Ψ ₀)	Δείκτης λειτουργικότητας	

I

2.4. Αέρια χρωματογραφία θερμικής αγωγιμότητας (GC-TCD)

Για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του υδρογόνου, του ηλίου, του οξυγόνου και του αζώτου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αέριας χρωματογραφίας θερμικής αγωγιμότητα ή όπως είναι κοινώς γνωστή ως GC-TCD (Gas Chromatography – Thermal Conductivity Detection, Shimadzu GC 2010 Plus – Εικόνα 12) με φέρον αέριο αργό υπό πίεση 5 bar. Πραγματοποιήθηκε εισαγωγή 250 μL αέριου δείγματος στην GC-TCD με ειδική gas tight σύριγγα, όπου και ο διαχωρισμός των αερίων (H₂, O₂ και N₂) έγινε με βάση τη διαφορά στη θερμική αγωγιμότητα των αερίων. Η θερμική αγωγιμότητα του αργού είναι 0.0001772 W/cmK, του αζώτου 0.0002598 W/cmK, του οξυγόνου 0.0002674 W/cmK και του υδρογόνου 0.001815 W/cmK. Για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε μια τριχοειδής στήλη μεγάλου μήκους (Ø 5Å), ενώ η θερμοκρασία του TCD ανιχνευτή ήταν 200οC, του φούρνου 120oC, και του σημείου εισόδου της ένεσης ήταν 180oC (Chader et al., 2009). Η ποσοτικοποίηση των αερίων έγινε με καμπύλες αναφοράς που σχηματίστηκαν με βάση γνωστές συγκεντρώσεις.



Εικόνα 12: Shimadzu GC-TCD 2010 Plus εν ώρα λειτουργίας με τη χρωματογράφια να παράγεται στην οθόνη του υπολογιστή.

Η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των τριών αερίων που έγινε με βάση τις καμπύλες αναφοράς δίνεται από τις παρακάτω εξισώσεις:

$$\begin{split} H_2(\%) &= 0.000001373^* εμβαδόν 1^{η_{\varsigma}} κορυφής, R^2 = 0.975 \\ O_2(\%) &= y = 0.0000009649^* εμβαδόν 2^{η_{\varsigma}} κορυφής, R^2 = 0.998 \\ N_2(\%) &= y = 0.0000012047 * εμβαδόν 3^{η_{\varsigma}} κορυφής, R^2 = 0.998 \end{split}$$

2.5. Μέτρηση pH

Για τις μετρήσεις pH τα δείγματα συλλεγόταν από τα κλειστά μπουκάλια που είναι σφραγισμένα με septa με gas tight αποστειρωμένη βελόνα κάτω από στείρες συνθήκες. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με το pH- μετρο Mettler Seven Compact S220 (Εικόνα 13), χρησιμοποιώντας το ηλεκτρόδιο lab versatile pro της Mettler Toledo



Εικόνα 13: pH meter Mettler Seven Compact S220.

2.6. Μέτρηση κυτταρικού όγκου

Δείγματα των 500 μL από τις καλλιέργειες του μικροφύκους φυγοκεντρήθηκαν σε βαθμονομημένο τριχοειδή υαλοσωλήνα (Εικόνα 14) για 5 λεπτά στα 1500 g, προκειμένου να καθιζήσουν (Logothetis et al., 2004). Η εκτίμηση της κυτταρικής συγκέντρωσης, παρουσιάζεται ως όγκος καθιζάμενων κυττάρων (Packed Cell Volume; PCV) ανά mL καλλιέργειας. (μL PCV/mL καλλιέργειας).



Εικόνα 14: Διαβαθμισμένος σωλήνας PCV.

3.Αποτελέσματα

3.1. Καταγραφή της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε ατμόσφαιρα ηλίου (He) και αζώτου (N₂)

Στα πλαίσια των στόγων που θέτει η παρούσα εργασία εξετάσαμε την φωτοσυνθετική λειτουργικότητα και κατ' επέκταση την επιβίωση του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus σε κλειστά συστήματα με ανοξικές ατμόσφαιρες: ατμόσφαιρα αζώτου (100% N2) και ατμόσφαιρα ηλίου (100% He). Ως ατμόσφαιρα μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αέρας. Για να δοθούν σαφείς απαντήσεις πραγματοποιήθηκε η παρακάτω πειραματική διαδικασία σε κλειστές καλλιέργειες των 50 mL (σε μπουκάλια των 125 mL) με συγκέντρωση κυττάρων 3 μL PCV ανά mL καλλιέργειας. Όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 28°C και σε συνεγή σταθερή φωτονιακή ένταση 60μmol.m⁻².s⁻¹. Η πλήρωση των αέριων πραγματοποιήθηκε με συνεχόμενη παρογή (>3min) μέσω 2 αποστειρωμένων βελονών (μία για την είσοδο και μία για την έξοδο των αερίων) στο σφραγισμένο με septum μπουκάλι από μπουκάλες υπερκαθαρών αέριων αζώτου και ηλίου. Τα μπουκάλια τοποθετηθήκαν σε ειδικούς διάδρομους με σταθερή ροή νερού που κρατούσε τη θερμοκρασία σταθερή και είχε λάμπες LED ρυθμιζόμενης έντασης από τρεις πλευρές (κάτω, αριστερά και δεξιά) οι οποίες διατηρούσαν σταθερό το φωτισμό και χρησιμοποιήθηκαν πέντε επαναλήψεις για κάθε χειρισμό. Ως πειραματικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν πέντε επαναλήψεις κλειστών μπουκαλιών με ατμόσφαιρα γήινου ατμοσφαιρικού αέρα για σύγκριση των αποτελεσμάτων με τις διαφορετικές ατμόσφαιρες. Το πείραμα διήρκησε 14 ημέρες (336 ώρες). Σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες παρακολουθήθηκαν μία σειρά παράμετροι στην πορεία του χρόνου. Στη διάρκεια αυτή οι μετρήσεις που γίνονταν καθημερινά αφορούσαν ανάλυση της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηγανισμού με τεχνικές επαγωγικού φθορισμού. Οι μετρήσεις αυτές περιλαμβάνουν την καταγραφή της φωτοσυνθετικής απόδοσης εκφρασμένη ως Fv/Fm, αλλά και σειρά άλλων παραμέτρων που αφορούν τη συγκέντρωση των ενεργών φωτοσυνθετικών κέντρων (RC/CS), το μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας ανα ενεργό κέντρο (ABS/RC), τη φωτοχημική (PSIo) και τη μη-φωτοχημική απόσβεση (DIo/RC) της απορροφηθείσας ενέργειας και μία σειρά άλλων παραγόντων που εκφράζουν το βαθμό καταπόνησης ή ανοχής του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και κατά επέκταση του οργανισμού. Παράλληλα καταγράφηκε η διαφοροποίηση του pH της καλλιέργειας, αλλά της βιομάζας της καλλιέργειας εκφρασμένη ως κυτταρικός όγκος (packed cell volume, PCV) ανά mL καλλιέργειας. Τέλος για την διαφοροποίηση της αλλαγής της σύστασης των αερίων έγιναν δειγματοληψίες εσωτερικής ατμόσφαιρας των κλειστών

μπουκαλιών οι οποίες αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία – θερμικής αγωγιμότητας (GC-TCD).



Εικόνα 15: Κινητικές διαφοροποίησης της φωτοσυνθετικής απόδοσης του χλωροφύκους σε ατμόσφαιαρα αέρα, N_2 και He .

Από το διάγραμμα της φωτοσυνθετικής απόδοσης (Fv/Fm) παρατηρούμε ότι η καλλιέργεια μάρτυρας που αναπτύσσεται σε ατμόσφαιρα αέρα διατηρεί τη φωτοσυνθετική του απόδοση από την αρχή μέχρι το πέρας του πειράματος σε σχετικά σταθερά επίπεδα (Fv/Fm =0,7-0,65) (Εικόνα 15). Η μικρή πτώση με το πέρασμα του χρόνου σε όλους τους χειρισμούς οφείλεται κυρίως στο ότι εξαντλούνται τα ανόργανα θρεπτικά της καλλιέργειας. Η αντίστοιχη καμπύλη του χειρισμού σε ατμόσφαιρα αξώτου μας δείχνει μια μικρή πτώση στη διάρκεια της πρώτης ημέρας επώασης, όμως στη συνεχεία επανέρχεται στα κανονικά επίπεδα φωτοσυνθετικής απόδοσης ακολουθώντας την καμπύλη του αέρα. Η μικρή αυτή πτώση οφείλεται πιθανόν στην παροδική προσαρμογή των χλωροφυκών στην απόλυτη ατμόσφαιρα αζώτου η όποια έχει 22% παραπάνω άζωτο από ότι η κανοική και φυσικά καθόλου οξυγόνο αλλά ούτε και CO₂. Παρά την καταπόνηση το μικροφύκος κατάφερε να προσαρμοστεί να

επιβιώσει και να φωτοσυνθέσει όπως και στον αέρα. Την ίδια πορεία ακριβώς με το άζωτο διακρίνουμε και με τη καμπύλη του ηλίου η όποια ξανά την πρώτη ημέρα έχει μια πτώση η όποια εξομαλύνεται με τον χρόνο επιστρέφοντας σε κανονικά πλαίσια της φωτοσυνθετικής απόδοσης (Εικόνα 15).

Στα παρακάτω διαγράμματα (Εικόνα 16) βλέπουμε μια αναλυτική εικόνα των μεταβλητών που μας δείχνουν την ακεραιότητα της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Στο πρώτο διάγραμμα διακρίνουμε την σύγκριση των τριών χειρισμών (αέρας, άζωτο, ήλιο) για το πρώτο εικοσιτετράωρο όπου παρατηρήσαμε σαφείς διαφορές στην φωτοσυνθετική απόδοση μεταξύ των χειρισμών. Στο δεύτερο διάγραμμα γίνεται η σύγκριση μεταξύ των χειρισμών με την ολοκλήρωση του πειράματος (στις 336 ώρες).

Από τη σύγκριση ορισμένων μεταβλητών ανάμεσα στις δυο ημερομηνίες λαμβάνουμε μια εμφανή εικόνα για το τι συνέβη στην διάρκεια της επώασης του χλωροφύκους στις ακραίες ατμοσφαιρικές συνθήκες. Αρχικά στις πρώτες 24 ώρες η έντονη αύξηση της παραμέτρου ABS/RC (Μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας) και στους τους δύο χειρισμούς αζώτου και ηλίου, σε συνδυασμό με την μείωση των τιμών της παραμέτρου RC/CS (Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης) υποδηλώνει αυξημένη καταπόνηση σε σχέση πάντα με τον χειρισμό μάρτυρα (μικροφύκη σε ατμόσφαιρα αέρα). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της μη φωτοχημικής απόσβεσης (DIo/CS) και κατά συνέπεια την μείωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης (Fv/Fm).

Αυτή την συμπεριφορά τη συναντούμε σε οποιαδήποτε μορφή αβιοτικής καταπόνησης: αυξημένη UVB-ακτινοβολία (Sfichi et al. 2004), αυξημένο ατμοσφαιρικό όζον (Navakoudis et al. 2003), χαμηλή θερμοκρασία (Sfakianaki et al. 2006), αυξημένη αλατότητα (Demetriou et al. 2007) κ.α. Με το πέρας των ημερών όμως και μάλιστα σχεδόν την επομένη μέρα βλέπουμε να εξομαλύνονται όλες οι μεταβλητές που εξετάσαμε προηγουμένως και μας δείχνουν τη μοριακή δομή και λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε όλους τους χειρισμούς να είναι παρόμοια (Εικόνα 16). Από το ραβδόγραμμα των 336 ωρών βλέπουμε ότι όλες οι παράμετροι που εξετάσαμε προηγουμένως: ABS/RC (Μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής Κεραίας), RC/CSo (Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης), DIo/CSo (μη φωτογημική απόσβεση), εξομαλύνονται και εξισώνονται σε σχέση με αυτή του αέρα αποδίδοντας αντίστοιχα ένα Fv/Fm (μεγίστη φωτοσυνθετική απόδοση) ίδιο σχεδόν με αυτό του αέρα (χειρισμός μάρτυρα). Αυτές οι εξομαλύνσεις στο ραβδόγραμμα μας δείχνουν τη τελική προσαρμογή του μικροφύκους στις απόλυτες (κατά την έναρξη των χειρισμών) ατμόσφαιρες του αζώτου και του ηλίου.Τα παραπάνω αποτελέσματα έδειξαν ότι παρά την έλλειψη Ο2 και CO2, έχουμε (στις συγκεκριμένες συνθήκες φωτισμού) απρόσκοπτη φωτοσυνθετική δραστηριότητα, οπότε θα θέλαμε να δούμε αν θα μπορούσε η ενέργεια που θα κερδηθεί από τη φωτοσύνθεση μπορεί να επενδυθεί στην ανάπτυξη (αύξηση βιομάζας) τη στιγμή που δεν υπάργει καθόλου ανόργανος άνθρακας (CO2).



Εικόνα 16: Σύγκριση της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του χλωροφύκους μετά από επώαση 24 και 366 ωρών.



Εικόνα 17 : Διαφοροποίηση της βιομάζας, εκφρασμένη σε μL PCV/mL στα πλαίσια των τριών χειρισμών (air, N₂, He) στη διάρκεια του χρόνου.

Από τα αποτελέσματα της Εικόνας 17 μπορούμε να διακρίνουμε ότι όλοι οι χειρισμοί ξεκίνησαν με την ίδια κυτταρική συγκέντρωση (3µLPCV/ml). Παρόλο όμως το κοινό ξεκίνημα δεν είχαν οι χειρισμοί κοινή κατάληξη μετά από επώαση 14 ημερών. Η καμπύλη της καλλιέργειας μάρτυρα (ατμόσφαιρα αέρα) κατέληξε σε ένα PCV με μέσο ορό το 6,6 μL PCV/mL. Ο χειρισμός σε ατμόσφαιρα αέρα δεν είχε κάποιον περιορισμό στην ανάπτυξη του (εκτός από τον περιορισμένο φωτισμό), όποτε η βιομάζα του μικροφύκους αναπτύχτηκε κανονικά εκμεταλλευόμενο τα θρεπτικά στο μέγιστο. Στη περίπτωση της ατμόσφαιρας ηλίου, το PCV αυξήθηκε στα 5 μL PCV/mL και το αντίστοιχο στην καλλιέργεια με ατμόσφαιρα αζώτου αυξήθηκε στα 5,4 μL PCV/mL. Η περιορισμένη αύξηση της ανάπτυξης στους δύο χειρισμούς συμβαίνει προφανώς για δύο λόγους: α) λόγω της παντελούς έλλειψης CO2 από τις ατμόσφαιρες αζώτου και ηλίου και ως εκ τούτου πρέπει να καταβολήσουν δική τους οργανική ύλη (από τα δικά τους περιορισμένα ενεργειακά αποθέματα – π.χ. άμυλο) μέσω της αναπνευστικής διαδικασίας για να παράγουν CO2 και στη συνέχεια να το χρησιμοποιήσουν στη φωτοσυνθετική διαδικασία, και β) Τα φύκη υπέστησαν καταπόνηση κατά την έκθεση τους στις ακραίες ατμόσφαιρες, όποτε μέρος του ενεργειακού τους αποθέματος το χρησιμοποίησαν για να ανταπεξέλθουν από αυτή την καταπόνηση. Άρα τα μικροφύκη επένδυσαν πρωτίστως στην επιβίωση και λιγότερο στην αύξηση της βιομάζας. Επόμενη μέτρηση για αυτό το πείραμα αποτελεί η μέτρηση της παραμέτρου του pH του θρεπτικού στους τρεις χειρισμούς, το όποιο φαίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Διαφοροποίηση του pH της καλλιέργειας των τριών χειρισμών (Air, N₂, He) στη διάρκεια του χρόνου.

Τα αποτελέσματα της Εικόνας 18 δείχνουν ότι το pH ξεκίνησε από το 7,25 για όλους τους χειρισμούς και σε όλες τις επαναλήψεις. Ο χειρισμός με την ατμόσφαιρα αέρα ακολουθώντας μια σταθερή αυξητική πορεία κατέληξε σε ένα ελαφρώς βασικό pH 7,45. Στο χειρισμό του αζώτου και του ηλίου το pH αυξήθηκε στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας περισσότερο από το αντίστοιχο του αέρα, αποτέλεσμα που πιθανόν να οφείλεται στην έλλειψη CO2 από την ατμόσφαιρα των δύο αυτών γειρισμών, που είναι γνωστό ότι το CO₂ μειώνει το pH του θρεπτικού, αλλά και από την έλλειψη οξυγόνου που περιορίζει την αναπνευστική διαδικασία άρα και την απελευθέρωση CO2. Με αυτά τα δεδομένα η φωτοσυνθετική διαδικασία και των τριών χειρισμών απορροφά Η+ (ως αναγωγική διαδικασία) από το θρεπτικό αυξάνοντας το pH του, όμως η λόγω έλλειψης του CO₂ και του O₂ στους δύο χειρισμούς (N₂- και He-χειρισμούός) αυτή η αύξηση είναι ελαφρώς μεγαλύτερη. Αν συγκρίνουμε τα αποτελέσματα αυτά με τα αποτελέσματα της διαφοροποίησης της βιομάζας (Εικόνα 17) βλέπουμε μία αντίστροφη εικόνα, όπου ο χειρισμός με την ατμόσφαιρα αέρα να παρουσιάζει μεγαλύτερη αύξηση από ότι οι άλλοι δύο χειρισμοί. Αυτό φαίνεται να συμβαίνει γιατί το υπάρχον CO2 (σε συνδυασμό με το O2,), χρησιμοποιείται από τον κύκλο του Calvin-Benson αποκλειστικά για την

μετατροπή του σε οργανική ύλη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη του. Σε αντίθεση με στους άλλους δύο χειρισμούς ή έλλειψη CO₂ θα αντιμετωπιστεί με τον καταβολισμό οργανικής ύλης (από τα υπάρχοντα κυτταρικά αποθέματα) μέσω της αναπνευστικής διαδικασίας (σε πρώτη φάση χρησιμοποιώντας πιθανόν NOx αντί O2 -Gupta and Igamberdiev, 2011; Igamberdiev and Hill 2009) yia va $\pi\alpha\rho\alpha\gamma\theta\epsilon$ i CO₂ yia ναπου θα υποστηρίξει την φωτοσυνθετική διαδικασία η οποία θα παράγει Ο2, μέρος του οποίου στη συνέγεια θα γρησιμοποιηθεί για την αναπνευστική διαδικασία. Αυτή η ανατροφοδότηση αναπνοής – φωτοσύνθεσης, επιτρέπει την επιβίωση, αλλά περιορίζει σε ένα αυτότροφο περιβάλλον την περίσσεια CO2 που θα μπορούσε να επενδυθεί για την παραγωγή οργανικής ύλης και ως εκ τούτου και βιομάζας . Για να κατανοήσουμε καλύτερα την στρατηγική που ακολουθούν τα μικροφύκη για να ανταπεξέλθουν σε τέτοιες ακραίες ατμόσφαιρες μετρήσαμε τη διαφοροποίηση της σύστασης της ατμόσφαιρας στη διάρκεια της επώασης. Στην Εικόνα 19 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αέριας χρωματογραφίας θερμικής αγωγιμότητας (τα προφίλ της ατμοσφαιρικής σύστασης τους) που ελήφθησαν από τα σφραγισμένα δοχεία στο πέρας των πειραματικών χειρισμών σε σχέση με την σύσταση των επιμέρους ατμοσφαιρών κατά την έναρξη του πειράματος.

Από την ανάλυση προέκυψαν τα εξής: Αρχικά βλέπουμε την περιεκτικότητα των αέριων στην απλή γήινη ατμόσφαιρα όπου διακρίνουμε τα ποσοστά της πραγματικής ατμόσφαιρας και τη διαφοροποίηση αυτής της ατμόσφαιρας μετά από την επώαση των 14 ημερών στις συγκεκριμένες συνθήκες φωτισμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν μικρή διαφοροποίηση στην ποσότητα του οξυγόνου .Στην ατμόσφαιρα των μπουκαλιών που είχαν πληρωθεί με 100% άζωτο ή 100% ήλιο παρατηρούμε μια σχετικά μικρή κορυφή στην περιοχή του οξυγόνου πράγμα που σημαίνει ότι κατά τη διάρκεια του πειράματος τα φύκη μας παρήγαγαν οξυγόνο που αντιστοιχεί σε 4,99 % και 5,41% της ατμόσφαιρας για την ατμόσφαιρα αζώτου και ηλίου αντίστοιχα από 0,62% και 0,24 % που ήταν στην αρχή . (Εικόνα 19).Το υψηλότερο μέγιστο του οξυγόνου από σε σχέση με το άζωτο στον χειρισμό του Ηε επιβεβαιώνει ότι το οξυγόνο παρήχθη μέσα στο κλειστό σύστημα και δεν ήταν αποτέλεσμα λάθους χειρισμού.



Εικόνα 19: Διαφοροποίηση της σύστασης της ατμόσφαιρας μεταξύ των τριών χειρισμών (Air, N₂, He) εκφρασμένη με τα GC-προφίλ την χρονική στιγμή θώρες (αριστερά) και 336 ώρες (δεξιά).

3.2.Καταγραφή της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε ατμόσφαιρες αντίστοιχες άλλων πλανητών

Παίρνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της παραπάνω πειραματικής προσέγγισης προσπαθήσαμε να προσομοιώσουμε (τουλάχιστον όσον αφορά τη σύσταση των κυρίων αερίων) τις όποιες ατμόσφαιρες σε πλανήτες του ηλιακού μας συστήματος.

Πιο συγκεκριμένα γνωρίζουμε ότι:

- H atmóspaira tou 'Ary apoteleítai apó CO2 : 95,32%, N2 : 2,70% , Ar: 1,60%, O2 : 0,13% , CO : 0,08% .
- H atmósquipa tou Króvou apoteleítai apó $H_2:96\%,\;\;He:3\%\;,\;CH_4:0,4\%\;,NH_3:0,01\%\;,\;C_2H_6:0,0007\%$
- Η ατμόσφαιρα του Ουρανού αποτελείται από H₂: 83% ± 3%, ,He: 15 ± 3 %, CH₄: 2,3%.

Δημιουργήσαμε τέσσερις ομάδες χειρισμών οι οποίες χαρακτηρίζονται από τις εξής ατμόσφαιρες:

- Ατμοσφαιρικός αέρας (προσέγγιση της ατμόσφαιρας της Γης)
- 100% CO₂ (προσέγγιση της ατμόσφαιρας του Άρη)
- 85% H₂ +15% He (προσέγγιση της ατμόσφαιρας του Ουρανού)
- > 95% H₂ +5% He (προσέγγιση της ατμόσφαιρας του Κρόνου)

Επηρεασμένοι λοιπόν από αυτά τα δεδομένα εξετάσαμε την φωτοσυνθετική λειτουργικότητα και κατ επέκταση την επιβίωση του χλωροφύκους μας σε αυτές τις ατμόσφαιρες. Σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες παρακολουθήθηκαν μία σειρά παράμετροι, αντίστοιχοι της προηγούμενης πειραματικής προσέγγισης στην πορεία του χρόνου.

Στη συνεχεία παρατίθεται το διάγραμμα της φωτοσυνθετικής απόδοσης /Fm στην πορεία του χρόνου επώασης (Εικόνα 20).

Από το διάγραμμα της φωτοσυνθετικής απόδοσης (Fv/Fm) διακρίνουμε ότι ο χειρισμός του αέρα που εφαρμόστηκε για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με τη γήινη ατμόσφαιρα κυμαίνεται από την αρχή μέχρι το πέρας του πειράματος σε υψηλά επίπεδα Fv/Fm=0,77-0,69. Άρα τα φύκη διαβιούν κανονικά χωρίς κάποιο περιορισμό/καταπόνηση στις συγκεκριμμένες συνθήκες φωτισμού. Στο δεύτερο χειρισμό 95% Υδρογόνο +5% Ήλιο (H₂+5% He - προσομοίωση της ατμόσφαιρας του

Κρόνου) παρατηρούμε ότι υπάρχει μια αισθητή πτώση στη φωτοσυνθετική απόδοση τις πρώτες δύο ημέρες.





Παρόλα αυτά μετά από μερικές μέρες και ως στο τέλος του πειράματος ανέβηκε και σταθεροποιήθηκε το Fv/Fm στο 0,7 . Άρα από ότι βλέπουμε τα φύκη ήταν αποδοτικά και βιώσιμα έως το πέρας του πειράματος. Κάτι ανάλογο συνέβη και στο δεύτερο χειρισμό του 85% Υδρογόνο +15% Ήλιο (Η H2+5%He προσε H2+15%He ; ατμόε CO2 του Ουρανού), όπου υπήρχε μια μεγάλη πτώση από την αρχή έως τις 72 ώρες και ύστερα από αυτό το σημείο προσαρμόστηκε πλήρως καταλήγοντας σε μια σταθερά υψηλή φωτοσυνθετική απόδοση μέχρι το τέλος του πειράματος. Στο τέταρτο χειρισμό του 100% CO₂ έχουμε μία καθαρά πτωτική πορεία, όπως αναμέναμε λόγω της μεγάλης οξύτητας που δημιούργησε η απόλυτη ατμόσφαιρα CO₂ στην καλλιέργεια του μικροφύκους. Η πτώση της φωτοσυνθετικής απόδοσης ήταν σχεδόν άμεση από το πρώτο εικοσιτετράωρο και έφτασε ουσιαστικά σε μηδενικές τιμές από την δεύτερη ημέρα επώασης.

Η επιβεβαίωση των παραπάνω δεδομένων πραγματοποιήθηκε με την καταγραφή των καμπυλών επαγωγικού φθορισμού για τους 4 χειρισμούς στις 24 και στις 336 ώρες (Εικόνα 21).







Αντίστοιχα με το προηγούμενο διάγραμμα της φωτοσυνθετικής απόδοσης παρατηρούμε μέσα από τις πρωτογενείς καμπύλες του επαγωγικού φθορισμού ακριβώς την ίδια κατάσταση για τους τέσσερις χειρισμούς. Όπως διακρίνουμε στην Εικόνα 21, η καμπύλη του μάρτυρα (ατμόσφαιρα αέρα) το πρώτο εικοσιτετράωρο ακολουθεί μια φυσιολογική πορεία, ενώ οι υπόλοιποι τρεις χειρισμοί διαφορετικής ατμόσφαιρας παρουσιάζουν χαρακτηριστικές καμπύλες καταπόνησης λόγω του στρες που διέρχονται. Παρόλαυτα μέχρι τις 336 ώρες τα φύκη από όλους τους χειρισμούς (εκτός του χειρισμού με CO2) των μιγμάτων έχουν επανέλθει σε φυσιολογικά επίπεδα επιβιώνοντας στις συγκεκριμένες ατμόσφαιρες συμφωνώντας με τα αποτελέσματα της φωτοσυνθετικής απόδοσης (Εικόνα 20). Σε αντίθεση με όλους τους άλλους χειρισμούς, Ο χειρισμός σε απόλυτη ατμόσφαιρα CO2 δεν επανήλθε ξανά από το στρες, οπότε η καμπύλη του επαγωγικού φθορισμού είναι ουσιαστικά ανύπαρκτη. Για καλύτερη κατανόηση της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των επιμέρους γειρισμών προσομοίωσης ατμοσφαιρών άλλων πλανητών καταγράψαμε με την τεχνική του επαγωγικού φθορισμού σειρά παραμέτρων της μοριακής δομής και λειτουργικότητας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού για το πρώτο εικοσιτετράωρο και για τις 336 ώρες επώασης.

Αντίστοιχα με το προηγούμενο πείραμα εξετάσαμε αναλυτικά τις μεταβλητές τις οποίες λαμβάνουμε από το OJIP test. Αυτές οι μεταβλητές μας δείχνουν την κατάσταση και λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στους τέσσερις χειρισμούς του πειράματος μας. Στο παραπάνω ραβδόγραμμα (Εικόνα 22) διακρίνουμε σε σειρά σύγκρισης τους τέσσερις χειρισμούς μας στις 24 και στις 336 ώρες. Αρχικά εξετάζοντας στις πρώτες 24 ώρες τη μεταβλητή ABS/RC (Μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής Κεραίας) διακρίνουμε ότι τα φύκη μας έχουν υποστεί έντονο στρες σε όλους τους χειρισμούς εκτός του αέρα αφού οι διαφορετικές ατμόσφαιρες είναι ένα αφιλόξενο περιβάλλον για αυτά. Στον αέρα διατηρείται η ακεραιότητα της διαβίωσης των μικροφυκών. Στις 336 ώρες το μέγεθος της κεραίας παρατηρούμε ότι μειώθηκε και εξισώθηκε με αυτό του ατμοσφαιρικού αέρα στη περίπτωση των μειγμάτων αέριων αλλά όχι στην ατμόσφαιρα CO2. Στη περίπτωση του CO2 κατέρρευσε ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός και ως εκ τούτου δεν μπορεί να γίνει ανάλυση της μοριακής δομής και λειτουργίας του. Όσον αναφορά την παράμετρο RC/CSm (Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης) στις 24 ώρες οι τιμές σε όλους τους χειρισμούς είναι πολύ χαμηλές σε σύγκριση με τις αντίστοιχες του αέρα. Αυτό μας δείχνει μικρό ποσοστό ενεργών κέντρων, στοιχείο που αποδεικνύει την έντονη καταπόνηση. Στις 336 ώρες τα μείγματα αέριων υδρογόνου και ηλίου καταφέρνουν να επανέλθουν στα ίδια επίπεδα με τον αέρα. Όμως κάτι ανάλογο δε συμβαίνει στο διοξείδιο του άνθρακα για τους λόγους που αναφέραμε παραπάνω. Επίσης φαίνεται από τον παράγοντα DIo/RC (μη φωτοχημική απόσβεση) στο ραβδόγραμμα για άλλη μια φορά να έχουμε υψηλά επίπεδα καταπόνησης στις 24 ώρες αφού τα μείγματα αερίων και το 100 % διοξείδιο του άνθρακα έχουν μεγάλη μη φωτοχημική απόσβεση



Εικόνα 22: Σύγκριση σειράς παραμέτρων που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού μεταξύ των τεσσάρων χειρισμών (Air, H₂+5% He, H₂+15% He, CO₂)για τις 24 και τις 336 ώρες επώασης.

σε σχέση με τον ατμοσφαιρικό αέρα, κάτι που δικαιολογεί την χαμηλή φωτοσυνθετική απόδοση (Fv/Fm). Στις 336 ώρες τα μείγματα αερίων υδρογόνου και ηλίου, για άλλη μια φορά επανέρχονται στα φυσιολογικά επίπεδα του αέρα.

Επόμενη μέτρηση που ακολουθεί για αυτό το πείραμα αποτελεί η μέτρηση της παραμέτρου του pH το όποιο φαίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα.



Εικόνα 23:, Εικόνα 23: Διαφοροποίηση του pH της καλλιέργειας των τεσσάρων (Air, H₂+5%He, H₂+15%He, CO₂) στη διάρκεια του χρόνου.

Το pH όπως παρατηρούμε έχει ξεκινήσει από το 6,71 και στους τέσσερις χειρισμούς. Όπως φαίνεται το pH ακολούθησε κοινή ανοδική πορεία και για τους τρεις χειρισμούς του αέρα και των δυο μιγμάτων υδρογόνου και ηλίου έχοντας περίπου την ίδια κατάληξη στο τέλος του πειράματος. Η διαφοροποίηση που εντοπίζεται ανάμεσα στα αέρια μίγματα και στον αέρα (ελαφρώς υψηλότερο pH στα αέρια μείγματα), πιθανόν να οφείλεται στην έλλειψη CO₂ από την ατμόσφαιρα των δύο αυτών χειρισμών αφού όπως είναι γνωστό το CO₂ μειώνει το pH του θρεπτικού, καθώς και η έλλειψη οζυγόνου περιορίζει την αναπνευστική διαδικασία άρα και την απελευθέρωση CO₂. Η 100% ατμόσφαιρα διοξειδίου του άνθρακα έχει ως συνέπεια την μείωση του pH όπως αναμέναμε. Στη συνεχεία ακολουθούν τα αποτελέσματα της αέριας χρωματογραφίας θερμικής αγωγιμότητας που ελήφθησαν από τα σφραγισμένα δοχεία στις 0 και στις 336 ώρες των πειραματικών χειρισμών (Εικόνα 24).

Από τη δειγματοληψία προέκυψαν τα εξής: Από τη δειγματοληψία των αέριων προέκυψε η σύσταση που είχε η ατμόσφαιρα του κάθε μπουκαλιού σε αέρια. Αρχικά παρατηρούμε την περιεκτικότητα των αέριων στην απλή γήινη ατμόσφαιρα όπου διακρίνουμε ότι η σύσταση της ατμόσφαιρας στη διάρκεια όλου του πειράματος διαφοροποιήθηκε ελάχιστα. Η ατμόσφαιρα του χειρισμού με 95% υδρογόνου και 5% ήλιο μετά από 336 ώρες φαίνεται να διαφοροποιείται όσον αφορά την εμφάνιση του Ο2 που έχει ανέβει αισθητά. Παρόμοια κατάσταση παρατηρείται και στη περίπτωση του δευτέρου μίγματος αερίων με 85% υδρογόνο και 15% ήλιο όπου και σε αυτό, μετά από 336 ώρες έχουμε ξανά σχετικά μεγάλη αύξηση οξυγόνου. Τέλος εξαιτίας της μη ευαισθησίας της αέριας χρωματογραφίας θερμικής αγωγιμότητας στο CO₂ αυτό που διακρίνουμε είναι μια επίπεδη καμπύλη πράγμα που μας επιβεβαιώνει την πλήρη απουσία O₂ και N₂.

Όπως συζητήθηκε παραπάνω, στην περίπτωση του ηλίου και του αζώτου, αυτή η ανατροφοδότηση αναπνοής – φωτοσύνθεσης, επιτρέπει την επιβίωση καθώς όπως φάνηκε και μέσα από την εξέταση των καμπύλων της αέριας χρωματογραφίας θερμικής αγωγιμότητας το οξυγόνο από τις 0 – 336 ώρες είχε αισθητή αύξηση. Άρα η αύξηση εμφάνιση του O_2 στην ατμόσφαιρα είναι προφανώς το αποτέλεσμα της φωτοσύνθετικής παραγωγής O_2 αν αφαιρέσουμε την κατανάλωση του O_2 στην αναπνευστική διαδικασία που είναι απαραίτητη για την παραγωγή CO_2 που με τη σειρά της θα χρησιμοποιηθεί στον κύκλο του Calvin/Benson. Αυτή η ανατροφοδότηση Φωτοσύνθεσης - Αναπνοής τροποποιεί τη σύσταση της ατμόσφαιρας αυξάνοντας το O_2 μέχρι ένα επίπεδο που του επιτρέπει το φωτονειακό περιβάλλον και τα κυτταρικά αποθέματα οργανικής ύλης. Η αποτυχία της επιβίωσης της καλλιέργειας σε απόλυτη ατμόσφαιρα CO₂ οφείλεται κυρίως στην άμεση μείωση του pH.



Εικόνα 24: Διαφοροποίηση της σύστασης της ατμόσφαιρας μεταξύ των τεσσάρων χειρισμών (Air, $H_2+5\%$ He, $H_2+15\%$ He, CO_2)εκφρασμένη με τα GC-προφίλ την χρονική στιγμή θώρες (αριστερά) και 336 ώρες (δεξιά).

3.3. Μπορεί ένας φωτοσυνθετικός οργανισμός σε ανοξική ατμόσφαιρα να δημιουργήσει οξυγονική ατμόσφαιρα;

Είναι ευρέως γνωστό το πόσο αναγκαίο για τα φυτά είναι το διοξείδιο του άνθρακα λόγω του σημαντικού ρολού του στη φωτοσύνθεση. Με αφορμή λοιπόν αυτήν τη σχέση θελήσαμε να δοκιμάσουμε σε αποκλειστική ανοξική ατμόσφαιρα αζώτου τι θα γινόταν (όσον αφορά τη διαφοροποίηση της σύστασης της ατμόσφαιρας) αν προσθέταμε κάποια ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα ή οργανικής ύλης, δίνοντας τη δυνατότητα στο μικροφύκος να ξεπεράσει τον περιορισμό της έλλειψης CO2. Επίσης επηρεασμένοι από τα αποτελέσματα της αέριας γρωματογραφίας των δυο προηγούμενων ενοτήτων, όπου παρατηρήσαμε αύξηση του ποσοστού του οξυγόνου κατά τη διάρκεια του πειράματος θελήσαμε να μελετήσουμε τη κινητική διαφοροποίησης του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα πιο αναλυτικά. Έτσι για να δώσουμε σαφείς απαντήσεις πραγματοποιήσαμε το παρακάτω πείραμα σε κλειστές καλλιέργειες (μπουκάλια) των 50 mL με συγκέντρωση κυττάρων 3 μL PCV ανά mL καλλιέργειας. Οι χειρισμοί που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: 100% άζωτο (N2), 90% άζωτο +10% CO2 (N2+10%CO2), 100% άζωτο +γλυκόζη 5g/L (N₂+glc), 90% άζωτο+ 10% CO₂ + γλυκόζη (N₂+10% CO₂+glc). Όλοι οι γειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 28οC και σε συνεχή φωτονιακή ένταση 60µmol.m-2.s-1. Η πλήρωση των αέριων γινόταν με συνεχόμενη παροχή μέσω αποστειρωμένης βελόνας εισόδου στο σφραγισμένο μπουκάλι από μπουκάλες αέριων αζώτου. Επίσης με τη χρήση βελόνας εξόδου αποβαλλόταν ο αέρας. Στη συνεχεία αφαιρέσαμε το 10% με αποστειρωμένη σύριγγα και στη θέση του προσθέσαμε ξανά με αποστειρωμένη σύριγγα αντίστοιγη ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα. Τα μπουκάλια τοποθετηθήκαν σε ενυδρείο το οποίο είχε ειδικές θέσεις τοποθέτησης για να διατηρείται η θερμοκρασία σταθερή στη διάρκεια του πειράματος. Η ικανοποίηση των αναγκών του πειράματος σε φωτεινότητα έγινε με λάμπες LED οι οποίες διατηρούσαν σταθερό το φωτισμό. Χρησιμοποιήθηκαν πέντε επαναλήψεις για κάθε χειρισμό για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Το πείραμα διήρκησε 8 ημέρες (192 ώρες). Σε τακτά διαστήματα γινόταν μέτρηση του επαγωγικού φθορισμού των μπουκαλιών (καταγραφή της φωτοσυνθετικής απόδοσης εκφρασμένη ως Fv/Fm), και ανάλυση της σύστασης της ατμόσφαιρας όλων των επιμέρους χειρισμών. Με αέριοχρωματογραφία θερμικής αγωγιμότητας. Ακόμη εξεταστήκαν η βιομάζα της καλλιέργειας εκφρασμένη ως κυτταρικός όγκος (packed cell volume, PCV) ανά mL καθώς και το pH.

Από το διάγραμμα της φωτοσυνθετικής απόδοσης (Fv/Fm) διακρίνουμε ότι οι χειρισμοί N_2 και N_2 +10%CO₂ παρουσιάζουν υψηλή φωτοσυνθετική απόδοση σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (Εικόνα 25). Στη περίπτωση του χειρισμού N_2 +glc διακρίνουμε ότι η φωτοσυνθετική απόδοση είχε μια σχετική μείωση στη διάρκεια του χρόνου καταλήγοντας σε επίπεδα μέτριας φωτοσυνθετικής απόδοσης.



Εικόνα 26: Διαφοροποίηση της φωτοσυνθετικής απόδοσης στη διάρκεια του χρόνου.

Παρόμοια είναι και η εικόνα του διαγράμματος για τον χειρισμό N₂+10%CO₂+glc, όπου τα επίπεδα της φωτοσυνθετικής απόδοσης παρά το υψηλό ξεκίνημα κατέληξε σε χαμηλότερα επίπεδα (Fv/Fm = 0,5). Είναι φυσικό σε μία μικτότροφη καλλιέργεια να υποβαθμιστεί η φωτοσυνθετική διαδικασία, όμως εδώ έχουμε ιδιαίτερες συνθήκες. Τα αυξημένα επίπεδα οργανικής ύλης (γλυκόζη) μπορούν να διασπαστούν στην αναπνευστική διαδικασία να απελευθερωθεί CO₂ που με τη σειρά του θα χρησιμοποιηθεί στη φωτοσυνθετική διαδικασία θα παραχθεί O₂ για να υποστηρίξει τον καταβολισμό της οργανικής ύλης και να επάγει την ανάπτυξη. Η προσθήκη πέραν της γλυκόζης (10% CO₂) στην ατμόσφαιρα δεν διαφοροποιεί τα αποτελέσματα, γιατί πιθανόν είναι το μέγιστο που μπορεί να διαχειριστεί ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός στις συγκεκριμένες συνθήκες φωτισμού (60μmol.m-2.s-1).

Οι καμπύλες επαγωγικού φθορισμού για τους 4 χειρισμούς μετά από επώαση 48 και 192 ωρών επιβεβαιώνουν τα παραπάνω αποτελέσματα (Εικόνα 26).

Στα παρακάτω διαγράμματα βλέπουμε μια αναλυτική εικόνα (Εικόνα 27) των παραμέτρων που χαρακτηρίζουν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού για τις 48 και 192 ώρες αντίστοιχα.





Εικόνα 26: Αντιπροσωπευτικές καμπύλες επαγωγικού φθορισμού των τεσσάρων χειρισμών (N2, N₂+CO₂, N₂+glc, N₂+CO₂+glc) για τις 48 και τις 192 ώρες επώασης.





Εικόνα 27: Σύγκριση σειράς παραμέτρων που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού μεταξύ των τεσσάρων χειρισμών (N₂,N₂+CO₂, N₂+glc,

Οπως συνέβη και στα προηγούμενα πειράματα εξετάσαμε αναλυτικά τις παραμέτρους τις οποίες λαμβάνουμε από το OJIP test . Στις 48 ώρες, αλλά ιδιαίτερα στις 192 ώρες το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (ABS/RC) παρατηρούμε ότι αυξήθηκε στους χειρισμούς που περιέχουν γλυκόζη (N₂+glc και

 N_2+CO_2+glc), μεταξύ άλλων και λόγω αυξημένου αυτοσκιασμού που προκύπτει από την σημαντική αύξηση της βιομάζας σε σχέση με τον χειρισμό N_2 αλλά και N_2+CO_2 (Εικόνα 27). Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουμε όταν παρατηρούμε και τους παράγοντες τον παράγοντα DIo/ RC(μη φωτοχημική απόσβεση) και PSIo (πρωτογενή φωτοχημική απόσβεση), όπου ξεκάθαρα οι δύο χειρισμοί με γλυκόζη παρουσιάζουν μειωμένη φωτοχημική απόσβεση (PSIo) και αυξημένη μη φωτοχημική απόσβεση (DIo/RC) σε σχέση με τους χειρισμούς N_2 και N_2+CO_2 (Εικόνα 28). Αυτό δικαιολογεί και την ελαφρώς μειωμένη τους φωτοσυνθετική απόδοση (Fv/Fm) σε σχέση με τους χειρισμούς N_2 και N_2+CO_2 (Εικόνα 26).

Στη συνεχεία παρατίθεται το διάγραμμα που προέκυψε από τη μέτρηση της διαφοροποίησης της βιομάζας εκφρασμένη σε (PCV) στην πορεία του χρόνου (Εικόνα 28).



Εικόνα 28: Διαφοροποίηση της βιομάζας, εκφρασμένη σε μL PCV/mL στα πλαίσια των τεσσάρων χειρισμών (N₂, N₂+CO₂, N₂+glc, N₂+CO₂+glc) στη διάρκεια του χρόνου.

Όλοι οι χειρισμοί ξεκίνησαν με 3 μL PCV/mL. Όσο αναφορά την καμπύλη του αζώτου (χειρισμός N_2) η βιομάζα περίπου διπλασιάστηκε στο τέλος του πειράματος. Στο χειρισμό (N_2 +CO₂) τα μικροφύκη εξαιτίας του επιπλέον διοξειδίου του άνθρακα, το όποιο ευνοεί τις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης που είναι υπεύθυνες για τη

παράγωγη οργανικής ύλης, υπάρχει σαφώς μεγαλύτερη αύξηση σε σχέση με τον πρώτο χειρισμό του απλού αζώτου. Κάτι αντίστοιχο παρατηρήθηκε και στους δυο χειρισμούς (N₂+glc και N₂+10% CO₂+glc) με τη γλυκόζη όπου η παράγωγη της βιομάζας ξεπέρασε κάθε προηγούμενο χειρισμό (Εικόνα 28). Οι μετρήσεις του pH με το πέρας του πειράματος σε όλους τους χειρισμούς παρατίθενται στην Εικόνα 29.



Εικόνα 29:Διαφοροποίηση του pH στα πλαίσια των τεσσάρων χειρισμών (N₂, N₂+CO₂, N₂+glc, N₂+CO₂+glc) στη διάρκεια του χρόνου.

Το pH όπως παρατηρούμε έχει ξεκινήσει από το 6,02 και στις 192 ώρες. Όπως φαίνεται και έχουμε παρατηρούμε μια σταθερή αύξηση του pH σε όλους τους χειρισμούς. Οι δυο χειρισμοί με γλυκόζη (και ιδιαίτερα ο χειρισμός N₂+10%CO₂+glc) παρουσιάζουν μία περιορισμένη αύξηση pH σε σχέση με τους άλλους χειρισμούς κάτι το όποιο πιθανόν να οφείλεται στο επιπλέον διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται από την ιδιαίτερα ενεργή αναπνοή εξαιτίας της μεγάλης ποσότητας υδατανθράκων (γλυκόζης) που περιέχουν τα θρεπτικά τους. Οι αναλύσεις της αέριας αεριοχρωματογραφίας θερμικής αγωγιμότητας που ελήφθησαν από τα σφραγισμένα δοχεία κατά την έναρξη, μετά από 48 και 192 ώρες (Εικόνα 30).



Εικόνα 30: Διαφοροποίηση της σύστασης της ατμόσφαιρας μεταξύ των τεσσάρων (N₂, N₂+CO₂, N₂+glc, N₂+CO₂+glc) και του εξωτερικού αέρα εκφρασμένη με τα GC-προφίλ την χρονική στιγμή θώρες (αριστερά), 48 ώρες (κέντρο) και 192 ώρες (δεξιά).

Από την δειγματοληψία των αέριων πρόεκυψε μία σαφής διαφοροποίηση της σύστασης της ατμόσφαιρας για κάθε που συνίσταται κυρίως στην αύξηση του επιπέδου του O_2 , ξεκινώντας από μηδενικές ουσιαστικά τιμές. Πιο συγκεκριμένα, όσον αναφορά το χειρισμό του 100% αζώτου (N2) φαίνεται ξεκάθαρα, όπως παρατηρήθηκε και σε στο προηγούμενο πείραμα, να αυξάνεται το οξυγόνο στην εσωτερική ατμόσφαιρα του μπουκαλιού κάτι που ανατροφοδοτεί φωτοσύνθεση – αναπνοή και συντηρεί σε ικανοποιητικό βαθμό τον κυτταρικό μεταβολισμό. Στο γειρισμό N2+CO2 φαίνεται ξεκάθαρα η ίδια τάση αλλά με σαφώς μεγαλύτερη ένταση αύξησης του οξυγόνου λόγω της προσθήκης του διοξειδίου του άνθρακα που τροφοδοτεί επιπλέον τη φωτοσύνθεση και παύει να είναι το CO2 περιοριστικός παράγοντας. Ο μόνος περιοριστικός παράγοντας σε αυτό τον γειρισμό είναι το φως. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα των γειρισμών N2+glc και N2+10%CO2+glc. Παρόλο που με την προσθήκη γλυκόζης αυξάνουμε εμμέσως τη δυνατότητα παραγωγής CO₂, τα επίπεδα του οξυγόνου παραμένουν στο ίδιο επίπεδο και στους τρεις χειρισμούς (Εικόνα 31). Σε όλους τους χειρισμούς τα μικροφύκη τείνουν να διαμορφώνουν μέσα από το μηχανισμό της φωτοσύνθεσης την κατά τα αλλά αφιλόξενη ατμόσφαιρα σε ατμόσφαιρα που προσεγγίζει τη σύσταση της γήινης ατμόσφαιρας (Εικόνα 30 και 31).



Εικόνα 31: Διαφοροποίηση του ποσοστού O2 στις ατμόσφαιρες των τεσσάρων χειρισμών (N₂, N₂+CO₂, N₂+glc, N₂+CO₂+glc) στη διάρκεια του χρόνου.

Ολοκληρώνοντας αυτή τη πειραματική διαδικασία διαπιστώνουμε ότι το μικροφύκος παρότι εισήχθη σε μια ατμόσφαιρα τελείως διαφορετική από την γήινη, κατάφερε από τα μηδενικά ποσοστά οξυγόνου, χρησιμοποιώντας τα κυτταρικά αποθέματα οργανικής ύλης (π.χ. άμυλο), να παράγει CO₂ για να το χρησιμοποιήσει στη συνέχεια για τη φωτοσύνθεση και τη φωτοσυνθετική παραγωγή O₂ που με τη σειρά του θα υποστηρίξει την αναπνευστική παραγωγή CO₂. Μέσω μίας ορθολογικής ανατροφοδότησης φωτοσύνθεσης – αναπνοής μπορεί να δημιουργήσει τις ελάχιστες εκείνες συνθήκες (ατμόσφαιρα με λίγο O₂) που μπορεί άνετα να επιβιώσει.

Αυτή η πειραματική διαδικασία έδειξε ότι όσο εμείς ενισχύαμε το μηχανισμό με διοξείδιο του άνθρακα και κυτταρικούς υδατάνθρακες, η παράγωγη O₂ αυξανόταν πολύ παραπάνω καθώς ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός επιταχυνόταν σε μεγάλο βαθμό. Φαίνεται ότι ο παράγοντας που επιδρά πιο ενισχυτικά στη παράγωγη οξυγόνου από τους δυο είναι το διοξείδιο του άνθρακα καθώς οι δυο χειρισμοί με επιπλέον CO₂ είχαν ταχύτερη παραγωγή O₂ ατμόσφαιρας που προσεγγίζει το επίπεδο της γήινης ατμόσφαιρας (Εικόνα 31).

4. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τη δυνατότητα επιβίωσης ενός φωτοσυνθετικού μικροφύκους (Scenedesmus obliquus), που στηρίζεται στην οξυγονική φωτοσύνθεση, σε κλειστά συστήματα με ανοξικές ατμόσφαιρες (ατμόσφαιρες που δεν έχουν στη σύσταση τους οξυγόνο) διαφορετικής σύστασης, αντίστοιχης με αυτές άλλων πλανητών του ηλιακού μας συστήματος, και τον τρόπο διαμόρφωσης της ατμόσφαιρας ενός κλειστού συστήματος προς όφελος του οργανισμού, μέσω της φωτοσυνθετικής διαχείρισης της ηλιακής ακτινοβολίας.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα μονοκύτταρα χλωροφύκη που θα εκτεθούν σε μία ανοξική ατμόσφαιρα (χωρίς O₂ και CO₂), θα την αντιμετωπίσουν με ορθολογικό τρόπο. Η παντελής έλλειψη CO₂ θα αντιμετωπιστεί με τον καταβολισμό οργανικής ύλης (από τα υπάρχοντα κυτταρικά αποθέματα, π.χ. άμυλο) μέσω της αναπνευστικής διαδικασίας (σε πρώτη φάση χρησιμοποιώντας πιθανόν NOx αντί O₂ - Gupta and Igamberdiev, 2011; Igamberdiev and Hill 2009) για να παραχθεί CO₂ που θα υποστηρίξει την φωτοσυνθετική διαδικασία η οποία θα παράγει O₂, μέρος του οποίου στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθεί για την αναπνευστική διαδικασία. Αυτή η ανατροφοδότηση αναπνοής – φωτοσύνθεσης, επιτρέπει την επιβίωση, αλλά περιορίζει σε ένα αυτότροφο περιβάλλον την περίσσεια CO₂ που θα μπορούσε να επενδυθεί για την παραγωγή οργανικής ύλης και ως εκ τούτου και βιομάζας.

Εάν εμπλουτίσουμε την ανοξική ατμόσφαιρα με CO₂ (ή γλυκόζη που θα χρησιμοποιηθεί από την αναπνευστική διαδικασία για την παραγωγή CO₂), τότε το μικροφύκος ξεπερνά και αυτό τον περιορισμό, και έχει τη δυνατότητα ένα μεγάλο μέρος του ανόργανου άνθρακα (CO₂) να το επενδύσει για την φωτοσυνθετική μετατροπή του σε οργανικό άνθρακα και βιομάζα αυξάνοντας ταυτόχρονα την φωτοσυνθετική δραστηριότητα και την παραγωγή O₂. Ο ρυθμός αύξησης του επιπέδου O₂ στην ατμόσφαιρα, κάτω από αυτές τις συνθήκες, φαίνεται να εξαρτάται απλώς από την ένταση του φωτός και τείνει να δημιουργήσει μία ατμόσφαιρα που προσεγγίζει τη σύσταση της γήινης ατμόσφαιρας, τουλάχιστον όσον αφορά το επίπεδο του O₂.

Το παράδοξο είναι ότι γνωρίζουμε εδώ και περίπου 80 χρόνια ότι τα χλωροφύκη έχουν τη δυνατότητα να παράγουν αέριο υδρογόνο σε ανοξικές συνθήκες (Gaffron and Rubin 1942). Σε ανοξικές συνθήκες τα μονοκύτταρα χλωροφύκη ενεργοποιούν μια υδρογενάση (Happe and Naber 1993), που εδράζεται στο χλωροπλάστη και λαμβάνει ηλεκτρόνια κατευθείαν από την ανηγμένη φερρεδοξίνη για τη παραγωγή H₂ (Ghirardi et al. 2000). Παρόλα ταύτα στους χειρισμούς και στις συνθήκες που επιλέξαμε δεν παρατηρήσαμε μετρήσιμη παραγωγή H₂. Η φωτοσυνθετική παραγωγή του H_2 στα μονοκύτταρα χλωροφύκη είναι ως επί το πλείστον το αποτέλεσμα δύο διαφορετικών μονοπατιών μεταφοράς ηλεκτρονίων: (1) το εξαρτώμενο από το PS II, όπου η φωτόλυση του νερού είναι η μοναδική πηγή ηλεκτρονίων για το PS I, τη φερρεδοξίνη και τελικά την υδρογενάση (Gaffron 1939; Gaffron and Rubin 1942), και (2) το ανεξάρτητο του PS II, όπου χρησιμοποιεί τον καταβολισμό των ενδογενών οργανικών υποστρωμάτων (υδατάνθρακες/σάκχαρα) ως αναγωγική πηγή ενέργειας, διοχετεύοντας ηλεκτρόνια στη δεξαμενή της πλαστοκινόνης (PQ), παρακάμπτοντας το PSII (Melis and Happe 2001). Και τα δύο μονοπάτια για να λειτουργήσουν απαιτούν φως, με αποτέλεσμα την φωτοσυνθετική παραγωγή O₂, το οποίο με τη σειρά του συμβάλει στην αναστολή της υδρογενάσης και την παραγωγή H₂. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η περιορισμένη βιωσιμότητα της παραγωγής H₂ (Kosourov et al. 2002).

Οι πιθανοί λόγοι που θα δικαιολογούσαν την μη παραγωγή φωτοσυνθετικού Η2 στους χειρισμούς της παρούσας εργασίας είναι οι εξής: α) Στην παρούσα εργασία στους περισσότερους χειρισμούς δεν έχουμε απλώς παντελή έλλειψη Ο2 αλλά και παντελή έλλειψη CO₂. Οπότε, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σε συνθήκες φωτός δίνεται λογικά προτεραιότητα στην ανατροφοδότηση φωτοσύνθεσης -αναπνοής, έτσι ώστε το λίγο CO2 που θα παραχθεί από τον καταβολισμό της οργανικής ύλης να επενδυθεί στον κύκλο Calvin/Benson για να ξαναδημιουργήσει οργανική ύλη κ.ο.κ. Αυτό σημαίνει απαιτήσεις μεταξύ άλλων σε NADPH, οπότε πιθανόν να προτιμά τα ηλεκτρόνια της φωτοσυνθετικής διαδικασίας να τα μεταφέρει στο NADP+ και όγι στην υδρογενάση για την παραγωγή H₂. β) Αυτό το εμπόδιο θα μπορούσε θεωρητικά να ξεπεραστεί με την προσθήκη CO₂ ή/και γλυκόζης. Όμως και σε αυτούς τους χειρισμούς δεν είχαμε παραγωγή Η2, πιθανότατα γιατί επιλέξαμε, έστω και οριακά, ο φωτισμός που χρησιμοποιήθηκε να επάγει την φωτοσυνθετική παραγωγή Ο2 περισσότερο από την αντίστοιχη κατανάλωση Ο2 από την αναπνευστική διαδικασία, με αποτέλεσμα να έχουμε σταδιακή εγκαθίδρυση οξυγονικής ατμόσφαιρας που δεν επιτρέπει την ενεργότητα της υδρογενάσης.

Σε περίπτωση που η αναπνευστική διαδικασία τρέχει περισσότερο από τη φωτοσυνθετική (π.χ. σε συνθήκες αρκετά χαμηλού φωτισμού, και σε αυξημένα επίπεδα κυτταρικών υδατανθράκων), τότε στα ευκαρυωτικά χλωροφύκη (όπως o Scenedesmus obliquus) επάγεται η υδρογενάση και η φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρόνιων καταλήγει στη παράγωγη Η₂ συντηρώντας την παράγωγη ενεργείας (Papazi et. al. 2014).

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας μπορούμε να συμπεράνουμε με σιγουριά τα εξής:

Σε όλες τις τεχνητές ανοξικές, αλλά και χωρίς CO₂, ατμόσφαιρες που εξετάσαμε το χλωροφύκος Scenedesmus obliquus σε επιλεγμένες συνθήκες φωτισμού (60μmol.m⁻².s⁻¹) καταφέρνει να συντηρήσει τον φωτοσυνθετικό του μηχανισμό που λειτουργεί με την ίδια ουσιαστικά φωτοσυνθετική απόδοση όπως και στην ατμόσφαιρα αέρα, συντηρώντας όλο τον κυτταρικό μεταβολισμό.

- Μέσω της φωτοσύνθεσης φωτολύεται το νερό παράγεται οξυγόνο και φαίνεται αυτό το ελάχιστο οξυγόνο να συντηρεί την αναπνευστική αλυσίδα, η οποία πιθανόν παράγει με τη σειρά της CO₂ που συντηρεί την φωτοσύνθεση. Η ανακύκλωση προϊόντων και υποστρωμάτων μεταξύ των δύο αυτών κύριων μεταβολικών διαδικασιών συντηρεί το μικροφύκος σε αυτές κατά τα άλλα ακραίες (για τα δεδομένα της γης) ατμόσφαιρες, περιορίζοντας όμως την ανάπτυξη. Φάνηκε ξεκάθαρα μέσα από την ανάλυση των καμπύλων που πρόεκυψαν από την αέρια χρωματογραφία ότι το οξυγόνο είχε αυξηθεί λόγω αυτής της διαδικασίας στο τέλος των χειρισμών. Περιοριστικός παράγοντας της αύξησης του είναι το CO₂ και τα οργανικά αποθέματα του οργανισμού, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από την αναπνευστική διαδικασία για την παραγωγή CO₂.
- Η προσθήκη CO₂ ή γλυκόζης κατάφεραν να αυξήσουν σημαντικά την παραγωγή O₂ στην ατμόσφαιρα προσεγγίζοντας τη σύσταση της γήινης ατμόσφαιρας λόγω της επιτάχυνσης που πήρε από την ενισχυτική τους δράση ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός, καθιστώντας τώρα ως περιοριστικό παράγοντα μόνο την ένταση φωτισμού.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1. Allen JF (2003). Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain. Trends Plant Sci. 8:15-19
- 2. Allen, J. F., de Paula, W. B., Puthiyaveetil, S., & Nield, J. (2011). A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis. Trends Plant Sci. 16(12): 645-655.
- 3. Allen, J. F., & Nilsson, A. (1997). Redox signalling and the structural basis of regulation of photosynthesis by protein phosphorylation. Physiol. Plant. 100(4): 863-868.
- 4. Arnon, D. I. (1971). The Light Reactions of Photosynthesis. Proc. Nat. Acad. Sci. 68: 2883-2892.
- 5. Arnon, D. I., Allen, M. B., & Whatley, F. R. (1954). Photosynthesis by isolated chloroplasts. Nature 174(4426): 394-396.
- Bishop, N. I., & Senger, H. (1971). Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of *Scenedesmus*. In Methods in enzymology, Vol. 23, pp. 53-66, Academic Press.
- Chader, S., Hacene, H., & Agathos, S. N. (2009). Study of hydrogen production by three strains of Chlorella isolated from the soil in the Algerian Sahara. Int. J. Hyd. Energy. 34(11): 4941-4946.
- 8. Cline, K., Henry, R., Li, C., & Yuan, J. (1993). Multiple pathways for protein transport into or across the thylakoid membrane. The EMBO J. 12(11): 4105-4114.
- 9. Cornic, G., Massacci, A., & Baker, N. R. (1996). Photosynthesis and the Environment. The Netherlands: Kluwer, pp. 347-366.
- Cramer, W. A., Zhang, H., Yan, J., Kurisu, G., & Smith, J. L. (2004). Evolution of photosynthesis: time-independent structure of the cytochrome b6/f complex. Biochemistry 43(20): 5921-5929
- Demetriou, G., Neonaki, C., Navakoudis E., & Kotzabasis K. (2007). Salt stress impact on the molecular structure und function of the photosynthetic apparatus – The protective role of polyamines. Biochim. Biophys. Acta (BIOENERGETICS) 1767: 272-280.
- 12. Falkowski, P. G., & Raven, J. A. (2007). Photosynthesis and primary production in nature. Aquatic Photosynth. pp. 319-363 ISBN:9780691115511.
- 13. Gaffron, H. (1939). Reduction of CO₂ with H₂ in green plants. Nature 143: 204-205.
- 14. Gaffron, H., & Rubin, J. (1942). Fermentative and Photochemical Production of Hydrogen in Algae. J. Gen. Physiol. 26: 219-240.
- Ghirardi, ML., Zhang, L., Lee, J.W., Flynn, T., Seibert, M., Greenbaum, E., & Melis, A. (2000). Microalgae: a green source of renewable H2. Trends Biotechnol. 18: 506-511.
- 16. Gupta, K.J., & Igamberdiev, A.U. (2011). The anoxic plant mitochondrion as a nitrite: NO reductase. Mitochondrion 11: 537–543.
- Happe, T., & Naber, J.D., (1993). Isolation, characterization and N-terminal aminoacid sequence of hydrogenase from the green alga Chlamydomonas reinhardtii. FEBS J. 214: 475-481.

- Happe, T., Mosler, B., & Naber, J. D. (1994). Induction, localization and metal content of hydrogenase in the green alga Chlamydomonas reinhardtii. European J. Biochem. 222(3): 769-774.
- 19. Heins, L., Collinson, I., & Soll, J. (1998). The protein translocation apparatus of chloroplast envelopes. Trends Plant Sci. 3(2): 56-61.
- Hemschemeier, A., Melis, A., & Happe, T. (2009). Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae. Photosynth. Res. 102(2-3): 523-540.
- 21. Igamberdiev, A.U., & Hill, R.,D. (2009). Plant mitochondrial function during anaerobiosis. Ann. Bot. 103: 259–268.
- 22. Kautsky, H., & Hirsch, A. (1931). Interactions of excited dye molecules and oxygen. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 64: 2677-2686.
- 23. Koning, Ross E. (1994). Light Reactions. Plant Physiology Information Website. http://plantphys.info/plant_physiology/light.shtml
- 24. Kosourov, S., Tsygankov, A., Seibert, M., & Ghirardi, M.,L., (2002). Sustained hydrogen photoproduction by Chlamydomonas reinhardtii: Effects of culture parameters. Biotechnol. Bioeng. 78: 731-740.
- 25. Lawlor, D., W., (1993). Photosynthesis: molecular, physiological and environmental processes (No. Ed. 2). Longman scientific & technical. ISBN: 9780582086579
- Logothetis, N.,K., & Wandell, B., A. (2004). Interpreting the BOLD signal. Annu. Rev. Physiol. 66:735-769
- 27. Melis, A., & Happe, T. (2001). Hydrogen production. Green algae as a source of energy. Plant Physiol. 127: 740-748.
- 28. Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M. L., & Seibert, M. (2000). Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant physiol. 122(1): 127-136.
- Navakoudis E., Lütz, C., Langebartels, C., Lütz-Meindl, U., & Kotzabasis, K. (2003).
 Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines. Biochim. Biophys. Acta (GENERAL SUBJECTS) 1621: 160-169.
- Ort, D.R., & Yocum, C.F. (Eds.). (1996). Oxygenic photosynthesis: the light reactions (Vol. 4). Springer Science & Business Media. Print ISBN:0-7923-3683-6, e-book ISBN:0-306-48127-8.
- 31. Papazi, A., Gjindali, A.,I., Kastanaki, E., Assimakopoulos, K., Stamatakis, K., & Kotzabasis, K. (2014). Potassium deficiency, a "smart" cellular switch for sustained high yield hydrogen production by the green alga Scenedesmus obliquus. Int. J. Hyd. Energy 39: 19452-19464.
- Papazi, A., Kastanaki, E., Pirintsos, S., & Kotzabasis, K. (2015). Lichen symbiosis: Nature's high yielding machines for induced hydrogen production. PloS one. 10(3): e0121325.

- 33. Plaxton, W., C. (1996). The organization and regulation of plant glycolysis. Ann. Rev. Plant Biol. 47(1):185-214.
- 34. Sfakianaki, M., Sfichi, L., & Kotzabasis, K. (2006). The involvement of LHCIIassociated polyamines in the response of the photosynthetic apparatus to low temperature. J. Photochem. Photobiol. 84:181-188.
- Sfichi, L., Ioannidis, N. & Kotzabasis, K. (2004). Thylakoid-associated polyamines adjust the UVB-sensitivity of the photosynthetic apparatus by means of LHCII changes. Photochem. Photobiol. 80: 499-506.
- Spalding, M., H. (1989). Photosynthesis and photorespiration in freshwater green algae. Aquat. Bot. 34(1-3): 181-209.
- 37. Strasser, R., J., & Srivastava, A. (1995). Polyphasic chlorophyll alpha fluorescence transient in plants and cyanobacteria. Photochem. Photobiol. 61(1): 32-42.
- Strasser, B., J., & Strasser, R. J. (1995). Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test. In: Mathis P (ed) Photosynthesis: from Light to Biosphere, pp 977- 980. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- 39. Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). Plant physiology and development. ISBN: 9781605352558
- 40. Walters, R. G., & Horton, P. (1994). Acclimation of Arabidopsis thaliana to the light environment: changes in composition of the photosynthetic apparatus. Planta. 195(2): 248-256.
- Zerges, W., Wang, S., & Rochaix, J., D. (2002). Light activates binding of membrane proteins to chloroplast RNAs in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Mol. Biol. 50(3): 573-585.
- 42. https://www.sedelco.org/cms/lib02/PA01001902/Centricity/Domain/506/08_lecture_a nimation_ppt.pdf