



Τεχνολογικό
Πανεπιστήμιο
Κύπρου

Σχολή Γεωτεχνικών
Επιστημών και
Διαχείρισης
Περιβάλλοντος

Διδακτορική διατριβή

**Σχέση δομής – λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού
των διατόμων *Phaeodactylum Tricornutum* και *Thalassiosira
Pseudonana***

Χαράλαμπος Τσέλιος

Λεμεσός, Σεπτέμβριος 2022

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Διδακτορική διατριβή

Σχέση δομής – λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των
διατόμων *Phaeodactylum Tricornutum* και *Thalassiosira*
Pseudonana

του

Χαράλαμπου Τσέλιου

Λεμεσός, Σεπτέμβριος 2022

Έντυπο έγκρισης

Διδακτορική διατριβή

**Σχέση δομής – λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των
διατόμων *Phaeodactylum Tricornutum* και *Thalassiosira***

Παρουσιάστηκε από

Χαράλαμπο Τσέλιο

Επιβλέπων καθηγητής: Κωνσταντίνος Βαρότσης, Καθηγητής

Υπογραφή _____

Μέλος επιτροπής: Ανδρέας Κατσιώτης, Καθηγητής

Υπογραφή _____

Μέλος επιτροπής: Παναγιώτης Λουκάκος, Κύριος Ερευνητής FORTH-IESL

Υπογραφή _____

Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

Λεμεσός, Σεπτέμβριος 2022

Έντυπο έγκρισης Επιτροπής Επίβλεψης

Διδακτορική διατριβή

**Σχέση δομής – λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των
διατόμων *Phaeodactylum Tricornutum* και *Thalassiosira***

Παρουσιάστηκε από

Χαράλαμπο Τσέλιο

Επιβλέπων καθηγητής: Κωνσταντίνος Βαρώτσης, Καθηγητής

Υπογραφή _____

Μέλος Επιτροπής: Ανδρέας Κατσιώτης, Καθηγητής

Υπογραφή _____

Μέλος Επιτροπής: Παναγιώτης Λουκάκος, Κύριος Ερευνητής FORTH-IESL

Υπογραφή _____

Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

Λεμεσός, Σεπτέμβριος 2022

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Χαράλαμπος Τσέλιος, 2022

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημικών Μηχανικών του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Αρχικά τον επιβλέποντα της διατριβής, καθηγητή Κωνσταντίνο Βαρώτση για την καθοδήγηση, τις συζητήσεις και τη συνεισφορά του στην εκπόνηση της διατριβής.

Ακολούθως θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου για τη βοήθεια που μου προσέφεραν και τη συνεργασία που είχαμε αυτά τα χρόνια. Συγκεκριμένα, τον Δρ. Αντώνη Νικολαΐδη για τη βοήθεια που προσέφερε σε κάθε ζήτημα, μικρό ή μεγάλο, προέκυψε αυτά τα χρόνια, τον Δρ. Άριστο Ιωάννου για τη βοήθεια στην ανάπτυξη των τεχνικών υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν, τους κ. Κωνσταντίνο Γιαννάκκο και κ. Χαράλαμπο Ανδρέου για την πολύτιμη βοήθεια στην απομόνωση των FCPs καθώς και τον κ. Μάριο Παπαγεωργίου με τον οποίο ξεκινήσαμε μαζί τη διαδρομή της μελέτης των φωτοσυνθετικών οργανισμών.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω, την οικογένεια μου και ιδιαίτερα τη σύζυγο μου Ζωή και το γιο μου Κωνσταντίνο στους οποίους θα ήθελα να αφιερώσω αυτή τη διατριβή.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα διάτομα είναι μονοκύτταροι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί υπεύθυνοι για το 20% της φωτοσύνθεσης που πραγματοποιείται στον πλανήτη. Για τη συλλογή φωτός επιστρατεύουν τα σύμπλοκα συλλογής φωτός FCPs (Fucocanthin Chlorophyll Proteins) που αποτελούνται από τις χλωροφύλλες *a* και *c* καθώς και τα καροτενοειδή φουκοξανθίνη και διαδινοξανθίνη. Οι οργανισμοί αυτοί αξιοποιούν μηχανισμούς προστασίας έτσι ώστε να είναι εφικτή η επιβίωση τους σε μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα όπως είναι οι αυξομειώσεις στην ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας κατά τη διάρκεια της ημέρας.

Στην παρούσα διατριβή αξιοποιούνται οι φασματοσκοπικές τεχνικές απορρόφησης ορατού – υπεριώδους, φθορισμού και Raman καθώς και η αναλυτική τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης για να μελετηθεί η απόκριση των κυττάρων δύο ειδών διατόμων κάτω από διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης. Από την κατηγορία των πτεροειδών διατόμων έχει επιλεγεί το είδος *Phaeodactylum Tricornutum* και από την κατηγορία των κεντρικών διατόμων το είδος *Thalassiosira Pseudonana*. Με την αλλαγή των συνθηκών ανάπτυξης παρατηρήθηκαν μεταβολές στη συγκέντρωση των παραγόμενων χρωμοφόρων μορίων καθώς και σημαντικές διαφορές στις ιδιότητες και τις αλληλεπιδράσεις που αυτά εμφανίζουν. Οι μεταβολές αυτές φαίνεται πως έχουν εξάρτηση τόσο από την ένταση όσο και από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των διατόμων.

Επίσης έχει πραγματοποιηθεί απομόνωση και μελέτη των ιδιοτήτων των FCPs των συγκεκριμένων οργανισμών καθώς και ανάπτυξη του διατόμου *Phaeodactylum Tricornutum* με αντικατάσταση του ^{14}N με το ισότοπο ^{15}N με σκοπό τον χαρακτηρισμό των παρατηρούμενων N-ευαίσθητων δονήσεων με χρήση της φασματοσκοπίας Raman.

Λέξεις κλειδιά: διάτομα, φωτοσύνθεση, καροτενοειδή, φασματοσκοπία Raman

ABSTRACT

Diatoms are unicellular photosynthetic organisms responsible for 20% of the photosynthesis that takes place on the planet. The FCPs (Fucoxanthin Chlorophyll Proteins) complexes consist of chlorophylls a/c and the carotenoids fucoxanthin and diadinoxanthin which are responsible for light harvesting. These organisms utilize photoprotection mechanisms to ensure their survival under intense and variable light conditions.

In this thesis, a combination of Uv-vis, resonance Raman and Fluorescence spectroscopy as well as the analytical technique of high-performance liquid chromatography are used to investigate the response of two diatom species under different growth conditions. The species *Phaeodactylum Tricornutum* has been selected from the group of pennate diatoms and *Thalassiosira Pseudonana* from centric diatoms. By altering the growth conditions, changes were observed in the concentration of the produced pigments in addition to significant differences in the properties and interactions they display. These changes seem to depend on both the intensity and the wavelength of the light source used for the growth of the diatoms.

In addition, isolation and study of the FCPs properties from both organisms has been carried out. Finally, by replacing ^{14}N with the ^{15}N isotope on the diatom *Phaeodactylum Tricornutum*, the observed N-sensitive vibrations using Raman spectroscopy were characterized.

Keywords: diatoms, photosynthesis, carotenoids, Raman spectroscopy

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	vii
ABSTRACT.....	viii
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	xii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	xiii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	xix
ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ	xx
1 Τα διάτομα ως φωτοσυνθετικοί οργανισμοί.....	21
1.1 Εισαγωγή.....	21
1.2 Χλωροφύλλες και Καροτενοειδή.....	23
1.3 Σύμπλοκα συλλογής φωτός των διατόμων	30
1.4 Φωτοπροστασία	32
1.5 <i>Phaeodactylum Tricornutum</i>	34
1.6 <i>Thalassiosira pseudonana</i>	38
1.7 Βιβλιογραφία Κεφαλαίου 1.....	41
2 Πειραματικές τεχνικές και μεθοδολογία.....	48
2.1 Ανάπτυξη διατόμων	48
2.2 Αλληλεπίδραση ύλης με ακτινοβολία.....	52
2.3 Φασματοσκοπία απορρόφησης.....	53
2.4 Φασματοσκοπία φθορισμού.....	55
2.5 Φασματοσκοπία Raman	57
2.5.1 Το φαινόμενο Raman.....	57
2.5.2 Κλασική περιγραφή	58

2.5.3	Κβαντική περιγραφή.....	60
2.5.4	Φασματοσκοπία συντονισμού Raman.....	62
2.5.5	Δονήσεις μορίων.....	62
2.5.6	Φάσματα χρωμοφόρων μορίων.....	65
2.5.7	Πειραματική διάταξη.....	67
2.6	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.....	69
2.7	Βιβλιογραφία κεφαλαίου 2.....	71
3	Φασματοσκοπική μελέτη του διατόμου <i>Phaeodactylum Tricornutum</i>	73
3.1	Εισαγωγή.....	73
3.2	Μεθοδολογία.....	76
3.3	Πειραματικά αποτελέσματα και συζήτηση.....	80
3.3.1	Μελέτη της επίδρασης υψηλής έντασης λευκού φωτός.....	80
3.3.2	Ανάπτυξη του διατόμου <i>P.Tricornutum</i> κάτω από κόκκινο φως.....	93
3.3.3	Απομόνωση και χαρακτηρισμός των συμπλόκων συλλογής φωτός του διατόμου <i>P.Tricornutum</i>	104
3.3.4	Ανάπτυξη του διατόμου <i>P.Tricornutum</i> με ισότοπο αζώτου ¹⁵ N.....	113
3.4	Συμπεράσματα Κεφαλαίου.....	117
3.5	Βιβλιογραφία Κεφαλαίου 3.....	119
4	Φασματοσκοπική μελέτη του διατόμου <i>Thalassiosira Pseudonana</i>	123
4.1	Εισαγωγή.....	123
4.2	Μεθοδολογία.....	124
4.3	Πειραματικά αποτελέσματα και συζήτηση.....	125
4.3.1	Μελέτη της επίδρασης υψηλής έντασης λευκού φωτός.....	125
4.3.2	Ανάπτυξη του διατόμου <i>T.Pseudonana</i> κάτω από κόκκινο φως.....	136
4.3.3	Απομόνωση και χαρακτηρισμός των συμπλόκων συλλογής φωτός του διατόμου <i>T.Pseudonana</i>	142

4.4	Συμπεράσματα Κεφαλαίου	148
4.5	Βιβλιογραφία Κεφαλαίου 4.....	150
5	Συμπεράσματα – Μελλοντική έρευνα	152
5.1	Συμπεράσματα	152
5.2	Μελλοντική Έρευνα.....	154

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 : Αναλυτική περιγραφή πρωτοκόλλου απομόνωσης FCPs.....	77
Πίνακας 2 : Αναλυτική περιγραφή πρωτοκόλλου διαχωρισμού χρωστικών.....	79
Πίνακας 3 : Περιεκτικότητα δειγμάτων σε χλωροφύλλη c (Chl-c), φουκοξανθίνη (Fx) και διαδινοξανθίνη (Dd) ως προς τη χλωροφύλλη α (Chl-a).....	84
Πίνακας 4 : Περιεκτικότητα δειγμάτων σε χλωροφύλλη c (Chl-c), φουκοξανθίνη (Fx) και διαδινοξανθίνη (Dd) ως προς τη χλωροφύλλη α (Chl-a).....	95
Πίνακας 5 : Θέση και προέλευση των δονήσεων που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη μετατόπιση στα φάσματα Raman μεταξύ των δειγμάτων που αναπτύχθηκαν με ^{14}N και ^{15}N . (24,25,26) Οι δείκτες που χρησιμοποιούνται στα μόρια άνθρακα αντιστοιχούν στην εικόνα 26. (δ =in-plane deformation, ν = stretch.)	116

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Εικόνα 1 : Χαρακτηριστικές δομές του περιβλήματος πυριτίου των διατόμων (3).	22
Εικόνα 2 : Χημική δομή των χλωροφύλλων a(αριστερά) και c(δεξιά). (4)	24
Εικόνα 3: Φάσμα απορρόφησης των χλωροφυλλών a και c σε μεθανόλη.....	25
Εικόνα 4 : Χημική δομή των καροτενοειδών Φουκοξανθίνη , Διαδινοξανθίνη και Διατοξανθίνη.....	26
Εικόνα 5 : Φάσμα απορρόφησης των χλωροφυλλών a/c και φουκοξανθίνης σε μεθανόλη.....	27
Εικόνα 6 : Φάσμα απορρόφησης του καροτενοειδούς φουκοξανθίνη σε μεθανόλη.....	28
Εικόνα7: Σχηματική αναπαράσταση της μεταφοράς ενέργειας από δύο καταστάσεις του καροτενοειδούς φουκοξανθίνη προς τη χλωροφύλλη a (9).	29
Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της θυλακοειδούς μεμβράνης των διατόμων(11).	30
Εικόνα 9 : Διαφορετικές μορφές της ανατομίας του διατόμου <i>P.Tricornutum</i> που εμφανίζονται στο περιβάλλον (27).	34
Εικόνα 10 : Η δομή ενός διμερούς FCP από το διάτομο <i>P.Tricornutum</i> σε ανάλυση 1,8 Å. Τα μόρια Chl-a απεικονίζονται με πράσινο χρώμα, Chl-c με μωβ, Fx με πορτοκαλί και Dd με μπλε. Με γκρι και γαλάζιο χρώμα εμφανίζονται οι πρωτεϊνικές δομές. (26)	36
Εικόνα 11 : Το χημικό και πρωτεϊνικό περιβάλλον των 2 μορίων χλωροφύλλης c στο μονομερές του συμπλόκου FCP.	37
Εικόνα 12 : Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) του περιβλήματος του διατόμου <i>T.Pseudonana</i> (43)	38
Εικόνα 13 : Φάσμα εκπομπής των πηγών φωτισμού LED (A) λευκού φωτός (B) κόκκινου φωτός.	49
Εικόνα 14 : Καμπύλη ανάπτυξης διατόμου <i>T.Pseudonana</i>	50
Εικόνα 15 : Οι περιοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (3).	52
Εικόνα 16 : Σχηματική αναπαράσταση της φασματοσκοπίας ορατού – υπεριώδους	53

Εικόνα 17 : Σχηματική αναπαράσταση των φαινομένων του φθορισμού και του φωσφορισμού(3).....	55
Εικόνα 18 : Φάσματα απορρόφησης και φθορισμού με διέγερση στα 440 nm από τη χλωροφύλλη α.....	56
Εικόνα 19 : Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου Raman.....	57
Εικόνα 20 : Σχηματική αναπαράσταση της μεταβολής στην ενεργειακή κατάσταση των μορίων κατά τη διάρκεια της φασματοσκοπίας Raman.(10).....	61
Εικόνα 21 : Αναπαράσταση καμπύλης δυναμικής ενέργειας διατομικού μορίου στην περίπτωση του αρμονικού και αναρμονικού ταλαντωτή. (3)	64
Εικόνα 22 : Φάσμα Raman των κυττάρων του διατόμου <i>P.Tricornutum</i>	65
Εικόνα 23 : Συσχέτιση μεταξύ του μήκους συζυγίας της πολυμερικής αλυσίδας των καροτενοειδών και της συχνότητας εμφάνισης της δόνησης ν_1 στο φάσμα Raman(11).	66
Εικόνα 24 : Τυπική πειραματική διάταξη της φασματοσκοπίας Raman.....	67
Εικόνα 25 : Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής υγρής χρωματογραφίας.....	69
Εικόνα 26 : Χημική δομή των καροτενοειδών Φουκοξανθίνη, Διαδινοξανθίνη και Διατοξανθίνη και των χλωροφύλλων α και c.	73
Εικόνα 27 : Φάσματα απορρόφησης ορατού-υπεριώδους των κυττάρων του διατόμου <i>P.Tricornutum</i> τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από (a) 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (b) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ λευκού φωτός.....	81
Εικόνα 28 : Χρωματογράφημα διαχωρισμού των χρωστικών ουσιών από τα κύτταρα του διατόμου <i>P.Tricornutum</i> σε μεθανόλη. Τα κύτταρα έχουν αναπτυχθεί κάτω από (A)150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ λευκού φωτός.....	82
Εικόνα 29 : Φάσματα απορρόφησης ορατού – υπεριώδους των χρωστικών που προέκυψαν από το διαχωρισμό με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας για τα κύτταρα του διατόμου <i>P.Tricornutum</i> τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από (A)150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ λευκού φωτός.	85
Εικόνα 30 : A) Φάσματα φθορισμού διέγερσης στα 680 nm των κυττάρων του διατόμου <i>P.Tricornutum</i> τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από : (a)150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και	

(b) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. B) Κανονικοποιημένα φάσματα φθορισμού εκπομπής με διέγερση στα 418 nm και (Γ) στα 460 nm 87

Εικόνα 31 : Φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου *P.Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από λευκό φως εντάσεως : (a) 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (b) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Κάθε φάσμα προκύπτει από το μέσο όρο 40 λήψεων διάρκειας 1 λεπτού η κάθε μία και η ακτινοβολία διέγερσης ήταν 442nm. 89

Εικόνα 32 : Φάσματα απορρόφησης ορατού-υπεριώδους των κυττάρων του διατόμου *P.Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (α) λευκού φωτός (b) κόκκινου φωτός..... 93

Εικόνα 33 : Χρωματογράφημα διαχωρισμού των χρωστικών ουσιών από τα κύτταρα του διατόμου *P.Tricornutum* σε μεθανόλη. Τα κύτταρα έχουν αναπτυχθεί κάτω από (A) λευκό (B) κόκκινο φως. 95

Εικόνα 34 : Κανονικοποιημένα φάσματα φθορισμού εκπομπής με διέγερση στα 440 nm για τα κύτταρα του διατόμου *P.Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί με χρήση λευκού φωτός (μαύρη γραμμή) και κόκκινου φωτός (κόκκινη γραμμή). 96

Εικόνα 35 : Κανονικοποιημένα φάσματα φθορισμού διέγερσης (A) στα 680 nm και (B) στα 710 nm των κυττάρων του διατόμου *P.Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί με φως (α) λευκό και (b) κόκκινο, εντάσεως 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 97

Εικόνα 36 : Φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου *P.Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (α) λευκού φωτός (b) κόκκινου φωτός. Η λήψη των φασμάτων έγινε σε θερμοκρασία -70°C 98

Εικόνα 37 : Φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου *P.Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί με φως (α) λευκό και (b) κόκκινο, εντάσεως 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 99

Εικόνα 38 : (A) Φάσματα φθορισμού εκπομπής και (B) φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου *P.Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί με κόκκινο φως εντάσεως 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ για χρονική διάρκεια (α) 2 (β) 5 (γ) 7 (δ) 9 ημερών. 101

Εικόνα 39 : (A) Φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου *P.Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί με κόκκινο φως εντάσεως 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ για χρονική διάρκεια (α) 2 (β) 5 (γ) 7 (δ) 9 ημερών..... 102

Εικόνα 40 : Χρωματογράφημα υγρής χρωματογραφίας το οποίο απεικονίζει τα διαφορετικά σύμπλοκα συλλογής φωτός τα οποία προέρχονται από το διάτομο <i>P.Tricornutum</i> σε σχέση με το χρόνο διαχωρισμού τους. Το μήκος κύματος ανίχνευσης ήταν τα 440nm.	105
Εικόνα 41 : Φάσματα απορρόφησης ορατού – υπεριώδους των συμπλόκων συλλογής φωτός του διατόμου <i>P.Tricornutum</i> όπως αυτά έχουν διαχωριστεί	106
Εικόνα 42 : Φάσματα φθορισμού εκπομπής με διέγερση στα 440 nm των συμπλόκων συλλογής φωτός του διατόμου <i>P.Tricornutum</i> όπως αυτά έχουν διαχωριστεί	108
Εικόνα 43 : Φάσματα φθορισμού διέγερσης στα 677 nm των συμπλόκων συλλογής φωτός του διατόμου <i>P.Tricornutum</i> όπως αυτά έχουν διαχωριστεί	109
Εικόνα 44 : Φάσματα Raman των συμπλόκων συλλογής φωτός του διατόμου <i>P.Tricornutum</i> όπως αυτά έχουν διαχωριστεί . Η λήψη των φασμάτων έγινε σε θερμοκρασία -70°C , η διάρκεια λήψης του κάθε φάσματος ήταν 20 λεπτά και το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης 442.	110
Εικόνα 45 : Φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου <i>P.Tricornutum</i> τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από φως έντασης $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ όπου σαν πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε (a) ^{14}N (b) ^{15}N	114
Εικόνα 46 : Φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου <i>P.Tricornutum</i> τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από φως έντασης $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ όπου σαν πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε (a) ^{14}N (b) ^{15}N	115
Εικόνα 47 : Φάσματα απορρόφησης ορατού-υπεριώδους των κυττάρων του διατόμου <i>T.Pseudonana</i> τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από (a) $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (b) $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (c) $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ λευκού φωτός.....	126
Εικόνα 48 : Α) Φάσματα φθορισμού διέγερσης στα 680 nm των κυττάρων του διατόμου <i>T.Pseudonana</i> τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από : (a) $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, (b) $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ και (c) $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Β) Κανονικοποιημένα φάσματα φθορισμού εκπομπής με διέγερση στα 418 nm και (Γ) στα 460 nm	127
Εικόνα 49 : Φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου <i>T.Pseudonana</i> τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από λευκό φως εντάσεως : (a) $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, (b) $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ και (c) $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Κάθε φάσμα προκύπτει από το	

μέσο όρο 40 λήψεων διάρκειας 1 λεπτού η κάθε μία και η ακτινοβολία διέγερσης ήταν 442nm.	129
Εικόνα 50 : Σχηματική αναπαράστασης της πειραματικής διαδικασίας για τη διερεύνηση της αντιστρεπτότητας των παρατηρούμενων μεταβολών στα κύτταρα του διατόμου <i>T.Pseudonana</i> οι οποίες οφείλονται στην ένταση του φωτισμού ανάπτυξης του οργανισμού.	131
Εικόνα 51 : Φάσματα απορρόφησης ορατού-υπεριώδους των κυττάρων του διατόμου <i>T.Pseudonana</i> τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από τις εξής συνθήκες : (a) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για τέσσερις ημέρες (b) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για εννέα ημέρες (c) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για τέσσερις ημέρες και ακολούθως 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για πέντε ημέρες.....	132
Εικόνα 52 : Φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου <i>T.Pseudonana</i> τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από λευκό φως εντάσεως (a) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για τέσσερις ημέρες (b) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για εννέα ημέρες (c) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για τέσσερις ημέρες και ακολούθως 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για πέντε ημέρες.	134
Εικόνα 53 : Φάσματα απορρόφησης ορατού – υπεριώδους των κυττάρων του διατόμου <i>T.Pseudonana</i> τα οποία έχουν αναπτυχθεί με φως (α) λευκό και (b) κόκκινο, εντάσεως 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$	136
Εικόνα 54 : Κανονικοποιημένα φάσματα φθορισμού εκπομπής με διέγερση στα 440 nm για τα κύτταρα του διατόμου <i>T.Pseudonana</i> τα οποία έχουν αναπτυχθεί με χρήση λευκού φωτός (μαύρη γραμμή) και κόκκινου φωτός (κόκκινη γραμμή). Επιπλέον παρουσιάζεται στο ένθετο διάγραμμα το αποτέλεσμα της αφαίρεσης των δύο φασμάτων.....	137
Εικόνα 55 : Φάσματα φθορισμού διέγερσης στα 680 nm των κυττάρων του διατόμου <i>T.Pseudonana</i> τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από : (α) λευκό και (b) κόκκινο φως εντάσεως 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$	138
Εικόνα 56 : Φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου <i>T.Pseudonana</i> τα οποία έχουν αναπτυχθεί με φως (α) λευκό και (b) κόκκινο, εντάσεως 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Η λήψη των φασμάτων έγινε σε θερμοκρασία -70°C , η διάρκεια λήψης του κάθε φάσματος ήταν 20 λεπτά και το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης 442 nm	139

Εικόνα 57 : Φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου <i>T.Pseudonana</i> τα οποία έχουν αναπτυχθεί με φως (α) λευκό και (β) κόκκινο, εντάσεως $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	140
Εικόνα 58 : Χρωματογράφημα υγρής χρωματογραφίας το οποίο απεικονίζει τα διαφορετικά σύμπλοκα συλλογής φωτός τα οποία προέρχονται από το διάτομο <i>T.Pseudonana</i> σε σχέση με το χρόνο διαχωρισμού τους. Το μήκος κύματος ανίχνευσης ήταν τα 440nm.	142
Εικόνα 59 : Φάσματα απορρόφησης ορατού – υπεριώδους των συμπλόκων συλλογής φωτός του διατόμου <i>T.Pseudonana</i> όπως αυτά έχουν διαχωριστεί	143
Εικόνα 60 : Φάσματα φθορισμού διέγερσης στα 677 nm των συμπλόκων συλλογής φωτός του διατόμου <i>T.Pseudonana</i> όπως αυτά έχουν διαχωριστεί	145
Εικόνα 61 : Φάσματα Raman των συμπλόκων συλλογής φωτός του διατόμου <i>T.Pseudonana</i> όπως αυτά έχουν διαχωριστεί . Η λήψη των φασμάτων έγινε σε θερμοκρασία -70°C , η διάρκεια λήψης του κάθε φάσματος ήταν 20 λεπτά και το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης 442 nm.	146

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Chl:	Chlorophyll
Car:	Carotenoid
Fx:	Fucoxanthin
Dd:	Diadinoxanthin
Dt:	Diatoxanthin
β-car:	Beta carotene
NPQ:	Non-Photochemical Quenching
FCP:	Fucoxanthin Chlorophyll Protein
LHC:	Light Harvesting Complex
ROS:	Reactive Oxygen Species
OD:	Optical Density
HPLC:	High Performance Liquid Chromatography
Rpm:	Revolutions per minute

ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

Light Harvesting Complexes	Σύμπλοκα συλλογής φωτός
Non-Photochemical Quenching	Μη-Φωτοχημική απόσβεση

1 Τα διάτομα ως φωτοσυνθετικοί οργανισμοί

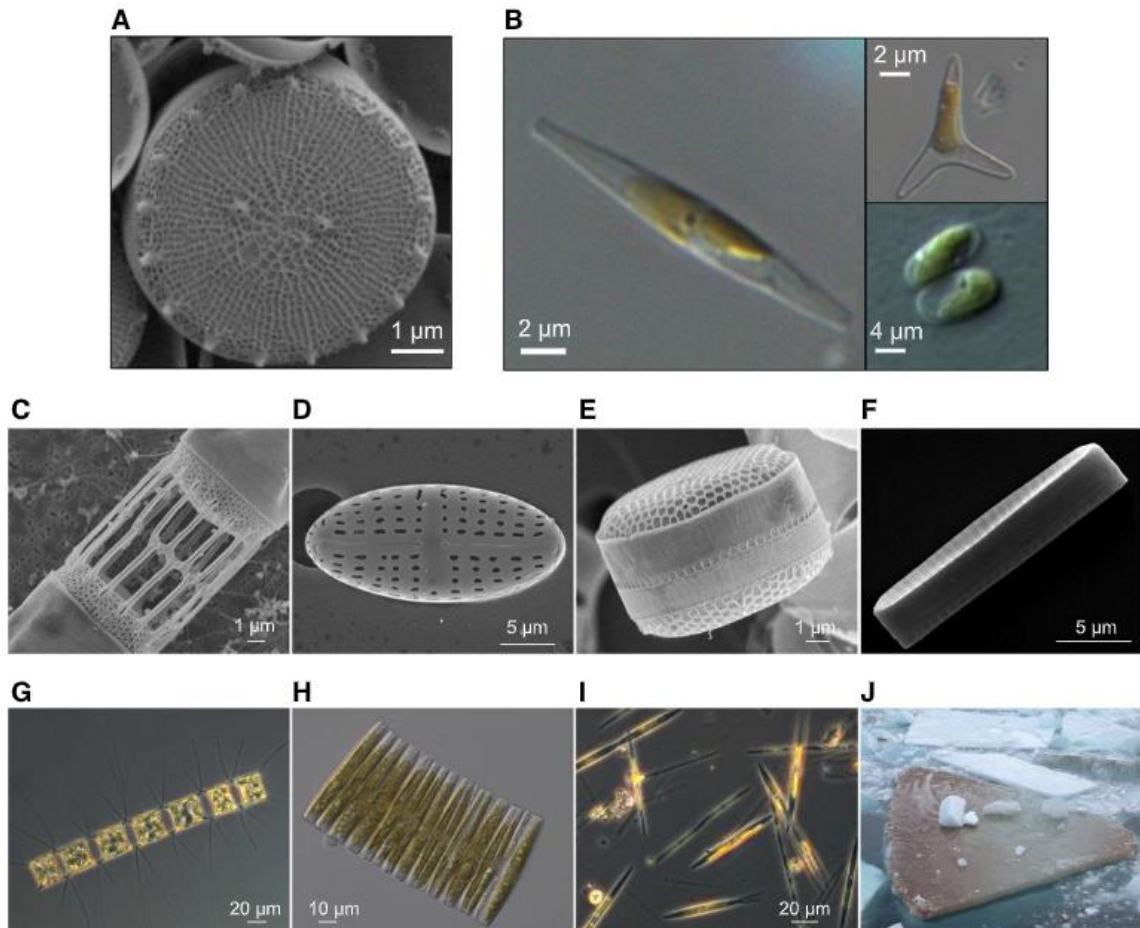
1.1 Εισαγωγή

Το θέμα της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη των διατόμων τα οποία αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με διαφορετικές συνθήκες φωτισμού τόσο ως προς την ένταση όσο και ως προς το μήκος κύματος. Η μελέτη πραγματοποιείται με χρήση τεχνικών φασματοσκοπίας όπως είναι η φασματοσκοπία ορατού – υπεριώδους, η φασματοσκοπία φθορισμού και η φασματοσκοπία Raman.

Σε αυτό το κεφάλαιο θα γίνει μια εισαγωγή σχετικά με την κατηγορία των φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών που ονομάζονται διάτομα. Αρχικά θα αναφερθούν κάποιες γενικές πληροφορίες για τους συγκεκριμένους οργανισμούς και στη συνέχεια μια αναλυτική περιγραφή των δύο ειδών που μελετώνται σε αυτή την εργασία, των διατόμων *Phaeodactylum Tricornutum* και *Thalassiosira Pseudonana*. Ακολούθως θα γίνει περιγραφή του μηχανισμού με τον οποίο πραγματοποιείται η συλλογή φωτός με σκοπό την παραγωγή ενέργειας μέσω της φωτοσύνθεσης καθώς και μια εκτενής αναφορά στα χρωμοφόρα μόρια τα οποία έχουν κύριο ρόλο σε αυτές τις διεργασίες. Στη συνέχεια θα γίνει περιγραφή του μηχανισμού της μη-φωτοχημικής απόσβεσης (Non photochemical quenching) ο οποίος είναι υπεύθυνος για την προστασία των οργανισμών αυτών σε περιβάλλοντα όπου η διαθέσιμη προς απορρόφηση ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει βλάβες στα κύτταρα των διατόμων. Τέλος, θα γίνει ανασκόπηση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας σχετικά με τη μελέτη των διατόμων τα οποία αναπτύσσονται σε διαφορετικές συνθήκες φωτισμού.

Τα διάτομα είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί μεγέθους 1-500μm που ανήκουν στην κατηγορία μικρο-άλγη, της οποίας είναι το σημαντικότερο μέλος με βάση τους πληθυσμούς της συγκεκριμένης ομοταξίας. Υπολογίζεται πως υπάρχουν περισσότερα από εκατό χιλιάδες διαφορετικά είδη τα οποία εντοπίζονται σε ολόκληρο τον πλανήτη ανεξαρτήτως γεωγραφικής περιοχής. Αυτό οφείλεται στην εκπληκτική προσαρμοστικότητα που παρουσιάζουν σε μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα καθώς και στους μηχανισμούς προστασίας που έχουν αναπτύξει. Τα διάτομα είναι υπεύθυνα για το 20% της ετήσιας δέσμευσης άνθρακα το οποίο είναι εξαιρετικά εντυπωσιακό ποσοστό λαμβάνοντας υπόψιν πως σε μάζα αποτελούν λιγότερο από 1% της βιομάζας της γης(1,2).

Τα διάτομα διαθέτουν ένα περίβλημα που είναι κατασκευασμένο από άμορφο πυρίτιο (frustule) και διαχωρίζονται κυρίως με βάση το σχήμα τους. Υπάρχουν δύο τάξεις στις οποίες διαχωρίζονται τα διάτομα, τα κεντρικά διάτομα τα οποία έχουν ακτινωτή συμμετρία και τα πτεροειδή διάτομα τα οποία έχουν κυρίως αμφίπλευρη συμμετρία. Κάποιες συνήθεις δομές του περιβλήματος πυρίτιου φαίνονται στην εικόνα 1.



Εικόνα 1 : Χαρακτηριστικές δομές του περιβλήματος πυρίτιου των διατόμων (3).

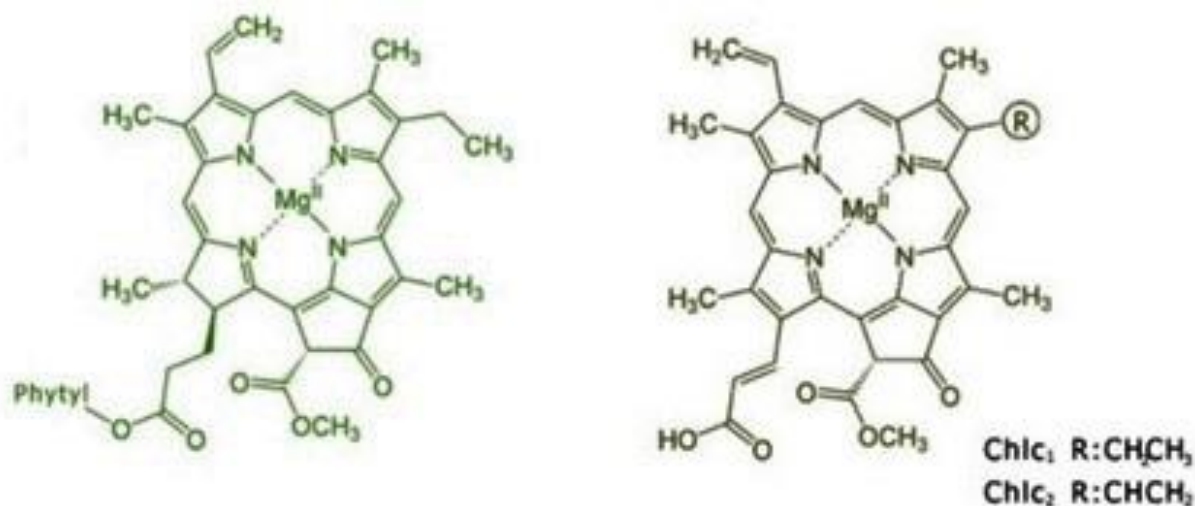
Στην εικόνα 1Α εμφανίζεται η χαρακτηριστική δομή του περιβλήματος των κεντρικών διατόμων ενώ στην εικόνα 1Β των πτεροειδών. Οι μικροοργανισμοί αυτοί αναπτύσσονται κυρίως σε θαλάσσια περιβάλλοντα όπου συναντώνται είτε ως μεμονωμένα κύτταρα είτε ως αλυσίδες κυττάρων όπως φαίνεται στις εικόνες 1Γ και 1Η. Κατά κύριο λόγο αναπτύσσονται σε περιορισμένο βάθος (μέχρι 200m) από την επιφάνεια της θάλασσας. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι είναι αυτότροφοι μικροοργανισμοί, επομένως χρειάζονται φως από τον ήλιο έτσι

ώστε να αξιοποιήσουν τη φωτοσύνθεση για παραγωγή ενέργειας. Παρόλα αυτά έχουν καταγραφεί κάποια είδη διατόμων τα οποία έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται και ετερότροφα, δηλαδή λαμβάνοντας τις ουσίες που χρειάζονται για την ανάπτυξη τους από οργανικές πηγές στο περιβάλλον τους, ακόμα και παρασιτικά εις βάρος άλλων οργανισμών(3).

1.2 Χλωροφύλλες και Καροτενοειδή

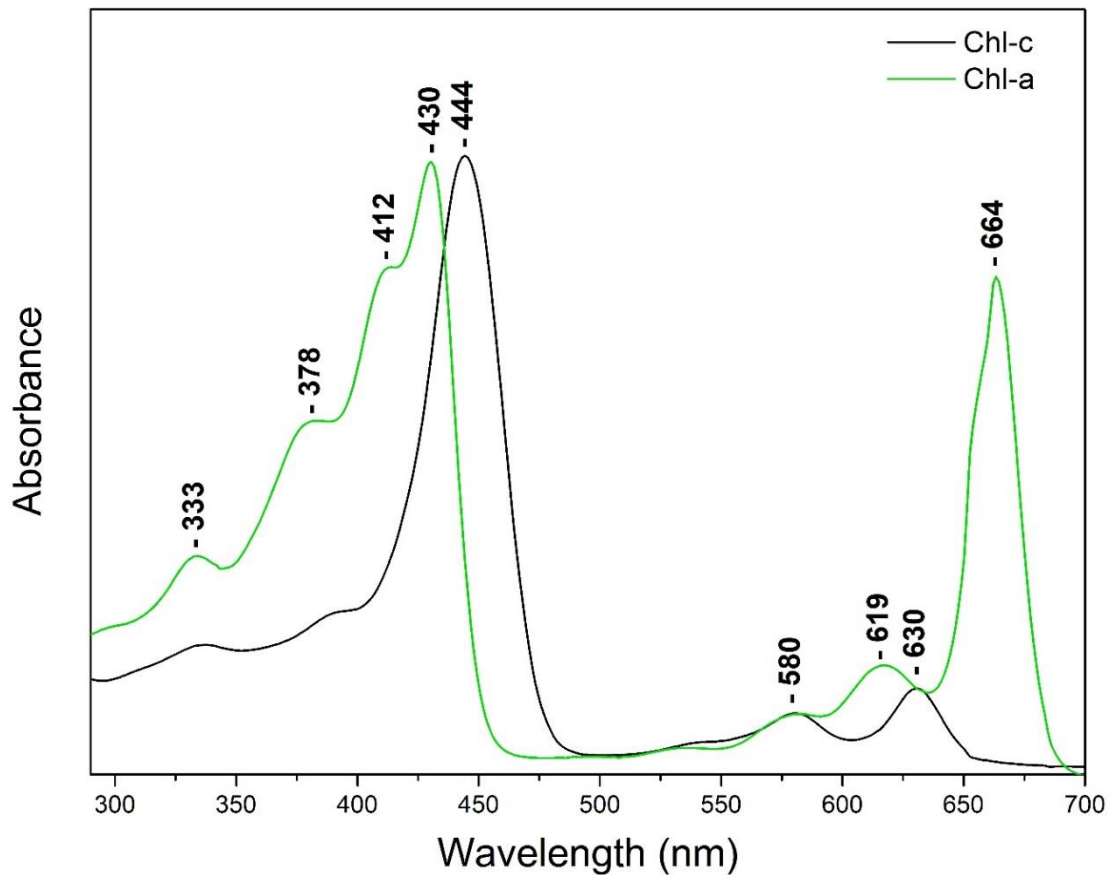
Τα διάτομα έχουν την ικανότητα σύνθεσης ενός μεγάλου αριθμού χρωμοφόρων μορίων που χρησιμοποιούνται τόσο στη συλλογή φωτός για την πραγματοποίηση της φωτοσύνθεσης όσο και στη φωτο-προστασία από την ηλιακή ακτινοβολία και τις επιπτώσεις της. Συγκεκριμένα, είναι γνωστό πως τα διάτομα παράγουν τις χλωροφύλλες *a* και *c* καθώς και καροτενοειδή όπως το β -καροτένιο από την κατηγορία των καροτενίων και φουκοξανθίνη, διατοξανθίνη, διαδινοξανθίνη, βιολαξανθίνη, ανθεραξανθίνη και ζεαξανθίνη από την κατηγορία των ξανθοφύλλων, οι οποίες είναι χρωστικές που συνεισφέρουν τόσο στη φωτο-προστασία όσο και στη συλλογή φωτός και δουλεύουν συνεργατικά με τις χλωροφύλλες για τις ανάγκες της φωτοσύνθεσης(4).

Οι χλωροφύλλες χωρίζονται σε 6 βασικές κατηγορίες, τις χλωροφύλλες *a, b, c, d* και τις σπανιότερες *e* και *f*, οι οποίες έχουν διαφορές στη δομή τους και συναντώνται σε διαφορετικούς οργανισμούς. Το σημαντικότερο είδος είναι η χλωροφύλλη *a*, η οποία βρίσκεται σε όλους τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς και λειτουργεί ως η κύρια φωτοσυνθετική χρωστική. Οι υπόλοιπες χλωροφύλλες έχουν συμπληρωματικό ρόλο μιας και απορροφούν φως σε διαφορετικά μήκη κύματος, μεγαλώνοντας έτσι το εύρος του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος από το οποίο μπορεί να γίνει απορρόφηση ενέργειας. Στην περίπτωση των διατόμων, οι χλωροφύλλες που παράγονται είναι οι *a* και *c*, των οποίων η δομή τους φαίνεται στο πιο κάτω σχήμα. Η χλωροφύλλη *c* διαχωρίζεται περαιτέρω στις υποκατηγορίες *c₁* και *c₂* (4).



Εικόνα 2 : Χημική δομή των χλωροφύλλων α(αριστερά) και c(δεξιά). (4)

Η δομή της χλωροφύλλης α αποτελείται από τα τέσσερα άτομα αζώτου των πυρρολικών δακτυλίων τα οποία συνδέονται με ένα άτομο μαγνησίου που βρίσκεται στο κέντρο του μορίου. Μεταξύ τρίτου και τέταρτου πυρρολίου δημιουργείται ένας δακτύλιος κυκλοπεντανόνης, ενώ στον τέταρτο πυρρολικό δακτύλιο συνδέεται με εστερικό δεσμό η φυτόλη η οποία αποτελείται από τέσσερις μονάδες ισοπρενίου. Η παρουσία διαφορετικών λειτουργικών ομάδων στους πυρρολικούς δακτυλίους είναι εκείνη που διαχωρίζει τα διάφορα είδη χλωροφύλλης. Οι χλωροφύλλες απορροφούν φως στο ορατό μέρος του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και παρουσιάζουν δύο ζώνες απορρόφησης, όπως φαίνεται στο πιο κάτω σχήμα το οποίο περιέχει τα φάσματα απορρόφησης των χλωροφυλλών α και c σε μεθανόλη και προέρχονται από τα κύτταρα του διατόμου *P. Tricornutum*. Συνδυαστικά φαίνεται πως οι δύο ουσίες έχουν την ικανότητα απορρόφησης φωτός από ένα πολύ μεγάλο μέρος του ορατού τμήματος του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Εξαίρεση αποτελεί μια μικρή περιοχή μεταξύ 480 – 550 nm.

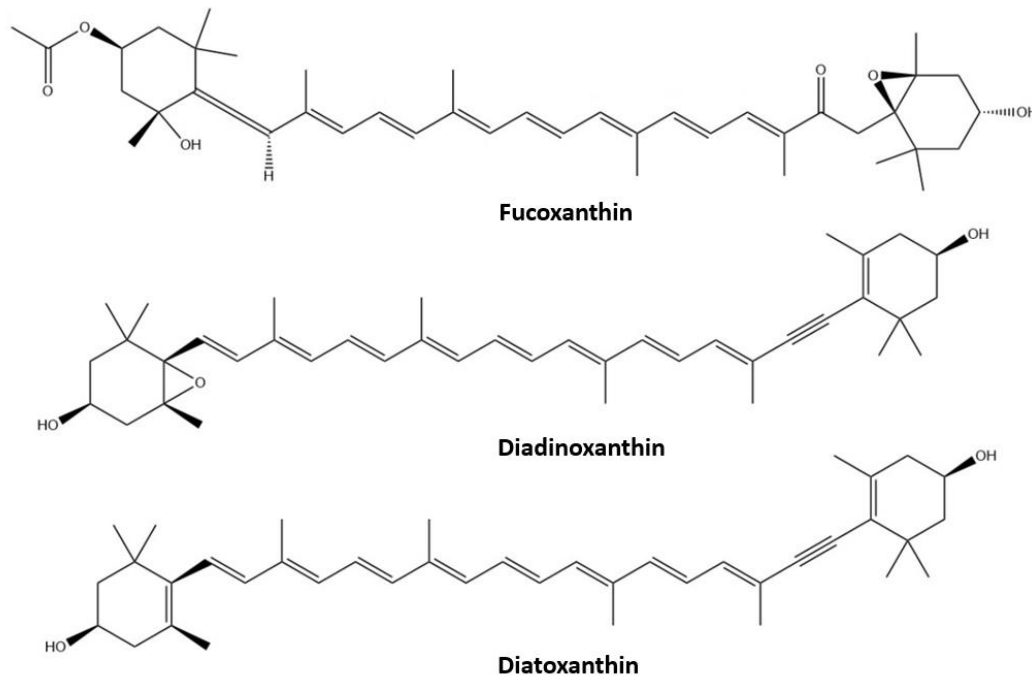


Εικόνα 3: Φάσμα απορρόφησης των χλωροφυλλών *a* και *c* σε μεθανόλη.

Αξίζει να σημειωθεί πως τα μήκη κύματος στα οποία απορροφούν φως οι χρωστικές ουσίες εξαρτώνται από το χημικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης εντός των κυττάρων (*in vivo*) οι χλωροφύλλες, όπως και τα καροτενοειδή, βρίσκονται σε σύμπλοκα συλλογής φωτός (Light Harvesting Complexes, LHCs) μαζί με πρωτεΐνες και κατά συνέπεια έχουν ελαφρώς μετατοπισμένες ζώνες απορρόφησης προς μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με την περίπτωση που βρίσκονται διαλυμένες σε κάποιο οργανικό διαλύτη (*in vitro*) (4).

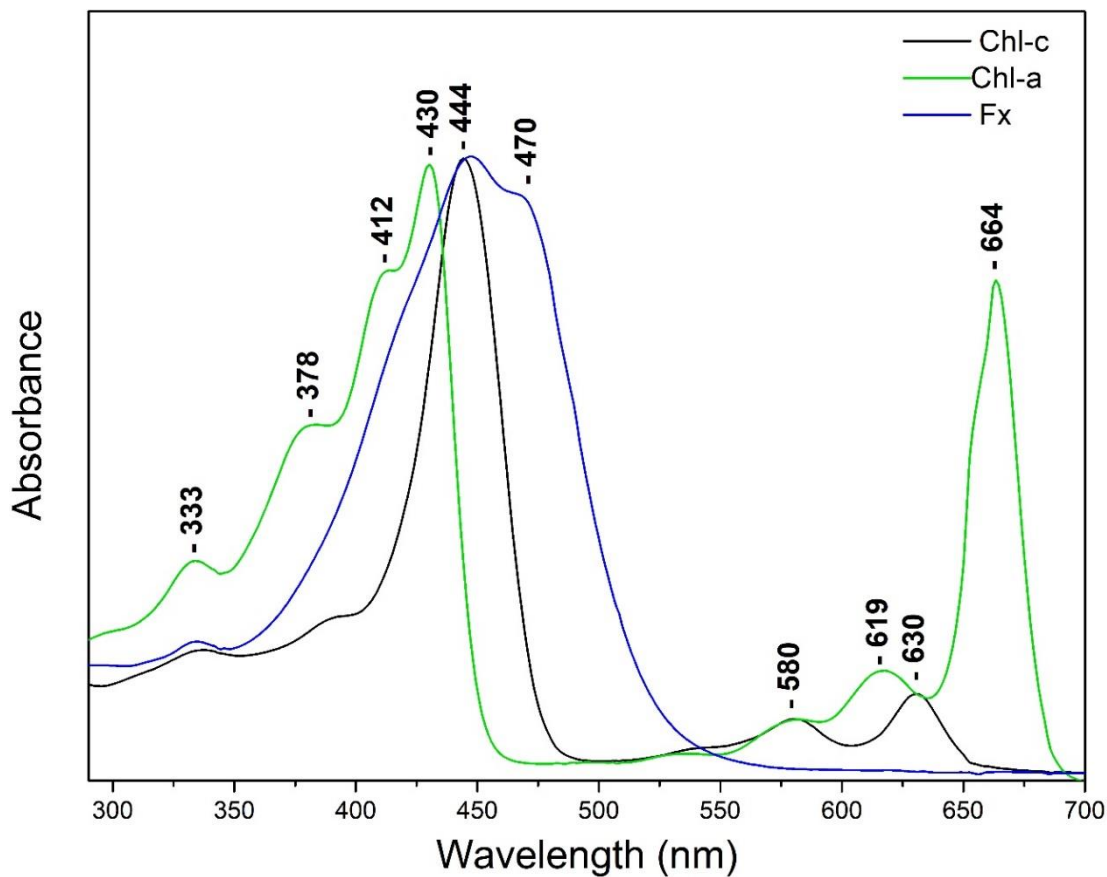
Τα καροτενοειδή είναι οργανικές χρωστικές ουσίες οι οποίες συνήθως έχουν κίτρινο, πορτοκαλί ή κόκκινο χρώμα και παράγονται κυρίως από φυτά, βακτήρια και άλγη. Μέχρι σήμερα είναι γνωστά περισσότερα από 1000 διαφορετικά καροτενοειδή, κάνοντας τα τη πιο διαδεδομένη φυσική χρωστική ουσία που υπάρχει στον πλανήτη. Η χημική τους δομή στηρίζεται σε μια αλυσίδα ατόμων άνθρακα και μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες, τα καροτένια, τα οποία είναι αμιγώς υδρογονάνθρακες και δεν περιέχουν οξυγόνο και τις ξανθοφύλλες οι οποίες περιέχουν οξυγόνο στη δομή τους. Στο πιο κάτω

σχήμα φαίνεται η δομή των τριών σημαντικότερων καροτενοειδών που παράγονται από τα δίατομα, Φουκοξανθίνη, Διαδινοξανθίνη και Διατοξανθίνη.



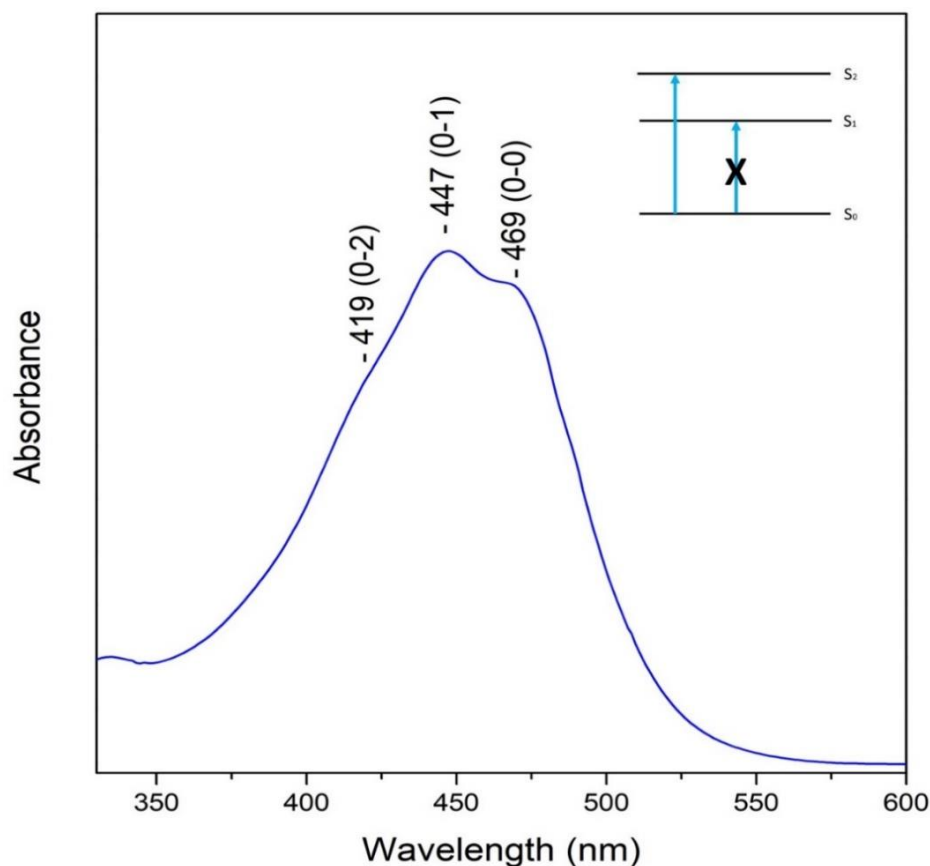
Εικόνα 4 : Χημική δομή των καροτενοειδών Φουκοξανθίνη, Διαδινοξανθίνη και Διατοξανθίνη.

Τα καροτενοειδή έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης. Με την παρουσία τους στα LHCs συμμετέχουν στη συλλογή φωτός σε μήκη κύματος διαφορετικά από αυτά των χλωροφυλλών και έτσι μεταφέρουν τη συλλεγόμενη ακτινοβολία στις χλωροφύλλες. Στην πιο κάτω εικόνα φαίνεται το φάσμα απορρόφησης της εικόνας 3 στο οποίο έχει προστεθεί και το φάσμα από το καροτενοειδές φουκοξανθίνη το οποίο εμφανίζει απορρόφηση στην περιοχή 350-550nm.



Εικόνα 5 : Φάσμα απορρόφησης των χλωροφυλλών a/c και φουκοξανθίνης σε μεθανόλη.

Από την εικόνα 5 γίνεται αντιληπτό πως συνδυαστικά η κύρια φωτοσυνθετική χρωστική που είναι η χλωροφύλλη α μαζί με τις συμπληρωματικές χλωροφύλλη c και φουκοξανθίνη, έχουν την ικανότητα εκμετάλλευσης ολόκληρου του ορατού μέρους του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και κατά συνέπεια τα σύμπλοκα που συνθέτουν να είναι σε θέση να πραγματοποιήσουν φωτοσύνθεση σε ποικίλες συνθήκες. Στη φύση, είτε λόγω της παρουσίας άλλων οργανισμών που απορροφούν μέρος της ακτινοβολίας από τον ήλιο είτε λόγω του μεγάλου βάθους από την επιφάνεια της θάλασσας δεν υπάρχει πάντα η ίδια διαθέσιμη ακτινοβολία για απορρόφηση, ούτε ως προς την ένταση, ούτε ως προς το μήκος κύματος. Επομένως, ένας φωτοσυνθετικός οργανισμός, για να μπορεί να προσαρμοστεί σε ένα μεγάλο εύρος περιοχών αλλά και σε μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα πρέπει να εμφανίζει ως προϋπόθεση την ικανότητα συλλογής φωτός από ένα μεγάλο μέρος του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (1,4). Στην εικόνα 6 εμφανίζεται το φάσμα απορρόφησης του καρροτενοειδούς φουκοξανθίνη σε μεθανόλη.

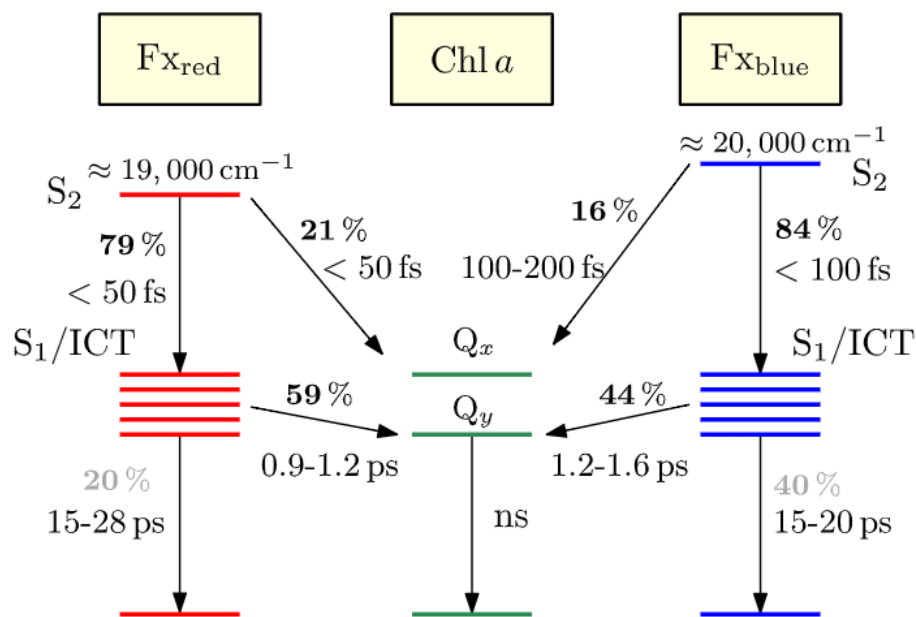


Εικόνα 6 : Φάσμα απορρόφησης του καροτενοειδούς φουκοξανθίνη σε μεθανόλη.

Γενικά, τα καροτενοειδή απορροφούν φως σε μήκη κύματος κυρίως μεταξύ 400-550nm, δηλαδή στο ορατό μέρος του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, αλλά και σε μικρότερο βαθμό στο υπεριώδες. Στο φάσμα απορρόφησης των καροτενοειδών εμφανίζονται τρεις διακριτές κορυφές απορρόφησης που αντιστοιχούν στις μεταβάσεις από τη θεμελιώδη ηλεκτρονιακή κατάσταση (S_0) στη δεύτερη διεγερμένη ηλεκτρονιακή κατάσταση (S_2). Η θεμελιώδης ηλεκτρονιακή κατάσταση και η πρώτη διεγερμένη ηλεκτρονιακή κατάσταση (S_1) εμφανίζουν την ίδια συμμετρία επομένως η μετάβαση $S_0 \rightarrow S_1$ είναι απαγορευμένη (5,6). Έτσι ο μόνος τρόπος μεταφοράς ηλεκτρονίων σε αυτή την κατάσταση είναι μέσω της αποδιέγερσης από την S_2 . Οι τρεις χαρακτηριστικές κορυφές που φαίνονται στο φάσμα της εικόνας 6 αντιπροσωπεύουν τη μετάβαση από την S_0 στην S_2 μεταξύ των δονητικών επιπέδων 0-0, 0-1 και 0-2.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα διάφορα χρωμοφόρα μόρια που παράγονται από τα διάτομα εμφανίζουν διαφορετικές ιδιότητες ανάλογα με το χημικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Είναι γνωστό πως και τα καροτενοειδή όταν αλληλοεπιδρούν με πρωτεΐνες εντός

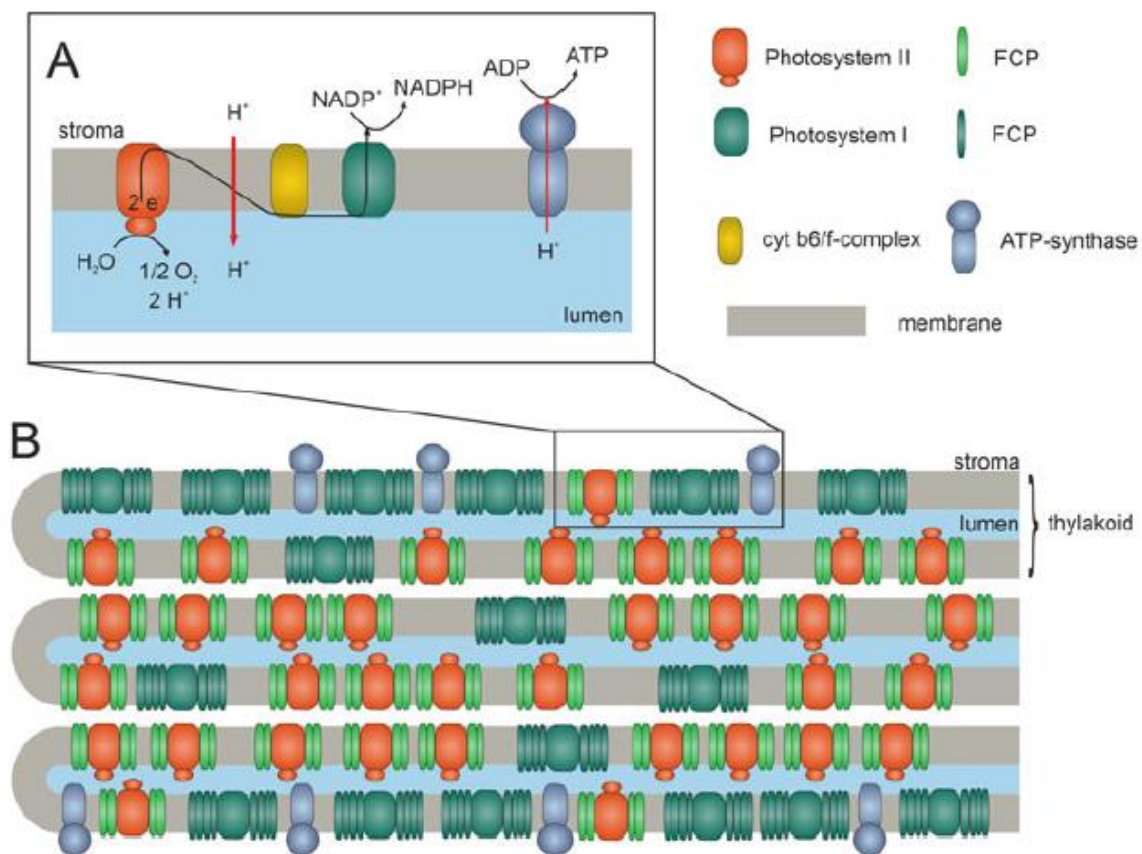
των συμπλόκων συλλογής φωτός των διαφόρων οργανισμών υφίστανται σημαντικές ενεργειακές μεταβολές οι οποίες μεταβάλουν τις οπτικές τους ιδιότητες. Ειδικά για την περίπτωση της φουκοξανθίνης, έχουν βρεθεί τρεις διαφορετικές καταστάσεις στις οποίες εμφανίζεται εντός των συμπλόκων του διατόμου *Cyclotella meneghiniana* με τις ονομασίες blue-Fx για μόρια που εμφανίζουν απορρόφηση μετατοπισμένη προς το ιώδες, red-Fx για μόρια που εμφανίζουν μετατόπιση προς το ερυθρό και green-Fx για ενδιάμεσες καταστάσεις (7,8). Οι τρεις αυτές κατηγορίες αποτελούν ένα γενικό χαρακτηρισμό των ιδιοτήτων των καροτενοειδών, παρόλα αυτά στην πραγματικότητα ίσως εμφανίζονται πολύ περισσότερες με μικρότερες διαφορές μεταξύ τους. Για αυτό το λόγο σε πολλές μελέτες γίνεται αναφορά μόνο σε δύο γενικές υποκατηγορίες, red-Fx και blue-Fx οι οποίες είναι γνωστό πως εκτός από τις διαφορές στα φάσματα απορρόφησης εμφανίζουν και σημαντικά διαφορετική λειτουργία ως προς την απόδοση και το χρόνο μεταφοράς ενέργειας προς τη χλωροφύλλη α (9) , όπως αποτυπώνεται και στην πιο κάτω εικόνα 7 που προέρχεται από την αντίστοιχη μελέτη.



Εικόνα7: Σχηματική αναπαράσταση της μεταφοράς ενέργειας από δύο καταστάσεις του καροτενοειδούς φουκοξανθίνη προς τη χλωροφύλλη α (9).

1.3 Σύμπλοκα συλλογής φωτός των διατόμων

Όλοι οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί διαθέτουν μηχανισμούς συλλογής φωτός από το περιβάλλον με σκοπό την παραγωγή ενέργειας μέσω συγκεκριμένων αντιδράσεων. Για την απορρόφηση ενέργειας σε μορφή φωτονίων χρησιμοποιούνται χρωμοφόρα μόρια δεσμευμένα στα φωτοσυστήματα I και II καθώς και σε περιφερειακά σύμπλοκα συλλογής φωτός με σκοπό τη μεταφορά ενέργειας σε συγκεκριμένα μόρια χλωροφύλλης α εντός των φωτοσυστημάτων τα οποία ονομάζονται κέντρα αντίδρασης (reaction centers) όπου γίνεται διαχωρισμός φορτίου και ξεκινάνε οι αντιδράσεις που οδηγούν στην παραγωγή χημικής ενέργειας. Μια σχηματική αναπαράσταση της θυλακοειδούς μεμβράνης στην οποία βρίσκονται τα φωτοσυστήματα στην περίπτωση των διατόμων φαίνεται στην εικόνα 8 (11).



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της θυλακοειδούς μεμβράνης των διατόμων(11).

Στα διάτομα τα LHCs ονομάζονται FCPs (Fucoxanthin-Chlorophyll proteins) και αποτελούνται από χλωροφύλλες α και c , φουκοξανθίνη καθώς και διαδινοξανθίνη σε

μερικές υποκατηγορίες. Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που καθιστούν τα συγκεκριμένα σύμπλοκα εξαιρετικά επιτυχημένα στη συλλογή και μεταφορά ενέργειας είναι η προσαρμοστικότητα που εμφανίζουν σε μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η ένταση του φωτός και το μήκος κύματος της διαθέσιμης ακτινοβολίας.. Τα μόρια χλωροφύλλης και καροτενοειδών είναι δεσμευμένα με μη-ομοιοπολικούς δεσμούς στα FCPs , κάτι που έχει σαν αποτέλεσμα τα ενεργειακά τους επίπεδα να έχουν εξάρτηση από το πρωτεϊνικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Έτσι, καροτενοειδή όπως η φουκοξανθίνη παρουσιάζουν ένα ασυνήθιστα μεγάλο εύρος απορρόφησης και οι ιδιότητες των συμπλοκών μεταβάλλονται σημαντικά ανάλογα με τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτά (10) .

Εκτός από τις ουσίες που είναι υπεύθυνες για τη συλλογή φωτός, εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στα συγκεκριμένα σύμπλοκα παίζουν και οι πρωτεΐνες οι οποίες τα αποτελούν. Το γονιδίωμα των διατόμων περιέχει τα γονίδια Lhc, των οποίων οι μεταφρασμένες πρωτεΐνες συμμετέχουν στα σύμπλοκα συλλογής φωτός και μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις βασικές κατηγορίες. Οι ομάδες των πρωτεϊνών που έχουν σημαντικό ρόλο στη συλλογή φωτός ονομάζονται Lhcf και Lhcf ενώ η ομάδα Lhcx πιστεύεται πως συμμετέχει κυρίως στη φωτοπροστασία του διατόμου. Επίσης, υπάρχουν κάποιες μικρότερες κατηγορίες που δεν έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα και ονομάζονται Lhcz και Lhey των οποίων ο ρόλος παραμένει αμφιλεγόμενος . Οι πρωτεΐνες αυτές οργανώνονται σε σύμπλοκα μαζί με χρωμοφόρα μόρια και συνδυαστικά δημιουργούν τα FCPs. Αξίζει να σημειωθεί πως στη βιβλιογραφία, για ιστορικούς λόγους, τα σύμπλοκα μεταξύ μιας πρωτεΐνης και χρωμοφόρων μορίων έχει επικρατήσει να αναφέρονται επίσης ως FCPs, αν και ο όρος τυπικά αφορά ομάδες αρκετών πρωτεϊνών που αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους για τη δημιουργία ενός μεγαλύτερου συμπλόκου.

Η αναλογία μεταξύ των χρωμοφόρων μορίων εντός των FCPs έχει αναφερθεί σε διάφορες μελέτες πως κυμαίνεται μεταξύ 6-8 μόρια χλωροφύλλης a και 2-3 μόρια χλωροφύλλης c σε συνδυασμό με 6-8 μόρια φουκοξανθίνης και πιθανώς 1 μόριο διαδινοξανθίνης (12,13,14,15). Τα πιο πάνω μεταβάλλονται ανάλογα με το είδος του διατόμου, τις συνθήκες ανάπτυξης, τη μέθοδο απομόνωσης καθώς και το είδος των FCPs, δηλαδή αν πρόκειται για περιφερειακά σύμπλοκα ή σύμπλοκα που αλληλοεπιδρούν κατευθείαν με κάποιο φωτοσύστημα (11). Η μεταφορά ενέργειας μεταξύ των χρωμοφόρων εμφανίζει σημαντική εξάρτηση από την απόσταση μεταξύ των μορίων εντός του συμπλόκου, τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους και τη διαμόρφωση που εμφανίζουν εντός του συμπλόκου(11,16).

1.4 Φωτοπροστασία

Τα διάτομα είναι οργανισμοί οι οποίοι εξαρτώνται από την ηλιακή ακτινοβολία για την παραγωγή ενέργειας και την επιβίωση τους. Όπως έχει αναφερθεί, είναι ένα είδος το οποίο συναντάται σε ποικίλα περιβάλλοντα ολόκληρου του πλανήτη, έτσι γίνεται εύκολα αντιληπτό πως οι οργανισμοί αυτοί έρχονται πολλές φορές αντιμέτωποι με συνθήκες οι οποίες μπορεί να είναι επιβλαβείς για την ανάπτυξη τους. Μια τέτοια περίπτωση είναι η υψηλή ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας, η οποία είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία ROS (Reactive Oxygen Species) εντός των φωτοσυστημάτων όλων των φωτοσυνθετικών οργανισμών και μπορούν να οδηγήσουν σε βιολογικές βλάβες που καταλήγουν στο θάνατο του οργανισμού(11). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα όλοι οι οργανισμοί που πραγματοποιούν φωτοσύνθεση να έχουν αναπτύξει κάποιους μηχανισμούς προστασίας οι οποίοι ενεργοποιούνται σε περιβάλλοντα υψηλής έντασης φωτός. Οι μηχανισμοί αυτοί εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των διαφόρων οργανισμών και εμπεριέχουν διαφορετικές στρατηγικές όπως είναι η παραγωγή συγκεκριμένων καροτενοειδών, η έκφραση πρωτεϊνών εντός των συμπλόκων συλλογής φωτός που τροποποιούν τη διάταξη και τις ιδιότητες τους κ.α. (17)

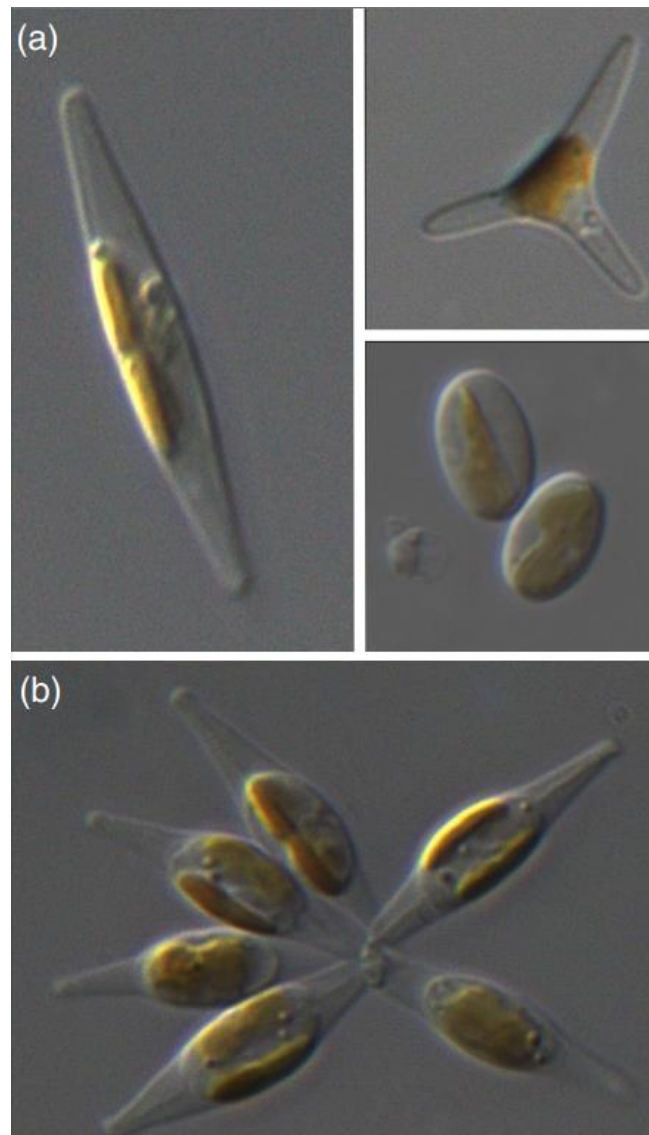
Ο σκοπός των φωτο-προστατευτικών μηχανισμών είναι η αποβολή, ως θερμότητα, της επιπλέον ενέργειας που έχει απορροφήσει ο οργανισμός από φωτόνια του περιβάλλοντος και η πρόληψη ή μείωση της οξειδωτικής βλάβης που αυτή μπορεί να προκαλέσει. Η πιο πάνω διαδικασία επιτυγχάνεται μέσω της μη-φωτοχημικής απόσβεσης (Non-photochemical quenching, NPQ) του φθορισμού της χλωροφύλλης α αποβάλλοντας σε μορφή θερμότητας την πλεονάζουσα ενέργεια η οποία δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μέσω της φωτοχημικής απόσβεσης, δηλαδή χρήση της ως πηγή ενέργειας για τις διεργασίες της φωτοσύνθεσης. Σημαντικότερο ρόλο στην NPQ έχουν τα καροτενοειδή διαδινοξανθίνη και διατοξανθίνη. Είναι γνωστό πως όταν τα διάτομα αναπτύσσονται σε συνθήκες υψηλού φωτισμού, αυξάνεται ραγδαία η παρουσία διαδινοξανθίνης στα κύτταρα τους(11,19). Μέσω μιας βαθμίδας ΔpH , η οποία δημιουργείται κατά τη διάρκεια της έκθεσης στο φως κατά μήκος της θυλακοειδούς μεμβράνης, ενεργοποιείται ο κύκλος της διαδινοξανθίνης (DD cycle) και πραγματοποιείται η μετατροπή διαδινοξανθίνης σε διατοξανθίνη μέσω του ενζύμου Ddx deperoxidase (DDE). Η διαδικασία μπορεί να αντιστραφεί μέσω του ενζύμου Dtx epoxidase (DEP) κάτω από συνθήκες παρατεταμένου σκοταδιού όπου δεν υπάρχει πλέον παρουσία ΔpH . Μέσω της διατοξανθίνης δεν είναι δυνατή η μεταφορά ενέργειας διέγερσης προς τη

χλωροφύλλη α, έτσι η απορρόφηση ακτινοβολίας από αυτά τα μόρια ακολουθείται από την αποδιέγερση τους με εκπομπή θερμότητας(11,17,18). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της παρουσίας χλωροφύλλης που βρίσκεται στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση (^3Chl) και η οποία είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία του (δι)οξυγόνου μονής κατάστασης που αποτελεί την κύρια αιτία οξειδωτικής βλάβης στα κύτταρα των φωτοσυνθετικών οργανισμών. Παρόλα αυτά, ο ακριβής μηχανισμός λειτουργίας αυτών των διεργασιών και ο ρόλος της διατοξανθίνης εντός των συμπλόκων συλλογής φωτός δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως(17,22). Ταυτόχρονα, τα καροτενοειδή έχουν την ιδιότητα απόσβεσης της ^3Chl μέσω της λήψης ενέργειας διέγερσης από αυτή την κατάσταση και αφού διεγερθούν στην τριπλή τους κατάσταση η οποία δεν έχει αρκετή ενέργεια για τη δημιουργία (δι)οξυγόνου μονής κατάστασης να αποδιεγερθούν με εκπομπή θερμότητας (20,21).

Επιπλέον υπάρχει αύξηση στην παρουσία της οικογένειας πρωτεϊνών Lhcx οι οποίες όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως σχετίζονται με την φωτο-προστασία και πιστεύεται πως επιτελούν αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις εντός των συμπλόκων συλλογής φωτός οι οποίες ενισχύουν την απόδοση της NPQ(17,18,19). Οι πιο πάνω μεταβολές που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της φωτο-προστασίας των διατόμων μπορούν να παρατηρηθούν με χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών, τόσο κατά τη διάρκεια της ενεργού φωτοπροστασίας όπου πραγματοποιείται NPQ λόγω του ρόλου της διατοξανθίνης, όσο και κατά την ανάπτυξη του οργανισμού σε ακραίες συνθήκες φωτισμού με την παρατήρηση της αύξησης στην παραγωγή διαδινοξανθίνης από τα κύτταρα καθώς και τις πιθανές αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των χρωμοφόρων και τις συνέπειες των μεταβολών στη σύνθεση πρωτεϊνών και κατά συνέπεια στις ιδιότητες των συμπλόκων συλλογής φωτός.

1.5 Phaeodactylum Tricornutum

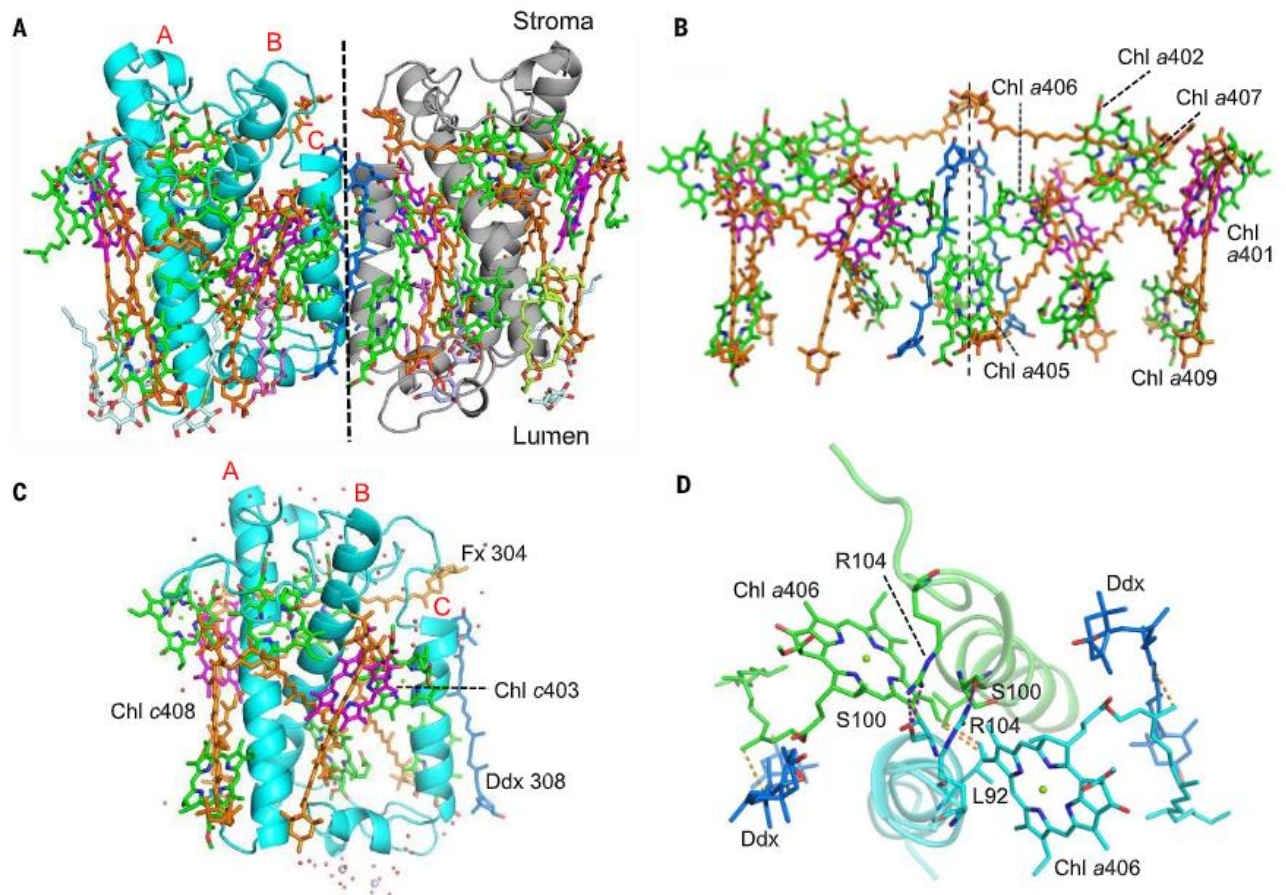
Το είδος *Phaeodactylum Tricornutum* (*P.Tricornutum*) θεωρείται το πιο εκτενώς μελετημένο είδος διατόμου μέχρι σήμερα (23,24). Είναι πρότυπο είδος για τη μελέτη πτεροειδών διατόμων μιας και έχει επιλεγεί ως το πρώτο διάτομο αυτής της κατηγορίας στο οποίο έγινε αλληλούχιση του γονιδιώματος του(25). Επίσης από το συγκεκριμένο είδος προέρχεται και η πρώτη κρυσταλλική δομή απομονωμένου συμπλόκου συλλογής φωτός σε υψηλή ανάλυση (26). Στην εικόνα 9 φαίνονται οι διαφορετικές μορφές που εμφανίζει το συγκεκριμένο είδος στο περιβάλλον (27).



Εικόνα 9 : Διαφορετικές μορφές της ανατομίας του διατόμου *P.Tricornutum* που εμφανίζονται στο περιβάλλον (27).

Σχετικά με την απόκριση του διατόμου κάτω από συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μελετών διαθέσιμες στη βιβλιογραφία. Το συμπέρασμα που υπάρχει σε όλες τις μελέτες αφορά την αύξηση στη σύνθεση των καροτενοειδών διαδινοξανθίνη και διατοξανθίνη (28,29,30,31,32,33). Ειδικότερα οι B.Lepetit et al. (30) αναφέρουν την παρουσία των συγκεκριμένων καροτενοειδών σε διαφορετικά μέρη της φωτοσυνθετικής μεμβράνης, τόσο δεσμευμένα με πρωτεΐνες εντός των συμπλόκων συλλογής φωτός όσο και εντός λιπιδίων τα οποία βρίσκονται σε εξωτερικά τμήματα της μεμβράνης, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως εξυπηρετούν διαφορετικούς ρόλους σχετικά με τη συλλογή φωτός και τη φωτοπροστασία σε κάθε περίπτωση. Επίσης οι M.Nymark et al (31) παρατήρησαν πως τα διάτομα *P.Tricornutum* έχουν την ικανότητα να διατηρήσουν την παραγωγή ενέργειας μέσω φωτοσύνθεσης με μεγάλη απόδοση ακόμη και σε συνθήκες έκθεσης σε υψηλή ένταση φωτισμού ($500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Η ικανότητα αυτή αποδόθηκε σε αλλαγές στη σύνθεση καροτενοειδών και την έκφραση των αντίστοιχων πρωτεϊνών που οδηγούν στην προσαρμογή κάτω από τέτοιες συνθήκες. Από μελέτη των κυττάρων και των απομονωμένων συμπλόκων FCP του διατόμου *P.Tricornutum* από τους R.Nagao et al. (32,33) μετά από έκθεση σε υψηλής έντασης φωτισμό για 24 ώρες προέκυψε το συμπέρασμα πως προκαλούνται δομικές αλλαγές στα σύμπλοκα συλλογής φωτός οι οποίες τροποποιούν τους μηχανισμούς μεταφοράς ενέργειας διέγερσης μεταξύ των χρωμοφόρων μορίων και επιπρόσθετα η απόσβεση της πλεονάζουσας ενέργειας παρατηρήθηκε πως συμβαίνει σε μικρότερο χρόνο.

Σχετικά με τα FCPs του συγκεκριμένου διατόμου, έχουν απομονωθεί και μελετηθεί εκτενώς, κυρίως μέσω της φασματοσκοπίας φθορισμού και βιοχημικών μεθόδων ανάλυσης πρωτεϊνών (34,35,36,37,38) . Οι πιο πάνω μελέτες έχουν οδηγήσει σε συμπεράσματα σχετικά με τις ιδιότητες συγκεκριμένων συμπλόκων του οργανισμού ως προς τη μεταφορά ενέργειας μεταξύ των χρωμοφόρων μορίων καθώς και τη σύστασή τους. Παρόλα αυτά, η σημαντικότερη μελέτη σχετικά με τα σύμπλοκα συλλογής φωτός του διατόμου *P.Tricornutum* είναι από τους Wang et al. (26) στην οποία παρουσιάζεται η κρυσταλλική δομή ενός διμερούς FCP με ανάλυση $1,8 \text{ \AA}$ (εικόνα 10). Το κάθε μονομερές αποτελείται από 7 μόρια χλωροφύλλης *a*, 2 μόρια χλωροφύλλης *c* , 7 μόρια φουκοξανθίνης και 1 μόριο διαδινοξανθίνης.

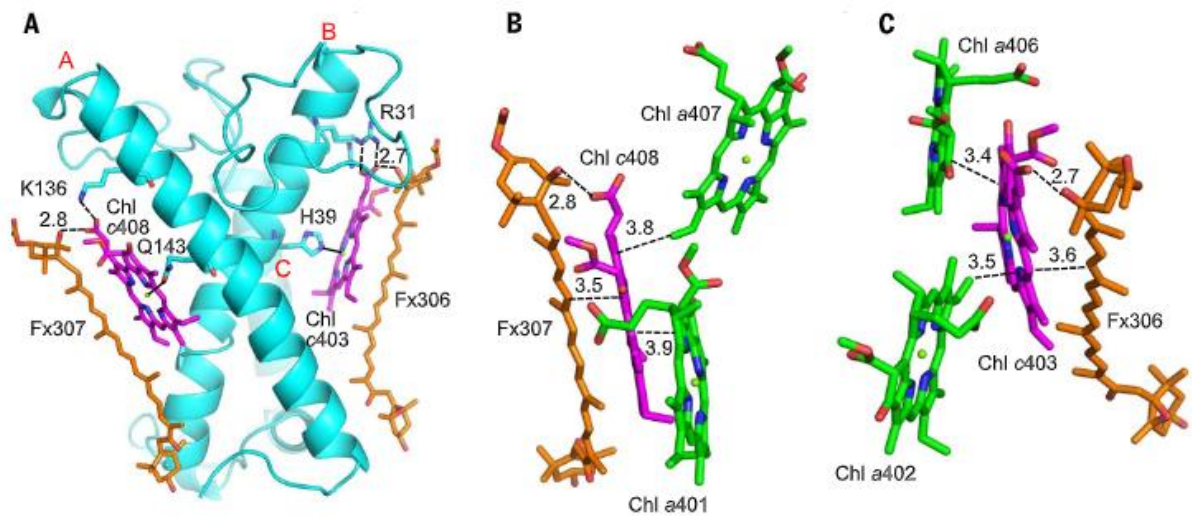


Εικόνα 10 : Η δομή ενός διμερούς FCP από το διάτομο *P.Tricornutum* σε ανάλυση 1,8 Å. Τα μόρια Chl-a απεικονίζονται με πράσινο χρώμα, Chl-c με μωβ, Fx με πορτοκαλί και Dd με μπλε. Με γκρι και γαλάζιο χρώμα εμφανίζονται οι πρωτεϊνικές δομές. (26)

Οι αποστάσεις μεταξύ των μορίων χλωροφύλλης a και χλωροφύλλης c στις πιο πάνω δομές έχει βρεθεί πως είναι 5,6 και 6,1 Å για τα ζευγάρια Chls c403-a402 και c408-a407 αντίστοιχα, εξηγώντας έτσι τις μετρήσεις που έχουν δείξει πως η μεταφορά ενέργειας μεταξύ τους πραγματοποιείται σε χρόνο 60-100fs με απόδοση 100% (15,38). Αντίστοιχα μεταξύ των μορίων φουκοξανθίνης και χλωροφύλλης οι αποστάσεις είναι στις περισσότερες περιπτώσεις περίπου 4 Å, κάτι που μεταφράζεται σε πολύ γρήγορη (~75fs) και αποδοτική (~90%) μεταφορά ενέργειας (15,38).

Ειδική αναφορά γίνεται για 2 από τα 7 μόρια φουκοξανθίνης (Fx306 , 307) τα οποία λόγω του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται αναφέρονται ως red-Fx και θεωρείται πως είναι υπεύθυνα για την παρατηρούμενη απορρόφηση στην περιοχή μεταξύ 500-550 nm που παρουσιάζουν τα διάτομα και έχει αναφερθεί προηγουμένως. Στην εικόνα 11 που ακολουθεί

εμφανίζεται η περιοχή όπου βρίσκονται τα συγκεκριμένα μόρια σε πολύ κοντινή απόσταση με τα 2 μόρια χλωροφύλλης c του μονομερούς.



Εικόνα 11 : Το χημικό και πρωτεϊνικό περιβάλλον των 2 μορίων χλωροφύλλης c στο μονομερές του συμπλόκου FCP.

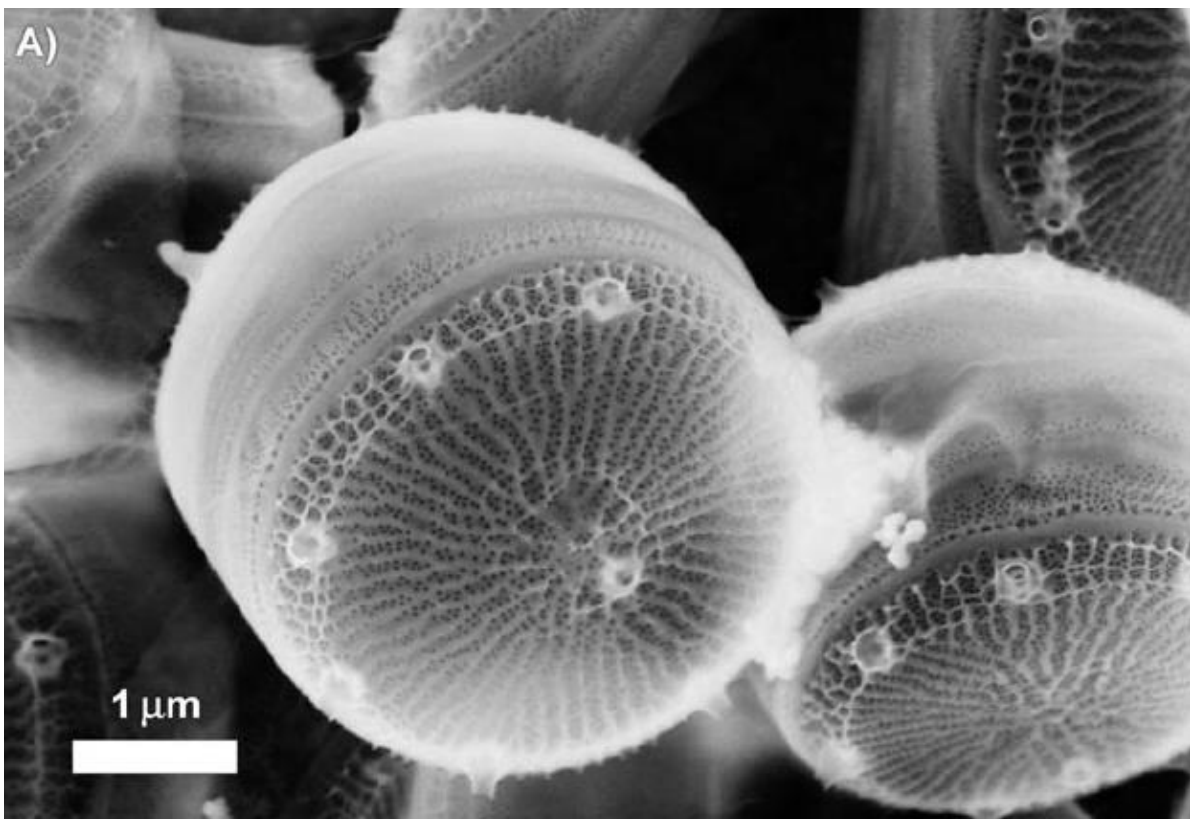
Η ιδιαίτερα μικρή απόσταση μεταξύ των μορίων Chl-c και red-Fx, καθιστά πιθανή την αλληλεπίδραση μεταξύ τους παρόλο που μέχρι σήμερα δεν υπάρχει πειραματική επιβεβαίωση. Εικάζεται πως η αιτία είναι ο πολύ μικρός χρόνος στη μεταφορά ενέργειας μεταξύ των δύο μορίων που καθιστά ιδιαίτερα δύσκολη της παρατήρηση της (26). Οι πιο πάνω παρατηρήσεις προσφέρουν μια γενική εικόνα για τη δομή και την οργάνωση των συμπλόκων συλλογής φωτός στα διάτομα. Παρόλα αυτά πρέπει να τονιστεί πως διαφορετικά σύμπλοκα συλλογής φωτός μπορούν να εμφανίσουν διαφορετική δομή και ιδιότητες που εξαρτώνται από το διάτομο που προέρχονται, τις συνθήκες ανάπτυξης και απομόνωσης και τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτό.

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του διατόμου *P.Tricornutum* αποτελεί η ικανότητα σύνθεσης ενός συμπλόκου FCP το οποίο εμφανίζει μια χαρακτηριστική εκπομπή φθορισμού στα 710 nm όταν αναπτύσσεται κάτω από κόκκινο φως ή κάτω από λευκό φως πολύ χαμηλής έντασης και για μικρή χρονική διάρκεια (39,40). Η ιδιότητα αυτή έχει αποδοθεί στην παρουσία της πρωτεΐνης Lhcf15 και θεωρείται ως ένα χαρακτηριστικό εξελικτικής προσαρμογής του διατόμου σε συνθήκες όπου δεν υπάρχει διαθέσιμη ακτινοβολία σε υψηλή ένταση και σε μεγάλο εύρος μηκών κύματος (41). Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου εκφράζεται το

πιο πάνω φαινόμενο δεν έχει εντοπιστεί μέχρι σήμερα σε επίπεδο διαμοριακών αλληλεπιδράσεων που προκαλούν τις παρατηρούμενες μεταβολές στα μόρια χλωροφύλλης α.

1.6 *Thalassiosira pseudonana*

Το είδος *Thalassiosira Pseudonana* (*T.Pseudonana*) ανήκει στην κατηγορία των διατόμων με κεντρική συμμετρία. Έχει επιλεγεί ως το πρώτο είδος ευκαριωτικού θαλάσσιου μικροοργανισμού για αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος από την κατηγορία του φυτοπλαγκτόν (42). Αυτό συνέβη λόγω της παρουσίας του μικροοργανισμού στους ωκεανούς ολόκληρου του πλανήτη καθώς και του σχετικά μικρού μεγέθους του γονιδιώματος του συγκριτικά με άλλους οργανισμούς της ομοταξίας. Παράλληλα, έχει καθιερωθεί ως ένα πρότυπο είδος διατόμου για τη μελέτη των οργανισμών, κυρίως στην κατηγορία των κεντρικών διατόμων (23). Στην εικόνα 12 φαίνεται η δομή του περιβλήματος του διατόμου *T.Pseudonana* (43).



Εικόνα 12 : Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) του περιβλήματος του διατόμου *T.Pseudonana* (43) .

Σχετικά με την απόκριση του συγκεκριμένου διατόμου σε έκθεση υψηλής έντασης φωτός, όπως και στην περίπτωση του διατόμου *P.Tricornutum*, γίνεται αναφορά σε πολλές μελέτες σχετικά με την αύξηση στη σύνθεση διαδινόξανθίνης καθώς και τη μετατροπή της σε διατοξανθίνη κατά τη διάρκεια του φωτισμού (44,45,46,47,48). Εκτός από τις μεταβολές των καροτενοειδών, έχει παρατηρηθεί και αύξηση στην παρουσία συγκεκριμένων πρωτεϊνών στα σύμπλοκα συλλογής φωτός του οργανισμού κάτω από αυτές τις συνθήκες. Πρόκειται για πρωτεΐνες της οικογένειας Lhcx και συγκεκριμένα τις Lhcx1, Lhcx4 και Lhcx6 (47). Ιδιαίτερα η τελευταία εμφανίζει πολύ σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση της με την έκθεση σε υψηλότερης έντασης φωτισμό και παρουσιάζει συσχέτιση με την παρουσία διατοξανθίνης στα δείγματα, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως έχει ενεργό ρόλο στη λειτουργία του καροτενοειδούς ως προς τη φωτοπροστασία των διατόμων (47,48).

Τα FCPs του συγκεκριμένου διατόμου έχουν απομονωθεί και μελετηθεί σε αρκετές περιπτώσεις (49,50,51,52) επιβεβαιώνοντας από τα συμπεράσματα που προέκυψαν πως υπάρχει ένα μεγάλο εύρος στις ιδιότητες που εμφανίζουν τα διαφορετικά σύμπλοκα κάθε οργανισμού τόσο ως προς τη σύσταση όσο και ως προς την λειτουργία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί μια πρόσφατη μελέτη με χρήση cryo-electron tomography που καθόρισε πως τα FCPs του διατόμου *T.Pseudonana* είναι τριμερή με την αναλογία Chlc:Chla να είναι 3:7 σε αντίθεση με την αντίστοιχη περίπτωση του *P.Tricornutum* όπου βρέθηκαν διμερή με αναλογία 2:7 (52).

Όλες οι μελέτες που έχουν αναφερθεί για τα δύο είδη διατόμων έχουν ιδιαίτερα σημαντική συνεισφορά στην κατανόηση της λειτουργίας αυτών των οργανισμών. Παρόλα αυτά πρέπει να τονιστεί πως υπάρχουν πολλά αναπάντητα ερωτήματα μιας και πρόκειται για εξαιρετικά περίπλοκες διεργασίες που αφορούν έμβια συστήματα. Τα σημαντικότερα ερωτήματα ως προς τη φωτοπροστασία του οργανισμού αφορούν τον ακριβή ρόλο των καροτενοειδών διαδινόξανθίνη και διατοξανθίνη καθώς και τη συμμετοχή των υπόλοιπων καροτενοειδών όπως είναι η φουκοξανθίνη στη φωτοπροστασία των διατόμων. Ταυτόχρονα θα πρέπει να εξεταστεί σε μεγαλύτερο βαθμό και η μακροχρόνια έκθεση σε τέτοιες συνθήκες μιας και στις περισσότερες μελέτες γίνεται έκθεση για πολύ σύντομο χρονικό διάστημα ή/και με χρήση σχετικά χαμηλής έντασης φωτός που δεν υπερβαίνει τα $300 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Επίσης, οι πειραματικές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί στις περισσότερες περιπτώσεις αφορούν βιοχημικές αναλύσεις και τη φασματοσκοπία φθορισμού, περιορίζοντας έτσι τις πληροφορίες που μπορούν να εξαχθούν. Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, είναι γνωστό πως κατά την

έκθεση σε υψηλή ένταση φωτός γίνεται αναπροσαρμογή στη διάταξη και λειτουργία των FCPs μέσω κυρίως της έκφρασης διαφορετικών πρωτεϊνών. Αυτές οι μεταβολές θα πρέπει να μελετηθούν με φασματοσκοπικές μεθόδους όπως είναι η φασματοσκοπία Raman η οποία μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με την αλληλεπίδραση των χρωμοφόρων μορίων μεταξύ τους αλλά και με το πρωτεϊνικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται.

1.7 Βιβλιογραφία Κεφαλαίου 1

1. Armbrust, E. V. (2009). The life of diatoms in the world's oceans. In *Nature* (Vol. 459, Issue 7244, pp. 185–192). <https://doi.org/10.1038/nature08057>
2. Benoiston, A. S., Ibarbalz, F. M., Bittner, L., Guidi, L., Jahn, O., Dutkiewicz, S., & Bowler, C. (2017). The evolution of diatoms and their biogeochemical functions. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 372, Issue 1728). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0397>
3. Falciatore, A., Jaubert, M., Bouly, J. P., Bailleul, B., & Mock, T. (2020). Diatom molecular research comes of age: Model species for studying phytoplankton biology and diversity[open]. In *Plant Cell* (Vol. 32, Issue 3, pp. 547–572). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00158>
4. Kuczynska, P., Jemiola-Rzeminska, M., & Strzalka, K. (2015). Photosynthetic pigments in diatoms. In *Marine Drugs* (Vol. 13, Issue 9, pp. 5847–5881). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md13095847>
5. Macernis, M., Streckaite, S., Litvin, R., Pascal, A. A., Llansola-Portoles, M. J., Robert, B., & Valkunas, L. (2022). Electronic and Vibrational Properties of Allene Carotenoids. *Journal of Physical Chemistry A*, 126(6), 813–824. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.1c09393>
6. Frank H. A., Christensen R. L., Excited electronic states, photochemistry and photophysics of carotenoids, in: G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander (Eds.), Carotenoids. Volume 4: Natural Functions, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2008, pp. 167–188.
7. Premvardhan, L., Sandberg, D. J., Fey, H., Birge, R. R., Büchel, C., & van Grondelle, R. (2008). The charge-transfer properties of the S2 state of fucoxanthin in solution and in fucoxanthin chlorophyll-a/c2 protein (FCP) based on stark spectroscopy and molecular-orbital theory. *Journal of Physical Chemistry B*, 112(37), 11838–11853. <https://doi.org/10.1021/jp802689p>
8. Premvardhan, L., Bordes, L., Beer, A., Büchel, C., & Robert, B. (2009). Carotenoid structures and environments in trimeric and oligomeric fucoxanthin chlorophyll a/c2 proteins from resonance raman spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(37), 12565–12574. <https://doi.org/10.1021/jp903029g>

9. Gelzinis, A., Butkus, V., Songaila, E., Augulis, R., Gall, A., Büchel, C., Robert, B., Abramavicius, D., Zigmantas, D., & Valkunas, L. (2015). Mapping energy transfer channels in fucoxanthin-chlorophyll protein complex. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1847(2), 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.11.004>
10. C. Büchel. How diatoms harvest light, 2019, *Science*, 365 (6452) 447-448, DOI: 10.1126/science.aay303
11. Falciatore, A., & Mock, T. (2022). *The Molecular Life of Diatoms*, Springer Nature
12. Lepetit, B., Volke, D., Gilbert, M., Wilhelm, C., & Goss, R. (2010). Evidence for the existence of one antenna-associated, lipid-dissolved and two protein-bound pools of diadinoxanthin cycle pigments in diatoms. *Plant Physiology*, 154(4), 1905–1920. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166454>
13. Nagao, R., Yokono, M., Akimoto, S., & Tomo, T. (2013). High excitation energy quenching in fucoxanthin chlorophyll a/c-binding protein complexes from the diatom *Chaetoceros gracilis*. *Journal of Physical Chemistry B*, 117(23), 6888–6895. <https://doi.org/10.1021/jp403923q>
14. Gundermann, K., & Büchel, C. (2012). Factors determining the fluorescence yield of fucoxanthin-chlorophyll complexes (FCP) involved in non-photochemical quenching in diatoms. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(7), 1044–1052. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.03.008>
15. Papagiannakis, E., van Stokkum, I. H. M., Fey, H., Büchel, C. B., & van Grondelle, R. (n.d.). *Spectroscopic characterization of the excitation energy transfer in the fucoxanthin-chlorophyll protein of diatoms*.
16. Claudia Büchel, 2020, Light harvesting complexes of Diatoms : Fucoxanthin-Chlorophyll Proteins, Photosynthesis in algae : Biochemical and Physiological mechanisms, Springer Nature
17. Goss, R., & Lepetit, B. (2015). Biodiversity of NPQ. In *Journal of Plant Physiology* (Vol. 172, pp. 13–32). Urban und Fischer Verlag GmbH und Co. KG. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.03.004>
18. Lavaud, J., & Lepetit, B. (2013). An explanation for the inter-species variability of the photoprotective non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in diatoms. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1827(3), 294–302. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.11.012>

19. Lepetit, B., G lin, G., Lepetit, M., Sturm, S., Vugrinec, S., Rogato, A., Kroth, P. G., Falciatore, A., & Lavaud, J. (2017). The diatom *Phaeodactylum tricornutum* adjusts nonphotochemical fluorescence quenching capacity in response to dynamic light via fine-tuned Lhcx and xanthophyll cycle pigment synthesis. *New Phytologist*, *214*(1), 205–218. <https://doi.org/10.1111/nph.14337>
20. Frank, H. A., Cua, A., Chynwat, V., Young, A., Gosztola , D., & Wasielewski, M. R. (1996). The lifetimes and energies of the first excited singlet states of diadinoxanthin and diatoxanthin: the role of these molecules in excess energy dissipation in algae. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 1277).
21. Choudhury, N., Behera, R. Photoinhibition of Photosynthesis: Role of Carotenoids in Photoprotection of Chloroplast Constituents. *Photosynthetica* **39**, 481–488 (2001). <https://doi.org/10.1023/A:1015647708360>
22. C.Buchel,2014, Fucoxanthin-Chlorophyll-Proteins and Non-Photochemical Fluorescence Quenching of Diatoms, *Advances in Photosynthesis and Respiration* 40, DOI 10.1007/978-94-017-9032-1_11, Springer Science
23. Falciatore, A., Jaubert, M., Bouly, J. P., Bailleul, B., & Mock, T. (2020). Diatom molecular research comes of age: Model species for studying phytoplankton biology and diversity[open]. In *Plant Cell* (Vol. 32, Issue 3, pp. 547–572). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00158>
24. Butler, T., Kapoore, R. V., & Vaidyanathan, S. (2020). *Phaeodactylum tricornutum*: A Diatom Cell Factory. In *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.023>
25. Bowler, C., Allen, A. E., Badger, J. H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Otilar, R. P., Rayko, E., Salamov, A., Vandepoele, K., Beszteri, B., Gruber, A., Heijde, M., Katinka, M., Mock, T., Valentin, K., ... Grigoriev, I. v. (2008). The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*, *456*(7219), 239–244. <https://doi.org/10.1038/nature07410>
26. Wang, W., Yu, L. J., Xu, C., Tomizaki, T., Zhao, S., Umena, Y., Chen, X., Qin, X., Xin, Y., Suga, M., Han, G., Kuang, T., & Shen, J. R. (2019). Structural basis for blue-green light harvesting and energy dissipation in diatoms. *Science*, *363*(6427). <https://doi.org/10.1126/science.aav0365>

27. Vardi, A., Thamatrakoln, K., Bidle, K. D., & Falkowski, P. G. (2009). Diatom genomes come of age. In *Genome Biology* (Vol. 9, Issue 12). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-12-245>
28. Kuczynska, P., Jemiola-Rzeminska, M., Nowicka, B., Jakubowska, A., Strzalka, W., Burda, K., & Strzalka, K. (2020). The xanthophyll cycle in diatom *Phaeodactylum tricornutum* in response to light stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, *152*, 125–137. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.04.043>
29. Lavaud, J., Rousseau, B., van Gorkom, H. J., & Etienne, A. L. (2002). Influence of the diadinoxanthin pool size on photoprotection in the marine planktonic diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiology*, *129*(3), 1398–1406. <https://doi.org/10.1104/pp.002014>
30. Lepetit, B., Volke, D., Gilbert, M., Wilhelm, C., & Goss, R. (2010). Evidence for the existence of one antenna-associated, lipid-dissolved and two protein-bound pools of diadinoxanthin cycle pigments in diatoms. *Plant Physiology*, *154*(4), 1905–1920. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166454>
31. Nymark, M., Valle, K. C., Brembu, T., Hancke, K., Winge, P., Andresen, K., Johnsen, G., & Bones, A. M. (2009). An integrated analysis of molecular acclimation to high light in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS ONE*, *4*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007743>
32. Nagao, R., Yokono, M., Ueno, Y., Suzuki, T., Kumazawa, M., Kato, K. H., Tsuboshita, N., Dohmae, N., Ifuku, K., Shen, J. R., & Akimoto, S. (2021). Enhancement of excitation-energy quenching in fucoxanthin chlorophyll a/c-binding proteins isolated from a diatom *Phaeodactylum tricornutum* upon excess-light illumination. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1862*(2). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148350>
33. Nagao, R., Ueno, Y., Yokono, M., Shen, J. R., & Akimoto, S. (2019). Effects of excess light energy on excitation-energy dynamics in a pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Photosynthesis Research*, *141*(3), 355–365. <https://doi.org/10.1007/s11120-019-00639-4>
34. Joshi-Deo, J., Schmidt, M., Gruber, A., Weisheit, W., Mittag, M., Kroth, P. G., & Büchel, C. (2010). Characterization of a trimeric light-harvesting complex in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* built of FcpA and FcpE proteins. *Journal of Experimental Botany*, *61*(11), 3079–3087. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq136>

35. Lepetit, B., Volke, D., Szabó, M., Hoffmann, R., Garab, G., Wilhelm, C., & Goss, R. (2007). Spectroscopic and molecular characterization of the oligomeric antenna of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochemistry*, *46*(34), 9813–9822. <https://doi.org/10.1021/bi7008344>
36. Gundermann, K., Schmidt, M., Weisheit, W., Mittag, M., & Büchel, C. (2013). Identification of several sub-populations in the pool of light harvesting proteins in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1827*(3), 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.10.017>
37. Gardian, Z., Litvín, R., Bína, D., & Vácha, F. (2014). Supramolecular organization of fucoxanthin-chlorophyll proteins in centric and pennate diatoms. *Photosynthesis Research*, *121*(1), 79–86. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-9998-3>
38. Akimoto, S., Teshigahara, A., Yokono, M., Mimuro, M., Nagao, R., & Tomo, T. (2014). Excitation relaxation dynamics and energy transfer in fucoxanthin-chlorophyll *a/c*-protein complexes, probed by time-resolved fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1837*(9), 1514–1521. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.02.002>
39. Herbstová, M., Bína, D., Koník, P., Gardian, Z., Vácha, F., & Litvín, R. (2015). Molecular basis of chromatic adaptation in pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1847*(6–7), 534–543. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.02.016>
40. Oka, K., Ueno, Y., Yokono, M., Shen, J. R., Nagao, R., & Akimoto, S. (2020). Adaptation of light-harvesting and energy-transfer processes of a diatom *Phaeodactylum tricornutum* to different light qualities. *Photosynthesis Research*, *146*(1–3), 227–234. <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00714-1>
41. Herbstová, M., Bína, D., Kaňa, R., Vácha, F., & Litvín, R. (2017). Red-light phenotype in a marine diatom involves a specialized oligomeric red-shifted antenna and altered cell morphology. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12247-0>
42. Armbrust, E. V., Berges, J. A., Bowler, C., Green, B. R., Martinez, D., Putnam, N. H., Zhou, S., Allen, A. E., Apt, K. E., Bechner, M., Brzezinski, M. A., Chaal, B. K., Chiovitti, A., Davis, A. K., Demarest, M. S., Detter, J. C., Glavina, T., Goodstein, D., Hadi, M. Z., ... Rokhsar, D. S. (2004). The genome of the diatom *Thalassiosira*

- Pseudonana: Ecology, evolution, and metabolism. *Science*, 306(5693), 79–86.
<https://doi.org/10.1126/science.1101156>
43. Sumper, M., & Brunner, E. (2008). Silica biomineralisation in diatoms: The model organism *Thalassiosira pseudonana*. In *ChemBioChem* (Vol. 9, Issue 8, pp. 1187–1194). <https://doi.org/10.1002/cbic.200700764>
44. Fisher, N. L., Campbell, D. A., Hughes, D. J., Kuzhiumparambil, U., Halsey, K. H., Ralph, P. J., & Suggett, D. J. (2020). Divergence of photosynthetic strategies amongst marine diatoms. *PLoS ONE*, 15(12 December).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244252>
45. Dong, H. P., Dong, Y. L., Cui, L., Balamurugan, S., Gao, J., Lu, S. H., & Jiang, T. (2016). High light stress triggers distinct proteomic responses in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *BMC Genomics*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3335-5>
46. Li, Z., Li, W., Zhang, Y., Hu, Y., Sheward, R., Irwin, A. J., & Finkel, Z. v. (2020). *DYNAMIC PHOTOPHYSIOLOGICAL STRESS RESPONSE OF A MODEL DIATOM TO TEN ENVIRONMENTAL STRESSES I*. <https://doi.org/10.1111/jpy.13072-20-099>
47. Zhu, S. H., & Green, B. R. (2010). Photoprotection in the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Role of LI818-like proteins in response to high light stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1797(8), 1449–1457.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.04.003>
48. Dong, Y. L., Jiang, T., Xia, W., Dong, H. P., Lu, S. H., & Cui, L. (2015). Light harvesting proteins regulate non-photochemical fluorescence quenching in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Algal Research*, 12, 300–307.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.09.016>
49. Calvaruso, C., Rokka, A., Aro, E. M., & Büchela, C. (2020). Specific Lhc Proteins Are Bound to PSI or PSII Supercomplexes in the Diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Plant Physiology*, 183(5), 67–79. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00042>
50. Kansy, M., Volke, D., Sturm, L., Wilhelm, C., Hoffmann, R., & Goss, R. (2020). Pre-purification of diatom pigment protein complexes provides insight into the heterogeneity of FCP complexes. *BMC Plant Biology*, 20(1).
<https://doi.org/10.1186/s12870-020-02668-x>
51. Grouneva, I., Rokka, A., & Aro, E. M. (2011). The thylakoid membrane proteome of two marine diatoms outlines both diatom-specific and species-specific features of the

photosynthetic machinery. *Journal of Proteome Research*, 10(12), 5338–5353.
<https://doi.org/10.1021/pr200600f>

52. Arshad, R., Calvaruso, C., Boekema, E. J., Büchel, C., & Kouřil, R. (2021). Revealing the architecture of the photosynthetic apparatus in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Plant Physiology*, 186(4). <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab208>

2 Πειραματικές τεχνικές και μεθοδολογία

Σε αυτή την ενότητα θα γίνει περιγραφή των πειραματικών τεχνικών και μεθοδολογιών που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της διατριβής. Συγκεκριμένα θα γίνει αναφορά στη μεθοδολογία ανάπτυξης των διατόμων και στις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν πριν τις πειραματικές μετρήσεις καθώς και αναφορά στο θεωρητικό υπόβαθρο των πειραματικών τεχνικών.

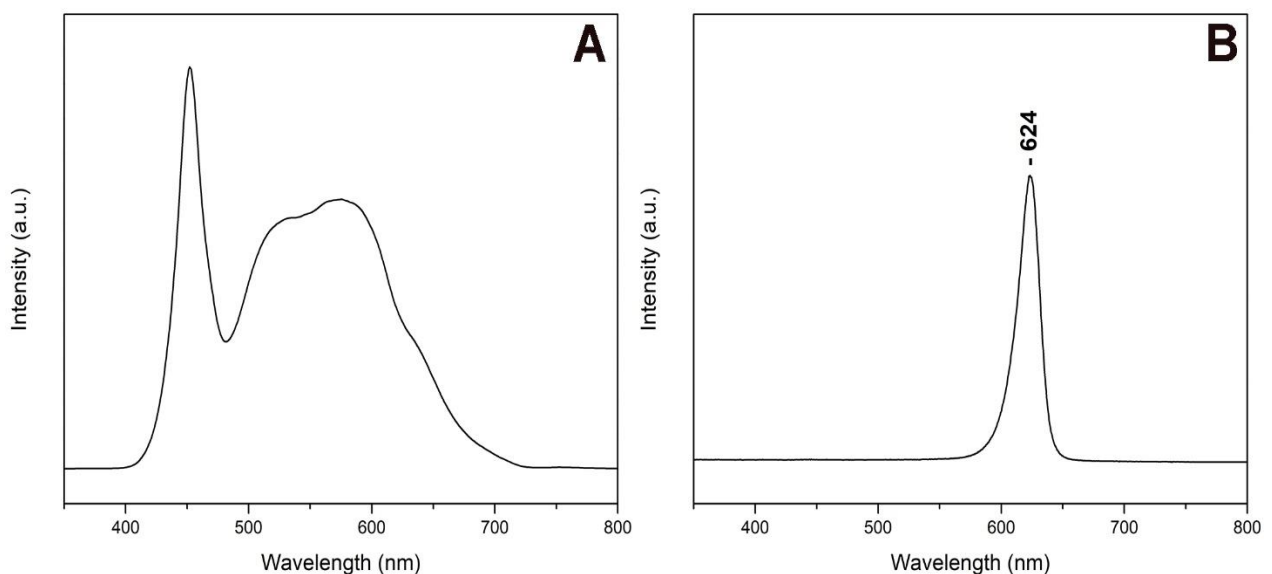
2.1 Ανάπτυξη διατόμων

Οι καλλιέργειες των διατόμων *P.Tricornutum* (CCAP 1052/1A) και *T.Pseudonana* (CCAP 1085/12) έχουν παραληφθεί από το κέντρο CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) και διατηρήθηκαν με συνεχής ανακαλλιέργειες στο βιομέσο f/2+Si (Guillard's medium) (1). Αρχικά γίνεται η ετοιμασία 5 διαλυμάτων τα οποία περιέχουν απαραίτητες ουσίες για την ανάπτυξη των διατόμων όπως φαίνεται πιο κάτω.

- 1) NaNO_3 75g/L
- 2) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.65g/L
- 3) *Trace elements*
 - Na_2EDTA 4,15g/L
 - $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3.15g/L
 - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01g/L
 - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02g/L
 - $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0.01g/L
 - $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 0.18g/L
 - $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 6 mg/L
- 4) *Vitamins*
 - Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂)* 0.5mg/L
 - Biotin* 0.5mg/L
 - Thiamine HCL (Vitamin B₁)* 0.1g/L
- 5) $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ 30g/L

Για την ανάπτυξη διατόμων παρουσία ^{15}N αντί ^{14}N έγινε αντικατάσταση του $\text{Na}^{14}\text{NO}_3$ (διάλυμα 1) με $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ διατηρώντας την ίδια συγκέντρωση και χωρίς οποιαδήποτε άλλη αλλαγή στα συστατικά του βιομέσου. Ακολούθως για την ετοιμασία του βιομέσου γίνεται προσθήκη 1ml από κάθε διάλυμα σε 1L θαλασσινού νερού και ρύθμιση του pH στο 8 με χρήση 1M NaOH ή 1M HCl . Το βιομέσο όπως και τα δοχεία στα οποία θα γίνει ανάπτυξη των διατόμων αποστειρώνονται με χρήση autoclave (15min/120°C). Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιούνται σε αποστειρωμένο περιβάλλον για αποφυγή ανάπτυξης άλλων μικροοργανισμών εντός των δοχείων.

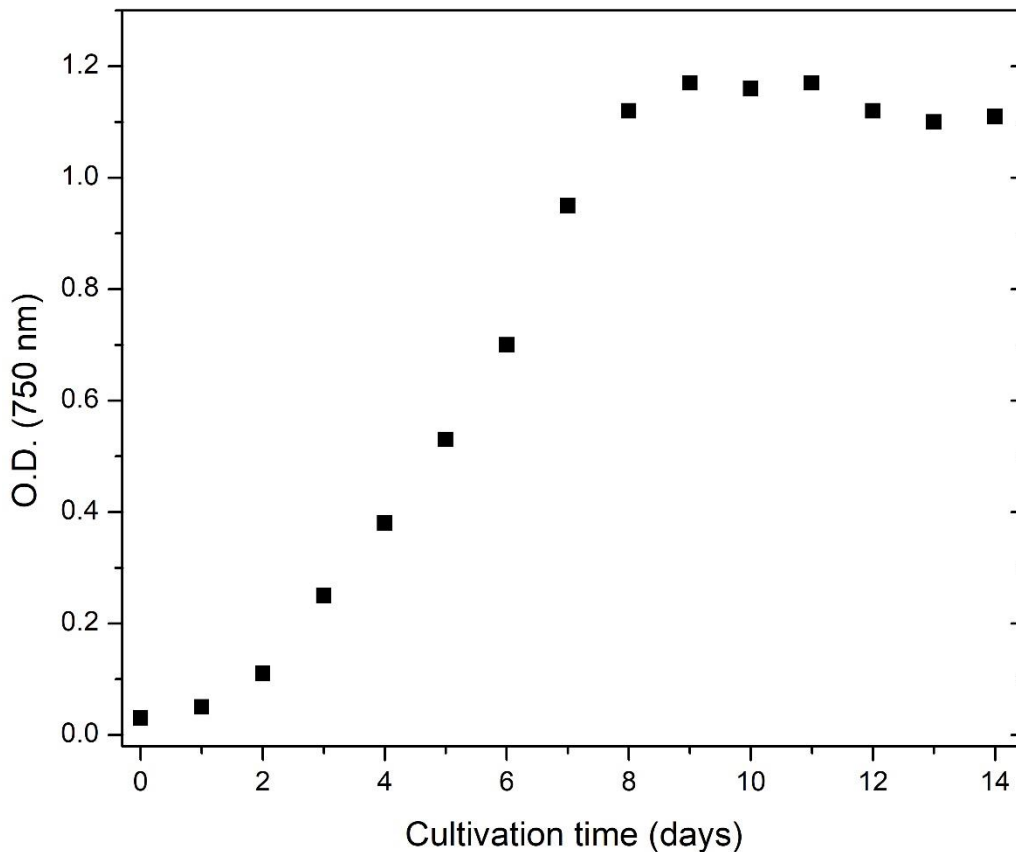
Οι καλλιέργειες των διατόμων αναπτύσσονται σε γυάλινα δοχεία και ο όγκος τους μπορεί να μεταβληθεί ανάλογα με τις ανάγκες της εκάστοτε πειραματικής διαδικασίας. Οι καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα της παρούσας διατριβής είχαν όγκο 30-500 ml. Η καλλιέργεια των διατόμων πραγματοποιείται με μεταφορά σε δοχείο που περιέχει αποστειρωμένο βιομέσο μιας ποσότητας από μια υπάρχουσα ενεργή καλλιέργεια με σκοπό τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ο όγκος της ενεργής καλλιέργειας αποτελεί συνήθως το 10% του τελικού όγκου της νέας καλλιέργειας. Ως πηγή φωτός σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν λάμπες LED (Light Emitting Diode) οι οποίες λειτουργούσαν για 12 ώρες την ημέρα προσφέροντας στις καλλιέργειες κύκλους 12ωρών φωτισμού και 12 ωρών σκοταδιού. Το φάσμα εκπομπής από τις λάμπες που χρησιμοποιήθηκαν (λευκό και κόκκινο φως) παρουσιάζεται στην εικόνα 13.



Εικόνα 13 : Φάσμα εκπομπής των πηγών φωτισμού LED (A) λευκού φωτός (B) κόκκινου φωτός.

Η ένταση του φωτός στην καλλιέργεια για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν είχε τιμές 15, 150 και 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Η μέτρηση της έντασης έγινε με χρήση του LightMeter LX-1118, οι τιμές που αναφέρονται μετρήθηκαν στην απόσταση από την πηγή φωτός που τοποθετήθηκαν οι καλλιέργειες. Η θερμοκρασία ανάπτυξης των διατόμων σε όλες τις περιπτώσεις ήταν 20°C.

Ο έλεγχος του ρυθμού ανάπτυξης των οργανισμών έγινε με παρακολούθηση της οπτικής πυκνότητας (Optical Density, O.D.) στα 750nm, η οποία αποτελεί δείκτη του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και αυξάνεται ανάλογα με το πλήθος των διατόμων που υπάρχει στο δείγμα (2). Μια χαρακτηριστική καμπύλη ανάπτυξης του διατόμου *T.Pseudonana* παρουσιάζεται στην εικόνα 14.

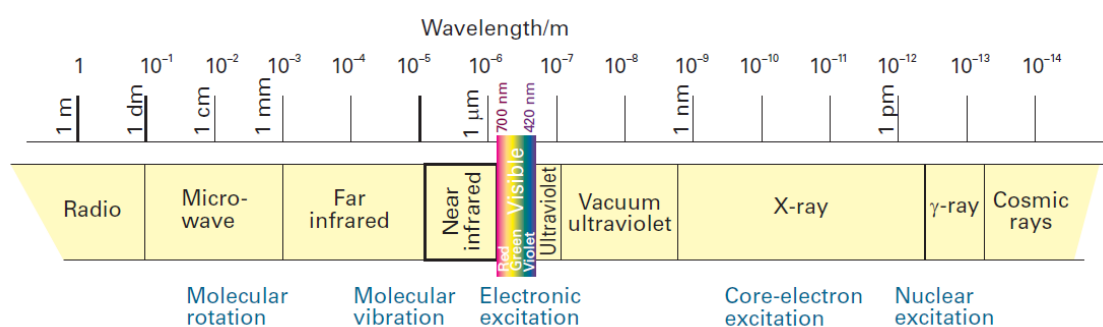


Εικόνα 14 : Καμπύλη ανάπτυξης διατόμου *T.Pseudonana*.

Αρχικά η καλλιέργεια βρίσκεται σε ένα στάδιο προσαρμογής που συνήθως διαρκεί 1-2 ημέρες, όπου δεν παρατηρείται αύξηση στον πληθυσμό των διατόμων, ακολούθως παρατηρείται εκθετική αύξηση των κυττάρων που διαρκεί 7-10 ημέρες και καταλήγει στη φάση στασιμότητας όπου δεν υπάρχει πλέον περαιτέρω αύξηση του πληθυσμού κυρίως λόγω εξάντλησης των απαραίτητων συστατικών από το βιομέσο. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα πειράματα πραγματοποιούνται με κύτταρα που βρίσκονται στην εκθετική φάση έτσι ώστε να υπάρχει η αναγκαία συγκέντρωση στα δείγματα που απαιτείται για τις τεχνικές φασματοσκοπίας αλλά και να περιοριστεί η παρουσία νεκρών κυττάρων των οποίων ο αριθμός αυξάνεται σημαντικά μετά το τέλος της εκθετικής φάσης.

2.2 Αλληλεπίδραση ύλης με ακτινοβολία

Με τον όρο φασματοσκοπία αναφερόμαστε στη χρήση ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων τα οποία μπορεί να έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά (μήκος κύματος, ένταση κ.α.) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να μεταφέρουν πληροφορίες για τη σύσταση, τις φυσικές και τις χημικές ιδιότητες ενός δείγματος. Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα συνήθως κατηγοριοποιείται με βάση το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, όπως φαίνεται στο πιο κάτω σχήμα.



Εικόνα 15 : Οι περιοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (3).

Το ορατό μέρος του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, με το οποίο είμαστε εξοικειωμένοι από την καθημερινότητα μας, αποτελεί μόνο ένα πολύ μικρό μέρος του συνολικού εύρους μηκών κύματος. Όπως είναι γνωστό, η ενέργεια κάθε φωτονίου συγκεκριμένου μήκους κύματος δίνεται από τη σχέση :

$$E = \frac{hc}{\lambda} = h\nu \quad (1)$$

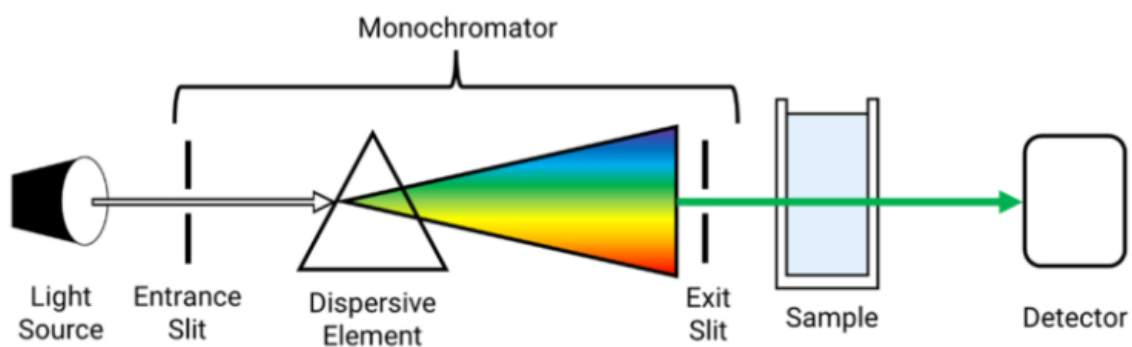
Όπου E είναι η ενέργεια του φωτονίου, c η ταχύτητα του φωτός, λ το μήκος κύματος, ν η συχνότητα και h η σταθερά του Planck ($h = 6.62607015 \times 10^{-34}$ Js), επομένως, όσο αυξάνεται το μήκος κύματος (και μειώνεται η συχνότητα) της ακτινοβολίας έχουμε μείωση της ενέργειας η οποία μεταφέρεται από κάθε φωτόνιο όταν η συγκεκριμένη ακτινοβολία προσπίπτει σε ένα σώμα.

Κάθε μέρος του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος μπορεί να προκαλέσει διαφορετικές ενεργειακές μεταβολές στις καταστάσεις των διαφόρων μορίων και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διαφορετικές τεχνικές φασματοσκοπίας. Ειδικότερα, η ακτινοβολία που βρίσκεται στην περιοχή του υπεριώδους και του ορατού μέρους του ηλεκτρομαγνητικού

φάσματος μπορεί να διεγείρει τα ηλεκτρόνια σθένους προκαλώντας ηλεκτρονικές μεταβάσεις οι οποίες οδηγούν σε μεταβολή της ηλεκτρονικής δομής και της διπολικής ροπής του μορίου. Αντίστοιχα, με φωτόνια από την περιοχή του υπέρυθρου μπορούν να παρατηρηθούν φαινόμενα σχετικά με τις δονήσεις των μορίων.

2.3 Φασματοσκοπία απορρόφησης

Η φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού υπεριώδους (uv/visible) χρησιμοποιεί συνήθως ακτινοβολία μήκους κύματος 190-800nm. Η περιοχή αυτή διαχωρίζεται σε ένα κομμάτι του υπεριώδους μέρους του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, μεταξύ 190-400nm και στο ορατό μέρος, δηλαδή μεταξύ 400-800nm. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην καταγραφή της απορρόφησης μέρους της ακτινοβολίας που προσπίπτει στο δείγμα, όταν η ενέργεια της ταυτίζεται με την ενέργεια που απαιτείται έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί μια κβαντισμένη ενεργειακή μεταβολή στο δείγμα. Η ενέργεια κάθε φωτονίου η οποία πρέπει να ισούται με την ενεργειακή διαφορά δύο ενεργειακών καταστάσεων του δείγματος έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η απορρόφηση. Στην περίπτωση του ορατού-υπεριώδους, οι ενέργειες αυτές αντιστοιχούν σε ηλεκτρονιακές, δονητικές και περιστροφικές μεταβολές. Λόγω όμως της πολύ μικρής ενεργειακής διαφοράς μεταξύ των δονητικών και περιστροφικών καταστάσεων, το αποτέλεσμα που λαμβάνουμε μπορεί να αποδοθεί σε συγκεκριμένες ηλεκτρονιακές μεταβολές χωρίς όμως να μπορούν να διαχωριστούν οι διάφορες δονητικές και περιστροφικές, οι οποίες συμβάλλουν στο εύρος της εμφανιζόμενης κορυφής απορρόφησης. Στο πιο κάτω σχήμα φαίνεται μια αναπαράσταση της τυπικής πειραματικής διάταξης για αυτή την τεχνική.



Εικόνα 16 : Σχηματική αναπαράσταση της φασματοσκοπίας ορατού – υπεριώδους

Η ακτινοβολία ξεκινάει από μια φωτεινή πηγή και διαχωρίζεται στα διάφορα μήκη κύματος μέσω του μονοχρωμάτορα. Στη συνέχεια προσπίπτει στο δείγμα με ένταση I_0 , ένα μέρος της απορροφάται και στη συνέχεια εξέρχεται με ένταση I_t με κατεύθυνση προς τον ανιχνευτή όπου καταγράφεται και εμφανίζεται στον ψηφιακό μετρητή. Η ανάλυση των μετρήσεων γίνεται με τη χρήση του νόμου των Beer-Lambert (3) :

$$I_t = I_0 e^{-\alpha C l} \quad (2)$$

Όπου C η συγκέντρωση του διαλύματος, l η απόσταση που διασχίζει η ακτινοβολία στο εσωτερικό του δείγματος και α ο συντελεστής απορρόφησης, ο οποίος εξαρτάται από το μόριο ή ιόν που απορροφά σε ορισμένο διαλύτη και από τη συχνότητα της ακτινοβολίας.

Η σχέση (2) μπορεί να πάρει την εξής λογαριθμική μορφή:

$$\text{Log } I/I_0 = -\varepsilon C l \quad (3)$$

Όπου το ε είναι ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης και συνδέεται με το συντελεστή απορρόφησης α με τη σχέση:

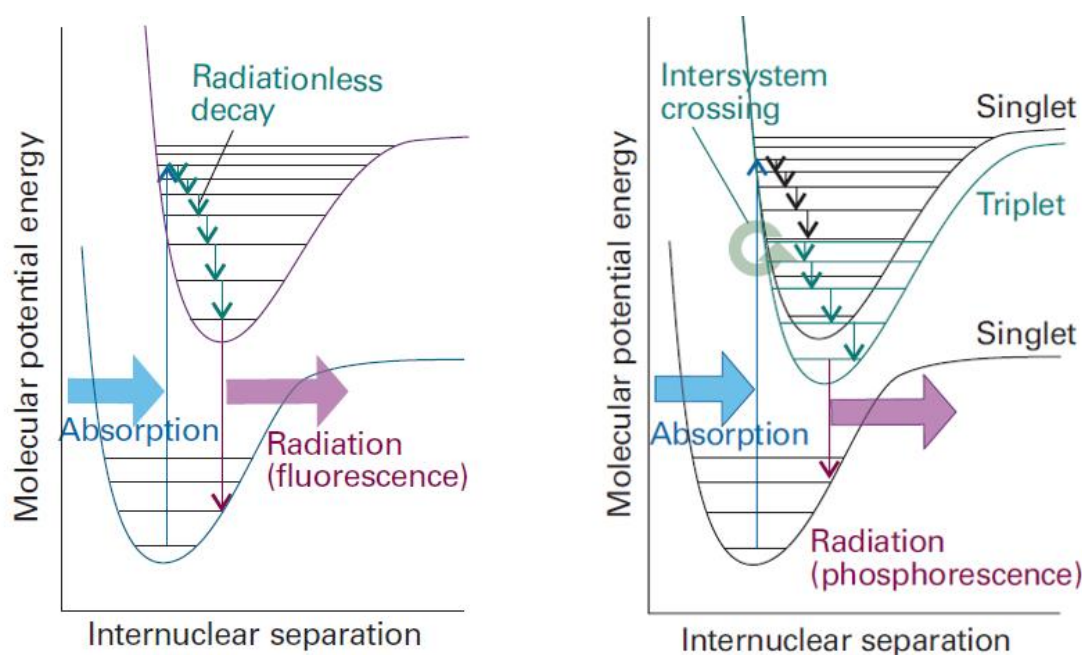
$$\varepsilon = \alpha/2,303 \quad (4)$$

Το γινόμενο $\varepsilon C l$ ονομάζεται απορρόφηση (A) και ο λόγος I_t/I_0 ονομάζεται διαπερατότητα (T). Επομένως προκύπτει η σχέση :

$$A = -\log T \quad (5)$$

2.4 Φασματοσκοπία φθορισμού

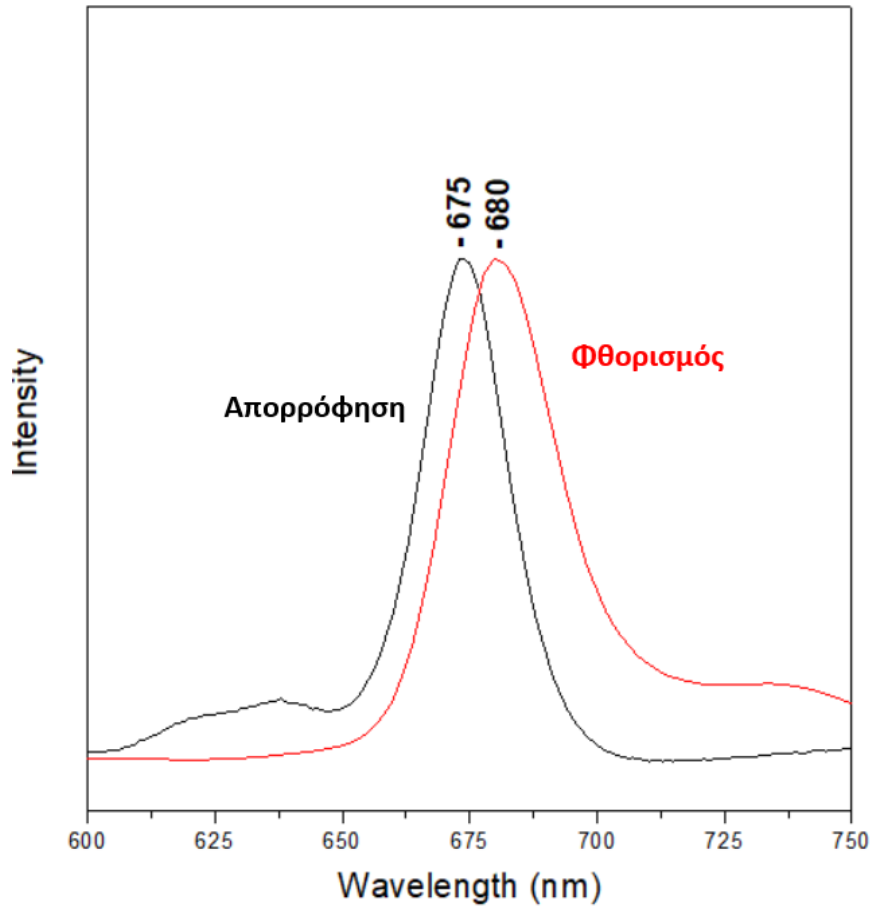
Μετά από την απορρόφηση ακτινοβολίας από ένα μόριο, αυτό οδηγείται σε μια διεγερμένη ηλεκτρονιακή και δονητική κατάσταση. Ακολούθως το μόριο αποβάλλει ενέργεια χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας και οδηγείται στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της διεγερμένης ηλεκτρονιακής κατάστασης στην οποία βρίσκεται. Από εκείνο το σημείο το μόριο μπορεί να αποδιεγερθεί στη θεμελιώδη ηλεκτρονιακή του κατάσταση με την εκπομπή ακτινοβολίας. Το πιο πάνω φαινόμενο λέγεται φθορισμός. Ένα άλλο φαινόμενο παρόμοιας προέλευσης είναι ο φωσφορισμός όπου η εκπομπή ακτινοβολίας προέρχεται από το μόριο αφού πρώτα μεταφερθεί από μια μονή διεγερμένη κατάσταση σε κάποια τριπλή κατάσταση μέσω εσωτερικής μεταπήδησης (intersystem crossing) (3). Οι δύο αυτοί μηχανισμοί αποτυπώνονται στα πιο κάτω διαγράμματα.



Εικόνα 17 : Σχηματική αναπαράσταση των φαινομένων του φθορισμού και του φωσφορισμού(3).

Όσα αναφέρθηκαν πιο πάνω μπορούν να εξηγήσουν την αιτία που ένα φάσμα εκπομπής φθορισμού εμφανίζει μετατόπιση σε μεγαλύτερη μήκη κύματος (μικρότερη ενέργεια) με το αντίστοιχο φάσμα απορρόφησης ενός μορίου. Αυτό αποτυπώνεται στην πιο κάτω εικόνα

όπου εμφανίζονται τα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού από τη χλωροφύλλη α που προέρχεται από κύτταρα του διατόμου *P. Tricornutum*.



Εικόνα 18 : Φάσματα απορρόφησης και φθορισμού με διέγερση στα 440 nm από τη χλωροφύλλη α.

Η μελέτη της χλωροφύλλης και γενικά του φαινομένου της φωτοσύνθεσης με τη χρήση της φασματοσκοπίας φθορισμού είναι ιδιαίτερα συνηθισμένη πρακτική, τόσο στα φυτά όσο και σε άλλες κατηγορίες φωτοσυνθετικών οργανισμών όπως είναι τα άλγη(4,5,6).

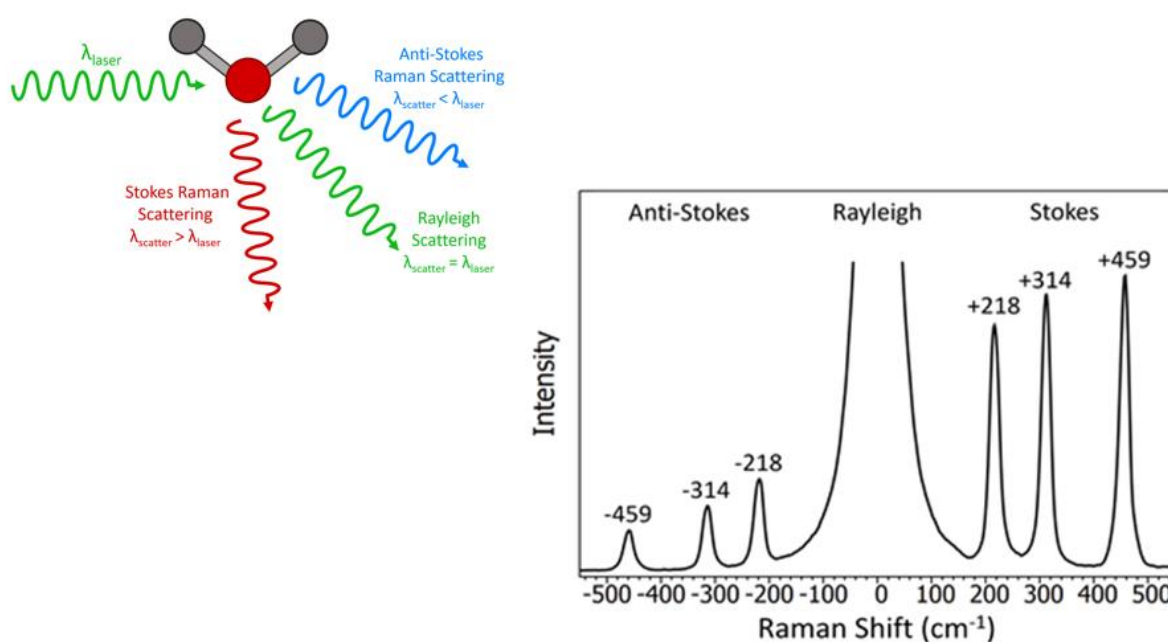
Για τη λήψη ενός φάσματος φθορισμού ως πηγές διέγερσης χρησιμοποιούνται συνήθως λάμπες δευτερίου για το υπεριώδες μέρος του φάσματος και λυχνίες ξένου για το ορατό. Ως ανιχνευτές χρησιμοποιούνται φωτοπολλαπλασιαστικοί σωλήνες (Photomultiplier tubes detectors) για την ενίσχυση και συλλογή του σήματος το οποίο στη συνέχεια μπορεί να υποστεί επεξεργασία μέσω του κατάλληλου λογισμικού. Τα αποτελέσματα συνήθως παρουσιάζονται είτε στη μορφή φασμάτων εκπομπής φθορισμού, όπως αυτό που φαίνεται στην εικόνα 18, είτε ως φάσματα φθορισμού διέγερσης όπου γίνεται παρακολούθηση της

έντασης της εκπομπής φθορισμού σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος όταν το δείγμα διεγείρεται με ένα εύρος μηκών κύματος μεγαλύτερης ενέργειας(7).

2.5 Φασματοσκοπία Raman

2.5.1 Το φαινόμενο Raman

Η φασματοσκοπία Raman πήρε το όνομα της από τον Ινδό φυσικό C.V. Raman ο οποίος παρατήρησε το φαινόμενο για πρώτη φορά το 1928. Με τη μέθοδο αυτή γίνεται μελέτη της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από ένα στερεό, υγρό ή αέριο δείγμα. Όπως είναι γνωστό, όταν ένα φωτόνιο αλληλοεπιδρά με ένα μόριο αλλά η ενέργεια του δεν είναι ικανή να προκαλέσει ηλεκτρονιακή μετάβαση τότε μπορεί να σκεδαστεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους : (α) ελαστικά, δηλαδή διατηρώντας την αρχική του ενέργεια, (β) ανελαστικά με μείωση της ενέργειας του και (γ) ανελαστικά με αύξηση της ενέργειας του. Στην πρώτη περίπτωση το αποτέλεσμα είναι η σκεδαζόμενη ακτινοβολία να έχει ίδια συχνότητα με την προσπίπτουσα και ονομάζεται σκέδαση Rayleigh, ενώ στις άλλες περιπτώσεις πραγματοποιείται σκέδαση Raman Stokes και Anti-Stokes αντίστοιχα(3).



Εικόνα 19 : Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου Raman.

Η διαφορά μεταξύ της συχνότητας της προσπίπτουσας και της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας ονομάζεται μετατόπιση Raman (Raman shift) και το σύνολο των διαφορετικών συχνοτήτων σκεδαζόμενης ακτινοβολίας αποτελούν το φάσμα Raman.

Η μετατόπιση Raman συνήθως εκφράζεται σε κυματαριθμούς $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) αλλά ταυτόχρονα αναφέρεται ως συχνότητα λόγω της αναλογίας των δύο μεγεθών που συνδέονται από τη σχέση :

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda} \quad (6)$$

Όπου ν είναι η συχνότητα, c η ταχύτητα του φωτός και λ το μήκος κύματος. Αντίστοιχα η μετατόπιση Raman εξαρτάται από το μήκος κύματος της προσπίπτουσας (λ_0) και της σκεδαζόμενης (λ_i) ακτινοβολίας ως εξής :

$$Raman\ shift(\text{cm}^{-1}) = \frac{10^7}{\lambda_0(\text{nm})} - \frac{10^7}{\lambda_i(\text{nm})} \quad (7)$$

2.5.2 Κλασική περιγραφή

Η κλασική περιγραφή του φαινομένου (3,9,10) δε μπορεί να εξηγήσει πλήρως όλες τις παρατηρήσεις που μπορούν να γίνουν πειραματικά, προσφέρει όμως μια αρκετά καλή προσέγγιση χρησιμοποιώντας τις βασικές αρχές του ηλεκτρομαγνητισμού.

Όταν ένα δείγμα βρίσκεται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου E , αναπτύσσεται σε αυτό μια επαγόμενη πόλωση (P) η οποία είναι ανάλογη του εφαρμοζόμενου πεδίου.

$$P = \alpha E \quad (8)$$

Όπου α είναι η πολωσιμότητα, ένα μέγεθος που δείχνει πόσο εύκολα παραμορφώνονται τα μοριακά τροχιακά στην παρουσία ενός ηλεκτρικού πεδίου.

Αξίζει να σημειωθεί πως η σχέση 8 είναι η γραμμική προσέγγιση του φαινομένου. Στην πραγματικότητα η πολωσιμότητα είναι ένας τανυστής μιας και η ιδιότητα αυτή αλλάζει ανάλογα με τη διεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου ως προς τη γεωμετρία του υλικού.

Έστω ότι η ακτινοβολία διέγερσης περιγράφεται από τη σχέση :

$$E(t) = E_0 \sin(\omega_i t) \quad (9)$$

Συνδυάζοντας τις σχέσεις (8) και (9) προκύπτει η σχέση :

$$P(t) = \alpha E_0 \sin(\omega_i t) \quad (10)$$

Η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη σκέδαση της ακτινοβολίας με συχνότητα ίση με εκείνη του προσπίπτοντος κύματος (ω_i). Η σκέδαση αυτή ονομάζεται σκέδαση Rayleigh (ελαστική σκέδαση). Στην πιο πάνω ανάλυση δεν έχουμε λάβει υπόψιν το ενδεχόμενο το σύστημα να έχει κάποιο κανονικό τρόπο δόνησης ο οποίος θα μεταβάλει την πολωσιμότητα του ως εξής:

$$\alpha(Q_1) = \alpha_0 + \left(\frac{\theta\alpha}{\theta Q_1}\right)_0 Q_1 + \dots \quad (11)$$

Όπου Q_1 είναι μια δονητική συντεταγμένη που περιγράφει τη συγκεκριμένη δόνηση και α_0 η πολωσιμότητα στη θέση ισορροπίας. Η σχέση 11 είναι ένα ανάπτυγμα Taylor και οι όροι υψηλότερης τάξης μπορούν να θεωρηθούν αμελητέοι. Η μερική παράγωγος της πολωσιμότητας προς τη συντεταγμένη Q_1 δίνει τη μεταβολή της πολωσιμότητας σε σχέση με αυτή τη μεταβλητή. Αν θεωρήσουμε πως το μόριο δονείται με συχνότητα ω_1 τότε μπορούμε να γράψουμε :

$$Q_1 = Q_{10} \cos(\omega_1 t) \quad (12)$$

Έτσι από τις εξισώσεις (10), (11) και (12) προκύπτει :

$$P(t) = \left[a_0 + \left(\frac{\theta\alpha}{\theta Q_1}\right)_0 Q_1 \cos(\omega_1 t) \right] E_0 \cos(2\omega_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\theta\alpha}{\theta Q_i}\right)_0 E_0 Q_{10} \cos[(\omega_0 - \omega_1) t] + \frac{1}{2} \left(\frac{\theta\alpha}{\theta Q_i}\right)_0 E_0 Q_{10} \cos[(\omega_0 + \omega_1) t] \quad (13)$$

Η πιο πάνω σχέση αποτελείται από τρία μέρη. Το πρώτο μέρος αντιστοιχεί σε ένα μόριο το οποίο σκεδάζει την προσπίπτουσα ακτινοβολία με την ίδια συχνότητα (ελαστική σκέδαση, Rayleigh). Το δεύτερο μέρος αντιστοιχεί στη μη ελαστική σκέδαση Raman – Stokes όπου η σκεδαζόμενη ακτινοβολία έχει μικρότερη συχνότητα από την προσπίπτουσα ενώ το τρίτο μέρος τη μη ελαστική σκέδαση Raman – Antistokes όπου η σκεδαζόμενη ακτινοβολία έχει μεγαλύτερη συχνότητα από την προσπίπτουσα.

Το σημαντικότερο συμπέρασμα που προκύπτει από τη σχέση 13 είναι πως λόγω του παράγοντα $\frac{\theta\alpha}{\theta Q_1}$ που υπάρχει στο δεύτερο και τρίτο μέρος της σχέσης, αν η πολωσιμότητα δε μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της δόνησης τότε η πιο πάνω μερική παράγωγος μηδενίζεται και κατά συνέπεια δεν υπάρχει σκέδαση Raman από το δείγμα. Επομένως, για να είναι ενεργή μια δόνηση για τη φασματοσκοπία Raman, θα πρέπει η πολωσιμότητα του μορίου να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της δόνησης.

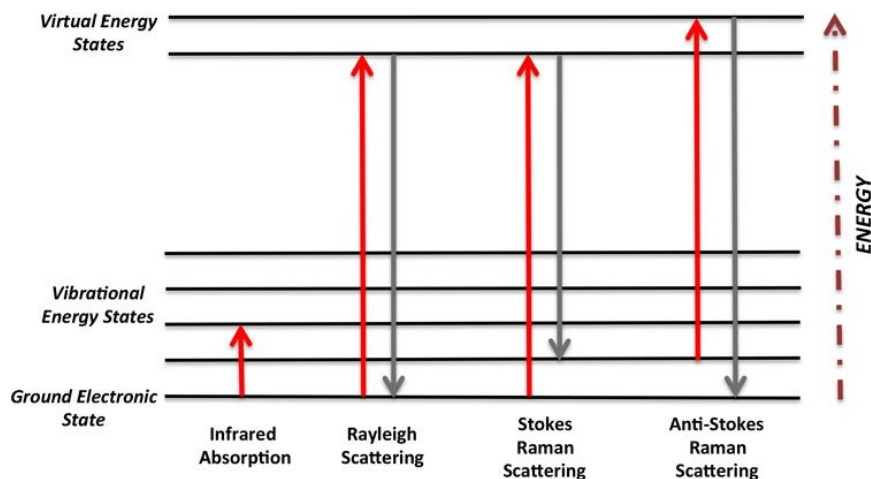
Ένα σημαντικό ερώτημα που δεν μπορεί να απαντηθεί με την πιο πάνω περιγραφή είναι γιατί η ένταση των κορυφών είναι μεγαλύτερη όταν προέρχονται από σκέδαση Raman Stokes σε σχέση με τις αντίστοιχες Anti-Stokes. Για να απαντηθεί αυτό το ερώτημα χρειάζεται η κβαντική προσέγγιση η οποία θα αναφερθεί περιληπτικά στην επόμενη ενότητα.

2.5.3 Κβαντική περιγραφή

Σε αυτή την ενότητα θα γίνει μια αναφορά στις βασικές αρχές της κβαντικής περιγραφής του φαινομένου Raman (3,9,10). Σύμφωνα με την κβαντική μηχανική, τα μόρια διαθέτουν κάποιες ενεργειακές καταστάσεις (δονητικές, περιστροφικές, ηλεκτρονιακές) οι οποίες βρίσκονται σε καθορισμένα ενεργειακά επίπεδα. Για να απορροφηθεί η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που προσπίπτει σε ένα μόριο θα πρέπει να ικανοποιείται η σχέση :

$$\Delta E = h\nu \quad (14)$$

Όπου ΔE είναι η διαφορά μεταξύ δύο ενεργειακών επιπέδων, h η σταθερά του Planck και ν η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Το γινόμενο $h\nu$ είναι η ενέργεια που διαθέτει το κάθε φωτόνιο που αποτελεί την προσπίπτουσα ακτινοβολία και σε περίπτωση που δεν ικανοποιεί την πιο πάνω συνθήκη δεν απορροφάται από το μόριο και σκεδάζεται.



Εικόνα 20 : Σχηματική αναπαράσταση της μεταβολής στην ενεργειακή κατάσταση των μορίων κατά τη διάρκεια της φασματοσκοπίας Raman.(10)

Όπως φαίνεται στο πιο πάνω σχήμα, όταν σε ένα μόριο προσπίπτει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία η οποία δεν αντιστοιχεί σε κάποια μετάβαση τότε θεωρούμε πως διεγείρεται σε μια βραχύβια «εικονική» ενεργειακή κατάσταση η οποία είναι ίση με την ενέργεια διέγερσης και στη συνέχεια αποδιεγείρεται. Στην περίπτωση της ελαστικής σκέδασης (Rayleigh) το μόριο ξεκινάει και καταλήγει στη θεμελιώδη του κατάσταση. Αντίθετα, όταν κατά την αποδιέγερση το μόριο καταλήξει σε μια διεγερμένη δονητική κατάσταση έχουμε τη σκέδαση Raman – Stokes ενώ όταν το μόριο προέρχεται από μια διεγερμένη κατάσταση και καταλήξει στη θεμελιώδη έχουμε τη σκέδαση Raman – Antistokes. Στην πρώτη περίπτωση η σκεδαζόμενη ακτινοβολία έχει μικρότερη ενέργεια από την ακτινοβολία διέγερσης ενώ στη δεύτερη περίπτωση μεγαλύτερη. Αυτές οι διαφορές μπορούν να ανιχνευθούν και να δώσουν πληροφορίες για το εξεταζόμενο δείγμα.

Η σκέδαση Raman είναι μια ασθενής διεργασία μιας και μόλις ένα ανά 10^6 - 10^8 φωτόνια σκεδάζεται με αυτό τον τρόπο, αυτός είναι και ο λόγος που απαιτείται η χρήση laser για τη διέγερση των δειγμάτων. Σε θερμοκρασία δωματίου, σχεδόν όλα τα μόρια βρίσκονται στη θεμελιώδη τους κατάσταση και ο πληθυσμός των κατειλημμένων δονητικών καταστάσεων είναι πολύ μικρός. Έτσι η σκέδαση Anti-Stokes είναι ασθενέστερη από τη σκέδαση Stokes σε αυτές τις συνθήκες.

2.5.4 Φασματοσκοπία συντονισμού Raman

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η σκέδαση Raman είναι μια ασθενής διεργασία και έτσι πολλές φορές η ένταση του σήματος που οφείλεται σε ορισμένες δονήσεις δεν είναι αρκετή για να επιτρέψει την παρατήρηση του. Σε αυτό συμβάλουν και φαινόμενα όπως ο φθορισμός.

Παρόλα αυτά έχει παρατηρηθεί πως εάν το μήκος κύματος που εκπέμπει το laser ταυτίζεται ή είναι αρκετά κοντά στην ενέργεια που απαιτεί κάποιο μόριο για να πραγματοποιηθεί κάποια ηλεκτρονιακή μετάβαση σε αυτό, τότε η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας Raman ενισχύεται από 10 έως 100000 φορές. Η ενίσχυση αυτή είναι πιο έντονη σε χρωμοφόρα μόρια λόγω της μεγαλύτερης απορρόφησης της ακτινοβολίας από αυτά. Το φαινόμενο οφείλεται κυρίως στη ραγδαία αύξηση της πολωσιμότητας κατά τη διάρκεια της απορρόφησης της ακτινοβολίας(9).

2.5.5 Δονήσεις μορίων

Στην απλούστερη περίπτωση διατομικών μορίων με τη χρήση της προσέγγισης του αρμονικού ταλαντωτή η χαρακτηριστική συχνότητα ταλάντωσης ενός δεσμού (ν_0) δίνεται από τη σχέση :

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (15)$$

Όπου k η σταθερά δύναμης του δεσμού και μ είναι η ανηγμένη μάζα των δύο ατόμων A και B που συμμετέχουν στο δεσμό και υπολογίζεται από τη σχέση :

$$\mu = \frac{m_A m_B}{m_A + m_B} \quad (16)$$

Στην προσέγγιση του αρμονικού ταλαντωτή (3) γίνεται η απλούστευση πως η καμπύλη δυναμικής ενέργειας του μορίου παρουσιάζει αρμονικότητα, δηλαδή πως έχει σχήμα παραβολής. Η σταθερά k αναπαριστά την καμπυλότητα που εμφανίζει η παραβολή, όσο ισχυρότερος είναι ο δεσμός, τόσο μεγαλύτερη τιμή έχει η σταθερά και τόσο πιο απότομη είναι η καμπύλη δυναμικής ενέργειας του μορίου.

Έτσι, η δυναμική ενέργεια (V) μπορεί να γραφεί ως :

$$V(x) = \frac{1}{2}kx^2 \quad (17)$$

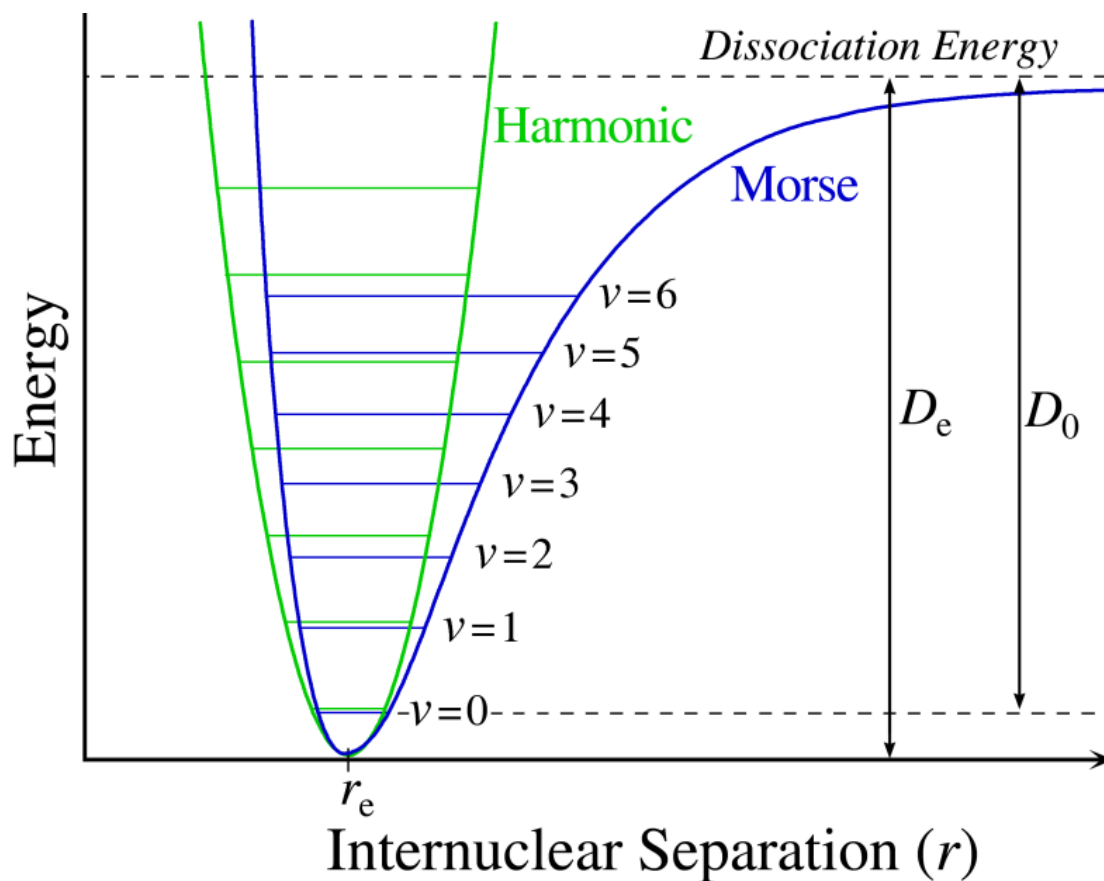
Όπου x είναι η αύξηση της απόστασης μεταξύ των δύο πυρήνων ως προς τη θέση ισορροπίας. Η εξίσωση Schrodinger για αυτή την περίπτωση είναι :

$$-\frac{\hbar}{2\mu} \frac{d^2\psi}{dx^2} + \frac{1}{2}kx^2\psi = E\psi \quad (18)$$

Από τη λύση της εξίσωσης προκύπτουν οι ενέργειες των δονητικών επιπέδων ενός διατομικού μορίου :

$$E_n = \left(n + \frac{1}{2}\right) h\nu_0 \quad n=0,1,2,\dots \quad (19)$$

Το πιο πάνω αποτέλεσμα αποτελεί μόνο μια προσέγγιση στο απλούστερο διατομικό μόριο. Για μεγαλύτερης ακρίβειας υπολογισμούς πρέπει να ληφθεί υπόψιν και ο παράγοντας αναρμονικότητας που εμφανίζει η καμπύλη δυναμικής ενέργειας του μορίου, όπως φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί.



Εικόνα 21 : Αναπαράσταση καμπύλης δυναμικής ενέργειας διατομικού μορίου στην περίπτωση του αρμονικού και αναρμονικού ταλαντωτή. (3)

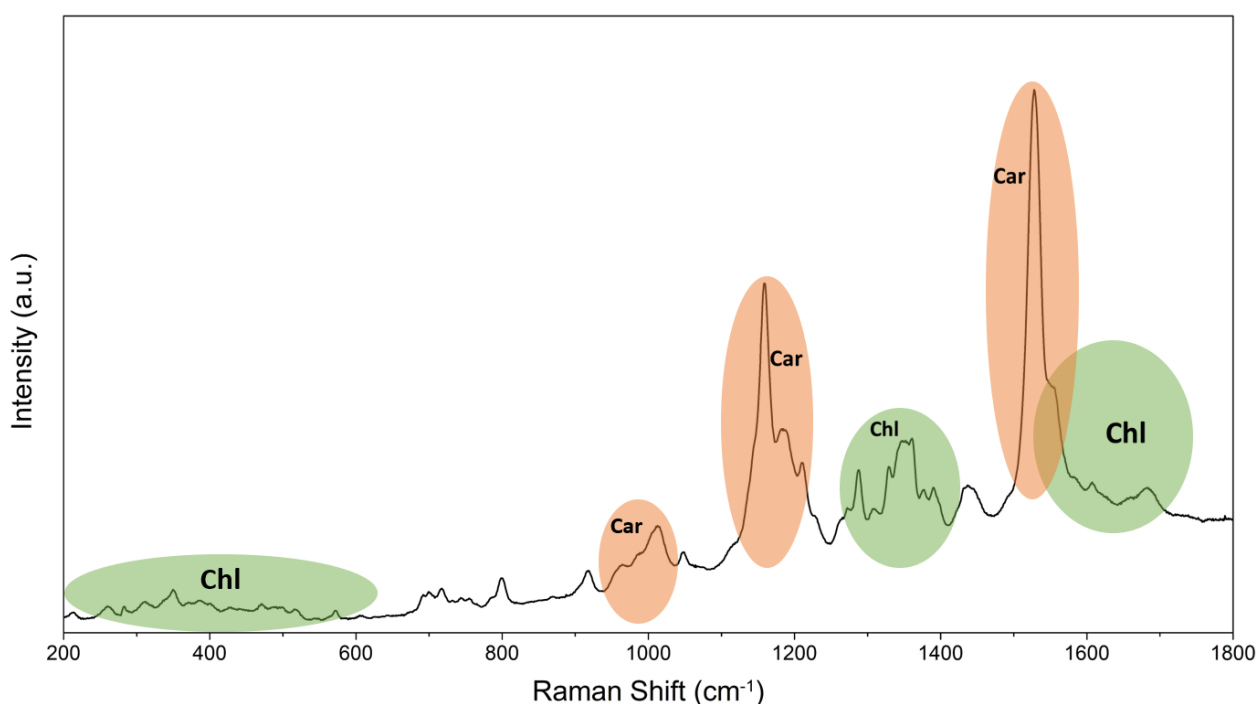
Η καμπύλη που εμφανίζεται με μπλε χρώμα ονομάζεται καμπύλη δυναμικής ενέργειας Morse και συμπεριλαμβάνει τον παράγοντα της αναρμονικότητας ο οποίος φαίνεται πως γίνεται ιδιαίτερα σημαντικός στα υψηλότερα ενεργειακά επίπεδα όπου χάνεται η αρμονική συμμετρία της καμπύλης(8). Οι λύσεις των αντίστοιχων εξισώσεων σε αυτή την περίπτωση δίνουν τις εξής τιμές για την ενέργεια των επιπέδων:

$$E_n = h\nu_0 \left[\left(n + \frac{1}{2} \right) - X_e \left(n + \frac{1}{2} \right)^2 \right] \quad (20)$$

Όπου X_e είναι ο συντελεστής αναρμονικότητας ο οποίος εξαρτάται από το «βάθος» του πηγαδιού δυναμικού και τη συχνότητα της ταλάντωσης του μορίου(3).

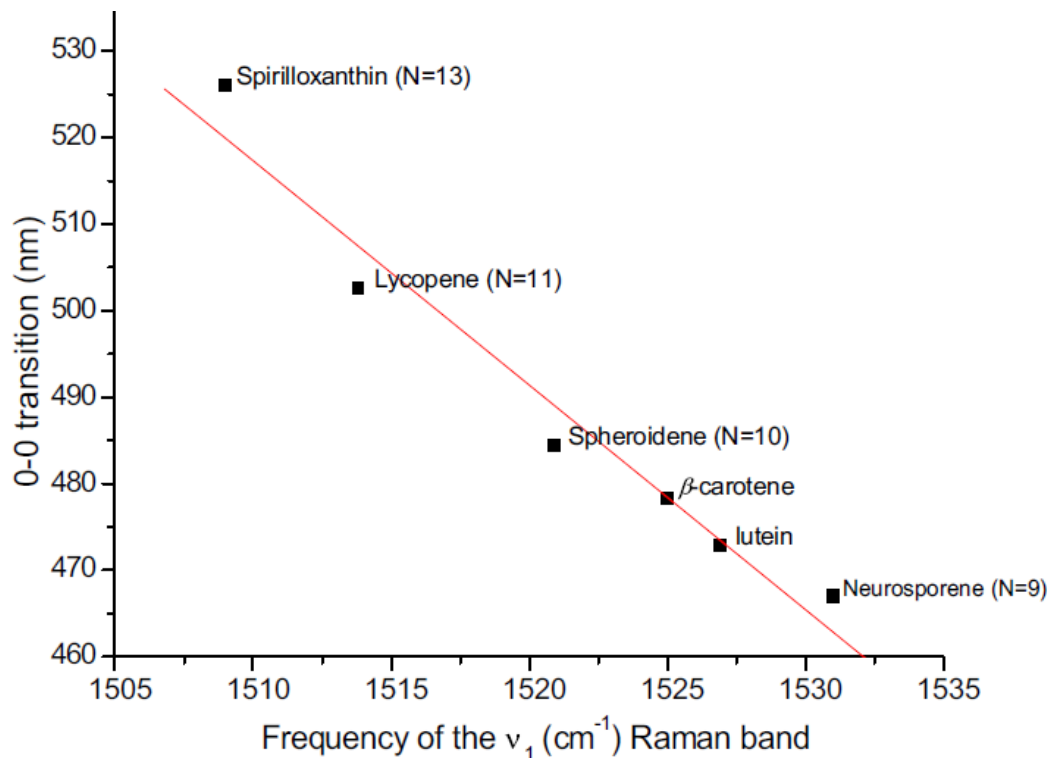
2.5.6 Φάσματα χρωμοφόρων μορίων

Λόγω του φαινομένου του συντονισμού που αναφέρθηκε προηγουμένως, τα χρωμοφόρα μόρια είναι ιδανικά για μελέτη με τη φασματοσκοπία Raman. Τα καροτενοειδή και οι χλωροφύλλες είναι δύο κατηγορίες χρωμοφόρων μορίων τα οποία έχουν μελετηθεί εκτενώς με τη συγκεκριμένη τεχνική. Στην εικόνα 22 εμφανίζεται ένα χαρακτηριστικό φάσμα Raman των κυττάρων του διατόμου *P. Tricornutum* όπου φαίνεται η προέλευση των σημαντικότερων δονήσεων ανάμεσα σε καροτενοειδή (car) και χλωροφύλλες (chl).



Εικόνα 22 : Φάσμα Raman των κυττάρων του διατόμου *P. Tricornutum*.

Το φάσμα των καροτενοειδών χαρακτηρίζεται από τέσσερις ομάδες δονήσεων (ν_1 - ν_4) οι οποίες έχουν τη μεγαλύτερη ένταση. Η ν_1 εμφανίζεται περίπου στους 1520 cm^{-1} και αποδίδεται σε δονήσεις τάσεως των διπλών δεσμών C=C (12,13). Η θέση εμφάνισης της μπορεί να συσχετισθεί με το μήκος συζυγίας της αλυσίδας του πολυμερούς. Στην εικόνα 23 φαίνεται η συσχέτιση σε κάποια είδη καροτενοειδών του μήκους συζυγίας των πολυμερικών τους αλυσίδων και της θέσης εμφάνισης της δόνησης ν_1 στο φάσμα Raman.



Εικόνα 23 : Συσχέτιση μεταξύ του μήκους συζυγίας της πολυμερικής αλυσίδας των καροτενοειδών και της συχνότητας εμφάνισης της δόνησης ν_1 στο φάσμα Raman(11).

Παρόλα αυτά, η θέση εμφάνισης μπορεί να επηρεαστεί και από άλλους παράγοντες όπως η θερμοκρασία και το χημικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται το πολυμερές, επομένως δεν μπορεί να γίνει ταυτοποίηση και διαχωρισμός των διάφορων καροτενοειδών μόνο με αυτή την πληροφορία(11). Το πλάτος στο μέσο του ύψους(Full Width at Half Maximum) της κορυφής που αντιστοιχεί στη συγκεκριμένη δόνηση μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με το πλήθος των διαφορετικών καροτενοειδών που βρίσκονται σε ένα κύτταρο. Όταν το δείγμα αποτελείται από ένα μόνο είδος, το αναμενόμενο πλάτος είναι περίπου 12 cm^{-1} , όταν το πλάτος είναι μεγαλύτερο συνήθως οφείλεται στην αλληλοεπικάλυψη κορυφών προερχόμενες από δονήσεις περισσότερων καροτενοειδών.(12)

Η ν_2 εμφανίζεται περίπου στους 1160 cm^{-1} και οφείλεται στις δονήσεις τάσεως των απλών δεσμών C-C. Γύρω από την κύρια δόνηση εμφανίζονται δορυφορικές δονήσεις οι οποίες μπορούν να συσχετιστούν με τη διάταξη των καροτενοειδών. (11,13)

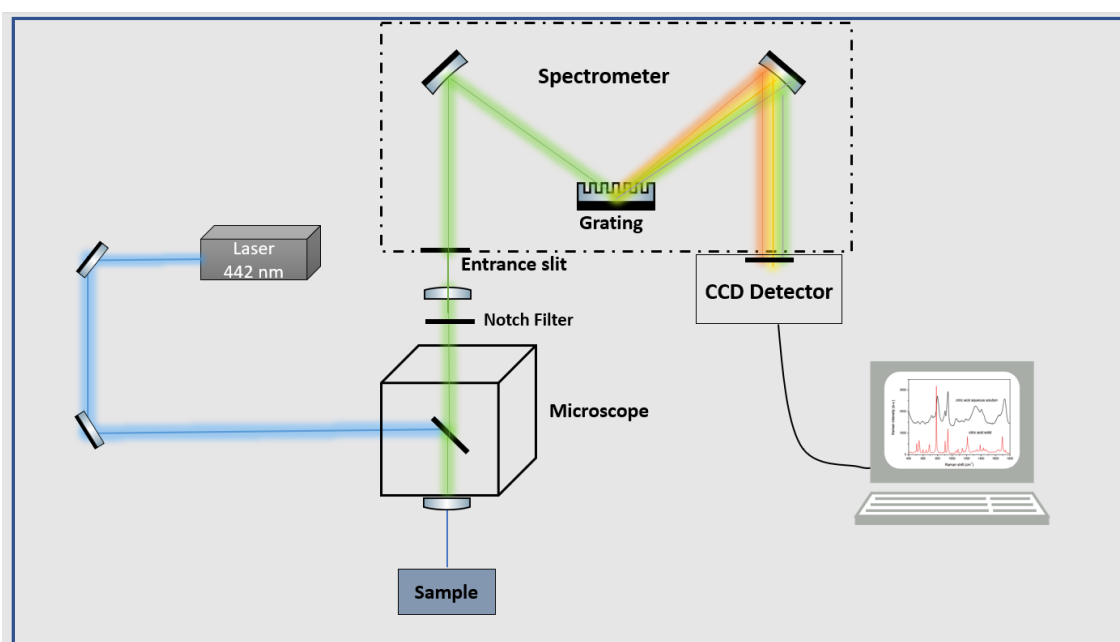
Η ν_3 οφείλεται στις δονήσεις αιώρησης εντός επιπέδου των μεθυλομάδων που βρίσκονται προσκολλημένες στην αλυσίδα του πολυμερούς σε συνδυασμό με τις δονήσεις κάμψης εντός

επιπέδου C-H και εμφανίζεται περίπου στους 1005cm^{-1} . Η περιοχή αυτή δίνει πληροφορίες για τη δομή και τον προσανατολισμό των άκρων της αλυσίδας του πολυμερούς.

Η ν_4 εμφανίζεται περίπου στους 960cm^{-1} και οφείλεται στις εκτός επιπέδου δονήσεις σείσης C-H σε συνδυασμό με τις δονήσεις στρέψης C=C. Όταν η «δομή» του καρβοτενοειδούς είναι επίπεδη, αυτές οι δονήσεις δεν είναι ορατές λόγω μη σύζευξης των τροχιακών με ηλεκτρονιακές μεταβάσεις. Αυτό έχει το αποτέλεσμα οι συγκεκριμένες δονήσεις να μην ενισχύονται από το φαινόμενο συντονισμού και έτσι να μην είναι ορατές στο φάσμα που λαμβάνεται. (12,13)

Σχετικά με τις δονήσεις που προέρχονται από τα μόρια χλωροφύλλης, οι σημαντικότερες μπορούν να χωριστούν σε 3 περιοχές. Η πρώτη βρίσκεται μεταξύ $200\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ και αφορά δονήσεις που έχουν άμεση συσχέτιση με το κεντρικό άτομο μαγνησίου της δομής τους. Η δεύτερη περιοχή είναι μεταξύ $900\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ όπου εμφανίζονται δονήσεις ευαίσθητες στη γεωμετρική διαμόρφωση των μορίων, όπως είναι οι δονήσεις C-N και τέλος η περιοχή $1600\text{-}1710\text{ cm}^{-1}$ όπου υπάρχουν οι δονήσεις τάσεως των συζευγμένων ομάδων βινυλίου και καρβονυλίου. Αυτές οι δονήσεις προσφέρουν πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό συναρμογής του κεντρικού ατόμου μαγνησίου καθώς και γενικότερα για τις αλληλοεπιδράσεις των μορίων με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται (12).

2.5.7 Πειραματική διάταξη

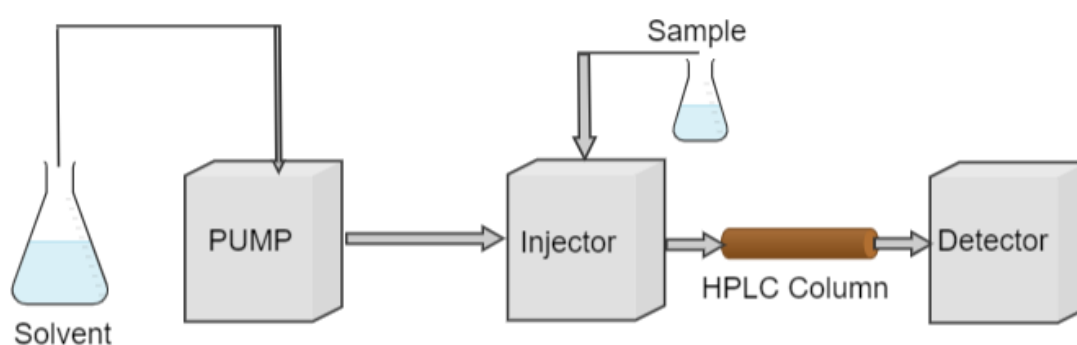


Εικόνα 24 : Τυπική πειραματική διάταξη της φασματοσκοπίας Raman.

Στην πιο πάνω εικόνα εμφανίζεται μια τυπική πειραματική διάταξη της φασματοσκοπίας Raman. Περιληπτικά, η ακτινοβολία διέγερσης προέρχεται από πηγή laser και κατευθύνεται με χρήση κατόπτρων προς το δείγμα όπου με χρήση κατάλληλου φακού η δέσμη εστιάζεται στο δείγμα. Ακολούθως, το σκεδαζόμενο φως κατευθύνεται προς τον ανιχνευτή όπου με χρήση κατάλληλου οπτικού φίλτρου αποκόπτεται η ακτινοβολία από τη σκέδαση Rayleigh και στη συνέχεια εισέρχεται στο μονοχρωμάτορα όπου με χρήση κατόπτρων και φραγμάτων περίθλασης πραγματοποιείται η ανάλυση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας διαχωρίζοντας την σε παράλληλες δέσμες ανάλογα με την ενέργεια τους. Αφού αναλυθεί το φως συλλέγεται από τον ανιχνευτή CCD (Charge Coupled Device) και μεταφέρεται στον υπολογιστή όπου με κατάλληλο λογισμικό μπορεί να πραγματοποιηθεί η επεξεργασία του σήματος.

2.6 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) χρησιμοποιείται για προσδιορισμό και ποσοτικοποίηση των συστατικών ενός δείγματος. Η λειτουργία της στηρίζεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του δείγματος και του πληρωτικού υλικού που βρίσκεται εντός ειδικής στήλης που χρησιμοποιείται στη χρωματογραφία και οδηγεί στο διαχωρισμό των συστατικών. Μια αναπαράσταση της λειτουργίας της τεχνικής φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί.



Εικόνα 25 : Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής υγρής χρωματογραφίας.

Μέσω της αντλίας το κατάλληλο διάλυμα ή μίγμα διαλυμάτων που χρησιμοποιείται σαν κινητή φάση εισέρχεται στο σύστημα. Ακολούθως, γίνεται εισαγωγή του δείγματος το οποίο οδηγείται στην επιλεγμένη στήλη χρωματογραφίας η οποία έχει το κατάλληλο πληρωτικό υλικό. Οι αλληλεπιδράσεις του δείγματος με το πληρωτικό υλικό της στήλης σε συνδυασμό με το είδος του μίγματος της κινητής φάσης οδηγούν σε διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος μέσω του διαφορετικού χρόνου συγκράτησης κάθε συστατικού και κατά συνέπεια διαφορετικού χρόνου έκλουσης. Όταν οι παράμετροι που καθορίζουν τα χαρακτηριστικά της κινητής φάσης, όπως είναι η σύσταση, το pH, η ροή και η θερμοκρασία, παραμένουν σταθερά τότε η έκλυση λέγεται ισοκρατική ενώ όταν μεταβάλλονται λέγεται βαθμωτή. Στη συνέχεια τα συστατικά του δείγματος οδηγούνται στον ανιχνευτή μέσω του οποίου μπορεί να γίνει ταυτοποίηση ανάλογα με το είδος του. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής έχουν χρησιμοποιηθεί δύο είδη ανιχνευτών, ο πρώτος είναι ανιχνευτής ορατού – υπεριώδους, ο οποίος μπορεί να εντοπίσει την παρουσία κάποιας ουσίας που εμφανίζει απορρόφηση σε

κάποιο συγκεκριμένο μήκος κύματος ενώ ο δεύτερος είναι ανιχνευτής παράταξης φωτοδιόδων (Photodiode Array Detector, PDA) ο οποίος μπορεί να ανιχνεύσει την απορρόφηση του δείγματος σε ένα μεγάλο εύρος μηκών κύματος στην περιοχή του ορατού και του υπεριώδους προσφέροντας ουσιαστικά το φάσμα απορρόφησης κάθε συστατικού του δείγματος. Μετά από τον ανιχνευτή υπάρχει η επιλογή απόρριψης ή συλλογής του δείγματος ανάλογα με τις δυνατότητες του συστήματος.

Υπάρχουν αρκετές παραλλαγές λειτουργίας της υγρής χρωματογραφίας, θα γίνει αναφορά σε δύο βασικές που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της διατριβής. Η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης χρησιμοποιεί την πολικότητα των δειγμάτων ως μέσο διαχωρισμού. Το πληρωτικό υλικό είναι μη πολικό σε αυτή τη μέθοδο ενώ χρησιμοποιούνται πολικοί διαλύτες στην κινητή φάση με πιο συνηθισμένους τη μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο. Μια δεύτερη κατηγορία υγρής χρωματογραφίας είναι αυτή της ιοανταλλαγής η οποία χρησιμοποιεί ως μέσο διαχωρισμού ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις του δείγματος με το πληρωτικό υλικό. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται ιδιαίτερα για το διαχωρισμό πρωτεϊνών(13).

Σχετικά με την ανάλυση φωτοσυνθετικών χρωστικών έχουν αναπτυχθεί δεκάδες διαφορετικές μεθοδολογίες οι οποίες οδηγούν στο διαχωρισμό των ουσιών και επιτρέπουν την ποσοτικοποίησή τους εντός των οργανισμών αλλά και τη μελέτη των ιδιοτήτων τους εκτός του βιολογικού συστήματος από το οποίο προέρχονται(14,15).

2.7 Βιβλιογραφία κεφαλαίου 2

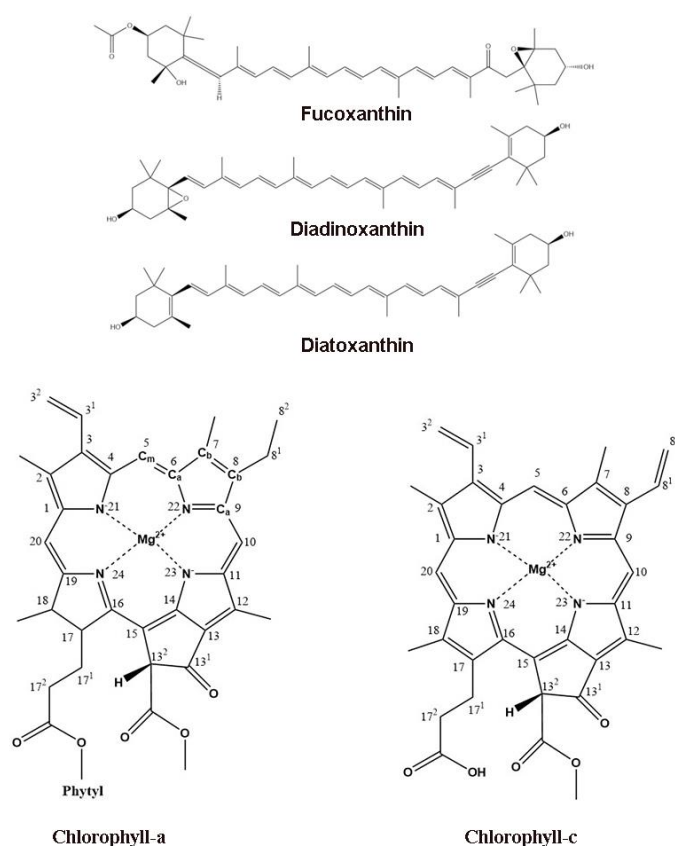
1. Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp 26- 60. In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, USA
2. Jensen, E. L., Yangüez, K., Carrière, F., & Gontero, B. (2020). Storage compound accumulation in diatoms as response to elevated CO₂ concentration. *Biology*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/biology9010005>
3. Atkins, P., De Paula, J.,(2006). Atkins' physical chemistry (8th ed.). Oxford University Press.
4. Maxwell1, K., & Johnson2, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence-a practical guide. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 51, Issue 345).
5. Lamb, J. J., Røkke, G., & Hohmann-Marriott, M. F. (2018). Chlorophyll fluorescence emission spectroscopy of oxygenic organisms at 77 K. In *Photosynthetica* (Vol. 56, Issue 1, pp. 105–124). The Institute of Experimental Biology of the Czech Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0791-y>
6. Harbinson, J., & Rosenqvist, E. (2003). *Chapter 1 AN INTRODUCTION TO CHLOROPHYLL FLUORESCENCE*.
7. S.Lutz, S.Sathyendaranath, E.Head,W.Li, (2001) Changes in the in vivo absorption and fluorescence excitation spectra with growth irradiance in three species of phytoplankton, *Journal of Plankton research* (23) 555-569
8. Popov, an. (2001). Considerations Concerning the Harmonic Limit of the Morse Oscillator. In *Phys. Scr* (Vol. 63). <http://iopscience.iop.org/1402-4896/63/4/001>
9. JR.Ferraro and K.Nakamoto, *Introductory Raman Spectroscopy*, 2nd edition, 1994.
10. MJ Baker, CS Hughes and KA Hollywood, *Biophotonics: Vibrational Spectroscopic Diagnostics*, Chapter 3, 2016.
11. Llansola-portoles, M.J., Pascal, A.A., Robert, B., 2017. Electronic and vibrational properties of carotenoids : from in vitro to in vivo.
12. Gall, A., Pascal, A.A., Robert, B., 2015. *Biochimica et Biophysica Acta* Vibrational techniques applied to photosynthesis : Resonance Raman and fluorescence line-narrowing ☆. *BBA - Bioenerg.* 1847, 12–18.

13. Papageorgiou, M., Tselios, C. and Varotsis, C. (2020). Photoreduction of carotenoids in the aerobic anoxygenic photoheterotrophs probed by real time Raman spectroscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 213,112069
14. Sabir, A. M., Moloy, M., & Bhasin, P. S. (2016). HPLC METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION: A REVIEW. *International Research Journal of Pharmacy*, 4(4), 39–46. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.04407>
15. Rodriguezl, F. (2000). *Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases* (Vol. 195).
16. Amorim-Carrilho, K. T., Cepeda, A., Fente, C., & Regal, P. (2014). Review of methods for analysis of carotenoids. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 56, pp. 49–73). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.12.011>

3 Φασματοσκοπική μελέτη του διατόμου *Phaeodactylum Tricornutum*

3.1 Εισαγωγή

Σε αυτό το κεφάλαιο θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα της φασματοσκοπικής μελέτης του διατόμου *Phaeodactylum Tricornutum* (*P.Tricornutum*) και της απόκρισης του σε διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης. Μεγαλύτερη έμφαση θα δοθεί στις χρωστικές ουσίες που παράγει ο οργανισμός και τις ιδιότητες τους στις διάφορες συνθήκες. Η επιλογή του συγκεκριμένου οργανισμού έγινε επειδή αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα είδη στον πλανήτη, θεωρείται πρότυπο είδος για τη μελέτη των πτεροειδών διατόμων (1,2,3) και πρόσφατα έχει δημοσιευθεί η κρυσταλλική δομή των συμπλόκων συλλογής φωτός (Light Harvesting Complexes, LHCs) που διαθέτει (4). Για τα διάτομα τα σύμπλοκα αυτά έχουν την ονομασία FCPs (Fucoxanthin-Chlorophyll Proteins) μιας και οι κύριες χρωστικές που τα απαρτίζουν είναι οι χλωροφύλλες *a* και *c* (Chlorophyll, Chl-*a/c*) και τα καροτενοειδή φουκοξανθίνη (Fucoxanthin, Fx) και διαδινοξανθίνη (Diadinoxanthin, Dd) (2,5).



Εικόνα 26 : Χημική δομή των καροτενοειδών Φουκοξανθίνη, Διαδινοξανθίνη και Διατοξανθίνη και των χλωροφύλλων *a* και *c*.

Ανάλογα με τις πρωτεΐνες και τη σύσταση των χρωστικών ουσιών σε κάθε σύμπλοκο επιτελείται διαφορετικός ρόλος ο οποίος συνδυαστικά ρυθμίζει τη λειτουργία του οργανισμού (6,7).

Αρχικά θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα που αφορούν την ανάπτυξη του διατόμου κάτω από φως διαφορετικής έντασης με σκοπό να μελετηθεί ο φωτο-προστατευτικός μηχανισμός που διαθέτει. Σε συνθήκες έκθεσης σε υψηλής έντασης φωτισμό είναι γνωστό πως παρατηρείται αυξημένη συγκέντρωση ROS (Reactive Oxygen Species) στα φωτοσυστήματα I και II των κυττάρων των διατόμων, τα οποία είναι ισχυρά οξειδωτικά και αν δεν αντιμετωπιστούν θα οδηγήσουν στο θάνατο των κυττάρων (6). Έτσι, όλοι οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί διαθέτουν μηχανισμούς αντιμετώπισης της υψηλής έντασης φωτός, είτε με την προληπτική δράση που οδηγεί στην αποφυγή δημιουργίας ROS, είτε με μηχανισμούς που απαλείφουν το αποτέλεσμα των ROS αφού δημιουργηθούν και ακολούθως επιδιορθώνουν τις βιολογικές επιδράσεις που έχουν προκληθεί από την παρουσία τους. Η πρόληψη της δημιουργίας ROS επιτυγχάνεται με τη μη-φωτοχημική απαλοιφή (Non-photochemical quenching, NPQ) μέσω της οποίας γίνεται διάχυση σε μορφή θερμότητας της ενέργειας που έχει δεσμευθεί μέσω της απορρόφησης φωτονίων από το περιβάλλον και δεν είναι δυνατόν να μετατραπεί σε χημική ενέργεια μέσω της χημικής απόσβεσης που πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης (6,7). Σημαντικό ρόλο στον φωτοπροστατευτικό μηχανισμό των διατόμων έχουν τα καροτενοειδή διαδινοξανθίνη (Diadinoxanthin, Dd) και διατοξανθίνη (Diatoxanthin, Dt) των οποίων η ποσότητα στα κύτταρα αυξάνεται σημαντικά σε συνθήκες παρατεταμένη έκθεση των διατόμων σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού (6,7,8).

Σχετικά με τις επιπτώσεις και τις μεταβολές που προκαλεί η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στα κύτταρα των διατόμων υπάρχουν αρκετές δημοσιευμένες μελέτες τα τελευταία χρόνια (9,10,11), παρόλα αυτά μέχρι στιγμής δεν έχει μελετηθεί σε σημαντικό βαθμό η απόκριση των διατόμων που έχουν αναπτυχθεί με φως εντάσεως μεγαλύτερης των $300 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ με χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών και κυρίως της φασματοσκοπίας Raman. Η χρήση της φασματοσκοπίας Raman σε δείγματα που περιέχουν χρωμοφόρα μόρια όπως τα καροτενοειδή και οι χλωροφύλλες, είναι από τις σημαντικότερες τεχνικές χαρακτηρισμού που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και προσφέρει πληροφορίες σχετικά με τη δομή και τη διαμόρφωση των ουσιών αυτών εντός των συμπλόκων στα οποία συμμετέχουν(12,13).

Ακολούθως, γίνεται παρουσίαση των αποτελεσμάτων που αφορούν την ανάπτυξη του οργανισμού κάτω από κόκκινο φως. Σε αυτές τις συνθήκες έχει αναφερθεί πως εμφανίζονται μόρια χλωροφύλλης α τα οποία έχουν διαφορετικές ιδιότητες σε σχέση με τις κανονικές συνθήκες και συγκεκριμένα εμφανίζουν απορρόφηση μετατοπισμένη προς το ερυθρό καθώς και μια χαρακτηριστική εκπομπή φθορισμού στα 710 nm (14). Η προέλευση των μεταβολών αυτών στις ιδιότητες της χλωροφύλλης έχουν αποδοθεί στην παρουσία της πρωτεΐνης Lhcf15 σε συγκεκριμένα σύμπλοκα συλλογής φωτός του διατόμου ως ένας μηχανισμός προσαρμογής του οργανισμού σε περιβάλλοντα όπου δεν είναι διαθέσιμα μικρότερα μήκη κύματος ακτινοβολίας για να αξιοποιηθούν στη φωτοσύνθεση(15,16,17). Στα αποτελέσματα αυτής της εργασίας εκτός από το χαρακτηρισμό κυττάρων του διατόμου ως προς τις ιδιότητες που εμφανίζουν τα συγκεκριμένα μόρια χλωροφύλλης, γίνεται προσπάθεια με χρήση της φασματοσκοπίας Raman να προσδιοριστεί η αιτία στην οποία οφείλονται οι μεταβολές μιας και δεν υπάρχει αντίστοιχη μελέτη στη βιβλιογραφία μέχρι σήμερα.

Στη συνέχεια, θα παρουσιαστεί ο χαρακτηρισμός των απομονωμένων συμπλόκων συλλογής φωτός αυτού του διατόμου. Με τη μεθοδολογία που ακολουθήθηκε έγινε η απομόνωση επτά διαφορετικών συμπλόκων συλλογής φωτός τα οποία διαθέτουν ξεχωριστές ιδιότητες και ως σύνολο παρέχουν πληροφορίες για τη δομή και λειτουργία του οργανισμού(18).

Τέλος, θα γίνει αναφορά στα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη με τη χρήση φασματοσκοπίας Raman κυττάρων του διατόμου τα οποία αναπτύχθηκαν με αντικατάσταση του ^{14}N με το ισότοπο ^{15}N στο βιομέσο του. Σκοπός είναι να παρατηρηθούν μετατοπίσεις στις δονήσεις των επηρεαζόμενων δεσμών των μορίων της χλωροφύλλης λόγω της παρουσίας του ισότοπου έτσι ώστε να μπορεί να αποδοθεί η προέλευση τους με μεγαλύτερη ακρίβεια. Κάτι τέτοιο δεν έχει πραγματοποιηθεί ποτέ στο παρελθόν σε κύτταρα διατόμων. Με τη χρήση διαφορετικών ισότοπων μπορεί να γίνει εφικτή η ανάθεση και μελέτη δονήσεων σε αυτού του είδους τα δείγματα, οι οποίες λόγω των πολλαπλών συνεισφορών από άλλες δονήσεις στη θέση εμφάνισής τους δεν μπορούν να διακριθούν με βεβαιότητα.

Οι τεχνικές φασματοσκοπίας που έχουν χρησιμοποιηθεί σε όλα τα μέρη της εργασίας είναι η φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού – υπεριώδους, η φασματοσκοπία φθορισμού και η φασματοσκοπία Raman. Επιπρόσθετα έχει χρησιμοποιηθεί η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).

3.2 Μεθοδολογία

Ανάπτυξη κυττάρων του διατόμου *P.Tricornutum*

Οι καλλιέργειες του διατόμου *P.Tricornutum* (CCAP 1052/1A) έχουν παραληφθεί από το κέντρο CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) και διατηρήθηκαν με συνεχή ανακαλλιέργειες σε βιομέσο F/2-Si το οποίο περιγράφεται αναλυτικά στο προηγούμενο κεφάλαιο. Για τα πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκε ισότοπο αζώτου έγινε αντικατάσταση του $\text{Na}^{14}\text{NO}_3$ με $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$. Η ανάπτυξη των οργανισμών γίνεται αυτότροφα σε κύκλους 12 ωρών φωτισμού και 12 ωρών σκοταδιού χρησιμοποιώντας ως πηγή φωτός λάμπες LED (Floodlight, Sunlight) εντάσεως (μετρούμενη στην καλλιέργεια με χρήση του LightMeter LX-1118) $15,150$ ή $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Για τα πειράματα επίδρασης της διαφορετικής έντασης φωτός χρησιμοποιήθηκε λευκό ψυχρό φως (6000K) ενώ για τα πειράματα μελέτης του οργανισμού σε ανάπτυξη κάτω από κόκκινο φως το μέγιστο της ακτινοβολίας ήταν στα 624nm. Τα φάσματα εκπομπής των δύο πηγών φωτισμού που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στο προηγούμενο κεφάλαιο. Η θερμοκρασία ανάπτυξης των οργανισμών ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 20°C .

Προετοιμασία δειγμάτων : Για τις μετρήσεις με χρήση της φασματοσκοπίας ορατού – υπεριώδους, φθορισμού και Raman έγινε λήψη των κυττάρων από καλλιέργειες που βρίσκονταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης τους κατά τη διάρκεια του ημερήσιου κύκλου σκοταδιού. Μετά από φυγοκέντριση 1,5ml όγκου καλλιέργειας στις 4000 rpm για 3 λεπτά, έγινε αφαίρεση του υπερκείμενου βιομέσου και ακολούθως έγινε διασπορά των κυττάρων σε απιονισμένο νερό έτσι ώστε η απορρόφηση της Chl-a στα 675nm να είναι ίδια για όλα τα δείγματα. Για κάθε δείγμα ο τελικός όγκος ήταν 50μl.

Απομόνωση FCPs

Η συλλογή των κυττάρων του διατόμου *P.Tricornutum* έγινε από καλλιέργεια που βρισκόταν στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης με χρήση φυγοκέντρησης στις 8000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C και ακολούθως τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris συγκέντρωσης 20mM αφού πρώτα αφαιρέθηκε το υπερκείμενο βιομέσο. Η διαδικασία που περιγράφεται στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε με χαμηλό φωτισμό για την αποφυγή αλλοίωσης των δειγμάτων. Μετά από ανάδευση το δείγμα τοποθετήθηκε για 20 λεπτά σε λουτρό υπερήχων, το οποίο διατηρήθηκε με χρήση πάγου σε χαμηλή θερμοκρασία και στη συνέχεια έγινε προσθήκη β -1,4-dodecyl maltoside (β -DDM) σε συγκέντρωση 4mM. Το

δείγμα αφέθηκε στο σκοτάδι υπό ανάδευση για 30 λεπτά και ακολούθως πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση 4000rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο τοποθετήθηκε σε κολώνα ιοντοανταλλαγής HiPrep Q HP 16/10 (20 mL) η οποία είχε εξισορροπηθεί με 25 mM Tris, 2 mM KCl και 0.4mM β-DDM σε pH 7,4 (διάλυμα A) και τοποθετήθηκε σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (Shimadzu LC 20AD, SPD-20A (detector)). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε βαθμιδωτή έκλυση 0-750mM KCl μεταξύ του διαλύματος A και του διαλύματος B (25 mM Tris, 750 mM KCl και 0.4mM β-DDM σε pH 7,4) με ροή 3ml/min όπως περιγράφεται αναλυτικά στον πίνακα 1. Ο διαχωρισμός των επιμέρους ζωνών έγινε με παρακολούθηση στα 440nm, τα δείγματα συλλέγηκαν και συγκεντρώθηκαν με χρήση φίλτρων Amicon (cutoff 10 kDa). Τα δείγματα στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -80°C μέχρι τον φασματοσκοπικό χαρακτηρισμό τους.

----- Solvents -----			
Time (min)	A	B	Flow rate (ml/min)
0	100	0	3
2	85	15	3
5.9	70	30	3
12.7	60	40	3
19.6	55	45	3
26.5	45	55	3
31.4	35	65	3
37.2	100	0	3
50	100	0	3

Πίνακας 1 : Αναλυτική περιγραφή πρωτοκόλλου απομόνωσης FCPs.

Φασματοσκοπία ορατού – υπεριώδους

Για τη λήψη των φασμάτων ορατού υπεριώδους χρησιμοποιήθηκε το όργανο Cary 60 UV-vis (Agilent Technologies, USA) και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε κυψελίδα χαλαζία. (Hellma fluorescence cuvettes, quartz, spectral range 200-2500 nm, pathlength 3x3 mm, chamber volume 45 μ L)

Φασματοσκοπία φθορισμού

Για τη λήψη των φασμάτων φθορισμού χρησιμοποιήθηκε το όργανο Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies, USA) και οι σχισμές του μοναχρωμάτορα (slits) ήταν 5nm. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε κυψελίδα χαλαζία. (Hellma fluorescence cuvettes, quartz, spectral range 200-2500 nm, pathlength 3x3 mm, chamber volume 45 μ L).

Φασματοσκοπία Raman

Η λήψη των φασμάτων Raman έγινε με χρήση του συστήματος LabRam (Horiba, Jobin Yvon, Japan) το οποίο είναι εξοπλισμένο με ανιχνευτή CCD (1800grooves/mm grating). Η φασματική ανάλυση ήταν 5cm^{-1} . Η ακτινοβολία για όλες τις μετρήσεις προήλθε από Laser KIMMON He-Cd με μήκος κύματος 442nm και η ισχύς της στο δείγμα ήταν 10mW. Για τα δείγματα τα οποία ήταν απαραίτητες οι μετρήσεις σε χαμηλή θερμοκρασία χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας (Linkam) και έγινε ψύξη του δείγματος με χρήση υγρού αζώτου. Η διάρκεια των μετρήσεων αναφέρεται ξεχωριστά σε κάθε φάσμα που παρουσιάζεται στη συνέχεια.

Ανάλυση χρωστικών ουσιών με χρήση HPLC

Η συλλογή των κυττάρων έγινε σε όλες τις περιπτώσεις κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης των οργανισμών. Η αρχική ποσότητα των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 3ml τα οποία μετά από φυγοκέντρηση στις 5000rpm για 3 λεπτά συγκεντρώθηκαν και έγινε αφαίρεση του υπερκείμενου βιομέσου το οποίο αντικαταστάθηκε με 100 μ L μεθανόλης. Τα επόμενα βήματα έχουν πραγματοποιηθεί σε χώρο με πολύ χαμηλό φωτισμό και ενδιάμεση τοποθέτηση του δείγματος σε πάγο έτσι ώστε να αποφευχθεί η πρόκληση μεταβολών στο δείγμα λόγω υψηλής θερμοκρασίας ή φωτισμού. Το δείγμα υποβλήθηκε σε ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα και ακολούθως τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για το ίδιο χρονικό διάστημα. Αυτά τα βήματα επαναλήφθηκαν 5 φορές και ακολούθως πραγματοποιήθηκε

φυγοκέντρωση του δείγματος για 1 λεπτό στις 8000 rpm. Το υπερκείμενο το οποίο περιείχε τις χρωστικές ουσίες των κυττάρων του διατόμου συλλέγηκε και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία -20°C μέχρι την ανάλυση του. Η ανάλυση των χρωστικών πραγματοποιήθηκε με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με το σύστημα Shimadzu-Nexera 40 εξοπλισμένο με ανιχνευτή SPD-M40 (Photodiode Array Detector). Η κολώνα που χρησιμοποιήθηκε ήταν Zorbax SB-C18 reverse phase (Agilent). Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής : A) 0.5M Ammonium Acetate σε μεθανόλη/νερό (85:15 v/v), (B) Acetonitrile και νερό (90:10,v/v) και (C) 100% Ethyl Acetate. Ο διαχωρισμός έγινε με βαθμιδωτή έκλυση όπως φαίνεται στον πίνακα 2.

----- Solvents -----				
Time (min)	A	B	C	Flow rate (ml/min)
0	60	40	0	0.8
2	0	100	0	0.8
7	0	80	20	0.8
17	0	50	50	0.8
21	0	30	70	0.8
28.5	0	30	70	0.8
29.5	0	100	0	0.8
30.5	60	40	0	0.8

Πίνακας 2 : Αναλυτική περιγραφή πρωτοκόλλου διαχωρισμού χρωστικών.

Η ταυτοποίηση των διαφόρων χρωστικών ουσιών έγινε με χρήση της βιβλιογραφίας (19) και του φάσματος απορρόφησης κάθε ουσίας. Η εκτίμηση της στοιχειομετρίας κάθε δείγματος συγκριτικά με τη συγκέντρωση χλωροφύλλης α έγινε από το εμβαδόν κάθε κορυφής με χρήση των αντίστοιχων συντελεστών απορρόφησης (20).

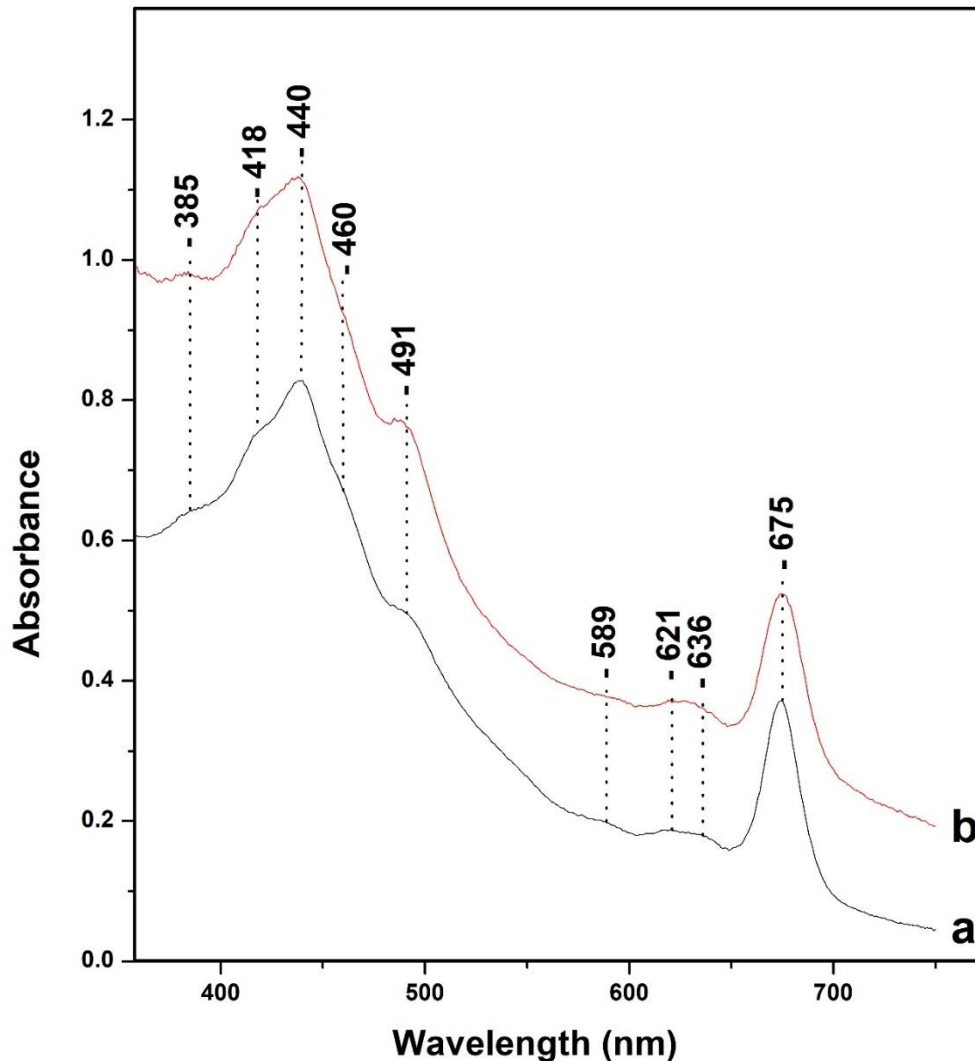
3.3 Πειραματικά αποτελέσματα και συζήτηση

3.3.1 Μελέτη της επίδρασης υψηλής έντασης λευκού φωτός

Αρχικά θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα που αφορούν την ανάπτυξη του διατόμου κάτω από λευκό φως διαφορετικής έντασης. Οι εντάσεις φωτός που έχουν επιλεγεί είναι 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (intermediate light, IL) που αντιστοιχεί σε σχετικά ήπιες συνθήκες για τον οργανισμό και 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (high light, HL) που αντιστοιχεί σε σημαντικά υψηλότερη ένταση φωτός η επίδραση της οποίας σε αυτούς τους οργανισμούς δεν έχει μελετηθεί επαρκώς φασματοσκοπικά μέχρι σήμερα. Σκοπός των πειραμάτων αυτών ήταν η μελέτη της απόκρισης του διατόμου κάτω από συνθήκες όπου είναι απαραίτητη η παρουσία ενός φωτο-προστατευτικού μηχανισμού για τη λειτουργία του οργανισμού. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να μελετηθούν οι διαφορετικοί μηχανισμοί που επιστρατεύει το συγκεκριμένο είδος έτσι ώστε να ανταπεξέλθει σε αυτές τις συνθήκες διατηρώντας την ικανότητα να διοχετεύει τη διαθέσιμη ενέργεια που λαμβάνει από το φως για την πραγματοποίηση φωτοσύνθεσης και κατ' επέκταση την παραγωγή ενέργειας και επιβίωση του οργανισμού.

Στην εικόνα 27 παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης ορατού υπεριώδους που αφορούν τα κύτταρα του διατόμου *P. Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από διαφορετικής έντασης λευκό φως. Όλα τα δείγματα κατά τη λήψη των φασμάτων είχαν ίδια απορρόφηση στα 675nm. Το φάσμα a, αφορά κύτταρα τα οποία αναπτύχθηκαν κάτω από 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Οι κορυφές απορρόφησης μεταξύ 385 - 460nm προέρχονται από τις χλωροφύλλες a και c καθώς και από τη συνεισφορά των καροτενοειδών. Πιο αναλυτικά, οι κορυφές 440 (Soret), 621 (Q_x) και 675 (Q_y) nm αποδίδονται στην χλωροφύλλη a (Chl-a) ενώ οι κορυφές 460 (Soret), 589 (Q_x) και 636 (Q_y) nm στην χλωροφύλλη c (Chl-c)(10,17,21). Η κορυφή στα 491 nm έχει σημαντικότερη συνεισφορά από τη διαδινοξανθίνη (Diadinoxanthin, Dd) και την «μπλε» φουκοξανθίνη (blue-Fx), ενώ η ευρεία περιοχή απορρόφησης μεταξύ 500-560 αποδίδεται στην «κόκκινη» φουκοξανθίνη(red-Fx). Η ορολογία «μπλε» και «κόκκινη» φουκοξανθίνη έχει επικρατήσει στη βιβλιογραφία για αναφορά του συγκεκριμένου καροτενοειδούς όταν η απορρόφηση του εμφανίζει μετατόπιση προς το ιώδες και το ερυθρό αντίστοιχα. Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα, οι

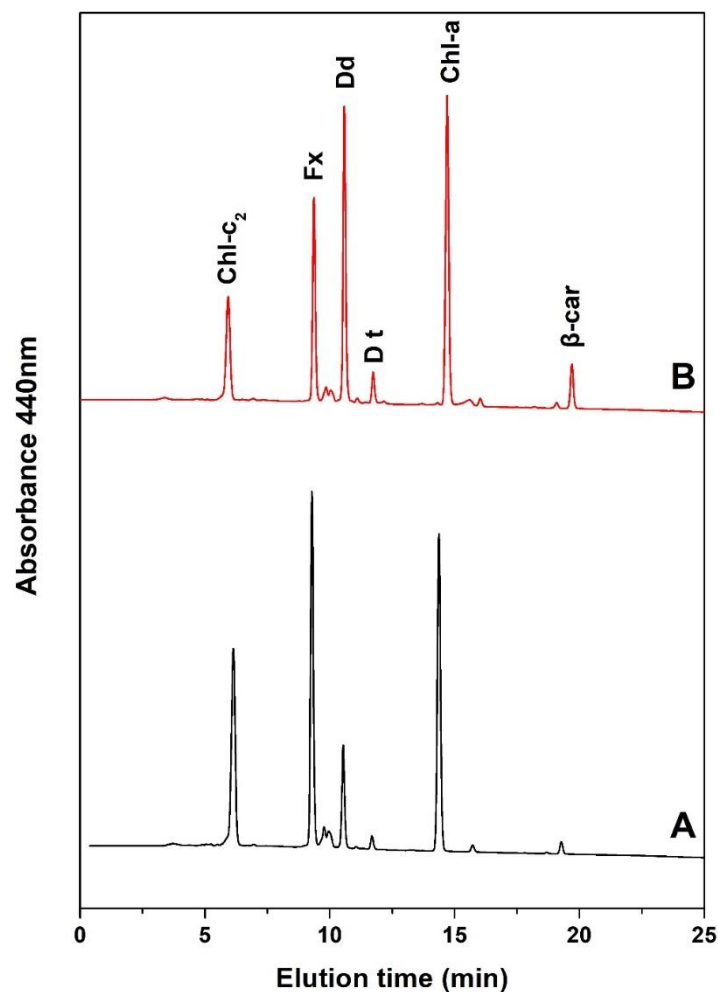
μετατοπίσεις που παρατηρούνται στην απορρόφηση των καροτενοειδών έχουν εξάρτηση από το πρωτεϊνικό περιβάλλον που βρίσκονται τα σύμπλοκα στα οποία συμμετέχουν. Ειδικά για το καροτενοειδές Fx είναι γνωστό πως εμφανίζει ένα πολύ μεγάλο εύρος απορρόφησης μεταξύ 390 – 580 nm(21).



Εικόνα 27 : Φάσματα απορρόφησης ορατού-υπεριώδους των κυττάρων του διατόμου *P.Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από (a) 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (b) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ λευκού φωτός.

Η κορυφή στα 491nm εμφανίζει μια σημαντική αύξηση και ταυτόχρονα παρατηρείται μείωση στην ευρεία απορρόφηση μεταξύ 500-560nm στα φάσμα b το οποίο αφορά κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί με φως έντασης 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Η αύξηση στη συγκέντρωση του καροτενοειδούς Dd και η μείωση της συγκέντρωσης της μετατοπισμένης

προς το ερυθρό φουκοξανθίνης στα κύτταρα του διατόμου που παρατηρείται με την αύξηση της έντασης του φωτός ανάπτυξης αποτελεί ένδειξη της ενεργοποίησης του φωτοπροστατευτικού μηχανισμού του οργανισμού κάτω από αυτές τις συνθήκες(6,7,21). Επίσης στο φάσμα b υπάρχει μια μικρή αύξηση στο πλάτος της κορυφής στα 675nm η οποία υποδηλώνει αλλαγές στα μόρια Chl-a οι οποίες οφείλονται στο διαφορετικό τρόπο ανάπτυξης σε σχέση με το δείγμα a. Μια άλλη διαφορά μεταξύ των δύο φασμάτων είναι η αναλογία των κορυφών στα 418 και 440nm η οποία μπορεί να οφείλεται σε αλλαγές στη συγκέντρωση των καροτενοειδών που εμφανίζουν απορρόφηση σε εκείνη την περιοχή, όπως είναι η μετατοπισμένη προς το ιώδες απορρόφηση της Fx.



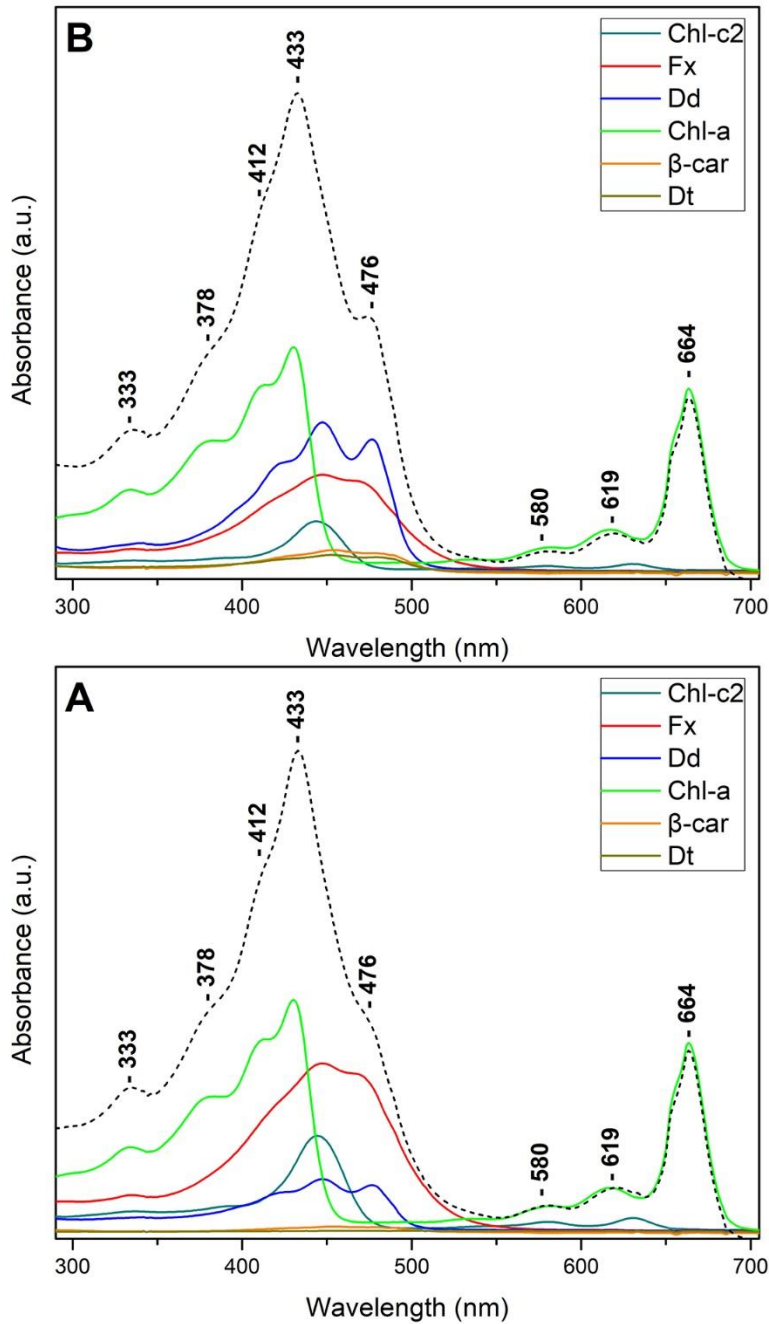
Εικόνα 28 : Χρωματογράφημα διαχωρισμού των χρωστικών ουσιών από τα κύτταρα του διατόμου *P.Tricornutum* σε μεθανόλη. Τα κύτταρα έχουν αναπτυχθεί κάτω από (A) 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ λευκού φωτός.

Στην εικόνα 28 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα το οποίο προέκυψε από την ανάλυση των χρωστικών ουσιών από τα κύτταρα του διατόμου *P. Tricornutum* με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης για ανάπτυξη κάτω από (A) 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και (B) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ λευκού φωτός. Η ταυτοποίηση των κορυφών έγινε με χρήση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας και των φασμάτων απορρόφησης ορατού – υπεριώδους κάθε κορυφής που εμφανίζεται στο χρωματογράφημα (19). Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν ρυθμιστεί έτσι ώστε να έχουν παρόμοια απορρόφηση στα 675nm και κατ' επέκταση συγκέντρωση Chl-a έτσι ώστε να είναι εφικτή η σύγκριση των υπόλοιπων ουσιών ως προς αυτή. Από το χρωματογράφημα φαίνεται μια ξεκάθαρη μείωση του καροτενοειδούς Fx και της Chl-c με την αύξηση της έντασης του φωτός ανάπτυξης και ταυτόχρονα η σημαντική αύξηση της παρουσίας Dd, διατοξανθίνης (Dt) και β-καροτενίου (βcar) στο δείγμα. Αξίζει να σημειωθεί πως παρά τη μείωση που εμφανίζεται στη συγκέντρωση της Fx σε σχέση με τη Chl-a, το καροτενοειδές παραμένει σε υψηλή συγκέντρωση στο δείγμα και κατά συνέπεια ενισχύει την ερμηνεία του φάσματος απορρόφησης της εικόνας 27 πως με την αύξηση της έντασης του φωτός ανάπτυξης επηρεάζεται μόνο ο πληθυσμός του καροτενοειδούς Fx που εμφανίζει απορρόφηση μετατοπισμένη προς το ερυθρό (red-Fx) και όχι τα υπόλοιπα μόρια που εμφανίζουν απορρόφηση σε μικρότερα μήκη κύματος (blue-Fx). Με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας δεν είναι δυνατός ο διαχωρισμός των δύο κατηγοριών της Fx γιατί όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, η περιοχή απορρόφησης της εξαρτάται από το πρωτεϊνικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται το οποίο δεν υφίσταται με τη χρήση της μεθανόλης ως διαλύτη σε αυτή τη μέθοδο. Οι υπόλοιπες κορυφές που εμφανίζονται στην εικόνα 28 αφορούν συμπληρωματικά καροτενοειδή που παράγει ο οργανισμός σε μικρότερες συγκεντρώσεις (Violaxanthin, Zeaxanthin, Antheraxanthin) τα οποία δεν εμφανίζουν σημαντικές μεταβολές στις συνθήκες των συγκεκριμένων πειραμάτων. Η χαμηλή τους συγκέντρωση δεν επιτρέπει την περαιτέρω μελέτη τους με τις τεχνικές που παρουσιάζονται σε αυτό το κεφάλαιο και η παρουσία τους δε φαίνεται να επηρεάζει τα πειραματικά αποτελέσματα ή τα συμπεράσματα που προκύπτουν από αυτά. Ο πίνακας 3 περιέχει τα αποτελέσματα υπολογισμών σχετικά με την περιεκτικότητα των δειγμάτων σε διάφορες χρωστικές ουσίες εκφρασμένες σε mole ουσίας ανά mole Chl-a.

Culture	Chl-c (mol/mol Chl a)	Fx(mol/mol Chl a)	Dd(mol/mol Chl a)
IL	0.17	0.59	0.16
HL	0.12	0.41	0.48

Πίνακας 3 : Περιεκτικότητα δειγμάτων σε χλωροφύλλη c (Chl-c), φουκοξανθίνη (Fx) και διαδινοξανθίνη (Dd) ως προς τη χλωροφύλλη α (Chl-a)

Τα φάσματα απορρόφησης ορατού – υπεριώδους για κάθε κορυφή του χρωματογραφήματος παρουσιάζονται στην εικόνα 29. Στην εικόνα έχει προστεθεί και το άθροισμα των συνεισφορών κάθε φάσματος για τα δύο δείγματα (Sum). Οι κορυφές που εμφανίζονται είναι αισθητά μετατοπισμένες προς μικρότερα μήκη κύματος σε σχέση με εκείνες της εικόνας 27 λόγω του χημικού περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται οι χρωστικές. Από τη μορφή των φασμάτων που αποτελούν το άθροισμα των επιμέρους συνεισφορών φαίνεται πως προκύπτει το χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης των κυττάρων των διατόμων. Επιπλέον με αυτό το τρόπο φαίνεται πως η ενίσχυση της κορυφής στα 491 nm (αντιστοιχεί στην κορυφή που εμφανίζεται στα 476 nm στην εικόνα 29) που παρατηρήθηκε στην εικόνα 27 οφείλεται στην αύξηση του καροτενοειδούς Dd στο δείγμα το οποίο προέρχεται από κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί σε συνθήκες HL.



Εικόνα 29 : Φάσματα απορρόφησης ορατού – υπεριώδους των χρωστικών που προέκυψαν από το διαχωρισμό με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας για τα κύτταρα του διατόμου *P.Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από (A) $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B) $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ λευκού φωτός.

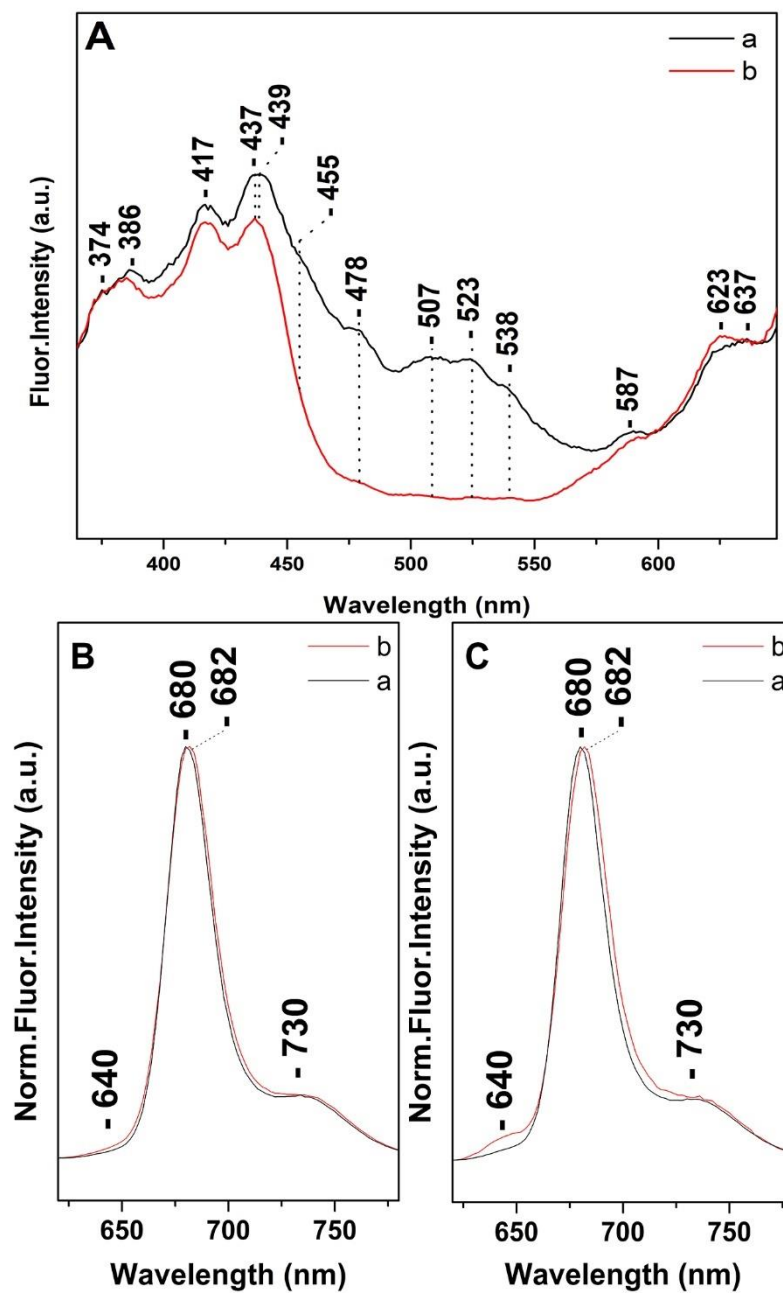
Οι πιο πάνω παρατηρήσεις, τόσο από τα φάσματα απορρόφησης στα κύτταρα του οργανισμού, όσο και από την ανάλυση με υγρή χρωματογραφία οδηγούν στο συμπέρασμα

πως με την αύξηση της έντασης της ακτινοβολίας κάτω από την οποία αναπτύσσεται ο οργανισμός πραγματοποιούνται δύο βασικές μεταβολές ως προς τις χρωστικές ουσίες που περιέχει.

- Αυξάνεται η παραγωγή των Dd, Dt και βcar από τα κύτταρα του διατόμου, όπως αποτυπώνεται στα ανάλογα χρωματογραφήματα.
- Μειώνεται η συγκέντρωση των Fx και Chl-c ως προς τη Chl-a.
- Πραγματοποιούνται βιοχημικές μεταβολές οι οποίες με τη σειρά τους τροποποιούν τις ιδιότητες των χρωστικών ουσιών που παράγονται έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η επιβίωση του οργανισμού, όπως προκύπτει από την πολύ μεγάλη μείωση στη συγκέντρωση red-Fx στο δείγμα που έχει αναπτυχθεί σε συνθήκες HL.

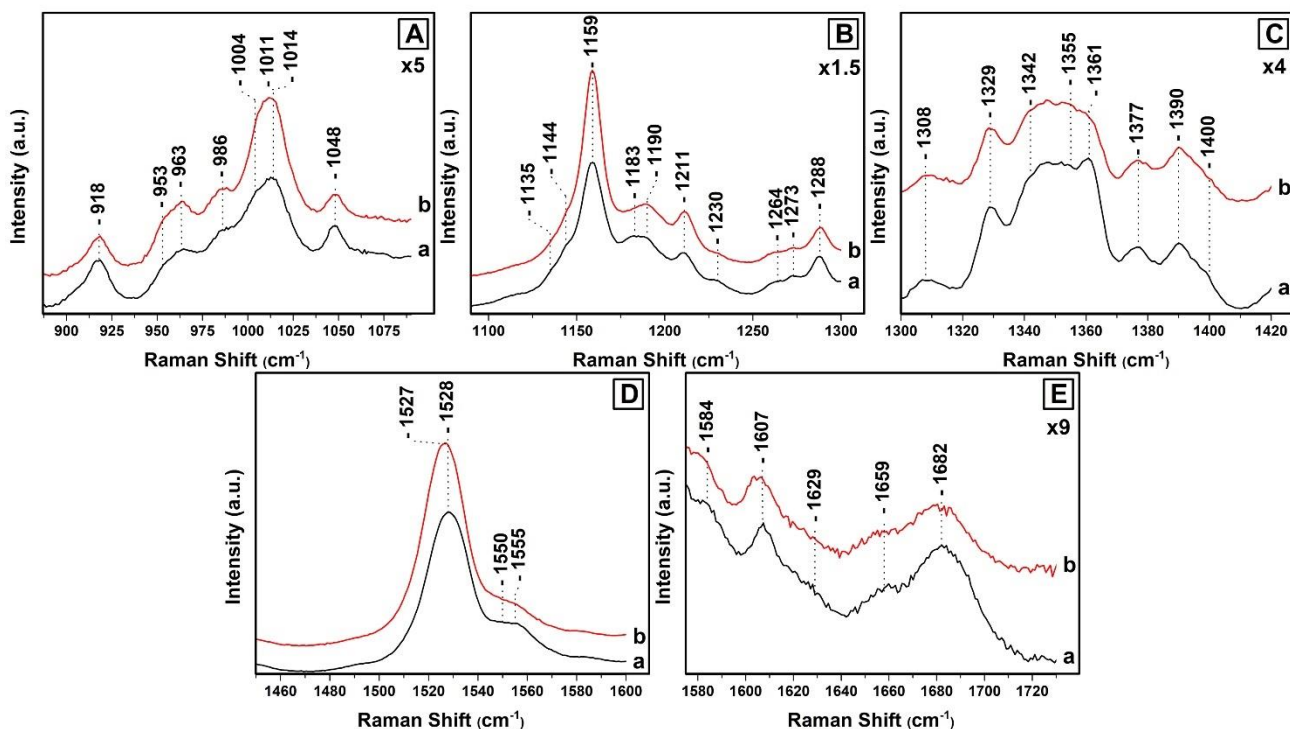
Στην εικόνα 30Α παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού διέγερσης στα 680 nm των κυττάρων του διατόμου *P. Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από (a) 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (b) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτό το μήκος κύματος (680 nm) έχει επιλεγεί γιατί αντιστοιχεί στη χαρακτηριστική εκπομπή φθορισμού από τα μόρια Chl-a που βρίσκονται στα κύτταρα των διατόμων(10). Το φάσμα a έχει σημαντική ομοιότητα με το αντίστοιχο φάσμα απορρόφησης που παρουσιάζεται στην εικόνα 27, το οποίο σημαίνει πως υπάρχει αποδοτική μεταφορά ενέργειας από τα καροτενοειδή και τη χλωροφύλλη c προς τη χλωροφύλλη a, σε συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (10,17). Αντίθετα στο φάσμα b παρατηρείται απουσία των κορυφών στα 507,523 και 538nm, οι οποίες αποδίδονται σε φουκοξανθίνη που εμφανίζει απορρόφηση μετατοπισμένη προς το ερυθρό (red-Fx), καθώς και μείωση περίπου στο μισό της έντασης στα 455nm η οποία αποδίδεται στην chl-c(10,17,22). Αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα πως κάτω από συνθήκες ανάπτυξης HL, η μεταφορά ενέργειας προς τη χλωροφύλλη a δεν περιλαμβάνει την «κόκκινη» φουκοξανθίνη και ταυτόχρονα περιορίζει τη συνεισφορά της χλωροφύλλης c. Επίσης στο φάσμα b υπάρχει μια μετατόπιση της παρατηρούμενης κορυφής από τα 439 nm (φάσμα a) στα 437 nm καθώς και σημαντική διαφορά στο λόγο των εντάσεων των κορυφών 437/417 nm ο οποίος έχει αυξηθεί σε σχέση με το φάσμα b. Τέλος, δεν παρατηρείται κάποια κορυφή στην περιοχή απορρόφησης του καροτενοειδούς Dd στο φάσμα b που αντιστοιχεί σε κύτταρα με μεγάλη συγκέντρωση της ουσίας οδηγώντας στο συμπέρασμα πως ο ρόλος της περιορίζεται στη φωτοπροστασία και όχι, άμεσα τουλάχιστον,

στη συλλογή φωτός και μεταφορά ενέργειας προς τη Chl-a.



Εικόνα 30 : Α) Φάσματα φθορισμού διέγερσης στα 680 nm των κυττάρων του διατόμου *P.Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από : (a)150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και (b) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Β) Κανονικοποιημένα φάσματα φθορισμού εκπομπής με διέγερση στα 418 nm και (Γ) στα 460 nm .

Στις εικόνες 30B και 30C παρουσιάζονται τα κανονικοποιημένα φάσματα φθορισμού εκπομπής με διέγερση στα 418 nm και 460 nm αντίστοιχα. Τα συγκεκριμένα μήκη κύματος μπορούν να απορροφηθούν από τις χλωροφύλλες α (418nm) και c(460nm) καθώς και από τα καροτενοειδή που υπάρχουν στο δείγμα και εμφανίζουν απορρόφηση στη συγκεκριμένη περιοχή. Παρατηρούμε μια κορυφή μεγάλης έντασης στα 680 nm (φάσμα α) και 682nm (φάσμα β) η οποία προέρχεται από την Chl-a και μια ευρεία κορυφή στα 730nm η οποία οφείλεται σε δονητικά επίπεδα της Chl-a(22). Επίσης παρατηρείται μια μικρή αύξηση του πλάτους της κορυφής στα 682nm για το δείγμα β η οποία δείχνει πως υπάρχει κάποια διαφοροποίηση στα ενεργειακά επίπεδα της Chl-a που προκύπτει από την αλλαγή στις συνθήκες ανάπτυξης του οργανισμού. Η κορυφή στα 640nm η οποία εμφανίζεται στο δείγμα β προέρχεται από την Chl-c και μπορεί να ερμηνευτεί ως μείωση της απόδοσης μεταφοράς ενέργειας της Chl-c προς τη Chl-a κάτω από αυτές τις συνθήκες ή ως παρουσία Chl-c στο δείγμα που δε συμμετέχει ενεργά σε σύμπλοκα συλλογής φωτός και έτσι δεν πραγματοποιεί μεταφορά ενέργειας προς τη Chl-a. Οι πιο πάνω παρατηρήσεις ενισχύουν τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τα φάσματα ορατού – υπεριώδους και την ανάλυση με υγρή χρωματογραφία σχετικά με την ποσότητα και τις ιδιότητες των διαφόρων χρωστικών ουσιών που υπάρχουν στα κύτταρα του διατόμου όταν αυτό αναπτύσσεται στις συγκεκριμένες συνθήκες φωτισμού.



Εικόνα 31 : Φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου *P.Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από λευκό φως εντάσεως : (a)150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (b) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Κάθε φάσμα προκύπτει από το μέσο όρο 40 λήψεων διάρκειας 1 λεπτού η κάθε μία και η ακτινοβολία διέγερσης ήταν 442nm.

Στην εικόνα 31 παρουσιάζονται τα φάσματα Raman που προέρχονται από τα κύτταρα του διατόμου *P.Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από λευκό φως εντάσεως : (a)150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (b) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Οι διαφορετικές περιοχές A-E έχουν χωριστεί με αυτό τον τρόπο για καλύτερη ευκρίνεια των αποτελεσμάτων. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου σε ζωντανά κύτταρα του οργανισμού έτσι ώστε οι συνθήκες να προσεγγίζουν αυτές της φυσιολογικής του λειτουργίας. Για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν περίπου 15 διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από την ίδια καλλιέργεια για την αποφυγή της αλλοίωσης των κυττάρων λόγω της ακτινοβολίας διέγερσης. Το αποτέλεσμα των μετρήσεων είναι ο μέσος όρος 40-50 λήψεων διάρκειας 1 λεπτού η κάθε μία.

Τα φάσματα απαρτίζονται από κορυφές οι οποίες οφείλονται σε δονήσεις προερχόμενες τόσο από τα καροτενοειδή που υπάρχουν στο δείγμα, όσο και από τα δύο είδη χλωροφύλλης. Σε αρκετές περιπτώσεις υπάρχει αλληλοεπικάλυψη των συνεισφορών από διαφορετικής προελεύσεως κορυφές. Παρόλα αυτά η τεχνική αυτή αποτελεί σημαντικό εργαλείο τόσο για

το χαρακτηρισμό των δειγμάτων ως προς τη σύσταση τους, όσο και ως προς τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων που τα απαρτίζουν. Όπως έχει αναφερθεί και στο κεφάλαιο 2, τα καροτενοειδή εμφανίζουν τέσσερις ομάδες δονήσεων οι οποίες έχουν τη μεγαλύτερη ένταση. Η ν_1 εμφανίζεται περίπου στους $1520-1530\text{ cm}^{-1}$ και αποδίδεται σε δονήσεις τάσεως των διπλών δεσμών $C=C$ στα καροτενοειδή. Η θέση εμφάνισής τους εξαρτάται από το μήκος συζυγίας της αλυσίδας του πολυμερούς. Το πλάτος στο μέσο του ύψους της κορυφής που αντιστοιχεί στη συγκεκριμένη δόνηση μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με το πλήθος των διαφορετικών καροτενοειδών που βρίσκονται σε ένα κύτταρο (23,24). Η ν_2 εμφανίζεται περίπου στους 1160 cm^{-1} και οφείλεται στις δονήσεις τάσεως των απλών δεσμών $C-C$. Γύρω από την κύρια δόνηση εμφανίζονται δορυφορικές δονήσεις οι οποίες μπορούν να συσχετιστούν με τη διάταξη των καροτενοειδών (12,23,24). Η ν_3 οφείλεται στις δονήσεις κάμψης εντός επιπέδου των μεθυλομάδων που βρίσκονται προσκολλημένες στην αλυσίδα του πολυμερούς σε συνδυασμό με τις δονήσεις κάμψης εντός επιπέδου $C-H$ και εμφανίζεται περίπου στους 1005 cm^{-1} . Η ν_4 εμφανίζεται περίπου στους 960 cm^{-1} και οφείλεται στις εκτός επιπέδου παλλόμενες δονήσεις (wagging) $C-H$ σε συνδυασμό με τις δονήσεις στρέψης $C=C$ (12,23,24).

Στην εικόνα 31A παρουσιάζονται οι δονήσεις στην περιοχή $870-1080\text{ cm}^{-1}$. Οι κορυφές στους 953 και 963 cm^{-1} αποδίδεται στην ν_4 των Fx/Dd ενώ στους 986 cm^{-1} στην ν_4 της Dd . Οι κορυφές στους $1004/1014\text{ cm}^{-1}$ οφείλονται στην ν_3 της Dd/Dt και Fx . Οι κορυφές στους $918,953$ και 1048 cm^{-1} προέρχονται από την $Chl-a$ και έχουν παρόμοιες εντάσεις για όλα τα φάσματα που παρουσιάζονται (9). Επίσης παρατηρείται μια μικρή διαφοροποίηση στην ένταση της δόνησης στους 963 cm^{-1} όμως οι σημαντικότερες διαφοροποιήσεις εμφανίζονται στην περιοχή των δονήσεων στους $1004/1014\text{ cm}^{-1}$. Στην περίπτωση του δείγματος που έχει αναπτυχθεί σε συνθήκες HL εμφανίζεται μια ευρεία δόνηση με κέντρο στους 1011 cm^{-1} (φάσμα b) η οποία αποδίδεται στην αύξηση της συγκέντρωσης των καροτενοειδών Dd και Dt στο δείγμα. Αυτό είναι αναμενόμενο μιας και πρόκειται για τις χρωστικές ουσίες οι οποίες συμμετέχουν στον βασικό φωτο-προστατευτικό μηχανισμό του οργανισμού ο οποίος είναι ενεργός στις συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιούνται τα πειράματα.

Στην εικόνα 31B παρουσιάζεται η περιοχή όπου βρίσκονται οι ομάδες δονήσεων της ν_2 των καροτενοειδών. Οι δονήσεις στους $1159,1183,1211,1230\text{ cm}^{-1}$ αποδίδονται στην Fx ενώ οι δονήσεις στους 1190 και 1211 cm^{-1} στις Dd/Dt το οποίο μπορεί να εξηγήσει την

παρατηρούμενη αύξηση της έντασης τους στο φάσμα b. Τέλος, οι δονήσεις στους 1135 και 1144 cm^{-1} οφείλονται στις χλωροφύλλες a και c(9-10,25-26). Μεταξύ 1300-1400 cm^{-1} εμφανίζονται οι δονήσεις τάσεως $\nu(\text{C}_a\text{N})$ οι οποίες παρουσιάζονται στην εικόνα 31C. Οι δονήσεις στους 1329,1342 και 1377 cm^{-1} αποδίδονται στην παρουσία Chl-a και είναι χαρακτηριστικές τους μορίου αυτού όταν παρουσιάζει αριθμό συναρμογής 5 και 6. Οι δονήσεις τάσεως C-N στους 1355 και 1361 cm^{-1} αποδίδονται αποκλειστικά στην Chl-c και απουσιάζουν από τη Chl-a λόγω του κορεσμένου δεσμού στη θέση C17-C18(10,27). Στην περίπτωση των δονήσεων που προέρχονται από την Chl-a δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των δύο δειγμάτων, αντίθετα στις δονήσεις που προέρχονται από την Chl-c παρατηρείται αύξηση της δόνησης στους 1355 cm^{-1} και ταυτόχρονη μείωση της δόνησης στους 1361 cm^{-1} όταν το δείγμα αναπτύσσεται κάτω από HL. Αυτή η παρατήρηση αποδίδεται σε μια διαφορετική διαμόρφωση (conformation) της Chl-c το οποίο οδηγεί στις παρατηρούμενες αλλαγές(13). Η ύπαρξη της Chl-c σε δύο διαμορφώσεις στα κύτταρα κάποιων διατόμων είναι γνωστή, για πρώτη φορά όμως γίνεται σύνδεση τους με την απόκριση του οργανισμού ανάλογα με την ένταση του φωτισμού ανάπτυξης.

Στην εικόνα 31D παρατηρείται μια κορυφή στους 1528 cm^{-1} η οποία αποδίδεται σε δονήσεις τάσεως των διπλών δεσμών C=C στα καροτενοειδή. Σε όλες τις περιπτώσεις η κορυφή αυτή έχει F.W.H.M. περίπου 20 cm^{-1} κάτι το οποίο υποδεικνύει πως αποτελεί την υπέρθεση περισσότερων από μια κορυφών και έτσι επιβεβαιώνεται η παρουσία περισσότερων του ενός καροτενοειδών στο δείγμα(12). Στην περίπτωση του φάσματος b υπάρχει μια ενίσχυση του σήματος καθώς και μια πολύ μικρή μετατόπιση προς υψηλότερες συχνότητες η οποία αποδίδεται στην παρουσία των καροτενοειδών Dd/Dt. Η κορυφή στους 1555 cm^{-1} και ο ώμος που εμφανίζεται στους 1550 cm^{-1} προέρχονται από τις δονήσεις $\nu(\text{C}_a\text{C}_b)$ των χλωροφύλλων a και c(9,10,25).

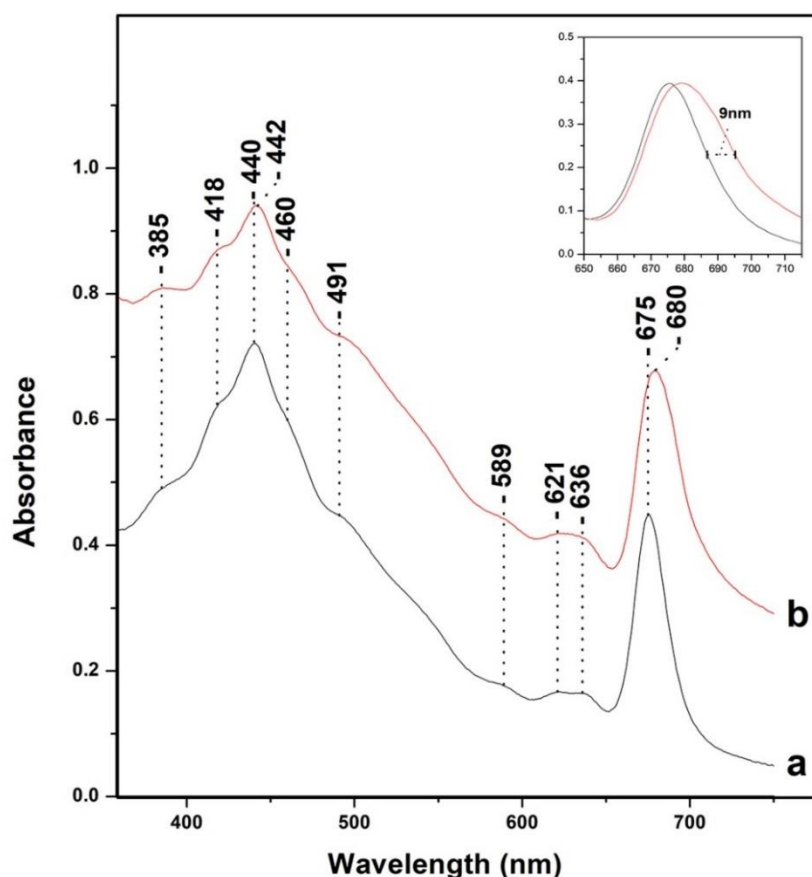
Στην εικόνα 31E, η κορυφή στους 1607 cm^{-1} προέρχεται από τις δονήσεις τάσεως $\nu(\text{C}_a\text{C}_m)$ (methine bridge) των χλωροφύλλων a και c και η συχνότητα στην οποία εμφανίζεται εξαρτάται από τη συναρμογή του κεντρικού ιόντος μαγνησίου της χλωροφύλλης(10,25). Η δόνηση στους 1629 cm^{-1} οφείλεται στις δονήσεις τάσεως της συζευγμένης ομάδας βινυλίου ($\text{R}-\text{CH}=\text{CH}_2$) στη θέση C₂. Γενικά, οι δονήσεις $\nu(\text{C}_a\text{C}_m)$ εμφανίζονται περίπου στους 1600 cm^{-1} όταν το ιόν Mg^{2+} έχει αριθμό συναρμογής 6 και εμφανίζει μικρή παραμόρφωση λόγω του πρωτεϊνικού του περιβάλλοντος ενώ μετατοπίζεται προς τους 1612-1615 cm^{-1} όταν ο

αριθμός συναρμογής γίνει 5(26). Έτσι, η δόνηση στους 1607 cm^{-1} μπορεί να προέρχεται είτε από Mg^{2+} με αριθμό συναρμογής 5 το οποίο βρίσκεται σε ασυνήθιστα επίπεδο συζευγμένο σύστημα, είτε από Mg^{2+} με αριθμό συναρμογής 6 που παρουσιάζει παραμόρφωση λόγω του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος. Όταν το Mg^{2+} αλληλοεπιδρά με κατάλοιπο ιστιδίνης οι δονήσεις αυτές μετατοπίζονται προς τους $1612\text{-}1615\text{ cm}^{-1}$ (10,26), επομένως η εμφάνιση της εν λόγω δόνησης στους 1607 cm^{-1} οδηγεί στο συμπέρασμα πως τα μόρια Chl-a/c δεν είναι ιδιαίτερα πιθανό να αλληλεπιδρούν με ένα τόσο ισχυρό υποκαταστάτη. Από όλες τις πληροφορίες που προσφέρουν τα φάσματα Raman προκύπτει πως το Mg^{2+} στα περισσότερα ή σε όλα τα μόρια Chl-a/c έχουν αριθμό συναρμογής 5 ή υπάρχουν και μερικά μόρια με αριθμό συναρμογής 6 τα οποία όμως έχουν ασθενείς αξονικούς υποκαταστάτες.

Οι δονήσεις τάσεως των καρβονυλίων ($\text{C}=\text{O}$) που εμφανίζονται στους 1659 cm^{-1} οφείλονται στην Fx, ενώ στην περιοχή $1670\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ στις δονήσεις $\nu(\text{C}_{13}=\text{O})$ των Chl-a/c(10). Γενικά, οι συγκεκριμένες δονήσεις σε μη-πολικό περιβάλλον εμφανίζονται στους 1700 cm^{-1} χωρίς την παρουσία δεσμών υδρογόνου και μετατοπίζονται μέχρι και 45 cm^{-1} προς τα κάτω όσο ισχυρότερος είναι ο δεσμός υδρογόνου με τον οποίο αλληλοεπιδρούν. Στην περίπτωση πολικού περιβάλλοντος προκαλούνται μικρότερες μετατοπίσεις της τάξεως των 10 cm^{-1} (10,25,26). Η ευρεία κορυφή που παρατηρείται στους 1682 cm^{-1} υποδηλώνει την παρουσία πολλών διαφορετικών αλληλεπιδράσεων με το χημικό περιβάλλον των Chl-a/c. Η μείωση της έντασης στο φάσμα b σε συνδυασμό με τις παρατηρήσεις σχετικά με τις αλλαγές που παρατηρήθηκαν στις δονήσεις $\nu(\text{C}_a\text{N})$ της Chl-c, οδηγούν στο συμπέρασμα πως κάτω από συνθήκες HL ένα μέρος του πληθυσμού των Chl-c υπόκειται σε διαμοριακές αλληλεπιδράσεις στο χημικό τους περιβάλλον οι οποίες είναι πολύ διαφορετικές σε σχέση με την περίπτωση που αναπτύσσεται σε συνθήκες IL. Σε συνδυασμό με την αύξηση των καρροτενοειδών Dd και Dt στο δείγμα καθώς και τη δραματική μείωση στην παρουσία red-Fx, αποτελούν συνολικά την απόκριση του οργανισμού σε αυτές τις συνθήκες. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως σύμφωνα με την πρώτη δημοσιευμένη κρυσταλλική δομή συμπλόκου συλλογής φωτός από το διάτομο *P.Tricornutum* (4), τα μόρια red-Fx βρίσκονται σε ιδιαίτερα κοντινή απόσταση με τα μόρια Chl-c (3.5 \AA) και αλληλοεπιδρούν με δεσμούς υδρογόνου με αυτά, κάνοντας πιθανό τα δύο αυτά αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν να οφείλονται σε κάποιο κοινό μηχανισμό.

3.3.2 Ανάπτυξη του διατόμου *P.Tricornutum* κάτω από κόκκινο φως

Όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, κάποια είδη πτεροειδών διατόμων, όπως το είδος *P.Tricornutum*, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες φωτισμού εμφανίζει ένα ποσοστό μορίων Chl-a το οποίο παρουσιάζει μετατόπιση στην απορρόφηση προς το ερυθρό (14). Οι συνθήκες αυτές είναι η ανάπτυξη κάτω από κόκκινο φως ή κάτω από μικρής διάρκειας και έντασης λευκό φως(14,28). Η ιδιότητα αυτή έχει εντοπιστεί πως οφείλεται στη σύνθεση συγκεκριμένων πρωτεϊνών οι οποίες έχουν ταυτοποιηθεί(15,16). Παρόλα αυτά μέχρι σήμερα δεν έχει πραγματοποιηθεί κάποια φασματοσκοπική μελέτη στα κύτταρα αυτών των οργανισμών έτσι ώστε να εξακριβωθεί ο μηχανισμός με τον οποίο πραγματοποιείται η τροποποίηση των ιδιοτήτων της Chl-a που οδηγεί στην απορρόφηση φωτός μικρότερης ενέργειας από αυτά τα μόρια. Στη συνέχεια θα γίνει σύγκριση των φασμάτων κυττάρων του διατόμου *P.Tricornutum* που έχουν αναπτυχθεί κάτω από λευκό και κόκκινο φως καθώς και διερεύνηση της επίδρασης του κόκκινου φωτός για διαφορετικό χρονικό διάστημα.

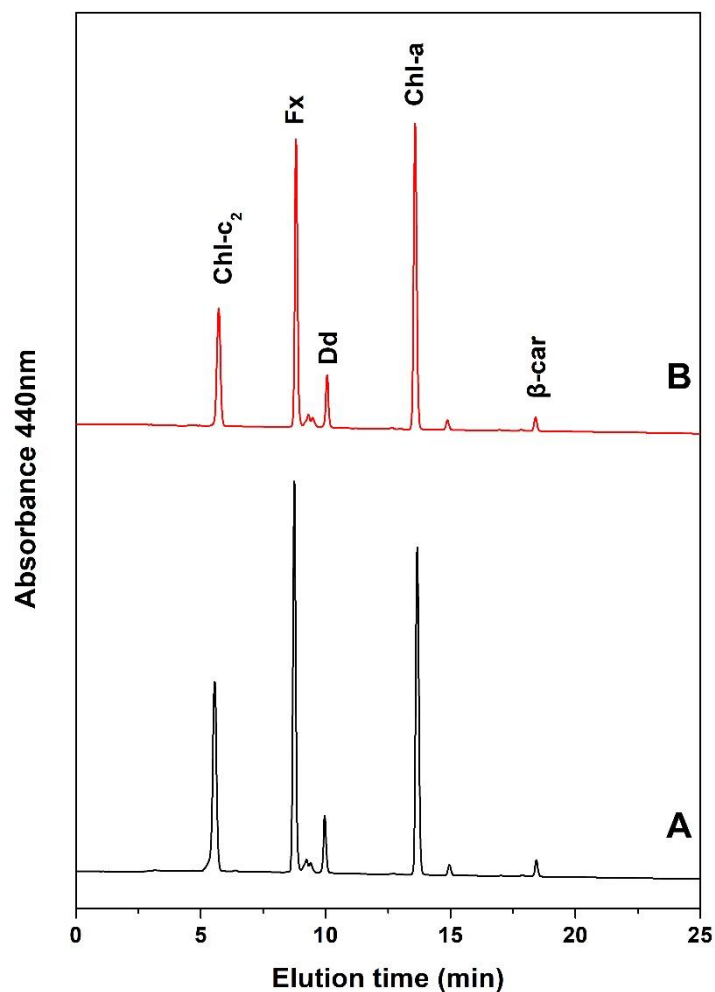


Εικόνα 32 : Φάσματα απορρόφησης ορατού-υπεριώδους των κυττάρων του διατόμου *P.Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (α) λευκού φωτός (b) κόκκινου φωτός.

Στην εικόνα 32 παρουσιάζεται το φάσμα απορρόφησης ορατού - υπεριώδους των κυττάρων του διατόμου *P. Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Low Light, LL) λευκού (φάσμα a) και κόκκινου φωτός (φάσμα b). Η μεγάλη διαφορά που εμφανίζουν τα δύο φάσματα εντοπίζεται στη θέση της απορρόφησης της Qy που οφείλεται στην Chl-a. Παρατηρείται μια μετατόπιση από τα 675 nm για τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε λευκό φως στα 680 nm για τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν με κόκκινο φως καθώς και αύξηση του πλάτους της κορυφής κατά 9 nm προς το ερυθρό. Οι πιο πάνω διαφορές μπορούν να αποδοθούν σε κάποια μόρια Chl-a τα οποία, λόγω του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται, εμφανίζουν μεταβολή στα ενεργειακά τους επίπεδα. Τα μόρια Chl-a με αυτά τα χαρακτηριστικά συμμετέχουν σε ξεχωριστά σύμπλοκα συλλογής φωτός τα οποία διαθέτουν μια χαρακτηριστική εκπομπή στο φάσμα φθορισμού στα 710 nm που στη βιβλιογραφία αναφέρεται ως F710(15,16). Η μείωση στην απορρόφηση που παρατηρείται στην περιοχή 380-580 nm στο φάσμα b οφείλεται στη μείωση της συγκέντρωσης των καροτενοειδών και της Chl-c σε σχέση με την Chl-a στο δείγμα, όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα της ανάλυσης με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης που παρουσιάζονται στην εικόνα 33.

Ο πίνακας 4 περιέχει τα αποτελέσματα υπολογισμών σχετικά με την περιεκτικότητα των δειγμάτων σε διάφορες χρωστικές ουσίες εκφρασμένες σε mole ουσίας ανά mole Chl-a.

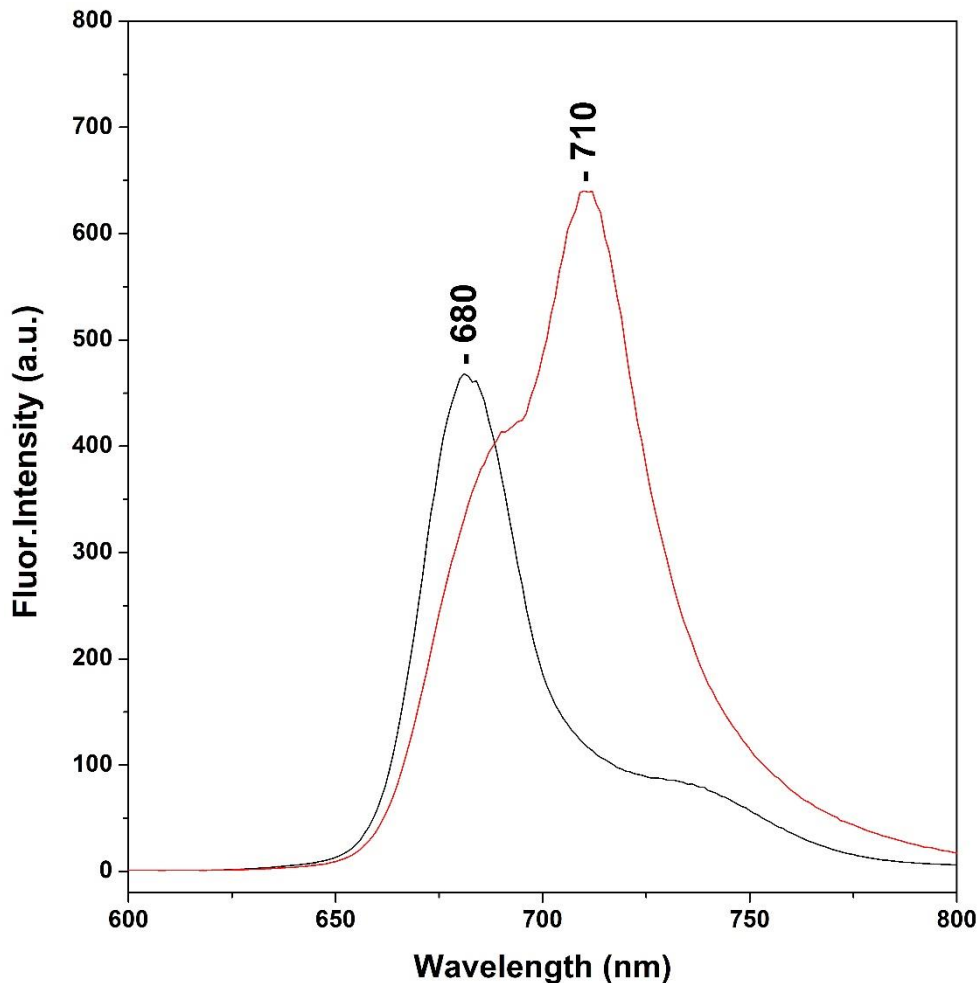
Από τους υπολογισμούς που παρουσιάζονται στον πίνακα 4 φαίνεται πως υπάρχει μείωση στη συγκέντρωση του καροτενοειδούς Fx και της Chl-c στο δείγμα που αναπτύχθηκε κάτω από κόκκινο φως. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με αντίστοιχη μελέτη στη βιβλιογραφία (15).



Εικόνα 33 : Χρωματογράφημα διαχωρισμού των χρωστικών ουσιών από τα κύτταρα του διατόμου *P.Tricornutum* σε μεθανόλη. Τα κύτταρα έχουν αναπτυχθεί κάτω από (A) λευκό (B) κόκκινο φως.

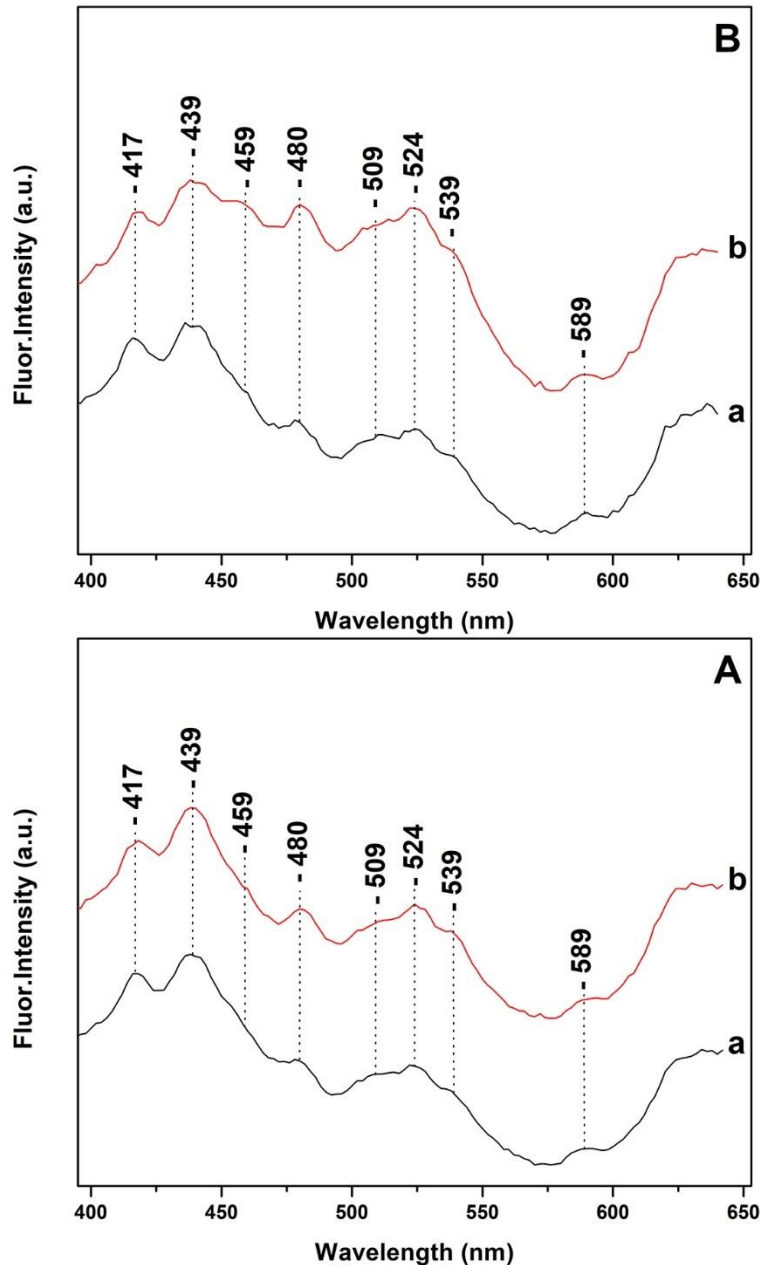
Culture	Chl-c (mol/mol Chl a)	Fx(mol/mol Chl a)	Dd(mol/mol Chl a)
White	0.15	0.62	0.08
Red	0.12	0.55	0.08

Πίνακας 4 : Περιεκτικότητα δειγμάτων σε χλωροφύλλη c (Chl-c), φουκοξανθίνη (Fx) και διαδινοξανθίνη (Dd) ως προς τη χλωροφύλλη α (Chl-a).



Εικόνα 34 : Κανονικοποιημένα φάσματα φθορισμού εκπομπής με διέγερση στα 440 nm για τα κύτταρα του διατόμου *P.Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί με χρήση λευκού φωτός (μαύρη γραμμή) και κόκκινου φωτός (κόκκινη γραμμή).

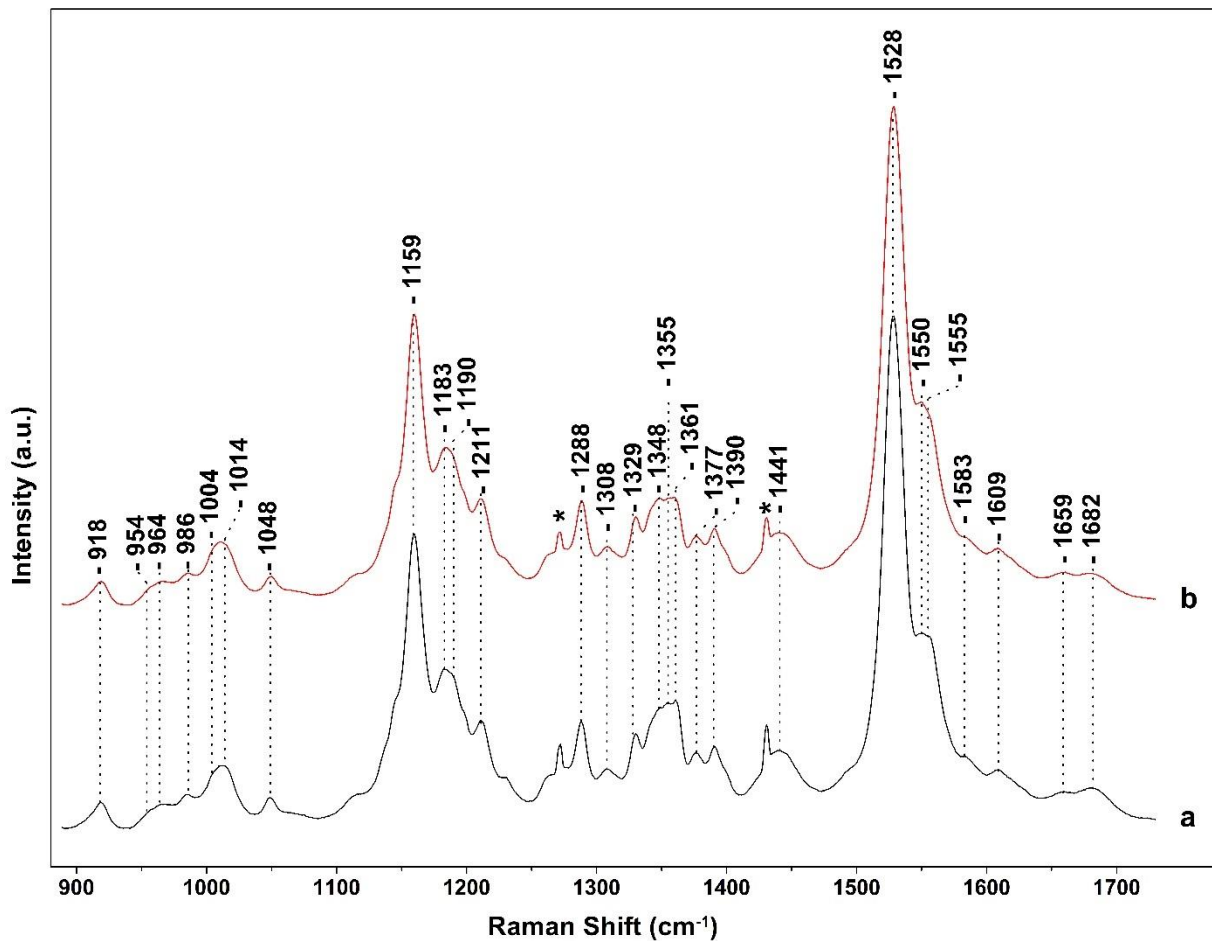
Στην εικόνα 34 παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού εκπομπής με διέγερση στα 440 nm. Για τα κύτταρα του διατόμου τα οποία αναπτύχθηκαν κάτω από λευκό φως εμφανίζεται μια κορυφή στα 680 nm ενώ για τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν κάτω από κόκκινο φως η κύρια κορυφή εμφανίζεται στα 710 nm . Όλες οι κορυφές οφείλονται σε εκπομπή προερχόμενη από την Chl-a (14-16,28) και οι παρατηρούμενες μετατοπίσεις οφείλονται στις ενεργειακές μεταβολές που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Η σχετική ένταση της εκπομπής στα 680 nm και 710 nm για τα δύο δείγματα παρουσιάζεται στα κανονικοποιημένα φάσματα φθορισμού διέγερσης της εικόνας 35. Οι εντάσεις έχουν κανονικοποιηθεί στην κορυφή στα 439 nm.



Εικόνα 35 : Κανονικοποιημένα φάσματα φθορισμού διέγερσης (A) στα 680 nm και (B) στα 710 nm των κυττάρων του διατόμου *P. Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί με φως (a) λευκό και (b) κόκκινο, εντάσεως $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Στην εικόνα 35A όπου παρουσιάζεται το φάσμα φθορισμού διέγερσης στα 680 nm δεν παρατηρείται κάποια διαφορά μεταξύ των δύο δειγμάτων. Αντίθετα στο φάσμα φθορισμού διέγερσης στα 710 nm της εικόνας 35B φαίνεται αύξηση των κορυφών στην περιοχή 450-550 nm στην περίπτωση των κυττάρων που έχουν αναπτυχθεί με κόκκινο φως. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα πως τα σύμπλοκα που περιέχουν τα μόρια Chl-a

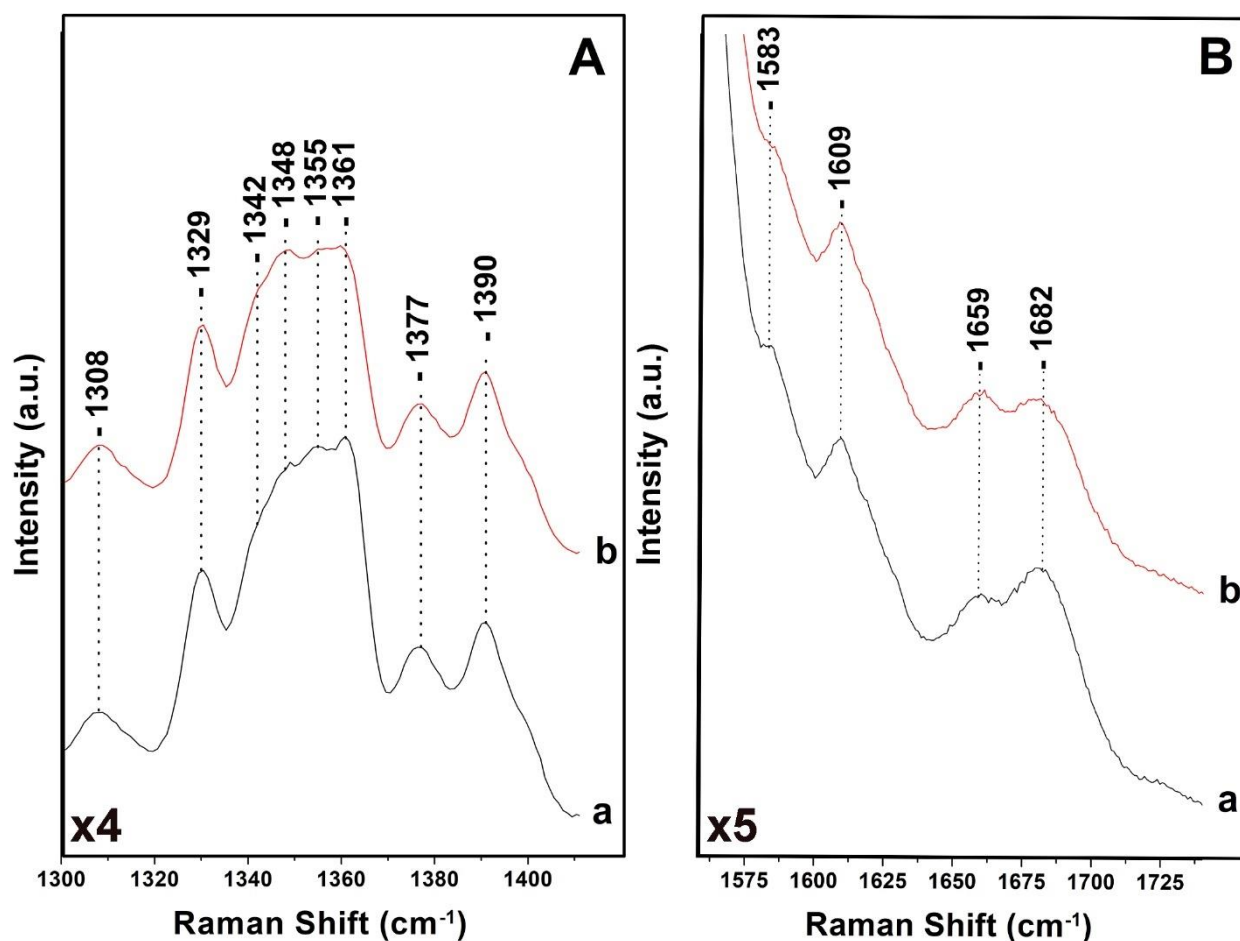
χαμηλότερης ενέργειας εμφανίζουν διαφορετικές ιδιότητες ως προς τη μεταφορά ενέργειας σε σχέση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα που υπάρχουν στα κύτταρα (28).



Εικόνα 36 : Φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου *P.Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (α) λευκού φωτός (β) κόκκινου φωτός. Η λήψη των φασμάτων έγινε σε θερμοκρασία -70°C .

Στην εικόνα 36 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα φάσματα Raman για τα δύο δείγματα. Η λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία -70°C , η διάρκεια λήψης του κάθε φάσματος ήταν 20 λεπτά και το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης 442 nm . Οι δονήσεις που αντιστοιχούν στα καρβοτενοειδή και έχουν αναφερθεί αναλυτικά στην προηγούμενη ενότητα ενισχύουν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη φασματοσκοπία απορρόφησης και την ανάλυση με υγρή χρωματογραφία πως δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο δειγμάτων ως προς τη σύσταση των καρβοτενοειδών. Αντίθετα τόσο στην περιοχή μεταξύ $1300\text{-}1400 \text{ cm}^{-1}$ όσο και στην περιοχή $1640\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$ εμφανίζονται

σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δύο δείγματα. Στην εικόνα 37 που ακολουθεί εμφανίζονται οι συγκεκριμένες περιοχές σε μεγέθυνση.

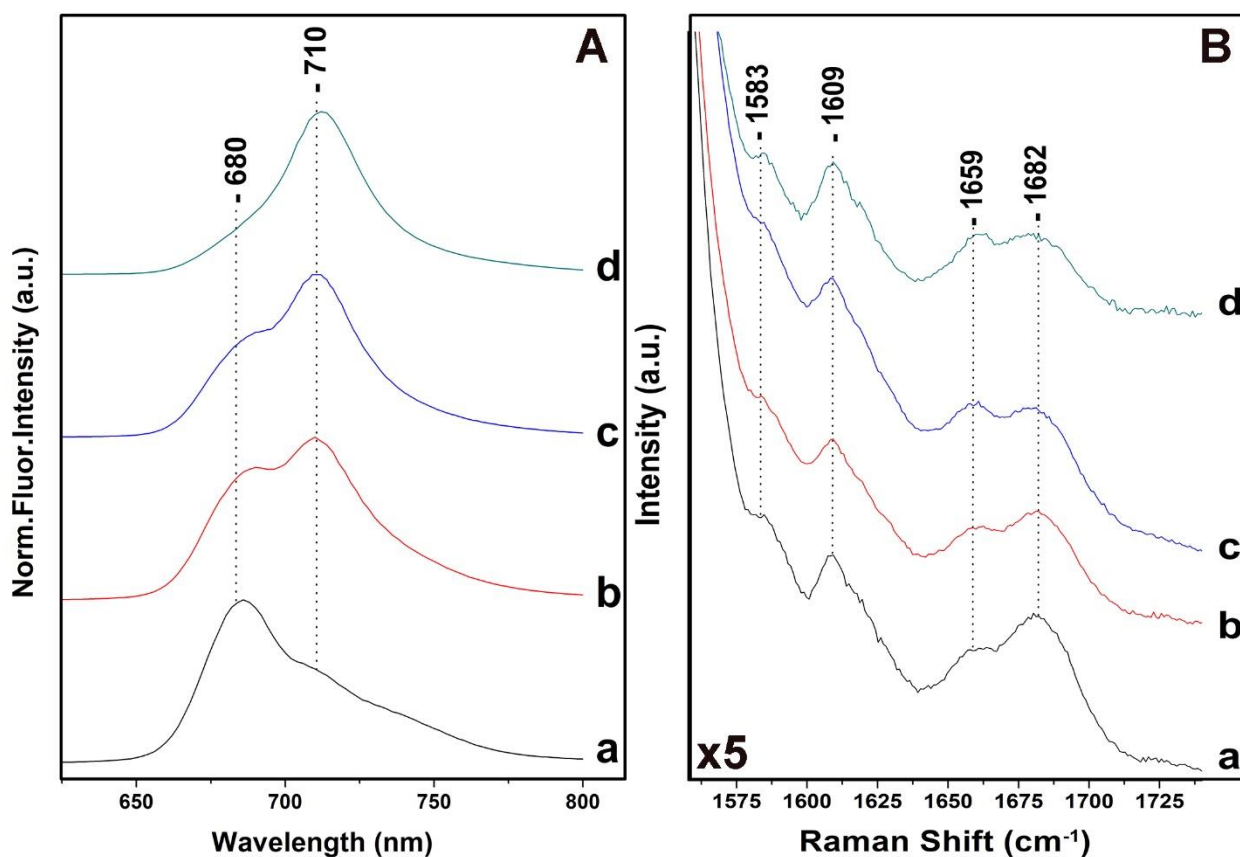


Εικόνα 37 : Φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου *P.Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί με φως (α) λευκό και (β) κόκκινο, εντάσεως $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Στην εικόνα 37A παρουσιάζεται η περιοχή εμφάνισης των χαρακτηριστικών δονήσεων C-N που αποδίδονται στα μόρια Chl-a/c. Παρατηρείται μια σημαντική μείωση στη σχετική ένταση της κορυφής στους 1361 cm^{-1} στο δείγμα το οποίο έχει αναπτυχθεί κάτω από κόκκινο φως. Όπως έχει αναφερθεί στην προηγούμενη ενότητα οι δονήσεις στους 1355 και 1361 cm^{-1} προέρχονται αποκλειστικά από μόρια Chl-c και αντιστοιχούν σε διαφορετικές διαμορφώσεις που εμφανίζουν. Η διαφορά που παρατηρείται μπορεί να αποτελεί ένδειξη διαφορετικών συμπλόκων συλλογής φωτός σε κάθε δείγμα και κατά συνέπεια μεταβολών στη διαμόρφωση των μορίων Chl-c σε αυτά. Στην εικόνα 37B παρουσιάζονται τα φάσματα Raman στην περιοχή $1640\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$ όπου εμφανίζονται οι δονήσεις τάσεως των καρβονυλίων (C=O). Είναι εμφανές πως στο φάσμα b που αφορά τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν κάτω από

κόκκινο φως παρατηρείται μείωση της έντασης της κορυφής που εμφανίζεται στους 1682 cm^{-1} η οποία οφείλεται σε μετατόπιση των επί μέρους συνεισφορών που απαρτίζουν την κορυφή προς χαμηλότερες συχνότητες. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί αν θεωρήσουμε πως ένας αριθμός μορίων χλωροφύλλης εμφανίζει πιο ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται κάτω από αυτές τις συνθήκες σε σχέση με την ανάπτυξη σε λευκό φως. Πιο συγκεκριμένα, είναι γνωστό πως η παρουσία δεσμών υδρογόνου στη θέση C13 της Chl-a μπορεί να επηρεάσει τις ιδιότητες απορρόφησης της ουσίας οδηγώντας σε παρατηρούμενες μετατοπίσεις τόσο στις Soret όσο και στις Q bands του μορίου(29,30). Γενικά, ελεύθερα καρβονύλια εμφανίζουν κορυφή στα φάσματα Raman περίπου στους 1700 cm^{-1} , όταν όμως δημιουργηθεί δεσμός υδρογόνου μεταξύ του οξυγόνου και κάποιου μορίου στο περιβάλλον του, όπως για παράδειγμα νερό, κάποιο κατάλοιπο αμινοξέως ή ακόμη και με το κεντρικό άτομο μαγνησίου άλλου μορίου χλωροφύλλης, παρατηρείται μείωση στη θέση εμφάνισης της κορυφής μέχρι και 45 cm^{-1} ανάλογα με την ισχύ του δεσμού(10,29). Εκτός από τους δεσμούς υδρογόνου, παρόμοιο αποτέλεσμα αναμένεται να έχουν και οι παραμορφώσεις του μορίου οι οποίες όμως εάν υπήρχαν θα εμφανίζονταν αλλαγές μεταξύ των φασμάτων στην περιοχή $1500\text{-}1615\text{ cm}^{-1}$ η οποία περιέχει δονήσεις ευαίσθητες σε τέτοιου είδους μεταβολές(28), όπως είχε αναφερθεί αναλυτικά και σε προηγούμενη ενότητα του κεφαλαίου. Τέτοιες διαφορές δεν εμφανίζονται στα φάσματα της εικόνας 37 επομένως η παρατηρούμενη μετατόπιση στην απορρόφηση ενός ποσοστού των μορίων της Chl-a στο δείγμα μπορεί να αποδοθεί σε ισχυρότερους δεσμούς υδρογόνου που δημιουργούνται όταν ο οργανισμός αναπτύσσεται κάτω από κόκκινο φως σε σχέση με την περίπτωση που αναπτύσσεται κάτω από λευκό φως.

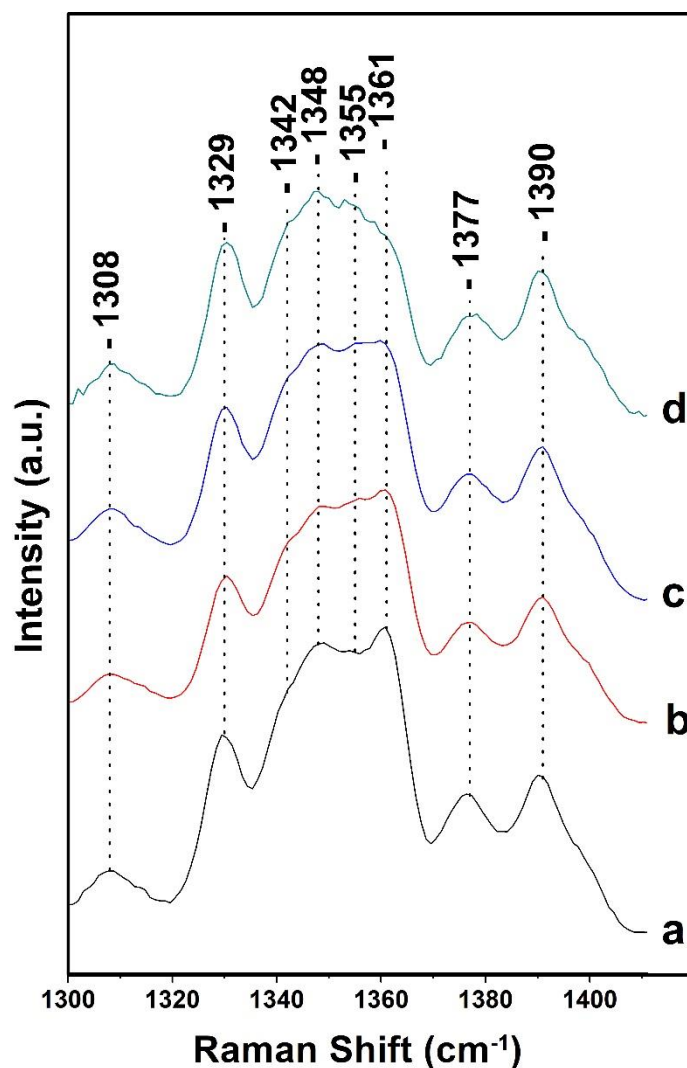
Για την περαιτέρω διερεύνηση της πιο πάνω υπόθεσης, έγινε λήψη των φασμάτων φθορισμού εκπομπής και Raman μετά από διαφορετικό χρόνο ανάπτυξης των διατόμων σε κόκκινο φως, συγκεκριμένα μετά από 2,5,7 και 9 μέρες. Σκοπός ήταν να αυξηθεί ο πληθυσμός των επηρεαζόμενων μορίων Chl-a έτσι ώστε τα αποτελέσματα να μπορούν να συσχετιστούν με τις παρατηρούμενες αλλαγές στα φάσματα Raman. Τα αντίστοιχα φάσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 38. Για τα φάσματα φθορισμού εκπομπής έχει γίνει κανονικοποίηση ως προς την υψηλότερη κορυφή για καλύτερη σύγκριση των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 38 : (A) Φάσματα φθορισμού εκπομπής και (B) φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου *P. Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί με κόκκινο φως εντάσεως $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για χρονική διάρκεια (α) 2 (β) 5 (γ) 7 (δ) 9 ημερών.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 38, με την πάροδο του χρόνου ανάπτυξης κάτω από κόκκινο φως, η ένταση της κορυφής εκπομπής στα 710 nm αυξάνεται υποδηλώνοντας πως στο δείγμα υπάρχει μεγαλύτερος πληθυσμός Chl-a που προκαλούν τη συγκεκριμένη εκπομπή. Για τα ίδια δείγματα πραγματοποιήθηκε η λήψη των φασμάτων Raman όπου φαίνεται πως υπάρχει η τάση μείωσης της έντασης της ευρείας κορυφής στους 1682 cm^{-1} και η εμφάνιση συνεισφορών σε χαμηλότερες συχνότητες, κάτι το οποίο ενισχύει την υπόθεση πως κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες, οι αλληλεπιδράσεις ενός ποσοστού των μορίων της Chl-a με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται οδηγούν στη δημιουργία ισχυρότερων δεσμών υδρογόνου οι οποίοι έχουν ως συνέπεια την μεταβολή των ιδιοτήτων απορρόφησης της ουσίας. Αυτή η μεταβολή φαίνεται πως ευνοεί την ανάπτυξη του οργανισμού σε συνθήκες όπου το φως το οποίο φτάνει σε αυτό έχει κατά κύριο λόγο μήκη κύματος στην περιοχή του ερυθρού μιας

και τα μόρια Chl-a μπορούν να απορροφήσουν αυτά τα φωτόνια κατευθείαν και να τα αξιοποιήσουν για παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο μέσω της φωτοσύνθεσης.



Εικόνα 39 : (Α) Φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου *P.Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί με κόκκινο φως εντάσεως $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για χρονική διάρκεια (α) 2 (β) 5 (γ) 7 (δ) 9 ημερών.

Σχετικά με την παρουσία διαφορετικών διαμορφώσεων των μορίων Chl-c στα δείγματα, από την εικόνα 39 φαίνεται πως η παρατηρούμενη μείωση στη σχετική ένταση της κορυφής στους 1361 cm^{-1} γίνεται μεγαλύτερη με την αύξηση του χρονικού διαστήματος ανάπτυξης του διατόμου κάτω από κόκκινο φως και κατά συνέπεια μπορεί να αποδοθεί στις συνθήκες αυτές. Συνοψίζοντας τις παρατηρήσεις αυτής της ενότητας, όταν τα κύτταρα του διατόμου *P.Tricornutum* αναπτύσσονται κάτω από κόκκινο φως εμφανίζονται μόρια Chl-a που έχουν την ιδιότητα να απορροφούν φως μικρότερης ενέργειας από τα αντίστοιχα μόρια Chl-a που

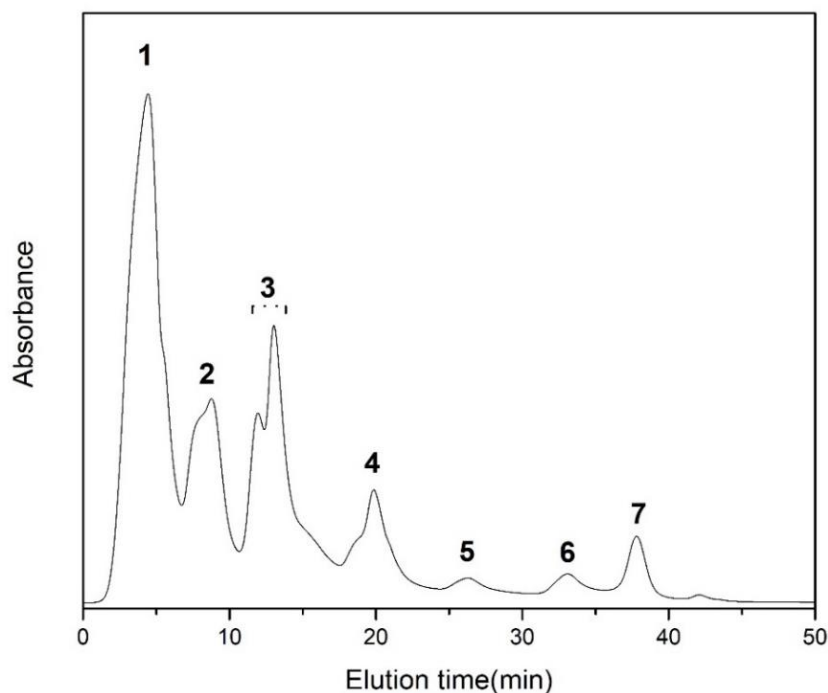
παράγονται από τα κύτταρα όταν αυτά αναπτύσσονται με λευκό φως. Η προέλευση τους αποδίδεται στη συμμετοχή των μορίων σε σύμπλοκα συλλογής φωτός και συγκεκριμένα σε δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται εντός του συμπλόκου με τα μόρια Chl-a.

Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε μια μεταβολή στην αναλογία δύο χαρακτηριστικών κορυφών που αντιστοιχούν σε διαφορετικές διαμορφώσεις των μορίων Chl-c στα δείγματα, ενισχύοντας έτσι περισσότερο την άποψη πως οι παρατηρούμενες αλλαγές στις ιδιότητες των μορίων Chl-a οφείλονται σε νέα σύμπλοκα συλλογής φωτός τα οποία αναπτύσσονται μόνο όταν χρησιμοποιείται κόκκινο φως για την ανάπτυξη του οργανισμού.

3.3.3 Απομόνωση και χαρακτηρισμός των συμπλόκων συλλογής φωτός του διατόμου *P.Tricornutum*

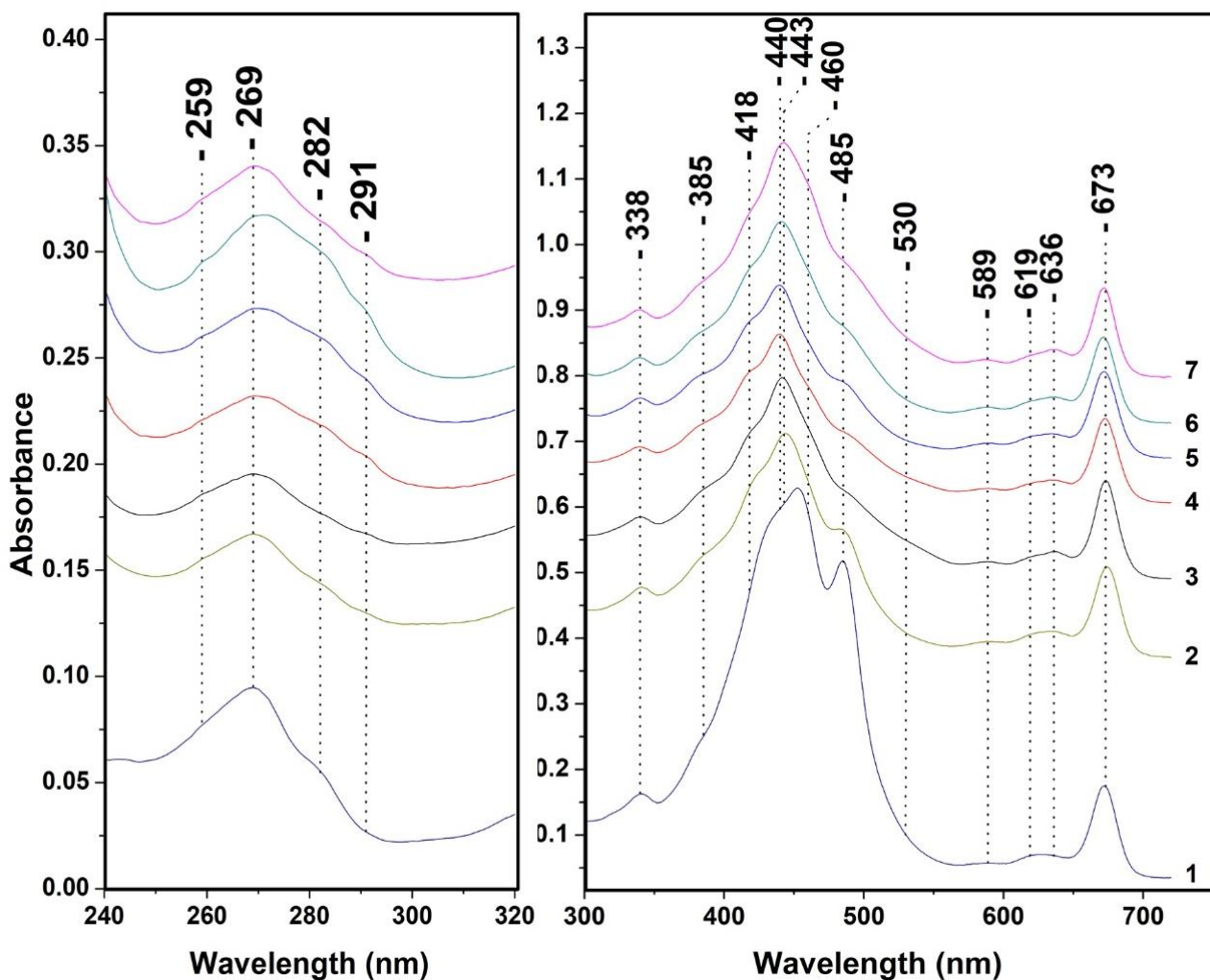
Όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή, τα διάτομα διαθέτουν σύμπλοκα χρωστικών ουσιών και πρωτεϊνών (FCPs) τα οποία είναι υπεύθυνα για τη συλλογή και μεταφορά ενέργειας από το διαθέσιμο φως στο περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται προς τα φωτοσυνθετικά κέντρα. Η φασματοσκοπική μελέτη της λειτουργίας των διατόμων με χρήση των κυττάρων τους έχει πλεονεκτήματα όπως της συνέπειας των πειραματικών αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών ερευνητικών κέντρων, τη δυνατότητα μελέτης ολόκληρου του οργανισμού σε συνθήκες που προσεγγίζουν τη φυσιολογική του λειτουργία και τον σχετικά μικρό χρόνο προετοιμασίας των δειγμάτων. Το μειονέκτημα που παρουσιάζει η πρακτική αυτή είναι η αδυναμία μελέτης των ιδιοτήτων κάθε συμπλόκου ξεχωριστά με σκοπό την κατανόηση του ρόλου του κατά τη διάρκεια της συλλογής και μεταφοράς ενέργειας.

Για το σκοπό αυτό έγινε απομόνωση αυτών των συμπλόκων με χρήση της χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής, όπως περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα της μεθοδολογίας. Το αποτέλεσμα ήταν ο διαχωρισμός του δείγματος σε 7 μέρη τα οποία ακολούθως χαρακτηρίστηκαν με τη χρήση των τεχνικών φασματοσκοπίας απορρόφησης ορατού – υπεριώδους, φθορισμού και Raman.



Εικόνα 40 : Χρωματογράφημα υγρής χρωματογραφίας το οποίο απεικονίζει τα διαφορετικά σύμπλοκα συλλογής φώτος τα οποία προέρχονται από το διάτομο *P.Tricornutum* σε σχέση με το χρόνο διαχωρισμού τους. Το μήκος κύματος ανίχνευσης ήταν τα 440nm.

Στην εικόνα 40 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα που προέκυψε από τον διαχωρισμό των FCPs με τη χρήση χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής. Τα φάσματα απορρόφησης των μερών αυτών απεικονίζονται στην εικόνα 41. Όλα τα φάσματα είναι κανονικοποιημένα προς την απορρόφηση της Chl-a στα 673nm. Στο αριστερό μέρος της εικόνας φαίνεται η υπεριώδης περιοχή απορρόφησης των αμινοξέων, τα οποία αποτελούν τους δομικούς λίθους των πρωτεϊνών. Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό, τα διαφορετικά μέρη που απομονώθηκαν αποτελούνται από διαφορετικά αμινοξέα τα οποία προσδίδουν με τη σειρά τους διαφορετικές ιδιότητες σε κάθε σύμπλοκο. Αυτή η παρατήρηση αποτελεί μια πρώτη ένδειξη για τον επιτυχή διαχωρισμό των συμπλόκων σε διαφορετικά μέρη με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε. Η αναλυτική περιγραφή της σύνθεσης των αμινοξέων κάθε μέρους ξεφεύγει από τους στόχους της συγκεκριμένης εργασίας.

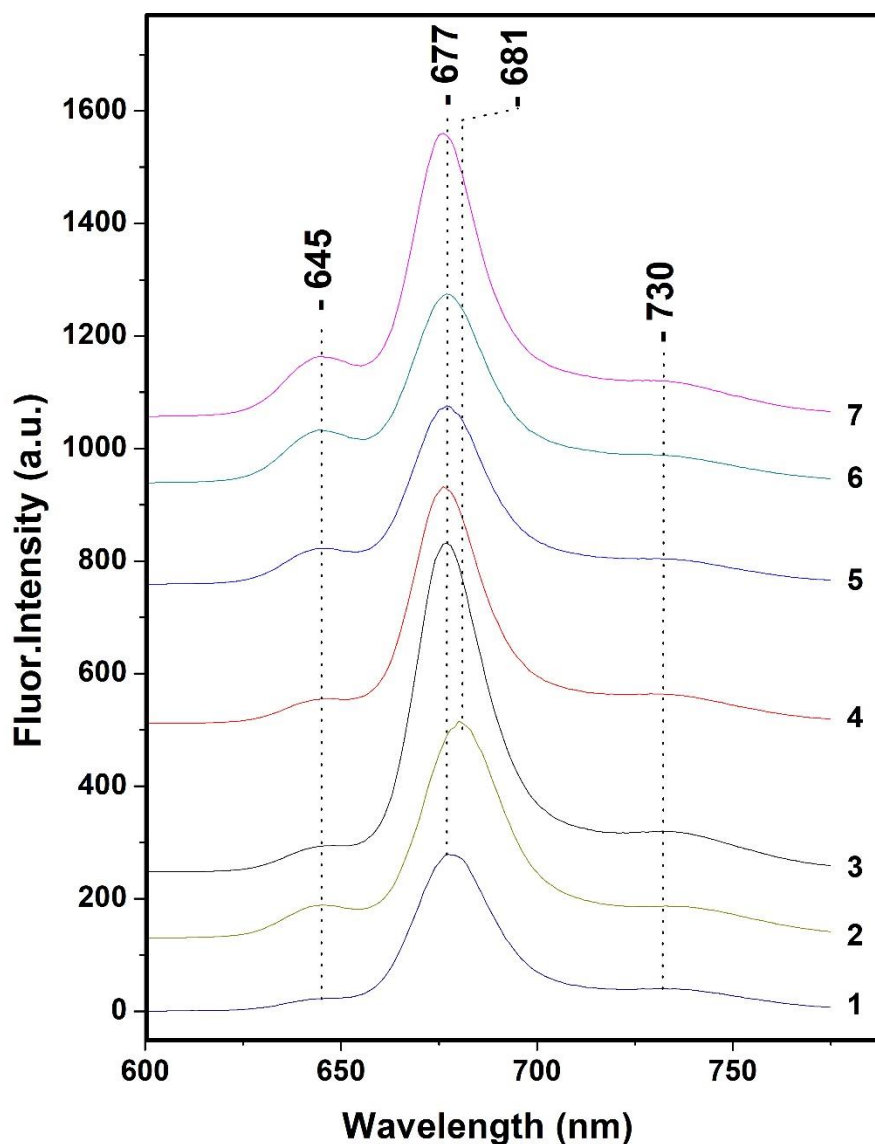


Εικόνα 41 : Φάσματα απορρόφησης ορατού – υπεριώδους των συμπλόκων συλλογής φωτός του διατόμου *P.Tricornutum* όπως αυτά έχουν διαχωριστεί .

Στα δεξιά της εικόνας 41 παρουσιάζεται η απορρόφηση κυρίως στο ορατό μέρος του φάσματος στο οποίο απορροφούν οι χρωστικές ουσίες που περιέχουν τα σύμπλοκα. Με εξαίρεση το φάσμα 1, η δομή που εμφανίζουν τα υπόλοιπα φάσματα προσεγγίζει σημαντικά εκείνη των κυττάρων του διατόμου που παρουσιάστηκε στην εικόνα 27. Στο φάσμα 1 φαίνεται πως κυριαρχεί η παρουσία της Dd με την εμφάνιση της κορυφής στα 485nm αλλά και έντονη απορρόφηση που παρουσιάζει το δείγμα μεταξύ 350-550nm σε σχέση με την απορρόφηση στα 673nm της Chl-a υποδηλώνει πως το δείγμα αποτελείται σε μεγάλο βαθμό από καροτενοειδή . Η παρουσία της red-Fx είναι ορατή μόνο στα δείγματα 3,4 και 7 όπως φαίνεται από την ευρεία περιοχή απορρόφησης μεταξύ 500-560nm. Επίσης η Chl-c η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία του ώμου στα 460 nm και των κορυφών στα 589 και 636

nm φαίνεται πως είναι εντονότερη στα δείγματα 3 και 7 ενώ απουσιάζει εντελώς στο 1. Οι πιο πάνω παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα πως τα μέρη που έχουν απομονωθεί δρουν συνεργατικά για απορρόφηση ακτινοβολίας από διαφορετικά μέρη του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος ή/και έχουν εντελώς διαφορετικούς ρόλους να διαδραματίσουν στη λειτουργία της φωτοσύνθεσης όπως είναι η παροχή φωτο-προστασίας.

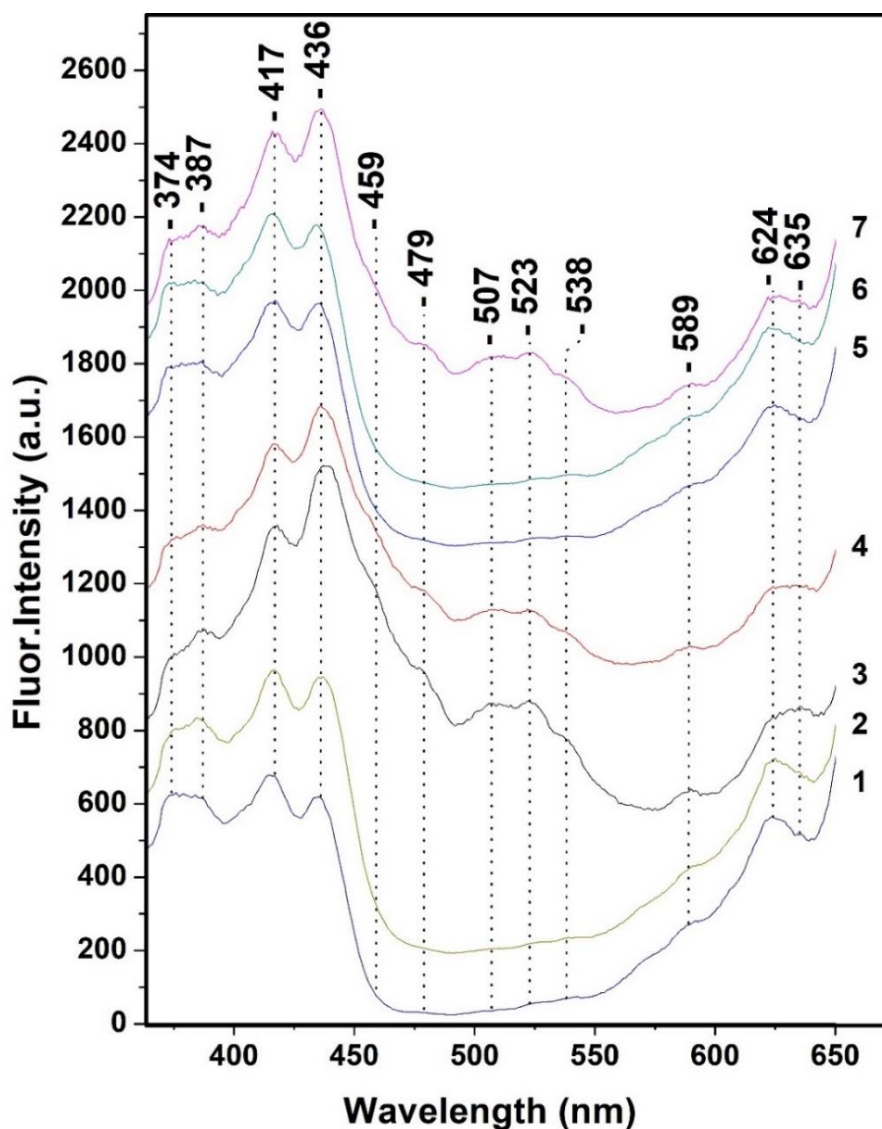
Στην εικόνα 42 παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού εκπομπής με διέγερση στα 440 nm των συμπλόκων συλλογής φωτός του διατόμου *P. Tricornutum* όπως αυτά έχουν διαχωριστεί. Η επιλογή της ακτινοβολίας διέγερσης στα 440nm έγινε λόγω της απορρόφησης τόσο των Chl-a/c όσο και καροτενοειδών σε αυτό το μήκος κύματος έτσι ώστε το φάσμα που προκύπτει να είναι αντιπροσωπευτικό της συνολικής λειτουργίας του συμπλόκου. Παρατηρείται εκπομπή κυρίως στα 677 nm η οποία εμφανίζει διακυμάνσεις μεταξύ των δειγμάτων, τόσο της θέσης όσο και του πλάτους κάθε κορυφής, με πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα το φάσμα 2 στο οποίο η εκπομπή έχει μετατοπιστεί στα 681nm. Αυτές οι διαφορές υποδηλώνουν τις διαφορετικές ιδιότητες της χλωροφύλλης σε σχέση με το διαφορετικό πρωτεϊνικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται το σύμπλοκο. Επίσης παρατηρείται η κορυφή στα 645nm η οποία προέρχεται από την Chl-c και υποδηλώνει αποτυχία μεταφοράς ενός ποσοστού ενέργειας από την Chl-c προς την Chl-a. Η κορυφή αυτή απουσιάζει από το δείγμα 1 μιας και όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως σε αυτό το δείγμα δεν εντοπίζεται παρουσία Chl-c.



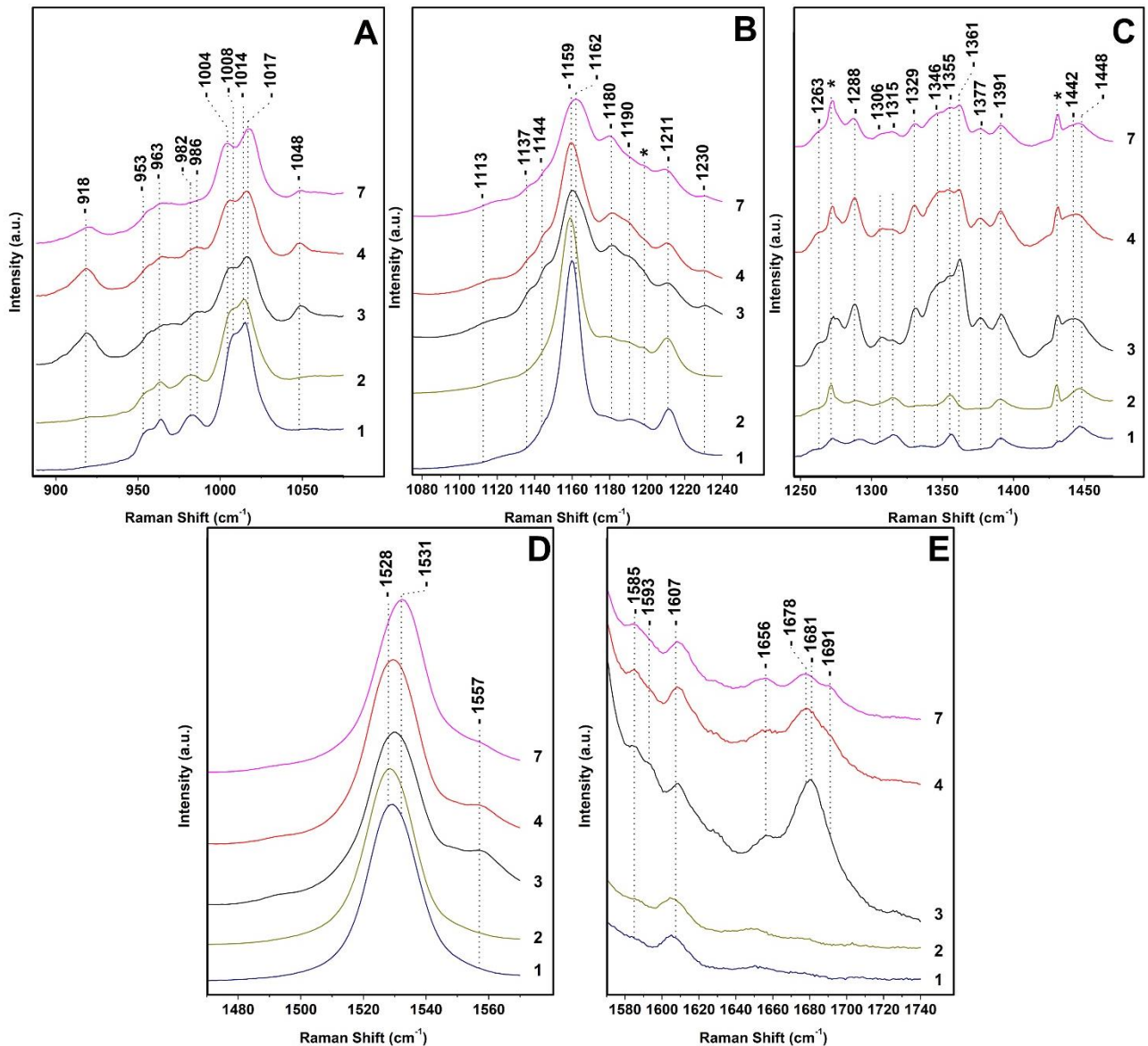
Εικόνα 42 : Φάσματα φθορισμού εκπομπής με διέγερση στα 440 nm των συμπλόκων συλλογής φωτός του διατόμου *P. Tricornutum* όπως αυτά έχουν διαχωριστεί .

Στην εικόνα 43 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού διέγερσης στα 677 nm των συμπλόκων στα οποία αποτυπώνεται η ένταση της εκπομπής στο συγκεκριμένο μήκος κύματος όταν το δείγμα διεγείρεται με ακτινοβολία μικρότερης ενέργειας έτσι ώστε να γίνει εμφανής η προέλευση της. Η συμμετοχή των red-Fx είναι εμφανής μόνο για τα δείγματα 3,4 και 7 με τις χαρακτηριστικές κορυφές στα 507,523 και 538 nm. Το ίδιο ισχύει και για την Chl-c μιας και οι κορυφές στα 459 και 635 nm απουσιάζουν ή έχουν πολύ μικρή ένταση στα δείγματα 1,2,5 και 6. Σημαντικό χαρακτηριστικό των φασμάτων αποτελεί και η αλλαγή στην ένταση μεταξύ των κορυφών στα 417 και 436nm οι οποίες έχουν

σημαντικότερη συνεισφορά από την παρουσία Chl-a. Για τα δείγματα 1,2,5 και 6 η κορυφή στα 417 nm έχει μεγαλύτερη ένταση από την αντίστοιχη στα 436 nm ενώ το αντίθετο συμβαίνει για τα δείγματα 3,4 και 7. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να εξηγηθεί από το διαφορετικό πρωτεϊνικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται η Fx σε κάθε δείγμα, το οποίο όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως μπορεί να μεταβάλει πολύ σημαντικά τα ενεργειακά επίπεδα της χρωστικής. Έτσι, σε κάθε δείγμα η συνεισφορά των κορυφών που οφείλονται στην Fx στην περιοχή 400-460nm μεταβάλλει το σχήμα του φάσματος που τελικά παρατηρείται και οφείλεται στην αθροιστική συνεισφορά όλων των χρωστικών που συμμετέχουν στο σύμπλοκο.



Εικόνα 43 : Φάσματα φθορισμού διέγερσης στα 677 nm των συμπλόκων συλλόγης φωτός του διατόμου *P. Tricornutum* όπως αυτά έχουν διαχωριστεί .



Εικόνα 44 : Φάσματα Raman των συμπλόκων συλλογής φωτός του διατόμου *P. Tricornutum* όπως αυτά έχουν διαχωριστεί . Η λήψη των φασμάτων έγινε σε θερμοκρασία -70°C , η διάρκεια λήψης του κάθε φάσματος ήταν 20 λεπτά και το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης 442.

Στην εικόνα 44 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα φάσματα Raman για δείγματα 1,2,3,4 και 7. Στα δείγματα 5 και 6 δεν ήταν δυνατή η λήψη φασμάτων λόγω πολύ χαμηλής συγκέντρωσης των χρωστικών ουσιών σε αυτά. Λόγω της ευαισθησίας που εμφανίζουν τα δείγματα τόσο στη θερμοκρασία όσο και στον έντονο φωτισμό, οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε

θερμοκρασία -70°C . Παρόλα αυτά, όπως φαίνεται και στα πιο πάνω φάσματα, για τα δείγματα 1 και 2 οι δονήσεις που προέρχονται από τα μόρια Chl-a/c δεν υπάρχουν. Αυτό αποδίδεται σε ευαισθησία των συγκεκριμένων συμπλόκων λόγω της ενέργειας της ακτινοβολίας διέγερσης που χρησιμοποιήθηκε. Το ίδιο αποτέλεσμα υπήρξε και σε αντίστοιχες μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία -120°C (δεν παρουσιάζονται σε αυτή την εργασία) και έτσι δεν μπόρεσε να γίνει αναλυτικός χαρακτηρισμός αυτών των συμπλόκων με τη φασματοσκοπία Raman. Παρόλα αυτά, τα φάσματα συμπεριλαμβάνονται στην εικόνα 44 λόγω των χαρακτηριστικών δονήσεων που προέρχονται από τα καροτενοειδή των δειγμάτων. Όλα τα φάσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τη δόνηση ν_1 των καροτενοειδών.

Στην εικόνα 44A, στην περιοχή $1000-1030\text{ cm}^{-1}$ εμφανίζονται οι δονήσεις ν_3 των καροτενοειδών και έχουν αποδοθεί αναλυτικά σε προηγούμενη ενότητα. Στα δείγματα 1 και 2 διακρίνονται δύο κορυφές στους 1008 και 1014 cm^{-1} που σε συνδυασμό με τα φάσματα απορρόφησης της εικόνας 41 μπορούν να αποδοθούν στα καροτενοειδή Dd και Dt. Αυτό υποστηρίζεται και από την ένταση της κορυφής στους 986 cm^{-1} που επίσης έχει αποδοθεί στα συγκεκριμένα καροτενοειδή. Οι κορυφές στους 1004 και 1017 cm^{-1} που διακρίνονται στα δείγματα 3,4 και 7 μπορούν να αποδοθούν κυρίως στην παρουσία Fx. Στην εικόνα 44B εμφανίζονται οι αντίστοιχες κορυφές που οφείλονται στις δονήσεις ν_2 των καροτενοειδών, το κέντρο των κορυφών βρίσκεται μεταξύ $1159-1162\text{ cm}^{-1}$. Επίσης για τα δείγματα 3,4 και 7 παρατηρείται σημαντικά μεγαλύτερο πλάτος στην κορυφή κάτι το οποίο ενισχύει την υπόθεση πως στα δείγματα 1 και 2 αποτελούνται κυρίως από τα καροτενοειδή Dd και Dt, ενώ στα υπόλοιπα υπάρχει μεγαλύτερη συγκέντρωση και από Fx. Αυτό το συμπέρασμα υποστηρίζεται και από τα φάσματα της εικόνας 44D όπου φαίνεται η ν_1 των καροτενοειδών. Η θέση της συγκεκριμένης δόνησης επηρεάζεται από το μήκος συζυγίας της πολυμερικής αλυσίδας των καροτενοειδών το οποίο όσο μεγαλύτερο είναι τόσο μειώνεται η θέση της αντίστοιχης δόνησης. Έτσι η κορυφή που εμφανίζεται στους 1531 cm^{-1} αποδίδεται κυρίως στη παρουσία Fx ενώ στους 1528 cm^{-1} στις DD/Dt. Πρέπει να αναφερθεί πως ο διαχωρισμός πολλών από τις κορυφές που αναφέρονται σε αυτή την ενότητα δεν ήταν ορατός στα αντίστοιχα φάσματα Raman από κύτταρα διατόμων που εμφανίστηκαν προηγουμένως. Αυτό οφείλεται τόσο στη φύση των δειγμάτων όσο και στη θερμοκρασία κάτω από την οποία πραγματοποιήθηκε η λήψη τους.

Σχετικά με τις δονήσεις που οφείλονται στα μόρια Chl-a/c ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει η περιοχή των δονήσεων C-N στην εικόνα 44C. Μεταξύ των δειγμάτων 3,4 και 7 υπάρχει σημαντική διαφορά στην αναλογία των εντάσεων μεταξύ των κορυφών στους 1355 και 1361 cm^{-1} οι οποίες έχουν αποδοθεί σε διαφορετικές διαμορφώσεις του μορίου Chl-c εντός των συμπλόκων. Αντίστοιχα στην εικόνα 44E όπου υπάρχουν οι δονήσεις C=O παρατηρείται η εμφάνιση τεσσάρων κορυφών στους 1656, 1676, 1681 και 1691 cm^{-1} , η πρώτη έχει αποδοθεί στα μόρια Fx ενώ οι υπόλοιπες τρεις στις Chl-a/c. Η διαφορετική θέση των δονήσεων αυτών υποδηλώνει την παρουσία ισχυρών (1676 cm^{-1}) και ασθενέστερων (1691 cm^{-1}) δεσμών υδρογόνου με το περιβάλλον τους.

Συνολικά, από τις πιο πάνω παρατηρήσεις προκύπτει το συμπέρασμα πως μεταξύ των συμπλόκων που έχουν απομονωθεί υπάρχει διαφορετική στοιχειομετρία, διαφορετικό πρωτεϊνικό περιβάλλον αλλά και διαφορετικές διαμορφώσεις και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των χρωμοφόρων μορίων που τα απαρτίζουν. Όλα τα πιο πάνω συνηγορούν πως τα διαφορετικά σύμπλοκα εξυπηρετούν διαφορετικές λειτουργίες κατά τη διάρκεια συλλογής και μεταφοράς ενέργειας και συνεργατικά είναι υπεύθυνα για την αποδοτική λειτουργία και τη φωτοπροστασία του οργανισμού.

3.3.4 Ανάπτυξη του διατόμου *P.Tricornutum* με ισότοπο αζώτου ¹⁵N

Σε αυτή την ενότητα θα γίνει παρουσίαση των φασμάτων Raman των κυττάρων του διατόμου *P.Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί σε βιομέσο που περιέχει ως πηγή αζώτου ¹⁵N, όπως περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο της μεθοδολογίας.

Όπως έγινε αντιληπτό και από τα φάσματα που παρουσιάστηκαν προηγουμένως, σε δείγματα που περιέχουν χρωστικές οι οποίες απορροφούν σε παρόμοια μήκη κύματος και οι δονήσεις που εμφανίζουν παρουσιάζουν μια σημαντική αλληλοεπικάλυψη, είναι αρκετά δύσκολο να γίνει σαφής διαχωρισμός των παρατηρούμενων κορυφών στις επιμέρους δονήσεις που τις προκαλούν. Για το σκοπό αυτό γίνεται χρήση του ισότοπου ¹⁵N με σκοπό να αντικαταστήσει το ¹⁴N στη σύνθεση των Chl-a/c στο δείγμα με αποτέλεσμα να παρατηρηθούν μετατοπίσεις στα φάσματα Raman των δονήσεων C-N ενώ να μείνουν αμετάβλητες οι υπόλοιπες δονήσεις που εμφανίζονται. Οι μετατοπίσεις οφείλονται στην αύξηση της μάζας του ατόμου αζώτου που συμμετέχει στις παρατηρούμενες δονήσεις. Όπως έχει αναφερθεί αναλυτικά σε προηγούμενο κεφάλαιο, στην κλασική περιγραφή του φαινομένου με την προσέγγιση του αρμονικού ταλαντωτή, η χαρακτηριστική συχνότητα ταλάντωσης ενός δεσμού (ν_0) δίνεται από τη σχέση :

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

Όπου μ είναι η ανηγμένη μάζα των δύο ατόμων A και B που συμμετέχουν στο δεσμό και υπολογίζεται από τη σχέση :

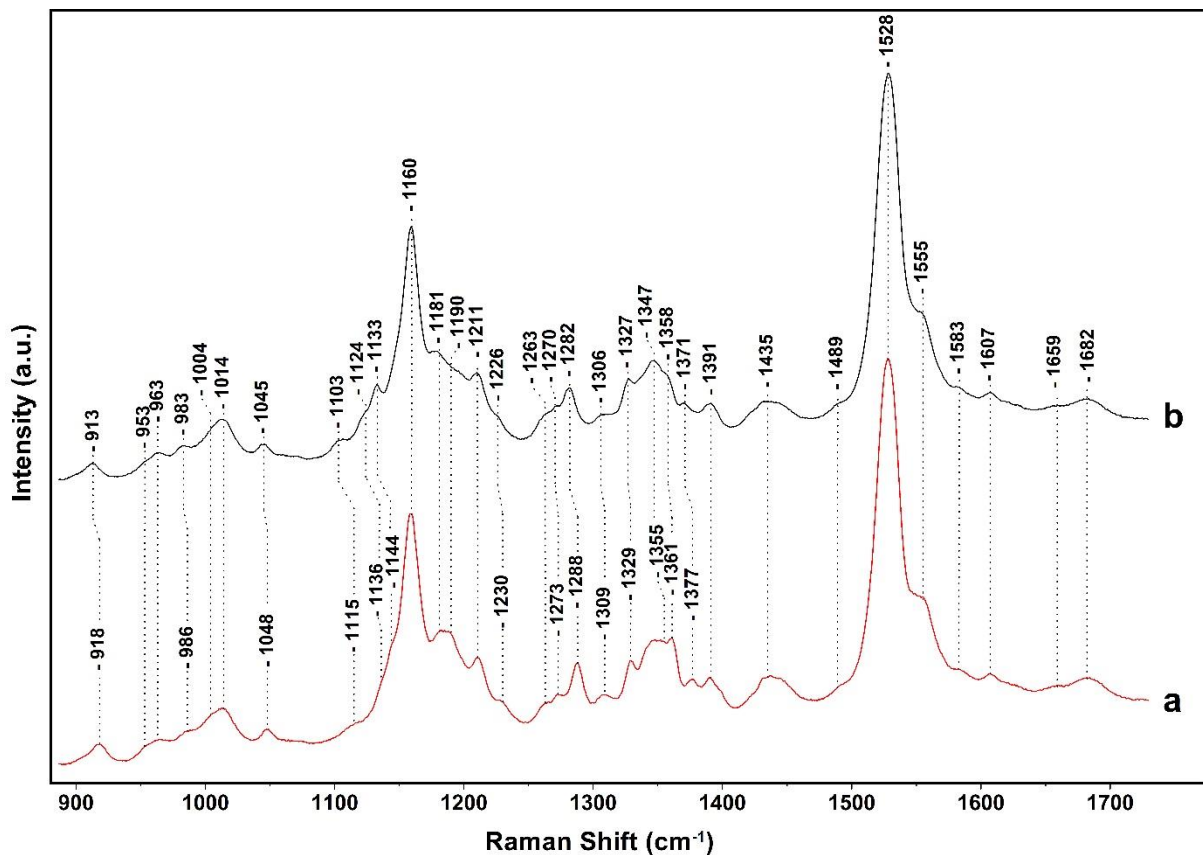
$$\mu = \frac{m_A m_B}{m_A + m_B}$$

Επομένως με αύξηση της μάζας ενός από τα δύο άτομα προκύπτει μείωση της ανηγμένης μάζας και κατά συνέπεια μείωση της χαρακτηριστικής συχνότητας δόνησης του δεσμού.

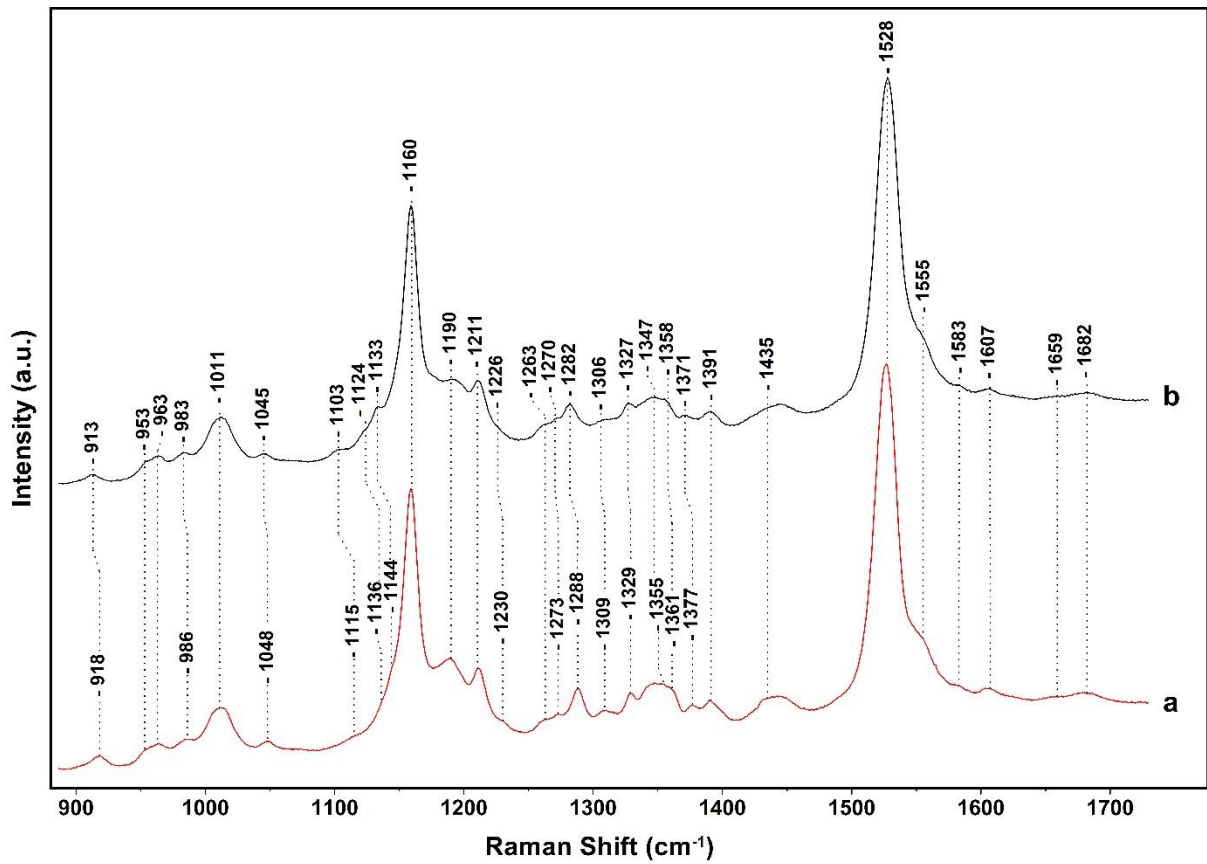
Η χρήση ισωτόπων για τον προσδιορισμό της προέλευσης δονήσεων από διάφορα βιολογικά δείγματα είναι συνηθισμένη πρακτική στη φασματοσκοπία Raman(31). Παρόλα αυτά δεν υπάρχει στη βιβλιογραφία οποιαδήποτε αναφορά σε αντίστοιχη μελέτη μέχρι σήμερα που να αφορά κύτταρα διατόμων τα οποία έχουν αναπτύξει χλωροφύλλες με χρήση ισωτόπου κατευθείαν από το βιομέσο που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη τους. Η επιτυχία αυτής της μεθόδου δίνει την ευκαιρία πλήρους χαρακτηρισμού και διαχωρισμού όλων των

εμφανιζόμενων δονήσεων με χρήση διαφορετικών ισοτόπων. Σε αυτή την εργασία γίνεται παρουσίαση των φασμάτων που προέκυψαν με αντικατάσταση αποκλειστικά του ^{14}N με ^{15}N επιβεβαιώνοντας την επιτυχία της μεθόδου.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φάσματα Raman για τα κύτταρα του διατόμου *P. Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από από λευκό φως έντασης $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Εικόνα 45) και $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Εικόνα 46) όπου σαν πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε (a) ^{14}N (b) ^{15}N .



Εικόνα 45 : Φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου *P. Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από φως έντασης $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ όπου σαν πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε (a) ^{14}N (b) ^{15}N .



Εικόνα 46 : Φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου *P. Tricornutum* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από φως έντασης $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ όπου σαν πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε (a) ^{14}N (b) ^{15}N .

Στα φάσματα Raman που παρουσιάζονται στις εικόνες 45 και 46 εμφανίζονται μετατοπίσεις στη θέση εμφάνισης των κορυφών μεταξύ των δειγμάτων a και b που αφορούν τα διάτομα που αναπτύχθηκαν με χρήση ^{14}N και ^{15}N αντίστοιχα. Οι σημαντικότερες δονήσεις που εμφάνισαν αξιόλογη μετατόπιση και η προέλευση τους αναφέρονται στον πίνακα 5.

¹⁴ N	¹⁵ N	Difference (cm ⁻¹)	Assignment
918	913	-5	δ(C _a C _m N) Chl-a
1115	1103	-12	ν(C _a N) Chl-a/c
1144	1133	-11	ν(C _a N) Chl-a
1136	1124	-12	ν(C _a N)+δ(C _a NC _a) Chl-a/c
1182	1178	-4	ν(C _a N) Chl-a
1288	1282	-6	ν(C _a N) Chl-a
1346	1341	-5	ν(C _a N) Chl-a
1355	1347	-8	ν(C _a N) Chl-c
1361	1358	-3	ν(C _a N) Chl-c
1377	1371	-6	ν(C _a N) Chl-a

Πίνακας 5 : Θέση και προέλευση των δονήσεων που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη μετατόπιση στα φάσματα Raman μεταξύ των δειγμάτων που αναπτύχθηκαν με ¹⁴N και ¹⁵N. (24,25,26)

Οι δείκτες που χρησιμοποιούνται στα μόρια άνθρακα αντιστοιχούν στην εικόνα 26. (δ=in-plane deformation, ν = stretch.)

Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό από τα φάσματα αυτά, υπάρχουν συγκεκριμένες δονήσεις που χωρίς τη χρήση του ισοτόπου δεν είναι ορατές λόγω της αλληλοεπικάλυψης που υπάρχει με άλλες δονήσεις μεγαλύτερης έντασης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα είτε να είναι αδύνατη η εξαγωγή συμπερασμάτων από αυτές τις δονήσεις είτε να προκύψει κάποια εσφαλμένη ερμηνεία σε αντίστοιχα φάσματα λόγω διαφορών που οφείλονται σε δονήσεις οι οποίες δεν είναι άμεσα ορατές. Κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι δονήσεις στους 1144 και 1137 cm⁻¹ οι οποίες εμφανίζονται αμυδρά στο φάσμα a λόγω της πολύ κοντινής θέσης που έχουν με τη δόνηση των καρτενοειδών στους 1159 cm⁻¹ η οποία έχει σημαντικά μεγαλύτερη ένταση από εκείνες. Λόγω της σημαντικής μετατόπισης που προέκυψε από τη χρήση του ισοτόπου ¹⁵N, στο φάσμα b τα χαρακτηριστικά τους είναι εμφανή. Ένα άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα της χρησιμότητας αυτής της εφαρμογής είναι η δόνηση στους 1182 cm⁻¹ που βρίσκεται σε μια περιοχή όπου κυριαρχούν δονήσεις που προέρχονται από τα καρτενοειδή του δείγματος και μπορεί εύκολα να προκαλέσει παρερμηνεία των φασμάτων εάν δεν εντοπιστεί ακριβώς η συνεισφορά που έχει στο συνολικό φάσμα που προκύπτει από τα κύτταρα των διατόμων.

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν σε αυτή την ενότητα φαίνεται πως η συγκεκριμένη μεθοδολογία είναι αποδοτική και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε καλλιέργειες

διατόμων για την ακριβή απόδοση της προέλευσης των κορυφών που εμφανίζονται σε φάσματα Raman.

3.4 Συμπεράσματα Κεφαλαίου

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάστηκε η φασματοσκοπική μελέτη του διατόμου *P.Tricornutum* η οποία οδήγησε στα πιο κάτω συμπεράσματα.

Αρχικά, σχετικά με την ανάπτυξη του διατόμου κάτω από διαφορετικής εντάσεως λευκό φως παρατηρήθηκε σημαντικά διαφορετική συγκέντρωση καροτενοειδών μεταξύ των δειγμάτων που αναπτύχθηκαν κάτω από 150 και 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Με την αύξηση της έντασης του φωτός ανάπτυξης των διατόμων αυξήθηκε η συγκέντρωση των καροτενοειδών διαδινοξανθίνη, διατοξανθίνη και β -καροτένιο ενώ μειώθηκε η συγκέντρωση της φουκοξανθίνης ως προς τη χλωροφύλλη *a*. Σχετικά με τον πληθυσμό μορίων φουκοξανθίνης που παρουσιάζει μετατόπιση της απορρόφησης του προς το ερυθρό εντός των κυττάρων των διατόμων, παρατηρήθηκε τόσο με χρήση της φασματοσκοπίας απορρόφησης ορατού – υπεριώδους, όσο και με τη φασματοσκοπία φθορισμού πως δεν εντοπίζονται στα κύτταρα που αναπτύχθηκαν με 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας Raman επιβεβαιώθηκαν τα συμπεράσματα σχετικά με τη συγκέντρωση των καροτενοειδών στο δείγμα με τον εντοπισμό των χαρακτηριστικών δονήσεων κάθε ουσίας στα φάσματα. Επίσης, εντοπίστηκε η παρουσία δύο διαμορφώσεων των μορίων χλωροφύλλης *c* σε όλα τα κύτταρα που μελετήθηκαν με τις χαρακτηριστικές δονήσεις στους 1355 και 1361 cm^{-1} . Οι εντάσεις των δύο χαρακτηριστικών κορυφών και κατ'επέκταση ο πληθυσμός μορίων χλωροφύλλης *c* που εμφανίζει την κάθε διαμόρφωση έχει εξάρτηση από την ένταση του φωτός ανάπτυξης του οργανισμού. Συνολικά, με την αύξηση του φωτός ανάπτυξης στο διάτομο *P.Tricornutum* πραγματοποιείται αύξηση της παραγωγής των καροτενοειδών που έχουν συσχετισθεί με τη φωτο-προστασία σε αυτούς τους οργανισμούς και ταυτόχρονα εξαλείφεται η παρουσία των μορίων φουκοξανθίνης που εμφανίζει απορρόφηση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος λόγω του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται. Παράλληλα υπάρχει μείωση στη συγκέντρωση της χλωροφύλλης *c* και αλλαγή της διαμόρφωσης των μορίων της εντός των κυττάρων. Όλα τα πιο πάνω συνηγορούν πως ανάλογα με τις συνθήκες έντασης φωτισμού συμβαίνουν αλλαγές τόσο ως προς τη σύνθεση χρωστικών ουσιών όσο και ως προς την αλληλεπίδραση μεταξύ

των μορίων αλλά και με το πρωτεϊνικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται έτσι ώστε να διασφαλιστεί η λειτουργία του οργανισμού και η προσαρμογή του σε αυτές τις συνθήκες.

Όσον αφορά την ανάπτυξη του διατόμου κάτω από κόκκινο φως, παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στις ιδιότητες ενός ποσοστού των μορίων χλωροφύλλης *a* στο δείγμα το οποίο εμφάνισε μετατόπιση της απορρόφησης του προς το ερυθρό. Το ποσοστό αυτό των μορίων αυξάνεται με την αύξηση του χρόνου έκθεσης της καλλιέργειας σε κόκκινο φως και φαίνεται πως οφείλεται στην παρουσία ισχυρότερων δεσμών υδρογόνου στην ομάδα καρβονυλίου της θέσης C13 του μορίου της χλωροφύλλης, σε σχέση με τα αντίστοιχα μόρια που εντοπίζονται σε διάτομα που έχουν αναπτυχθεί κάτω από λευκό φως. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε πως η αναλογία των δύο διαμορφώσεων των μορίων της χλωροφύλλης *c* επηρεάζεται και από το μήκος κύματος του φωτός ανάπτυξης εκτός από την ένταση του.

Από την απομόνωση των συμπλόκων συλλογής φωτός του συγκεκριμένου διατόμου προέκυψαν 7 διαφορετικά σύμπλοκα τα οποία είχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις των χρωστικών ουσιών καθώς και παρουσία διαφορετικών αμινοξέων. Όπως φάνηκε από τη μελέτη με τις φασματοσκοπίες φθορισμού και Raman, τα σύμπλοκα αυτά εμφανίζουν πολύ διαφορετικές ιδιότητες μεταξύ τους και συνδυαστικά επιτελούν τις απαραίτητες λειτουργίες συλλογής φωτός, μεταφοράς ενέργειας και φωτοπροστασίας που είναι απαραίτητες για την πραγματοποίηση της φωτοσύνθεσης σε αυτούς τους οργανισμούς.

Τέλος, με την αντικατάσταση της πηγής αζώτου στο βιομέσο ανάπτυξης του διατόμου με το ισότοπο ^{15}N , έγινε εφικτός ο προσδιορισμός των δονήσεων στα φάσματα Raman οι οποίες οφείλονται σε δεσμούς C-N. Μέσω αυτών των αποτελεσμάτων φαίνεται πως είναι εφικτή η χρήση ισοτόπων στο βιομέσο των διατόμων με σκοπό την απόδοση κορυφών σε συγκεκριμένες δονήσεις με μεγαλύτερη ακρίβεια καθώς και τη μελέτη δονήσεων οι οποίες εμφανίζουν κορυφές στο φάσμα Raman σε συχνότητες όπου υπάρχει σημαντική αλληλοεπικάλυψη με άλλες κορυφές.

3.5 Βιβλιογραφία Κεφαλαίου 3

1. Butler, T., Kapoore, R. V., & Vaidyanathan, S. (2020). *Phaeodactylum tricornutum*: A Diatom Cell Factory. In *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.023>
2. Kuczynska, P., Jemiola-Rzeminska, M., & Strzalka, K. (2015). Photosynthetic pigments in diatoms. In *Marine Drugs* (Vol. 13, Issue 9, pp. 5847–5881). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/md13095847>
3. Falciatore, A., Jaubert, M., Bouly, J. P., Bailleul, B., & Mock, T. (2020). Diatom molecular research comes of age: Model species for studying phytoplankton biology and diversity[open]. In *Plant Cell* (Vol. 32, Issue 3, pp. 547–572). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00158>
4. Wang, W., Yu, L. J., Xu, C., Tomizaki, T., Zhao, S., Umena, Y., Chen, X., Qin, X., Xin, Y., Suga, M., Han, G., Kuang, T., & Shen, J. R. (2019). Structural basis for blue-green light harvesting and energy dissipation in diatoms. *Science*, *363*(6427).
<https://doi.org/10.1126/science.aav0365>
5. Büchel, C. (2020). Light harvesting complexes in chlorophyll c-containing algae. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1861, Issue 4). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2019.05.003>
6. Lepetit, B., Campbell, D.A., Lavaud, J., Büchel, C., Goss, R., Bailleul, B. (2022). Photosynthetic Light Reactions in Diatoms. II. The Dynamic Regulation of the Various Light Reactions. In: Falciatore, A., Mock, T. (eds) *The Molecular Life of Diatoms*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-92499-7_16
7. Blommaert, L., Chafai, L., & Bailleul, B. (2021). The fine-tuning of NPQ in diatoms relies on the regulation of both xanthophyll cycle enzymes. *Scientific Reports*, *11*(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-91483-x>
8. Goss, R., & Lepetit, B. (2015). Biodiversity of NPQ. In *Journal of Plant Physiology* (Vol. 172, pp. 13–32). Urban und Fischer Verlag GmbH und Co. KG.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.03.004>
9. Alexandre, M. T. A., Gundermann, K., Pascal, A. A., van Grondelle, R., Büchel, C., & Robert, B. (2014). Probing the carotenoid content of intact *Cyclotella* cells by resonance Raman spectroscopy. *Photosynthesis Research*, *119*(3), 273–281.
<https://doi.org/10.1007/s11120-013-9942-y>

10. Nagao, R., Ueno, Y., Yokono, M., Shen, J. R., & Akimoto, S. (2018). Alterations of pigment composition and their interactions in response to different light conditions in the diatom *Chaetoceros gracilis* probed by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1859*(7), 524–530. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.04.003>
11. Nagao, R., Ueno, Y., Yokono, M., Shen, J. R., & Akimoto, S. (2019). Effects of excess light energy on excitation-energy dynamics in a pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Photosynthesis Research*, *141*(3), 355–365. <https://doi.org/10.1007/s11120-019-00639-4>
12. Llansola-Portoles, M. J., Pascal, A. A., & Robert, B. (2017). Electronic and vibrational properties of carotenoids: From in vitro to in vivo. In *Journal of the Royal Society Interface* (Vol. 14, Issue 135). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rsif.2017.0504>
13. Premvardhan, L., Robert, B., Beer, A., & Büchel, C. (2010). Pigment organization in fucoxanthin chlorophyll a/c2 proteins (FCP) based on resonance Raman spectroscopy and sequence analysis. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1797*(9), 1647–1656. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.05.002>
14. Fujita, Y., & Ohki, K. (2004). On the 710 nm Fluorescence Emitted by the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* at Room Temperature. In *Plant Cell Physiol* (Vol. 45, Issue 4). <https://academic.oup.com/pcp/article/45/4/392/1921974>
15. Herbstová, M., Bína, D., Koník, P., Gardian, Z., Vácha, F., & Litvín, R. (2015). Molecular basis of chromatic adaptation in pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1847*(6–7), 534–543. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.02.016>
16. Herbstová, M., Bína, D., Kaňa, R., Vácha, F., & Litvín, R. (2017). Red-light phenotype in a marine diatom involves a specialized oligomeric red-shifted antenna and altered cell morphology. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12247-0>
17. Oka, K., Ueno, Y., Yokono, M., Shen, J. R., Nagao, R., & Akimoto, S. (2020). Adaptation of light-harvesting and energy-transfer processes of a diatom *Phaeodactylum tricornutum* to different light qualities. *Photosynthesis Research*, *146*(1–3), 227–234. <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00714-1>

18. Kansy, M., Volke, D., Sturm, L., Wilhelm, C., Hoffmann, R., & Goss, R. (2020). Pre-purification of diatom pigment protein complexes provides insight into the heterogeneity of FCP complexes. *BMC Plant Biology*, 20(1).
<https://doi.org/10.1186/s12870-020-02668-x>
19. Kraay, G.W.; Zapata, M.; Veldhuis, M.J.W. Separation of chlorophylls c1c2, and c3 of marine phytoplankton by reversed-phase-C18-high-performance liquid chromatography. *J. Phycol.*1992, 28, 708–712
20. Jeffrey, S.W.; Mantoura, R.F.C.; Wright, S.W. *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*; Jeffrey, S., Mantoura, R., Wright, S., Eds.; UNESCO Publishing: Paris, France, 1997
21. Premvardhan, L., Bordes, L., Beer, A., Büchel, C., & Robert, B. (2009). Carotenoid structures and environments in trimeric and oligomeric fucoxanthin chlorophyll a/c2 proteins from resonance raman spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(37), 12565–12574. <https://doi.org/10.1021/jp903029g>
22. Lamb, J. J., Røkke, G., & Hohmann-Marriott, M. F. (2018). Chlorophyll fluorescence emission spectroscopy of oxygenic organisms at 77 K. In *Photosynthetica* (Vol. 56, Issue 1, pp. 105–124). The Institute of Experimental Biology of the Czech Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0791-y>
23. Gall, A., Pascal, A. A., & Robert, B. (2015). Vibrational techniques applied to photosynthesis: Resonance Raman and fluorescence line-narrowing. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1847, Issue 1, pp. 12–18). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.09.009>
24. Papageorgiou, M., Tselios, C. and Varotsis, C. (2020). Photoreduction of carotenoids in the aerobic anoxygenic photoheterotrophs probed by real time Raman spectroscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 213,112069
25. Sashima, T., Abe, M., Kurano, N., Miyachi, S., & Koyama, Y. (1998). *Changes in the Carbon-Carbon and Carbon-Nitrogen Bond Orders in the Macrocycle of Chlorophyll a upon Singlet and Triplet Excitation As Probed by Resonance Raman Spectroscopy of Natural-Abundance and Singly and Doubly Labeled Species with 15 N, 13 C, and 2 H Isotopes*. *J.Phys.Chem.B*, 102, 6903-6914.
26. Schick, G. A., & Bocian, D. F. (1987). Resonance Raman studies of hydroprophyrins and chlorophylls. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 895).

27. W.D.Wagner & W.Waidelich, (1986) Selective Observation of Chlorophyll c in Whole Cells of Diatoms by Resonant Raman Spectroscopy, *Applied Spectroscopy*, 40(2) 191-196.
28. Giovagnetti, V., & Ruban, A. v. (2021). The mechanism of regulation of photosystem i cross-section in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Experimental Botany*, 72(2), 561–575. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa478>
29. Llansola-Portoles, M. J., Li, F., Xu, P., Streckaite, S., Illoaia, C., Yang, C., Gall, A., Pascal, A. A., Croce, R., & Robert, B. (2020). Tuning antenna function through hydrogen bonds to chlorophyll a. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1861(4). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2019.148078>
30. Wientjes, E., Roest, G., & Croce, R. (2012). From red to blue to far-red in Lhca4: How does the protein modulate the spectral properties of the pigments? *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(5), 711–717. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.02.030>
31. Wang, Y., Huang, W. E., Cui, L., & Wagner, M. (2016). Single cell stable isotope probing in microbiology using Raman microspectroscopy. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 41, pp. 34–42). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.04.018>

4 Φασματοσκοπική μελέτη του διατόμου *Thalassiosira Pseudonana*

4.1 Εισαγωγή

Το είδος *Thalassiosira Pseudonana* θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους εκπροσώπους της κατηγορίας των κεντρικών διατόμων (1,2) και το πρώτο διάτομο του οποίου το γονιδίωμα δημοσιεύθηκε(3).

Σε αυτό το κεφάλαιο θα γίνει η φασματοσκοπική μελέτη των κυττάρων του οργανισμού, αρχικά σε σχέση με την απόκριση του σε τρεις διαφορετικές εντάσεις λευκού φωτός αλλά και της ικανότητας του οργανισμού να προσαρμόζεται αντιστρεπτά στις εν λόγω συνθήκες. Ακολούθως, θα γίνει μελέτη των ιδιοτήτων των χρωστικών ουσιών που παράγει ο οργανισμός σε συνθήκες φωτισμού με κόκκινο φως και η σύγκριση τους με τα αντίστοιχα αποτελέσματα του διατόμου *P.Tricornutum* που παρουσιάστηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο, όπως και ο χαρακτηρισμός των συμπλόκων συλλογής φωτός που έχουν απομονωθεί από αυτόν τον οργανισμό.

Οι ομοιότητες και οι διαφορές που παρουσιάζουν τα πτεροειδή και τα κεντρικά διάτομα στην απόκριση τους σε μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα σχετικά με τις συνθήκες φωτισμού μπορούν να προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την κατανόηση της λειτουργίας των οργανισμών αυτών και των διεργασιών που πραγματοποιούν έτσι ώστε να προσαρμόζονται και να φωτοσυνθέτουν κάτω από διαφορετικές συνθήκες με μεγάλη επιτυχία. Αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό στη μελέτη των φωτοσυνθετικών οργανισμών, ιδιαίτερα αν λάβει κανείς υπόψιν του το πολύ μεγάλο πλήθος μηχανισμών φωτο-προστασίας και συλλογής φωτός που επιστρατεύουν τα διάφορα είδη (4,5).

4.2 Μεθοδολογία

Οι καλλιέργειες του διατόμου *T.Pseudonana* (CCAP 1085/12) έχουν παραληφθεί από το κέντρο CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) και διατηρήθηκαν με συνεχή ανακαλλιέργειες σε βιομέσο F/2-Si. Η μεθοδολογία προετοιμασίας των δειγμάτων και πραγματοποίησης των πειραμάτων είναι ίδια όπως περιγράφεται στην αντίστοιχη ενότητα για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με χρήση του διατόμου *P.Tricornutum*. Μοναδική εξαίρεση αποτελούν τα πειράματα της μελέτης αντιστρεπτότητας της απόκρισης του διατόμου σε συνθήκες μεταβαλλόμενης έντασης φωτός, τα οποία έχουν πραγματοποιηθεί μόνο για το διάτομο *T.Pseudonana*. Για τις εν λόγω μετρήσεις, τα κύτταρά του διατόμου αναπτύχθηκαν με χρήση λευκού φωτός εντάσεως $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ για τέσσερις ημέρες και ακολούθως ο μισός όγκος της καλλιέργειας μεταφέρθηκε σε πηγή φωτός χαμηλότερης έντασης και συγκεκριμένα $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ για ακόμη πέντε ημέρες. Το βιομέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν F/2-Si, οι κύκλοι φωτισμού και σκοταδιού ήταν 12 ώρες ενώ η θερμοκρασία ανάπτυξης ήταν 20°C .

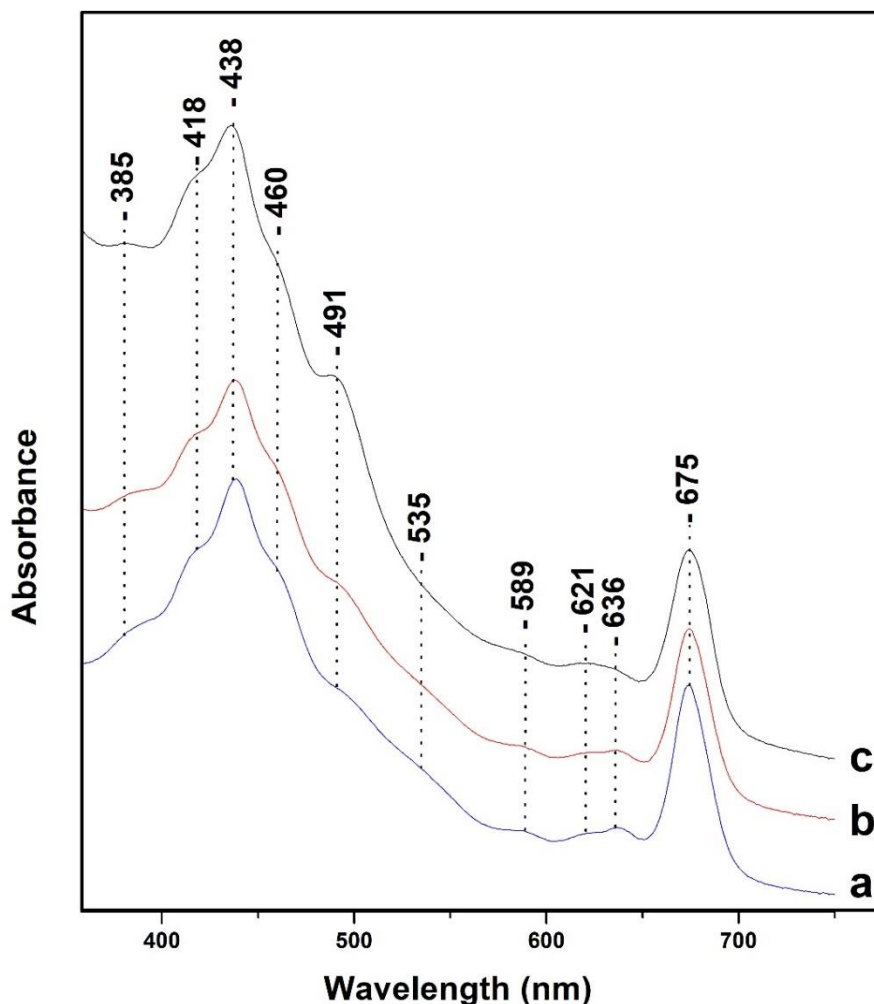
4.3 Πειραματικά αποτελέσματα και συζήτηση

4.3.1 Μελέτη της επίδρασης υψηλής έντασης λευκού φωτός

Όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, ο σκοπός των συγκεκριμένων πειραμάτων είναι η μελέτη των μηχανισμών και στρατηγικών που επιστρατεύει ο συγκεκριμένος οργανισμός όταν έρχεται αντιμέτωπος με διαφορετικής έντασης φως έτσι ώστε να διατηρήσει τις λειτουργίες του. Όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία(4,5), διαφορετικά είδη διατόμων χρησιμοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς για να επιτύχουν αυτό το σκοπό, έτσι με τα πειράματα που θα παρουσιαστούν στη συνέχεια θα διερευνηθεί η απόκριση ενός από τα πιο διαδεδομένα και αναλυτικά μελετημένα είδη κεντρικών διατόμων στον πλανήτη, του *T.Pseudonana*. Η διαφοροποίηση σχετικά με τα αντίστοιχα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο διάτομα *P.Tricornutum* είναι η χρήση μιας ακόμη χαμηλότερης έντασης λευκού φωτός για την ανάπτυξη του οργανισμού ($15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Low Light, LL) καθώς και η διερεύνηση της αντιστρεπτότητας της απόκρισης που παρουσιάζει το συγκεκριμένο είδος όταν μεταφερθεί από συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού. Η ικανότητα ενός οργανισμού να μεταβάλει τις ιδιότητες που διαθέτουν τα σύμπλοκα συλλογής φωτός με άμεσο τρόπο ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες βρίσκεται εξασφαλίζει τόσο την επιβίωση του σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών όσο και την υψηλή απόδοση στην παραγωγή ενέργειας για την ανάπτυξη και διάδοση του.

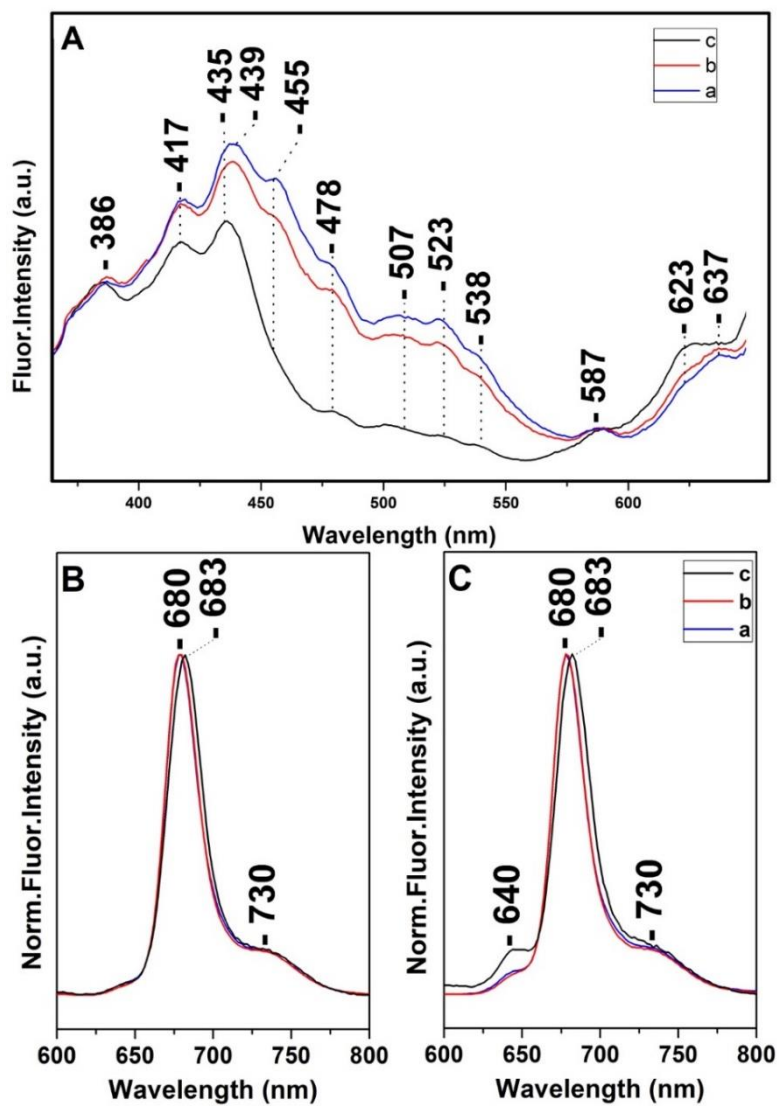
Στην εικόνα 47 παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης ορατού-υπεριώδους των κυττάρων του διατόμου *T.Pseudonana* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από (a) $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (b) $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (b) $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ λευκού φωτός. Σε όλα τα δείγματα η ένταση της κορυφής απορρόφησης στα 675 nm είναι ίδια. Η προέλευση των κορυφών που εμφανίζονται έχει αναφερθεί αναλυτικά στο προηγούμενο κεφάλαιο. Περιληπτικά, οι κορυφές προέρχονται από καροτενοειδή και χλωροφύλλες. Μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφανίζουν τα καροτενοειδή φουκοξανθίνη (Fx), με απορρόφηση μεταξύ 390-550nm ανάλογα με το πρωτεϊνικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται και η διαδινοξανθίνη (Dd) που εμφανίζει απορρόφηση μεταξύ 450-520 nm. Οι χλωροφύλλες a/c (Chl-a/c) έχουν χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης 440, 621 675 nm (Chl-a) και 460, 589 και 636 nm (Chl-c) (6,7,8).

Τα φάσματα a και b έχουν παρόμοια μορφή και εμφανίζουν μικρές διαφορές στην περιοχή 380-480nm που ίσως οφείλονται σε μικρές στοιχειομετρικές διαφορές μεταξύ των χρωστικών που περιέχουν καθώς και μια μικρή αύξηση στην κορυφή στα 491nm η οποία οφείλεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση του καροτενοειδούς Dd, το οποίο έχει σημαντικό ρόλο στη φωτο-προστασία του διατόμου. Στο φάσμα c που αφορά κύτταρα τα οποία έχουν αναπτυχθεί με φως εντάσεως $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ εμφανίζονται τα χαρακτηριστικά που είχαν παρατηρηθεί και στα αντίστοιχα πειράματα με το διάτομο *P.Tricornutum*, σημαντική αύξηση της κορυφής στα 491nm, μείωση της απορρόφησης στην περιοχή 500-560nm που αποδίδεται σε φουκοξανθίνη που εμφανίζει απορρόφηση μετατοπισμένη προς το ερυθρό (red-Fx) και μείωση του ώμου στα 460nm που αποδίδεται σε συνεισφορές από την Chl-c και τα καροτενοειδή που απορροφούν σε αυτή την περιοχή.



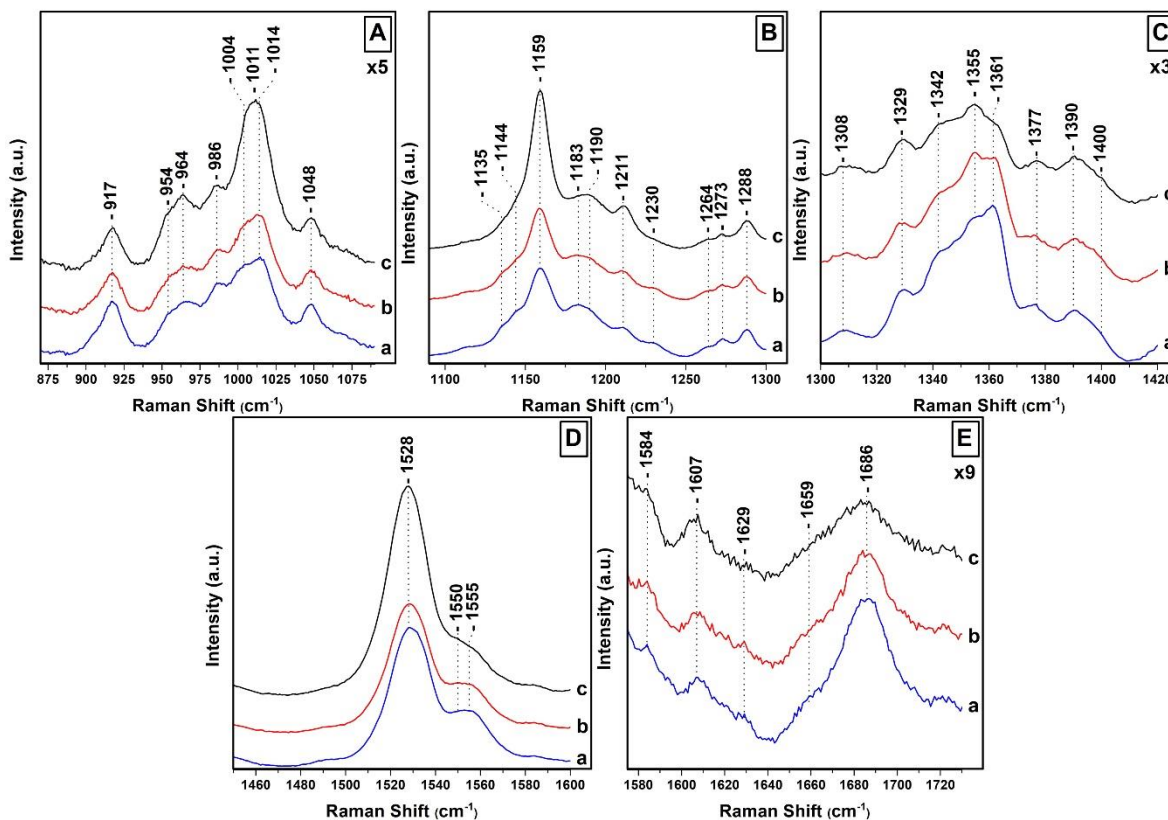
Εικόνα 47 : Φάσματα απορρόφησης ορατού-υπεριώδους των κυττάρων του διατόμου *T.Pseudonana* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από (a) $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (b) $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (c) $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ λευκού φωτός.

Γενικά από τις πληροφορίες που προκύπτουν από τα φάσματα απορρόφησης, η απόκριση του διατόμου σε συνθήκες υψηλού φωτισμού ακολουθεί το παράδειγμα του *P.Tricornutum* που παρουσιάστηκε προηγουμένως. Επιπρόσθετα, η συμπερίληψη της συνθήκης φωτισμού με 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ επιβεβαιώνει το συμπέρασμα πως υπάρχει εξάρτηση της συγκέντρωσης Dd στα κύτταρα του διατόμου από την ένταση του φωτισμού και ταυτόχρονα πως αλλαγές στην ένταση φωτισμού μεταξύ 15-150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ δεν προκαλούν ραγδαίες μεταβολές στη στοιχειομετρία χρωστικών στα κύτταρα του διατόμου *T.Pseudonana* όπως παρατηρήθηκε στην περίπτωση της ανάπτυξης με φως εντάσεως 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



Εικόνα 48 : Α) Φάσματα φθορισμού διέγερσης στα 680 nm των κυττάρων του διατόμου *T.Pseudonana* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από : (a)15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, (b) 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και (c) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Β) Κανονικοποιημένα φάσματα φθορισμού εκπομπής με διέγερση στα 418 nm και (Γ) στα 460 nm .

Στην εικόνα 48A παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού διέγερσης στα 680 nm, όπου εμφανίζεται η χαρακτηριστική εκπομπή της Chl-a (9), των κυττάρων του διατόμου *T.Pseudonana* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από : (a) 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, (b) 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ και (c) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Μεταξύ των φασμάτων a και b παρατηρείται μικρή μείωση της έντασης του φάσματος b μετά τα 425nm η οποία μπορεί να αποδοθεί σε μεταβολές κυρίως του καροτενοειδούς red-Fx και πιθανώς της Chl-c στο δείγμα τόσο ως προς τη στοιχειομετρία όσο και ως προς την απόδοση της συμμετοχή τους στη μεταφορά ενέργειας προς τη Chl-a. Στο φάσμα c παρατηρείται πολύ σημαντική μείωση στις περιοχές που αναφέρθηκαν προηγουμένως, ενισχύοντας την άποψη πως πρόκειται για αποτέλεσμα που οφείλεται στην ένταση του φωτός ανάπτυξης του οργανισμού. Επιπρόσθετα, υπάρχει μια μετατόπιση στη θέση εμφάνισης της κορυφής στα 435nm κατά 4nm σε σχέση με τα δύο άλλα δείγματα. Στις εικόνες 48B και 48C παρουσιάζονται τα κανονικοποιημένα φάσματα φθορισμού εκπομπής με διέγερση στα 418 nm και 460 nm αντίστοιχα. Μεταξύ των φασμάτων a και b δεν παρατηρείται καμία διαφορά, αντίθετα στο φάσμα c υπάρχει μετατόπιση της εκπομπής που προέρχεται από την Chl-a από τα 680nm στα 683nm καθώς και εμφάνιση εκπομπής στα 640 nm που προέρχεται από την Chl-c και συνδέεται με μείωση της απόδοσης στη μεταφορά ενέργειας μεταξύ των δύο τύπων χλωροφύλλης. Συνολικά, παρά τις μικρές διαφορές που εμφανίζουν, η απόκριση των δύο οργανισμών σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτός κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τους ήταν παρόμοια.



Εικόνα 49 : Φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου *T.Pseudonana* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από λευκό φως εντάσεως : (a) 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, (b) 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και (c) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Κάθε φάσμα προκύπτει από το μέσο όρο 40 λήψεων διάρκειας 1 λεπτού η κάθε μία και η ακτινοβολία διέγερσης ήταν 442nm.

Στην εικόνα 49 παρουσιάζονται τα φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου *T.Pseudonana* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από λευκό φως εντάσεως : (a) 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, (b) 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και (c) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Τα φάσματα παρουσιάζονται σε 5 διαφορετικές περιοχές με διαφορετικές κλίμακες έντασης έτσι ώστε να είναι ευκολότερη η σύγκριση μεταξύ τους. Η προέλευση των κορυφών που εμφανίζονται έχει αναφερθεί αναλυτικά στο προηγούμενο κεφαλαίο (10,11). Όπως προκύπτει και από τα αποτελέσματα που έχουν ήδη παρουσιαστεί, τα δείγματα a και b δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Εξαιρέση αποτελεί το φάσμα που εμφανίζεται στην εικόνα 49C στην περιοχή των δονήσεων C-N και συγκεκριμένα των μορίων Chl-c στους 1361 και 1355 cm^{-1} . Οι δύο αυτές κορυφές έχουν ήδη αποδοθεί στην παρουσία διαφορετικών διαμορφώσεων Chl-c στο δείγμα και η αναλογία μεταξύ τους φαίνεται πως μεταβάλλεται στις παρούσες συνθήκες με μείωση της δόνησης στους 1361 cm^{-1} και τη συνεπακόλουθη αύξηση της

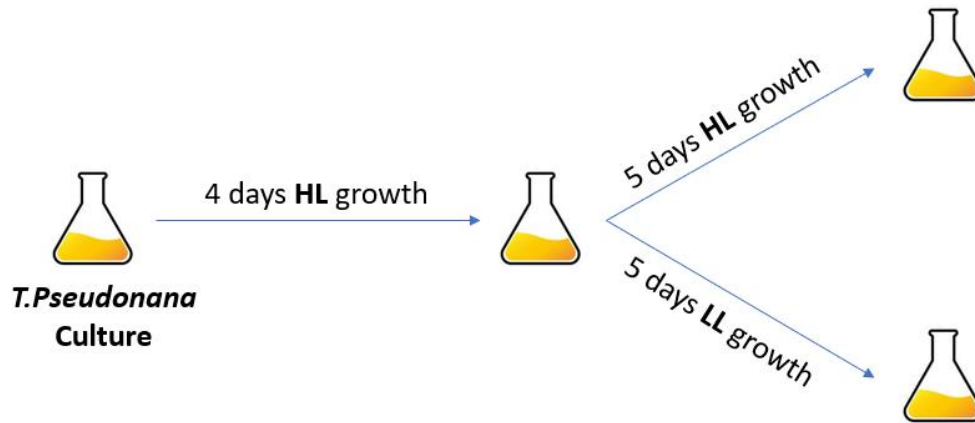
δόνησης στους 1355 cm^{-1} . Η αλλαγή στις εντάσεις των συγκεκριμένων κορυφών γίνεται σαφώς εντονότερη στο φάσμα c επιβεβαιώνοντας την υπόθεση που είχε εκφραστεί και στο προηγούμενο κεφάλαιο πως η παρουσία των συγκεκριμένων διαμορφώσεων εμφανίζει εξάρτηση από την ένταση του φωτός ανάπτυξης των οργανισμών.

Μεταξύ των φασμάτων b και c που αφορούν κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί με τις ίδιες συνθήκες όπως και τα αντίστοιχα του διατόμου *P. Tricornutum* παρατηρείται η ίδια γενική συμπεριφορά. Στο φάσμα c αποτυπώνεται η αύξηση των καροτενοειδών Dd και Dt, κάτι αναμενόμενο μιας και είναι γνωστό πως έχουν σημαντικό ρόλο στον φωτο-προστατευτικό μηχανισμό των διατόμων (5) σε συνδυασμό με τη διαφοροποίηση στις δονήσεις C-N της Chl-c που αναφέρθηκε προηγουμένως. Συγκεκριμένα, στην εικόνα 49A, υπάρχει αλλαγή στο λόγο των εντάσεων των κορυφών στους 1004 και 1014 cm^{-1} η οποία αποδίδεται στη σταδιακή αύξηση των καροτενοειδών Dd και Dt. Λόγω της σημαντικής αλληλοεπικάλυψης που παρατηρείται σε αυτή την περιοχή στις δονήσεις των διαφόρων καροτενοειδών, στο φάσμα c όπου η αύξηση στη συγκέντρωση των Dd και Dt είναι ακόμη μεγαλύτερη εμφανίζεται μια κορυφή με κέντρο τους 1011 cm^{-1} η οποία όπως έχει ήδη αναφερθεί αποδίδεται στην παρουσία των συγκεκριμένων καροτενοειδών. Επίσης, οι δονήσεις που αποδίδονται στα καροτενοειδή εμφανίζουν σημαντική ενίσχυση στην ένταση τους στο φάσμα c σε σχέση με τα φάσματα a και b η οποία αποδίδεται στην αύξηση της συγκέντρωσης των καροτενοειδών σε σχέση με τις χλωροφύλλες στο δείγμα, κυρίως λόγω της παρουσίας Dd.

Σχετικά με τις ιδιότητες που εμφανίζουν οι χλωροφύλλες στο συγκεκριμένο είδος διατόμων, δεν παρατηρείται κάποια διαφοροποίηση ως προς τα συμπεράσματα από τα φάσματα Raman που αναλύθηκαν και στο προηγούμενο κεφάλαιο. Δηλαδή, τα κεντρικά άτομα Mg^{2+} στα περισσότερα ή σε όλα τα μόρια Chl-a/c έχουν αριθμό συναρμογής 5 χωρίς να μπορεί να αποκλεισθεί το ενδεχόμενο παρουσίας ενός πληθυσμού με αριθμό συναρμογής 6 και ασθενείς αξονικούς υποκαταστάτες.

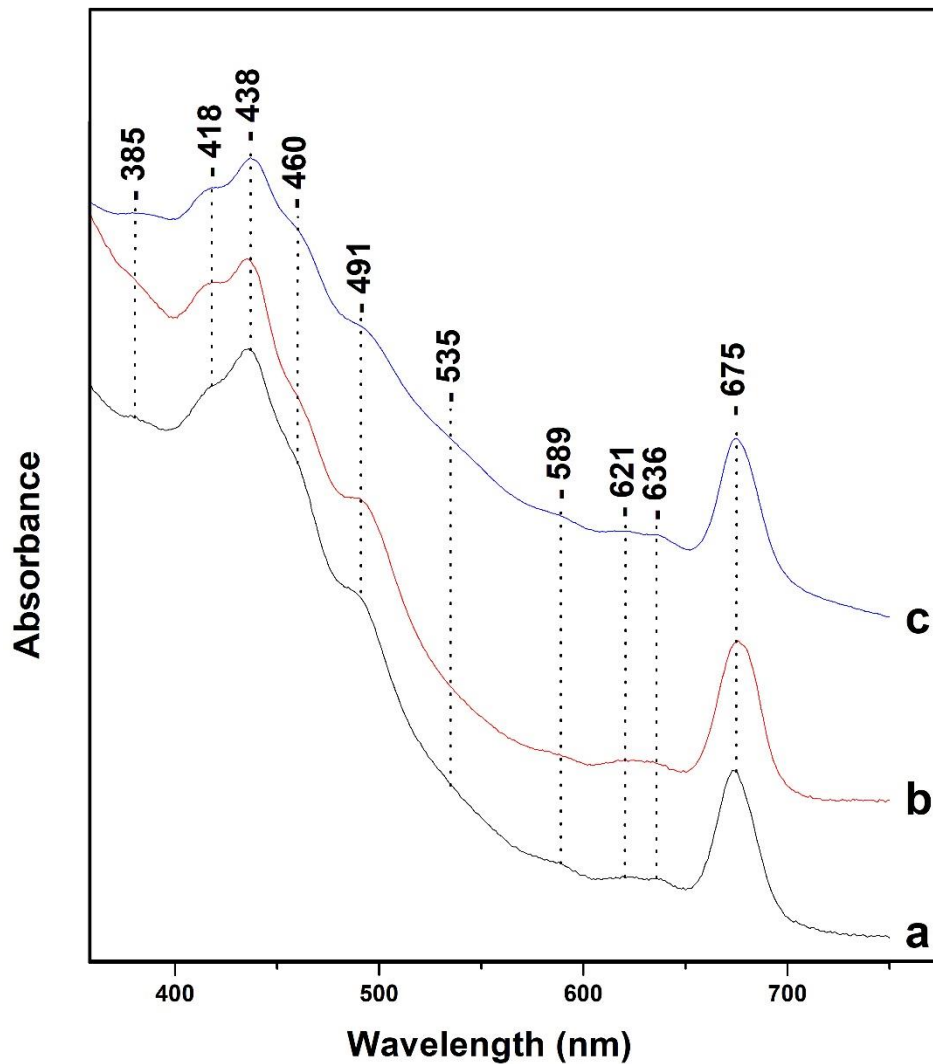
Για να διερευνηθεί περαιτέρω η προσαρμοστικότητα του συγκεκριμένου είδους διατόμων πραγματοποιήθηκαν πειράματα στα οποία ενώ αρχικά η καλλιέργεια αναπτυσσόταν σε συνθήκες HL, ο μισός όγκος της μεταφέρθηκε σε συνθήκες LL. Σκοπός ήταν η απάντηση στο ερώτημα αν οι πιο πάνω παρατηρούμενες μεταβολές είναι αντιστρεπτές, δηλαδή αν ο

οργανισμός μπορεί να επανέλθει σε φυσιολογικές συνθήκες μετά από την έκθεση του σε υψηλής έντασης φωτισμό.



Εικόνα 50 : Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας για τη διερεύνηση της αντιστρεπτότητας των παρατηρούμενων μεταβολών στα κύτταρα του διατόμου *T.Pseudonana* οι οποίες οφείλονται στην ένταση του φωτισμού ανάπτυξης του οργανισμού.

Στην εικόνα 50 παρουσιάζεται η σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε σχετικά με την ανάπτυξη του οργανισμού. Συγκεκριμένα, αρχικά η καλλιέργεια αναπτύχθηκε σε φωσ εντάσεως $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για διάρκεια 4 ημερών και στη συνέχεια ο μισός όγκος της καλλιέργειας μεταφέρθηκε σε συνθήκες $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ενώ το υπόλοιπο παρέμεινε στις αρχικές συνθήκες. Δεν πραγματοποιήθηκε καμία άλλη μεταβολή σχετικά με την ανάπτυξη του οργανισμού. Η λήψη των φασμάτων απορρόφησης ορατού – υπεριώδους και Raman πραγματοποιήθηκε αρχικά την τέταρτη ημέρα, πριν το διαχωρισμό της καλλιέργειας και ακολούθως την ένατη μέρα ανάπτυξης του οργανισμού, λαμβάνοντας δείγματα και από τις δύο καλλιέργειες που αναπτύσσονταν παράλληλα.



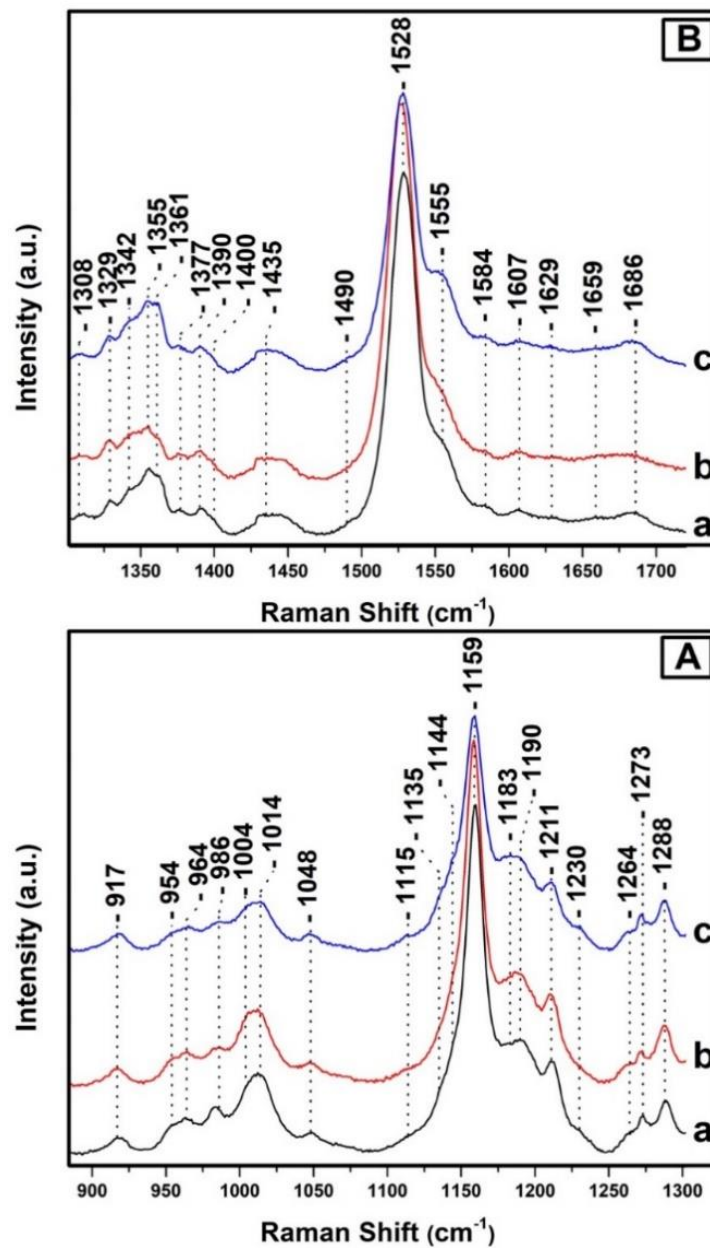
Εικόνα 51 : Φάσματα απορρόφησης ορατού-υπεριώδους των κυττάρων του διατόμου *T.Pseudonana* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από τις εξής συνθήκες : (a) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για τέσσερις ημέρες (b) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για εννέα ημέρες (c) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για τέσσερις ημέρες και ακολούθως 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για πέντε ημέρες.

Στην εικόνα 51 παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης ορατού-υπεριώδους των κυττάρων του διατόμου *T.Pseudonana* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από τις εξής συνθήκες : (a) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για τέσσερις ημέρες (b) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για εννέα ημέρες (c) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για τέσσερις ημέρες και ακολούθως 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για πέντε ημέρες. Το φάσμα α είναι όμοιο με το αντίστοιχο φάσμα c της εικόνας 47 μιας και αφορούν παρόμοιες συνθήκες ανάπτυξης. Στο φάσμα b, ο οργανισμός έχει εκτεθεί σε συνθήκες υψηλού φωτισμού για περισσότερες ημέρες, έτσι όπως ήταν

αναμενόμενο παρατηρείται εξέλιξη των μεταβολών που έχουν αναφερθεί για αυτές τις συνθήκες και συγκεκριμένα περαιτέρω αύξηση της κορυφής στα 491 nm, μείωση της απορρόφησης μεταξύ 500-560 nm καθώς και μείωση του ώμου στα 460 nm. Αντίθετά, στο φάσμα c, εμφανίζονται οι αντίθετες μεταβολές στα φάσματα, λόγω της μείωσης στη συγκέντρωση του καροτενοειδούς Dd υπάρχει μείωση στη κορυφή στα 491 nm, η αύξηση της απορρόφησης στην περιοχή 500-560 nm υποδηλώνει την εμφάνιση μορίων red-Fx ενώ υπάρχει και αύξηση στην απορρόφηση του ώμου στα 460 nm η οποία οφείλεται είτε στην παρουσία blue-Fx ή/και στην αύξηση της Chl-c στο δείγμα. Όπως φαίνεται από τις πιο πάνω παρατηρήσεις όταν η καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε συνθήκες χαμηλότερης έντασης φωτισμού πραγματοποιήθηκε προσαρμογή στις καινούριες συνθήκες ανάπτυξης και αλλαγή στη στοιχειομετρία και την αλληλεπίδραση των χρωστικών ουσιών. Οι αλλαγές αυτές προσομοιάζουν σε πολύ μεγάλο βαθμό την παρατηρούμενη απόκριση του οργανισμού όταν αναπτύχθηκε εξ αρχής σε αυτές τις συνθήκες, όπως παρουσιάστηκε στο φάσμα a της εικόνας 47.

Στην εικόνα 52 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου *T.Pseudonana* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από λευκό φως εντάσεως (a) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για τέσσερις ημέρες (b) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για εννέα ημέρες (c) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για τέσσερις ημέρες και ακολούθως 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για πέντε ημέρες. Όπως και στα φάσματα απορρόφησης, μεταξύ των φασμάτων a και b, παρατηρείται ενίσχυση των χαρακτηριστικών που παρουσιάζει ο οργανισμός λόγω της έκθεσης του σε συνθήκες υψηλού φωτισμού. Η αύξηση της έντασης των κορυφών στους 986 και 1211 cm^{-1} είναι χαρακτηριστική της αύξησης στη συγκέντρωση των καροτενοειδών Dd και Dt και η μείωση στην κορυφή στους 1361 cm^{-1} συνάδει με την αναμενόμενη μεταβολή της διαμόρφωσης στην Chl-c που έχει αναφερθεί σε προηγούμενη ενότητα. Στο φάσμα c που αντιστοιχεί στο δείγμα το οποίο προέρχεται από τον οργανισμό που μεταφέρθηκε από συνθήκες HL σε συνθήκες LL, στην περιοχή δονήσεων της ν_3 των καροτενοειδών (εικόνα 52A), παρατηρείται η τάση εμφάνισης των δύο κορυφών στους 1004 και 1014 cm^{-1} που είναι χαρακτηριστικό της αύξησης της συγκέντρωσης του καροτενοειδούς Fx σε σχέση με την ευρεία κορυφή στους 1011 cm^{-1} που όπως έχει αναλυθεί και στο προηγούμενο κεφάλαιο αποτελεί ένδειξη αύξησης των Dd και Dt. Επίσης υπάρχει αύξηση στην κορυφή στους 1183 cm^{-1} και μείωση στην κορυφή στους 1211 cm^{-1} που επιβεβαιώνουν το ίδιο συμπέρασμα. Στην περιοχή των δονήσεων $\nu(\text{CaN})$ της Chl-c, παρατηρείται αύξηση της κορυφής στους 1361 cm^{-1} που υποδηλώνει την αλλαγή της διαμόρφωσης σε μέρος των μορίων της Chl-c και

προσομοιάζει την αναλογία που εμφανίζεται στα κύτταρα των διατόμων που έχουν αναπτυχθεί σε συνθήκες LL.



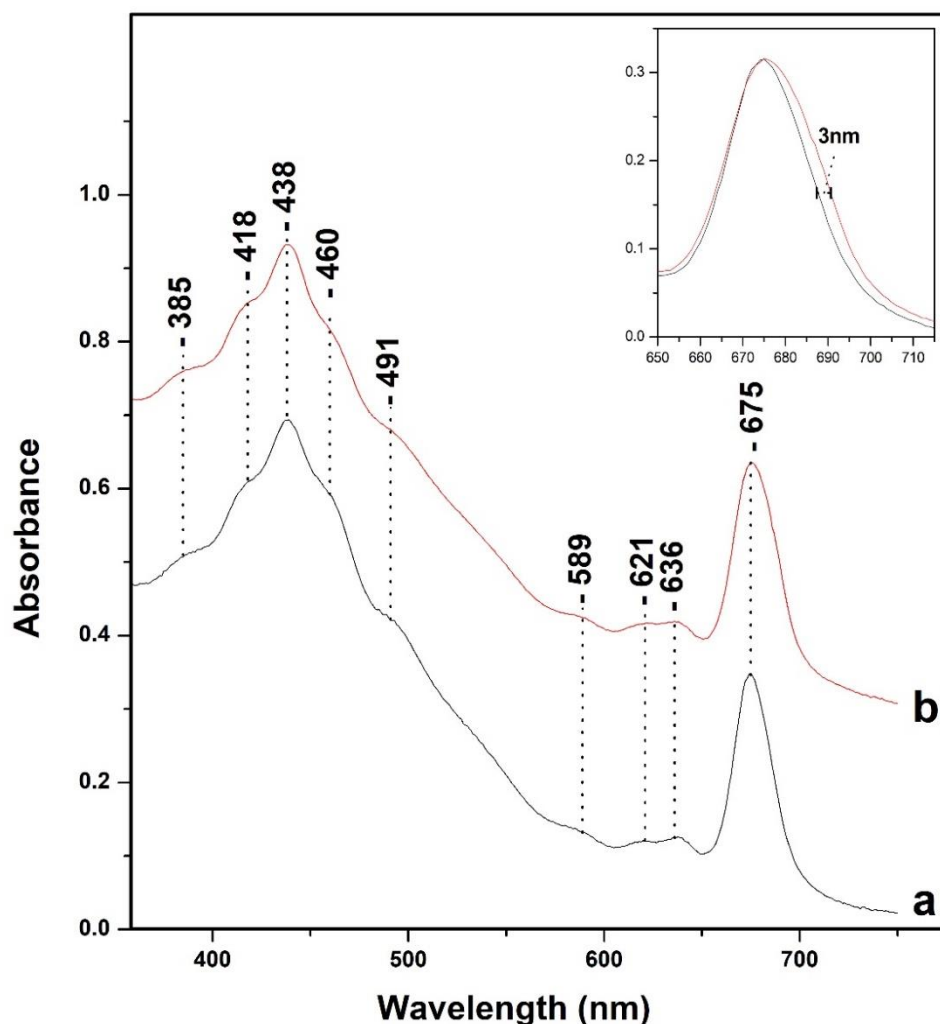
Εικόνα 52 : Φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου *T.Pseudonana* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από λευκό φως εντάσεως (a) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για τέσσερις ημέρες (b) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για εννέα ημέρες (c) 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για τέσσερις ημέρες και ακολούθως 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για πέντε ημέρες.

Συνολικά, τα πιο πάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν πως με την αλλαγή της έντασης του φωτισμού ανάπτυξης των διατόμων πραγματοποιούνται αλλαγές όχι μόνο ως προς τη συγκέντρωση των χρωστικών ουσιών που παράγονται αλλά και ως προς τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους καθώς και την έκφραση πρωτεϊνών εντός των συμπλόκων συλλογής φωτός (12). Οι αλλαγές αυτές καθορίζουν τις ιδιότητες του οργανισμού ως προς τη συλλογή φωτός, τη μεταφορά ενέργειας και τη φωτο-προστασία και μπορούν να αντιστραφούν με τη μεταβολή της έντασης του φωτισμού ανάπτυξης.

Αυτό το αποτέλεσμα αποτυπώνει την άμεση προσαρμογή των διατόμων σε μεταβαλλόμενες συνθήκες φωτισμού με χρήση πολλαπλών στρατηγικών και μηχανισμών οι οποίοι διασφαλίζουν την επιβίωση αλλά και την ανάπτυξη των οργανισμών αυτών σε τέτοιου είδους περιβάλλοντα.

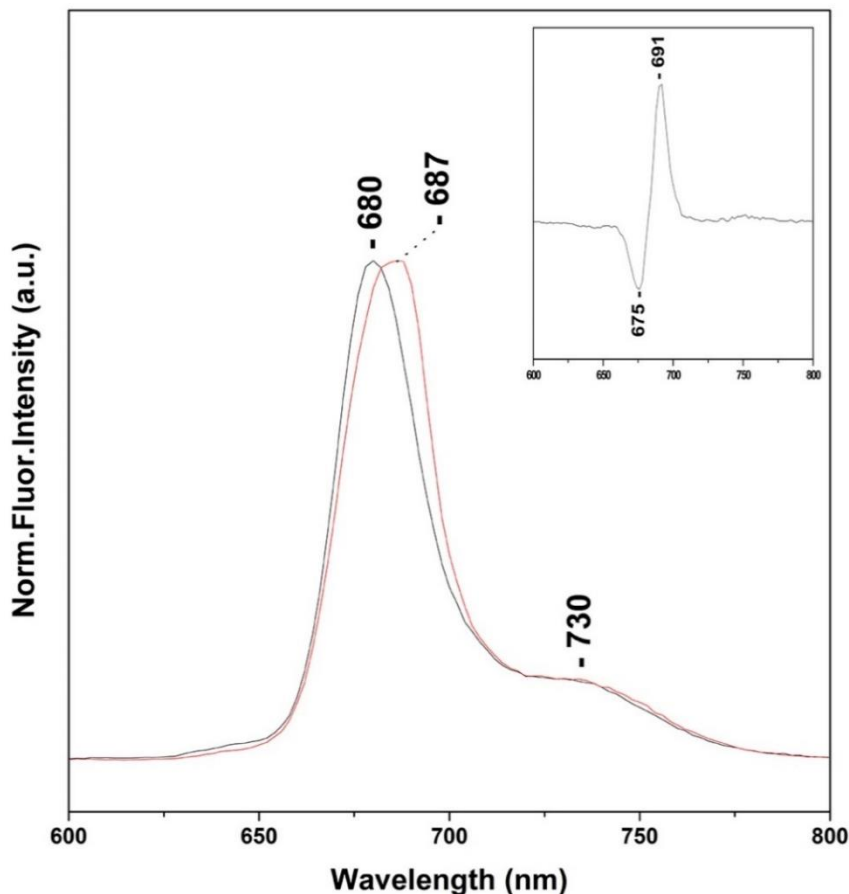
4.3.2 Ανάπτυξη του διατόμου *T.Pseudonana* κάτω από κόκκινο φως

Στο προηγούμενο κεφάλαιο έχουν παρουσιαστεί τα αποτελέσματα της μελέτης της ανάπτυξης του διατόμου *P.Tricornutum* με χρήση κόκκινου φωτός όπου διαπιστώθηκε η ύπαρξη της εκπομπής στα 710nm στο φάσμα φθορισμού προερχόμενη από σύμπλοκα συλλογής φωτός που περιέχουν μόρια Chl-a με σημαντικά διαφορετικές ιδιότητες από τα υπόλοιπα. Η συμπεριφορά αυτή περιγράφεται στη βιβλιογραφία σε κάποια είδη διατόμων όμως περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό στα πτεροειδή διάτομα. Σε αυτή την ενότητα θα γίνει η αντίστοιχη μελέτη για το διάτομο *T.Pseudonana* που όπως έχει αναφερθεί είναι ένα πρότυπο διάτομο της κατηγορίας των κεντρικών διατόμων.



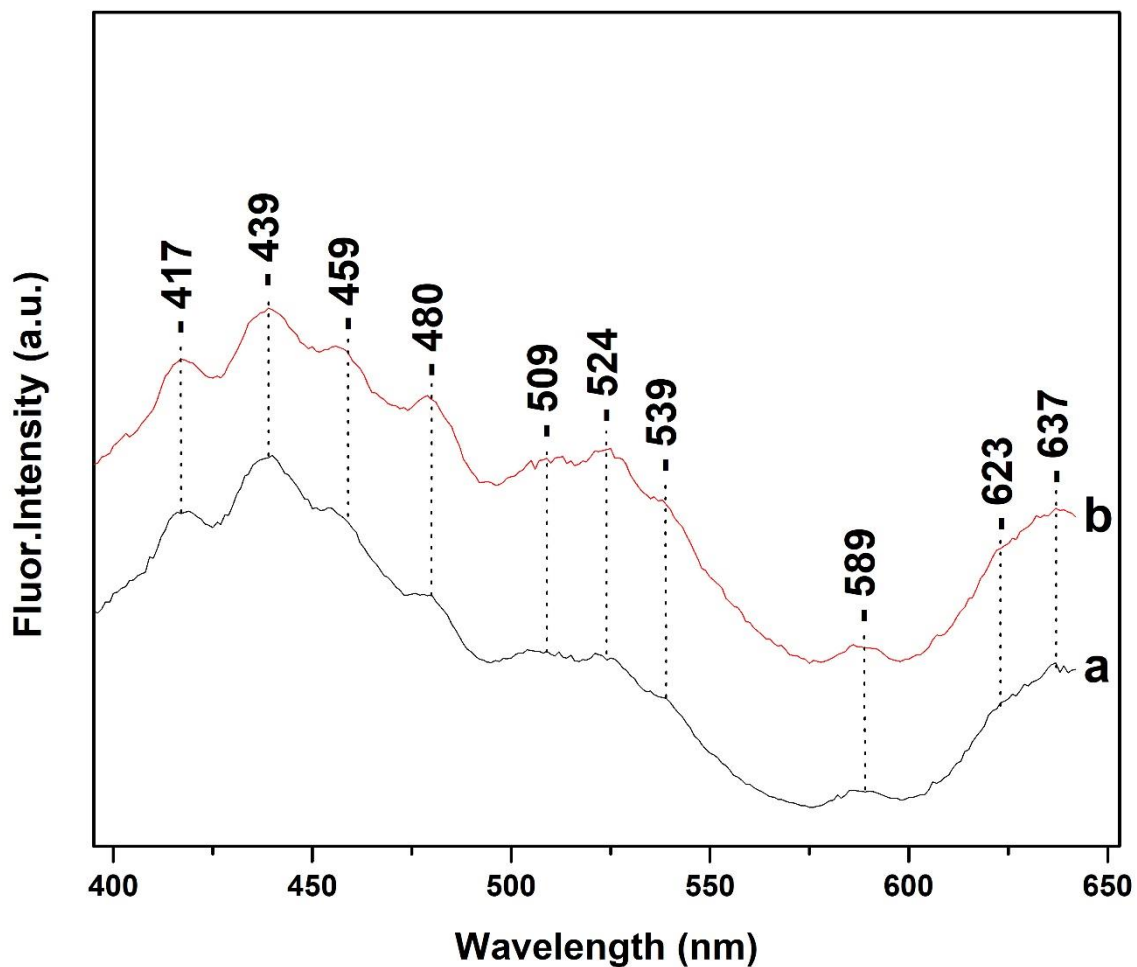
Εικόνα 53 : Φάσματα απορρόφησης ορατού – υπεριώδους των κυττάρων του διατόμου *T.Pseudonana* τα οποία έχουν αναπτυχθεί με φως (α) λευκό και (β) κόκκινο, εντάσεως $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Στην εικόνα 53 παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης ορατού – υπεριώδους των κυττάρων του διατόμου *T.Pseudonana* τα οποία έχουν αναπτυχθεί με φως (α) λευκό και (β) κόκκινο, εντάσεως $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Η μοναδική διαφορά που υπάρχει μεταξύ των δύο φασμάτων εντοπίζεται στην κορυφή στα 675 nm (Q_y , Chl-a) η οποία εμφανίζει αύξηση στο πλάτος της, επεκτείνοντας την απορρόφηση της προς μεγαλύτερα μήκη κύματος. Η κορυφή αυτή έχει πλάτος (FWHM) κατά 3nm μεγαλύτερο στο φάσμα b. Αυτή η συμπεριφορά είναι παρόμοια με το διάτομο *P.Tricornutum* όμως σε πολύ μικρότερο βαθμό. Όπως έχει αναφερθεί, η συμμετοχή της Chl-a σε σύμπλοκα πρωτεϊνών μπορεί να επηρεάσει τις ιδιότητες απορρόφησης που παρουσιάζει. Στην εικόνα 54 εμφανίζονται τα κανονικοποιημένα φάσματα φθορισμού εκπομπής με διέγερση στα 440 nm για τα κύτταρα του διατόμου *T.Pseudonana* τα οποία έχουν αναπτυχθεί με χρήση λευκού φωτός (μαύρη γραμμή) και κόκκινου φωτός (κόκκινη γραμμή).



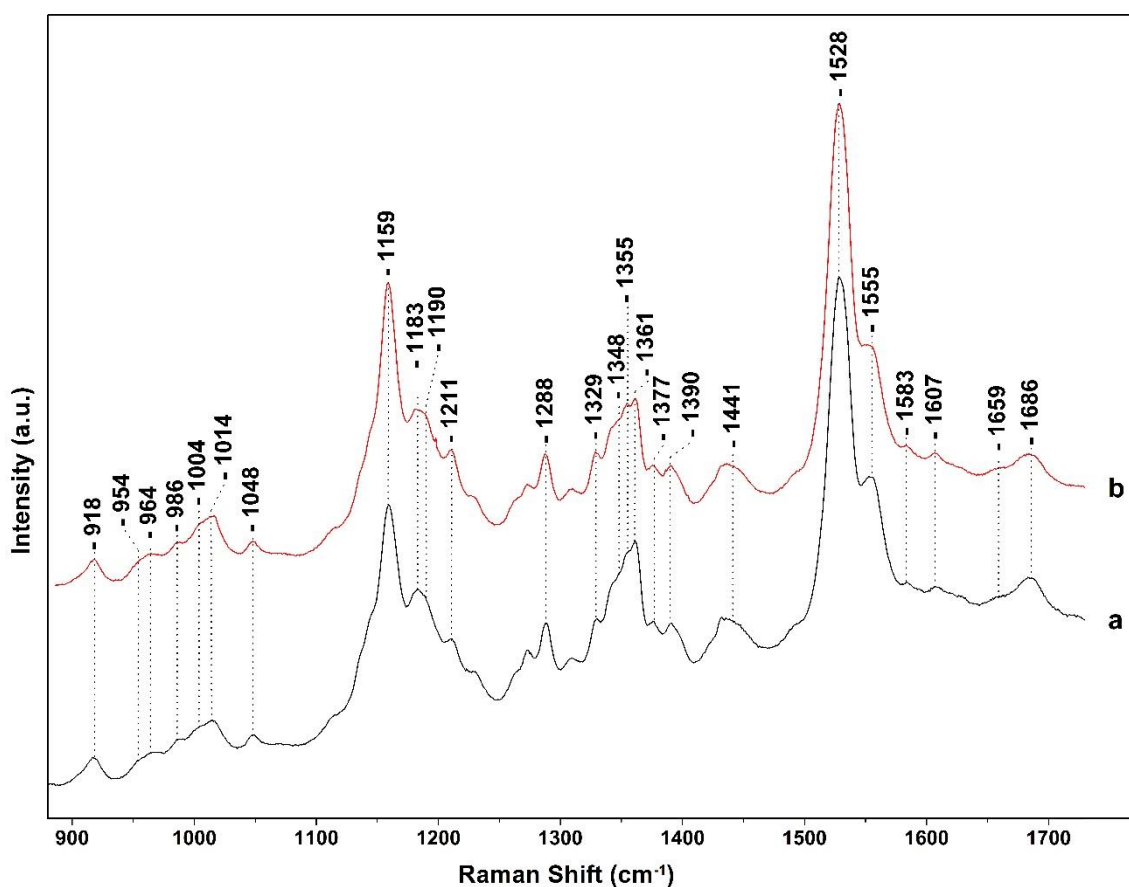
Εικόνα 54 : Κανονικοποιημένα φάσματα φθορισμού εκπομπής με διέγερση στα 440 nm για τα κύτταρα του διατόμου *T.Pseudonana* τα οποία έχουν αναπτυχθεί με χρήση λευκού φωτός (μαύρη γραμμή) και κόκκινου φωτός (κόκκινη γραμμή). Επιπλέον παρουσιάζεται στο ένθετο διάγραμμα το αποτέλεσμα της αφαίρεσης των δύο φασμάτων.

Στα φάσματα της εικόνας 54 παρατηρείται μετατόπιση στην κορυφή εκπομπής που προέρχεται από την Chl-a από τα 680 στα 687 nm μεταξύ των δειγμάτων που αναπτύχθηκαν σε λευκό και κόκκινο φως αντίστοιχα. Από την αφαίρεση των δύο φασμάτων, προκύπτουν δύο κορυφές στα 675 και 691 nm από τις οποίες προκύπτει το συμπέρασμα πως στο δείγμα b κάποια σύμπλοκα περιέχουν μόρια Chl-a χαμηλότερης ενέργειας σε σχέση με το δείγμα a και ταυτόχρονα δεν εντοπίζεται σε αυτό η εκπομπή από σύμπλοκα που περιέχουν τα μόρια Chl-a υψηλότερης ενέργειας από τα οποία προέρχεται η εκπομπή στα 675 nm στο δείγμα a. Η εμφάνιση συμπλόκων συλλογής φωτός που περιλαμβάνουν μόρια Chl-a χαμηλότερης ενέργειας έχει ήδη αναφερθεί και στην περίπτωση του κεντρικού διατόμου *Chaetoceros gracilis* σε αντίστοιχες συνθήκες ανάπτυξης (13,14).



Εικόνα 55 : Φάσματα φθορισμού διέγερσης στα 680 nm των κυττάρων του διατόμου *T.Pseudonana* τα οποία έχουν αναπτυχθεί κάτω από : (a) λευκό και (b) κόκκινο φως εντάσεως $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$

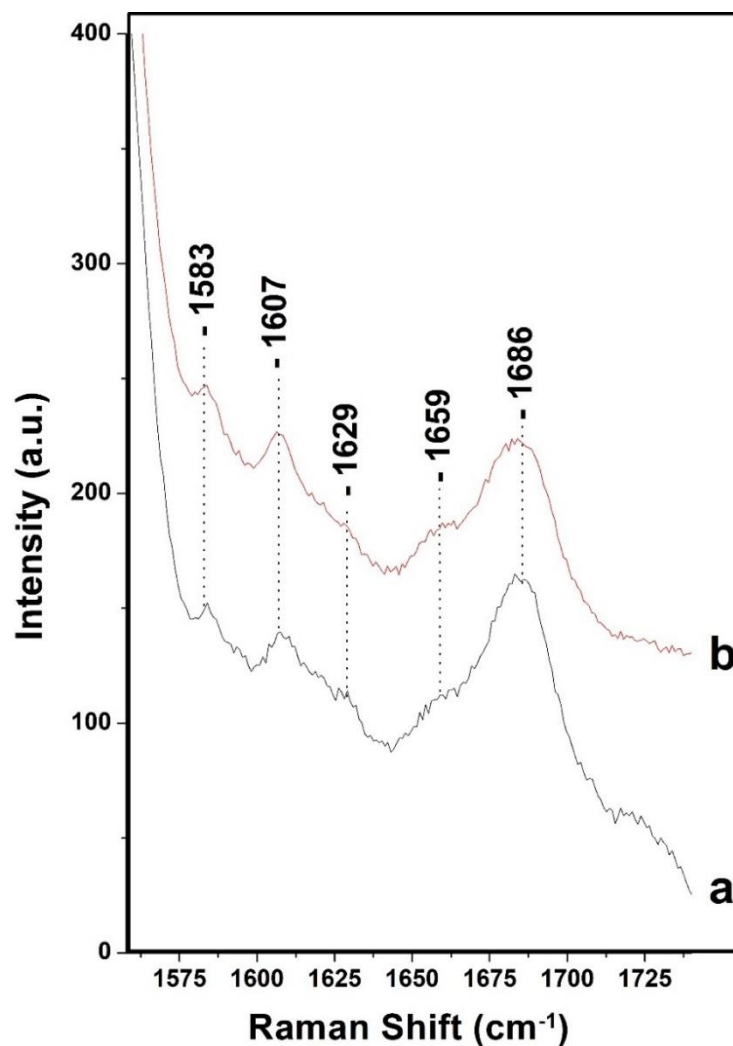
Όπως φαίνεται στην εικόνα 55 όπου εμφανίζονται τα αντίστοιχα φάσματα φθορισμού διέγερσης, δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο δειγμάτων. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός πως δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στην απόδοση μεταφοράς ενέργειας μεταξύ των νέων συμπλόκων που δημιουργούνται με την ανάπτυξη κάτω από κόκκινο φως σε σχέση με την ανάπτυξη κάτω από λευκό φως ή λόγω του σχετικά μικρού πλήθους των συμπλόκων αυτών που έχει ως αποτέλεσμα τη μη αποτύπωση των ιδιοτήτων τους σε αυτό το φάσμα που αφορά ολόκληρα κύτταρα του διατόμου. Τα αντίστοιχα φάσματα Raman των δύο δειγμάτων παρουσιάζονται στην εικόνα 56.



Εικόνα 56 : Φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου *T.Pseudonana* τα οποία έχουν αναπτυχθεί με φως (α) λευκό και (β) κόκκινο, εντάσεως $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Η λήψη των φασμάτων έγινε σε θερμοκρασία -70°C , η διάρκεια λήψης του κάθε φάσματος ήταν 20 λεπτά και το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης 442 nm

Οι χαρακτηριστικές δονήσεις που αντιστοιχούν στα καρτενοειδή των δειγμάτων δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές επιβεβαιώνοντας τις παρατηρήσεις που έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής. Σχετικά με τις δονήσεις C-N στους 1355 και 1361 cm^{-1} που οφείλονται

αποκλειστικά στα μόρια Chl-c παρατηρείται μια μικρή διαφορά με την ένταση της κορυφής στους 1361 cm^{-1} να έχει μειωθεί στο δείγμα που αναπτύχθηκε κάτω από κόκκινο φως. Η μείωση είχε παρατηρηθεί σε μεγαλύτερο βαθμό και στα αντίστοιχα πειράματα με το διάτομο *P.Tricornutum*. Μια επιπρόσθετη διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των δύο φασμάτων είναι στην περιοχή των δονήσεων τάσης των καρβονυλίων όπου υπάρχει μια μικρή αύξηση στο πλάτος της δόνησης στους 1686 cm^{-1} στο δείγμα που αφορά τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν κάτω από κόκκινο φως. Η περιοχή αυτή φαίνεται σε μεγέθυνση στην εικόνα 57.



Εικόνα 57 : Φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου *T.Pseudonana* τα οποία έχουν αναπτυχθεί με φως (α) λευκό και (β) κόκκινο, εντάσεως $15\text{ }\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$.

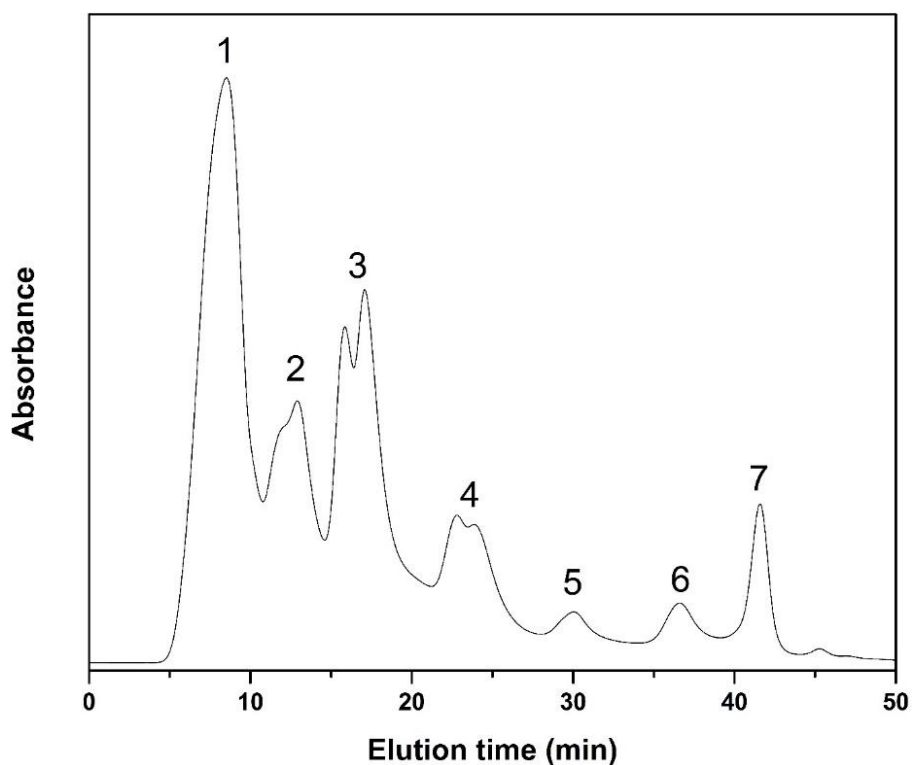
Όπως έχει αναφερθεί και στο προηγούμενο κεφάλαιο, αυτή η παρατήρηση μπορεί να οφείλεται στη δημιουργία ισχυρότερων δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μορίων χλωροφύλλης και του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται, οι οποίοι στη συνέχεια μπορούν να προκαλέσουν τις παρατηρούμενες διαφορές στα φάσματα απορρόφησης.

Είναι προφανές πως οι αλλαγές με όλες τις τεχνικές φασματοσκοπίας είναι πολύ περιορισμένες σε σχέση με τα αντίστοιχα πειράματα στο διάτομο *P. Tricornutum*, αυτό αποτελεί ακόμη μια ένδειξη πως τα διαφορετικά είδη διατόμων έχουν αναπτύξει διαφορετικές μεθόδους προσαρμογής τόσο σε περιβάλλοντα με διαφορετικής έντασης φωτισμό όσο και σε συνθήκες όπου το φως το οποίο φτάνει σε αυτά έχει περιορισμένο εύρος ως προς το μήκος κύματος και κατ' επέκταση την ενέργεια που μεταφέρει.

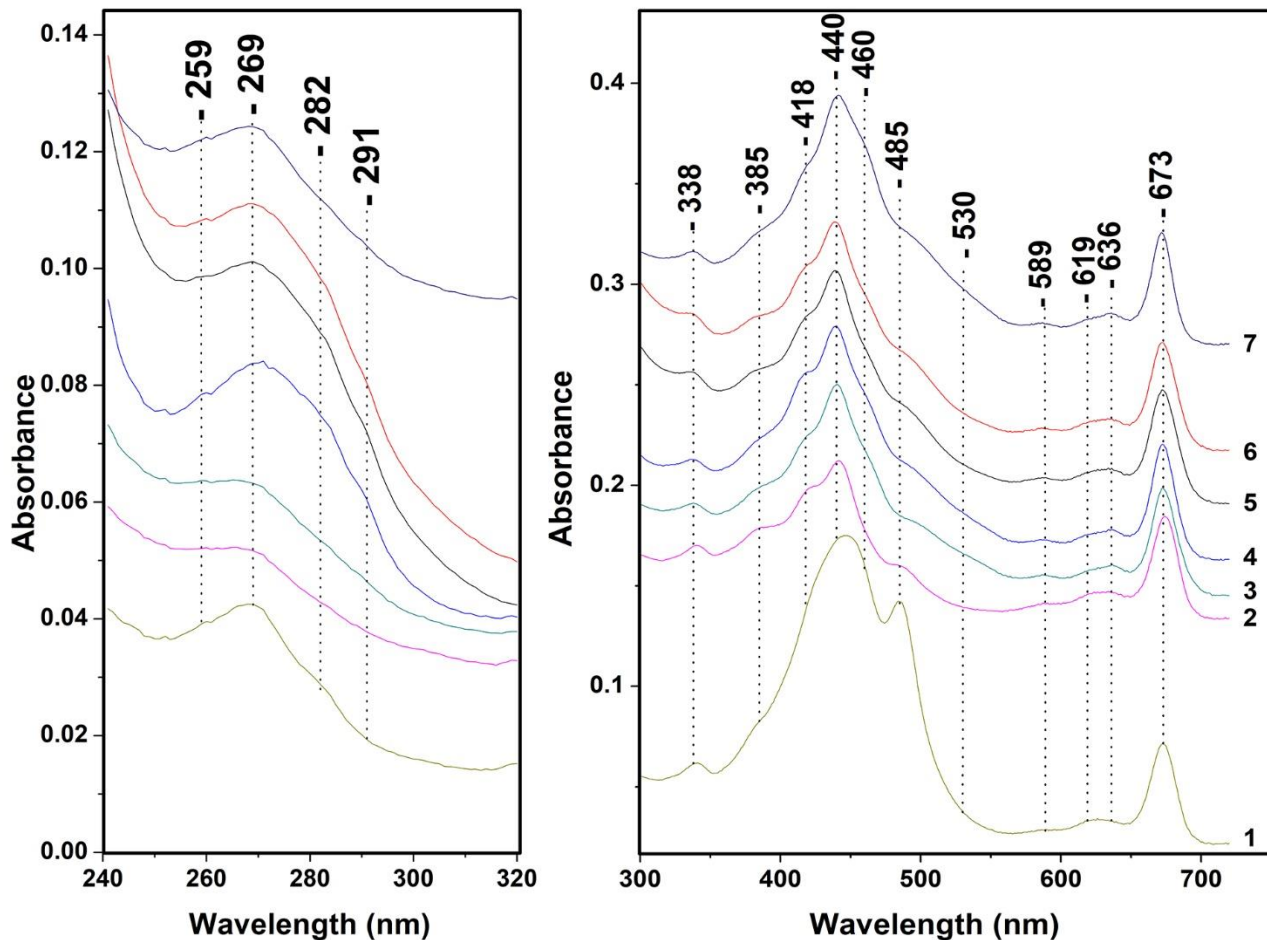
Παρόλα αυτά, τα πιο πάνω αποτελέσματα δείχνουν την παρουσία μορίων χλωροφύλλης α με διαφορετικές ιδιότητες όταν το διάτομο αναπτύσσεται κάτω από κόκκινο φως, κάτι που αποτελεί ένδειξη για την ύπαρξη συμπλόκων συλλογής φωτός που δημιουργούνται στο διάτομο μόνο κάτω από αυτές τις συνθήκες.

4.3.3 Απομόνωση και χαρακτηρισμός των συμπλόκων συλλογής φωτός του διατόμου *T.Pseudonana*

Στη συνέχεια θα γίνει χαρακτηρισμός των συμπλόκων συλλογής φωτός που απομονώθηκαν από το διάτομο *T.Pseudonana*. Οι συνθήκες προετοιμασίας των δειγμάτων και η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε είναι ίδια με τα αντίστοιχα στο προηγούμενο κεφάλαιο (15). Παρόλα αυτά, όπως φαίνεται και στην εικόνα 58 όπου παρουσιάζεται το χρωματογράφημα στο οποίο απεικονίζονται οι χρόνοι έκλουσης των συμπλόκων που απομονώθηκαν, υπάρχουν σημαντικές διαφορές ως προς το χρόνο και τη μορφή των κορυφών που απεικονίζονται σε σχέση με την περίπτωση του διατόμου *P.Tricornutum*.



Εικόνα 58 : Χρωματογράφημα νγρης χρωματογραφίας το οποίο απεικονίζει τα διαφορετικά σύμπλοκα συλλογής φωτός τα οποία προέρχονται από το διάτομο *T.Pseudonana* σε σχέση με το χρόνο διαχωρισμού τους. Το μήκος κύματος αντίχνευσης ήταν τα 440nm.

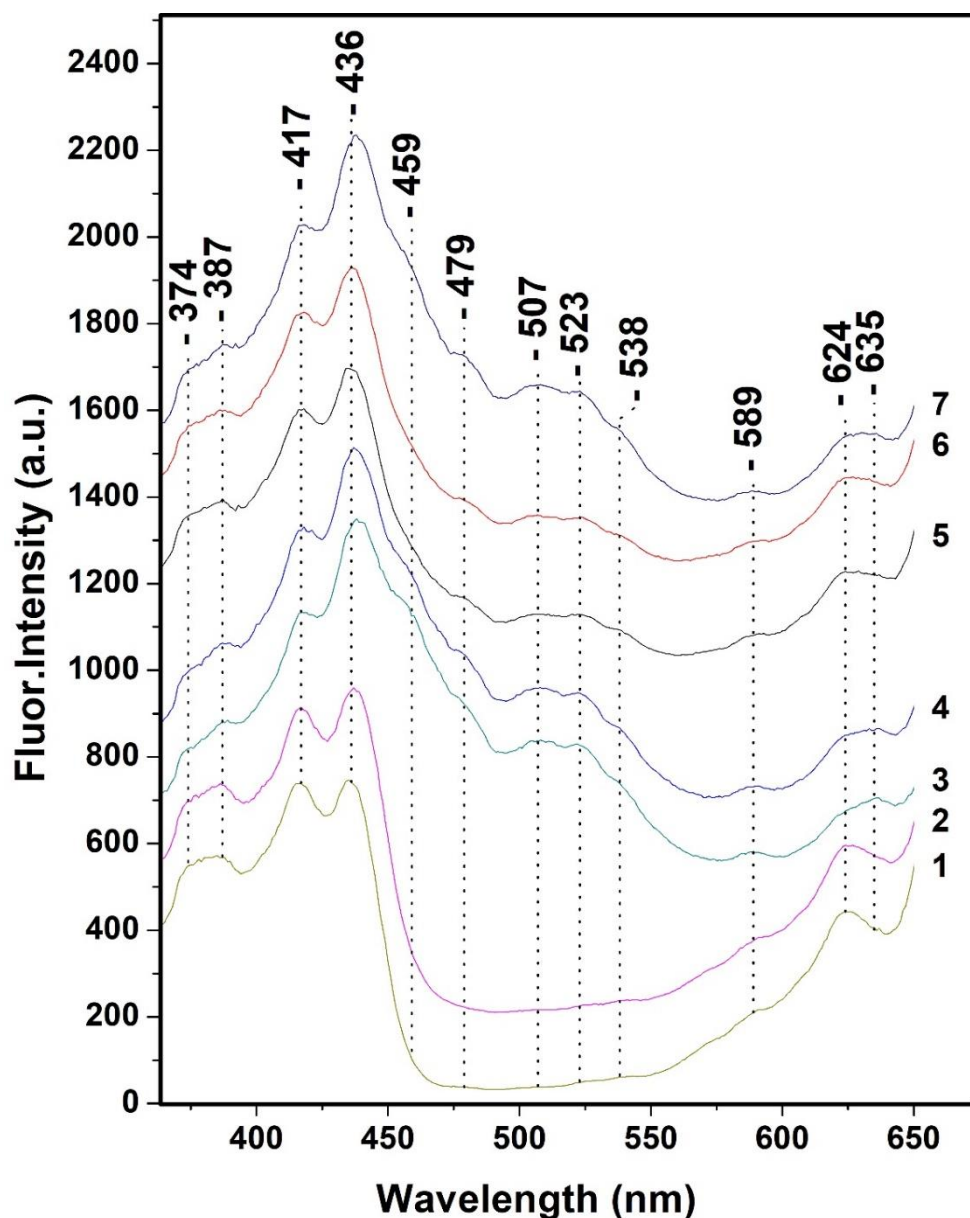


Εικόνα 59 : Φάσματα απορρόφησης ορατού – υπεριώδους των συμπλόκων συλλογής φωτός του διατόμου *T.Pseudonana* όπως αυτά έχουν διαχωριστεί .

Στην εικόνα 59 παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης ορατού – υπεριώδους των συμπλόκων συλλογής φωτός του διατόμου *T.Pseudonana* όπως αυτά έχουν διαχωριστεί. Όλα τα φάσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς την κορυφή στα 673 nm που προέρχεται από την Chl-a. Στα αριστερά της εικόνας 59 εμφανίζεται σε μεγέθυνση η περιοχή όπου εμφανίζουν χαρακτηριστικές απορροφήσεις τα αμινοξέα. Είναι εμφανές από τις διαφορές μεταξύ των δειγμάτων πως υπάρχει διαφορετική σύσταση αμινοξέων και κατ' επέκταση πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα, έτσι είναι αναμενόμενες και οι διαφορετικές ιδιότητες των χρωστικών ουσιών που συμμετέχουν σε κάθε σύμπλοκο και θα παρουσιαστούν στη συνέχεια. Στα δεξιά της εικόνας 59 εμφανίζεται η περιοχή απορρόφησης των καροτενοειδών και των χλωροφυλλών των δειγμάτων. Το δείγμα 1 παρουσιάζει σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα υπόλοιπα κυρίως λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης στο καροτενοειδές Dd όπως φαίνεται από τη

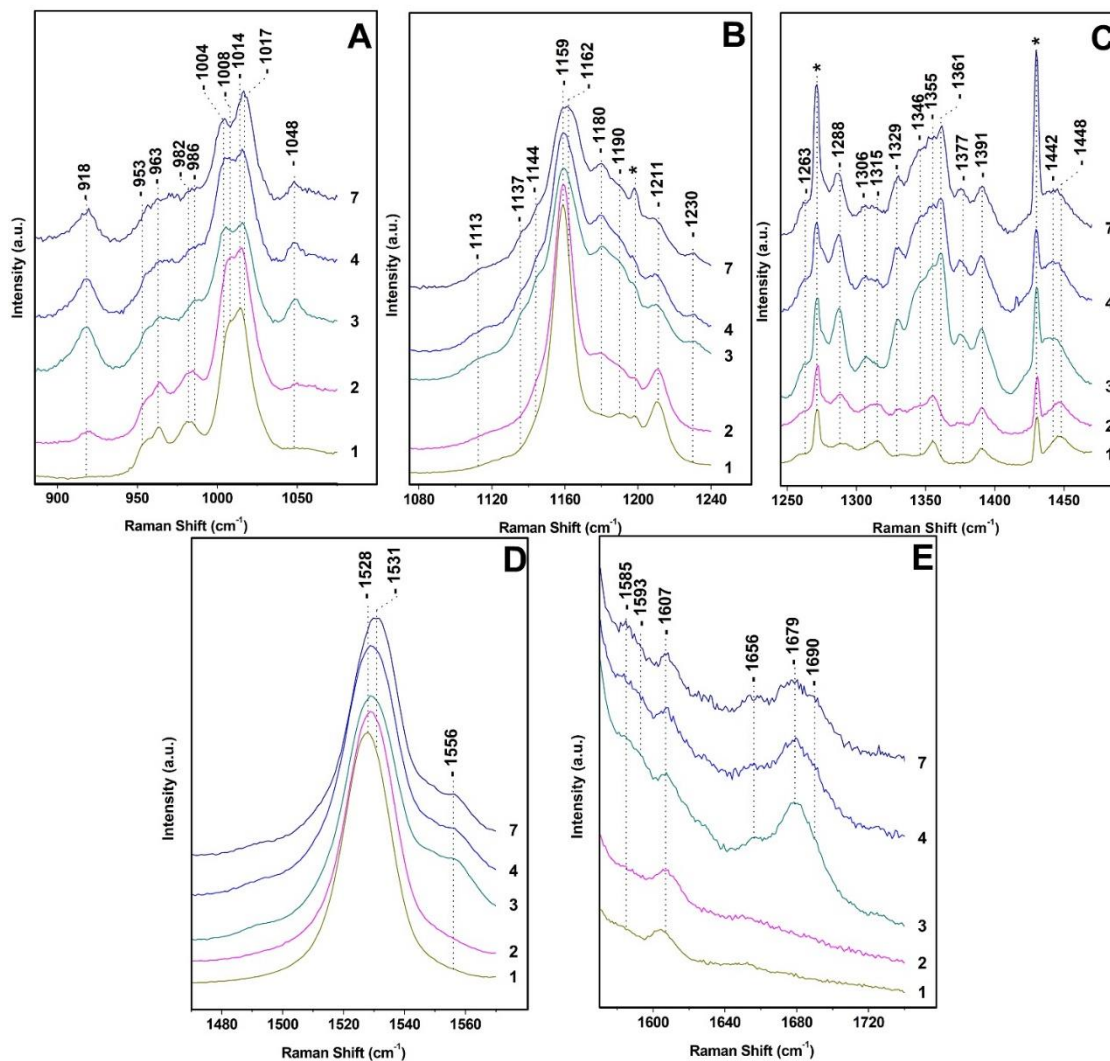
μεγάλη ένταση της κορυφής στα 485 nm καθώς και τη χαμηλή συγκέντρωση σε Chl-c όπως φαίνεται από την κορυφή στα 636 nm. Στο δείγμα 2, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα, η ένταση των κορυφών στην περιοχή 350-500 nm είναι αντίστοιχη με την κορυφή στα 673 nm που υποδηλώνει μικρή συγκέντρωση καροτενοειδών σε σχέση με τις χλωροφύλλες. Η ύπαρξη red-Fx είναι ορατή κυρίως στα δείγματα 3,4 και 7 αλλά και με μικρότερη ένταση στα δείγματα 5 και 6 όπως αποτυπώνεται από την ευρεία απορρόφηση στην περιοχή 500-560 nm.

Στην εικόνα 60 παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού διέγερσης στα 677 nm. Οι χαρακτηριστικές κορυφές στην περιοχή 490-560 nm που οφείλονται στις red-Fx είναι ορατές σε όλα τα δείγματα εκτός από τα δείγματα 1 και 2 παρόλο που η ένταση τους είναι σημαντικά μεγαλύτερη στα δείγματα 3,4 και 7. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι μια σημαντική διαφορά σε σχέση με τα αντίστοιχα φάσματα από το διάτομο *P. Tricornutum* όπου η παρουσία red-Fx ήταν εμφανής μόνο σε 3 από τα 7 δείγματα. Η κορυφή στα 635 nm η οποία προέρχεται από την Chl-c, παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις στην ένταση μεταξύ των δειγμάτων και παρουσιάζει μεγαλύτερη ένταση στα δείγματα 3,4 και 7 τα οποία πιθανώς να παρουσιάζουν αποδοτικότερη συμμετοχή στη μεταφορά ενέργειας από την Chl-c προς την Chl-a, κάτι που υποστηρίζεται και από την αύξηση της κορυφής στα 459nm που εμφανίζεται ως ώμος στα αντίστοιχα φάσματα. Η απουσία σήματος στην περιοχή 450-560 nm στα δείγματα 1 και 2 αλλά και η χαμηλότερη ένταση που εμφανίζουν τα δείγματα 5 και 6 υποδηλώνει μειωμένη ή ανύπαρκτη συμμετοχή τόσο της Chl-c όσο και των καροτενοειδών στη μεταφορά ενέργειας προς την Chl-a.



Εικόνα 60 : Φάσματα φθορισμού διέγερσης στα 677 nm των συμπλόκων συλλόγης φωτός του διατόμου *T.Pseudonana* όπως αυτά έχουν διαχωριστεί .

Εξαίρεση αποτελούν μόρια blue-Fx που λόγω της επικάλυψης τους με τις κορυφές που οφείλονται στην Chl-a δεν είναι εφικτό να αποκλειστεί η παρουσία τους. Αξίζει να σημειωθεί πως παρά τη μεγάλη παρουσία Dd πρωτίστως στο δείγμα 1 αλλά και στο δείγμα 2, από τα φάσματα στην εικόνα 60 δεν προκύπτει συμμετοχή αυτών των καροτενοειδών στην απευθείας μεταφορά ενέργειας προς τη Chl-a.



Εικόνα 61 : Φάσματα Raman των συμπλόκων συλλογής φώτος του διατόμου *T.Pseudonana* όπως αυτά έχουν διαχωριστεί . Η λήψη των φασμάτων έγινε σε θερμοκρασία -70°C , η διάρκεια λήψης του κάθε φάσματος ήταν 20 λεπτά και το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης 442 nm.

Στην εικόνα 61 εμφανίζονται τα φάσματα Raman των συμπλόκων συλλογής φώτος του διατόμου *T.Pseudonana* όπως αυτά έχουν διαχωριστεί . Η λήψη των φασμάτων έγινε σε θερμοκρασία -70°C , η διάρκεια λήψης του κάθε φάσματος ήταν 20 λεπτά και το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης 442 nm. Όπως είχε παρατηρηθεί και στην περίπτωση των συμπλόκων που προέρχονταν από το διάτομο *P.Tricornutum*, τα μόρια χλωροφύλλης στα πρώτα δύο σύμπλοκα που απομονώθηκαν εμφανίζουν ευαισθησία στην ακτινοβολία διέγερσης που χρησιμοποιείται με αποτέλεσμα να μην είναι ορατές οι αντίστοιχες δονήσεις στα φάσματα Raman. Στην περίπτωση του δείγματος 2, υπάρχει μια μικρή συνεισφορά από

τα μόρια χλωροφύλλης η οποία είναι ορατή στους 918 και 1377 cm^{-1} . Παρόλα αυτά τα φάσματα έχουν συμπεριληφθεί στην εικόνα 61 λόγω των πληροφοριών που προσφέρουν οι δονήσεις που προέρχονται από τα καροτενοειδή που διαθέτουν. Τα δείγματα 5 και 6 δεν περιλαμβάνονται λόγω πολύ χαμηλής συγκέντρωσης που δεν επέτρεπε τη λήψη φασμάτων Raman. Στην εικόνα 61A, οι δονήσεις στους 1008 και 1014 cm^{-1} προέρχονται από τα καροτενοειδή Dd και Dt τα οποία φαίνεται πως είναι έχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο δείγμα σε σχέση με τα υπόλοιπα καροτενοειδή. Αντίθετα στα δείγματα 3,4 και 7 φαίνεται πως στα φάσματα 12A και 12B υπάρχει σημαντική παρουσία δονήσεων του καροτενοειδούς φουκοξανθίνη με την αύξηση της κορυφής στους 1017 cm^{-1} . Η διαφορετική αναλογία των εντάσεων των χαρακτηριστικών κορυφών που εμφανίζουν τα καροτενοειδή σε αυτά τα τρία δείγματα υποστηρίζει το συμπέρασμα πως τα διαφορετικά σύμπλοκα έχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις των καροτενοειδών αυτών. Αυτό ενισχύεται και από τα φάσματα στην εικόνα 61D της χαρακτηριστικής δόνησης ν_1 των καροτενοειδών η οποία προέρχεται από την υπέρθεση των κορυφών όλων των καροτενοειδών του δείγματος εμφανίζει διαφορές στη θέση και το πλάτος της. Όπως έχει αναφερθεί και στο προηγούμενο κεφάλαιο, η θέση της συγκεκριμένης κορυφής είναι ανάλογη με το μήκος συζυγίας της πολυμερικής αλυσίδας του καροτενοειδούς και το πλάτος της ενδεικτικό του πλήθους των καροτενοειδών που υπάρχουν στο δείγμα.

Στην εικόνα 61C παρουσιάζεται η περιοχή των δονήσεων C-N των μορίων chl-a/c. Δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων 3,4 και 7 με εξαίρεση μια μικρή αύξηση της έντασης στους 1355 cm^{-1} για τα δείγματα 4 και 7 σε σχέση με το δείγμα 3. Τέλος, στην εικόνα 61E, στην περιοχή των χαρακτηριστικών δονήσεων C=O εμφανίζονται τρεις κορυφές στους 1656, 1679 και 1690 cm^{-1} . Η πρώτη κορυφή οφείλεται στο καροτενοειδές Fx ενώ οι άλλες δύο προέρχονται από τις chl-a/c. Όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, η θέση των κορυφών αυτών υποδηλώνει την παρουσία ισχυρών (1679 cm^{-1}) ή ασθενέστερων (1690 cm^{-1}) δεσμών υδρογόνου με το περιβάλλον τους.

Όλες οι πιο πάνω παρατηρήσεις, όπως και στην περίπτωση των συμπλόκων του διατόμου *P. Tricornutum*, συνηγορούν στο συμπέρασμα πως το κάθε σύμπλοκο έχει διαφορετικές ιδιότητες και επιτελεί διαφορετικές λειτουργίες που απαιτούνται για τη συλλογή ενέργειας και τη φωτο-προστασία του οργανισμού. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός πως από τα αποτελέσματα της μελέτης των δύο ειδών διατόμων φαίνεται πως παρά τις ομοιότητες που

εμφανίζουν τα σύμπλοκα που έχουν απομονωθεί υπάρχουν και αρκετές διαφορές μεταξύ τους.

4.4 Συμπεράσματα Κεφαλαίου

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάστηκε η φασματοσκοπική μελέτη του διατόμου *T.Pseudonana*.

Αρχικά, στα πειράματα όπου έγινε ανάπτυξη του διατόμου κάτω από τρεις διαφορετικές εντάσεις λευκού φωτός παρατηρήθηκε ανάλογη απόκριση όπως και στην περίπτωση του διατόμου *P.Tricornutum*. Συγκεκριμένα εντοπίστηκε αύξηση της συγκέντρωσης των καροτενοειδών διαδινοξανθίνη και διατοξανθίνη καθώς και δραματική μείωση στη συγκέντρωση των μορίων φουκοξανθίνης τα οποία εμφανίζουν μετατόπιση στην απορρόφηση τους προς το ερυθρό. Αντίστοιχη συμπεριφορά παρατηρήθηκε και ως προς τις διαμορφώσεις που εμφανίζουν τα μόρια χλωροφύλλης c σε σχέση με την ένταση του φωτός ανάπτυξης των διατόμων.

Η συμπερίληψη μιας επιπλέον συνθήκης ανάπτυξης χαμηλότερης έντασης φωτισμού επιβεβαίωσε πως όλες οι πιο πάνω μεταβολές έχουν εξάρτηση από την ένταση του φωτός. Παρόλα αυτά, μεταξύ 15-150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ η επίδραση της αύξησης της έντασης του φωτός ανάπτυξης είχε πολύ μικρότερη επίδραση σε σχέση με τη χρήση 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για τη μελέτη της αντιστρεπτότητας των πιο πάνω μεταβολών κατέδειξαν πως το είδος *T.Pseudonana* μπορεί αρκετά γρήγορα να προσαρμοστεί σε μεταβολές της εντάσεως του φωτός ανάπτυξης προσαρμόζοντας τις συγκεντρώσεις των χρωστικών ουσιών που παράγει και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Αυτό έγινε εμφανές αρχικά από τα φάσματα απορρόφησης ορατού – υπεριώδους όπου μετά τη μεταφορά της καλλιέργειας των διατόμων από φωτισμό με ένταση 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ σε φωτισμό με 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ μειώθηκε η κορυφή στα 491 nm που αποδίδεται στο καροτενοειδές διαδινοξανθίνη και ταυτόχρονα αυξήθηκε η απορρόφηση στην περιοχή 500-560 nm που αποδίδεται σε μόρια φουκοξανθίνης που λόγω του περιβάλλοντος που βρίσκονται εμφανίζουν μετατόπιση προς το ερυθρό. Παράλληλα με χρήση της φασματοσκοπίας Raman παρατηρήθηκε αλλαγή στις εντάσεις των κορυφών στους 1355 και 1361 cm^{-1} και επαναφορά

στην αναλογία που έχει εντοπιστεί πως εμφανίζεται σε αυτό το είδος διατόμου όταν αναπτύσσεται κάτω από $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Σχετικά με την ανάπτυξη του διατόμου κάτω από κόκκινο φως, η απόκριση του οργανισμού ήταν πολύ διαφορετική σε σχέση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα στο διάτομο *P. Tricornutum*. Παρατηρήθηκε μια μικρή μεταβολή στα μόρια χλωροφύλλης *a* που επέκτεινε την απορρόφηση τους κατά ένα μικρό ποσοστό προς το ερυθρό η οποία δε φαίνεται πως επηρέασε σε μεγάλο βαθμό τη λειτουργία του οργανισμού ως προς τη συλλογή και μεταφορά ενέργειας.

Από τη μελέτη των συμπλόκων συλλογής φωτός που απομονώθηκαν από το συγκεκριμένο οργανισμό προέκυψε το συμπέρασμα πως και σε αυτή την περίπτωση εντοπίζονται διαφορετικές ιδιότητες σε κάθε σύμπλοκο ανάλογα με τη στοιχειομετρία και το πρωτεϊνικό περιβάλλον που διαθέτει.

4.5 Βιβλιογραφία Κεφαλαίου 4

1. Armbrust, E. V. (2009). The life of diatoms in the world's oceans. In *Nature* (Vol. 459, Issue 7244, pp. 185–192). <https://doi.org/10.1038/nature08057>
2. Falciatore, A., Jaubert, M., Bouly, J. P., Bailleul, B., & Mock, T. (2020). Diatom molecular research comes of age: Model species for studying phytoplankton biology and diversity[open]. In *Plant Cell* (Vol. 32, Issue 3, pp. 547–572). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00158>
3. Armbrust, E. V., Berges, J. A., Bowler, C., Green, B. R., Martinez, D., Putnam, N. H., Zhou, S., Allen, A. E., Apt, K. E., Bechner, M., Brzezinski, M. A., Chaal, B. K., Chiovitti, A., Davis, A. K., Demarest, M. S., Detter, J. C., Glavina, T., Goodstein, D., Hadi, M. Z., ... Rokhsar, D. S. (2004). The genome of the diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, evolution, and metabolism. *Science*, 306(5693), 79–86. <https://doi.org/10.1126/science.1101156>
4. Goss, R., & Lepetit, B. (2015). Biodiversity of NPQ. In *Journal of Plant Physiology* (Vol. 172, pp. 13–32). Urban und Fischer Verlag GmbH und Co. KG. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.03.004>
5. Blommaert, L., Chafai, L., & Bailleul, B. (2021). The fine-tuning of NPQ in diatoms relies on the regulation of both xanthophyll cycle enzymes. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91483-x>
6. Nagao, R., Ueno, Y., Yokono, M., Shen, J. R., & Akimoto, S. (2018). Alterations of pigment composition and their interactions in response to different light conditions in the diatom *Chaetoceros gracilis* probed by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1859(7), 524–530. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.04.003>
7. Oka, K., Ueno, Y., Yokono, M., Shen, J. R., Nagao, R., & Akimoto, S. (2020). Adaptation of light-harvesting and energy-transfer processes of a diatom *Phaeodactylum tricornutum* to different light qualities. *Photosynthesis Research*, 146(1–3), 227–234. <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00714-1>
8. Premvardhan, L., Bordes, L., Beer, A., Büchel, C., & Robert, B. (2009). Carotenoid structures and environments in trimeric and oligomeric fucoxanthin chlorophyll a/c2 proteins from resonance raman spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(37), 12565–12574. <https://doi.org/10.1021/jp903029g>

9. Lamb, J. J., Røkke, G., & Hohmann-Marriott, M. F. (2018). Chlorophyll fluorescence emission spectroscopy of oxygenic organisms at 77 K. In *Photosynthetica* (Vol. 56, Issue 1, pp. 105–124). The Institute of Experimental Biology of the Czech Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0791-y>
10. Alexandre, M. T. A., Gundermann, K., Pascal, A. A., van Grondelle, R., Büchel, C., & Robert, B. (2014). Probing the carotenoid content of intact *Cyclotella* cells by resonance Raman spectroscopy. *Photosynthesis Research*, *119*(3), 273–281. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9942-y>
11. Schick, G. A., & Bocian, D. F. (1987). Resonance Raman studies of hydroprophyrins and chlorophylls. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 895).
12. Zhu, S. H., & Green, B. R. (2010). Photoprotection in the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Role of LI818-like proteins in response to high light stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1797*(8), 1449–1457. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.04.003>
13. Ueno, Y., Nagao, R., Shen, J. R., & Akimoto, S. (2019). Spectral Properties and Excitation Relaxation of Novel Fucoxanthin Chlorophyll a/c-Binding Protein Complexes. *Journal of Physical Chemistry Letters*, *10*(17), 5148–5152. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcl.9b02093>
14. Akimoto, S., Ueno, Y., Yokono, M., Shen, J. R., & Nagao, R. (2020). Adaptation of light-harvesting and energy-transfer processes of a diatom *Chaetoceros gracilis* to different light qualities. *Photosynthesis Research*, *146*(1–3), 87–93. <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00713-2>
15. Kansy, M., Volke, D., Sturm, L., Wilhelm, C., Hoffmann, R., & Goss, R. (2020). Pre-purification of diatom pigment protein complexes provides insight into the heterogeneity of FCP complexes. *BMC Plant Biology*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02668-x>

5 Συμπεράσματα – Μελλοντική έρευνα

5.1 Συμπεράσματα

Από τα πειραματικά αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια προκύπτουν κάποια σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με τη μελέτη της απόκρισης των διατόμων *P.Tricornutum* και *T.Pseudonana* κάτω από διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης. Τα κυριότερα συμπεράσματα που προέκυψαν από την ανάπτυξη και των δύο οργανισμών κάτω από λευκό φως υψηλής έντασης είναι τα εξής :

- Με την αύξηση της έντασης του φωτός ανάπτυξης, αυξάνεται η παραγωγή των καροτενοειδών διαδινοξανθίνη και διατοξανθίνη
- Για πολύ υψηλές τιμές της έντασης του φωτός παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης στην υποκατηγορία του καροτενοειδούς φουκοξανθίνη, «red-Fx» .
- Υπάρχει σύνδεση μεταξύ της έντασης του φωτός ανάπτυξης και του πληθυσμού των μορίων χλωροφύλλης c οι οποίες εμφανίζουν συγκεκριμένες διαμορφώσεις εντός των FCPs.
- Η συμμετοχή των μορίων φουκοξανθίνης και χλωροφύλλης c στη μεταφορά ενέργειας προς τη χλωροφύλλη a εμφανίζει εξάρτηση από την ένταση του φωτός ανάπτυξης.
- Για το είδος *T.Pseudonana* αποδείχθηκε πως οι παρατηρούμενες μεταβολές είναι αντιστρεπτές όταν γίνεται μεταφορά της καλλιέργειας σε περιβάλλον χαμηλότερης έντασης φωτισμού.

Τα πιο πάνω συμπεράσματα καταδεικνύουν τη στρατηγική που ακολουθούν τα διάτομα όταν αναπτύσσονται κάτω από διαφορετική ένταση φωτισμού, δηλαδή της μεταβολής τόσο της σύστασης όσο και της δομής των μερών που απαρτίζουν το φωτοσυνθετικό τους σύστημα με σκοπό την προσαρμογή τους και την αποδοτική συλλογή και εκμετάλλευση του φωτός. Η χρήση των συγκεκριμένων φασματοσκοπικών τεχνικών για τη μελέτη διατόμων που έχουν αναπτυχθεί κάτω από λευκό φως έντασης μεγαλύτερης των $300 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τους μηχανισμούς φωτοπροστασίας αυτών των οργανισμών.

Σχετικά με την ανάπτυξη των διατόμων κάτω από κόκκινο φως προέκυψαν οι πιο κάτω παρατηρήσεις :

- Στο είδος *P.Tricornutum* παρατηρήθηκε ένας μεγάλος αριθμός μορίων χλωροφύλλης α τα οποία εμφάνιζαν μετατόπιση της απορρόφησης τους προς το ερυθρό. Το χαρακτηριστικό αυτής της κατάστασης ήταν η κορυφή στα 710nm στα φάσματα εκπομπής φθορισμού.
- Εντοπίστηκαν χαρακτηριστικές δονήσεις στα φάσματα Raman που παραπέμπουν σε παρουσία ισχυρότερων δεσμών υδρογόνου στα μόρια χλωροφύλλης όταν τα δείγματα αναπτύσσονται κάτω από κόκκινο φως σε σύγκριση με χρήση λευκού φωτός. Παρατηρήθηκε συσχέτιση των συγκεκριμένων δονήσεων με το χρόνο ανάπτυξης κάτω από κόκκινο φως και τη συνεπακόλουθη αύξηση του πληθυσμού των επηρεαζόμενων μορίων χλωροφύλλης.
- Για το είδος *T.Pseudonana* παρατηρήθηκαν κάποια αντίστοιχα αποτελέσματα σε πολύ μικρότερη κλίμακα. Η μεταβολές φαίνεται πως αφορούσαν μικρότερο πληθυσμό μορίων χλωροφύλλης α και η μετατόπιση στην απορρόφηση που παρατηρήθηκε ήταν σημαντικά περιορισμένη.

Από αυτές τις παρατηρήσεις προκύπτει το συμπέρασμα πως το μήκος κύματος της ακτινοβολίας ανάπτυξης των διατόμων μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού που διαθέτουν. Αυτό πιθανότατα συμβαίνει με σύνθεση FCPs τα οποία είτε υπάρχουν σε μικρότερους αριθμούς είτε δεν εμφανίζονται όταν τα διάτομα αναπτύσσονται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Τα σύμπλοκα αυτά διαφέρουν σημαντικά μεταξύ διαφορετικών ειδών διατόμων.

Από την απομόνωση και το χαρακτηρισμό των συμπλόκων FCPs και από τους δύο οργανισμούς εντοπίστηκαν σύμπλοκα που εμφάνιζαν διαφορές ως προς τη σύσταση και τις ιδιότητες τους. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η παρουσία σε διαφορετικές συγκεντρώσεις red-Fx και διαδινδοξανθίνης σε κάποια σύμπλοκα, η μεταβολή της συγκέντρωσης και των διαμορφώσεων των μορίων χλωροφύλλης c καθώς και η παρουσία διαφορετικών δεσμών υδρογόνου ως προς την ισχύ του δεσμού των μορίων χλωροφύλλης στα διάφορα σύμπλοκα. Συνολικά, προέκυψε το συμπέρασμα πως παρά τις ομοιότητες που εμφανίζουν υπάρχουν και σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ειδών.

Η χρήση του ισοτόπου ^{15}N για τη μελέτη των N-ευαίσθητων δονήσεων με τη φασματοσκοπία Raman πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά με τη μεθοδολογία που παρουσιάστηκε στο αντίστοιχα κεφάλαιο. Η επιτυχής ενσωμάτωσης ισοτόπου ενός στοιχείου στα παραγόμενα χρωμοφόρα μόρια με απλή αντικατάσταση μιας ουσίας στο βιομέσο ανάπτυξης των διατόμων οδήγησε στον εντοπισμό των αντίστοιχων δονήσεων και των συνεισφορών τους στα φάσματα Raman των κυττάρων του διατόμου.

5.2 Μελλοντική Έρευνα

Το γεγονός πως μεταξύ δύο ειδών διατόμων εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές ως προς την απόκριση τους σε μεταβολές των συνθηκών ανάπτυξης οδηγεί στην ανάγκη επέκτασης αντίστοιχων μελετών σε περισσότερα είδη διατόμων. Αυτό θα βοηθήσει τόσο στην κατανόηση των παρατηρούμενων μηχανισμών όσο και στην εύρεση συσχετισμών μεταξύ των διαφορετικών ειδών που οδηγούν στις διαφορές που εμφανίζουν.

Η χρήση υψηλής έντασης φωτός για την ανάπτυξη των οργανισμών οδήγησε σε παρατηρήσεις που πραγματοποιούνται για πρώτη φορά σε αυτά τα είδη. Έτσι προκύπτει πως θα ήταν χρήσιμη μελέτη της απόκρισης των διατόμων σε ακόμη υψηλότερης έντασης φωτός ανάπτυξης καθώς και διαφορετικά μήκη κύματος τα οποία φαίνεται πως επηρεάζουν σημαντικά τις ιδιότητες του οργανισμού.

Η χρήση της φασματοσκοπίας Raman για μελέτη του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των διατόμων και ιδιαίτερα της δομής του μπορεί να προσφέρει πολύ σημαντικές πληροφορίες. Η χρήση περισσότερων ισοτόπων με τη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή θα οδηγήσει στο χαρακτηρισμό ενός μεγάλου αριθμού δονήσεων που εμφανίζονται στα φάσματα Raman και θα βοηθήσει στην εξαγωγή συμπερασμάτων αλλά και στο σχεδιασμό πειραμάτων για την περαιτέρω μελέτη των διατόμων.

Τέλος, η απομόνωση των FCPs προσφέρει την ευκαιρία μελέτης ενός μέρους του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των διατόμων χωρίς την παρουσία άλλων δομών οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν ή να περιορίσουν τις πληροφορίες που μπορούν να δώσουν οι μέθοδοι φασματοσκοπίας. Στόχος είναι η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός τέτοιων συμπλόκων τα οποία να προέρχονται από διαφορετικά είδη διατόμων και από διαφορετικά περιβάλλοντα ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, τα σύμπλοκα που αναπτύσσονται τόσο στα κεντρικά όσο και στα πτεροειδή διάτομα με ανάπτυξη κάτω από κόκκινο φως εμφανίζουν πολύ μεγάλο ενδιαφέρον ως προς τα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες τους.