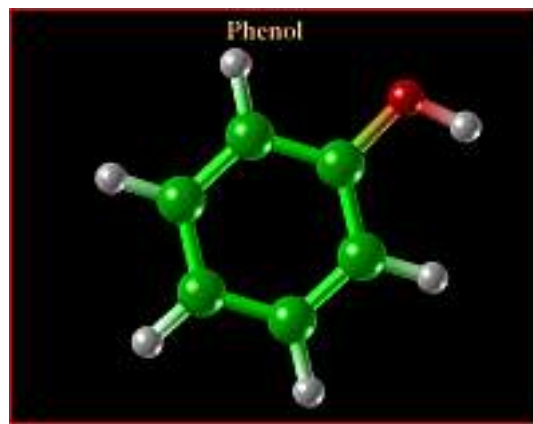


Πανεπιστήμιο Κρήτης
Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Βιολογίας

Μεταπτυχιακή εργασία της Αικατερίνης Παπαζή με
τίτλο :

«Η βιοενεργητική στρατηγική του μικροφύκου
Scenedesmus obliquus στη βιοαποικοδόμηση
φαινολικών ενώσεων».



Εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας

Υπεύθυνος Καθηγητής : Κυριάκος Κοτζαμπάσης

Σεπτέμβριος 2006

Πρόλογος

Η μεταπτυχιακή αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος με τίτλο: «Περιβαλλοντική Βιολογία - Διαχείριση Χερσαίων και Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων», στο Εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου της Κρήτης, κατά το Ακαδημαϊκό έτος 2005-2006.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή, κύριο Κυριάκο Κοτζαμπάση, για την εμπιστοσύνη, που μου έδειξε, και την αστείρευτη υποστήριξή του, για το θέμα που επέλεξα να εκπονήσω τη μεταπτυχιακή μου εργασία, σε όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω, γιατί με τις γνώσεις του πάνω στον τομέα της φωτοσύνθεσης με βοήθησε να βάλω το πιο σημαντικό ίσως λιθαράκι στο ερευνητικό πεδίο της βιοαποικοδόμησης, που με ενδιαφέρει. Ευχαριστώ ακόμα, που με δέχτηκε στο εργαστήριό του με την ιδιότητα του Χημικού Μηχανικού και που ποτέ δεν προσπάθησε, ούτε στο ελάχιστο, να μου αλλάξει τρόπο σκέψης, κάτι που δυστυχώς δεν θεωρείται αυτονόητο...

Επιπλέον ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την βοήθεια που μου προσέφεραν, την ευχάριστη ατμόσφαιρα, την συμπαράστασή τους και κυρίως την υπομονή και την ανοχή τους στις «ευχάριστες ευωδιές» των αρωματικών φαινολικών ενώσεων, καθ' όλη τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, που μου έδωσαν τη δυνατότητα να αποκτήσω περισσότερα εφόδια και με τη διαρκή υποστήριξή τους, -ηθική και υλική, δεδομένου ότι και οι δύο μου χρειάστηκαν- καθ' όλη τη διάρκεια της διετούς φοίτησης στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα της Περιβαλλοντικής Βιολογίας, να ολοκληρώσω τον δεύτερο, αλλά όχι τελευταίο, κύκλο των σπουδών μου, συνεχίζοντας να πραγματοποιώ ένα κομμάτι από τα όνειρα και τις επιδιώξεις μου.

*Αφιερωμένη σε εκείνους που
αγαπώ και με αγαπούν*

Περιεχόμενα

<u>Περίληψη</u>	5
<u>Θεωρητικό μέρος</u>	6
1 Η χημεία των φαινολικών ενώσεων.....	6
1.1 Βενζόλιο και αρωματικότητα.....	6
1.2 Φαινόλες.....	7
1.3 Βιομηχανικές χρήσεις φαινολών.....	7
1.4 Ιδιότητες φαινολών.....	8
1.5 Αντιδράσεις φαινολών.....	9
1.5.1 Αντιδράσεις παρόμοιες με των αλκοολών.....	9
1.5.2 Αντιδράσεις ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης.....	9
1.5.3 Οξείδωση.....	10
1.5.4 Μετάθεση Claisen.....	12
2 Ενέργειες δεσμών.....	13
2.1 Ορισμός ενέργειας δεσμού στα διατομικά μόρια.....	13
2.2 Διαφορά ενέργειας δεσμού από ενέργεια διάστασης.....	14
2.3 Ενέργεια δεσμού σε πολυατομικά μόρια τύπου AX _n	14
2.4 Ενέργειες δεσμών όταν στο μόριο υπάρχουν περισσότερα από ένα είδη δεσμών.....	15
2.5 Παράγοντες από τους οποίους εξαρτώνται οι ενέργειες δεσμών.....	15
3 Φύκη.....	17
3.1 Γενικά.....	17
3.2 Δομή των κυττάρων των φυκών.....	17
3.3 Φάσεις κυτταρικής ανάπτυξης.....	19
3.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη καλλιεργειών μικροφυκών.....	20
3.5 Γιατί επιλέγονται τα φύκη;.....	25
4 Φωτοσύνθεση.....	27
4.1 Γενικά.....	27
4.2 Φωτοσυνθετική μονάδα.....	27
5 Βιοαποικοδόμηση.....	29
5.1 Γενικά για τη βιοαποικοδόμηση.....	29
5.2 Βιοαποικοδόμηση αρωματικών ενώσεων.....	29
5.2.1 Βιοαποικοδόμηση φαινόλης.....	30
5.2.1.1 Αερόβια βιοαποικοδόμηση φαινόλης.....	31
5.2.1.2 Αναερόβια βιοαποικοδόμηση φαινόλης.....	32

5.3 Βιοαποικοδόμηση αλοαρωματικών ενώσεων.....	33
5.3.1 Βιοαποικοδόμηση χλωροφαινολών.....	34
<u>Υλικά και Μέθοδοι</u>	36
1 Οργανισμός και συνθήκες καλλιέργειας.....	36
2 Υπολογισμός κυτταρικής συγκέντρωσης.....	38
3 Μετρήσεις φωτοσυνθετικής δραστηριότητας.....	39
4 Επαγωγικός φθορισμός - Φυσιοχημικές αναλύσεις της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (μέθοδος JIP).....	39
5 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση φαινολικών ενώσεων με υγρή χρωματογραφία υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (HPLC).....	45
<u>Αποτελέσματα</u>	46
1 Επίδραση των φαινολικών ενώσεων στην ανάπτυξη των καλλιεργειών.....	47
2 Διαφοροποιήσεις της μοριακής δομής, λειτουργίας και βιοενεργητικής του φωτοσυνθετικού μηχανισμού κατά την έκθεση των καλλιεργειών σε φαινολικές ενώσεις.....	51
3 Βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων.....	55
<u>Συζήτηση-Συμπεράσματα</u>	59
<u>Βιβλιογραφία</u>	64
<u>Παράρτημα I</u>	68
<u>Παράρτημα II</u>	82

Περίληψη

Η μελέτη της βιοαποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων από μικροφύκη έδειξε ξεκάθαρα ότι είναι μια βιοενεργητική διαδικασία, που εξαρτάται γενικά από τις συνθήκες ανάπτυξης των καλλιιεργειών και ειδικότερα από την εξωγενώς παρεχόμενη ενεργειακή πηγή (φως, πηγή ανόργανου και οργανικού άνθρακα). Με τη βοήθεια του επαγωγικού φθορισμού του φωτοσυνθετικού μηχανισμού καταγράφηκε ο βαθμός ανθεκτικότητας των μικροφυκών σε σειρά φαινολικών ενώσεων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η φαινόλη δεν προκαλεί φαινόμενα τοξικότητας στις καλλιέργειες και ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια εναλλακτική πηγή άνθρακα. Ο βαθμός βιοαποικοδόμησης της φαινόλης από τα μικροφύκη είναι σε απόλυτη συνάρτηση με την έλλειψη πηγής άνθρακα στις καλλιέργειες. Σε αντίθεση, οι αλογονοφαινόλες (χλωροφαινόλες, βρωμοφαινόλες και ιωδοφαινόλες) είναι σχετικά τοξικές για τις καλλιέργειες των μικροφυκών. Η βιοαποικοδόμηση τους γίνεται σε δύο βήματα. Το πρώτο βήμα είναι η αφαλογόνωση, δηλαδή η απόσπαση του αλογόνου. Αυτό βρέθηκε ότι είναι στενά συνδεδεμένο με την ενέργεια διάσπασης δεσμών του εκάστοτε υποκαταστάτη και σύμφωνα με τις ενεργειακές απαιτήσεις για τη βιοαποικοδόμηση, αυτές αυξάνουν σύμφωνα με την ακολουθία ιωδοφαινόλες < βρωμοφαινόλες < χλωροφαινόλες. Επιπρόσθετα, η μετά-θέση του αλογόνου στο φαινολικό δαχτύλιο απαιτεί περισσότερη ενέργεια σε σύγκριση με την όρθο ή πάρα θέση. Αυτοί είναι και οι πιθανοί λόγοι για τους οποίους οι αλογονοφαινόλες χρειάζονται επιπρόσθετη πηγή ενέργειας, που μπορεί να παρασχεθεί είτε ως οργανικός άνθρακας (με την προσθήκη γλυκόζης) είτε ως ανόργανος άνθρακας (με την προσθήκη CO₂ παρουσία φωτός). Η χρήση του CO₂ ως επιπλέον πηγή άνθρακα, αποδεικνύει ότι η φωτοσύνθεση παίζει σημαντικό ρόλο στην βιοαποικοδόμηση, γεγονός που ενισχύεται από την απουσία βιοαποικοδόμησης στο σκοτάδι, αναδεικνύοντας την βιοαποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων στα μικροφύκη ως μια καθαρά φωτοεξαρτώμενη διαδικασία.

Θεωρητικό Μέρος

Κεφάλαιο 1: Η χημεία των φαινολικών ενώσεων

1.1 Βενζόλιο και αρωματικότητα

Στα πρώτα στάδια ανάπτυξης της οργανικής χημείας, η λέξη αρωματικός είχε καθιερωθεί για την περιγραφή ενώσεων με ευχάριστη οσμή, όπως η βενζαλδεΐδη (από τα κεράσια, τα ροδάκινα και τα αμύγδαλα), το τολουόλιο (από το βάλσαμο του δέντρου Τολού) και το βενζόλιο (από το απόσταγμα της λιθανθρακόπισσας). Γρήγορα όμως έγινε φανερό ότι οι ενώσεις που ταξινομούνταν ως αρωματικές διέφεραν από τις περισσότερες άλλες οργανικές ενώσεις ως προς τη χημική τους συμπεριφορά.

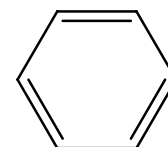
Σήμερα χρησιμοποιούμε τον όρο αρωματικός αναφερόμενοι στο βενζόλιο και στις ενώσεις που η δομή τους συγγενεύει με τη δική του, ενώ η άμεση συσχέτιση της αρωματικότητας με την ευχάριστη οσμή έχει προ πολλού εκλείψει.

Οι απλοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες προέρχονται από δύο πηγές: το κάρβουνο (λιθάνθρακες) και το πετρέλαιο. Το κάρβουνο είναι ένα εξαιρετικά περίπλοκο μίγμα αποτελούμενο κυρίως από εκτεταμένες αλυσίδες δακτυλίων που μοιάζουν με του βενζολίου. Όταν θερμανθεί στους 1000 °C, απουσία αέρα, το κάρβουνο υφίστανται θερμική διάσπαση και προκύπτει ένα μίγμα πτητικών προϊόντων, που αποκαλούνται λιθανθρακόπισσα. Η κλασματική απόσταση της λιθανθρακόπισσας περιέχει βενζόλιο, τολουόλιο, ξυλένιο, ναφθαλένιο και μια πληθώρα άλλων αρωματικών ενώσεων.

Σε αντίθεση με το κάρβουνο, το πετρέλαιο περιλαμβάνει λίγες αρωματικές ενώσεις και αποτελείται κυρίως από αλκάνια. Παρ' όλα αυτά, κατά τη διύλιση του πετρελαίου σχηματίζονται αρωματικά μόρια, όταν τα αλκάνια διέλθουν υπό υψηλή πίεση πάνω από έναν καταλύτη στους 500 °C περίπου.

Το βενζόλιο είναι η απλούστερη αρωματική ένωση, που έχει τις ακόλουθες χαρακτηριστικές ιδιότητες:

- Είναι κυκλικό, επίπεδο και συζυγιακό.
- Είναι ασυνήθιστα σταθερό. Η θερμότητα υδρογόνωσής του είναι κατά 150 KJ/mol μικρότερη απ' ότι θα αναμένονταν για ένα κυκλικό τριένιο.
- Αντιδρά με ηλεκτρονιόφιλα και σχηματίζει προϊόντα υποκατάστασης, στα οποία διατηρείται η κυκλική συζυγία, και όχι προϊόντα προσθήκης, όπου η συζυγία καταστρέφεται.

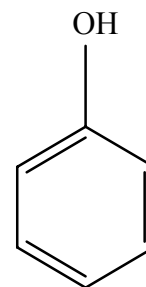


Εικόνα 1. Δομή βενζολίου.

- Έχει έξι ισοδύναμους δεσμούς C-C μήκους $1,39 \text{ \AA}$, τιμή ενδιάμεση ανάμεσα στον αμιγή απλό και αμιγή διπλό δεσμό.
- Έχει αριθμό ηλεκτρονίων π κατά Hückel, $4n + 2$, όπου $n = 1$. Τα ηλεκτρόνια π είναι απεντοπισμένα γύρω από τους έξι άνθρακες.

1.2 Φαινόλες

Οι φαινόλες είναι ενώσεις που φέρουν μια ομάδα $-\text{OH}$ απευθείας συνδεδεμένη σε έναν αρωματικό δακτύλιο, ArOH . Απαντούν ευρέως στη φύση και χρησιμοποιούνται ως ενδιάμεσα στη βιομηχανική σύνθεση διαφόρων προϊόντων, όπως κόλλες και αντισηπτικά. Η ίδια η φαινόλη είναι ένα γενικής φύσης απολυμαντικό, που απαντά στη λιθανθρακόπισσα.

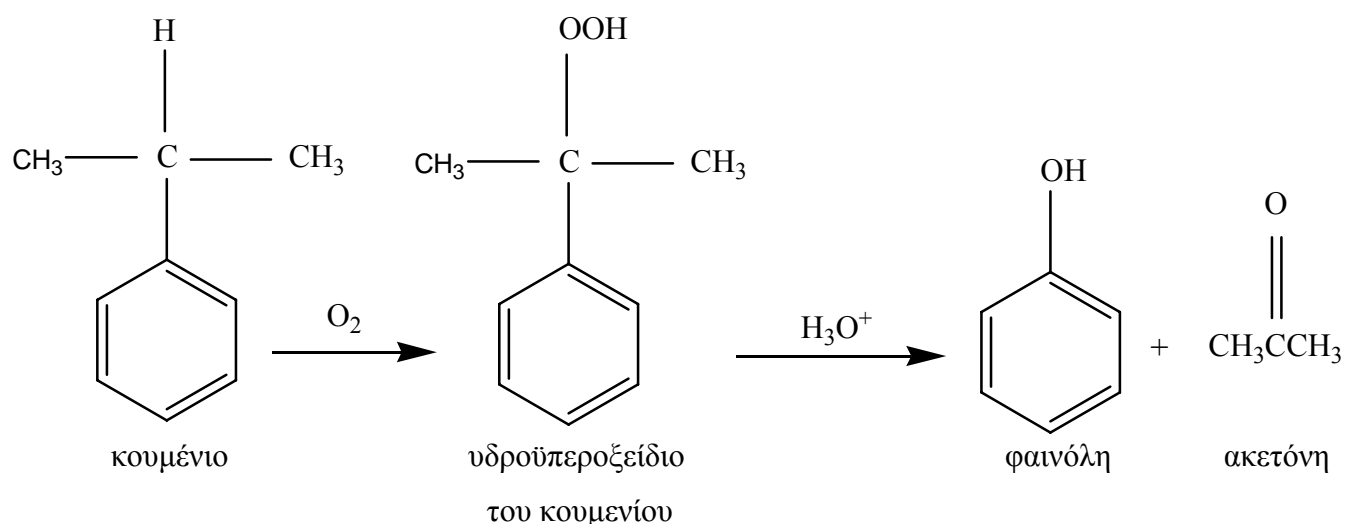


Εικόνα 2. Δομή φαινόλης.

1.3 Βιομηχανικές χρήσεις φαινολών

Η έκρηξη του Α΄ Παγκοσμίου πολέμου αποτέλεσε αφορμή για τη βιομηχανική παρασκευή μεγάλων ποσοτήτων συνθετικής φαινόλης, η οποία ήταν απαραίτητη ως πρώτη ύλη για την παρασκευή του εκρηκτικού πικρικού οξέος (2,4,6-τρινιτροφαινόλη). Σήμερα, παρασκευάζονται ετησίως στις Η.Π.Α. περίπου 1,8 εκατομμύρια τόνοι φαινόλης, που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση προϊόντων, όπως η ρητίνη βακελίτης και οι κόλλες για την κατεργασία του ξύλου.

Για πολλά χρόνια, η φαινόλη παρασκευαζόταν με τη μέθοδο Dow, κατά την οποία χλωροβενζόλιο αντιδρά με NaOH υπό υψηλή θερμοκρασία και πίεση. Σήμερα, όμως, παρασκευάζεται από ισοπροπυλοβενζόλιο (κουμένιο). Το κουμένιο αντιδρά με τον ατμοσφαιρικό αέρα, σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας, μέσω μηχανισμού ριζών, σχηματίζοντας το υδροϋπεροξείδιο του κουμενίου, το οποίο, αφού υποστεί κατεργασία με κάποιο οξύ, μετατρέπεται σε φαινόλη και ακετόνη. Αυτή η διαδικασία είναι εξαιρετικά αποτελεσματική, διότι παρασκευάζονται ταυτόχρονα δύο χημικές ουσίες με μεγάλη εμπορική αξία.



Εικόνα 3. Παρασκευή φαινόλης από κουμένιο [Mc Murry, 1999].

Η αντίδραση πραγματοποιείται με πρωτονίωση του οξυγόνου, ακολουθούμενη από μετάθεση της φαινυλομάδας από τον άνθρακα στο οξυγόνο, με ταυτόχρονη αποβολή ενός μορίου νερού. Με επαναπροσθήκη νερού, στη συνέχεια, σχηματίζεται μια ημιακετάλη, η οποία διασπάται σε φαινόλη και ακετόνη.

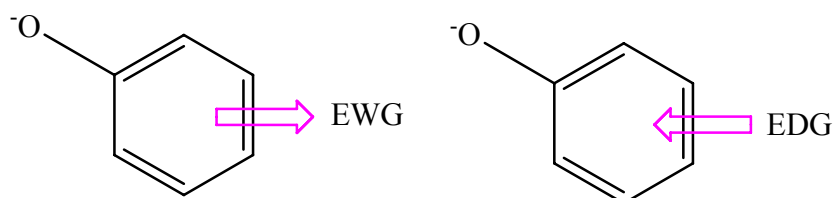
Εκτός από τη χρήση της σε ρητίνες και κόλλες, η φαινόλη αποτελεί επίσης την πρώτη ύλη για τη σύνθεση χλωριωμένων φαινολών και ουσιών BHT (βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο) και BHA (βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη), που είναι συντηρητικά τροφίμων. Η πενταχλωροφαινόλη, ένα ευρύτατα διαδεδομένο συντηρητικό του ξύλου, παρασκευάζεται από την αντίδραση φαινόλης με περίσσεια Cl₂. Το φυτοφάρμακο 2,4-D (2,4-διχλωροφαινοξυοξικό οξύ) παρασκευάζεται από 2,4-διχλωροφαινόλη, ενώ το αντισηπτικό των νοσοκομείων εξαχλωροφαινόλιο παρασκευάζεται από 2,4,5-τριχλωροφαινόλη.

1.4 Ιδιότητες φαινολών

Οι χαμηλού μοριακού βάρους φαινόλες είναι σε γενικές γραμμές σχετικά υδατοδιαλυτές και έχουν υψηλά σημεία ζέσεως, λόγω των διαμοριακών δεσμών υδρογόνου. Ωστόσο, η σημαντικότερη ιδιότητα των φαινολών είναι ίσως η οξύτητά τους. οι φαινόλες είναι ασθενή οξέα, και όταν διαλυθούν σε νερό δίστανται σε μικρό βαθμό, σχηματίζοντας H₃O⁺ και ένα ανιόν φαινοξειδίου, ArO⁻.

Οι υποκατεστημένες φαινόλες μπορεί να είναι περισσότερο ή λιγότερο όξινες από την ίδια τη φαινόλη. Οι φαινόλες με έναν υποκαταστάτη δέκτη ηλεκτρονίων είναι γενικά πιο όξινες, διότι οι υποκαταστάτες αυτοί σταθεροποιούν το ιόν φαινοξειδίου

απεντοπίζοντας το αρνητικό φορτίο. Οι φαινόλες με έναν υποκαταστάτη δότη ηλεκτρονίων είναι λιγότερο όξινες, διότι οι υποκαταστάτες αυτοί αποσταθεροποιούν το ιόν φαινοξειδίου, αφού το φορτίο είναι πλέον εντοπισμένο στο O και όχι απεντοπισμένο.



Εικόνα 4. Αριστερά: ομάδες δέκτες ηλεκτρονίων (EWG), που σταθεροποιούν το ανιόν φαινοξειδίου, με αποτέλεσμα την αυξημένη οξύτητα της φαινόλης. Δεξιά: ομάδες δότες ηλεκτρονίων (EDG), που αποσταθεροποιούν το ανιόν φαινοξειδίου, με αποτέλεσμα τη μειωμένη οξύτητα της φαινόλης [Mc Murry, 1999].

Η επίδραση, που ασκείται στην οξύτητα από έναν υποκαταστάτη δέκτη ηλεκτρονίων, είναι ιδιαίτερα αισθητή στις φαινόλες που φέρουν μια νίτρο ομάδα σε όρθο ή πάρα θέση.

1.5 Αντιδράσεις φαινολών

1.5.1 Αντιδράσεις παρόμοιες με των αλκοολών

Οι φαινόλες μπορούν να μετατραπούν σε εστέρες, αν αντιδράσουν με χλωρίδια ή ανυδρίτες οξέων, και σε αιθέρες, αν αντιδράσουν με αλκυλαλογονίδια παρουσία βάσης. Και οι δύο αντιδράσεις πραγματοποιούνται ταχύτητα, διότι το δραστικό ενδιάμεσο ιόν φαινοξειδίου σχηματίζεται πολύ πιο εύκολα από ένα ιόν αλκοξειδίου. Ωστόσο, η απευθείας εστεροποίηση κατά Fisher, με όξινα καταλύμενη αντίδραση μεταξύ φαινόλης και ενός καρβοξυλικού οξέος, συνήθως δεν είναι επιτυχής.

1.5.2 Αντιδράσεις ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης

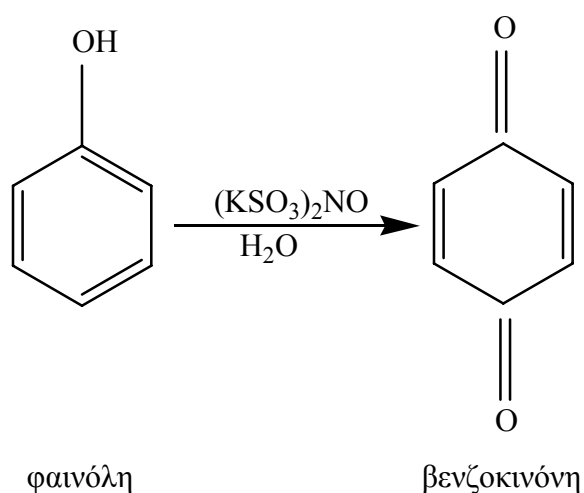
Η υδροξυλομάδα είναι, στις αντιδράσεις ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, ένας ισχυρά ενεργοποιός, όρθο- και πάρα-κατευθυντήριος υποκαταστάτης. Ως αποτέλεσμα, οι φαινόλες αποτελούν ιδιαίτερα δραστικά υποστρώματα σε μια ηλεκτρονιόφιλη αλογόνωση, νίτρωση ή σουλφονίωση, καθώς και στη σύζευξη με διαζωνικά άλατα, για την παραγωγή αζωχρωμάτων.

Λογική συνέπεια είναι ότι τα ιόντα φαινοξειδίου είναι πολύ πιο δραστικά, ως προς την ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση, απ' ότι οι ουδέτερες βάσεις, εφόσον διαθέτουν πλήρες αρνητικό φορτίο.

Οι δομές συντονισμού ενός ανιόντος φαινοξειδίου εμφανίζουν ομοιότητα με τις δομές συντονισμού ενός ενολικού ανιόντος, γεγονός που παραπέμπει στην πιθανότητα τα φαινοξείδια να υφίστανται αντιδράσεις α -υποκατάστασης. Στην πράξη όμως, τα ιόντα φαινοξειδίου είναι λιγότερο δραστικά από τα ενολικά ιόντα, λόγω της σταθερότητας του βενζολικού δακτυλίου. Ωστόσο υπάρχουν αρκετά παραδείγματα δραστικότητας ιόντων φαινοξειδίου παρόμοιας με την αντίστοιχη των ενολικών ιόντων.

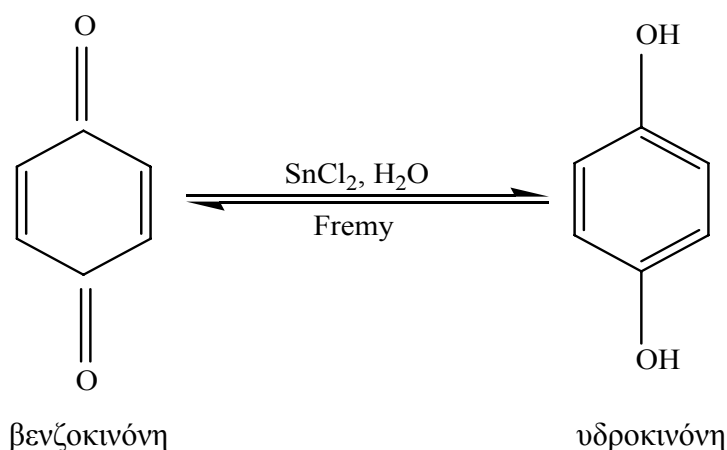
1.5.3 Οξείδωση

Η επιδεκτικότητα των φαινολών σε αντιδράσεις ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης αποτελεί συνέπεια της αυξημένης ηλεκτρονικής πυκνότητας στο φαινολικό δακτύλιο. Μια άλλη συνέπεια αποτελεί η επιδεκτικότητα των φαινολών σε οξείδωση. Κατεργασία της φαινόλης με κάποιο ισχυρό οξειδωτικό αντιδραστήριο οδηγεί στο σχηματισμό 2,5-κυκλοεξαδιεν-1,4-διόνης ή κινόνης.



Εικόνα 5. Οξείδωση φαινόλης [Mc Murry, 1999].

Οι κινόνες αποτελούν μια ενδιαφέρουσα και με ιδιαίτερη σημασία κατηγορία ενώσεων, λόγω των οξειδοαναγωγικών τους ιδιοτήτων. Μπορούν εύκολα να αναχθούν σε υδροκινόνες (*p*-διυδροξυβενζόλια), ενώ οι υδροκινόνες μπορούν εύκολα να επανοξειδωθούν σε κινόνες, με επίδραση του άλατος του Fremy.

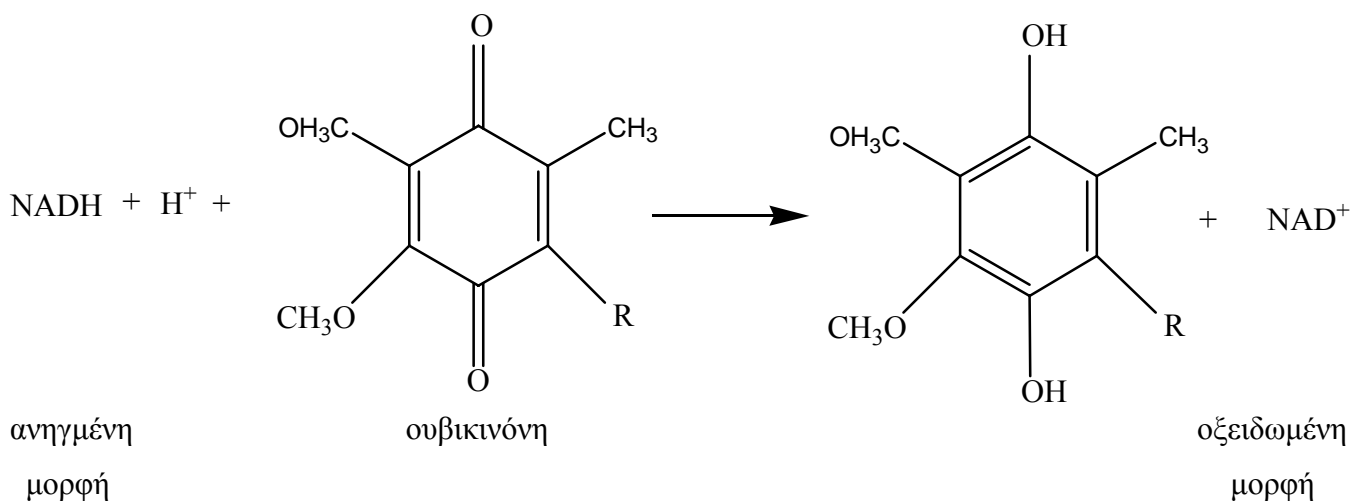


Εικόνα 6. Οξειδοαναγωγική δράση κινόνης [Mc Murry, 1999].

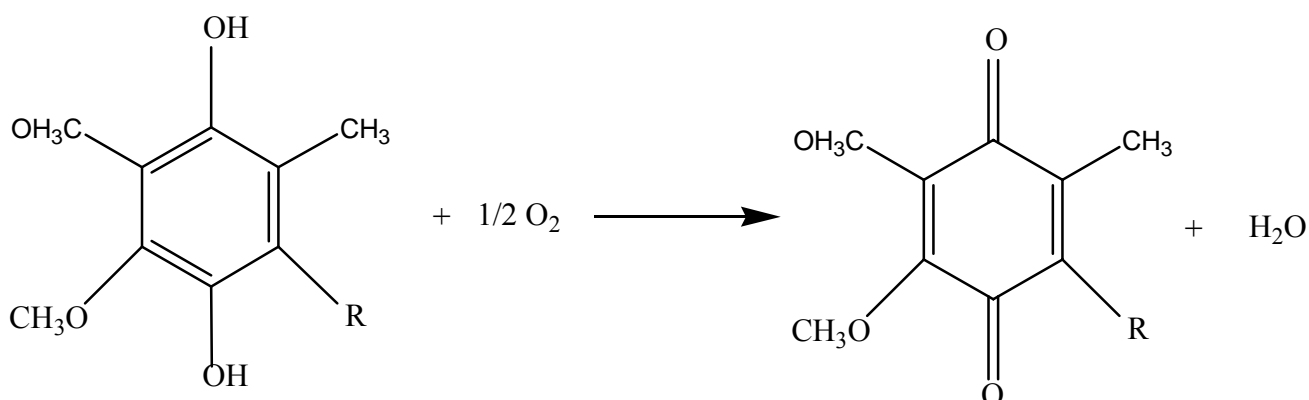
Οι οξειδοαναγωγικές ιδιότητες των κινονών είναι σημαντικές για τη λειτουργία των ζώντων κυττάρων, όπου ενώσεις που καλούνται ουβικινόνες δρουν ως βιοχημικά οξειδωτικά αντιδραστήρια, μεσολαβώντας στις διαδικασίες μεταφοράς ηλεκτρονίων, που συμμετέχουν στην παραγωγή ενέργειας. Οι ουβικινόνες, που αποκαλούνται επίσης συνένζυμα *Q*, αποτελούν συστατικά των κυττάρων όλων των αερόβιων οργανισμών, από τα απλούστατα βακτήρια μέχρι τον άνθρωπο.

Οι ουβικινόνες λειτουργούν μέσα στα μιτοχόνδρια των κυττάρων ως μεσολαβητές στη διαδικασία της αναπνοής, κατά την οποία μεταφέρονται ηλεκτρόνια από το βιολογικά αναγωγικό αντιδραστήριο NADH στο μοριακό οξυγόνο. Αν και η όλη διαδικασία περιλαμβάνει μια περίπλοκη σειρά σταδίων, τελικό αποτέλεσμα είναι ένας κύκλος, όπου το NADH οξειδώνεται προς NAD⁺, το O₂ ανάγεται σε νερό και παράγεται ενέργεια. Η ουβικινόνη δρα μόνον ως διαμεσολαβητής και η ίδια παραμένει αμετάβλητη.

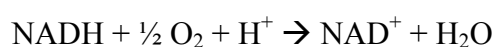
Στάδιο 1:



Στάδιο 2:



Καθαρή μεταβολή:



Εικόνα 7. Λειτουργία ουβικινονών στα μιτοχόνδρια των κυττάρων [Mc Murry, 1999].

1.5.4 Μετάθεση Claisen

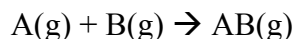
Η κατεργασία του ιόντος φαινοξειδίου με 3-βρωμοπροπένιο (αλλυλοβρωμίδιο) καταλήγει στο σχηματισμό αλλυλοφαινυλοαιθέρα. Η θέρμανση του τελευταίου στους 200-250 °C στη συνέχεια, προκαλεί μια μετάθεση Claisen, οδηγώντας στο σχηματισμό *ο*-αλλυλοφαινόλης. Τελικό αποτέλεσμα είναι η αλκυλίωση της φαινόλης σε όρθο θέση.

Η μετάθεση Claisen των αλλυλοφαινυλοαιθέρων προς *ο*-αλλυλοφαινόλες αποτελεί μια γενική αντίδραση, που είναι συμβατή με την παρουσία πολλών άλλων υποκαταστατών στο βενζολικό δακτύλιο. Η αντίδραση πραγματοποιείται μέσω ενός περικυκλικού μηχανισμού, στον οποίο εκδηλώνεται ταυτόχρονα αναδιοργάνωση των δεσμικών ηλεκτρονίων σε μια εξαμελή, κυκλική μεταβατική κατάσταση. Η ενδιάμεση 2-αλλυλοκυκλοεξαδιενόνη, στη συνέχεια, ταυτομερίζεται προς *ο*-αλλυλοφαινόλη.

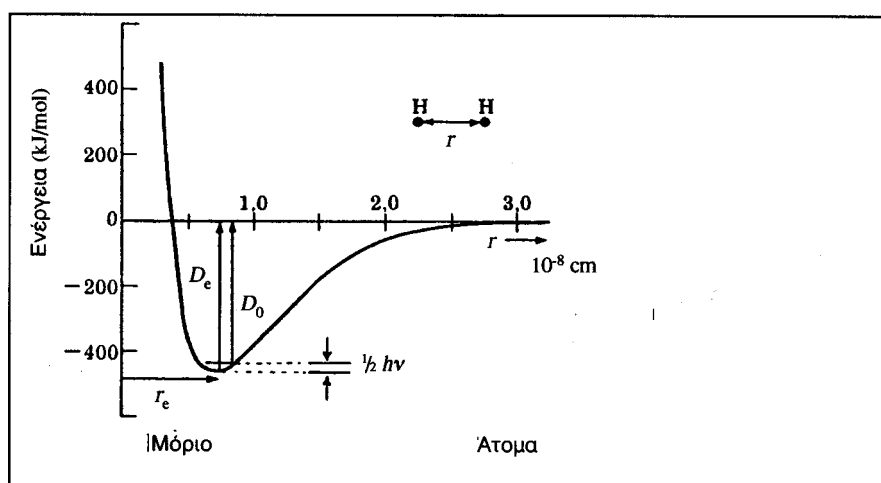
Κεφάλαιο 2: Ενέργειες δεσμών

2.1 Ορισμός ενέργειας δεσμού στα διατομικά μόρια

Έστω ο σχηματισμός διατομικού μορίου AB:



Καθώς τα άτομα A και B πλησιάζουν μεταξύ τους για να σχηματίσουν το δεσμό A-B η δυναμική ενέργεια του συστήματος μεταβάλλεται, σαν συνάρτηση της απόστασης r των πυρήνων των δύο ατόμων, κατά τρόπο ανάλογο προς αυτόν που δείχνει η καμπύλη της παρακάτω εικόνας:



Εικόνα 8. Καμπύλη ενέργειας για δύο άτομα H που σχηματίζουν χημικό δεσμό [Κλούρας, 1999].

Μια τέτοια καμπύλη ερμηνεύεται ως εξής: κατά την προσέγγιση των ατόμων A και B, η πυκνότητα του ηλεκτρονικού νέφους στο χώρο μεταξύ των δύο πυρήνων μεγαλώνει και οι ελκτικές δυνάμεις που ασκούνται πάνω σε αυτό, από τους δύο πυρήνες, τείνουν να επικρατήσουν. Αυτό φυσικά συνεπάγεται ελάττωση της δυναμικής ενέργειας του συστήματος. Αν τώρα οι πυρήνες των ατόμων A και B πλησιάσουν πάλι μεταξύ τους, τότε υπερिशύουν οι απωστικές δυνάμεις Coulomb και η δυναμική ενέργεια του συστήματος αυξάνει. Η σταθερότερη κατάσταση του συστήματος είναι εκείνη, για την οποία η ενέργεια γίνεται ελάχιστη. Στην κατάσταση αυτή (κατάσταση ισορροπίας) η επικράτηση των ελκτικών δυνάμεων οδηγεί στο σχηματισμό χημικού δεσμού, δηλαδή στη δημιουργία του μορίου AB. Η ενέργεια D_e , που αντιστοιχεί στην κατάσταση ισορροπίας, ονομάζεται ενέργεια δεσμού, ενώ η

απόσταση r_e , ανάμεσα στους δύο πυρήνες, μήκος δεσμού. Η ενέργεια δεσμού αποτελεί μέτρο της ισχύος του δεσμού.

2.2 Διαφορά ενέργειας δεσμού από ενέργεια διάστασης

Η ενέργεια διάστασης ενός διατομικού μορίου ορίζεται ως η ενέργεια που απαιτείται για την αντίδραση:



Η αντίδραση αυτή είναι ακριβώς αντίθετη της αντίδρασης σχηματισμού του μορίου $AB(g)$ και επομένως θα περίμενε κανείς η ενέργεια διάστασης να είναι απόλυτα ίση με την ενέργεια δεσμού. Στην πραγματικότητα όμως η ενέργεια διάστασης είναι λίγο μικρότερη από την ενέργεια δεσμού. Κι αυτό, γιατί στον υπολογισμό της ενέργειας, που ελευθερώνεται κατά το σχηματισμό ενός διατομικού μορίου, πρέπει να λάβουμε υπόψη μας και την ενέργεια μηδενικού σημείου, που οφείλεται στις δονήσεις των μορίων και ισούται με $\frac{1}{2} h\nu$. Επομένως:

$$\text{Ενέργεια δεσμού} = \text{Ενέργεια διάστασης} + \text{Ενέργεια δονήσεων}$$

Η ποσότητα $\frac{1}{2} h\nu$ για όλα τα διατομικά μόρια είναι μικρότερη από εκείνη του H_2 (25 KJ/mol), επειδή η συχνότητα ν ελαττώνεται γρήγορα με αύξηση της ατομικής μάζας. Έτσι, η διαφορά ανάμεσα στην ενέργεια δεσμού και στην ενέργεια διάστασης θεωρείται συνήθως αμελητέα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, στις περιπτώσεις διατομικών μορίων, οι τιμές της ενέργειας διάστασης να χρησιμοποιούνται σαν τιμές ενέργειας δεσμού.

Οι ενέργειες διάστασης προσδιορίζονται με φασματοσκοπικές μεθόδους. Προσδιορίζονται όμως και από θερμοδυναμικά δεδομένα. Στην περίπτωση αυτή ονομάζονται ενθαλπίες διάστασης και επειδή αναφέρονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($25^\circ C = 298 K$) συμβολίζονται με το ΔH_{298} .

2.3 Ενέργεια δεσμού σε πολυατομικά μόρια τύπου AX_n

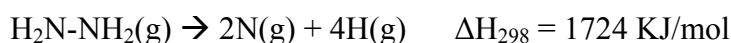
Τα μόρια αυτού του τύπου περιέχουν ενός μόνον είδους δεσμούς, A-X. Έστω για παράδειγμα το H_2O με τις ακόλουθες τρεις διαστάσεις:



Παρατηρούμε ότι για τις δύο πρώτες αντιδράσεις, ενώ κάθε φορά διασπάται ένας και του αυτού είδους δεσμός (O-H), οι απαιτούμενες ενέργειες διαφέρουν. Πώς θα ορισθεί λοιπόν η ενέργεια του δεσμού O-H; Στις περιπτώσεις αυτές σαν μέτρο της ισχύος του δεσμού χρησιμοποιείται η λεγόμενη μέση ενέργεια δεσμού, η οποία ορίζεται ως ο αριθμητικός μέσος όλων των επιμέρους ενεργειών διάστασης.

2.4 Ενέργειες δεσμών όταν στο μόριο υπάρχουν περισσότερα από ένα είδη δεσμών

Έστω για παράδειγμα η διάσταση της υδραζίνης, $\text{H}_2\text{N-NH}_2$, το μόριο της οποίας περιέχει δύο διαφορετικά είδη δεσμών, N-H και N-N



Επειδή η ενέργεια αυτή δαπανάται για τη διάσπαση τεσσάρων δεσμών N-H και ενός δεσμού N-N, θα ισχύει:

$$1724 \text{ KJ/mol} = 4\Delta H_{298}(\text{N-H}) + \Delta H_{298}(\text{N-N})$$

Όμως δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα για τις τιμές ΔH των επιμέρους διαστάσεων. Έτσι για τον υπολογισμό τους καταφεύγουμε σε έμμεσες και προσεγγιστικές μεθόδους.

Έτσι πρώτα πρέπει να υπολογίσουμε τη μέση ενέργεια δεσμού N-H, με τρόπο ανάλογο με αυτόν που περιγράφηκε παραπάνω για το νερό και έπειτα να γίνει δυνατός ο υπολογισμός της ενέργειας του δεσμού N-N.

2.5 Παράγοντες από τους οποίους εξαρτώνται οι ενέργειες των δεσμών

Η ενέργεια του δεσμού εξαρτάται κυρίως από τρεις παράγοντες: το μήκος του δεσμού, την πολικότητα του δεσμού και την τάξη του δεσμού (απλός, διπλός, τριπλός).

Οι επιδράσεις του μήκους του δεσμού και της πολικότητας του δεσμού δεν ξεχωρίζουν πάντα εύκολα, επειδή οι παράγοντες αυτοί σχετίζονται μεταξύ τους. Πάντως η επίδραση της πολικότητας πάνω στην ενέργεια ενός δεσμού γίνεται φανερή, αν συγκρίνουμε τις ενέργειες δεσμών που έχουν το ίδιο μήκος, για παράδειγμα H-Cl και H-S ή H-Br και H-Se.

Η επίδραση του μήκους του δεσμού φαίνεται αν συγκριθούν οι ενέργειες των δεσμών H-H, Cl-Cl, Br-Br και I-I. Η ασυνήθιστα μικρή ενέργεια δεσμού του μορίου

F-F αποδίδεται κυρίως στις ισχυρές απώσεις που ασκούνται ανάμεσα στα δύο άτομα F, λόγω του μικρού μεγέθους τους.

Τέλος, η ενέργεια ενός δεσμού αυξάνει, καθώς αυξάνει η τάξη του δεσμού (Πίνακας 1). Τα όρια μέσα στα οποία κυμαίνονται οι μέσες ενέργειες δεσμών για συνηθισμένους απλούς, διπλούς και τριπλούς δεσμούς, είναι:

$$E-E: 125-505 \text{ KJ/mol}$$

$$E=E: 420-710 \text{ KJ/mol}$$

$$E\equiv E: 800-1090 \text{ KJ/mol}$$

Πίνακας 1. Ενέργειες δεσμών (τιμές ΔH_{298} σε KJ/mol) [Κλούρας, 1999]

A. Ενέργειες απλών δεσμών														
	H	C	Si	Ge	N	P	As	O	S	Se	F	Cl	Br	I
H	436	416	323	289	391	322	247	463	347	276	566	431	366	299
C		356	301	255	285	264	201	336	272	243	485	327	285	213
Si			226	—	335	—	—	368	226	—	582	391	310	234
Ge				188	256	—	—	—	—	—	—	342	276	213
N					160	~200	—	201	—	—	272	193	—	—
P						209	—	~340	—	—	490	319	264	184
As							180	331	—	—	464	317	243	180
O								146	—	—	190	205	—	201
S									226	—	326	255	213	—
Se										172	285	243	—	—
F											158	255	238	—
Cl												242	217	209
Br													193	180
I														151

B. Ενέργειες πολλαπλών δεσμών			
C=C	598	C=N	616
C≡C	813	C≡N	866
C=O	695	N=N	418
C≡O	1073	N≡N	946

Κεφάλαιο 3: Φύκη

3.1 Γενικά

Η ιστορία των φυκών ξεκινάει από την Προκάμβριο περίοδο, καθώς ευρήματά τους ανακαλύφθηκαν σε απολιθώματα, που χρονολογούνται πριν από τρία περίπου δισεκατομμύρια χρόνια [<http://www.nmnh.si.edu/botany/projects/algae/AlgIntro.htm>].

Πρόκειται για μια μεγάλη και ποικίλη ομάδα φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών που ζουν σε αλμυρά, υφάλμυρα, γλυκά, στάσιμα ή τρέχοντα υδατικά περιβάλλοντα, αλλά και σε υγρές τοποθεσίες της στεριάς. Τα φύκη δε θεωρούνται ταξινομική ομάδα, αν και μερικές φορές ομαδοποιούνται μαζί με άλλους οργανισμούς στο βασίλειο «Πρώτιστα». Συνήθως οι επί μέρους ομάδες των φυκών αναγνωρίζονται ως ταξινομικές υποδιαιρέσεις. Ο διαχωρισμός σε αυτές τις υποδιαιρέσεις βασίζεται πρωταρχικά στη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος, τη φύση των τροφικών αποθεμάτων και την παρουσία άλλων – εκτός της χλωροφύλλης – φωτοσυνθετικών χρωστικών.

Η ύπαρξη των φυκών είναι πολύ σημαντική, γιατί ενισχύουν την πρωτογενή παραγωγή της οργανικής ύλης στη βάση της τροφικής αλυσίδας και κυρίως, γιατί παράγουν οξυγόνο, που είναι απαραίτητο σε άλλους υδρόβιους οργανισμούς [<http://www.nmnh.si.edu/botany/projects/algae/AlgIntro.htm>].

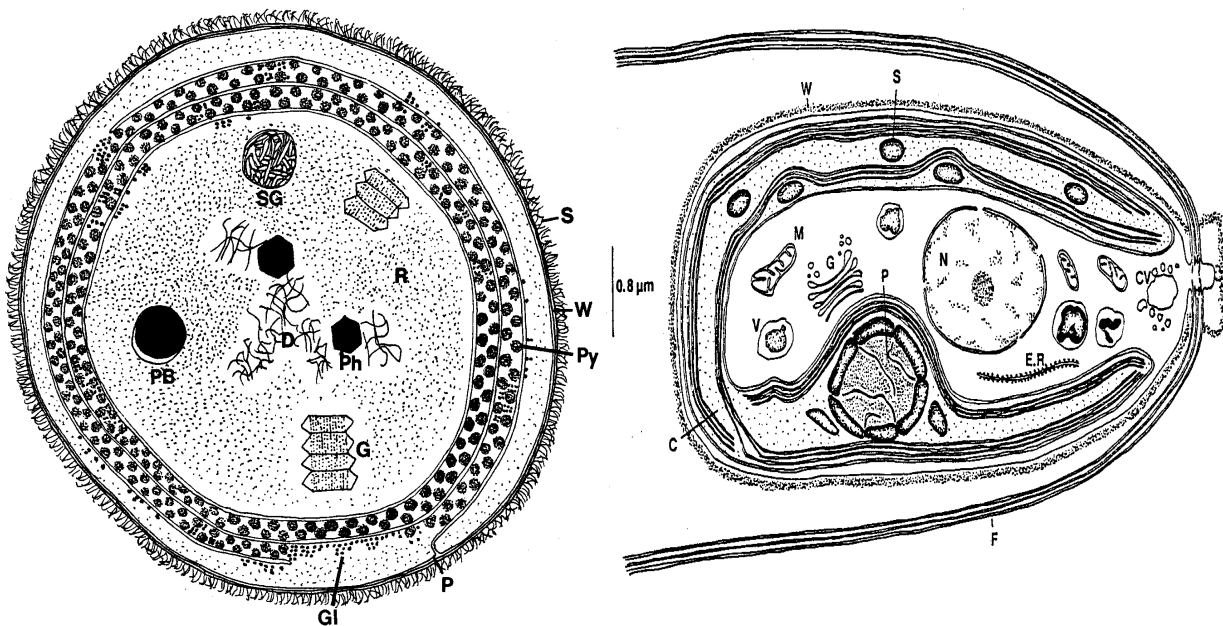
3.2 Δομή των κυττάρων των φυκών

Στα φύκη απαντώνται δύο βασικοί τύποι κυττάρων: τα προκαρυωτικά και τα ευκαρυωτικά. Τα τελευταία αποτελούν και το είδος της πλειοψηφίας των κυττάρων των φυκών : [Lee, 1999].

➡ **προκαρυωτικά:** χαρακτηρίζονται από παντελή έλλειψη πυρηνικής μεμβράνης. Δεν έχουν μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες, ενώ το πρωτόπλασμα τους έχει υφή πηκτής. Αναπαράγονται ασεξουαλικά. Διαθέτουν εκτός από χρωμοσωμικό και εξωχρωμοσωμικό DNA, που οργανώνεται σε μικρές κυκλικές κατασκευές, τα πλασμίδια. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι τα προκαρυωτικά μικροφύκη έχουν συχνά διαφορετικές χρωστικές από τις αντίστοιχες των ευκαρυωτικών.

- **ευκαρυωτικά:** χαρακτηρίζονται από υψηλή οργάνωση. Έχουν πυρηνική μεμβράνη και ένα πολύπλοκο σύστημα μεμβρανών στο εσωτερικό τους. Ευδιάκριτα και αυτόνομα μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες ανιχνεύονται σε ορισμένες κατηγορίες ευκαρυωτικών κυττάρων. Οι γενετικές πληροφορίες βρίσκονται κυρίως στα χρωμοσώματα του πυρήνα. Αποτελούνται από DNA και από ειδικές (ιστόνες) και μη ειδικές πρωτεΐνες. Επιπλέον μερικές γενετικές πληροφορίες περιέχονται και σε ορισμένα κυτταρικά οργανίδια. Η αναπαραγωγή τους γίνεται τόσο με ασεξουαλικό, όσο και με σεξουαλικό τρόπο [Μακρής, Κέκος & Χριστακόπουλος, 1999].

Στην παρακάτω Εικόνα 9 παρουσιάζονται δύο κύτταρα φυκών, ένα από την κάθε κατηγορία :



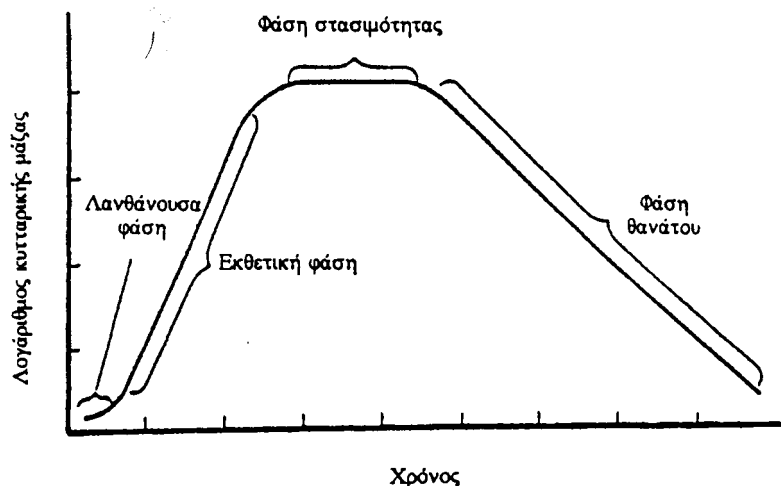
Εικόνα 9. : Παραδείγματα κυττάρων φυκών

Αριστερά: προκαρυωτικό κύτταρο ενός κυανοφύκου, όπου (D) ίνες από DNA, (G) κυστίδια αερίων, (GI) κόκκοι γλυκογόνου, (P) πλασμαλλήμα (εγκόλπωση πλασματικής μεμβράνης), (Ph) πολυεδρικό σώμα, (Py) φυκοβιλισώματα, (R) ριβοσώματα, (S) περίβλημα, (SG) κοκκοειδής δομή (cyanophycin granules), (W) κυτταρικό τοίχωμα

Δεξιά: ευκαρυωτικό κύτταρο (*Chlamidomonas*), όπου (C) χλωροπλάστης, (CV) συσταλά κενοτόπια, (E.R.) ενδοπλασματικό δίκτυο, (F) μαστίγιο, (G) συμπλέγματα golgi, (M) μιτοχόνδρια, (N) πυρήνας, (P) πυρηνοειδές, (S) άμυλο, (V) κενοτόπια, (W) κυτταρικό τοίχωμα [Lee, 1999].

3.3 Φάσεις κυτταρικής ανάπτυξης

Τα τυπικά στάδια της κυτταρικής ανάπτυξης σε μια διεργασία διαλείποντος έργου παρουσιάζονται στην Εικόνα 10. Η καλλιέργεια γίνεται σε περιορισμένη ποσότητα θρεπτικών υλικών και ο ρυθμός της εξαρτάται από τη συγκέντρωση ενός θρεπτικού συστατικού (υποστρώματος), έναντι του οποίου όλα τα άλλα βρίσκονται σε περίσσεια [Κέκος & Παπαγιαννάκος, 1999].



Εικόνα 10. Τυπικές φάσεις κυτταρικής ανάπτυξης. [Κέκος & Παπαγιαννάκος, 1999].

Λανθάνουσα φάση: πρόκειται για την αρχική φάση, όπου παρατηρείται μια καθυστέρηση στην ανάπτυξη. Οφείλεται στην προσαρμογή των κυττάρων στο νέο περιβάλλον και στην προετοιμασία της μεταβολικής μηχανής του κυττάρου (σύνθεση νέων ενζύμων), με σκοπό να χρησιμοποιήσει τις παρεχόμενες θρεπτικές ουσίες για τον καταβολισμό και τη βιοσύνθεση των απαραίτητων συστατικών. Προς το τέλος της φάσης αυτής παρατηρείται μια μεταβατική φάση, κατά τη διάρκεια της οποίας ορισμένος αριθμός κυττάρων αρχίζει να αναπτύσσει τους ενζυμικούς μεταβολικούς μηχανισμούς, καταναλώνοντας υπόστρωμα και παρουσιάζοντας μικρή ανάπτυξη.

Από τεχνολογική άποψη ενδιαφέρει η μείωση της χρονικής διάρκειας της λανθάνουσας φάσης. Η διάρκειά της εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως οι αλλαγές στη σύσταση ή στη συγκέντρωση του θρεπτικού μέσου και τα χαρακτηριστικά των κυττάρων, που χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου (είδος, ηλικία, μέγεθος).

Η ελαχιστοποίηση της διάρκειας της λανθάνουσας φάσης προϋποθέτει τη χρήση :

- ✘ εμβολίων με κύτταρα που βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης
 - ✘ καλλιέργειας εμβολίου σε θρεπτικά υλικά παραπλήσιας σύστασης με εκείνη της κύριας καλλιέργειας
 - ✘ μεγέθους εμβολίου 5-10 % της κύριας καλλιέργειας των κυττάρων.
- ➡ **Εκθετική ή λογαριθμική φάση:** κατά τη φάση αυτή όλα τα κύτταρα αναπτύσσονται με σταθερούς ρυθμούς –τουλάχιστον για το μεγαλύτερο μέρος της-, με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του πληθυσμού.
- ➡ **Φάση στασιμότητας:** χαρακτηριστικό της φάσης αυτής είναι η σταθεροποίηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Ο ρυθμός παραγωγής νέων κυττάρων συνεχώς μειώνεται, λόγω εξάντλησης του υποστρώματος και συσσώρευσης τοξικών ουσιών, και γίνεται ίσος με το ρυθμό θανάτου των κυττάρων. Οι παράγοντες, που καθορίζουν το πότε θα αρχίσει η φάση στασιμότητας είναι κυρίως το φως, τα θρεπτικά συστατικά, το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), που περιγράφονται αναλυτικότερα παρακάτω.
- ➡ **Φάση θανάτου:** στη φάση αυτή κυριαρχεί το φαινόμενο του θανάτου των κυττάρων.

3.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη καλλιιεργειών μικροφυκών

- ◆ **Φως:** η φωτεινή ενέργεια λαμβάνεται από τους φωτοαυτότροφους μικροοργανισμούς με τη μορφή πυκνής ροής φωτονίων, που καταλήγουν στην επιφάνεια της καλλιέργειας. Τα κύτταρα όμως απορροφούν μόνο ένα μέρος αυτής της ροής, το ποσοστό της οποίας είναι συνάρτηση πολλών παραγόντων, μερικοί από τους οποίους είναι η πυκνότητα και οι οπτικές ιδιότητες των κυττάρων, ο ρυθμός ανάδευσης και η απόσταση της καλλιέργειας από την φωτεινή πηγή [Richmond, 2004].

Καθώς ολοένα και περισσότερα φωτόνια απορροφούνται από τα κύτταρα της καλλιέργειας, παρατηρείται μια εκθετική αύξηση της πυκνότητάς τους (καλύτερη ανάπτυξη και γρηγορότερη διαίρεση), έως ότου να επιτευχθεί μια κρίσιμη τιμή φωτονίων, πέρα από την οποία επέρχεται κορεσμός, όσον αφορά την απορρόφηση νέων φωτονίων, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται η κυτταρική μάζα με σταθερό ρυθμό. Κι αυτό συνεχίζεται, έως ότου το φως που αντιστοιχεί σε κάθε κύτταρο ή η συγκέντρωση κάποιου συστατικού από το μέσο ανάπτυξης

αποκτήσουν χαμηλή τιμή, οπότε και αρχίζει η πτωτική πορεία ανάπτυξης της καλλιέργειας [Richmond, 2004].

Τα αποτελέσματα της έκθεσης των φωτοσυνθετικών μικροφυκών σε φως ελέγχονται ολοκληρωτικά από τη διαδικασία, που καλείται «φωτοεγκλιματισμός» ή αλλιώς «φωτοπροσαρμογή». Σε αυτήν τη διαδικασία τα κύτταρα των φυκών υφίστανται δυναμικές αλλαγές στη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, που έχει επιπτώσεις και στην αύξηση της βιομάζας. Σε συνθήκες χαμηλής έντασης φωτισμού, σε αντίθεση με τις αντίστοιχες υψηλής έντασης, παρατηρείται αύξηση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (LHCII) και μείωση των ενεργών κέντρων αντίδρασης, που οδηγεί σε χαμηλά επίπεδα τη μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα, αλλά και μείωση του σημείου αντισταθμίσεως μεταξύ αναπνοής και φωτοσύνθεσης [Kotzabasis et al., 1999].

Μετά από όλα αυτά, καταλαβαίνει κανείς ότι η προσπίπτουσα ακτινοβολία είναι μείζονος σημασίας, ειδικά σε συνθήκες υψηλής κυτταρικής πυκνότητας. Γι' αυτό είναι απαραίτητο να συνεκτιμηθούν οι παρακάτω παράγοντες:

- περιορισμοί για την φωτοσύνθεση των μικροφυκών σε συνθήκες υψηλής κυτταρικής πυκνότητας
- η διαθέσιμη ακτινοβολία κάποιες μέρες του έτους είναι επικίνδυνα υψηλή για τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό (φωτοαναστολή), ενώ σε άλλες περιπτώσεις είναι εξαιρετικά χαμηλή
- η διεισδυτικότητα του φωτός σε μία καλλιέργεια εξαρτάται κυρίως από την πυκνότητά της σε κύτταρα και μειώνεται σημαντικά με το βάθος, λόγω αυτοσκιασμού. Το 90 % των φωτονίων με μήκος κύματος 440–680 nm απορροφώνται από τα κύτταρα του πρώτου εκατοστόμετρου σε μία καλλιέργεια με 1 g βιομάζας/L
- ◆ **Θερμοκρασία:** η θερμοκρασία του κάθε κυττάρου ισούται με τη θερμοκρασία του μέσου ανάπτυξης της καλλιέργειας. Αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την αύξηση της βιομάζας, αφού επηρεάζει τους ρυθμούς των κυτταρικών αντιδράσεων, τη φύση του μεταβολισμού, τις θρεπτικές απαιτήσεις και τη σύσταση της βιομάζας [Richmond, 2000].

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη και δράση της κυτταρικής βιομάζας οφείλεται πρωτίστως στην εξάρτηση της δομής των συστατικών των

κυττάρων (ειδικότερα των πρωτεϊνών και των λιπιδίων) και του ρυθμού της δράσης από τη θερμοκρασία και δευτερευόντως από διάφορους μεταβολικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς, την εξειδίκευση των ενζυμικών δράσεων, τη διαπερατότητα και τη σύσταση των κυττάρων. [Richmond, 2000].

Η εξάρτηση της ανάπτυξης των φυκών από την θερμοκρασία ακολουθεί εκθετική αύξηση μέχρι να λάβει η θερμοκρασία μια βέλτιστη τιμή, πέρα από την οποία ο ρυθμός αύξησης της κυτταρικής βιομάζας μειώνεται δραματικά. [Richmond, 2000].

◆ **Θρεπτικά συστατικά:** το μέσο ανάπτυξης των φυκών επιβάλλεται να διαθέτει τις βέλτιστες συγκεντρώσεις σε θρεπτικά συστατικά. Γι' αυτό, είναι αναγκαίο για την παρασκευή του να ελέγχονται οι ακόλουθες παράμετροι :

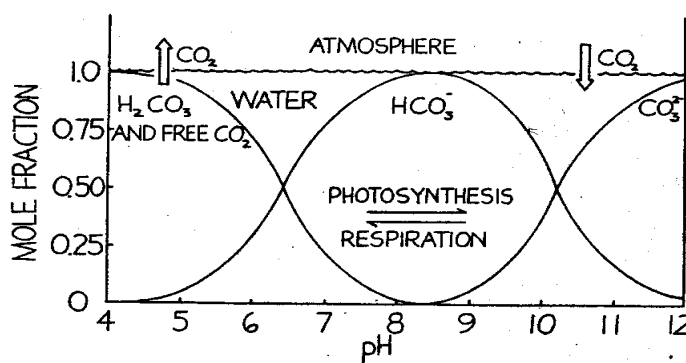
- ✘ η συνολική ποσότητα αλάτων να είναι παραπλήσια με εκείνη του φυσικού περιβάλλοντος του φύκου
- ✘ οι συγκεντρώσεις των ιόντων K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} , SO_4^- και Cl^- , να είναι οι μεγαλύτερες δυνατές, σύμφωνα με τον Πίνακα 2
- ✘ η πηγή άνθρακα, που είναι συνήθως είτε CO_2 είτε HCO_3^-
- ✘ η πηγή αζώτου, που συνήθως είναι τα νιτρικά, αλλά μπορεί να είναι και αμμωνία ή ουρία
- ✘ το pH
- ✘ τα ιχνοστοιχεία, καθώς και η παρουσία κάποιων χηλικών ενώσεων, όπως το EDTA
- ✘ οι βιταμίνες
- ✘ αν απαιτείται επιπλέον προσθήκη οργανικού (γλυκόζη, φρουκτόζη ή οξικό οξύ) ή ανόργανου άνθρακα για περαιτέρω ανάπτυξη. [Richmond, 2004].

Πίνακας 2. Πηγές και βέλτιστο εύρος συγκεντρώσεων των διαφόρων θρεπτικών συστατικών [Richmond, 2004].

Θρεπτικά στοιχεία	Ενώσεις	Εύρος συγκεντρώσεων σε μg ανά mg ξηρής βιομάζας
C	CO_2 , HCO_3^{2-} , CO_3^- , οργανικά μόρια	175 - 650
O	O_2 , H_2O , οργανικά μόρια	205 - 330
H	H_2O , οργανικά μόρια, H_2S	29 - 100

N	N ₂ , NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , αμινοξέα, πουρίνες, πυριμιδίνες, ουρία	10 - 140
Na	Ανόργανα άλατα (NaCl, Na ₂ SO ₄ , Na ₃ PO ₄)	0,4 - 4,7
K	Ανόργανα άλατα (KCl, K ₂ SO ₄ , K ₃ PO ₄)	1 - 75
Ca	Ανόργανα άλατα (CaCO ₃ , Ca ²⁺)	0,0 - 80
P	Ανόργανα άλατα, φωσφορικό νάτριο και κάλιο, πενταένυδρο γλυκεροφωσφορικό νάτριο	0,5 - 33
S	Ανόργανα άλατα, MgSO ₄ .7H ₂ O, αμινοξέα	1,5 - 16
Mg	Ανόργανα άλατα, άλατα με CO ₂ ³ , SO ₄ ²⁻ ή Cl ⁻	0,5 - 75
Cl	Άλατα με Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ ή NH ₄ ⁺	Ανεπαρκείς πληροφορίες
Fe	FeCl ₃ , Fe(NH ₄) ₂ SO ₄ , κίτρικος σίδηρος	0,2 - 34
Zn	Άλατα με SO ₄ ²⁻ ή Cl ⁻	0,005 - 1,0
Mn	Άλατα με SO ₄ ²⁻ ή Cl ⁻	0,02 - 0,24
Br	Άλατα με Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ ή NH ₄ ⁺	Ανεπαρκείς πληροφορίες
Si	Na ₃ SiO ₃ .9H ₂ O	0 - 230
B	H ₃ BO ₃	0,001 - 0,25
Mo	Άλατα με Na ⁺ ή NH ₄ ⁺	0,0002 - 0,001
V	Na ₃ VO ₄ .16H ₂ O	Ανεπαρκείς πληροφορίες
Sr	Άλατα με SO ₄ ²⁻ ή Cl ⁻	Ανεπαρκείς πληροφορίες
Al	Άλατα με SO ₄ ²⁻ ή Cl ⁻	Ανεπαρκείς πληροφορίες
Rb	Άλατα με SO ₄ ²⁻ ή Cl ⁻	Ανεπαρκείς πληροφορίες
Li	Άλατα με SO ₄ ²⁻ ή Cl ⁻	Ανεπαρκείς πληροφορίες
Cu	Άλατα με SO ₄ ²⁻ ή Cl ⁻	0,006 - 0,3
Co	Βιταμίνη B ₁₂ , άλατα με SO ₄ ²⁻ ή Cl ⁻	0,0001 - 0,2
I	Άλατα με Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ ή NH ₄ ⁺	Ανεπαρκείς πληροφορίες
Se	Na ₂ SeO ₃	Ανεπαρκείς πληροφορίες

- ◆ **Ανάδευση:** με την ανάδευση διατίθενται ομοιόμορφα σε όλα τα κύτταρα της καλλιέργειας το φως και τα θρεπτικά συστατικά. Συνήθως, οι καλλιέργειες των φυκών αναδεύονται, είτε με παροχή φυσαλίδων αέρα, που είναι δυνατόν να λειτουργεί ταυτόχρονα και για τη μεταφορά του αερίου διοξειδίου του άνθρακα, είτε με μηχανικό τρόπο [Laing, 1991]
- ◆ **Διοξείδιο του άνθρακα:** όλα τα φύκη καλλιεργούνται χημο- ή φωτολιθοτροφικά με τη χρήση διαλελυμένου διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) ή με ένυδρα άλατά του, με σκοπό τη σύνθεση οργανικών συστατικών. Στο νερό, το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) μπορεί να εμφανιστεί ως H_2CO_3 , HCO_3^- ή ως CO_3^{2-} , ανάλογα με την τιμή του pH, όπως φαίνεται στην ακόλουθη Εικόνα 11 [Richmond, 2004].



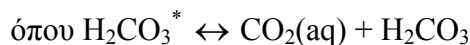
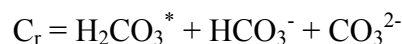
Εικόνα 11. Επίδραση της φωτοσύνθεσης και της αναπνοής στο pH, μορφές ανόργανου άνθρακα στο νερό και ανταλλαγή CO_2 από τη διεπιφάνεια αέρα-νερού. [Richmond, 2004]

Στα περισσότερα φυσικά υδάτινα περιβάλλοντα το κυριότερο ρυθμιστικό σύστημα του pH είναι το $\text{CO}_2\text{-H}_2\text{CO}_3\text{-HCO}_3^-\text{-CO}_3^{2-}$, που αποτελεί ταυτόχρονα ένα πολύ χρήσιμο ρυθμιστικό σύστημα για την αύξηση της βιομάζας σε καλλιέργειες φυκών, συντηρώντας τα σε ένα αλκαλικό pH. Η ολική διαθέσιμη συγκέντρωση διαλελυμένου ανόργανου άνθρακα δίνεται από την ακόλουθη εξίσωση :

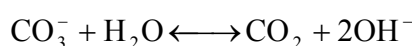
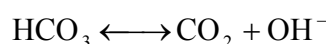
$$C_T = \text{CO}_2(\text{aq}) + \text{H}_2\text{CO}_3 + \text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-}$$

Η σχετική συγκέντρωση του ανόργανου άνθρακα θα καθορίσει το pH, όπως φαίνεται στην παραπάνω Εικόνα 11, αλλά και το αντίστροφο. Στην ισορροπία η συγκέντρωση του $\text{CO}_2(\text{aq})$ είναι πολύ μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση του H_2CO_3 και η συγκέντρωση του $\text{CO}_2(\text{aq})$ μπορεί να υπολογιστεί από το

άθροισμα των ένυδρων και άνυδρων μορφών του CO₂. Έτσι έχουμε την ακόλουθη σχέση :



Το σύστημα των ανθρακικών αλάτων μπορεί να προμηθεύει με CO₂ μέσω των ακόλουθων δράσεων :



Όμως, παράλληλα με την επιπλέον παροχή του διοξειδίου του άνθρακα, συσσωρεύονται και υδροξυλιόντα, που επηρεάζουν το pH της καλλιέργειας. Γι' αυτό και προστίθεται στο μέσο της καλλιέργειας κάποιο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να διατηρεί το pH της σε σταθερά επίπεδα. [Richmond, 2004]

- ◆ **Αλατότητα:** τα φυτικά κύτταρα είναι υδρολυτικά συστήματα, που πραγματοποιούν χημικές αντιδράσεις σε υδάτινα μέσα. Τα κύτταρα διαχωρίζονται από το περιβάλλον τους με μια μεμβράνη, που είναι διαπερατή από το νερό, όχι όμως και από τις διαλυτές ουσίες. Αυξημένη αλατότητα στο μέσο ανάπτυξης προκαλεί σύγχυση στις λειτουργίες του κυττάρου, αφού παραβιάζονται οι απαιτήσεις του σε νερό. Έτσι απαιτείται η συντήρηση υδάτωσης των κυττάρων, που επιτυγχάνεται με φυσική κυκλοφορία του νερού διαμέσου της μεμβράνης.

Η αντοχή των φυκών στις διάφορες αλατότητες κυμαίνεται σε πολύ μεγάλο εύρος. Έτσι, ενώ σε μια τιμή αλατότητας ένα είδος μπορεί να προσαρμόζεται με μεγάλη ευκολία, ένα άλλο είναι δυνατόν να καταστραφεί. [Richmond, 2000].

3.5 Γιατί επιλέγονται τα φύκη;

Σε αντίθεση με τα φυτά, τα φύκη εμφανίζουν ανθεκτικότητα στις αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες και δεν αναστέλλεται η φωτοσυνθετική τους δραστηριότητα παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων διοξειδίου του άνθρακα (CO₂).

Μάλιστα για το ίδιο ποσό ακτινοβολίας τα φύκη δεσμεύουν μεγαλύτερο ποσό διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) σε σύγκριση με ένα φυτό ίσου μεγέθους. Επίσης, ορισμένα φύκη μπορούν να μεταβολίσουν ρύπους, όπως τα οξείδια του αζώτου και του θείου ή οργανικές ενώσεις [Ellis, 1977; Klekner & Kosaric, 1992; Tikoo et al., 1997; Cerniglia et al., 1980; Warshawsky et al., 1995; Warshawsky et al., 1998].

Τα ευνοϊκά αυτά χαρακτηριστικά των φυκών οφείλονται στην εξελικτική τους προέλευση. Ειδικά τα φύκη και τα κυανοβακτήρια τα τελευταία εκατομμύρια χρόνια χρειάστηκε να επιβιώσουν σε πολύ πιο αντίξοες συνθήκες από της σημερινής ατμόσφαιρας. Όχι μόνο άντεξαν τις τοξικές συγκεντρώσεις CO₂, NH₃, HCN, αλλά και συνέβαλαν στην βελτίωση της ατμοσφαιρικής σύστασης και την μετατροπή της υδρογείου σε έναν πιο φιλόξενο πλανήτη. Κυρίως το οξυγόνο, που παράχθηκε από αυτές τις κατηγορίες οργανισμών, επέτρεψε και την εξέλιξη πιο πολύπλοκων ειδών, μεταξύ των οποίων και του ανθρώπινου.

Συγκεντρωτικά, θα έλεγε κανείς, ότι τα πλεονεκτήματα των μικροφυκών είναι τα εξής :

- είναι εύκολη η καλλιέργεια και η συλλογή τους σε υδατικά διαλύματα
- εμφανίζουν ταχείς ρυθμούς πολλαπλασιασμού (πολλές φορές ανά ημέρα), υψηλή παραγωγικότητα (πολλές εκατοντάδες τόνους ανά εκτάριο ανά έτος) και συνεχίζουν να αναπτύσσονται ακόμη και σε μεγάλης πυκνότητας καλλιέργειες (αρκετές δεκάδες γραμμάρια ανά λίτρο)
- αναπτύσσονται σε μεγάλο εύρος αλατότητας (ευρύαλοι οργανισμοί) και θερμοκρασιακών διακυμάνσεων, οπότε είναι κατάλληλοι για ένα μεγάλο εύρος κλιματολογικών συνθηκών (10–40 °C)
- χάρη στο μικροσκοπικό τους μέγεθος μπορούν εύκολα να χωρέσουν σε εξαιρετικά μικρά ή λεπτά μέσα, όπως σταγονίδια, φυσαλίδες ή αερολύματα
- εμφανίζουν ανθεκτικότητα στις υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας και διατηρούν υψηλές φωτοσυνθετικές αποδόσεις, χωρίς να εμφανίζουν φωτοαναστολή, όπως άλλα φυτικά είδη
- η βιοχημική τους σύσταση είναι κατάλληλη για πολλές εφαρμογές. Είναι εφικτή η χρήση τους ως πηγή υψηλής αξίας προϊόντων, όπως η παραγωγή αντιοξειδωτικών, χρωστικών, λιπαρών οξέων υψηλής διατροφικής αξίας.

Κεφάλαιο 4: Φωτοσύνθεση

4.1 Γενικά

Φωτοσύνθεση είναι η φυσικοχημική διαδικασία μέσω της οποίας τα φυτά και τα φωτοσυνθετικά βακτήρια χρησιμοποιούν την ηλιακή ενέργεια για να συνθέσουν οργανικές ενώσεις. Στα φυτά και σε ορισμένα είδη βακτηρίων, η φωτοσυνθετική διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση οξυγόνου και τη δέσμευση διοξειδίου του άνθρακα από την ατμόσφαιρα, το οποίο χρησιμοποιείται για τη σύνθεση υδατανθράκων (οξυγονική φωτοσύνθεση). Άλλα είδη βακτηρίων χρησιμοποιούν την ηλιακή ενέργεια για να συνθέσουν οργανικές ενώσεις, αλλά δεν παράγουν οξυγόνο (ανοξυγονική φωτοσύνθεση).

Η φωτοσύνθεση μπορεί να χωριστεί σε δύο στάδια:

- Φωτεινές αντιδράσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν:
 - ✘ παραγωγή του ισχυρού αναγωγικού NADPH
 - ✘ σχηματισμός ATP, που είναι συζευγμένος με τη ροή των ηλεκτρονίων από το νερό στο NADP^+
 - ✘ έκλυση O_2 , που είναι παραπροϊόν της φωτόλυσης του νερού
- Σκοτεινές αντιδράσεις, οι οποίες χρησιμοποιούν το NADPH και το ATP για να μετατραπεί η ανόργανη ύλη (CO_2) σε οργανική (υδατάνθρακες).

4.2 Φωτοσυνθετική μονάδα

Χωροταξικά, ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός (Εικόνα 12) εντοπίζεται στους χλωροπλάστες. Η φωτοσυνθετική μονάδα αποτελείται από τρία σύμπλοκα χρωστικών/πρωτεϊνών: το φωτοσύστημα II (PSII), με το σύμπλοκο συλλογής του φωτός (Light Harvesting Complex, LHCI), το φωτοσύστημα I (PSI) και το κυτόχρωμα b_6/f (cyt b_6/f).

➤ Φωτοσύστημα II

Το PSII είναι ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, που αποτελείται από δύο διακριτά λειτουργικά ενζυμικά σύμπλοκα: το σύμπλοκο συλλογής φωτός (LHC II) και τον πυρήνα του PSII.

Το σύμπλοκο LHCI περιέχει 6 περίπου πρωτεΐνες, με μοριακά βάρη 25-28 kD και μόρια χλωροφύλλης a, χλωροφύλλης b και καροτενοειδών. Το σύμπλοκο LHCI εντοπίζεται περιφερειακά του PSII, συνδέει τις μεμβράνες θυλακοειδών

και ελέγχει την κατανομή της ενέργειας μεταξύ του PSII και του PSI. Το σύμπλοκο LHCII περιέχει σχεδόν όλη τη χλωροφύλλη b και το 50 % της χλωροφύλλης a του PSII.

Το LHCII, *in vivo*, βρίσκεται σε τριμερή μορφή και γύρω από κάθε κέντρο αντίδρασης υπάρχουν οκτώ τριμερή LHCII.

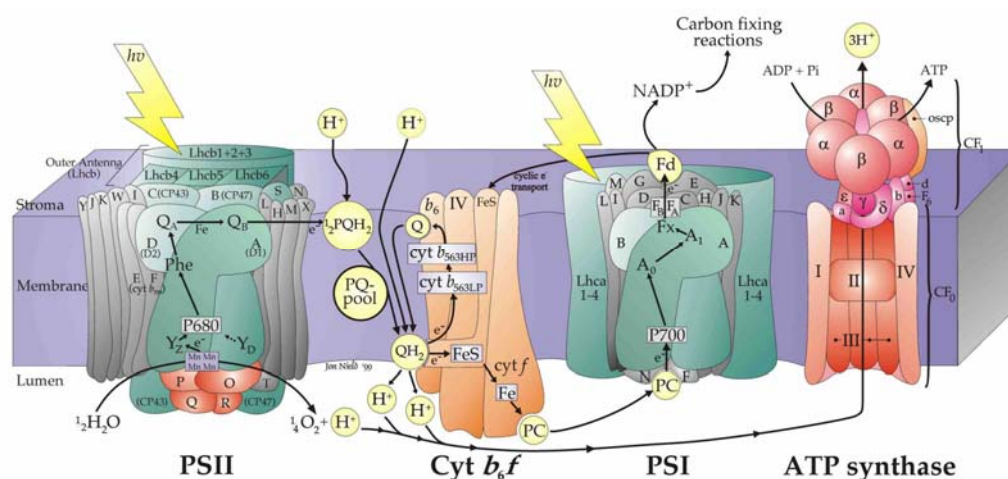
Ο πυρήνας του PSII είναι ένα πολυπεπτιδικό σύμπλοκο που περιλαμβάνει το κέντρο αντίδρασης, όπου πραγματοποιείται ο πρωτογενής διαχωρισμός φορτίου και το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου.

➡ Φωτοσύστημα I

Στους ευκαρυωτικούς φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, το PSI αποτελείται από το σύμπλοκο συλλογής φωτός (LHCI) και τον πυρήνα του PSI. Το σύμπλοκο LHCI δρα ως βοηθητική κεραία, η οποία συγκεντρώνει το φως και μεταφέρει την ενέργειά του στον πρωτογενή ηλεκτρονιοδότη του κέντρου αντίδρασης, P₇₀₀, που βρίσκεται στον πυρήνα του PSI. Εκτός από το P₇₀₀, το πρωτεϊνικό σύμπλοκο του πυρήνα, περιέχει επίσης τις χρωστικές και τους οξειδοαναγωγικούς παράγοντες, που είναι απαραίτητοι για να επιτευχθεί η μεταφορά ηλεκτρονίων από το PSI στο NADP⁺.

➡ Κυτόχρωμα b₆/f

Το κυτόχρωμα b₆/f αποτελεί το ενδιάμεσο πρωτεϊνικό σύμπλοκο στη μη κυκλική μεταφορά ηλεκτρονίων. Αποτελείται από τέσσερις πρωτεΐνες: το κυτόχρωμα b₆, το κυτόχρωμα f, την υπομονάδα IV και μια πρωτεΐνη Fe-S. Τα ηλεκτρόνια της πλαστοκινόνης του Φωτοσυστήματος II μεταφέρονται μέσω του πρωτεϊνικού συμπλόκου cyt b₆/f στην πλαστοκυανίνη και από εκεί στο PSI.



Εικόνα 12. Δομική περιγραφή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Κεφάλαιο 5: Βιοαποικοδόμηση

5.1 Γενικά για τη βιοαποικοδόμηση

Στην εποχή μας, χρησιμοποιούνται περισσότερα από 70.000 συνθετικά οργανικά χημικά, που μερικά μόνο έχουν ελεγχθεί για τις συνέπειές τους στην ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον. Έτσι, καθημερινά, αποκαλύπτονται οι βλαβερές τους συνέπειες, με αποτέλεσμα να απαγορεύεται η εμπορική τους παραγωγή και να γίνονται προσπάθειες εύρεσης εναλλακτικών χημικών με λιγότερο καταστροφικές συνέπειες. Τέτοια, συνήθως, είναι αυτά, που μπορούν να βιοαποικοδομηθούν.

Η βιοαποικοδόμηση, στην ουσία, οδηγεί σε αποτοξικοποίηση, με βιολογικές δράσεις, των διαφόρων χημικών ενώσεων, ώστε σε περίπτωση απόθεσής τους στο περιβάλλον να μην επηρεαστούν οι ζωντανοί οργανισμοί και τα οικοσυστήματά τους.

Οι περισσότερες φυσικές και χημικές οργανικές ενώσεις βιοαποικοδομούνται από τους μικροοργανισμούς, κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού τους, αφού τους βοηθούν στην κάλυψη των ενεργειακών τους αναγκών, ώστε να αναπτυχθούν. Ένα μέρος από το οργανικό υλικό, που λειτουργεί ως πηγή ηλεκτρονίων και ενέργειας, μετατρέπεται σε οξειδωμένα τελικά προϊόντα, μέσω οξειδοαναγωγικών δράσεων, ενώ το υπόλοιπο συντίθεται σε κυτταρικό υλικό. Αυτού του είδους οι μετατροπές λαμβάνουν χώρα σε αερόβιες συνθήκες, στις οποίες το οξυγόνο λειτουργεί ως αποδέκτης ηλεκτρονίων. Όμως μπορούν να πραγματοποιηθούν και σε αναερόβιες συνθήκες. Σε αυτήν την περίπτωση τον ρόλο του δέκτη ηλεκτρονίων αναλαμβάνουν νιτρικά ή θειικά άλατα, διοξείδιο του άνθρακα, οξειδωμένα ανόργανα στοιχεία ή οργανικές ενώσεις.

Βέβαια, υπάρχουν και μερικές φυσικές και συνθετικές οργανικές ενώσεις, που αντιστέκονται στη βιοαποικοδόμηση. Σε άλλες περιπτώσεις, η ένωση μπορεί να βιομετατρέπεται, αλλά η δομή της να εμποδίζει τη βιομετατροπή να γίνει μέρος του συστήματος του μεταβολισμού του μικροοργανισμού [Rittmann & McCarty, 2001].

5.2 Βιοαποικοδόμηση αρωματικών ενώσεων

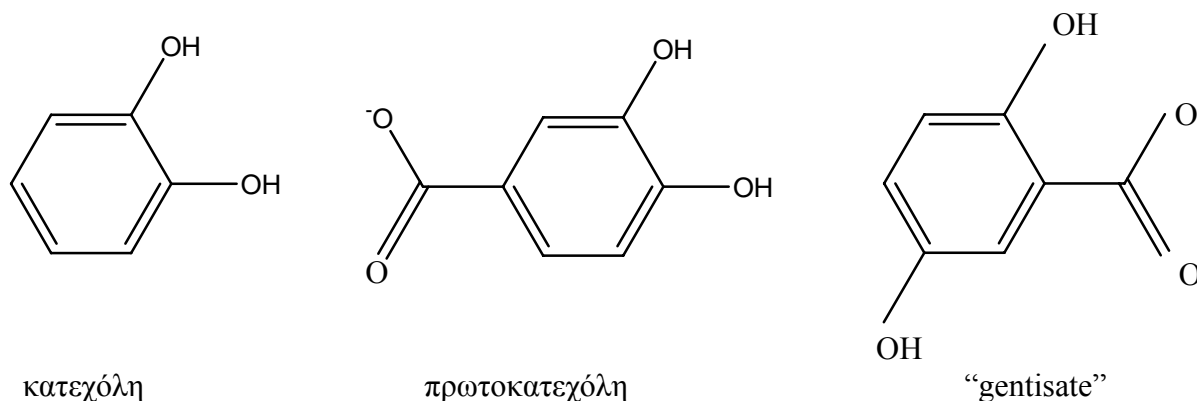
Οι αρωματικές ενώσεις εμφανίζονται ευρέως στο περιβάλλον, καθώς παράγονται τόσο από φυσικές, όσο και από ανθρωπογενείς πηγές. Φυσικές πηγές των αρωματικών ενώσεων είναι τα αρωματικά αμινοξέα (φαινυλαλανίνη, θρυπτοφάνη, τυροσίνη), ενώσεις λιγνίνης και συστατικά από απολιθώματα ορυκτελαίου και

άνθρακα. Το μεγαλύτερο μέρος όμως των αρωματικών ενώσεων προέρχεται από ανθρωπογενείς πηγές, όπως είναι η πυρόλυση των οργανικών ενώσεων και η χημική σύνθεση [Rehm et. al., 2000].

Η βιοαποικοδόμηση των αρωματικών ουσιών πραγματοποιείται με τη βοήθεια μιας μεγάλης ποικιλίας ενζύμων, ανάμεσα στα οποία ανήκουν τα ένζυμα υδροξυλίωσης, αφαλογόνωσης, αφυδρογόνωσης και υδρόλυσης, μέσω δύο κεντρικών μεταβολικών μονοπατιών : το όρθο- και το μέτα-.

- **όρθο-μονοπάτι:** τα κύρια μεταβολικά προϊόντα αυτού του μονοπατιού είναι η κατεχόλη, το πρωτοκατεχουικό και το “gentisate” (σαλικυλικό οξύ)
- **μέτα-μονοπάτι:** τα κύρια μεταβολικά προϊόντα αυτού του μονοπατιού είναι η κατεχόλη, το πρωτοκατεχουικό και παράγωγα αυτών.

Στην Εικόνα 13 παρουσιάζονται οι συντακτικοί τύποι των προαναφερθέντων παραγώγων.



Εικόνα 13. : Συντακτικοί τύποι της κατεχόλης, του πρωτοκατεχουικού και του “gentisate” (σαλικυλικό οξύ)

5.2.1 Βιοαποικοδόμηση φαινόλης

Η πιο διαδεδομένη αρωματική ένωση στη φύση είναι η φαινόλη. Οι μικροοργανισμοί, που την βιοαποικοδομούν, είναι άλλοι αερόβιοι και άλλοι αναερόβιοι. Για τους αερόβιους μικροοργανισμούς το μεταβολικό μονοπάτι της βιοαποικοδόμησης είναι πλέον γνωστό, σε αντίθεση όμως με τους αναερόβιους, όπου οι πληροφορίες είναι πολύ περιορισμένες ακόμα.

5.2.1.1 Αερόβια βιοαποικοδόμηση φαινόλης

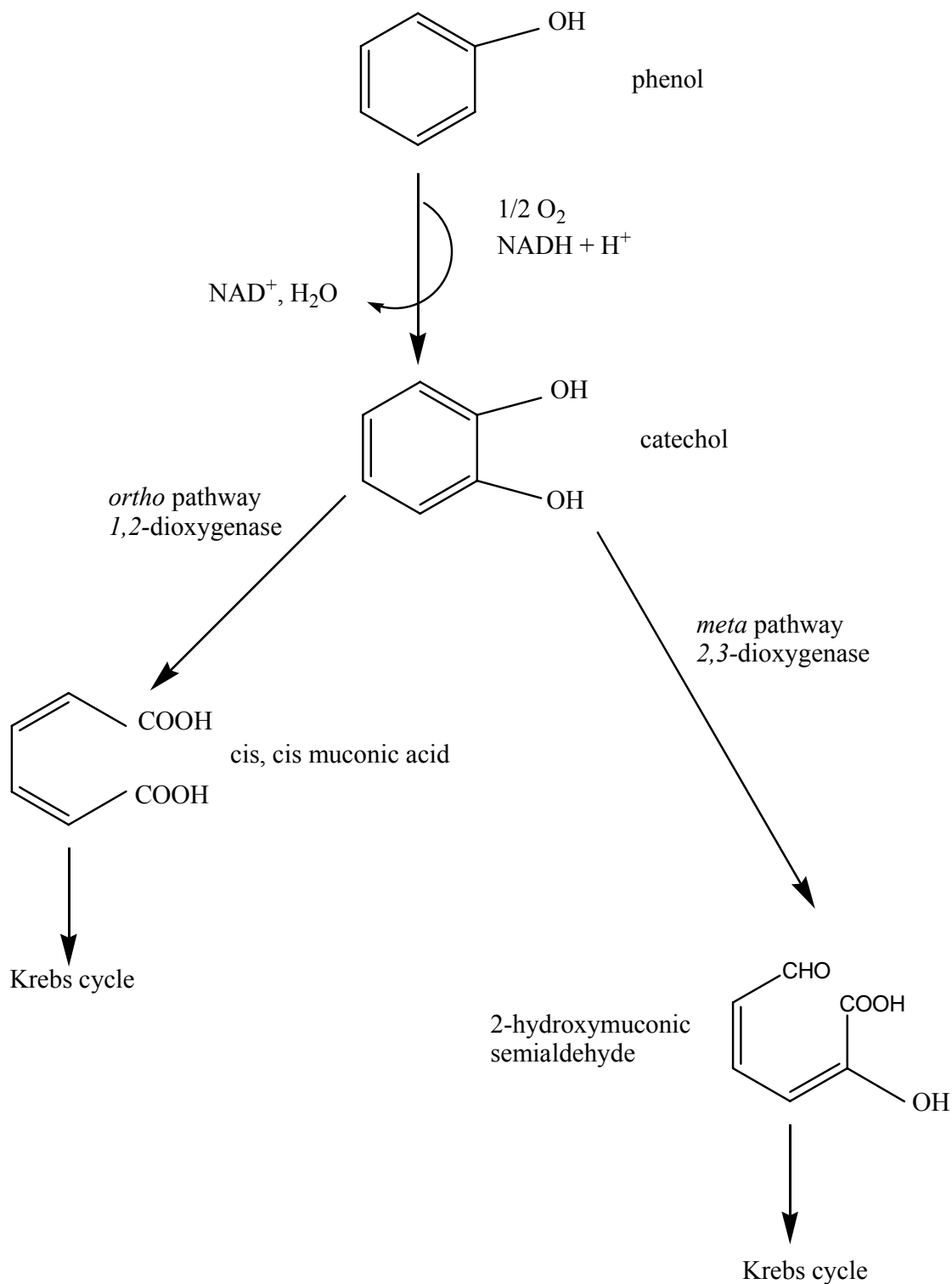
Το πρώτο βήμα για την βιοαποικοδόμηση της φαινόλης από αερόβιους μικροοργανισμούς είναι η εισαγωγή ενός μοριακού οξυγόνου στην όρθο θέση της, με τη δράση του ενζύμου υδροξυλάση της φαινόλης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας διυδροδιόλης, της κατεχόλης. Ακολουθεί η σχάση του δακτυλίου στο δεσμό που πρόσκειται ή που βρίσκεται ανάμεσα στα δύο υδροξύλια της κατεχόλης, οπότε σχηματίζεται 2-υδροξυμουκονικοημιαλδεϋδη ή *cis,cis* μουκονικό οξύ αντίστοιχα. Το ποιο από τα δύο αυτά μονοπάτια θα πραγματοποιηθεί, τελικά, εξαρτάται μόνο από τον υπεύθυνο, για την εκάστοτε βιοαποικοδόμηση, μικροοργανισμό. Και τα δύο προϊόντα, του όρθο και μέτα μονοπατιού, υφίστανται περαιτέρω μεταβολή προς κάποια ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου του Krebs.

Η αερόβια βιοαποικοδόμηση της φαινόλης αποδίδεται στην Εικόνα 14.

Μερικοί από τους αερόβιους μικροοργανισμούς, που βρέθηκαν ότι βιοαποικοδομούν την φαινόλη, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3, όπου αναφέρεται και το μονοπάτι, που ακολουθείται για την σχάση του δακτυλίου.

Πίνακας 3 : Μικροοργανισμοί υπεύθυνοι για την αερόβια βιοαποικοδόμηση της φαινόλης.

Οργανισμός	Μονοπάτι	Αναφορά
Bacteria		
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	όρθο	Evans, 1947
<i>Pseudomonas putida U</i>	μέτα	Dagley and Gibson, 1965
<i>Pseudomonas aeruginosa T1</i>	μέτα	Ribbons, 1970
<i>Ralstonia eutropha</i> (<i>Alcaligenes eutrophus</i>)	μέτα	Johnson and Stanier, 1971
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	μέτα	Buswell and Twomey, 1975
<i>Streptomyces setonii</i>	όρθο	Antai and Crawford, 1983
<i>Pseudomonas sp. EST 1001</i>	όρθο	Kivisaar et al., 1989
<i>Pseudomonas sp. CF600</i>	μέτα	Shingler et al., 1989
<i>Pseudomonas pickettii PK01</i>	μέτα	Kukor and Olsen, 1990
Eucarya		
<i>Trichosporon cutaneum</i>	όρθο	Neujahr and Varga, 1970
<i>Candidatropicalis</i>	όρθο	Neujahr et al., 1974



Εικόνα 14. Βιοχημικό μονοπάτι αερόβιας βιοαποικοδόμησης της φαινόλης [van Schie & Young, 2000]

5.2.1.2 Αναερόβια βιοαποικοδόμηση φαινόλης

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι πληροφορίες για την αναερόβια βιοαποικοδόμηση της φαινόλης είναι αρκετά περιορισμένες. Η πρώτη αναφορά στην

αναερόβια βιοαποικοδόμησης αυτής της χημικής ένωσης ενίσχυσε την άποψη, ότι λαμβάνει χώρα κάτω από μεθανιογενείς συνθήκες, και αργότερα κάτω από συνθήκες περιορισμένες σε νιτρικά ή σε θειικά ή σε σίδηρο.

Τα διάφορα μονοπάτια, που προτείνονται, για την αναερόβια βιοαποικοδόμηση της φαινόλης είναι ανάλογα με εκείνα της αερόβιας βιοαποικοδόμησης, με τη διαφορά ότι το «σπάσιμο» του δακτυλίου γίνεται υπό μεθανιογενείς ή απονιτρωτικές συνθήκες.

Στον Πίνακα 4 αναφέρονται μερικοί αναερόβιοι μικροοργανισμοί, που είναι υπεύθυνοι για την αναερόβια βιοαποικοδόμηση της φαινόλης, καθώς και οι συνθήκες κάτω από τις οποίες αυτή πραγματοποιείται.

Πίνακας 4 : Μικροοργανισμοί υπεύθυνοι για την αναερόβια βιοαποικοδόμηση της φαινόλης [van Schie & Young, 2000].

Είδος και στέλεχος	Συνθήκες	Αναφορά
<i>Thauera aromatica</i> K127, S100	έλλειψη νιτρικών	Tschech and Fuchs, 1987
<i>Azoarcus</i> sp. PbN1, ToN1	έλλειψη νιτρικών	Rabus and Widdel, 1995
<i>Azoarcus</i> sp. PH002, GR23, FL05	έλλειψη νιτρικών	Van Schie and Young, 1998
<i>Desulfobacterium</i> <i>phenilicum</i>	έλλειψη θεικών	Bak and Widdel, 1986
<i>Desulfotomaculum</i> sp. Groll	έλλειψη θεικών	Kuever et al., 1993
<i>Presumed Desulfovibrio</i> sp.	έλλειψη θεικών	Boopathy, 1995
<i>Geobacter metallireducens</i> GS15	έλλειψη σιδήρου	Lovley and Lonergan, 1990

5.3 Βιοαποικοδόμηση αλοαρωματικών ενώσεων

Στη βίωση, περίπου 1.500 διαφορετικές αλοαρωματικές ενώσεις είναι γνωστές. Παράγονται ευρέως και ελευθερώνονται από φυτά, ζώα, μικροοργανισμούς και φυσικές διαδικασίες καύσης, όπως αυτές που λαμβάνουν χώρα στα ηφαίστεια, στους ωκεανούς και στις πυρκαγιές των δασών. Σε μερικές περιπτώσεις οι συγκεντρώσεις των αλοαρωματικών ενώσεων, που παράγονται από αυτές τις φυσικές πηγές, ξεπερνούν κατά πολύ εκείνες, που προέρχονται από τις ανθρωπογενείς.

Η βιοαποικοδόμηση των αλοαρωματικών ενώσεων, υπό αερόβιες συνθήκες, ακολουθεί δύο διαφορετικούς μηχανισμούς. Σύμφωνα με τον πρώτο μετατοπίζεται το αλογόνο κατά τη διάρκεια της αρχικής δράσης της διοξυγονάσης, οδηγώντας σε μη αλογονωμένη ή σε ελαφρά αλογονωμένη κατεχόλη, η οποία με τη σειρά της βιοαποικοδομείται σύμφωνα με το όρθο μονοπάτι. Αντίθετα, στον δεύτερο μηχανισμό ο αρωματικός δακτύλιος προσβάλλεται από μονοοξυγονάσες ή διοξυγονάσες σε μια ελεύθερη θέση του, με αποτέλεσμα το σχηματισμό αλογονωμένης κατεχόλης.

5.3.1 Βιοαποικοδόμηση χλωροφαινόλων

Η χλωροφαινόλη αποτελεί μια ένωση, που έχει ευρύτατα μελετηθεί, όσον αφορά τη βιοαποικοδόμησή της. Συγκεκριμένα έχουν μελετηθεί 19 διαφορετικά ισομερή της. Η αποδόμησή της πραγματοποιείται είτε αερόβια, είτε με αναγωγική αφαλογόνωση. Όμως η τελευταία οδηγεί σε συσσώρευση μεταβολικών προϊόντων και όχι σε πλήρη αποδόμηση.

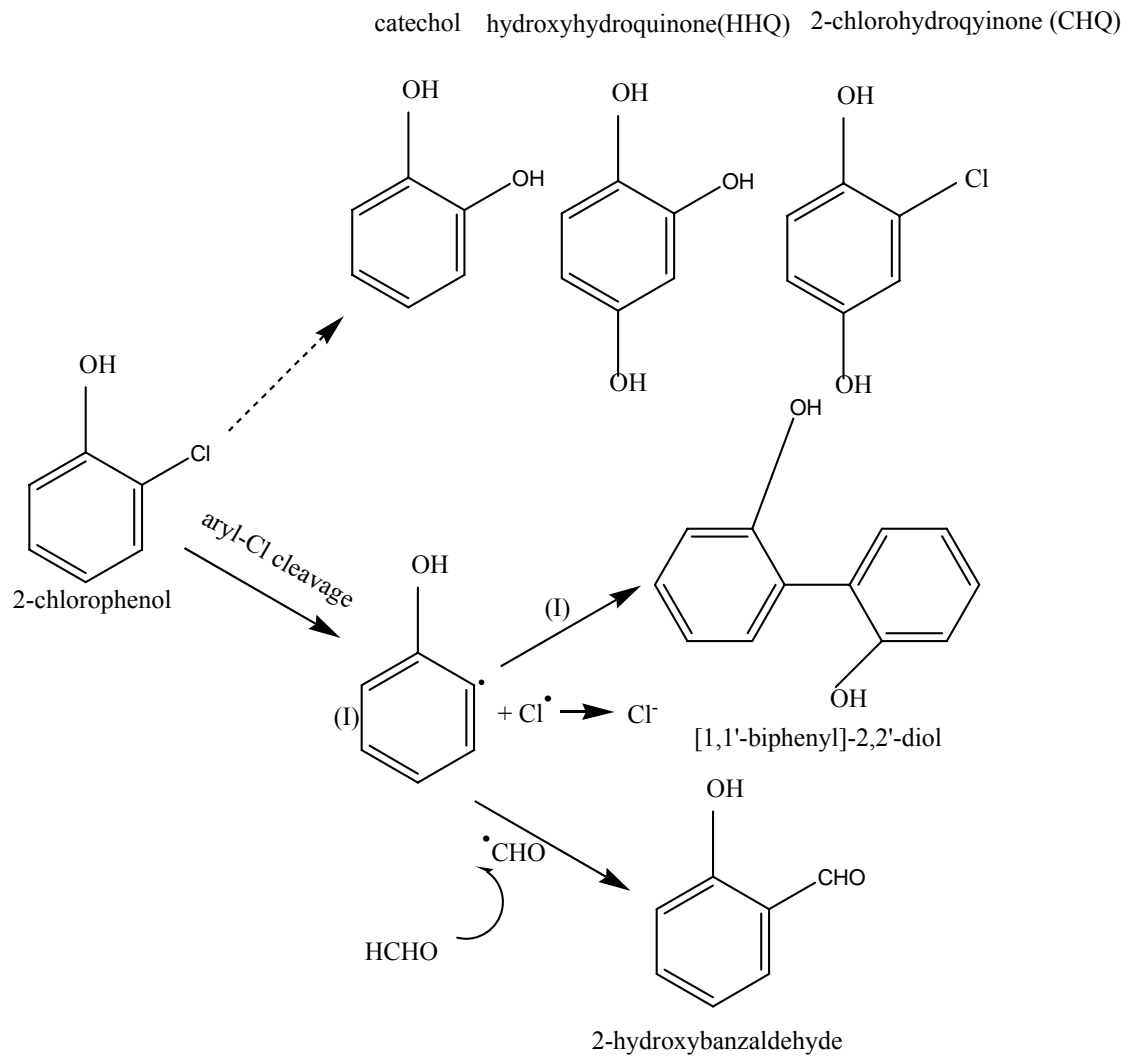
Οι χλωροφαινόλες με ένα και δύο άτομα χλωρίου βιοαποικοδομούνται με υδροξυλίωση προς χλωροκατεχόλες, που με τη σειρά τους αποδομούνται μέσω του όρθου μονοπατιού. Στις περισσότερες χλωριωμένες φαινόλες η υδροξυλίωση λαμβάνει χώρα στην πάρα θέση. Από την παραγόμενη υδροκινόνη ένα άτομο χλωρίου μπορεί να αντικατασταθεί από ένα υδροξύλιο προς σχηματισμό υδροξυυδροκινόνης και η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται τόσες φορές, όσα είναι τα άτομα χλωρίου [Rehm et al., 2000].

Ένα πιθανό μονοπάτι βιοαποικοδόμησης της 2-χλωροφαινόλης είναι αυτό, που απεικονίζεται στην Εικόνα 15.

Σε πρώτη φάση, το μόριο της 2-χλωροφαινόλης υποβάλλεται σε ομολυτικό σχάσιμο του δεσμού $\text{aryl}-\text{Cl}$, με αποτέλεσμα το σχηματισμό της ρίζας (I) και του ιόντος χλωρίου.

Σε δεύτερη φάση, η ρίζα (I) διμερίζεται προς σχηματισμό 1,1 διφαινύλ 2,2 διόλη ή σε συνδυασμό με μια ρίζα φορμυλίου προς σχηματισμό 2-υδροξυβενζαλδεΐδης.

Όμως, επειδή οι ρίζες υδροξυλίου, είναι γνωστό, ότι προτιμούν τις αρωματικές ενώσεις, λόγω της ηλεκτρονιόφιλης φύσης τους, σχηματίζονται και υδροξυλιωμένα παράγωγα, όπως είναι η κατεχόλη, η χλωροϋδροκινόνη και η υδροξυυδροκινόνη [Rao et al, 2003].



Εικόνα 15. Βιοχημικό μονοπάτι αερόβιας βιοαποικοδόμησης της 2-χλωροφαινόλης [Rao et. al., 2003].

Υλικά και Μέθοδοι

1 Οργανισμός και συνθήκες καλλιέργειας

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus*. Η φυλογενετική του ταξινόμηση είναι η εξής:

Βασίλειο : Φυτά

Διαίρεση : Χλωρόφυτα

Κλάση : Χλωροφύκη

Τάξη : Chlorococcales

Γένος : Scenedesmus

Είδος : *Scenedesmus obliquus*

Ο οργανισμός αυτός είναι μονοκύτταρος ευκαρυωτικός, με ελλειψοειδή κύτταρα, μήκους περίπου 5-10 μm. Ο κύκλος ζωής του διαρκεί γύρω στις 20 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, τη Χλαμυδομονάδα (*Chlamydomonas*) και τη Χλωρέλλα (*Chlorella*).

Πρόκειται για ευκαρυωτικό φωτοσυνθετικό οργανισμό, που παράγει οξυγόνο κατά τη φωτοσύνθεσή του. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά της φωτοσυνθετικής του δραστηριότητας, μοιάζει με τα γυμνόσπερμα φυτά: ο άγριος τύπος (wt), 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 I και II (εφ' όσον του παρέχεται κάποια πηγή οργανικού άνθρακα στο θρεπτικό μέσο).

Η ανάπτυξη των οργανισμών έγινε σε επιμήκεις γυάλινους σωλήνες (διαμέτρου 5cm), με ειδικό στόμιο στο κάτω μέρος του σωλήνα, που επιτρέπει τον αερισμό της καλλιέργειας, ενώ τοποθετήθηκαν σε ενυδρείο σταθερής θερμοκρασίας 30 °C, μπροστά από λάμπες λευκού φωτισμού, με ρυθμιζόμενη ένταση. Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε αυτές τις συνθήκες για 2-3 ημέρες περίπου, έπειτα ανακαλλιεργήθηκαν προσθέτοντας νέο μέσο καλλιέργειας (Πίνακας 5) [Bishop & Senger, 1971], ενώ ακολούθως, μετά το πέρας 3-4 ημερών, χρησιμοποιήθηκαν ως μητρική καλλιέργεια για τη διεξαγωγή του εκάστοτε πειράματος.

Όλα τα πειράματα έλαβαν χώρα σε ερμητικά κλειστά μπουκαλάκια με septa, των 100 mL, (Εικόνα 16) ώστε να μειωθεί η πιθανότητα οποιασδήποτε μορφής επιμόλυνσης, που θα μπορούσε να επηρεάσει και να αλλοιώσει τα αποτελέσματα. Η δειγματοληψία γινόταν καθημερινά την ίδια ώρα με αποστειρωμένες σύριγγες, μετά από ολιγόλεπτη ανακίνηση, ενώ η διάρκεια διεξαγωγής του κάθε πειράματος ήταν 5 ημέρες. Ο



Εικόνα 16. Μπουκαλάκια των 100 mL, ερμητικά κλειστά με septa, στα οποία πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα

τελικός όγκος της καλλιέργειας στο κάθε μπουκάλι ήταν 50 mL. Η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων ήταν 1,5 μL PCV/mL, ενώ η τελική συγκέντρωση της εκάστοτε φαινολικής ένωσης στο μπουκάλι ήταν 1,5 mM. [Σημειώνεται ότι τα stock διαλύματα της φαινόλης ήταν διαλυμένα σε μεθανόλη, η ίδια ποσότητα της οποίας προστέθηκε και στον μάρτυρα, ώστε να είναι απολύτως συγκρίσιμα τα αποτελέσματα]. Τα μπουκαλάκια αυτά βρίσκονταν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας της τάξης των 30 °C, ενώ το φως που έφτανε στην επιφάνεια της καλλιέργειας ήταν 50-60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Πίνακας 5. Θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* [Bishop & Senger, 1971].

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (σε g/L)	ΜΟΡΙΑΚΟΤΗΤΑ (M)
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,50	$1\cdot 10^{-4}$
KNO_3	80,0	$8\cdot 10^{-3}$
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	24,6	$1\cdot 10^{-3}$
NaCl	47,0	$8\cdot 10^{-3}$
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	17,8	$1\cdot 10^{-3}$
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1\text{H}_2\text{O}$	40,5	$3\cdot 10^{-3}$
$\text{Na-Citrate} \times 2\text{H}_2\text{O}$	16,5	$5,5\cdot 10^{-4}$
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times 1\text{H}_2\text{O}$	0,40	$7,5\cdot 10^{-6}$

Microelements	
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ x4H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ x7H ₂ O	0,222
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,079
MoO ₃ (85%-99.5%)	0,0177
C ₆ H ₅ FeO ₇ x5H ₂ O	18,025

Στη διάρκεια της παρούσας εργασίας δοκιμάστηκαν 4 διαφορετικοί χειρισμοί όσον αφορά την χρησιμοποιούμενη πηγή του άνθρακα. Ο πρώτος [CO₂ TR] αφορά την ανόργανη πηγή άνθρακα, η οποία ήταν 10% CO₂ [Logothetis et al, 2004], ο δεύτερος την οργανική πηγή άνθρακα [glu TR], η οποία ήταν 5 g/L D⁺-γλυκόζη [Bishop & Senger, 1971], ο τρίτος [CO₂ + glu TR] αφορά τη συνδυασμένη χρήση οργανικής και ανόργανης πηγής άνθρακα (10% CO₂ και 5 g/L D⁺-γλυκόζη) και ο τελευταίος [limit C TR] αφορά τη μη προσθήκη οποιασδήποτε μορφής εξωγενούς πηγής άνθρακα.

2 Υπολογισμός κυτταρικής συγκέντρωσης

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

Ως εναλλακτικός τρόπος μέτρησης της κυτταρικής πυκνότητας –για εξοικονόμηση ποσότητας δείγματος και χρόνου- χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική καταγραφή της θολερότητας του μέσου καλλιέργειας στα 550 nm (PERKIN ELMER 551S UV/VIS SPECTROPHOTOMETER) [DellaGreca et al, 2001], ενώ παράλληλα συσχετίστηκαν οι δύο τρόποι εκτίμησης της κυτταρικής συγκέντρωσης με βάση την ακόλουθη καμπύλη αναφοράς:

$$\text{PCV } (\mu\text{L/mL}) = 2,7733 \cdot A_{550\text{nm}}$$

3 Μετρήσεις φωτοσυνθετικής δραστηριότητας

Οι μετρήσεις της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας έγιναν με σύστημα Clark type ηλεκτροδίου της Hansatech. Μεταξύ ενός ηλεκτροδίου πλατίνας (κάθοδος) και ενός άλλου από άργυρο (άνοδος) τίθεται, μέσω ενός ηλεκτρολύτη (KCl), μία μικρή ηλεκτρική τάση (~50V). Για την μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ ανόδου και καθόδου, χρειάζεται O_2 το οποίο περνά από μία ημιπερατή μεμβράνη, που χωρίζει το δείγμα από τα ηλεκτρόδια. Η καταγραφή της έντασης του ρεύματος (σε A) είναι ανάλογη της συγκέντρωσης οξυγόνου του δείγματος.

Η φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου από το δείγμα (φωτοσυνθετικά κύτταρα) επιτυγχάνεται μόνο με τον φωτισμό του δείγματος. Η αποφυγή του περιοριστικού για την φωτοσύνθεση παράγοντα (συγκέντρωση CO_2 στο διάλυμα του δείγματος) επιτυγχάνεται με την προσθήκη $NaHCO_3$. Μονοκύτταρα φύκη *Scenedesmus obliquus* συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρηση 5 min στα 1500 g και επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα A [$34 \text{ mg } NaHCO_3 + 8,96 \text{ mg Tricin}/100 \text{ mL } H_2O$, PH: 7,6 με KOH], έτσι ώστε η πυκνότητα του αιωρήματος σε κύτταρα να είναι $10 \mu\text{L PCV}/\text{mL}$. Η οριοθέτηση του επιπέδου συγκέντρωσης του οξυγόνου από το 0-100% στο διάλυμα του δείγματος γίνεται με αέριο αζώτου και κορεσμένου σε οξυγόνο νερό, αντίστοιχα. Η μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα καταγράφηκε σε ένταση φωτισμού $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, ενώ η αναπνευστική δραστηριότητα σε απόλυτο σκοτάδι. Και στις δύο περιπτώσεις καταγράφηκε η παραγωγή και απορρόφηση οξυγόνου αντίστοιχα στην διάρκεια του χρόνου και οι τελικές τιμές ανήχθησαν ανά $\mu\text{L PCV}$.

4 Επαγωγικός φθορισμός - Φυσιοχημικές αναλύσεις της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (μέθοδος JIP)

Μόνο ένα μέρος της ενέργειας που απορροφάται από τις χρωστικές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού χρησιμοποιείται για τη φωτοχημεία της φωτοσύνθεσης. Το υπόλοιπο εκπέμπεται είτε ως θερμότητα είτε ως φθορισμός. Η επαγωγή του φθορισμού από φωτοσυνθετικούς οργανισμούς παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τους Kautsky & Hirsch το 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 φάσης- έχει εξελιχθεί σε πολύτιμο ερευνητικό μέσο για τη μελέτη της δραστηριότητας, αλλά και της απόδοσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Βάσει της

μεθόδου των Strasser & Strasser (1995), μπορεί να εκτιμηθεί, εκτός των άλλων, το μέγεθος του LHCI_{II}, η πυκνότητα των κέντρων αντίδρασης και μια σειρά από παραμέτρους, που αφορούν τη δομή και τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Ο φθορισμός αυξάνεται όταν η φωτοχημική απόδοση της φωτοσύνθεσης παρεμποδίζεται για οποιοδήποτε λόγο, για παράδειγμα όταν δεν υπάρχει διαθέσιμος οξειδωμένος δέκτης ηλεκτρονίων σε κάποιο σημείο στην πορεία της ηλεκτρονιακής μεταφοράς. Το μεγαλύτερο μέρος του φθορισμού εκπέμπεται από τις χρωστικές της κεραίας του Φωτοσυστήματος II, κι αυτό γιατί το PSII έχει ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό: όταν τα κέντρα του είναι «κλειστά», τότε αυτά τα ίδια τα κέντρα αποσβένουν αρκετά αποτελεσματικά τον φθορισμό [Green & Durnford, 1996]. Όταν ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός (wt κύτταρα), μετά από την προσαρμογή του στο σκοτάδι, δεχτεί την επίδραση συνεχούς φωτισμού, τότε ο φθορισμός του αυξάνεται από το αρχικό του επίπεδο (F_0) σε ένα μέγιστο επίπεδο (F_m) και στη συνέχεια μειώνεται βαθμιαία μέχρι ένα σταθερό επίπεδο (F_s).

Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού έγιναν με τη συσκευή «ανάλυσης της απόδοσης των φυτών» (Plant Efficiency Analyser, PEA), της *Hansatech Instruments*, και ακολούθησε επεξεργασία των δεδομένων με χρήση εξειδικευμένου λογισμικού εφαρμογής του JIP-test (Biolyzer 4.0), σύμφωνα με τη μέθοδο των Strasser & Strasser (1995).

Όλες οι μετρήσεις έγιναν σε δείγματα των καλλιεργειών όγκου 1 mL, τα οποία προτού διεγερθούν είχαν παραμείνει στο σκοτάδι για 10 min, προκειμένου να “αδειάσουν” τα κέντρα αντίδρασης από ηλεκτρόνια. Από τις μετρήσεις υπολογίστηκε ο λόγος F_v/F_m , που συνδέεται άμεσα με τη φωτοσυνθετική απόδοση σύμφωνα με τη μέθοδο Strasser & Strasser (1995). Επίσης με εφαρμογή του JIP-TEST για τιμές φθορισμού, που αντιστοιχούν σε καθορισμένα στάδια [J, I και P (Εικόνα 17)] υπολογίστηκαν τα επιμέρους χαρακτηριστικά του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

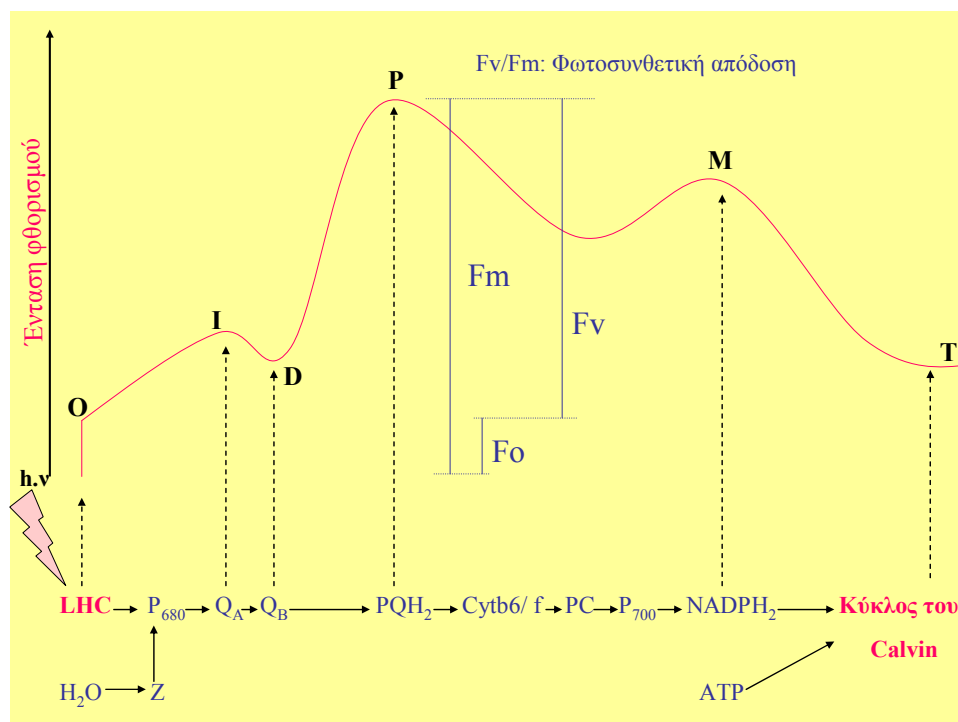
Η μέθοδος βασίζεται σε μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού με ανάλυση 10 μs σε χρονικό διάστημα 1 δευτερολέπτου. Ο φθορισμός μετρήθηκε με 12-bit ανάλυση και η διέγερση έγινε από 6 διόδους φωτισμού (LEDs) οι οποίες έχουν ένταση ακτινοβολίας μέχρι $600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ερυθρού φωτός (650nm).

Πίνακας 6. Εξισώσεις από το JIP TEST των Strasser & Strasser (1995)

Μεταβλητή OJIP καμπύλης	Ορισμός
F_t	Τιμή φθορισμού σε χρόνο t μετά την ακτινοβολήση
$F_{50\mu s}$	Ένταση φθορισμού στα 50 μs
$F_{300\mu s}$	Ένταση φθορισμού στα 300 μs
$F_J = F_{2ms}$	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_o	Ελάχιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί σε «ανοιχτά» κέντρα (open PSII RC _s , $t = 0$)
F_m	Μέγιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί στο χρόνο όπου όλα τα κέντρα είναι «κλειστά» (closed PSII RC _s , $t = t_{Fm}$)
F_v	Μεταβλητή τιμή φθορισμού τη χρονική στιγμή t
$F_v = F_m - F_o$	Μέγιστη τιμή μεταβλητής τιμής φθορισμού
$V_t = (F_t - F_o)(F_m - F_o)$	Σχετική μεταβολή φθορισμού τη χρονική στιγμή t
$V_J = (F_J - F_o)(F_m - F_o)$	Σχετική μεταβολή φθορισμού στο βήμα J
$M_o = (\Delta V/\Delta t)_o =$	Αρχική κλίση σε ms της καμπύλης $V = f(t)$

$= 4(F_{300\ \mu s} - F_o)/(F_m - F_o)$	
$S_m = (Area)/(F_m - F_o)$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης OJIP (Area), ομαλοποιούμενο ως προς F_v (αποτελεί μέτρο του αριθμού των οξειδοαναγωγικών κύκλων της Q_A)
$S_s = V_J/M_o$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης OJIP που αντιστοιχεί μόνο στην OJ φάση (διάστημα όπου η Q_A των RC ανάγεται μία φορά)
$N = S_m/S_s = S_m M_o(1/V_J)$	Μέτρο αριθμού κύκλων αναγωγής της Q_A στο διάστημα t_{Fm}
Ειδικές ροές ενέργειας (ανά κέντρο που ανάγει Q_A)	
$ABS/RC = M_o (1/V_J)(1/\Phi_{P_o})$	Μέγεθος φωτοσυλλεκτικής κεραίας
$TR_o/RC = M_o (1/V_J)$	Ενέργεια που παγιδεύεται ανά κέντρο αντίδρασης (Trapped energy flux per RC at $t = 0$)
$ET_o/RC = M_o (1/V_J)\Psi_o$	Ροή ηλεκτρονίων ανά κέντρο αντίδρασης (για $t = 0$)
$DI_o/RC = (ABS/RC) - (TR_o/RC)$	Διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης (για $t = 0$)
Αποδόσεις ή λόγοι επιμέρους ροών	
$\Phi_{P_o} = TR_o/ABS = [1-(F_o/F_m)]$	Μέγιστη κβαντική απόδοση της πρωτοταγούς φωτοχημείας (για $t = 0$)
$\Psi_o = ET_o/TR_o = 1 - V_J$	Πιθανότητα (για $t = 0$) να προκαλέσει μια διέγερση (exciton) την μετακίνηση ενός ηλεκτρονίου κατά μήκος της αλυσίδας πέρα από την Q_A^-
$\Phi_{E_o} = ET_o/ABS = [1-(F_o/F_m)]\Psi_o$	Κβαντική απόδοση της μεταφοράς ηλεκτρονίων (για $t = 0$)

$\Phi_{D0} = 1 - \Phi_{P0} = F_0/F_m$	Κβαντική απόδοση της διάχυσης ηλεκτρονίων (για $t = 0$)
Εκτιμώμενες ροές ενέργειας ανά περιοχή (Phenomenological energy fluxes per excited cross section – CS)	
ABS/CS_0	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το F_0
ABS/CS_m	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το F_m
$TR_0/CS_0 = \Phi_{P0}(ABS/CS_0)$	Παγιδευμένη ενέργεια ανά διεγερόμενη περιοχή της μεμβράνης (για $t = 0$)
$ET_0/CS_0 = \Phi_{E0}(ABS/CS_0)$	Ροή ηλεκτρονίων ανά περιοχή (για $t = 0$)
$DI_0/CS_0 = (ABS/CS_0) - (TR_0/CS_0)$	Διαχεόμενη ενέργεια ανά περιοχή (για $t = 0$)
Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης	
RC/CS_0	Πυκνότητα ενεργών κέντρων
Δείκτες επίδοσης (Performance indexes, $t = 0$)	
$PI_{ABS} = (RC/ABS) (\Phi_{P0}/1 - \Phi_{P0})(\Psi_0/1 - \Psi_0)$	Επιδόσεις ανά απορροφώμενη ενέργεια
$PI_{CS0} = (RC/CS_0) (\Phi_{P0}/1 - \Phi_{P0})(\Psi_0/1 - \Psi_0)$	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης ($t = 0$)
$PI_{CSm} = (RC/CS_m) (\Phi_{P0}/1 - \Phi_{P0})(\Psi_0/1 - \Psi_0)$	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης ($t = t_{Fm}$)
$SFI_{abs} = (1 - \Phi_{P0})(1 - \Psi_0)$	Δείκτης λειτουργικότητας
Ικανότητα παραγωγής έργου	
$DF_{ABS} = \log(PI_{ABS})$	Εκτιμώμενη παραγωγή έργου ανά απορροφώμενη ενέργεια



Εικόνα 17. Τυπική καμπύλη επαγωγικού φθορισμού

5 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση φαινολικών ενώσεων με υγρή χρωματογραφία υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (HPLC).

Τα δείγματα, που παίρνονταν καθημερινά από τις καλλιέργειες, φυγοκεντρήθηκαν για 5 min σε 3000 g (Heraeus SEPATECH, Biofuge 13), με απώτερο σκοπό την καθίζηση των κυττάρων, ενώ το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιήθηκε για την ποιοτική και την ποσοτική ανάλυση των φαινολικών ενώσεων με την χρήση ενός diode array – narrow bore – HPLC συστήματος (Shimadzu, SPD-M10A, VP). Για τον διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε μία narrow bore χρωματογραφική στήλη (Hewlett Packard, 2.1X200mm, C-18, 5 μm particle size) που αυξάνει την ευαισθησία του διαχωρισμού για επιπλέον 5-10 φορές σε σύγκριση με τις κλασσικές στήλες. Για τον διαχωρισμό των φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε διαλύτης έκλουσης, ο οποίος περιείχε υπερκάθαρο νερό (H₂O), μεθανόλη (CH₃OH) και οξικό οξύ (CH₃COOH) σε αναλογία όγκων 49:50:1 αντίστοιχα, με σταθερή ροή 0,1 mL/min και θερμοκρασία διαχωρισμού τους 25 °C. [Lovell et al., 2002]. Η ποιοτική ανάλυση έγινε βάσει του φάσματος απορρόφησης των επιμέρους μεγίστων του HPLC-προφίλ, ενώ η ποσοτική εκτίμηση έγινε με την βοήθεια γνωστών συγκεντρώσεων φαινολικών ενώσεων.

Αποτελέσματα

Η βιοαποικοδόμηση είναι ένα πολλά υποσχόμενο επιστημονικό πεδίο. Από την πλευρά της βακτηριακής βιοαποικοδόμησης είναι εκτενώς μελετημένο, αφού έχουν βρεθεί αρκετά μεταβολικά μονοπάτια για ένα σεβαστό αριθμό ενώσεων. Αντίθετα, η βιοαποικοδόμηση τοξικών ενώσεων με φύκη είναι ένα ελάχιστα προσεγγισμένο ερευνητικό πεδίο. Υπάρχουν κάποιες δημοσιεύσεις που αφορούν το αν ένας οργανισμός έχει τη δυνατότητα να βιοαποικοδομήσει κάποια ένωση και αν ναι σε ποιο ποσοστό και κάτω από ποιες συνθήκες (Παράρτημα I, Πίνακας 1).

Στην παρούσα μεταπτυχιακή έρευνα έγινε ένα πρώτο βήμα να βρεθεί αν τελικά η βιοαποικοδόμηση είναι κυρίως θέμα οργανισμού ή αν είναι θέμα επιλογής κατάλληλων αρχικών συνθηκών. Δηλαδή έγινε προσπάθεια να απαντήσουμε στο εξής ερώτημα: αν ένας οργανισμός δεν βιοαποικοδομεί κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, τότε αυτό σημαίνει ότι δεν έχει το κατάλληλο ένζυμο για να ξεκινήσει τη βιοαποικοδόμηση ή αν αλλάξουμε τις συνθήκες μπορούμε να ενεργοποιήσουμε τη βιοαποικοδόμηση;

Γι' αυτό καλλιέργειες του *Scenedesmus obliquus* αναπτύχθηκαν σε ασηπτικές, σταθερές συνθήκες φωτός και θερμοκρασίας, με συγκεκριμένη αρχική κυτταρική συγκέντρωση της τάξης του 1,5 μL PCV/mL καλλιέργειας, παρουσία 1,5 mM φαινολικής ένωσης (φαινόλη, 2-γλωροφαινόλη, 3-γλωροφαινόλη, 4-γλωροφαινόλη, 2-βρωμοφαινόλη, 3-βρωμοφαινόλη, 4-βρωμοφαινόλη, 2-ιωδοφαινόλη, 3-ιωδοφαινόλη και 4-ιωδοφαινόλη) και τα αποτελέσματα εξετάστηκαν συγκριτικά.

Με βάση πρόσφατα ερευνητικά αποτελέσματα του εργαστηρίου Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας [Navakoudis et al., 2003; Sfichi et al., 2004; Lütz et al., 2005; Ioannidis et al., 2006] έγινε προσπάθεια να επηρεάσουμε τη βιοαποικοδόμηση με το να αλλάξουμε τη μοριακή δομή και λειτουργία τον φωτοσυνθετικού μηχανισμού, να κάνουμε ποιο ανθεκτικό τον οργανισμό μας, προσθέτοντας εξωγενείς πηγές άνθρακα (ανόργανη πηγή - CO_2 , οργανική πηγή - D^+ -γλυκόζη ή συνδυασμό τους), ενώ παράλληλα μελετήθηκε και η περίπτωση απουσίας οποιασδήποτε εξωγενούς πηγής άνθρακα.

Όμως δεν ενδιέφερε μόνο η αλλαγή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, αλλά και η γνώση της κατάστασης στην οποία βρίσκεται την κάθε χρονική στιγμή ο οργανισμός μας, λόγω της παρουσίας των τοξικών φαινολικών ενώσεων και γι' αυτό έγιναν κινητικές κάποιων σημαντικών φωτοσυνθετικών παραμέτρων του JIP test. Αυτά τα

δεδομένα συνδυάστηκαν με τα αντίστοιχα ενεργειακά δεδομένα, που αφορούν ενέργειες διάσπασης δεσμών, καθώς και με δεδομένα αύξησης της βιομάζας κάτω από την παρουσία αυτών των τοξικών φαινολικών ενώσεων, με απώτερο σκοπό να βρούμε ποιος είναι ο συνδυασμός των παραγόντων εκείνων που επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα την βιοαποικοδόμηση, ώστε να επιλέξουμε τις βέλτιστες συνθήκες που θα κάνουν ανθεκτικό τον οργανισμό μας στην παρουσία των τοξικών φαινολικών ενώσεων, αυξάνοντας παράλληλα το ποσοστό της βιοαποικοδόμησης τους σε όσο το δυνατόν μικρότερο χρονικό διάστημα.

1. Επίδραση των φαινολικών ενώσεων στην ανάπτυξη των καλλιιεργειών

Η ανάπτυξη του μικροφύκου αποτελεί πολύ σημαντική παράμετρο για την εκκίνηση της διαδικασίας της βιοαποικοδόμησης, αλλά και για τη δημιουργία υψηλού ρυθμού βιοαποικοδόμησης. Είναι αυτονόητο ότι με δεδομένη συγκέντρωση φαινολικής ένωσης όσο χαμηλότερη είναι η κυτταρική συγκέντρωση τόσο τοξικότερες συνθήκες επικρατούν στο μέσο της καλλιέργειας ανά μονάδα κυττάρου. Αυτό όμως που δεν είναι γνωστό είναι ο τρόπος αντίδρασης του στελέχους στις τοξικές αυτές συνθήκες. Υπάρχει περίπτωση να μην μπορεί να επιβιώσει σε έντονη τοξικότητα, οπότε και να μην μπορεί να ξεκινήσει τη διαδικασία της βιοαποικοδόμησης, αλλά υπάρχει και η δυνατότητα σε υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικής ένωσης να επέλθει γρηγορότερη προσαρμογή του οργανισμού στην προσπάθειά του να επιβιώσει σε νέο περιβάλλον, με αποτέλεσμα να βιοαποικοδομεί και σημαντικές ποσότητες της τοξικής φαινολικής ένωσης.

Για να διερευνηθεί αυτό, επιλέχτηκε ο παράγοντας απουσία ή παρουσία οργανικής ή/και ανόργανης πηγής άνθρακα σε σταθερή ένταση φωτεινής ακτινοβολίας της τάξης των 50-60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}$, ώστε να εξεταστεί η επίδραση της εκάστοτε φαινολικής ένωσης στην ανάπτυξη του μικροφύκου, με απώτερο σκοπό να διερευνηθεί αν τελικά το μικροφύκος βιοαποικοδομεί επειδή αναπτύσσεται ή αν πρώτα βιοαποικοδομεί και γι' αυτό αναπτύσσεται.

Οι κινητικές των καμπύλων ανάπτυξης για τους τέσσερις διαφορετικούς χειρισμούς, που αφορούν την πηγή του άνθρακα, παρουσιάζονται συγκριτικά στα ακόλουθα διαγράμματα της Εικόνας 18. Σημειώνεται ότι σε αυτήν την απεικόνιση κάθετα υπάρχει πάντα η ίδια φαινολική ένωση και αυτό που μεταβάλλεται κάθε φορά είναι η

πηγή του άνθρακα, ενώ οριζόντια υπάρχει πάντα η ίδια πηγή άνθρακα και αυτό που μεταβάλλεται είναι το είδος της εκάστοτε φαινολικής ένωσης.

Με κάθετη σύγκριση είναι ολοφάνερο ότι η καλύτερη ανάπτυξη επιτυγχάνεται με τη χρήση οργανικής πηγής άνθρακα (5 g/L γλυκόζη), ακολουθεί η συνδυασμένη χρήση οργανικής και ανόργανης πηγής άνθρακα (10% CO₂ και 5 g/L γλυκόζη), μετά ο χειρισμός με την ανόργανη πηγή άνθρακα (10% CO₂), ενώ τελευταίος βρίσκεται ο χειρισμός με την περιορισμένη σε άνθρακα συγκέντρωση (0,04% CO₂). Είναι ολοφάνερο λοιπόν ότι η χρησιμοποιούμενη ποσότητα γλυκόζης –που είναι η βέλτιστη για το συγκεκριμένο μικροοργανισμό- προσφέρει πολύ περισσότερη ενέργεια στο μικροφύκος σε σύγκριση με την χρησιμοποιούμενη ποσότητα του διοξειδίου του άνθρακα, με αποτέλεσμα να διοχετεύεται και μεγαλύτερο μέρος της στην αύξηση της βιομάζας του.

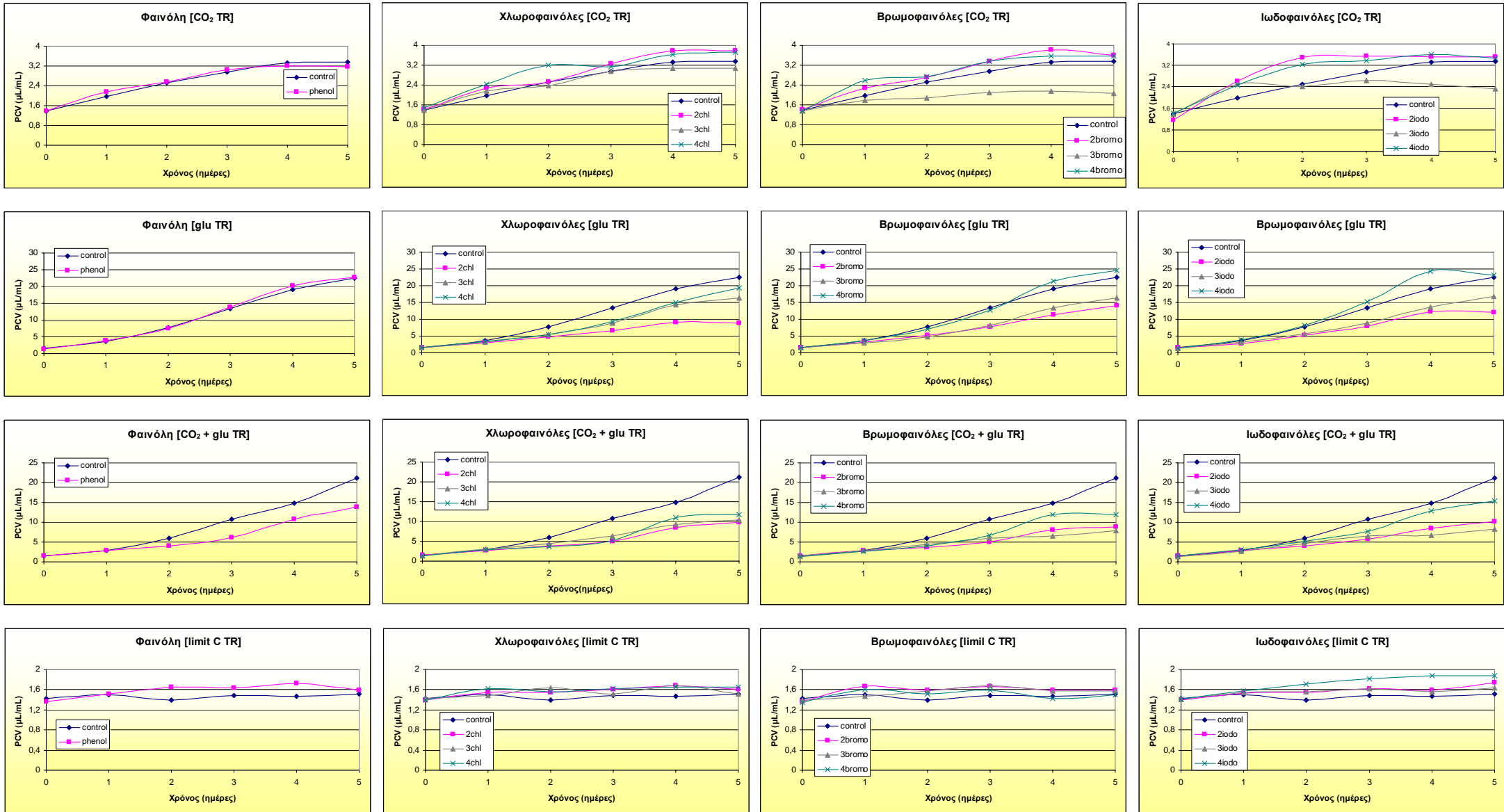
Σε οριζόντια σύγκριση υπάρχουν πιο ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις στις κινητικές των καμπυλών ανάπτυξης. Στον [CO₂ TR] χειρισμό η παρουσία της φαινόλης δεν προκαλεί κανενός είδους παρεμπόδιση στην ανάπτυξη. Στις αλογονοφαινόλες όμως, ανάλογα με τη θέση του υποκαταστάτη, ανεξαρτήτως του είδους του αλογόνου, παρατηρείται όμοια συμπεριφορά, που ακολουθεί ένα συγκεκριμένο πρότυπο, σύμφωνα με το οποίο υπάρχει παρεμπόδιση στην ανάπτυξη, όταν ο υποκαταστάτης είναι στην 3-θέση, ενώ η ύπαρξη του υποκαταστάτη στις θέσεις 2- και 4- οδηγεί σε παρόμοια ανάπτυξη.

Στον [glu TR] χειρισμό για άλλη μια φορά στη φαινόλη δεν εμφανίζεται κανενός είδους παρεμπόδιση, ενώ στις αλογονοφαινόλες το πρότυπο ανάπτυξης εμφανίζει μια διαβάθμιση, που ακολουθεί τη σειρά 2-θέση < 3-θέση < 4-θέση. Φαίνεται λοιπόν ότι η παρουσία της γλυκόζης, με την παραπάνω ενέργεια που προσφέρει, δίνει τη δυνατότητα στο μικροφύκος να αντιμετωπίσει την επιπλέον τοξικότητα, που προκαλεί η ύπαρξη του υποκαταστάτη στην μέτα θέση, με αποτέλεσμα να μην εμφανίζεται κανενός είδους παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των μέτα-μονοϋποκατεστημένων αλογονοφαινολών.

Στη συνδυασμένη χρήση οργανικού και ανόργανου άνθρακα, δηλαδή στο χειρισμό [CO₂ + glu TR], τα αποτελέσματα είναι αναμενόμενα με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία της γλυκόζης συνδέεται με μια διαβάθμιση στην ανάπτυξη, που ακολουθεί τη σειρά 2-θέση < 3-θέση < 4-θέση, ενώ η παρουσία του διοξειδίου του άνθρακα συνδέεται με παρεμποδισμένη ανάπτυξη στην 3-θέση. Έτσι, λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις δύο παραπάνω παρατηρήσεις, είναι

αναμενόμενο που η συνδυασμένη χρήση και των δύο πηγών άνθρακα οδηγεί σε παραπλήσια ανάπτυξη των θέσεων 2- και 3-, ενώ αισθητά καλύτερη είναι η ανάπτυξη, όταν το αλογόνο βρίσκεται στην 4-θέση. Μια εξίσου σημαντική παρατήρηση είναι μια μικρή παρεμπόδιση, που υπάρχει στην ανάπτυξη του μικροφύκους παρουσία φαινόλης, η οποία δεν παρατηρείται ούτε στο χειρισμό με το διοξείδιο του άνθρακα, ούτε στο χειρισμό με τη γλυκόζη. Η ύπαρξη της παρεμπόδισης όμως στην συνδυασμένη χρήση οργανικού και ανόργανου άνθρακα, πιθανόν να αποδίδεται σε επιπλέον στρες, λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης του άνθρακα στο μέσο της καλλιέργειας.

Στον τελευταίο χειρισμό, τον [limit C TR], παρατηρείται καλύτερη ανάπτυξη σε σύγκριση με τον μάρτυρα, όταν στο μέσο της καλλιέργειας υπάρχει φαινόλη ή κάποια από τις τρεις ιωδοφαινόλες, ενώ δεν υπάρχει κάποια ιδιαίτερη διαφοροποίηση στην ανάπτυξη, όταν στο μέσο καλλιέργειας υπάρχουν χλώρο- ή βρωμοφαινόλες. Αυτή η σημαντική παρατήρηση θα είναι εκείνη, που θα μας δώσει την απάντηση για το αν προηγείται η ανάπτυξη της βιοαποικοδόμησης ή το αντίστροφο. Αν λοιπόν υπάρχει βιοαποικοδόμηση στις περιπτώσεις εκείνες που η ανάπτυξη, με την παρουσία φαινολικής ένωσης, απουσία πηγής άνθρακα, είναι μεγαλύτερη από τον μάρτυρα, τότε θα μπορούμε να ισχυριστούμε ότι η βιοαποικοδόμηση προηγείται της ανάπτυξης. Με άλλα λόγια, το μικροφύκος θα βιοαποικοδομεί, όταν διαθέτει την απαιτούμενη ενέργεια και θα χρησιμοποιεί τη φαινολική ένωση, που θα έχει βιοαποικοδομήσει, ως πηγή άνθρακα για ανάπτυξη και αύξηση της βιομάζας του.



Εικόνα 18. Καμπύλες ανάπτυξης του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας (30°C), έντασης φωτεινής ακτινοβολίας (50-60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), αρχικής κυτταρικής συγκέντρωσης (1,5 μL PCV/mL) και φαινολικής συγκέντρωσης (1,5 mM). PCV: πακεταρισμένα κύτταρα σε $\mu\text{L}/\text{mL}$, [CO₂ TR]: χειρισμός με 10% CO₂, [glu TR]: χειρισμός με 5 g/L γλυκόζη, [CO₂ + glu TR]: χειρισμός με 10% CO₂ και 5 g/L γλυκόζη, [limit C TR]: χειρισμός με περιορισμένη ποσότητα άνθρακα (0,04 % CO₂), control: μάρτυρας, phenol: φαινόλη, 2chl: 2-χλωροφαινόλη, 3chl: 3-χλωροφαινόλη, 4chl: 4-χλωροφαινόλη, 2bromo: 2-βρωμοφαινόλη, 3bromo: 3-βρωμοφαινόλη, 4bromo: 4-βρωμοφαινόλη, 2iodo: 2-ιωδοφαινόλη, 3iodo: 3-ιωδοφαινόλη, 4iodo: 4-ιωδοφαινόλη.

2. Διαφοροποιήσεις της μοριακής δομής, λειτουργίας και βιοενεργητικής του φωτοσυνθετικού μηχανισμού κατά την έκθεση των καλλιιεργειών σε φαινολικές ενώσεις

Μετά τη μελέτη της επίδρασης των φαινολικών ενώσεων στην ανάπτυξη του μικροφύκου, το επόμενο βήμα είναι η καταγραφή του επιπέδου καταπόνησης των μικροφυκών από την επίδραση της εκάστοτε φαινολικής ένωσης. Γι' αυτόν το λόγο πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, μέσω μετρήσεων επαγωγικού φθορισμού με τη βοήθεια του JIP-test. Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται οι κυριότεροι παράμετροι της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, που αφορούν μόνον την πέμπτη μέρα διεξαγωγής του πειράματος, τη μέρα δηλαδή, που ορίστηκε ως η τελευταία για τον προσδιορισμό του ποσοστού της βιοαποικοδόμησης, ενώ οι αντίστοιχες κινητικές για τις ίδιες παραμέτρους, για τον εκάστοτε χειρισμό και για την κάθε φαινολική ένωση παρουσιάζονται στο Παράρτημα II (Εικόνες 1 έως 4). Αυτές οι παράμετροι είναι η φωτοσυνθετική απόδοση (F_v/F_m), το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (ABS/RC), η διαχεόμενη ενέργεια σε μη φωτοχημικές δράσεις (DI_o/RC) και η πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης (RC/ CS_o).

Παρατηρώντας προσεκτικά τον Πίνακα 8 για τον χειρισμό [CO_2 TR] είναι εμφανής η ύπαρξη έντονης τοξικότητας στην περίπτωση που το αλογόνο καταλαμβάνει την 3-θέση του φαινολικού δακτυλίου. Αυτό συμπεραίνεται από τις χαμηλότερες τιμές της φωτοσυνθετικής απόδοσης (F_v/F_m) σε σύγκριση με τις αντίστοιχες του μάρτυρα. Άμεσες αποκρίσεις αυτής της εμφανούς τοξικότητας είναι η αύξηση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (ABS/RC), η μείωση της πυκνότητας των ενεργών κέντρων (RC/ CS_o) και η αύξηση της διαχεόμενης σε μη φωτοχημικές δράσεις ενέργειας (DI_o/RC). Ανάλογες μεταβολές στη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού λαμβάνουν χώρα σε καταστάσεις αβιοτικού στρες, όπως είναι η έκθεση σε υψηλή UV-B ακτινοβολία [Lütz et al., 2005; Sfichi et al., 2004] ή σε όζον [Navakoudis et al., 2003]. Αντίθετα, όταν ο υποκαταστάτης είναι στη 2^η ή και 4^η θέση του φαινολικού δακτυλίου, τότε η πυκνότητα των ενεργών κέντρων είναι υψηλότερη (RC/ CS_o), ενώ το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (ABS/RC) και η διαχεόμενη σε μη φωτοχημικές δράσεις ενέργεια (DI_o/RC) είναι χαμηλότερα σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές στην περίπτωση που ο υποκαταστάτης βρίσκεται στην 3-θέση.

[CO ₂ TR]					[limit C TR]				
	F _v /F _m	ABS/RC	DI ₀ /RC	RC/CS ₀		F _v /F _m	ABS/RC	DI ₀ /RC	RC/CS ₀
control	0,408	2,591	1,591	54,040	control	0,616	2,073	0,810	28,461
φαινόλη	0,353	4,262	2,7805	28,6252	φαινόλη	0,623	1,9431	0,7539	36,5391
2-γλωροφαινόλη	0,378	3,639	2,305	45,622	2-γλωροφαινόλη	0,550	3,403	1,653	19,985
3-γλωροφαινόλη	0,224	5,437	4,260	19,312	3-γλωροφαινόλη	0,600	2,452	1,016	23,659
4-γλωροφαινόλη	0,388	3,319	2,056	25,005	4-γλωροφαινόλη	0,586	2,556	1,102	19,559
2-βρωμοφαινόλη	0,311	4,170	2,953	27,339	2-βρωμοφαινόλη	0,543	3,171	1,524	19,554
3-βρωμοφαινόλη	0,133	13,852	11,852	5,559	3-βρωμοφαινόλη	0,564	2,709	1,281	19,194
4-βρωμοφαινόλη	0,359	3,362	2,220	30,038	4-βρωμοφαινόλη	0,540	3,922	1,922	12,495
2-ιωδοφαινόλη	0,398	5,467	3,356	27,620	2-ιωδοφαινόλη	0,541	3,766	2,010	23,102
3-ιωδοφαινόλη	0,082	23,744	22,030	3,791	3-ιωδοφαινόλη	0,485	3,454	1,751	18,323
4-ιωδοφαινόλη	0,409	3,018	1,841	32,146	4-ιωδοφαινόλη	0,589	2,620	1,175	21,422
[glu TR]					[CO ₂ + glu TR]				
	F _v /F _m	ABS/RC	DI ₀ /RC	RC/CS ₀		F _v /F _m	ABS/RC	DI ₀ /RC	RC/CS ₀
control	0,427	2,795	1,658	75,143	control	0,395	3,251	2,026	104,275
φαινόλη	0,359	2,9787	1,9418	59,0853	φαινόλη	0,441	2,6984	1,5853	83,3835
2-γλωροφαινόλη	0,493	2,440	1,282	87,762	2-γλωροφαινόλη	0,382	3,120	2,004	41,989
3-γλωροφαινόλη	0,347	3,247	2,167	46,731	3-γλωροφαινόλη	0,342	3,186	2,217	35,171
4-γλωροφαινόλη	0,425	3,017	1,770	86,502	4-γλωροφαινόλη	0,404	3,058	1,888	54,943
2-βρωμοφαινόλη	0,440	3,016	1,766	53,384	2-βρωμοφαινόλη	0,396	3,485	2,175	38,763
3-βρωμοφαινόλη	0,316	3,607	2,501	43,249	3-βρωμοφαινόλη	0,308	3,441	2,500	24,703
4-βρωμοφαινόλη	0,414	2,264	1,363	82,144	4-βρωμοφαινόλη	0,428	3,258	1,894	46,371
2-ιωδοφαινόλη	0,466	2,910	1,591	72,503	2-ιωδοφαινόλη	0,387	3,524	2,215	45,119
3-ιωδοφαινόλη	0,335	4,014	2,751	42,850	3-ιωδοφαινόλη	0,305	3,253	2,152	30,343
4-ιωδοφαινόλη	0,420	4,539	3,061	116,770	4-ιωδοφαινόλη	0,452	2,463	1,396	86,087

Πίνακας 7. Φωτοσυνθετικές παράμετροι του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας (30°C), έντασης φωτεινής ακτινοβολίας (50-60 μmol·m⁻²·s⁻¹), αρχικής κυτταρικής συγκέντρωσης (1,5 μL PCV/mL) και φαινολικής συγκέντρωσης (1,5 mM). [CO₂ TR]: χειρισμός με 10% CO₂, [glu TR]: χειρισμός με 5 g/L γλυκόζη, [CO₂ + glu TR]: χειρισμός με 10% CO₂ και 5 g/L γλυκόζη, [limit C TR]: χειρισμός με περιορισμένη ποσότητα άνθρακα (0,04% CO₂), control: μάρτυρας, F_v/F_m: φωτοσυνθετική ικανότητα, ABS/RC: μέγεθος φωτοσυνθετικής κεραίας, DI₀/RC: διαχεόμενη ενέργεια σε μη φωτοχημικές δράσεις, RC/CS₀: πυκνότητα ενεργών κέντρων.

Παρόμοια είναι και τα αποτελέσματα, όσον αφορά την ύπαρξη τοξικότητας στην 3-θέση, στη περίπτωση που χρησιμοποιείται οργανική πηγή άνθρακα, δηλαδή στην περίπτωση ύπαρξης γλυκόζης στο μέσο καλλιέργειας με ή χωρίς παρουσία διοξειδίου του άνθρακα. Επομένως, στους χειρισμούς [glu TR] και [CO₂ + glu TR], όπου υπάρχει γλυκόζη, είναι εμφανής η ύπαρξη τοξικότητας στην μέτα-υποκατεστημένη θέση του φαινολικού δακτυλίου, όπως φαίνεται από τις τιμές της φωτοσυνθετικής απόδοσης (F_v/F_m), οι οποίες είναι όντως χαμηλότερες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες του μάρτυρα όμως σχετικά υψηλότερες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες των χειρισμών εκείνων χωρίς προσθήκη γλυκόζης.

Στον τελευταίο χειρισμό, τον [limit C TR], παρατηρείται τοξικότητα στην μέτα-υποκατάσταση μόνο των ιωδοφαινόλων, όπου υπάρχει χαμηλή τιμή της φωτοσυνθετικής ικανότητας (F_v/F_m), που συνοδεύεται από αύξηση του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (ABS/RC), μείωση της πυκνότητας των ενεργών κέντρων (RC/CS_o) και ταυτόχρονη αύξηση της διαχεόμενης σε μη φωτοχημικές δράσεις ενέργειας (DI_o/RC), σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές του μάρτυρα. Αντίθετα, στις χλώρο- και βρωμοφαινόλες δεν εμφανίζεται κανενός είδους τοξικότητα στην μέταθεση.

Τέλος, αξίζει να σημειώσουμε ότι σε κανέναν από τους τέσσερις διαφορετικούς χειρισμούς, που αφορούν την προέλευση και την απουσία ή παρουσία της πηγής του άνθρακα, δεν εμφανίζεται κανενός είδους τοξικότητα, που να οφείλεται στην παρουσία της φαινόλης, όπως φαίνεται από τις τιμές των φωτοσυνθετικών παραμέτρων του Πίνακα 7.

Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με τα αποτελέσματα των μετρήσεων της μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, τα οποία συνοψίζονται στην Εικόνα 19.

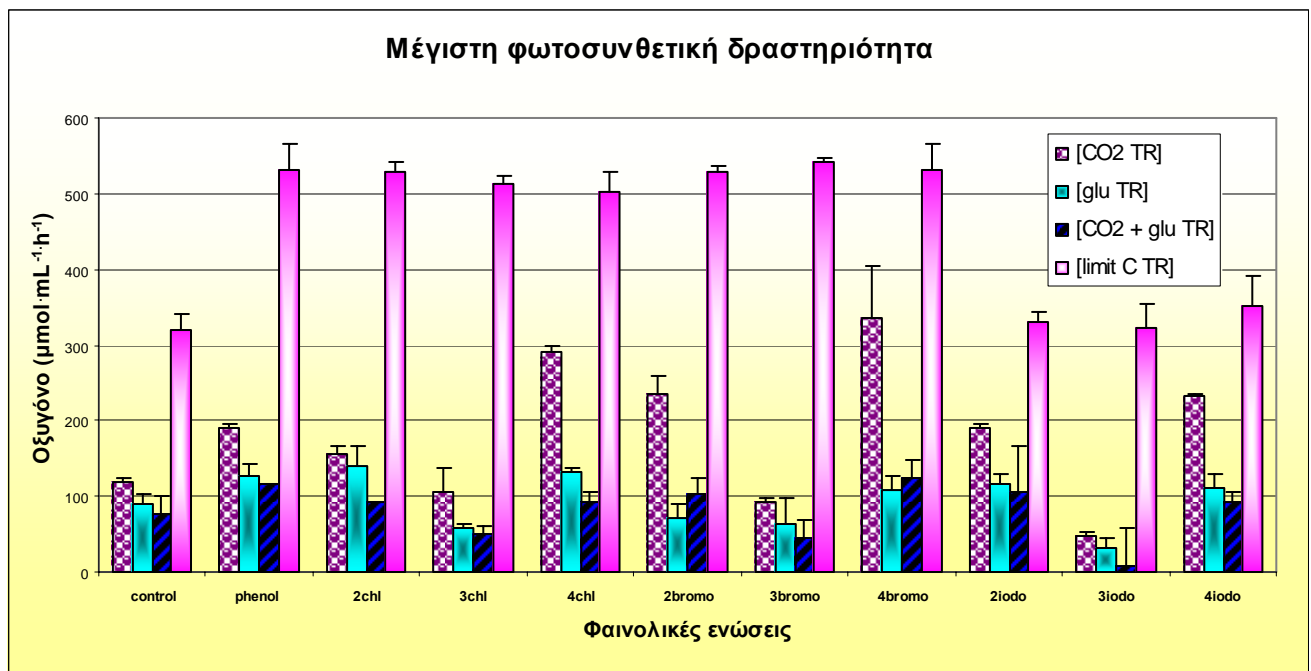
Μελετώντας προσεκτικά την Εικόνα 19 επιβεβαιώνεται και εδώ η έντονη τοξικότητα, που προκαλεί η ύπαρξη του υποκαταστάτη στην 3-θέση του φαινολικού δακτυλίου στον χειρισμό [CO₂ TR], αφού η μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα είναι μικρότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή του μάρτυρα για την κάθε μέτα μονοϋποκατεστημένη αλογονοφαινόλη. Αντίθετα, όταν οι υποκαταστάτες βρίσκονται στην όρθο ή πάρα θέση, τότε η μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα είναι μεγαλύτερη από αυτήν του μάρτυρα.

Όταν υπάρχει γλυκόζη στο μέσο καλλιέργειας, δηλαδή στους χειρισμούς [glu TR] και [CO₂ + glu TR], λόγω της εξαιρετικά μεγάλης αύξησης της κυτταρικής βιομάζας, είναι πολύ έντονο το φαινόμενο του αυτοσκιασμού, γεγονός που από μόνο του

μειώνει τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα, οπότε δεν είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε αν αυτές οι μειωμένες τιμές της μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, στην περίπτωση ύπαρξης της γλυκόζης, οφείλονται περισσότερο στην παρουσία της φαινολικής ένωσης ή πιθανότατα κυρίως στο φαινόμενο του αυτοσκιασμού.

Στον χειρισμό [limit C TR], οι τιμές της μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας στις ιωδοφαινόλες είναι παραπλήσιες με αυτήν του μάρτυρα, ενώ αυξημένες είναι στις χλώρο- και βρώμοφαινόλες, σε σύγκριση πάντα με τον μάρτυρα.

Τέλος, σημειώνεται ότι στη φαινόλη, όπου δεν υπάρχει κανενός είδους τοξικότητα, σύμφωνα με τις φωτοσυνθετικές παραμέτρους του Πίνακα 7, οι τιμές της μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας είναι υψηλότερες σε κάθε χειρισμό, συγκρινόμενες με τις αντίστοιχες τιμές του μάρτυρα.



Εικόνα 19. Μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας (30°C), έντασης φωτεινής ακτινοβολίας (50-60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), αρχικής κυτταρικής συγκέντρωσης (1,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) και φαινολικής συγκέντρωσης (1,5 mM). [CO₂ TR]: χειρισμός με 10% CO₂, [glu TR]: χειρισμός με 5 g/L γλυκόζη, [CO₂ + glu TR]: χειρισμός με 10% CO₂ και 5 g/L γλυκόζη, [limit C TR]: χειρισμός με περιορισμένη ποσότητα άνθρακα (0,04 % CO₂), control: μάρτυρας, phenol: φαινόλη, 2chl: 2-χλωροφαινόλη, 3chl: 3-χλωροφαινόλη, 4chl: 4-χλωροφαινόλη, 2bromo: 2-βρωμοφαινόλη, 3bromo: 3-βρωμοφαινόλη, 4bromo: 4-βρωμοφαινόλη, 2iodo: 2-ιωδοφαινόλη, 3iodo: 3-ιωδοφαινόλη, 4iodo: 4-ιωδοφαινόλη.

3. Βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων

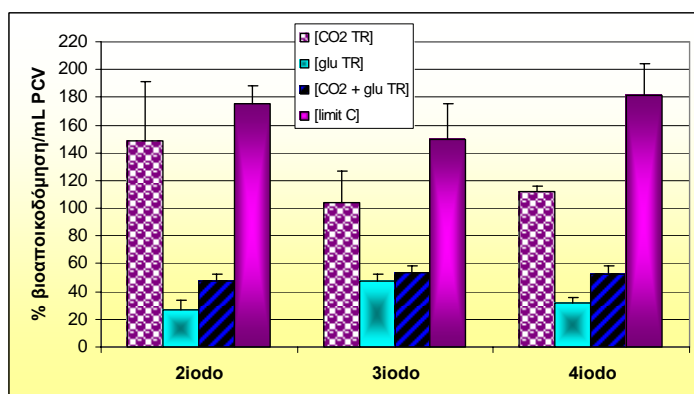
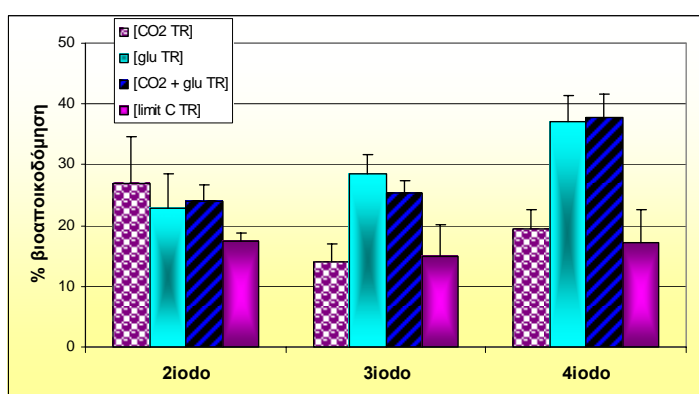
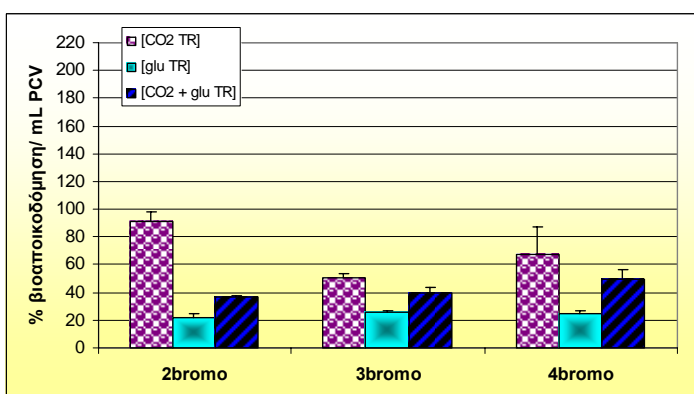
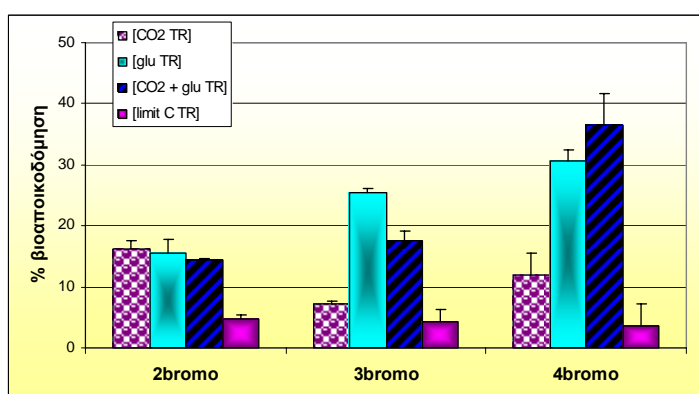
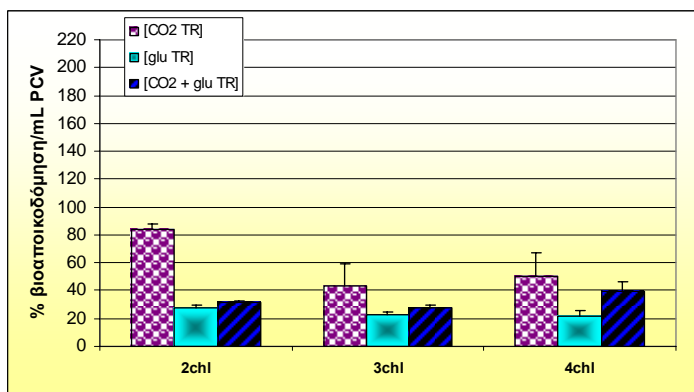
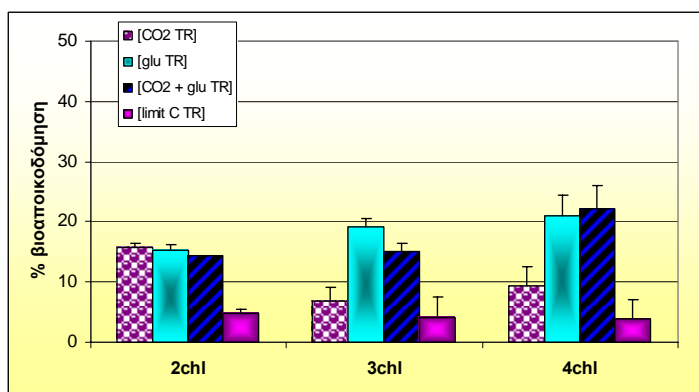
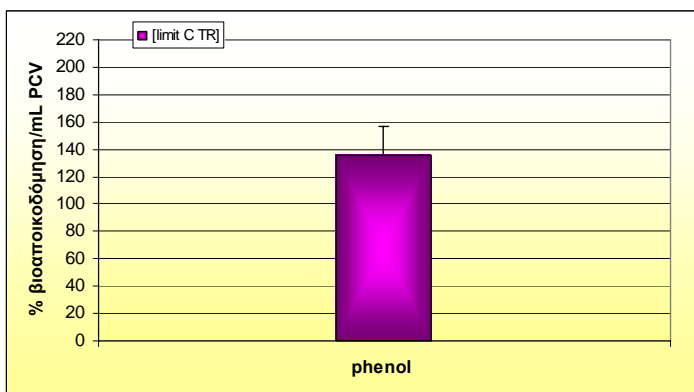
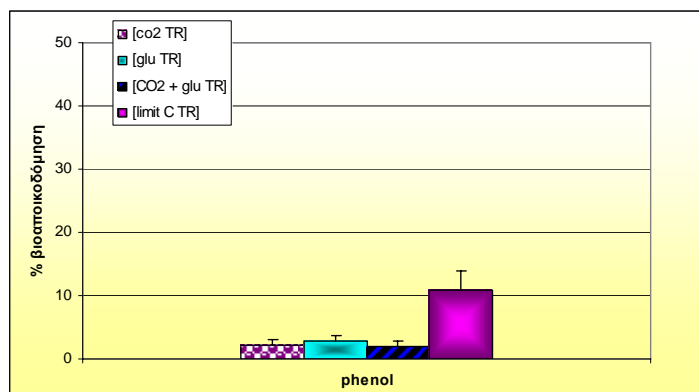
Τα αποτελέσματα της βιοαποικοδόμησης, μετά από αναλύσεις υγρής χρωματογραφίας υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (HPLC), συνοψίζονται στην Εικόνα 18, όπου η πρώτη στήλη αναφέρεται σε βιοαποικοδόμηση ανά 50 mL καλλιέργειας αρχικής συγκέντρωσης κυττάρων 1,5 μL PCV/mL, ενώ η δεύτερη αναφέρεται σε βιοαποικοδόμηση ανά κύτταρο. Επίσης σημειώνεται ότι όπου η βιοαποικοδόμηση ανά καλλιέργεια ήταν μικρότερη από 5%, δεν θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά, ώστε να γίνει αναγωγή ανά κύτταρο και γι' αυτό κάποια αποτελέσματα απουσιάζουν από τη δεύτερη στήλη της Εικόνας 20.

Από τα αποτελέσματα της Εικόνας 20, με κάθετη σύγκριση, είναι ολοφάνερο ότι η βιοαποικοδόμηση αυξάνεται, ακολουθώντας τη σειρά χλωροφαινόλες < βρωμοφαινόλες < ιωδοφαινόλες σε κάθε έναν από τους τέσσερις χρησιμοποιούμενους χειρισμούς.

Με οριζόντια σύγκριση για κάθε έναν από τους χειρισμούς στους οποίους παρέχεται πηγή άνθρακα, είτε αναφερόμαστε στις χλωροφαινόλες, είτε στις βρωμοφαινόλες, είτε στις ιωδοφαινόλες, ισχύουν ακριβώς τα ίδια συμπεράσματα. Στον [CO₂ TR] χειρισμό παρατηρείται μειωμένη βιοαποικοδόμηση, όταν ο υποκαταστάτης καταλαμβάνει την 3- θέση του φαινολικού δακτυλίου, ενώ στις 2- και 4- υποκαταστάσεις του αλογόνου υπάρχει μεγαλύτερη βιοαποικοδόμηση, με βέλτιστη αυτήν της 2- θέσης. Στον [glu TR] χειρισμό υπάρχει διαβάθμιση στην βιοαποικοδόμηση, που ακολουθεί τη σειρά 2-θέση < 3-θέση < 4-θέση. Στον [CO₂ + glu TR] χειρισμό υπάρχει παρόμοια βιοαποικοδόμηση, όταν οι υποκαταστάτες διακατέχουν την 2- και την 3-θέση του φαινολικού δακτυλίου, ενώ μεγαλύτερη βιοαποικοδόμηση αντιστοιχεί στην 4-θέση υποκατεστημένη αλογονοφαινόλη.

Στον [limit C TR] χειρισμό, όπου υπάρχει περιορισμένη συγκέντρωση σε άνθρακα, υπάρχει βιοαποικοδόμηση μόνο στις ιωδοφαινόλες, η οποία είναι σχεδόν ίδια σε όλες τις θέσεις του ιωδοϋποκατεστημένου φαινολικού δακτυλίου, με χαμηλότερη αυτήν που αντιστοιχεί στην 3-θέση.

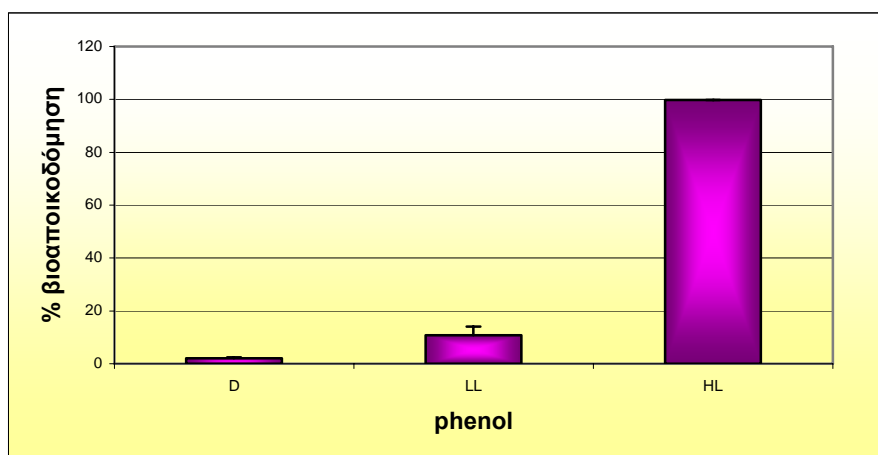
Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειώσουμε ότι η φαινόλη, δεν βιοαποικοδομείται σε κανέναν από τους χειρισμούς, όπου προσφέρεται άνθρακας στο μέσο καλλιέργειας, είτε με οργανική, είτε με ανόργανη μορφή, είτε συνδυασμός αυτών, αλλά υπάρχει βιοαποικοδόμηση της τάξης του 11% στον χειρισμό [limit C TR], όπου παρέχεται πολύ περιορισμένη ποσότητα σε άνθρακα (0,04% CO₂).



Εικόνα 20. Βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων από το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus* σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας (30°C), έντασης ακτινοβολίας (50-60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), αρχικής κυτταρικής συγκέντρωσης (1,5 $\mu\text{L PCV/mL}$) και φαινολικής συγκέντρωσης (1,5 mM). PCV: πακεταρισμένα κύτταρα, [CO₂ TR]: χειρισμός με 10% CO₂, [glu TR]: χειρισμός με 5 g/L γλυκόζη, [CO₂ + glu TR]: χειρισμός με 10% CO₂ και 5 g/L γλυκόζη, [limit C TR]: χειρισμός με περιορισμένη ποσότητα άνθρακα (0,04 % CO₂), phenol: φαινόλη, 2chl: 2-χλωροφαινόλη, 3chl: 3-χλωροφαινόλη, 4chl: 4-χλωροφαινόλη, 2bromo: 2-βρωμοφαινόλη, 3bromo: 3-βρωμοφαινόλη, 4bromo: 4-βρωμοφαινόλη, 2iodo: 2-ιωδοφαινόλη, 3iodo: 3-ιωδοφαινόλη, 4iodo: 4-ιωδοφαινόλη.

Αυτά τα αποτελέσματα αναφέρονται στο ποσοστό της βιοαποικοδόμησης ανά 50 mL καλλιέργειας. Αν τώρα παρατηρήσει κανείς το ποσοστό της βιοαποικοδόμησης ανά κύτταρο θα οδηγηθεί στο συμπέρασμα ότι μεγαλύτερη είναι η βιοαποικοδόμηση στον χειρισμό [limit C TR] (όπου υπάρχει), ακολουθεί ο χειρισμός [CO₂ TR], μετά ο [CO₂ + glu TR], ενώ στο τέλος βρίσκεται ο [glu TR]. Αυτά τα αποτελέσματα είναι απολύτως δικαιολογημένα, αν τα συνδυάσει κανείς με τα δεδομένα που έχουμε από τις καμπύλες ανάπτυξης. Με άλλα λόγια εκεί που υπάρχει μεγάλη ανάπτυξη βιομάζας και επομένως περισσότερα κύτταρα, υπάρχει μεγαλύτερη βιοαποικοδόμηση ανά καλλιέργεια, αλλά μικρότερη ανά κύτταρο, ενώ όταν υπάρχει μικρή ανάπτυξη βιομάζας μπορεί να υπάρχει και μικρότερο ποσοστό βιοαποικοδόμησης ανά καλλιέργεια, αλλά αυτό είναι μεγαλύτερο αν το εξετάσει κανείς ανά κύτταρο.

Ανάλογα αποτελέσματα υπάρχουν και για το σκοτάδι. Μόνο που στη συνθήκη αυτή κανένα ποσοστό βιοαποικοδόμησης, σε οποιονδήποτε από τους τέσσερις εξετασθέντες χειρισμούς, δεν ξεπέρασε το όριο των 5%, γι' αυτό και τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η βιοαποικοδόμηση της φαινόλης και των αλογονοφαινολών είναι μια αυστηρά φωτοεξαρτώμενη διαδικασία, αφού λαμβάνει χώρα μόνο παρουσία φωτός.



Εικόνα 21. Ποσοστά βιοαποικοδόμησης της φαινόλης στον [limit C TR] χειρισμό από το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus* σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας (30°C), αρχικής κυτταρικής συγκέντρωσης (1,5 μL PCV/mL) και φαινολικής συγκέντρωσης (1,5 mM) σε διάφορες εντάσεις ακτινοβολίας. D: σκοτάδι, LL: 50-60 μmol·m⁻²·s⁻¹, HL: 100-120 μmol·m⁻²·s⁻¹, [limit C TR]: χειρισμός με 0,04% CO₂, phenol: φαινόλη.

Άλλη μια απόδειξη της φωτορύθμισης της βιοαποικοδόμησης αποτελεί η βιοαποικοδόμηση της απλούστερης φαινολικής ένωσης, της φαινόλης. Το ποσοστό αποδόμησης της φαινόλης δεν ξεπερνάει το 11% στον [limit C TR] χειρισμό σε

ένταση φωτισμού $50-60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Αν όμως πράγματι η αποδόμηση είναι φωτοεξαρτώμενη θα περίμενε κανείς με αύξηση της έντασης του φωτός να αυξηθεί και το ποσοστό της βιοαποικοδόμησης της φαινόλης, δεδομένου ότι η παροχή μεγαλύτερης έντασης ακτινοβολίας ισοδυναμεί με παροχή επιπλέον ποσότητας ενέργειας. Έτσι, με διπλασιασμό της έντασης της φωτεινής ακτινοβολίας (από $50-60$ σε $100-120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) το αποτέλεσμα ήταν θεαματικό, δεδομένου ότι η βιοαποικοδόμηση της φαινόλης πλησίασε το 100%, όπως φαίνεται και στην παραπάνω Εικόνα 21.

Συζήτηση-Συμπεράσματα

Η βιοαποικοδόμηση, όπως φάνηκε και από τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι μια δυναμική διαδικασία, που επηρεάζει και επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων, μερικοί από τους οποίους μελετήθηκαν στην παρούσα μεταπτυχιακή έρευνα. Έτσι, ακολούθως θα σχολιαστούν συγκριτικά παράγοντες, που ρυθμίζουν το ποσοστό της βιοαποικοδόμησης, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται οι ενέργειες διάσπασης δεσμών, η αύξηση της κυτταρικής βιομάζας, η μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και όλα αυτά πάντα σε συνδυασμό με την εξωγενώς παρεχόμενη πηγή του άνθρακα.

Στο σημείο αυτό είναι αναγκαίο να τονίσουμε ότι τα αποτελέσματά μας εξαρτώνται άμεσα από τις αρχικές συνθήκες, δηλαδή από την θερμοκρασία, την ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας, τον τελικό όγκο της καλλιέργειας, την αρχική πυκνότητα της κυτταρικής βιομάζας και την αρχική συγκέντρωση της εκάστοτε φαινολικής ένωσης. Αυτό σημαίνει ότι, αν κάποια από αυτές τις παραμέτρους μεταβληθεί, τα αποτελέσματα πιθανόν να είναι εντελώς διαφορετικά. Με άλλα λόγια η βιοαποικοδόμηση είναι θέμα επιλογής κατάλληλων αρχικών συνθηκών, αλλά όχι μόνο αυτό [Yan & Pan, 2004; Yang et al, 2002].

Από τα αποτελέσματα της Εικόνας 20 παρατηρείται ότι η φαινόλη, η απλούστερη φαινολική ένωση, δεν βιοαποικοδομείται παρουσία εξωγενούς πηγής άνθρακα –είτε οργανικής πηγής, είτε ανόργανης, είτε συνδυασμού αυτών-. Όμως υπάρχει ένα ποσοστό βιοαποικοδόμησης της τάξης του 11%, όταν στο μέσο καλλιέργειας υπάρχει πολύ περιορισμένη αρχική συγκέντρωση σε άνθρακα (0,04% CO₂). Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η φαινόλη για το μικροφύκος αποτελεί εναλλακτική πηγή άνθρακα. Έτσι, από τις καμπύλες ανάπτυξης της Εικόνας 18, για την φαινόλη στον [limit C TR] χειρισμό, αποδεικνύεται ότι το μικροφύκος πρώτα βιοαποικοδομεί ένα μέρος της φαινολικής ένωσης και έπειτα χρησιμοποιεί την φαινόλη ως πηγή άνθρακα, ώστε να αναπτυχθεί. Γι' αυτό και η καμπύλη ανάπτυξης της φαινόλης στον [limit C TR] χειρισμό βρίσκεται πάνω από το control σε όλη τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος.

Στο σημείο αυτό όμως δημιουργείται το εξής ερώτημα: Πώς είναι δυνατόν το μικροφύκος να βιοαποικοδομεί τις αλογονοφαινόλες, όταν υπάρχει επαρκής πηγή άνθρακα, ενώ την ίδια στιγμή δεν βιοαποικοδομεί σε αυτές τις συνθήκες την απλούστερη φαινολική ένωση, την φαινόλη; Αυτή η παρατήρηση μας δίνει το

δικαίωμα να ισχυριστούμε ότι το στέλεχος βιοαποικοδομεί τις αλογονοφαινόλες μάλλον, γιατί χρειάζεται περισσότερο το αλογόνο και όχι την πηγή του άνθρακα, αλλιώς δε θα υπήρχε άλλος λόγος για να μπει ο οργανισμός στη διαδικασία της βιοαποικοδόμησης, αφού γι' αυτόν αποτελεί άλλη μια διαδικασία απώλειας ενέργειας.

Αυτή η υπόθεση υποστηρίζει ότι το πρώτο βήμα στη βιοαποικοδόμηση των αλογονοφαινολών είναι η αφαιολόγωση, για την οποία υπάρχουν διάφοροι βιολογικοί μηχανισμοί [Goldman, 1972]. Η αναγωγική αφαιολόγωση περιλαμβάνει την αφαίρεση ενός ατόμου αλόγονου μέσω οξειδοαναγωγικών δράσεων. Σύμφωνα με τους Kobayashi και Ritmann (1982), ο μηχανισμός περιλαμβάνει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από τις ανηγμένες οργανικές ουσίες μέσω των μικροοργανισμών ή ενός άβιου μεσολαβητή, όπως τα ανόργανα ιόντα, και τα βιολογικά προϊόντα. Οι μεσολαβητές αυτοί είναι αρμόδιοι για την πρόσληψη των ηλεκτρονίων από τις ανηγμένες οργανικές ουσίες και τη μεταφορά τους στις αλογονωμένες ενώσεις. Σημαντικότερες απαιτήσεις, για να λάβει χώρα η διαδικασία, θεωρούνται η ύπαρξη ελεύθερων διαθέσιμων ηλεκτρονίων και η άμεση επαφή μεταξύ του δότη, του μεσολαβητή, και του αποδέκτη των ηλεκτρονίων.

Όλα αυτά όμως με μια βασική προϋπόθεση, που είναι η ύπαρξη απαιτούμενης ενέργειας ενεργοποίησης, ώστε το στέλεχος να ξεκινήσει τη διαδικασία της αφαιολόγωσης και κατ' επέκταση τη βιοαποικοδόμηση. Εάν δεν υπάρχει αυτή η ενέργεια, τότε η βιοαποικοδόμηση δεν θα λάβει χώρα, όπως ακριβώς συμβαίνει και στον [limit C TR] χειρισμό, όπου οι χλωροφαινόλες και οι βρωμοφαινόλες δεν αποδομούνται. Αυτό εξηγείται αν αναλογιστεί κανείς ότι το μικροφύκος, δεδομένης της απουσίας της πηγής του άνθρακα, δεν έχει αυτήν την απαιτούμενη ενέργεια, ώστε να κάνει αποδόμηση και μετά να χρησιμοποιήσει το εναπομένον φαινολικό ιόν ως εναλλακτική πηγή άνθρακα για να αυξήσει τη βιομάζα του.

Το αμέσως επόμενο ερώτημα έγκειται στο γιατί αυτό να μη συμβαίνει στον [limit C TR] χειρισμό και στις ιωδοφαινόλες, οι οποίες αποδομούνται περίπου κατά 15%; Την απάντηση έρχεται να δώσει αυτό που καλείται ενέργεια διάσπασης δεσμών. Αν αναλογιστεί κανείς τη θέση των αλογόνων στον περιοδικό πίνακα, θα θεωρήσει αυτονόητο ότι απαιτείται περισσότερη ενέργεια για τη σχάση του δεσμού C-Cl ($\Delta H_{298} = 327 \text{ KJ/mol}$) λιγότερη για τον δεσμό C-Br ($\Delta H_{298} = 285 \text{ KJ/mol}$) και ακόμα λιγότερη για τον δεσμό C-I ($\Delta H_{298} = 213 \text{ KJ/mol}$). Έτσι η περιορισμένη ποσότητα του

άνθρακα που υπάρχει στο μέσο καλλιέργειας επαρκεί μόνο για να ξεκινήσει η αφαλογόνωση στις ιωδοφαινόλες, ενώ στις χλωρο- και βρωμοφαινόλες χρειάζεται, όπως φαίνεται από τις παραπάνω τιμές, περισσότερη ενέργεια ενεργοποίησης. Γι' αυτό και στις καμπύλες ανάπτυξης οι ιωδοφαινόλες βρίσκονται υψηλότερα από τον μάρτυρα, αφού μετά την αφαλογόνωση μπορούν να χρησιμοποιήσουν τον άνθρακα του εναπομένου φαινολικού ιόντος ως εναλλακτική πηγή άνθρακα.

Η απαιτούμενη ενέργεια για τη διάσπαση των δεσμών αποτελεί και την αιτία που σε όλους τους άλλους χειρισμούς –με 10% CO₂, με 5 g/L γλυκόζη ή συνδυασμός αυτών– η βιοαποικοδόμηση ακολουθεί τη διαβάθμιση χλωροφαινόλες < βρωμοφαινόλες < ιωδοφαινόλες.

Ένα άλλο σημείο που επιβάλλεται να σχολιαστεί είναι η τοξικότητα που προκαλείται, όταν το αλογόνο καταλαμβάνει την 3-θέση του φαινολικού δακτυλίου. Είναι ολοφάνερο από τις τιμές του Πίνακα 7 και την Εικόνα 19, ότι οι μετα-μονοϋποκατεστημένες αλογονοφαινόλες εμφανίζουν χαμηλές τιμές φωτοσυνθετικής απόδοσης (F_v/F_m) και μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, σε σύγκριση πάντα με τις αντίστοιχες του μάρτυρα. Όμως αυτή η τοξικότητα υπάρχει μόνο όταν το μικροφύκος μπει στη διαδικασία της αποδόμησης. Γι' αυτό και οι χαμηλές τιμές F_v/F_m υπάρχουν σε όλους τους χειρισμούς στις μετα-μονοϋποκατεστημένες αλογονοφαινόλες εκτός από τον χειρισμό [limit C TR], όπου οι χλώρο- και βρωμοφαινόλες στην 3-θεση δεν εμφανίζουν τοξικότητα, αφού δεν υπάρχει και βιοαποικοδόμηση.

Ανάλογα με την εξωγενώς παρεχόμενη πηγή άνθρακα (παρουσία φωτισμού) η τοξικότητα αυτή γίνεται περισσότερο ή λιγότερο ενοχλητική για το μικροφύκος, ενώ επηρεάζει περισσότερο ή λιγότερο το τελικό ποσοστό της βιοαποικοδόμησης. Συγκεκριμένα, στον [CO₂ TR] χειρισμό η τοξικότητα της 3-θέσης επηρεάζει πάρα πολύ τη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, αυξάνοντας το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (ABS/RC), μειώνοντας την πυκνότητα των ενεργών κέντρων (RC/CS₀) και αυξάνοντας την διαχεόμενη σε μη φωτοχημικές δράσεις ενέργεια (DI₀/RC), με άμεσο αντίκτυπο στην βιοαποικοδόμηση, η οποία είναι αισθητά μικρότερη σε σύγκριση με την αποδόμηση της όρθο ή πάρα υποκατάστασης.

Στον χειρισμό [glu TR] η τοξικότητα της 3-θέσης δεν επηρεάζει τόσο πολύ τη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, αφού με την παραπάνω ενέργεια που αυτή προσφέρει δεν μεταβάλλονται, λόγω έντονου στρες, οι παράγοντες

ABS/RC, DIo/RC, RC/CSo (Πίνακας 7). Μάλιστα παρατηρείται μια διαβάθμιση της αποδόμησης, που ακολουθεί τη σειρά 2-θέση < 3-θέση < 4-θέση, αν κοιτάξει κανείς τα αποτελέσματα ανά καλλιέργεια. Αν όμως ληφθούν υπόψη και τα δεδομένα της ανάπτυξης, οπότε γίνεται αναφορά σε βιοαποικοδόμηση ανά κύτταρο, τότε η αποδόμηση είναι ίδια σε οποιαδήποτε θέση και αν βρίσκεται το αλογόνο στον φαινολικό δακτύλιο (Εικόνα 20). Είναι ξεκάθαρο λοιπόν ότι για τη περίπτωση βιοαποικοδόμησης με εξωγενή πηγή άνθρακα τη γλυκόζη είναι θέμα καθαρά ανάπτυξης το επιτυγχανόμενο ποσοστό βιοαποικοδόμησης. Με άλλα λόγια περισσότερα κύτταρα θα αποδίδουν και μεγαλύτερο ποσοστό βιοαποικοδόμησης.

Στον $[CO_2 + glu TR]$ υπάρχει συνέργια παραγόντων, οπότε και η βιοαποικοδόμηση ακολουθεί ένα ανάλογο πρότυπο. Σύμφωνα με τον $[glu TR]$ χειρισμό θα αναμενόταν διαβαθμισμένη αποδόμηση που θα ακολουθούσε τη σειρά 2-θέση < 3-θέση < 4-θέση. Όμως λαμβανομένης υπόψη της έντονης τοξικότητας της μετά υποκατάστασης στον $[CO_2 TR]$ χειρισμό είναι αναμενόμενο να υπάρχει παρόμοια βιοαποικοδόμηση της 2- και 3- θέσης, ενώ αρκετά μεγαλύτερη να είναι η αποδόμηση της 4-θέσης.

Από όλα τα παραπάνω συνάγεται ότι η μελέτη της βιοαποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων από μικροφύκη έδειξε ξεκάθαρα ότι είναι μια βιοενεργητική διαδικασία, που εξαρτάται γενικά από τις συνθήκες ανάπτυξης των καλλιεργειών και ειδικότερα από την εξωγενώς παρεχόμενη ενεργειακή πηγή (φως, πηγή οργανικού άνθρακα, πηγή ανόργανου άνθρακα σε συνδυασμό με φωτισμό). Με τη βοήθεια του επαγωγικού φθορισμού του φωτοσυνθετικού μηχανισμού καταγράφηκε ο βαθμός ανθεκτικότητας των μικροφυκών σε σειρά φαινολικών ενώσεων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η φαινόλη δεν προκαλεί φαινόμενα τοξικότητας στις καλλιέργειες, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια εναλλακτική πηγή άνθρακα (τουλάχιστον σε μικρές συγκεντρώσεις). Ο βαθμός βιοαποικοδόμησης της φαινόλης από τα μικροφύκη είναι σε απόλυτη συνάρτηση με την έλλειψη πηγής άνθρακα στις καλλιέργειες. Σε αντίθεση οι αλογονοφαινόλες (χλωροφαινόλες, βρωμοφαινόλες και ιωδοφαινόλες) είναι σχετικά τοξικές για τις καλλιέργειες των μικροφυκών. Η βιοαποικοδόμηση τους γίνεται σε δύο βήματα. Το πρώτο βήμα είναι η αφαλογόνωση, δηλαδή η απόσπαση του αλογόνου. Αυτό βρέθηκε ότι είναι στενά συνδεδεμένο με την ενέργεια διάσπασης δεσμών του εκάστοτε υποκαταστάτη και σύμφωνα με τις ενεργειακές απαιτήσεις για τη βιοαποικοδόμηση, αυτές αυξάνουν σύμφωνα με την ακολουθία ιωδοφαινόλες <

βρωμοφαινόλες < χλωροφαινόλες. Επιπρόσθετα, η μετά-θέση του αλογόνου στο φαινολικό δακτύλιο απαιτεί περισσότερη ενέργεια σε σύγκριση με την όρθο- ή πάρα-θέση. Αυτοί είναι και οι πιθανοί λόγοι για τους οποίους οι αλογοφαινόλες χρειάζονται επιπρόσθετη πηγή ενέργειας, που μπορεί να παρασχεθεί είτε ως οργανικός άνθρακας (με την προσθήκη γλυκόζης) είτε ως ανόργανος άνθρακας (με την προσθήκη CO₂). Η χρήση του CO₂ ως επιπλέον πηγή άνθρακα αποδεικνύει ότι η φωτοσύνθεση παίζει σημαντικό ρόλο στην βιοαποικοδόμηση, γεγονός που ενισχύεται από την απουσία βιοαποικοδόμησης στο σκοτάδι, αναδεικνύοντας την βιοαποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων στα μικροφύκη ως μια φωτοεξαρτώμενη διαδικασία.

Επομένως η βιοαποικοδόμηση είναι πολύ περισσότερο θέμα επιλογής κατάλληλων αρχικών συνθηκών, παρά επιλογής κατάλληλου οργανισμού.

Βιβλιογραφία

1. Bishop N.L. & Senger H., 1971. Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of *Scenedesmus*, in A San Pietro (Ed.), *Methods in Enzymology*, Vol 23, Academic Press, New York, p.130-143.
2. Cerniglia C.E., Gibson D.T. & Van Baalen C. Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae. *J. Gen. Microbiol.* 116 (1980): 495–500.
3. DellaGreca M., Monaco P., Pinto G., Pollio A., Previtera L. & Temussi F. Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill waste waters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67 (2001): 352-359.
4. Ellis B.E. Degradation of phenolic compounds by fresh-water algae. *Plant Sci. Lett.* 8 (1977):213–216.
5. Gamila H.A., Ibrahim M.B.M. & Abd El-Ghafar H.H. The role of cyanobacterial isolated strains in the biodegradation of crude oil. *Intern J. Environ. Studies* 60 (2003): 435-444.
6. Goldman P., 1972. *Enzymology of Carbon-Halogen Bonds*, In degradation of synthetic organic molecules in the biosphere, National Academy of Sciences, Washington, p. 147-161.
7. Gutenkauf A., Duker A. & Fock H.P. Fate of substituted benzoates in the freshwater green alga, *Chlamydomonas reinhardtii* II-32b. *Biodegradation* 9 (1988): 359-368.
8. Hirooka T., Akiyama Y., Tsuji N., Nakamura T., Nagase H., Hirata K. & Miyamoto K. Removal of hazardous phenols by microalgae under photoautotrophic conditions. *J. Biosci. Bioeng.* 95 (2003): 200-203.
9. Hook I.L., Ryan S. & Sheridan H. Biotransformation of aromatic aldehydes by five species of marine microalgae. *Phytochemistry* 51 (1999): 621-627.
10. <http://www.nmnh.si.edu/botany/projects/algae/AlgIntro.htm>
11. Ioannidis N.E., Sfichi L. & Kotzabasis K. Putrescine stimulates chemiosmotic ATP synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006): 821-828.
12. Joseph V. & Joseph A. Acclimation of Algal Species Following Exposure to Phenol. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 62 (1999): 87-92.
13. Kautsky H. & Hirsch A. Neue versuche zur kohlesäureassimilation. *Naturwissenschaften* 19 (1931): 964.

14. Klekner V. & Kosaric N. Degradation of phenols by algae. *Environ. Technol.* 13 (1992):493–501.
15. Kneifel H., Elmendorff K., Hegewald E. & Soeder C.J. Biotransformation of 1-naphthalenesulfonic acid by the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Arch Microbiol* 167 (1997): 32-37.
16. Kobayashi H. & Rittmann B.E. Microbial removal of hazardous organic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 16 (1982): 170A-183A.
17. Kotzabasis K., Strasser B., Navakoudis E., Senger H. & Dornemann D. The regulatory role of polyamines in structure and functioning of the photosynthetic apparatus during photoadaptation. *J. Photochem. Photobiol.* 50 (1999): 45-52.
18. Laing L., 1991. Cultivation of marine, unicellular algae, Laboratory leaflet, No 67, Lowestoft, p. 7-31.
19. Lee P.E., 1999. *Phycology*, 3rd Edition, p. 3-64 και 415-458.
20. Lima S.A.C., Castro P.M.L. & Morais R. Biodegradation of p-nitrophenol by microalgae. *J. Appl. Phycol.* 15 (2003): 137-142.
21. Logothetis K., Dakanali S., Ioannidis N. & Kotzabasis K. The impact of high CO₂ concentration on the structure and function of the photosynthetic apparatus and the role of polyamines. *J. Plant Physiol.* 161 (2004): 715-724.
22. Lovell C.R., Eriksen N.T., Lewitus A.J. & Chen Y.P. Resistance of the marine diatom *Thalassiosira* sp. to toxicity of phenolic compounds. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 229 (2002): 11-18.
23. Lütz C., Navakoudis E., Seidlitz H.K. & Kotzabasis K. Simulated solar irradiation with enhanced UV-B adjust plastid- and thylakoid-associated polyamine changes for UV-B protection. *Biochim. Biophys. Acta* 1710 (2005): 24-33.
24. Mc Murry J., 1998. *Οργανική Χημεία*, Τόμος I, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ. 655-760.
25. Mc Murry J., 1999. *Οργανική Χημεία*, Τόμος II, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ.1189-1234.
26. Navakoudis E., Lütz C., Langebartels C., Lütz–Meindl U. & Kotzabasis K. Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines. *Biochim. Biophys. Acta* 1621 (2003): 160–169.
27. Pinto G., Pollio A., Previtiera L. & Temussi F. Biodegradation of phenols by microalgae. *Biotechnol. Lett.* 24 (2002): 2047-2051.

28. Rao N.N., Dubey A.K., Mohanty S., Khate P., Jain R. & Kaul S.N., 2003. Photocatalytic degradation of 2-chlorophenol: a study of kinetics, intermediates and biodegradability. *Journal of hazardous materials* 101, p. 301-307.
29. Rehm H.J., Reed G., Puhler A. & Stadler P., 2000. *Biotechnology*, p. 212-271.
30. Richmond A., 2000. *Handbook of Microalgal Culture*, p. 69-100.
31. Richmond A., 2004. *Handbook of Microalgal Culture*, p. 83-115 και 125-177.
32. Rittmann B.E. & Mc Carty P.L., 2001. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*, p. 637-694.
33. Semple K.T. Biodegradation of phenols by a eukaryotic alga. *Res.Mikrobiol.* 148 (1997): 365-367.
34. Semple K.T., Cain R.B. & Schmidt S. Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbial. Let.*170 (1999): 291-300.
35. Sfichi L., Ioannidis N. & Kotzabasis K. Thylakoid-associated Polyamines Adjust the UV-B Sensitive of the Photosynthetic apparatus by means of Light-harvesting Complex II Changes. *Photochem. Photobiol.* 80 (2004): 499–506.
36. Strasser B.J. & Strasser R.J., 1995. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test, in P Mathis (Ed.) *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, vol. V, Kluwer Academic Press, Dordrecht, p. 977-980.
37. Tam N.F.Y., Chong A.M.Y. & Wong Y.S. Removal of tributyltin (TBT) by live and dead microalgal cells”. *Mar. Pollut. Bul.* 45 (2002): 362-371.
38. Tikoo V., Scragg A.H. & Shales S. W. Degradation of pentachlorophenol by microalgae. *J. Chem. Tech. Biotech.* 68 (1997):425–431.
39. Todd S.J., Cain R.B. & Schmidt S. Biotransformation of naphthalene and diaryl ethers by green microalgae. *Biodegradation* 13 (2002): 229-238.
40. van Schie P.M. & Young L.T., 2000. Biodegradation of Phenol: Mechanisms and Applications. *Bioremediation Journal* 4 (1), p. 1-18.
41. Warshawsky D., Cody T., Radike M., Reilman R., Schumann B., La Dow K. & Schneider J. Biotransformation of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light. *Chem. Biol. Interact.* 97 (1995): 131–148.
42. Warshawsky D., Radike M., Jayasimhulu K. & Cody T. Metabolism of benzo(a)pyrene by a dioxygenase enzyme system of the freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152 (1988): 540–544.

43. Yan H. & Pan G. Increase in biodegradation of dimethyl phthalate by *Closterium lunula* using inorganic carbon. *Chemosphere* 55 (2004): 1281-1285.
44. Yang S., Wu R.S.S. & Kong R.Y.C. Biodegradation and enzymatic responses in the marine diatom *Skeletonema costatum* upon exposure to 2,4-dichlorophenol. *Aquat. Toxicol.* 59 (2002): 191-200.
45. Κέκος Δ. & Παπαγιαννάκος Ν., 1999. «Σημειώσεις Βιοχημικής Μηχανικής», Αθήνα, σελ 37-80.
46. Κλούρας Ν.Δ., 1999. Βασική Ανόργανη Χημεία, Εκδοτικός οίκος Τραυλός, σελ.145-196.
47. Μακρής Β.Ι., Κέκος Δ. & Χριστακόπουλος Π., 1999. «Στοιχεία βασικής βιοτεχνολογίας», Αθήνα, σελ. 28-30.
48. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη Κ.Α., 2003. Φυσιολογία Φυτών, Από το μόριο στο περιβάλλον, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ.145-189.

Παράρτημα Ι

Πίνακας 1. Βιβλιογραφικές αναφορές βιοαποικοδόμησης τοξικών ενώσεων από μικροφύκη

Συγγραφέας	Μικροφύκος (φύλο)	Τοξική ένωση (αρχική συγκέντρωση)	% Βιοαποικοδόμηση/χρόνος [σε ημέρες (d)]	Συνθήκες καλλιέργειας
Gamila H.A. et al., 2003	<i>Anabaena sphaerica</i> (κυανοπράσινο φύκος)	<ol style="list-style-type: none"> 1. κανονικό δεκάνιο 2. κανονικό δωδεκάνιο 3. κανονικό δεκατεσσεράνιο 4. κανονικό δεκαεξάνιο 5. κανονικό δεκαοχτάνιο 6. κανονικό εικοσάνιο 7. κανονικό εικοσιδυάνιο 8. κανονικό εισιτεσσεράνιο 9. ναφθαλίνιο 10. ακεναφθυλένιο 11. ακεναφθένιο 12. φλουορένιο 13. φαινανθρένιο 14. ανθρακένιο 15. φλουορανθένιο 16. πυρένιο 17. βενζο[a]ανθρακένιο 18. χρυσένιο 19. βενζο[b]φλουορανθένιο 20. βενζο[a]πυρένιο 21. διβενζο[a,h]ανθρακένιο <p>* πρόκειται για ενώσεις, που περιέχονται</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 47,9 % / 7 d και 100 % / 63 d 2. 44,8 % / 7 d, και 100 % / 63 d 3. 42,6 % / 7 d και 100 % / 63 d 4. 47,9 % / 7 d και 100 % / 63 d 5. 39,7 % / 7 d και 99,4 % / 63 d 6. 36,8 % / 7 d και 99,0 % / 63 d 7. 35,1 % / 7 d και 100 % / 63 d 8. 29,9 % / 7 d και 99,0 % / 63 d 9. 51,7 % / 7 d και 100 % / 49 d 10. 8,1 % / 7 d και 98,5 % / 63 d 11. 14,0 % / 7 d και 98,3 % / 63 d 12. 19,4 % / 7 d και 90,1 % / 63 d 13. 11,1 % / 7 d και 100 % / 63 d 14. 13,3 % / 7 d και 100 % / 63 d 15. 22,4 % / 7 d και 98,7 % / 63 d 16. 10,8 % / 7 d και 97,4 % / 63 d 17. 16,4 % / 7 d και 100 % / 63 d 18. 9,5 % / 7 d και 96,4 % / 63 d 19. 7,8 % / 7 d και 100 % / 63 d 20. 10,0 % / 7 d και 100 % / 63 d 21. 8,2 % / 7 d και 90,4 % / 63 d 	Θερμοκρασία : 24 °C Φως : 33,75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Συνεχές φως Απουσία νιτρικών Κωνικές φιάλες (5 L)

		σε 0,1 mg/L πετρελαίου πυκνότητας 0,84 g/L		
Gamila H.A. et al., 2003	<i>Oscillatoria agardhii</i> (κυανοπράσινο φύκος)	<ol style="list-style-type: none"> 1. κανονικό δεκάνιο 2. κανονικό δωδεκάνιο 3. κανονικό δεκατεσσεράνιο 4. κανονικό δεκαεξάνιο 5. κανονικό δεκαοχτάνιο 6. κανονικό εικοσάνιο 7. κανονικό εικοσιδυνάνιο 8. κανονικό εισιτεσσεράνιο 9. ναφθαλίνιο 10. ακεναφθυλένιο 11. ακεναφθένιο 12. φλουορένιο 13. φαινανθρένιο 14. ανθρακένιο 15. φλουορανθένιο 16. πυρένιο 17. βενζο[a]ανθρακένιο 18. χρυσένιο 19. βενζο[b]φλουορανθένιο 20. βενζο[a]πυρένιο 21. διβενζο[a,h]ανθρακένιο <p>* πρόκειται για ενώσεις, που περιέχονται σε 0,1 mg/L πετρελαίου πυκνότητας 0,84 g/L</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 49,7 % / 7 d και 98,2 % / 35 d 2. 48,2 % / 7 d και 98,2 % / 35 d 3. 45,4 % / 7 d και 98,1 % / 35 d 4. 44,7 % / 7 d και 97,6 % / 35 d 5. 41,1 % / 7 d και 97,7 % / 35 d 6. 36,2 % / 7 d και 97,6 % / 35 d 7. 34,6 % / 7 d και 96,9 % / 35 d 8. 31,1 % / 7 d και 96,6 % / 35 d 9. 16,0 % / 7 d και 74,6 % / 35 d 10. 19,4 % / 7 d και 66,8 % / 35 d 11. 13,2 % / 7 d και 75,4 % / 35 d 12. 20,0 % / 7 d και 78,0 % / 35 d 13. 21,8 % / 7 d και 71,5 % / 35 d 14. 14,6 % / 7 d και 76,1 % / 35 d 15. 10,9 % / 7 d και 84,6 % / 35 d 16. 15,5 % / 7 d και 81,6 % / 35 d 17. 12,7 % / 7 d και 69,2 % / 35 d 18. 13,1 % / 7 d και 66,9 % / 35 d 19. 18,4 % / 7 d και 83,2 % / 35 d 20. 14,7 % / 7 d και 78,9 % / 35 d 21. 13,9 % / 7 d και 85,0 % / 35 d 	Θερμοκρασία : 24 °C Φως : 33,75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Συνεχές φως Απουσία νιτρικών Κωνικές φιάλες (5 L)
Gutenkauf A. et al., 1998	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> II-32b	<ol style="list-style-type: none"> 1. βενζοϊκό οξύ (250 mg/L) 2. 2-νιτροβενζοϊκό οξύ (250 mg/L) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 95,5 % / 21 d 2. 0 % / 21 d 	Θερμοκρασία : 22°C Φως : 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

	(πράσινο φύκος)	3. 3-νιτροβενζοϊκό οξύ (250 mg/L) 4. 4-νιτροβενζοϊκό οξύ (250 mg/L) 5. 4-αμινοβενζοϊκό οξύ (250 mg/L) 6. 2,4-δινιτροβενζοϊκό οξύ (250 mg/L) 7. 3,5-δινιτροβενζοϊκό οξύ (250 mg/L) 8. 3,5-δινιτρο 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (250 mg/L) 9. 3-σουλφοβενζοϊκό οξύ (250 mg/L) 10. 4-σουλφοβενζοϊκό οξύ (250 mg/L) 11. 2-χλωροβενζοϊκό οξύ (250 mg/L) 12. 3-χλωροβενζοϊκό οξύ (100 mg/L) 13. 4-χλωροβενζοϊκό οξύ (100 mg/L) 14. 2-χλωρο 3,5-δινιτροβενζοϊκό οξύ (250 mg/L) 15. 4-χλωρο 3,5-δινιτροβενζοϊκό οξύ (250 mg/L) 16. 2,4-διχλωροβενζοϊκό οξύ (200 mg/L) 17. 2,5-δινιτροβενζοϊκό οξύ (200 mg/L) 18. 3,4-διχλωροβενζοϊκό οξύ (200 mg/L) 19. 3,5-διχλωροβενζοϊκό οξύ (200 mg/L) 20. 2,4-διχλωρο 3,5-δινιτροβενζοϊκό οξύ (40 mg/L) 21. 2,4,6-τριχλωροβενζοϊκό οξύ (300 mg/L)	3. 22,5 % / 21 d 4. 95,5 % / 21 d 5. 94,5 % / 21 d 6. 49,5 % / 21 d 7. 39,5 % / 21 d 8. 54,5 % / 21 d 9. 11,5 % / 21 d 10. 24,5 % / 21 d 11. 22,5 % / 21 d 12. 7,5 % / 21 d 13. 4,5 % / 21 d 14. 42,5 % / 21d 15. 72,5 % / 21 d 16. 12,5 % / 21 d 17. 14,5 % / 21 d 18. 13,5 % / 21 d 19. 31,5 % / 21 d 20. 0 % / 21 d 21. 9,5 % / 21 d	Συνεχές φως Παροχή 0,035 % CO ₂ Κωνικές φιάλες
Hirooka T. et al., 2003	<i>Carteria inverse</i> <i>NIES 422</i> (πράσινο φύκος)	1. 2,4-δινιτροφαινόλη (7,36 mg/L)	1. 38 % / 3 d	Θερμοκρασία : 27,3 °C Φως : 64,28 μmol m ⁻² s ⁻¹ Συνεχές φως Παροχή 1% CO ₂

				pH : 7,5 Κωνικές φιάλες (100 mL)
Hirooka T. et al., 2003	<i>Chlamidomonas fasciata</i> NIES 437 (πράσινο φύκος)	1. 2,4-δινιτροφαινόλη (7,36 mg/L)	1. 20 % / 3 d	Θερμοκρασία : 27,5 °C Φως : 64,28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Συνεχές φως Παροχή 1% CO ₂ pH : 7,5 Κωνικές φιάλες (100 mL)
Hirooka T. et al., 2003	<i>Chlamidomonas moewusii</i> IAM C-259 (πράσινο φύκος)	1. 2,4-δινιτροφαινόλη (7,36 mg/L)	1. 3 % / 3 d	Θερμοκρασία : 27,5 °C Φως : 64,28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Συνεχές φως Παροχή 1% CO ₂ pH : 7,5 Κωνικές φιάλες (100 mL)
Hirooka T. et al., 2003	<i>Chlamidomonas reinhardtii</i> IAM C-238 (πράσινο φύκος)	1. 2,4-δινιτροφαινόλη (7,36 mg/L)	1. 1 % / 3 d	Θερμοκρασία : 27,5 °C Φως : 64,28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Συνεχές φως Παροχή 1% CO ₂ pH : 6,0 Κωνικές φιάλες (100 mL)
Hirooka T. et al., 2003	<i>Chlorella ellipsoidea</i> IAM C-87 (πράσινο φύκος)	1. 2,4-δινιτροφαινόλη (7,36 mg/L)	1. 5 % / 3 d	Θερμοκρασία : 27,5 °C Φως : 64,28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Συνεχές φως Παροχή 1% CO ₂ pH : 6,0 Κωνικές φιάλες (100 mL)
Hirooka T. et al., 2003	<i>Chlorella fusca</i> var. <i>vacuolata</i> IAM C-	1. ο-νιτροφαινόλη (7,36 mg/L) 2. m-νιτροφαινόλη (7,36 mg/L)	1. 100 % / 5 d σε συνεχές φως και 95 % / 5 d στο σκοτάδι	Θερμοκρασία : 27,5 °C Φως : 64,28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

	28 (πράσινο φύκος)	<ol style="list-style-type: none"> 3. p-νιτροφαινόλη (7,36 mg/L) 4. 2,4-δινιτροφαινόλη (7,36 mg/L) 5. 2,4,6-τρινιτροφαινόλη (7,36 mg/L) 6. δισφαινόλη (7,36 mg/L) 	<ol style="list-style-type: none"> 2. 60 % / 5 d σε συνεχές φως και 0 % / 5 d 3. 77 % / 5 d σε συνεχές φως και 10 % / 5 d στο σκοτάδι 4. 57 % / 3 d σε συνεχές φως, 90 % / 5 d σε συνεχές φως και 68 % / 5 d στο σκοτάδι 5. 0 % / 5 d σε συνεχές φως και 0 % / 5 d στο σκοτάδι 6. 85 % / 5 d σε συνεχές φως και 22 % / 5 d στο σκοτάδι 	<p>Παροχή 1% CO₂ pH : 6,0 Κωνικές φιάλες (100 mL)</p>
Hirooka T. et al., 2003	<i>Chlorella sorokiniana</i> IAM C-212 (πράσινο φύκος)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 2,4-δινιτροφαινόλη (7,36 mg/L) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 26 % / 3 d 	<p>Θερμοκρασία : 27,5 °C Φως : 64,28 μmol m⁻² s⁻¹ Συνεχές φως Παροχή 1% CO₂ pH : 6,6 Κωνικές φιάλες (100 mL)</p>
Hirooka T. et al., 2003	<i>Anabaena cylindrical</i> NIES 19 (κυανοβακτήριο)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 2,4-δινιτροφαινόλη (7,36 mg/L) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 20 % / 3 d 	<p>Θερμοκρασία : 27,5 °C Φως : 64,28 μmol m⁻² s⁻¹ Συνεχές φως Παροχή 1% CO₂ pH : 6,0 Κωνικές φιάλες (100 mL)</p>
Hirooka T. et al., 2003	<i>Anabaena variabilis</i> NIES 23 (κυανοβακτήριο)	<ol style="list-style-type: none"> 1. o-νιτροφαινόλη (7,36 mg/L) 2. m-νιτροφαινόλη (7,36 mg/L) 3. p-νιτροφαινόλη (7,36 mg/L) 4. 2,4-δινιτροφαινόλη (7,36 mg/L) 5. 2,4,6-τρινιτροφαινόλη (7,36 mg/L) 6. δισφαινόλη (7,36 mg/L) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 100 % / 5 d σε συνεχές φως και 97 % / 5 d στο σκοτάδι 2. 100 % / 5 d σε συνεχές φως και 84 % / 5 d στο σκοτάδι 3. 4 % / 5 d σε συνεχές φως και 4 % / 5 d στο σκοτάδι 	<p>Θερμοκρασία : 27,5 °C Φως : 64,28 μmol m⁻² s⁻¹ Παροχή 1% CO₂ pH : 7,5 Κωνικές φιάλες (100 mL)</p>

			<ol style="list-style-type: none"> 4. 86 % / 3 d σε συνεχές φως, 95 % / 5 d σε συνεχές φως και 81 % / 5 d στο σκοτάδι 5. 51 % / 5 d σε συνεχές φως και 0 % / 5 d στο σκοτάδι 6. 23 % / 5 d σε συνεχές φως και 0 % / 5 d στο σκοτάδι 	
Hirooka T. et al., 2003	<i>Microcystis aeruginosa f. aeruginosa</i> NIES 44 (κυανοβακτήριο)	1. 2,4-δινιτροφαινόλη (7,36 mg/L)	1. 63 % / 3 d	Θερμοκρασία : 27,5 °C Φως : 64,28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Συνεχές φως Παροχή 1% CO ₂ pH : 8,0 Κωνικές φιάλες (100 mL)
Hirooka T. et al., 2003	<i>Chlorella fusca var. vacuolata</i> IAM C-28 (πράσινο φύκος)	<ol style="list-style-type: none"> 1. ο-χλωροφαινόλη (5,12 mg/L) 2. p-χλωροφαινόλη (5,12 mg/L) 3. 2,4-διχλωροφαινόλη (6,52 mg/L) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 15 % / 5 d 2. 14 % / 5 d 3. 21 % / 5 d 	Θερμοκρασία : 25 °C Φως : 64,28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Συνεχές φως Ανάδευση : shaker pH : 6,0 Κωνικές φιάλες (100 mL)
Hirooka T. et al., 2003	<i>Anabaena variabilis</i> NIES 23 (κυανοβακτήριο)	<ol style="list-style-type: none"> 1. ο-χλωροφαινόλη (5,12 mg/L) 2. p-χλωροφαινόλη (5,12 mg/L) 3. 2,4-διχλωροφαινόλη (6,52 mg/L) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 36 % / 5 d 2. 36 % / 5 d 3. 31 % / 5 d 	Θερμοκρασία : 25 °C Φως : 64,28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ανάδευση : shaker pH : 7,5 Κωνικές φιάλες (100 mL)
Hook I.L. et al., 1999	<i>Chlorella minutissima</i> (πράσινο φύκος)	<ol style="list-style-type: none"> 1. βενζαλδεΐδη (100 mg/L) 2. 2-χλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 3. 3- χλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 4. 4- χλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 5. 2,3-διχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 100 % / 1 d 2. 9 % / 5 d 3. 10 % / 5 d 4. 80 % / 5 d 5. < 1 % / 5 d 	Θερμοκρασία : 25 °C Φως : 91,8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ημέρα : Νύχτα 18:6 Ανάδευση : shaker 90 rpm Κωνικές φιάλες (100 mL)

		6. 2,4-διχλωροβενζαλδεΰδη (100 mg/L) 7. 3,4-διχλωροβενζαλδεΰδη (100 mg/L) 8. 2-μεθόξυχλωροβενζαλδεΰδη (100 mg/L) 9. 3-μεθόξυχλωροβενζαλδεΰδη (100 mg/L) 10. 4-μεθόξυχλωροβενζαλδεΰδη (100 mg/L) 11. 4-υδροξύ3-μεθόξυχλωροβενζαλδεΰδη (100 mg/L)	6. 1 % / 5 d 7. 6 % / 5 d 8. 100 % / 5 d 9. 97 % / 5 d 10. 100 % / 5 d 11. 0 % / 5 d	
Hook I.L. et al., 1999	<i>Nannochloris atomus</i> (πράσινο φύκος)	1. βενζαλδεΰδη (100 mg/L) 2. 2-χλωροβενζαλδεΰδη (100 mg/L) 3. 3- χλωροβενζαλδεΰδη (100 mg/L) 4. 4- χλωροβενζαλδεΰδη (100 mg/L) 5. 2,3-διχλωροβενζαλδεΰδη (100 mg/L) 6. 2,4-διχλωροβενζαλδεΰδη (100 mg/L) 7. 3,4-διχλωροβενζαλδεΰδη (100 mg/L) 8. 2-μεθόξυχλωροβενζαλδεΰδη (100 mg/L) 9. 3-μεθόξυχλωροβενζαλδεΰδη (100 mg/L) 10. 4-μεθόξυχλωροβενζαλδεΰδη (100 mg/L) 11. 4-υδροξύ3-μεθόξυχλωροβενζαλδεΰδη (100 mg/L)	1. 100 % / 1 d 2. 1 % / 5 d 3. 83 % / 5 d 4. 89 % / 5 d 5. < 1 % / 5 d 6. 7 % / 5 d 7. 3 % / 5 d 8. 100 % / 5 d 9. 100 % / 5 d 10. 97 % / 5 d 11. 0 % / 5 d	Θερμοκρασία : 25 °C Φως : 91,8 μmol m ⁻² s ⁻¹ Ημέρα : Νύχτα 18:6 Ανάδευση : shaker 90 rpm Κωνικές φιάλες (100 mL)
Hook I.L. et al., 1999	<i>Dunaliella parva</i> (πράσινο φύκος)	1. βενζαλδεΰδη (100 mg/L) 2. 2-χλωροβενζαλδεΰδη (100 mg/L) 3. 3- χλωροβενζαλδεΰδη (100 mg/L) 4. 4- χλωροβενζαλδεΰδη (100 mg/L)	1. 100 % / 4 d 2. 0 % / 5 d 3. 70 % / 5 d 4. 95 % / 5 d	Θερμοκρασία : 25 °C Φως : 91,8 μmol m ⁻² s ⁻¹ Ημέρα : νύχτα 18:6 Ανάδευση : shaker 90 rpm

		5. 2,3-διχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 6. 2,4-διχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 7. 3,4-διχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 8. 2-μεθόξυχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 9. 3-μεθόξυχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 10. 4-μεθόξυχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 11. 4-υδροξύ3-μεθόξυχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L)	5. < 1 % / 5 d 6. 12 % / 5 d 7. 27 % / 5 d 8. 94 % / 5 d 9. 98 % / 5 d 10. 97 % / 5 d 11. 0 % / 5 d	Κωνικές φιάλες (100 mL)
Hook I.L. et al., 1999	<i>Porphyridium purpureum</i> (κόκκινο φύκος)	1. βενζαλδεΐδη (100 mg/L) 2. 2-χλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 3. 3- χλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 4. 4- χλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 5. 2,3-διχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 6. 2,4-διχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 7. 3,4-διχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 8. 2-μεθόξυχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 9. 3-μεθόξυχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 10. 4-μεθόξυχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 11. 4-υδροξύ3-μεθόξυχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L)	1. 100 % / 1 d 2. 0 % / 5 d 3. 99 % / 4 d 4. 76 % / 5 d 5. < 1 % / 5 d 6. 4 % / 5 d 7. 22 % / 5 d 8. 100 % / 5 d 9. 58 % / 4 d 10. 100 % / 5 d 11. 0 % / 5 d	Θερμοκρασία : 25 °C Φως : 91,8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ημέρα : Νύχτα 18:6 Ανάδευση : shaker 90 rpm Κωνικές φιάλες (100 mL)
Hook I.L. et al., 1999	<i>Isichrysis galbana</i> (χρυσοκαφέ φύκος)	1. βενζαλδεΐδη (100 mg/L) 2. 2-χλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 3. 3- χλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L)	1. 100 % / 3 d 2. 0 % / 5 d 3. 68 % / 5 d	Θερμοκρασία : 25°C Φως : 91,8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ημέρα : Νύχτα 18:6

		<ol style="list-style-type: none"> 4. 4- χλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 5. 2,3-διχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 6. 2,4-διχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 7. 3,4-διχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 8. 2-μεθόξυχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 9. 3-μεθόξυχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 10. 4-μεθόξυχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 11. 4-υδρόξυ3-μεθόξυχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 	<ol style="list-style-type: none"> 4. 1% / 5 d 5. < 1 % / 5 d 6. 1 % / 5 d 7. 1 % / 5 d 8. 100 % / 5 d 9. 96 % / 5 d 10. 100 % / 5 d 11. 0 % / 5 d 	χωρίς ανάδευση Κωνικές φιάλες (100 mL)
Hook I.L. et al., 1999	<i>Euglena Gracilis</i> (ευγληνόφυτο)	<ol style="list-style-type: none"> 1. βενζαλδεΐδη (100 mg/L) 2. 2-χλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 3. 3- χλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 4. 4- χλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 5. 2,3-διχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 6. 2,4-διχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 7. 3,4-διχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 8. 2-μεθόξυχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 9. 3-μεθόξυχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 10. 4-μεθόξυχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 11. 4-υδρόξυ3-μεθόξυχλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 100 % / 1 d 2. 100 % / 1 d 3. 100 % / 5 d 4. 100 % / 5 d 5. 100 % / 5 d 6. 100 % / 5 d 7. 100 % / 5 d 8. 100 % / 1 d 9. 100 % / 5 d 10. 100 % / 5 d 11. 100 % / 5 d 	Ανεπαρκείς πληροφορίες
Hook I.L. et al., 1999	<i>D. Tertiolacta</i> (χλωροφύκος)	<ol style="list-style-type: none"> 1. βενζαλδεΐδη (100 mg/L) 2. 2-χλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 100 % / 1 d 2. 100 % / 1 d 	Ανεπαρκείς πληροφορίες

		3. 3-χλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 4. 4-χλωροβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 5. 2-μεθοξυβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 6. 3-μεθοξυβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 7. 4-μεθοξυβενζαλδεΐδη (100 mg/L) 8. 4-υδροξυ 3-μεθοξυβανζαλδεΐδη (100 mg/L)	3. 100 % / 5 d 4. 100 % / 5 d 5. 100 % / 1 d 6. 100 % / 1 d 7. 100 % / 1 d 8. 25 % / 9 d	
Joseph V. et al., 1999	<i>O.pusilla</i> (πράσινο φύκος)	1. φαινόλη (4 mg/L)	1. 16,4 % / 1 d	Θερμοκρασία : 28 °C Συνεχές φως σωλήνες καλλιέργειας (50 mL)
Joseph V. et al., 1999	<i>C.pyrenoidosa</i> (πράσινο φύκος)	1. φαινόλη (4 mg/L)	1. 16,4 % / 1 d	Θερμοκρασία : 28 °C Συνεχές φως σωλήνες καλλιέργειας (50 mL)
Joseph V. et al., 1999	<i>O.quadrripunctulata</i> (πράσινο φύκος)	1. φαινόλη (25 mg/L)	1. 68,4 % / 1 d	Θερμοκρασία : 28 °C Συνεχές φως σωλήνες καλλιέργειας (50 mL)
Kneifel H. et al., 1997	<i>Scenedesmus obliquus</i> (πράσινο φύκος)	1. 1-ναφθαλινοσουλφονικό οξύ (100 mg/L)	1. 2,7 % / 1 d και 18,1 % / 7 d * τα ποσοστά αναφέρονται σε βιομετατροπή	Θερμοκρασία : 30 °C Φως : 972 μE m ⁻² s ⁻¹ Ημέρα : Νύχτα 16:8 pH : 6,2 Συνεχής παροχή 1 % CO ₂ σε αέρα Έλλειψη θεικών
Lima S.A.C. et al., 2003	<i>Chlorella vulgaris</i> (πράσινο φύκος)	1. p-νιτροφαινόλη (50 mg/L)	1. 23 % / 8 d	Θερμοκρασία : 25 °C Φως : 52,5 μmol m ⁻² s ⁻¹ Συνεχές φως

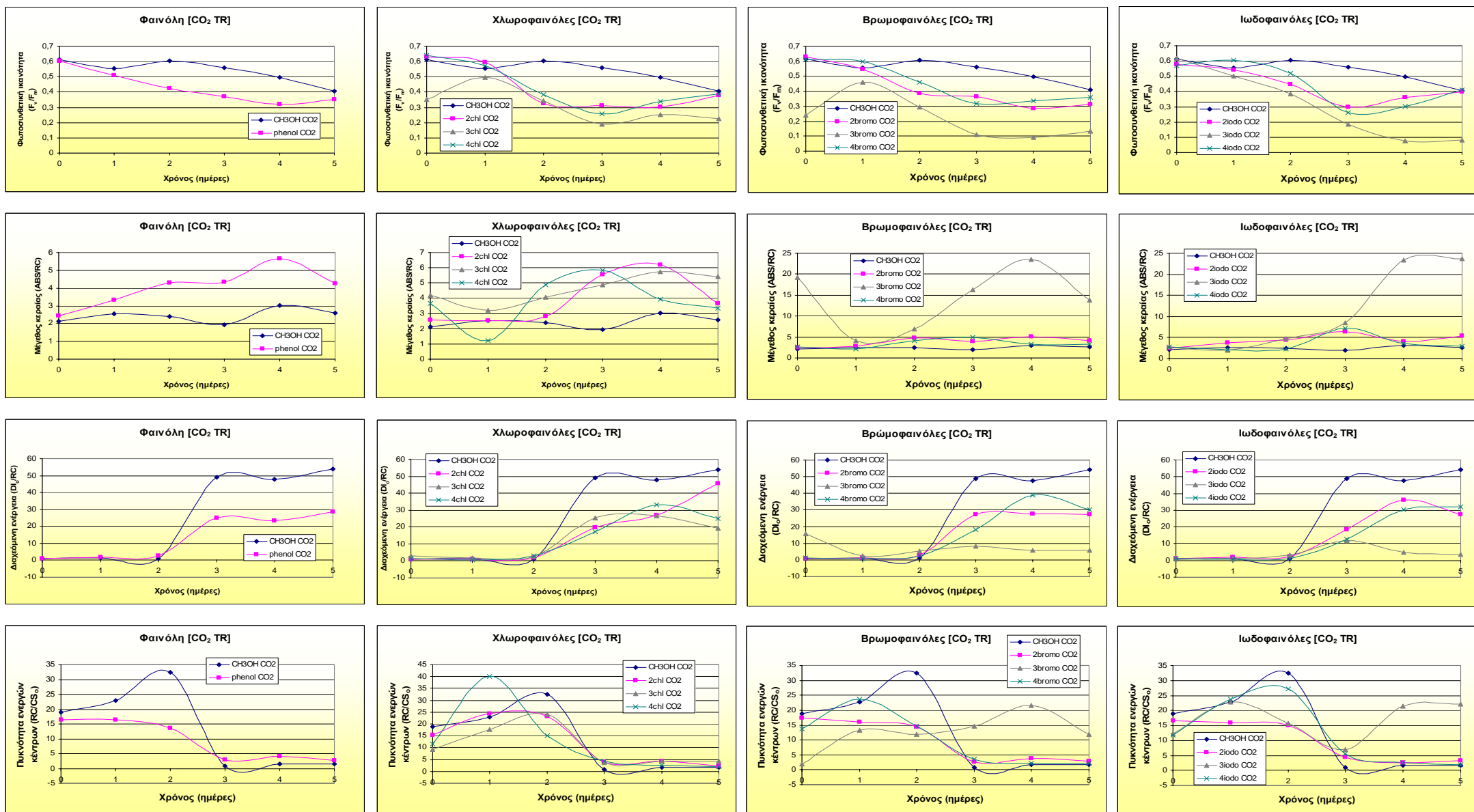
				Ανάδευση : περιστροφικό skaker (100 ± 2 rpm) Κωνικές φιάλες (250 mL)
Lima S.A.C. et al., 2003	<i>Coenochloris pyrenoidosa</i> (πράσινο φύκος)	1. p-νιτροφαινόλη (50 mg/L)	1. 100 % / 5 d	Ανεπαρκείς πληροφορίες
Pinto G. et al., 2002	<i>Ankistrodesmus braunii</i> (πράσινο φύκος)	1. τυροσόλη (400 mg/L) 2. υδρόξυτυροσόλη (400 mg/L) 3. κατεχόλη (400 mg/L) 4. 4-υδρόξυβενζοϊκό οξύ (400 mg/L) 5. φερουλικό οξύ (400 mg/L) 6. p. κουμαρικό οξύ (400 mg/L) 7. συναπικό οξύ (400 mg/L) 8. καφεϊκό οξύ (400 mg/L) 9. βανιλλικό οξύ (400 mg/L) * πρόκειται για απόβλητα ελαιουργείου	1. 2 % / 5 d και 5 % / 10 d 2. 2 % / 5 d και 50 % / 10 d 3. 50 % / 5 d και 84 % / 10 d 4. 58 % / 5 d και 88 % / 10 d 5. 22 % / 5 d και 41 % / 10 d 6. 70 % / 5 d και 88 % / 10 d 7. 27 % / 5 d και 60 % / 10 d 8. 70 % / 5 d και 85 % / 10 d 9. 70 % / 5 d και 85 % / 10 d	Θερμοκρασία : 25°C Φως : 100 mE m ⁻² s ⁻¹ Συνεχές φως pH : 6,2 Κωνικές φιάλες (100 mL)
Pinto G. et al., 2002	<i>Scenedesmus quadricauda</i> (πράσινο φύκος)	1. τυροσόλη (400 mg/L) 2. υδρόξυτυροσόλη (400 mg/L) 3. κατεχόλη (400 mg/L) 4. 4-υδρόξυβενζοϊκό οξύ (400 mg/L) 5. φερουλικό οξύ (400 mg/L) 6. p. κουμαρικό οξύ (400 mg/L) 7. συναπικό οξύ (400 mg/L) 8. καφεϊκό οξύ (400 mg/L) 9. βανιλλικό οξύ (400 mg/L) * πρόκειται για απόβλητα ελαιουργείου	1. 2 % / 5 d και 50 % / 10 d 2. 50 % / 5 d και 68 % / 10 d 3. 64 % / 5 d και 95 % / 10 d 4. 82 % / 5 d και 95 % / 10 d 5. 36 % / 5 d και 85 % / 10 d 6. 38 % / 5 d και 96 % / 10 d 7. 34 % / 5 d και 80 % / 10 d 8. 45 % / 5 d και 96 % / 10 d 9. 10 % / 5 d και 40 % 10 d	Θερμοκρασία : 25°C Φως : 100 μE m ⁻² s ⁻¹ Συνεχές φως pH : 6,2 Κωνικές φιάλες (100 mL)

Semple K.T., 1997	<i>Ochromonas danica</i> (χρυσοκαφέ φύκος)	<ol style="list-style-type: none"> 1. p-κρεσόλη (4,6 mg/L – 9,2 mg/L – 18,4 mg/L – 27,7 mg/L – 37 mg/L) 2. φαινόλη (5,3 mg/L – 10,6 mg/L – 21,2 mg/L – 32 mg/L – 42,5 mg/L) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 100 % / 3,5 d – 100 % / 4 d – 100 % / 6 d – 100 % / 7,5 d – 100 % / 12 d 2. 100 % / 1,5 d – 100 % / 2 d – 100 % / 2,5 d – 100 % / 5 d – 100 % / 6 d 	Θερμοκρασία : 25 °C Συνεχής σκοτάδι Ανάδευση : 100 rpm
Semple K.T. et al., 1999	<i>Chlamidomonas reinhardtii</i> (πράσινο φύκος)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 9H-φλουορένιο-9-one (6,91 mg/L) 2. φαινανθρένιο (33,3 mg/L) 3. 4-μεθυλβενζο[ε]κινολίνη (6,76 mg/L) 4. 1-μεθυλανθρακένιο (1,15 mg/L) 5. 2-μεθυλανθρακένιο (20,5 mg/L) 6. 1,2-διμεθυλφαινανθρένιο (5,1 mg/L) 7. 3,4-διμεθυλφαινανθρένιο (10,15 mg/L) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 95,2 % / 3 d 2. 28,9 % / 3 d 3. 4,3 % / 3 d 4. 54,4 % / 3 d 5. 18,5 % / 3 d 6. 85,2 % / 3 d 7. 30,9 % / 3 d 	Ανεπαρκείς πληροφορίες
Tam N.F.Y. et al., 2002	<i>Chlorella miniata</i> (πράσινο φύκος)	<ol style="list-style-type: none"> 1. τριβουτυλοκασσίτερος (0,025 mg/L) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 28 % / 1 d και 48 % / 3 d 	Θερμοκρασία : 25 °C Φως : 175 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ημέρα : Νύχτα 16:8 Ανάδευση : shaker 100 rpm Κωνικές φιάλες (2 L)
Tam N.F.Y. et al., 2002	<i>Chlorella sorokiniana</i> (πράσινο φύκος)	<ol style="list-style-type: none"> 1. τριβουτυλοκασσίτερος (0,025 mg/L) 	<ol style="list-style-type: none"> 2. 30 % σε 5 λεπτά 3. 54 % σε 1 μέρα 4. 41 % σε 3 μέρες 	Θερμοκρασία : 25 °C Φως : 175 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ημέρα : Νύχτα 16:8 Ανάδευση : shaker 100 rpm Κωνικές φιάλες (2 L)
Tam N.F.Y.	<i>Scenedesmus</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. τριβουτυλοκασσίτερος (0,025 mg/L) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 70 % / 1 d και 74 % / 3 d 	Θερμοκρασία : 25 °C

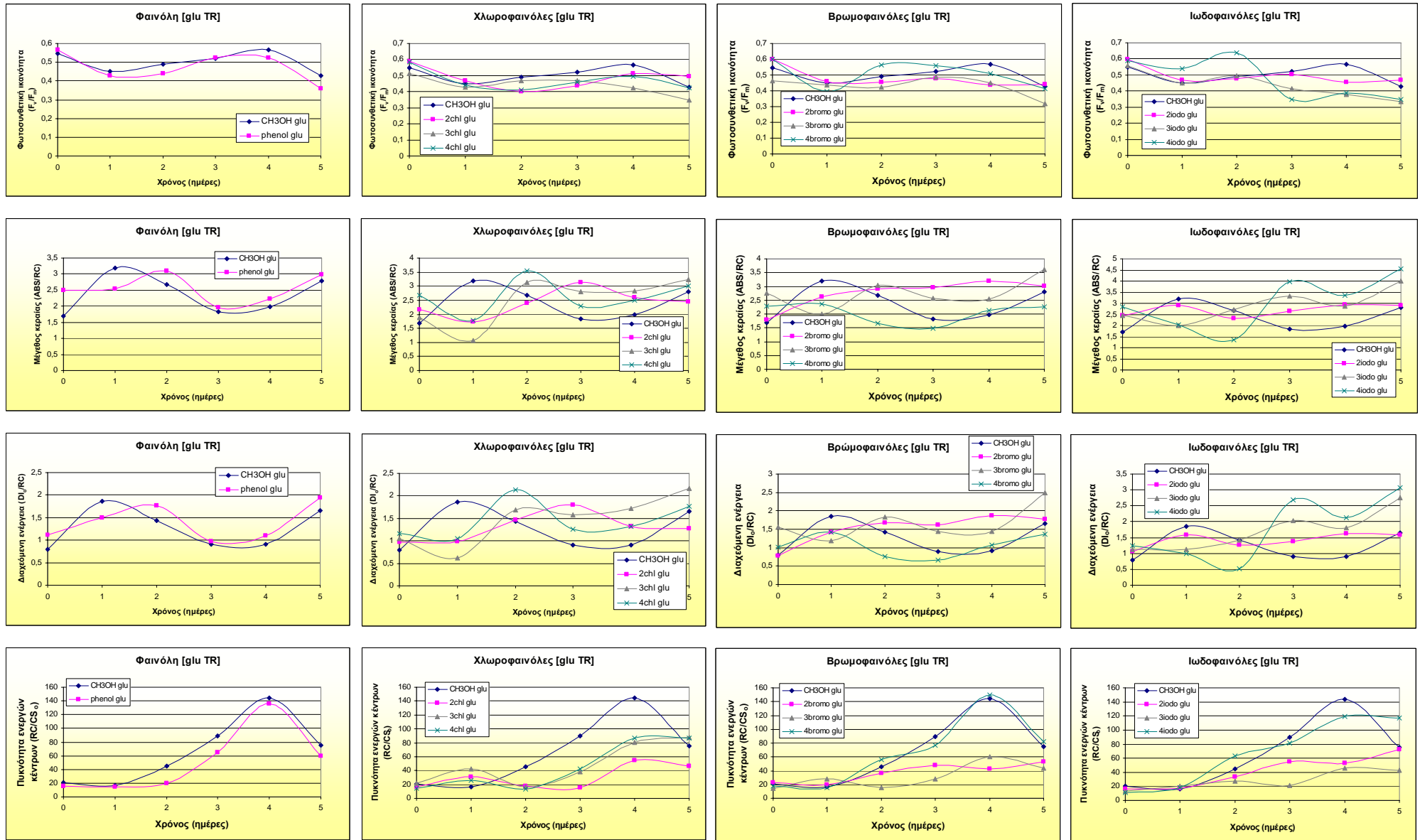
et al., 2002	<i>dimorphus</i> (πράσινο φύκος)			Φως : 175 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ημέρα : Νύχτα 16:8 Ανάδευση : shaker 100 rpm Κωνικές φιάλες (2 L)
Tam N.F.Y. et al., 2002	<i>Scenedesmus platydiscus</i> (πράσινο φύκος)	1. τριβουτυλοκασσίτερος (0,025 mg/L)	1. 81 % / 1 d και 95 % / 3 d	Θερμοκρασία : 25 °C Φως : 175 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ημέρα : Νύχτα 16:8 Ανάδευση : shaker 100 rpm Κωνικές φιάλες (2 L)
Todd S.J. et al., 2002	<i>Chlorella vulgaris</i> (πράσινο φύκος)	1. ναφθαλίνιο (12,8 mg/L)	1. 0,36-0,65 % / 5 d * τα ποσοστά αναφέρονται σε βιομετατροπή	Θερμοκρασία : 18 °C Φως : 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ημέρα : Νύχτα 12:12 pH : 6,6 Ανάδευση : 100 rev.min ⁻¹ Κωνικές φιάλες (100 mL)
Todd S.J. et al., 2002	<i>Ankistrodesmus SI2</i> (πράσινο φύκος)	1. διβενζοφουράνιο (16,8 mg/L)	1. 7 % / 5 d * τα ποσοστά αναφέρονται σε βιομετατροπή	Θερμοκρασία : 18 °C Φως : 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ημέρα : Νύχτα 12:12 pH : 6,6 Ανάδευση : 100 rev.min ⁻¹ Κωνικές φιάλες (100 mL)
Todd S.J. et al., 2002	<i>Scenedesmus SII</i> (πράσινο φύκος)	1. διβενζο-p-διοξίνη (18,4 mg/L)	1. 3,8 % / 5 d * τα ποσοστά αναφέρονται σε βιομετατροπή	Θερμοκρασία : 18 °C Φως : 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ημέρα : Νύχτα 12:12 pH : 6,6

				Ανάδευση : 100 rev.min ⁻¹ Κωνικές φιάλες (100 mL)
Yan H. Et al., 2004	<i>Closterium lunula</i> (πράσινο φύκος)	1. φθαλικός διμέθυλ εστέρας (100 mg/L)	1. 35 % / 2-3 d με αρχική ποσότητα ανόργανου άνθρακα 0,5 mg/L και 100 % / 6 d με αρχική ποσότητα ανόργανου άνθρακα 21,5 mg/L	Θερμοκρασία : 24°C Φως : 40,5 μmol m ⁻² s ⁻¹ Ημέρα : Νύχτα 12:12 Κωνικές φιάλες (100 mL)
Yang S. et al., 2002	<i>Skeletonema costatum</i> (διάτομο)	1. 2,4-διγλωροφαινόλη (6 mg/L)	1. 19,2 % / 10 d και 45,7 % / 10 d με προσθήκη 75 μM glutathione	Θερμοκρασία : 24°C Φως : 40,5 μmol m ⁻² s ⁻¹ Ημέρα : Νύχτα 12:12 Κωνικές φιάλες (100 mL)

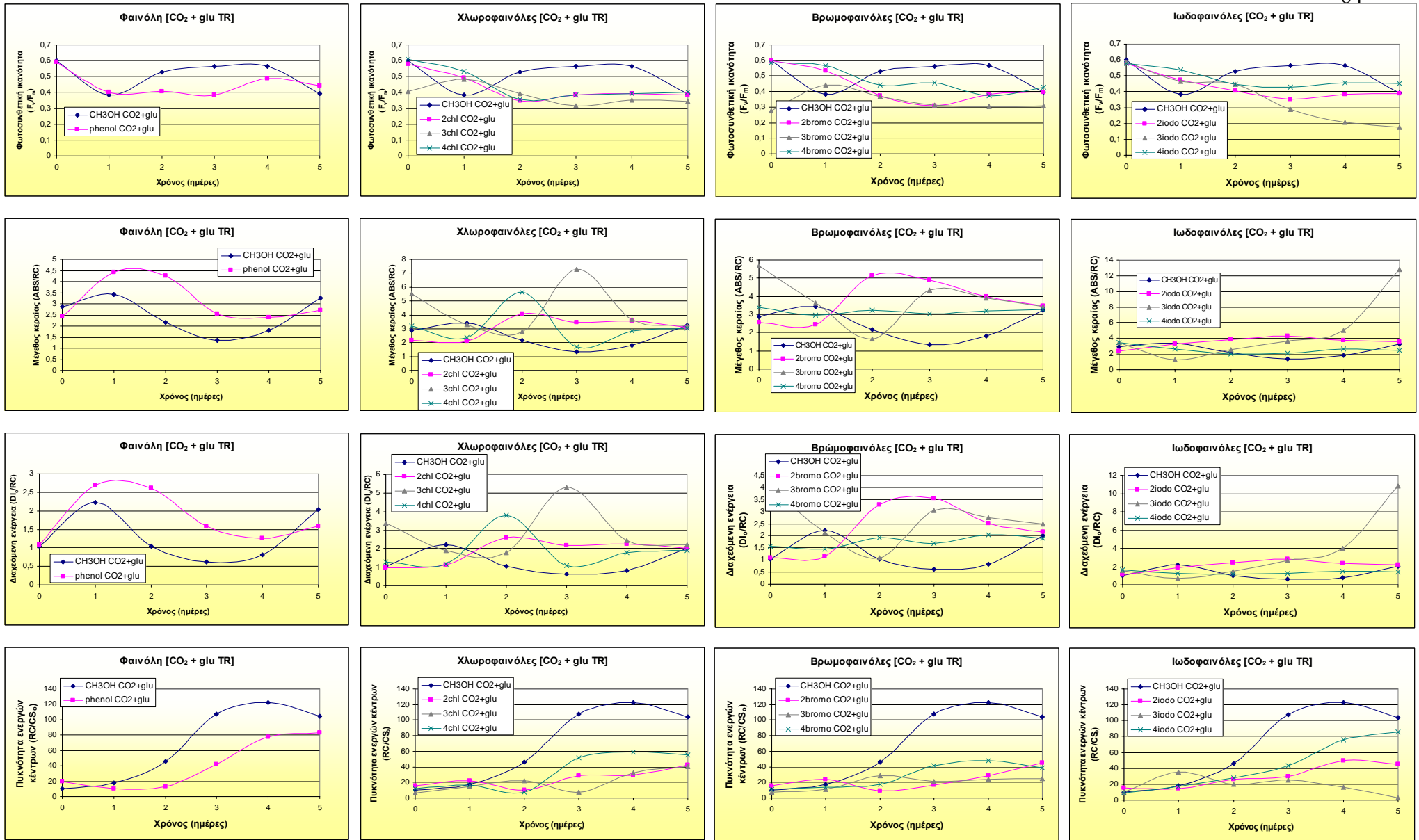
Παράρτημα II



Εικόνα 1. Φωτοσυνθετικές παράμετροι του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* στον χειρισμό με την ανόργανη πηγή του άνθρακα (10% CO₂), σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας (30°C), έντασης φωτεινής ακτινοβολίας (50-60 μmol·m⁻²·s⁻¹), αρχικής κυτταρικής συγκέντρωσης (1,5 μL PCV/mL) και φαινολικής συγκέντρωσης (1,5 mM). [CO₂ TR]: χειρισμός με 10% CO₂, F_v/F_m : φωτοσυνθετική απόδοση, ABS/RC: μέγεθος φωτοσυλλεκτικής κεραίας, DI_0/RC : διαχόμενη ενέργεια σε μη φωτοχημικές δράσεις, RC/CS₀: πυκνότητα ενεργών κέντρων, CH₃OH: μάρτυρας, phenol: φαινόλη, 2chl: 2-χλωροφαινόλη, 3chl: 3-χλωροφαινόλη, 4chl: 4-χλωροφαινόλη, 2bromo: 2-βρωμοφαινόλη, 3bromo: 3-βρωμοφαινόλη, 4bromo: 4-βρωμοφαινόλη, 2iodo: 2-ιωδοφαινόλη, 3iodo: 3-ιωδοφαινόλη, 4iodo: 4-ιωδοφαινόλη.

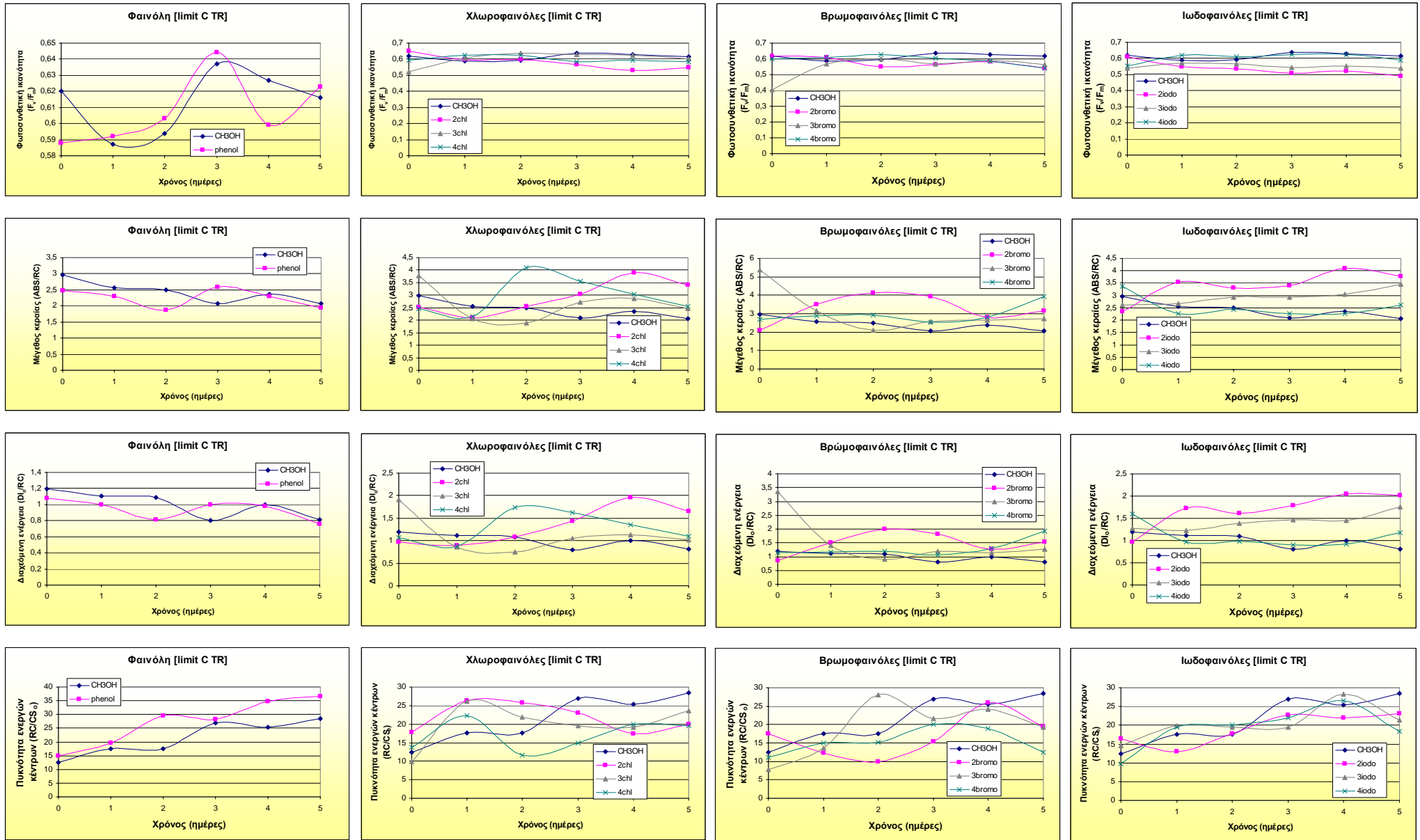


Εικόνα 2. Φωτοσυνθετικές παράμετροι του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* στον χειρισμό με την οργανική πηγή του άνθρακα (5 g/L γλυκόζη), σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας (30°C), έντασης φωτεινής ακτινοβολίας (50–60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), αρχικής κυτταρικής συγκέντρωσης (1,5 μL PCV/mL) και φαινολικής συγκέντρωσης (1,5 mM). [glu TR]: χειρισμός με 5 g/L γλυκόζη, F_v/F_m : φωτοσυνθετική ικανότητα, ABS/RC: μέγεθος φωτοσυλλεκτικής κεραίας, D_{I_o}/RC : διαχόμενη ενέργεια σε μη φωτοχημικές δράσεις, RC/CS₀: πυκνότητα ενεργών κέντρων, CH₃OH: μάρτυρας, phenol: φαινόλη, 2chl: 2-χλωροφαινόλη, 3chl: 3-χλωροφαινόλη, 4chl: 4-χλωροφαινόλη, 2bromo: 2-βρωμοφαινόλη, 3bromo: 3-βρωμοφαινόλη, 4bromo: 4-βρωμοφαινόλη, 2iodo: 2-ιωδοφαινόλη, 3iodo: 3-ιωδοφαινόλη, 4iodo: 4-ιωδοφαινόλη.



Εικόνα 3. Φωτοσυνθετικές παράμετροι του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* στον χειρισμό με τη συνδυασμένη χρήση οργανικής (5 g/L γλυκόζη) και ανόργανης πηγής του άνθρακα (10% CO₂), σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας (30°C), έντασης φωτεινής ακτινοβολίας (50-60 μmol·m⁻²·s⁻¹), αρχικής κυτταρικής συγκέντρωσης (1,5 μL PCV/mL) και φαινολικής συγκέντρωσης (1,5 mM). [CO₂ + glu TR]: χειρισμός με 10% CO₂ και 5 g/L γλυκόζη, F_v/F_m: φωτοσυνθετική ικανότητα, ABS/RC: μέγεθος φωτοσυλλεκτικής κεραίας,

DI_w/RC: διαχεόμενη ενέργεια σε μη φωτοχημικές δράσεις, RC/CS_a: πυκνότητα ενεργών κέντρων, CH₃OH: μάρτυρας, phenol: φαινόλη, 2chl: 2-χλωροφαινόλη, 3chl: 3-χλωροφαινόλη, 4chl: 4-χλωροφαινόλη, 2bromo: 2-βρωμοφαινόλη, 3bromo: 3-βρωμοφαινόλη, 4bromo: 4-βρωμοφαινόλη, 2iodo: 2-ιωδοφαινόλη, 3iodo: 3-ιωδοφαινόλη, 4iodo: 4-ιωδοφαινόλη.



Εικόνα 4. Φωτοσυνθετικές παράμετροι του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* στον χειρισμό με την περιορισμένη συγκέντρωση σε πηγή άνθρακα (0,04% CO₂), σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας (30°C), έντασης φωτεινής ακτινοβολίας (50–60 μmol·m⁻²·s⁻¹), αρχικής κυτταρικής συγκέντρωσης (1,5 μL PCV/mL) και φαινολικής συγκέντρωσης (1,5 mM). [limit C TR]: χειρισμός με 0,04% CO₂, F_v/F_m : φωτοσυνθετική ικανότητα, ABS/RC: μέγεθος φωτοσυλλεκτικής κεραίας, DI_o/RC : διαχεόμενη ενέργεια σε μη φωτοχημικές δράσεις, RC/CS_a: πυκνότητα ενεργών κέντρων, CH₃OH: μάρτυρας, phenol: φαινόλη, 2chl: 2-χλωροφαινόλη, 3chl: 3-χλωροφαινόλη, 4chl: 4-χλωροφαινόλη, 2bromo: 2-βρωμοφαινόλη, 3bromo: 3-βρωμοφαινόλη, 4bromo: 4-βρωμοφαινόλη, 2iodo: 2-ιωδοφαινόλη, 3iodo: 3-ιωδοφαινόλη, 4iodo: 4-ιωδοφαινόλη.