



## Πανεπιστήμιο Κρήτης - Τμήμα Βιολογίας

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών  
**ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ**

Διατριβή Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης

**Παραγωγή υδρογόνου από το χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* μέσω του μηχανισμού βιοαποικοδόμησης των διχλωροφαινολών σε συνδυασμό με στοχευμένες ελλείψεις ιόντων από το μέσο καλλιέργειας.**

**Ασημακόπουλος Κωνσταντίνος (Α.Μ.: 545)**

Επιβλέπων Καθηγητής: Καθ. Κυριάκος Κοτζαμπάσης

**Συνεπιβλέποντες:**

Καθ. Νικόλαος Πανόπουλος  
Επικ. Καθ. Στέργιος Πυρίντσος

Ηράκλειο 2011

## Πρόλογος –Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε κατά το μεγαλύτερο μέρος της στο εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης στα πλαίσια των απαιτήσεων του μεταπτυχιακού προγράμματος Μοριακή Βιολογία και Βιοτεχνολογία Φυτών, για την απόκτηση του μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης. Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω όλους αυτούς που συντέλεσαν πρακτικά και ψυχικά στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο **Κυριάκο Κοτζαμπάση** για την εμπιστοσύνη που μου έδωσε, καθώς και για την αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξη σε όποιο πρόβλημα παρουσιάστηκε κατά την εκπόνηση αυτής της Μεταπτυχιακής Διατριβής. Ευχαριστώ επίσης τα αλλά δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, τον κύριο **Στέργιο Πυρίντσο** και τον κύριο **Νίκο Πανόπουλο**.

Ευχαριστώ εγκαρδίως την συνάδελφο μου Δρ. **Αικατερίνη Παπάζη** για την υπομονή της, τον χρόνο που μου αφιέρωσε, την εμπιστοσύνη της στο πρόσωπο μου, την ηθική της υποστήριξη, την ουσιαστική βοήθεια της στην διεξαγωγή των πειραμάτων αυτών, καθώς και στην συγγραφή αυτής της εργασίας, μα πάνω από όλα για την μοναδική της ικανότητα να βρίσκει λύσεις σε όλα τα προβλήματα που έτυχε να συναντήσω.

...Επίσης ευχαριστώ τον Δρ. **Αντρέα Ντούλη** από το Ίδρυμα Γεωργικών Ερευνών για την εμπιστοσύνη που μας έδειξε παρέχοντας μας ελεύθερη πρόσβαση στη GS-TCD του ιδρύματος όπου και έγιναν όλες οι μετρήσεις του υδρογόνου.

...Κλείνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συνάδελφο μου **Κων/νο Σταματάκη** για την βοήθεια του κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς και τον μεταδιδάκτορα Δρ. **Νίκο Ιωαννίδη** για την βοήθεια και τις συμβουλές που μου πρόσφερε κατά την εκπόνηση αυτής της διατριβής.

## Περίληψη.

Η δυνατότητα των χλωροφυκών να παράγουν φωτοχημικά μοριακό υδρογόνο όταν βρεθούν σε αναερόβιες συνθήκες πρωτοανακαλύφθηκε από τον Gaffron (1939). Στο διάστημα των 72 αυτών ετών έως σήμερα, έγιναν πολλές προσπάθειες ώστε να καταστεί η παραγωγή του υδρογόνου από τα μικροφύκη οικονομικά βιώσιμη, δεδομένων των αναγκών της ανθρωπότητας για ενεργειακές λύσεις φιλικότερες προς το περιβάλλον. Οι Melis et al. (2000) ανακάλυψαν πως η απουσία του θρεπτικού στοιχείου θείου (S) από το διάλυμα καλλιέργειας του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhartii*, όταν αυτό καλλιεργείται σε ερμητικά κλειστά δοχεία, παρουσία φωτός, οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής υδρογόνου σε σχέση με τον μάρτυρα. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε επίσης, πως το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus* κατά την βιοαποικοδόμηση meta-υποκατεστημένων διχλωροφαινολών (dcps), παράγει ιδιαίτερα μεγάλες ποσότητες υδρογόνου. Η ιδιότητα των ανηγμένων διχλωροφαινολών (που δημιουργούνται κατά την βιοαποικοδόμηση) να παίρνουν θέση στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ως ηλεκτρονιοπομποί, πριν το φωτοσύστημα I, απενεργοποιώντας ταυτόχρονα το φωτοσύστημα II (και την παραγωγή οξυγόνου από την φωτόλυση του νερού), επιτρέπει την συνεχή τροφοδότηση του φωτοσυστήματος I με ηλεκτρόνια, τα οποία κατ' επέκταση τροφοδοτούν την υδρογενάση που παράγει υδρογόνο σε τεράστιες ποσότητες (Parazi, 2009).

Με την παρούσα μελέτη, συνδυάζοντας την στρατηγική παραγωγής υδρογόνου μέσω του μηχανισμού βιοαποικοδόμησης των διχλωροφαινολών, μαζί με στοχευμένες ελλείψεις θρεπτικών συστατικών και διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης (αυτότροφες ή μικτότροφες καλλιέργειες με υψηλή συγκέντρωση κυττάρων), επιτεύχθηκε επιπλέον αύξηση της παραγωγής H<sub>2</sub>.

Οι πειραματικές προσεγγίσεις έδειξαν ότι οι παράγοντες με την εντονότερη επίδραση στην παραγωγή H<sub>2</sub>, είναι η παρουσία της 2,3-dcp, ο μικτότροφος τρόπος καλλιέργειας (συνεχής παροχή γλυκόζης από την αρχή της καλλιέργειας) και η έλλειψη αζωτούχας πηγής από το θρεπτικό του χλωροφύκου. Ο συνδυασμός των τριών αυτών παραγόντων [-N+glc+dcp] επηρεάζει δραματικά τις βασικές λειτουργίες του χλωροφύκου, με κυρίαρχες αλλαγές την αύξηση της αναπνευστικής λειτουργίας, την εξάλειψη της φωτοσυνθετικής παραγωγής O<sub>2</sub> (ταχεία εγκαθίδρυση ανοξίας) και την αύξηση της ταχύτητας βιοαποικοδόμησης της διχλωροφαινόλης. Οι καλλιέργειες *Scenedesmus obliquus* που

αναπτύχθηκαν υπό αυτές τις συνθήκες παρήγαγαν σε 5 ημέρες την μέγιστη ποσότητα υδρογόνου, 14 L H<sub>2</sub>/ L PCV, σε αντίθεση με τα 2,5 L H<sub>2</sub>/ L PCV που παράγουν οι καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν μόνο με την παρουσία 2,3 διχλωροφαινόλης [Control+dcp] και τα 0,3 L H<sub>2</sub>/ L PCV που παράγουν οι καλλιέργειες μάρτυρες [Control].

Η εντυπωσιακή επιπλέον αύξηση της παραγωγής H<sub>2</sub>, επιτεύχθηκε προσεγγίζοντας με έμμεσο τρόπο τον μηχανισμό παραγωγής υδρογόνου, επιδρώντας κυρίως στους ρυθμούς βιοαποικοδόμησης της διχλωροφαινόλης. Η αυξημένη και συνεχής παροχή γλυκόζης από τις προκαλλιέργειες μέχρι και τις κύριες καλλιέργειες, αλλά και η έλλειψη αζώτου από τα θρεπτικά, που επάγει την αύξηση των λιπαρών, αυξάνουν σημαντικά τον ρυθμό βιοαποικοδόμησης των διχλωροφαινολών εξασφαλίζοντας γρηγορότερα αναερόβιες συνθήκες για την ομαλή λειτουργία της υδρογενάσης, παρέχοντας ταυτόχρονα ενεργειακά αποθέματα για το χλωροφύκος. Το γεγονός αυτό αφήνει περιθώρια για περαιτέρω αύξηση της παραγωγής H<sub>2</sub> από τα χλωροφύκη στα πλαίσια μίας πραγματικά πράσινης βιοτεχνολογικής προσέγγισης

## Abstract

The ability of green algae to produce molecular hydrogen photochemically, when grown under anaerobic conditions, was first discovered by Gaffron (1939). During the past 72 years many efforts were made in order to develop an economically viable way to produce bio-hydrogen from algae, based on the demands for more environment friendly energy solutions. Melis et al. (2000) discovered that sulfur (S) deprived cultures of the microalgae *Chlamydomonas reinhartii*, show greater hydrogen production, when grown anaerobically under light, compared to the control cultures. Furthermore, it was recently discovered that the unicellular green algae *Scenedesmus obliquus* was able to produce large amounts of hydrogen, during the biodegradation processes of meta-substituted dichlorophenols (dcps). The capacity of the reduced dichlorophenols (produced during the biodegradation processes) to enter and to take part into the electron transport chain, as electron donors before the photosystem I, deactivating at the same time the photosystem II (as well as the oxygen evolving system), allows a constant electron flow towards the photosystem I, and finally towards hydrogenase which produces huge amounts of hydrogen (Papazi 2009).

In this study, combining the microalgae's ability to produce hydrogen through the dichlorophenol biodegradation mechanism, with a series of targeted nutrition depletions and different growth conditions (autotrophic or mixotrophic cultures with high concentrations of algae cells), a further increase on hydrogen production was achieved.

Our experimental data revealed that the factors with the more intense impact on the hydrogen production mechanism were, the depletion of the nitrogen source from the culture medium, the presence of 2,3-dcp, as well as the mixotrophic character of the culture (continuous glucose supply from the mother culture). The combination of all these three factors [-N+glc+dcp] affects dramatically the basic algae's functions, with major alterations being; the increase of respiration, the depletion of the photosynthetically O<sub>2</sub> production (anoxia) and finally the increase of the dichlorophenol's biodegradation rate. The *Scenedesmus obliquus* cultures, grown under these conditions, led to the greatest H<sub>2</sub> production ever reported of 14 L H<sub>2</sub>/ L PCV, in contrast to the 2,5 L H<sub>2</sub>/ L PCV produced solely by the 2,3-dcp's action [Control+dcp] and to the 0,3 L H<sub>2</sub>/ L PCV produced by the control cultures [Control].

The impressive increase in the hydrogen production was achieved by approaching the hydrogen production mechanism in an indirect way, mainly affecting the dichlorophenol's removal rate. The continuous glucose supply from the mother cultures, combined with the nitrogen source depletion, which increase the fatty acids in the cell, induce the increase of dichlorophenol's removal rate, quickly providing anaerobic conditions for the hydrogenase's proper function and finally extra energy stocks for the microalgae. This fact leaves room for further investigation of the hydrogen production mechanism, having as main target the increase of the production through a real green biotechnology approach.

## **Περιεχόμενα:**

### **1.Εισαγωγή**

<b>1.1 Υδρογόνο :Χαρακτηριστικά-Παραγωγή –Εφαρμογές</b>	<b>9</b>
<b>1.1.1 Ένζυμα παραγωγής υδρογόνου</b>	<b>14</b>
<b>1.1.1.1 Υδρογενάσες στα μικροφύκη (άλγη)</b>	<b>16</b>
<b>1.2 Βιονεργητική μικροφυκών</b>	<b>17</b>
<b>1.2.1 Φωτοσύνθεση</b>	<b>17</b>
<b>1.2.1.1 Μη κυκλική ροή ηλεκτρονίων</b>	<b>21</b>
<b>1.2.1.2 Κυκλική Ροή Ηλεκτρονίων –Κυκλική Φωτοφοσφορυλίωση</b>	<b>22</b>
<b>1.2.1.3 Ψευδοκυκλική Ροή Ηλεκτρονίων ή Αντίδραση Mehler</b>	<b>22</b>
<b>1.2.1.4 Χλωροαναπνοή</b>	<b>23</b>
<b>1.2.2 Φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου από χλωροφύκη σε ανοξικές συνθήκες.</b>	<b>24</b>
<b>1.2.3 Βιοαποικοδόμηση meta-υποκατεστημένων διχλωροφαινολών (m-dcps) από το χλωροφύκος Scenedesmus obliquus και παραγωγή υδρογόνου.</b>	<b>27</b>

### **2. Υλικά και Μέθοδοι**

<b>2.1 Οργανισμός</b>	<b>29</b>
<b>2.2 Συνθήκες Ανάπτυξης</b>	<b>30</b>
<b>2.3 Υπολογισμός Κυτταρικής Συγκέντρωσης</b>	<b>32</b>

2.4 Επαγωγικός Φθορισμός-Φυσικοχημικές Αναλύσεις της Μοριακής Δομής και Λειτουργίας του Φωτοσυνθετικού Μηχανισμού	33
2.5 Πολαρογραφικές Μετρήσεις Μέγιστης Φωτοσυνθετικής Δραστηριότητας και Αναπνοής	36
2.6 Ποιοτική και Ποσοτική Ανάλυση των meta-διχλωροφαινολών με HPLC.	37
2.7 Ποιοτική και Ποσοτική Ανάλυση Υδρογόνου (H <sub>2</sub> ) με Αέρια Χρωματογραφία Θερμικής Αγωγιμότητας (GC-TCD)	38
2.8 Λυοφιλοποίηση κυττάρων	38
2.9 Εκχύλιση λιπαρών	39
<b><u>3.Αποτελέσματα και Συζήτηση</u></b>	
3.1 Επίδραση της έλλειψης ιόντων από το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης μικτότροφων καλλιεργειών <i>Scenedesmus obliquus</i> παρουσία της 2,3-dcp.	40
3.2 Επίδραση της έλλειψης του αζώτου στην παραγωγή υδρογόνου σε καλλιέργειες <i>Scenedesmus obliquus</i> παρουσία της 2,3-dcp.	49
3.3 Αλληλεπίδραση της 2,3-dcp με την περίσσεια συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών.	54
3.4 Επίδραση της ενισχυμένης παρουσίας της γλυκόζης στην παραγωγή υδρογόνου.	58
<b><u>4.Συζήτηση- Επίλογος</u></b>	<b>70</b>
<b><u>5.Συμπεράσματα</u></b>	<b>72</b>
<b><u>6.Βιβλιογραφία</u></b>	<b>73</b>



# 1.Εισαγωγή

## 1.1 Υδρογόνο :Χαρακτηριστικά-Παραγωγή -Εφαρμογές

Το υδρογόνο είναι το χημικό στοιχείο με ατομικό αριθμό 1. Αντιπροσωπεύεται από το σύμβολο H. Έχοντας ατομική μάζα 1,00794 amu, είναι το ελαφρύτερο και το πιο άφθονο χημικό στοιχείο στο σύμπαν. Τα άστρα της κύριας ακολουθίας αποτελούνται κυρίως από υδρογόνο σε κατάσταση πλάσματος. Φυσικά, το στοιχειακό υδρογόνο («διυδρογόνο») είναι σχετικά σπάνιο στη Γη.

Το πιο συνηθισμένο ισότοπο του υδρογόνου είναι το «πρώτιο» ( $^1\text{H}$ ) με ένα πρωτόνιο και κανένα νετρόνιο, στον πυρήνα του. Σε ιονικές ενώσεις μπορεί να σχηματίσει ένα αρνητικά φορτισμένο «υδρογονανιόν» ( $\text{H}^-$ ) ή ένα θετικά φορτισμένο «υδρογονοκατιόν» ( $\text{H}^+$ ). Το τελευταίο γράφεται σαν να αποτελείται από ένα σκέτο πρωτόνιο, αλλά στην πραγματικότητα, τα υδρογονοκατιόντα πάντα βρίσκονται με τη μορφή πιο πολύπλοκων χημικών ειδών. Το υδρογόνο σχηματίζει ενώσεις με την πλειοψηφία των χημικών στοιχείων, είναι παρόν στο νερό και στις περισσότερες οργανικές ενώσεις. Παίζει έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην οξεοβασική χημεία, αφού σε πολλές αντιδράσεις ανταλλάσσονται πρωτόνια ανάμεσα σε διαλυτά μόρια.

Το υδρογόνο έχει το απλούστερο γνωστό άτομο και χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη της ατομικής θεωρίας. Είναι το μόνο ουδέτερο άτομο για το οποίο υπάρχει αναλυτική λύση για την εξίσωση Schrödinger, οπότε η θεωρητική μελέτη του ατόμου του, δηλαδή των ενεργειακών καταστάσεων του και των δυνατοτήτων του για δημιουργία δεσμών, έπαιξε έναν νευραλγικό ρόλο για την ανάπτυξη της κβαντομηχανικής.

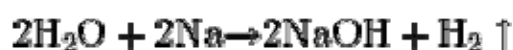
Το στοιχειακό υδρογόνο (γνωστό και ως «διυδρογόνο»,  $\text{H}_2$ ) παρήχθη για πρώτη φορά τεχνητά στις αρχές του 16ου αιώνα, με ανάμειξη μετάλλων και ισχυρών οξέων. Τη χρονική περίοδο 1766 - 1781, ο Χένρυ Κέιβντις (Henry Cavendish) αναγνώρισε πρώτος ότι το αέριο υδρογόνο είναι μια διακριτή (διαφορετική από τις ήδη γνωστές) χημική ουσία, και ότι παρήγαγε νερό όταν καίγονταν. Με βάση αυτή τη βασική του ιδιότητα το ονόμασε «υδρογόνο», συνενώνοντας τις ελληνικές λέξεις «ύδωρ» και «γεννώ». Το στοιχειακό υδρογόνο στις συνηθισμένες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης είναι ένα άχρωμο, άοσμο, μη μεταλλικό, άγευστο και πολύ εύφλεκτο διατομικό αέριο με χημικό τύπο  $\text{H}_2$ .

Η βιομηχανική του παραγωγή γίνεται κυρίως με επίδραση ατμού σε φυσικό αέριο, και λιγότερο συχνά με την περισσότερο ενεργειοβόρα μέθοδο της ηλεκτρόλυσης του νερού. Το περισσότερο υδρογόνο που παράγεται, καταναλώνεται σε κοντινή απόσταση. Οι δυο μεγαλύτερες καταναλώσεις του αφορούν την υδροπυρόλυση ορυκτών καυσίμων και η παραγωγή αμμωνίας, η τελευταία κυρίως για τη βιομηχανία παραγωγής λιπασμάτων. Το υδρογόνο είναι μια πρόκληση για τη μεταλλουργία, αφού μπορεί να διαπιδύσει (αφού τα μόριά του είναι συχνά μικρότερα από τα διάκενα μεταξύ των μεταλλικών ιόντων στα μεταλλικά πλέγματα) πολλά μέταλλα <http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A5%CE%B4%CF%81%CE%BF%CE%B3%CF%8C%CE%BD%CE%BF> - cite note-Rogers 1999 1057.E2.80.931064-4, κάνοντας πιο πολύπλοκη την κατασκευή αγωγών και δεξαμενών κατάλληλων για την κυκλοφορία και την αποθήκευσή του.

Μπορεί να συνδυαστεί χημικά με σχεδόν κάθε άλλο στοιχείο και έτσι μπορεί να δώσει περισσότερες ενώσεις από ότι μπορεί οποιοδήποτε άλλο στοιχείο. Στις ενώσεις αυτές συγκαταλέγονται το νερό, η αμμωνία, τα οξέα, τα υδροξείδια, διάφοροι υδρογονάνθρακες όπως το πετρέλαιο και το φυσικό αέριο και πολύ μεγάλο ποσοστό των υπόλοιπων οργανικών ενώσεων. Εξαιτίας της ελαφρότητάς του το υδρογόνο δεν αποτελεί περισσότερο από το 1% της συνολικής μάζας της Γης. Σε καθαρή αέρια μορφή συναντάται σπάνια, κυρίως σε φυσικά αέρια και σε μικρό ποσοστό στα ανώτερα (κυρίως) στρώματα της ατμόσφαιρας. Πολλά ορυκτά και όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί περιέχουν ενώσεις του σε πολύ μεγάλο βαθμό. Έτσι, το υδρογόνο βρίσκεται στην κερατίνη, στα ένζυμα, στα μόρια του DNA, ενώ βρίσκεται άφθονο στις τροφές υπό μορφή λιπών, πρωτεϊνών και υδατανθράκων. Όλα τα βαρύτερα στοιχεία, όπως και το ήλιο (He), προκύπτουν από την πυρηνική σύντηξη του υδρογόνου. Βάσει αυτής της διαδικασίας πιστεύεται ότι σχηματίστηκε το ίδιο το Σύμπαν, ενώ η ίδια διαδικασία είναι επίσης υπεύθυνη για την έκλυση ενέργειας από τα άστρα, όπως γίνεται στον Ήλιο.

Η μη ύπαρξη καθαρού αερίου υδρογόνου θέτει το πρόβλημα της παρασκευής του. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται αναλυτικότερα για την παρασκευή υδρογόνου είναι πολυάριθμες<sup>1</sup>:

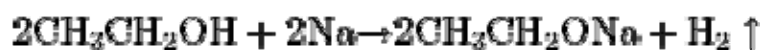
1. Από το φυσικό αέριο ή το φωταέριο, με κλασματική διαπίδυση.
2. Με την επίδραση νερού σε νάτριο (ή κάλιο) «εν ψυχρώ»:



<sup>1</sup> [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)

Η αντίδραση είναι έντονα εξώθερμη. Αν γίνει χωρίς προσοχή καταλήγει σε έκρηξη του παραγόμενου υδρογόνου, λόγω ανάφλεξής του με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο. Με χρήση καλίου, η έκρηξη είναι ακόμη πιο βίαιη.

3. Με την επίδραση αλκοόλης σε νάτριο «εν ψυχρώ»:

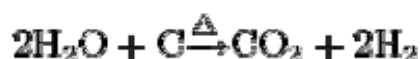


- Η αντίδραση είναι έντονα εξώθερμη. Αν γίνει χωρίς προσοχή καταλήγει σε έκρηξη του παραγόμενου υδρογόνου, λόγω ανάφλεξής του (πιθανόν και της αλκοόλης) με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο.
- Η αντίδραση πραγματοποιείται και με άλλες αλκοόλες και με Κ. Με χρήση καλίου η αντίδραση είναι ακόμη πιο βίαιη.

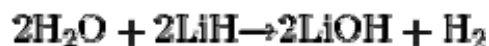
4. Με την επίδραση υπέρθερμων υδρατμών σε διάλυρο σίδηρο:



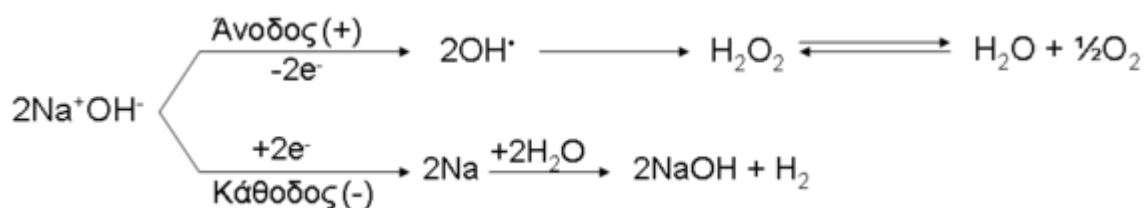
5. Με την επίδραση υπέρθερμων υδρατμών σε διάλυρο άνθρακα:



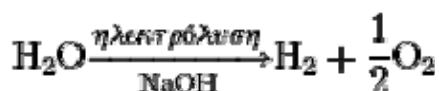
6. Με την επίδραση νερού σε υδρίδια, όπως το υδρίδιο του λιθίου:



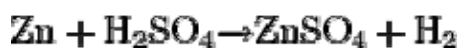
7. Με ηλεκτρόλυση νερού: Στην πράξη πρόκειται για ηλεκτρόλυση διαλύματος NaOH που αντιστοιχεί έμμεσα σε ηλεκτρόλυση νερού. (Το αποσταγμένο νερό είναι κακός αγωγός του ηλεκτρισμού και δεν περιέχει ιόντα για να γίνει ηλεκτρόλυση):



- Η συνολική αντίδραση εκφράζεται από την ακόλουθη στοιχειομετρική εξίσωση:

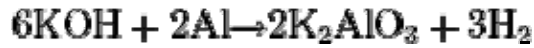


8. Από τα οξέα, με αντικατάσταση του Η από ηλεκτροθετικότερο μέταλλο:



- Δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν γι' αυτόν το σκοπό μέταλλα λιγότερο ηλεκτροθετικά από το υδρογόνο, όπως π.χ. Cu.

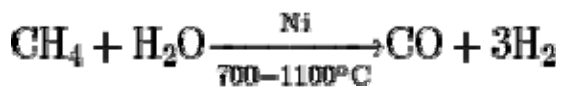
9. Από τις βάσεις με την επίδραση επαμφοτεριζόντων στοιχείων:



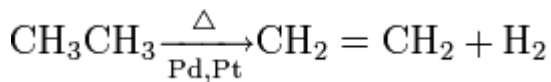
10. Από την πυρόλυση του μεθανίου:



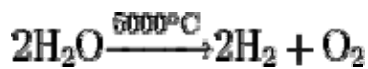
11. Από το μεθάνιο με την επίδραση νερού και παρουσία νικελίου ως καταλύτη (παραγωγή υδραερίου):



12. Με καταλυτική αφυδρογόνωση αιθανίου



13. Με υδροδιάσπαση στους 5000°C:



Οι μέθοδοι παρασκευής, ενδεικτικά, χωρίζονται σε 4 κατηγορίες: τις αντιδράσεις απλής αντικατάστασης, τις θερμοχημικές, τις ηλεκτρολυτικές και τις φωτολυτικές. Όλες είναι άμεσα ή έμμεσα ενεργοβόρες αντιδράσεις.

Το υδρογόνο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φορέας ενέργειας, δηλαδή ως μια μορφή ενεργειακού νομίσματος. Μάλιστα αυτή τη στιγμή γίνονται σημαντικές προσπάθειες, κυρίως στα ιδιαίτερα ανεπτυγμένα κράτη, για τη μετατροπή της προσαρμοσμένης στα συμβατικά καύσιμα υποδομής σε υποδομή με βάση το υδρογόνο. Ενδεικτικά, η Ισλανδία, προβλέπει υποδομή πλήρως βασισμένη στο υδρογόνο μέχρι το 2030 - 2040, ενώ μέχρι το 2030 στόχος του Υπουργείου Οικονομίας των ΗΠΑ είναι η αντικατάσταση του 10% της ενεργειακής κατανάλωσης από ενέργεια προερχόμενη από υδρογόνο.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα για το πώς το υδρογόνο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να παραχθεί ενέργεια είναι οι λεγόμενες κυψέλες καυσίμου (fuel cells), στοιχεία τα οποία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας με βάση το υδρογόνο. Περισσότερα για τις κυψέλες καυσίμου αναφέρονται πιο κάτω.

Η τάση κατανάλωσης καυσίμων όλο και μικρότερης περιεκτικότητας σε άνθρακα είναι ιστορικά εμφανής. Το υδρογόνο, απαλλαγμένο από κάθε ποσοστό άνθρακα, μπορεί να προσφέρει αρκετή ενέργεια για καθημερινές χρήσεις, όπως η ηλεκτροδότηση κτιρίων ή η κίνηση μεταφορικών μέσων.

Το ότι υπάρχει ένας σαφής προσανατολισμός προς την κατεύθυνση του υδρογόνου δεν είναι τυχαίο:

- Το υδρογόνο έχει το υψηλότερο ενεργειακό περιεχόμενο ανά μονάδα βάρους από οποιοδήποτε άλλο γνωστό καύσιμο, 120,7 kJ/gr και 3 φορές μεγαλύτερο από αυτό της συμβατικής βενζίνης.
- Κάνει "καθαρή" καύση. Όταν καίγεται με οξυγόνο παράγει μόνο νερό και θερμότητα. Όταν καίγεται με τον ατμοσφαιρικό αέρα, ο όγκος του οποίου αποτελείται κατά 78% από άζωτο, παράγονται επίσης μερικά οξείδια του αζώτου, σε αμελητέο ωστόσο βαθμό.
- Για το λόγο ότι κάνει καθαρή καύση, δεν συμβάλλει στη μόλυνση του περιβάλλοντος. Το ποσό του νερού που παράγεται κατά τη καύση είναι τέτοιο, ώστε να θεωρείται επίσης αμελητέο και επομένως μη ικανό να επιφέρει κάποια κλιματολογική αλλαγή δεδομένης ακόμα και μαζικής χρήσης.

Ωστόσο, υπάρχουν και μειονεκτήματα στη χρήση του υδρογόνου ως καυσίμου, τα περισσότερα από τα οποία σχετίζονται με την ελλιπή σημερινή υποδομή και αποτελούν κυρίως τεχνικά προβλήματα τα οποία αναζητούν λύση:

- Ένα πρόβλημα είναι αυτό της αποθήκευσής του. Δεδομένου του ότι το υδρογόνο είναι πολύ ελαφρύ, η συμπίεση μεγάλης ποσότητας σε μικρού μεγέθους δεξαμενή είναι δύσκολη λόγω των υψηλών πιέσεων που χρειάζονται για να επιτευχθεί η υγροποίηση. Ωστόσο στην έκθεση της Φρανκφούρτης του 2001 παρουσιάστηκε μία υδρογονοκίνητη έκδοση του Mini Cooper, στο οποίο για την αποθήκευση του υδρογόνου χρησιμοποιήθηκε ένα νέο ρεζερβουάρ, που καταλαμβάνει τον ίδιο χώρο με ένα αντίστοιχο συμβατικό βενζινοκίνητων οχημάτων.
- Πρόβλημα επίσης αποτελεί η έλλειψη οργανωμένου δικτύου διανομής του. Μία λύση είναι η κατασκευή υπερκαλωδίων. Τα υπερκαλώδια θα μετέφεραν εξαιρετικά υψηλής έντασης ηλεκτρικά ρεύματα με σχεδόν μηδενική ηλεκτρική αντίσταση διαμέσου υπεραγωγίων συρμάτων. Παράλληλα, μέσω των σωληνώσεων τους θα μεταφερόταν, υπό υψηλή πίεση, και υπέρψυχρο υδρογόνο σε εργοστάσια, σταθμούς

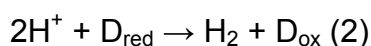
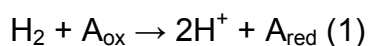
ανεφοδιασμού υδρογονοκίνητων οχημάτων και, ίσως κάποια μέρα, σε οικιακούς φούρνους και καλοριφέρ.

- Υπάρχει, επίσης, το ζήτημα της προέλευσης της ενέργειας που δαπανάται για την παραγωγή του. Αν, για παράδειγμα, χρησιμοποιηθεί ενέργεια προερχόμενη από ανθρακούχα ορυκτά, το συνολικό περιβαλλοντολογικό όφελος είναι πρακτικά αρνητικό (συνυπολογίζοντας και την ενέργεια συμπίεσης/διαχείρισης).

Οι νέες τάσεις που θέλουν την αντικατάσταση των ορυκτών καυσίμων με φιλικότερα προς το περιβάλλον, ώθησε την επιστήμη στην αναζήτηση λιγότερο ενεργειακόβρων μεθόδων και συστημάτων για την παραγωγή του αερίου υδρογόνου. Η στροφή της έρευνας στα βιολογικά συστήματα έγινε από την ανακάλυψη των (Gaffron and Rubin, 1942), πως μερικά μικροφύκη όταν βρεθούν σε αναερόβιες συνθήκες για σύντομα χρονικά συστήματα, μπορούν να παράγουν την ενέργεια που χρειάζονται για την επιβίωση τους, ενεργοποιώντας μηχανισμούς που καταλήγουν στην παραγωγή αερίου υδρογόνου (Harpe et al., 2002). Η ανακάλυψη αυτή φάνηκε πολλά υποσχόμενη μιας και η ενέργεια που χρειάζεται για την συντήρηση ενός βιολογικού συστήματος παραγωγής υδρογόνου είναι ελάχιστη μπροστά στις συμβατικές βιομηχανικές μεθόδους παραγωγής του αερίου. Παρά τις έρευνες ετών όμως, πρόβλημα παραμένει η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων καθώς και η επίτευξη μιας συνεχούς παραγωγής. Στο κεφάλαιο που ακολουθεί θα περιγραφούν οι διαδικασίες που χρησιμοποιούν τα μικροφύκη για την παραγωγή ενέργειας από την μετατροπή της ηλιακής ακτινοβολίας καθώς και η συσχέτιση των διαδικασιών αυτών με την βιολογική παραγωγή υδρογόνου.

### 1.1.1 Ένζυμα παραγωγής υδρογόνου

Πολλοί προκαρυωτικοί οργανισμοί και αρκετοί ευκαρυωτικοί, διαθέτουν ενζυμικά συστήματα τα οποία μπορούν να καταλύουν την αναστρέψιμη αντίδραση της αναγωγής των πρωτονίων σε μοριακό υδρογόνο. Χαμηλού μοριακού βάρους υποστρώματα όπως η φερρεδοξίνη και τα κυτόχρωμα c3 και c6 μπορούν να δράσουν σαν φυσιολογικοί δότες(D) και δέκτες (A) ηλεκτρονίων όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση.



Τα ιδιαίτερα ποικιλόμορφα αυτά ένζυμα καλούνται υδρογενάσες και ομαδοποιούνταν έως και το 2004 σε τρεις κατηγορίες με κριτήριο τα ιόντα μετάλλων που έχουν στο ενεργό τους κέντρο (**υδρογενάσες [Ni-Fe], υδρογενάσες [FeFe] και οι υδρογενάσες χωρίς μέταλλα στο ενεργό τους κέντρο**) (Vignais and Billoud, 2007 ). Το 2004 ο Thauer (1998), έδειξε πως οι υδρογενάσες χωρίς μέταλλα στο ενεργό τους κέντρο περιέχουν στην ουσία Fe. Έτσι οι άνευ μετάλλου υδρογενάσες σήμερα καλούνται [Fe] υδρογονάσες μίας και έχουν ενεργό κέντρο με ένα άτομο Fe και καθόλου Fe-S περιοχές, σε αντίθεση με τις [ FeFe] υδρογενάσες. Η νέα κατάταξη των υδρογενασών είναι η εξής:

- **[NiFe] υδρογενάσες:** Οι ετεροδιμερείς αυτές πρωτεΐνες συνίστανται από μια μεγάλη και μια μικρή υπομονάδα. Η μικρή περιέχει 3 τομείς Fe-S ,ενώ η μεγάλη περιέχει το ενεργό κέντρο Ni-Fe το οποίο συνδέεται με το διαλύτη μέσω ενός μοριακού καναλιού. Η εντόπιση τους μπορεί να είναι τόσο σε μεμβράνες του κυτταροπλάσματος, όσο και ελεύθερη. Οι υδρογενάσες αυτού του τύπου όταν απομονωθούν μπορούν να καταλύσουν τόσο την αντίδραση παραγωγής υδρογόνου όσο και της κατανάλωσης αυτού για την δημιουργία αναγωγικών βιομορίων.
- **Καινοτομικές [NiFe] υδρογενάσες:** Ανακαλύφθηκαν στην *Ralstonia eutropha* και ονομάζονται έτσι επειδή σε αντίθεση με τις ευαίσθητες [NiFe] υδρογενάσες ,είναι ανθεκτικές στο οξυγόνο και στο μονοξείδιο του άνθρακα.
- **[FeFe] υδρογενάσες:** Τα ένζυμα αυτής της κατηγορίας χωρίζονται περεταίρω ανάλογα με την ενδοκυτταρική τους εντόπιση:

1. **Κυτταροπλασματικές:** Πρόκειται για διαλυτά μονομερή ένζυμα τα οποία συναντάμε σε αυστηρά αναερόβιους οργανισμούς όπως *Clostridium pasteurianum* και *Megasphaera elsdenii*. Είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στην απενεργοποίηση παρουσία μοριακού οξυγόνου και καταλύουν τόσο την αντίδραση παραγωγής όσο και κατανάλωσης H<sub>2</sub>.
2. **Περιπλασματικές:** Πρόκειται για ετεροδιμερή ένζυμα που απομονώθηκαν από τα είδη *Desulfovibrio* και καταλύουν κυρίως αντιδράσεις οξειδωσης του H<sub>2</sub>.
3. **Χλωροπλαστικές:** Πρόκειται για διαλυτά μονομερή ένζυμα τα οποία συναντάμε στους χλωροπλάστες του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* όπου καταλύουν την

αντίδραση παραγωγής υδρογόνου. Η φερεδοξίνη αποτελεί εδώ τον δότη ηλεκτρονίων και είναι υπεύθυνη για την σύζευξη του ενζύμου με την φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Μέχρι τώρα οι υδρογενάσες σιδήρου ήταν ένζυμα που κατείχαν μόνο αναερόβια βακτήρια και πρωτόζωα με δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου. Τα ένζυμα αυτά δίνουν την δυνατότητα στον οργανισμό να παράγει  $H_2$  χωρίς την ανάγκη παρουσίας εξωγενών αποδεκτών ηλεκτρονίων πέρα από το  $H_2$ . Οι υδρογενάσες Fe έχουν πολύ μεγάλη συγγένεια ως προς το υπόστρωμα τους, 100 φορές μεγαλύτερη από τις υδρογενάσες Ni-Fe. Ισχυροί αναστολείς όλων των υδρογενασών σιδήρου είναι το  $O_2$  και το  $CO$ .

Οι δομές των ενζύμων αυτών από τους οργανισμούς *Clostridium pasteurianum* και *Desulfovibrio desulfuricans* αναλύθηκαν και μελετήθηκαν πρόσφατα με κρυσταλλογραφία ακτινών X και βρέθηκε ότι συνίστανται από μία με δύο υπομονάδες οι οποίες φέρουν ένα συμπράγοντα σιδήρου (H cluster) στο ενεργό τους κέντρο. Αυτός με την σειρά του δομείται από ένα τομέα με  $4Fe4S$  και ένα κέντρο-υποτομέα με 2 άτομα Fe. Στην τρισδιάστατη δομή του ενεργού κέντρου συμβάλει μια ομάδα θείου από μία κυστεΐνη. Αρκετά συντηρημένα αμινοξέα δημιουργούν μια υδρόφοβη θήκη που προστατεύουν τον υποτομέα  $[2Fe]$  από τον διαλύτη. Άλλες οκτώ τουλάχιστον κυστεΐνες του αμινοτελικού άκρου φαίνεται να έχουν επίσης ιδιαίτερο ρόλο για την συγκρότηση του τομέα F (F cluster), περιοχής που συζητείται πως ευθύνεται για την μεταφορά των ηλεκτρονίων από την επιφάνεια του ενζύμου στο ενεργό κέντρο.

### **1.1.1.1 Υδρογενάσες στα μικροφύκη (άλγη)**

Η παρουσία υδρογενασών πρωτοανακαλύφθηκε στην πράσινη άλγη από τον (Gaffron and Rubin, 1939) πριν από 72 χρόνια. Διεξάγοντας πειράματα παρατήρησε πως κύτταρα άλγης προσαρμοσμένα σε αναερόβιες συνθήκες παράγουν  $H_2$  ανάλογα με τις μερικές πιέσεις  $CO_2$ . Η παραγωγή του υδρογόνου αυξάνεται όταν αφαιρεθεί το οξυγόνο της καλλιέργειας, με αερισμό της με αργό και έπειτα από έκθεση του στο φως. Τα ηλεκτρόνια που απαιτούνται για την παραγωγή του  $H_2$ , προέρχονται είτε από την φωτόλυση του νερού, μέσω του φωτοσυστήματος II, ή από μεταβολική οξείδωση οργανικών υποστρωμάτων με ταυτόχρονη απελευθέρωση  $CO_2$ . Η φωτοεξαρτώμενη μεταφορά ηλεκτρονίων από οργανικά



υποστρώματα, μέσω της δεξαμενής της πλαστοκινόνης, στην υδρογενάση καλύπτει τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου σε ATP για όσο διάστημα διατηρείται η αναεροβίωση.

Μέχρι το 2000 η μόνη γνωστή [FeFe] υδρογενάση ευκαρυωτικού οργανισμού είχε απομονωθεί από το μονοκύτταρο μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*. Μελέτες σε άλλα μικροφύκη όπως ο *Scenedesmus obliquus* οδήγησαν στην απομόνωση υδρογενασών [NiFe] μέχρι που οι (Florin et al., 2001) απέδειξαν την ύπαρξη και [FeFe] υδρογενάσεων σε αυτό το είδος. Τόσο οι [NiFe] υδρογενάσες όσο και οι [FeFe] υδρογενάσες του *Scenedesmus obliquus* μεταφράζονται στο κυτταρόπλασμα γενικά αλλά φαίνεται πως σε όλη την διαδικασία σπουδαίο ρόλο παίζει και κάποιος χλωροπλαστικός μεταγραφικός παράγοντας.

## 1.2 Βιονεργητική μικροφυκών

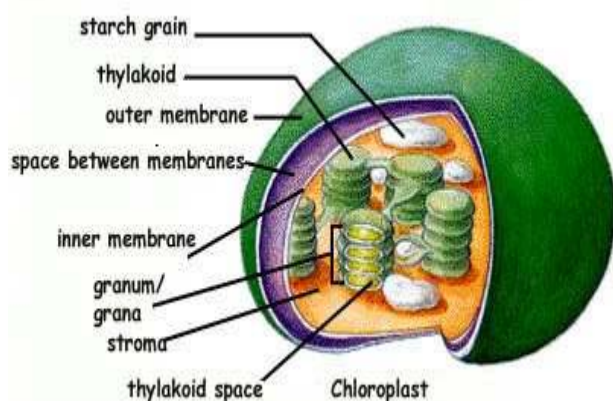
### 1.2.1 Φωτοσύνθεση

Φωτοσύνθεση καλούμε το σύνολο των φωτοχημικών διαδικασιών μέσω των οποίων τα φυτά και τα φωτοσυνθετικά βακτήρια χρησιμοποιούν την ηλιακή ενέργεια για να συνθέσουν οργανικές ενώσεις. Στα φυτά καθώς και σε ορισμένα βακτήρια, η φωτοσυνθετική διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση μοριακού οξυγόνου και την δέσμευση ατμοσφαιρικού CO<sub>2</sub>, το οποίο χρησιμοποιείται για την σύνθεση υδατανθρακικών ενώσεων (οξυγονική φωτοσύνθεση). Μερικά είδη βακτηρίων χρησιμοποιούν την ηλιακή ενέργεια για να συνθέσουν οργανικές ενώσεις αλλά χωρίς να παράγεται οξυγόνο (ανοξυγονική φωτοσύνθεση).

Η φωτοσύνθεση στα φυτά έχει δύο διακριτά στάδια:

- Τις «φωτεινές αντιδράσεις» στις οποίες λαμβάνει χώρα η απορρόφηση του φωτός, η μεταφορά της ενέργειας στα κέντρα αντίδρασης, καθώς και τις αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων και πρωτονίων οι οποίες οδηγούν στην παραγωγή NADPH και ATP.
- Τις σκοτεινές αντιδράσεις οι οποίες περιλαμβάνουν την αναγωγή του CO<sub>2</sub> και την σύνθεση υδατανθράκων, χρησιμοποιώντας το NADPH και το ATP που παράγεται κατά τις φωτεινές αντιδράσεις.

Χωροταξικά ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός εντοπίζεται στους χλωροπλάστες.



**Εικόνα 1 .Δομή χλωροπλάστη**

Ο χλωροπλάστης περιβάλλεται από μια διπλή μεμβράνη, τον πλαστιδιακό φάκελο (Εικόνα 1). Οι μεμβράνες αυτές παρουσιάζουν διαφορετική διαπερατότητα σε διαφορές οργανικές και ανόργανες ουσίες. Έτσι ενώ η εξωτερική μεμβράνη είναι διαπερατή κυρίως από μικρού μοριακού βάρους μεταβολίτες, η εσωτερική είναι επιλεκτικά διαπερατή στις περισσότερες ουσίες. Και οι δύο μεμβράνες είναι αρκετά διαπερατές από το CO<sub>2</sub> που αποτελεί το υπόστρωμα για την σύνθεση των υδατανθράκων κατά τις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης. Ο χώρος που δημιουργείται μεταξύ των δύο αυτών μεμβρανών, εσωτερικής και εξωτερικής ονομάζεται διαμεμβρανικός χώρος, ενώ ο χώρος που περικλείει η εσωτερική μεμβράνη καλείται στρώμα.

Στο στρώμα απαντώνται τα περισσότερα ένζυμα που καταλύουν τις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης, όπου υπάρχει ένα αναπτυγμένο σύστημα μεμβρανών, το οποίο αποτελεί συνέχεια της εσωτερικής μεμβράνης του πλαστιδιακού φακέλου. Οι δομές αυτές ονομάζονται ελασμάτια (lamellae) και σε κανονικά διαστήματα διαπλατώνονται και δημιουργούν μεμβρανώδεις σάκους, τα θυλακοειδή, που περιέχουν έναν εσωτερικό χώρο, γνωστό ως μικροχώρο(lumen). Τέλος τα θυλακοειδή οργανώνονται σε μεμβρανικές στοιβάδες, οι οποίες ονομάζονται grana. Οι φωτοσυνθετικές μονάδες βρίσκονται στις μεμβράνες των θυλακοειδών και αποτελούνται από πρωτεΐνες και φωτοσυνθετικές χρωστικές (χλωροφύλλες και καροτενοειδή), οργανωμένες σε σύμπλοκα.

Σήμερα είναι γνωστό πως η φωτοσυνθετική μονάδα αποτελείται από τρία διακριτά σύμπλοκα (Εικόνα 3): το φωτόςυστημα II (PSII) με το σύμπλοκο συλλογής φωτός (Light

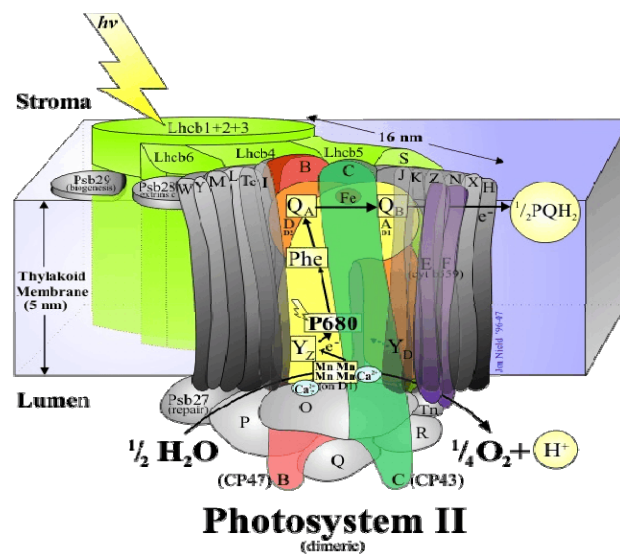
Harvesting Complex, LHCI), το φωτοσύστημα I (PSI), το κυτόχρωμα  $b_6/f$  (cyt  $b_6/f$ ) καθώς και μία συνθάση του ATP.

## Φωτοσύστημα II

Το φωτοσύστημα II είναι ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελείται από δύο διακριτά ενζυμικά σύμπλοκα (**Εικόνα 2**): το σύμπλοκο συλλογής φωτός (LHCII) και τον πυρήνα του φωτοσυστήματος (PSII core).

Το σύμπλοκο LHCII περιέχει περίπου 6 πρωτεΐνες με μοριακά βάρη 25-28 kD και μόρια χλωροφύλλης *a*, χλωροφύλλης *b* και καροτενοειδών. Το σύμπλοκο αυτό εντοπίζεται περιφερειακά του PSII, συνδέει τις μεμβράνες των θυλακοειδών και ελέγχει την κατανομή της ενέργειας μεταξύ του PSII και του PSI. Το σύμπλοκο LHCII περιέχει σχεδόν όλη την χλωροφύλλη *b* και το 50% της χλωροφύλλης *a* του PSII. Το σύμπλοκο αυτό έχει την δυνατότητα να αποσπαστεί από τον PSII σε ειδικές καταστάσεις και να διοχετεύσει ενέργεια στο PSI.

Ο πυρήνας του PSII είναι ένα πολυπεπτιδικό σύμπλοκο που περιλαμβάνει το κέντρο αντίδρασης, όπου πραγματοποιείται ο πρωτογενής διαχωρισμός φορτίου, καθώς και το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου. Το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου φωτολύει το μόριο του νερού και πέραν της παραγωγής οξυγόνου, τροφοδοτεί των μικροχώρο με ιόντα υδρογόνου τα οποία δημιουργούν μια διαβάθμιση με το στρώμα, την οποία χρησιμοποιεί ως κινητήρια δύναμη η ATP συνθάση.



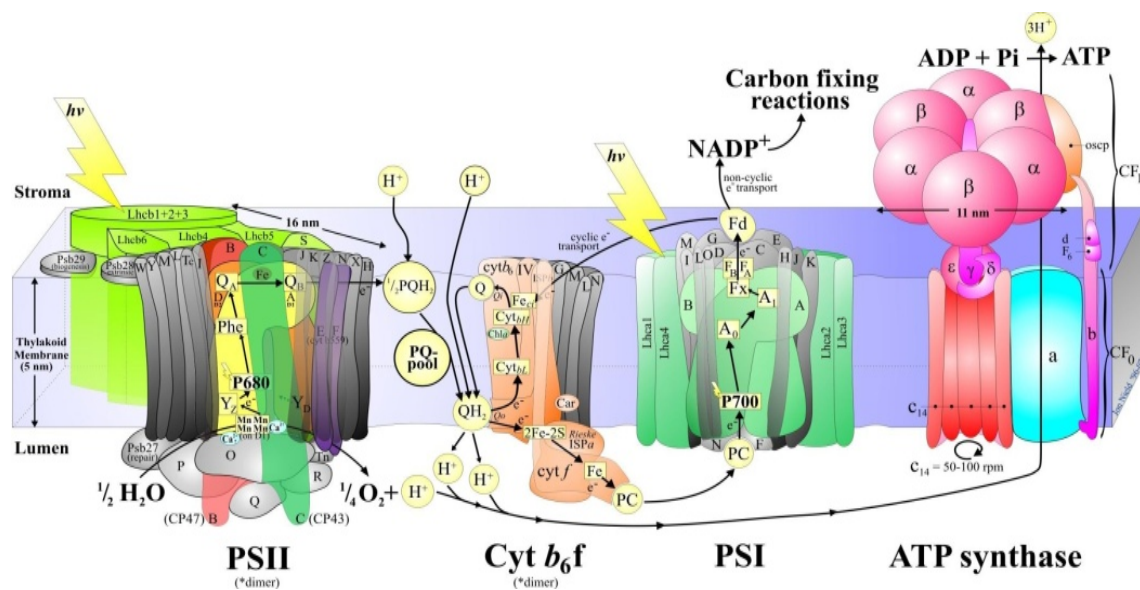
**Εικόνα 2** : Δομή και λειτουργία του φωτοσυστήματος II.

## Φωτοσύστημα I

Στους ευκαρυωτικούς φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, το PSI απαρτίζεται από το σύμπλοκο συλλογής φωτός (LHCI) και τον πυρήνα του φωτοσυστήματος I. Το σύμπλοκο LHCI δρα ως βοηθητική κεραία η οποία συγκεντρώνει το φως και μεταφέρει την ενέργεια του στον πρωτογενή ηλεκτρονιοδότη του κέντρου αντίδρασης, P<sub>700</sub>, που βρίσκεται στον πυρήνα. Εκτός από P<sub>700</sub>, το πρωτεϊνικό σύμπλοκο περιέχει επίσης και τις χρωστικές και τους οξειδοαναγωγικούς παράγοντες που είναι απαραίτητοι για να επιτευχθεί η μεταφορά των ηλεκτρονίων στο PSI.

## Κυτόχρωμα b<sub>6</sub>/f

Το κυτόχρωμα b<sub>6</sub>/f αποτελεί ενδιάμεσο πρωτεϊνικό σύμπλοκο μεταξύ του PSII και PSI στην μη κυκλική μεταφορά ηλεκτρονίων. Αποτελείται από τέσσερις πρωτεΐνες: το κυτόχρωμα b<sub>6</sub>, το κυτόχρωμα f, την υπομονάδα IV και μια πρωτεΐνη Fe-S. Τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν από την απορρόφηση ενέργειας στο φωτοσύστημα II μέσω της πλαστοκινόνης αποδίδονται στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο του κυτοχρώματος b<sub>6</sub>/f, έπειτα στην πλαστοκυανίνη και από εκεί στο PSI.

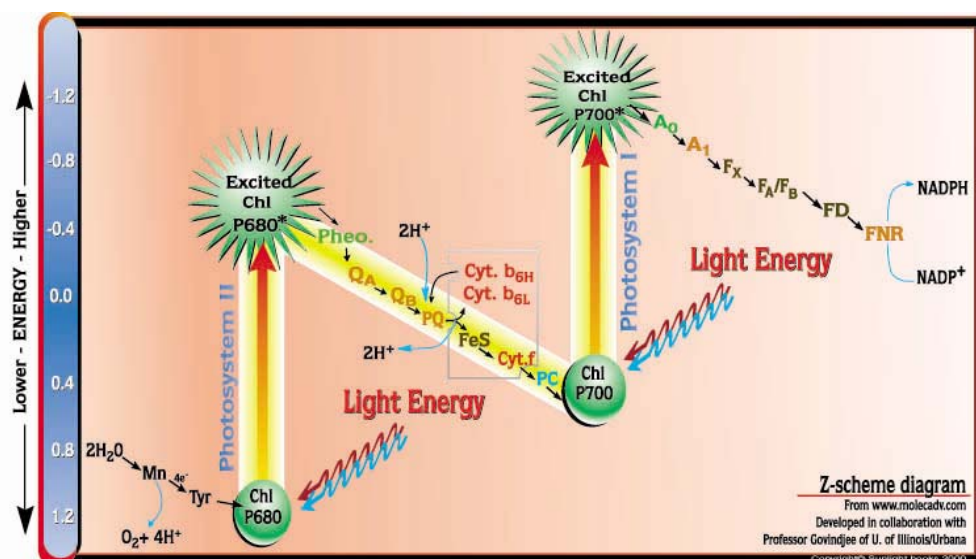


Εικόνα 3: Δομική περιγραφή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

### 1.2.1.1 Μη κυκλική ροή ηλεκτρονίων

Η φωτεινή ενέργεια απορροφάται από τις χλωροφύλλες του LHClI οι οποίες διεγείρονται. Η διέγερση αυτή μεταφέρεται μέχρι τον πυρήνα του φωτοσυστήματος II όπου βρίσκεται το κέντρο αντίδρασης, P<sub>680</sub>, με αποτέλεσμα τελικά την ενεργειακή του διέγερση (P<sub>680</sub><sup>\*</sup>). Αυτό με την σειρά του μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο στη φαιοφυτίνη (Pheo a). Το ηλεκτρόνιο αυτό αναπληρώνεται από το νερό, το οποίο οξειδώνεται για να παραχθεί μοριακό οξυγόνο και ιόντα υδρογόνου. Η ανηγμένη φαιοφυτίνη δίνει με την σειρά της ένα ηλεκτρόνιο στην κινόνη Q<sub>A</sub> και αυτή στην κινόνη Q<sub>B</sub> η οποία μετατρέπεται σε ημικινόνη Q<sub>B</sub><sup>-</sup>. Μετά από την απορρόφηση ενός δεύτερου φωτονίου και αφού πάρει δύο πρωτόνια από το στρώμα, η κινόνη Q<sub>B</sub> ανάγεται σε πλαστοκινόνη PQH<sub>2</sub> (Εικόνα 4). Η οξειδωμένη μορφή του P<sub>680</sub><sup>\*</sup> θα αναχθεί από ηλεκτρόνια που θα προκύψουν από την φωτόλυση του νερού, ενώ τα κατιόντα υδρογόνου θα κατευθυνθούν στον μικροχώρο.

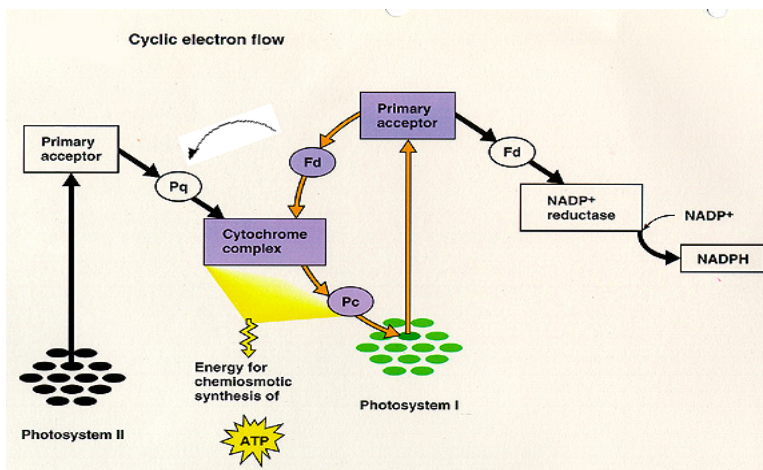
Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο κυτόχρωμα b6/f και στη συνέχεια στην πλαστοκυανίνη, ενώ τα H<sup>+</sup> μεταφέρονται στο μικροχώρο. Τα ηλεκτρόνια τελικά καταλήγουν στο φωτοσύστημα I (PSI), όπου προηγήθηκε διέγερση του κέντρου αντίδρασης P<sub>700</sub><sup>\*</sup>, που του επέτρεψε να μεταφέρει ηλεκτρόνια στην φερεδοξίνη και από κει στο NADP<sup>+</sup>, που το ανάγει σε NADPH. Η διαφορά πρωτονιακής συγκέντρωσης που δημιουργείται, από την λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, μεταξύ στρώματος και μικροχώρου, είναι η κινητήρια δύναμη που θα ενεργοποιήσει την ΑΤΡαση και θα δημιουργήσει ΑΤΡ.



Εικόνα 4. Μη κυκλική ροή ηλεκτρονίων

### 1.2.1.2 Κυκλική Ροή Ηλεκτρονίων – Κυκλική Φωτοφωσφορυλίωση

Ορισμένες φορές ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός απαιτεί περισσότερο ATP από ότι NADPH, τότε παράλληλα με τη μη κυκλική ροή ηλεκτρονίων ενεργοποιείται και η κυκλική ροή. Κατά την κυκλική ροή ηλεκτρονίων τα  $e^-$  που θα φτάσουν από το P<sub>700</sub> στη φερρεδοξίνη έχουν τη δυνατότητα, αντί να προωθηθούν στο NADP<sup>+</sup> μέσω πλαστοκινόνης και κυτοχρώματος b<sub>6</sub>/f, πρωτεΐνης Rieske και πλαστοκυανίνης, να καταλήξουν πάλι στο κέντρο αντίδρασης του Φωτοσυστήματος I (PSI), το P<sub>700</sub>

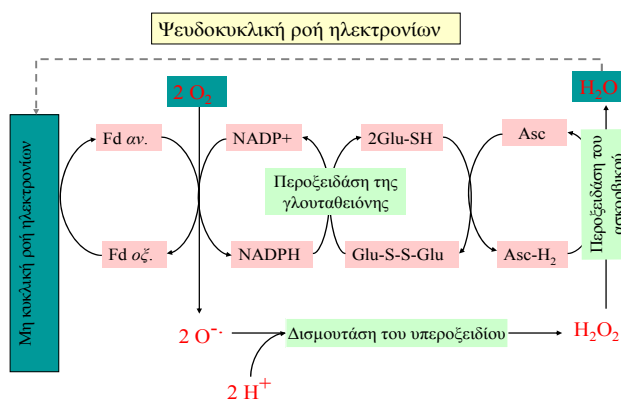


Εικόνα 5: Κυκλική ροή ηλεκτρονίων

(Εικόνα 5). Και σε αυτήν τη διαδικασία δημιουργείται διαφορά δυναμικού μεταξύ μικροχώρου και στρώματος που οδηγεί σε σχηματισμό ATP (κυκλική φωσφορυλίωση), χωρίς τη δημιουργία του οξειδοαναγωγικού παράγοντα NADPH.

### 1.2.1.3 Ψευδοκυκλική Ροή Ηλεκτρονίων ή Αντίδραση Mehler

Έχει πολλές ομοιότητες με τη μη κυκλική ροή ηλεκτρονίων. Η ροή ηλεκτρονίων από τη φωτόλυση του νερού μέχρι την αναγωγή της φερρεδοξίνης είναι η ίδια. Η ανηγμένη φερρεδοξίνη έπειτα ανάγει το μοριακό οξυγόνο (O<sub>2</sub>), με αποτέλεσμα τον ελεγχόμενο σχηματισμό ενεργών ριζών οξυγόνου (O<sub>2</sub><sup>-\*</sup>), που μέσω του ενζύμου της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD)



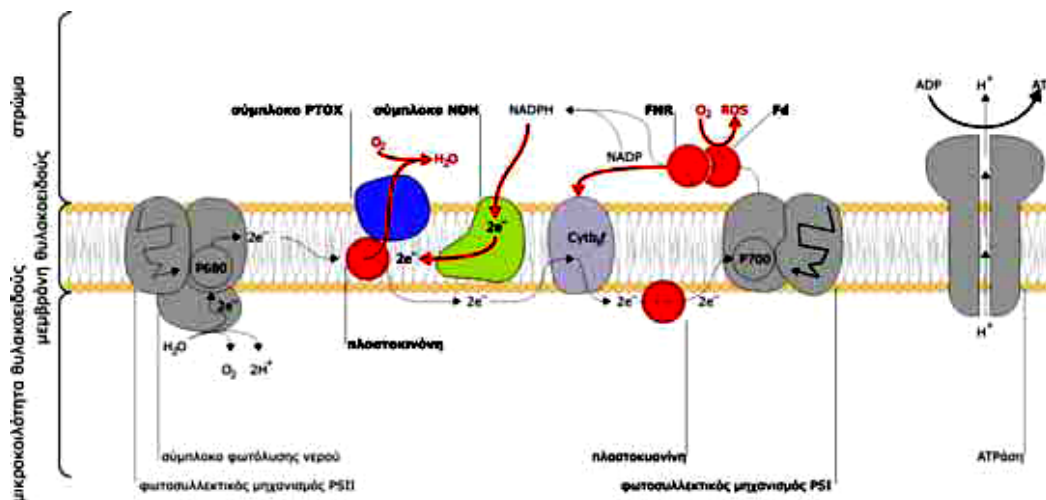
Εικόνα 6: Ψευδοκυκλική ροή ηλεκτρονίων



μετατρέπεται σε υπεροξείδιο ( $H_2O_2$ ), που με τη σειρά του μετατρέπεται σε νερό, με τη βοήθεια των ενζύμων περοξειδάση της γλουταθειόνης και ασκορβική περοξειδάση (Εικόνα 6).

### 1.2.1.4 Χλωροαναπνοή

Η χλωροαναπνοή ή αλλιώς χλωροπλαστική αναπνοή συνιστά ένα σύνολο από αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων από την πλαστοκινίνη προς το  $O_2$  μέσω της δραστηριότητας της πλαστιδιακής οξειδάσης της πλαστοκινίνης (PTOX) με τελικό προϊόν το  $H_2O$  (Βεηπου, 1982; Niyogi, 2000; Rumeau et al., 2007), (Εικόνα 7). Η λειτουργία της χλωροπλαστικής αναπνοής λαμβάνει χώρα στις μεμβράνες των θυλακοειδών του χλωροπλάστη και τροφοδοτείται με ηλεκτρόνια προερχόμενα είτε από την γραμμική ροή, είτε από την κυκλική ροή μέσω του PSI μέσω οξειδωσης του NAD(P)H από το πλαστιδιακό σύμπλοκο της αφυδρογονάσης του NAD(P)H (NDH) (Rumeau et al, 2007).



**Εικόνα 7** : Αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων της φωτοσύνθεσης. Με κόκκινα βέλη παριστάνονται οι αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την φωτοαναπνοή και την κυκλική μεταφορά μέσω του PSI.<sup>2</sup>

Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι παράγοντες PTOX και NDH συνεργάζονται στενά κατά την μη φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων μέσω της πλαστοκινίνης και ακόμα ότι μπορεί να λαμβάνει χώρα μεταφορά ηλεκτρονίων απευθείας από την NDH προς την PTOX αν και αυτό

<sup>2</sup> <http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/phts/cyclic.jpg>

δεν έχει αποδειχθεί ακόμα (Rumeau et al., 2007). Ωστόσο, έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι η ύπαρξη του συμπλόκου NDH συνδέεται με την αναγωγή της πλαστοκινόνης. Η μελέτη της εμπλοκής των PTOX και NDH στη φωτοσύνθεση έδειξε πως ενώ η NDH δεν φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στη φωτοσυνθετική διαδικασία, δεν συμβαίνει το ίδιο και με την PTOX, η οποία συνδέεται με τη διαδικασία σχηματισμού των καρτενοειδών στους χλωροπλάστες.

Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το εύρημα ότι τα καρτενοειδή είναι απαραίτητα για τη επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται στο PSII από τις υπερβολικές εντάσεις ακτινοβολίας, υποδηλώνει πως η χλωροπλαστική αναπνοή λειτουργεί ως βαλβίδα ασφαλείας στις περιπτώσεις υπερσυσσώρευσης ενέργειας κατά την φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων (Niyogi, 2000). Πειραματικά δεδομένα εμπλέκουν την χλωροπλαστική αναπνοή στον εγκλιματισμό των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης προκαλούμενες από υψηλές εντάσεις φωτισμού. Υπό αυτές τις συνθήκες, η μη φωτοχημική αναγωγή της πλαστοκινόνης ενισχύεται μέσω της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στη χλωροπλαστική αναπνοή (Rumeau et al., 2007).

Συγκεκριμένα, η PTOX λειτουργεί προστατευτικά αποτρέποντας την παραμονή των δεκτών ηλεκτρονίων του PSII στην ανηγμένη κατάσταση με αποτέλεσμα να αποφεύγονται οι βλάβες στη φωτοσυνθετική συσκευή και τελικά η φωτοαναστολή (Niyogi, 2000). Επιπλέον η ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης της πλαστοκινόνης αποτελεί μηχανισμό ρύθμισης της διανομής της ενέργειας μεταξύ των φωτοσυστημάτων μέσω της μετανάστευσης των LHCs. Είναι πιθανόν λοιπόν ο μηχανισμός της χλωροαναπνοής να ενεργοποιείται και ανάλογα με τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου σε ATP και NADPH ευνοώντας κατά βούληση την κυκλική ροή ηλεκτρονίων έναντι της μη κυκλικής.

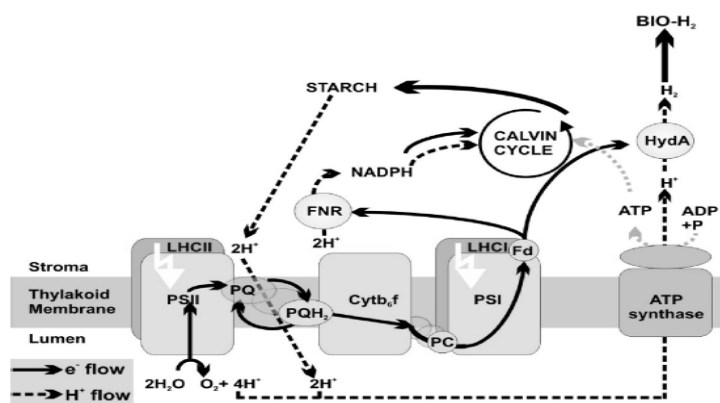
### **1.2.2 Φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου από χλωροφύκη σε ανοξικές συνθήκες.**

Τα μικροφύκη χρησιμοποιώντας φωτονιακή ενέργεια και με την βοήθεια ενζύμων που καλούνται υδρογενάσες μπορούν υπό αναερόβιες συνθήκες να καταλύουν την αντίδραση της αναγωγής των ιόντων υδρογόνου σε μοριακό υδρογόνο. Η διαδικασία αυτή είναι απόλυτα συνδεδεμένη με τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό μιας και χρησιμοποιεί ένζυμα και σύμπλοκα αυτού. Η σύγχρονη αντίληψη για την ύπαρξη αυτού του μηχανισμού υποστηρίζει



πως πρόκειται για ένα εξελικτικό απομεινάρι που επιτρέπει στα μικροφύκη να επιβιώνουν ακόμη και σε αναερόβιες συνθήκες. Βασικός ρόλος του μηχανισμού όπως φαίνεται και παρακάτω είναι η διατήρηση της φωτοσυνθετικής αλυσίδας σε μια οξειδωμένη κατάσταση, ώστε αυτή να μπορεί να λειτουργεί φυσιολογικά.

Σε κανονικές συνθήκες φωτοσύνθεσης (**Εικόνα 8**) η φωτονιακή ενέργεια συλλέγεται από τις χλωροφύλλες με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό του φορτίου στο φωτοσύστημα II και τελικά την φωτόλυση του νερού με την παράλληλη έκλυση οξυγόνου. Τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν από την φωτόλυση του νερού μεταφέρονται μέσω μιας αλυσίδας μεταφορέων ηλεκτρονίων στην πλαστοκινόνη και εν συνεχεία στο κυτόχρωμα b6/f, στην πλαστοκυανίνη, στο φωτοσύστημα I και στην φερρεδοξίνη. Η ανηγμένη φερρεδοξίνη αποτελεί κινητήρια δύναμη για την Fe-NADP<sup>+</sup> αναγωγή για την μετατροπή του NADP<sup>+</sup> σε NADPH. Από όλη αυτή την διαδικασία παράγεται ATP και NADPH που θα χρησιμοποιηθεί στον κύκλο του Calvin για την παραγωγή υδατανθράκων.



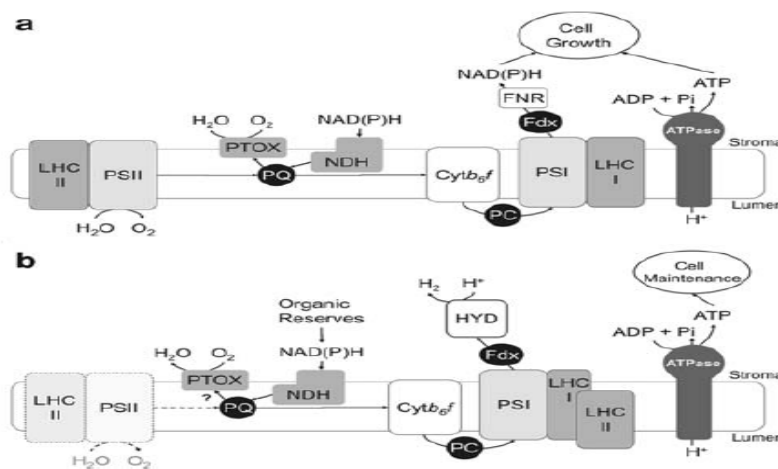
**Εικόνα 8** : Φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου στο μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*. Υπό αερόβιες συνθήκες, τα ηλεκτρόνια από την φωτόλυση του νερού στο PSII μεταφέρονται μέσω της πλαστοκινόνης (PQ) στο κυτόχρωμα b6f (Cyt b6f), στο PSI στην φερρεδοξίνη(Fd), και τελικά χρησιμοποιούνται για την παραγωγή NADPH και αμύλου (starch). Η απελευθέρωση πρωτονίων μέσα στον αυλό του θυλακοειδούς από το PSII και τον κύκλο PQ/PQH2 (ροή H<sup>+</sup> διακεκομμένη γραμμή) οδηγεί στη δημιουργία μιας διαβάθμισης πρωτονίων η οποία οδηγεί σε παραγωγή ATP μέσω της ATP-συνθάσης. Υπό αναερόβιες συνθήκες ενεργοποιείται η υδρογενάση για να παράγει H<sub>2</sub>.

Υπό αναερόβιες συνθήκες τα κύτταρα ενεργοποιούν την σύνθεση μιας Fe-υδρογενάσης (Harpe and Naber, 1993) η οποία ανάγει πρωτόνια που βρίσκονται στο χλωροπλάστη και παράγει αέριο υδρογόνο. Η υδρογενάση είναι συνδεδεμένη με την φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο επίπεδο της φερρεδοξίνης (**Εικόνα 8**), από την οποία λαμβάνει τα απαραίτητα ηλεκτρόνια που χρειάζονται για την αναγωγή των πρωτονίων (Florin et al., 2001). Επειδή το οξυγόνο αποτελεί ισχυρό αναστολέα των ενζύμων αυτών η παραγωγή του

υδρογόνου συντηρείται μόνο σε αυστηρά αναερόβιες συνθήκες (Benemann et al., 1973; Ghirardi et al., 1997).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα ηλεκτρόνια που χρειάζονται για την παραγωγή υδρογόνου προέρχονται από την υδρόλυση του νερού. Αυτό είναι το PS II εξαρτώμενο μονοπάτι όπου τα ηλεκτρόνια από την φωτόλυση του νερού καταλήγουν, μέσω μορίων-μεταφορέων στο PSII, στην φερρεδοξίνη και τελικά στην υδρογενάση όπου παράγεται το H<sub>2</sub>. Ένα δεύτερο μονοπάτι χαρακτηρίστηκε από τους (Melis and Harpe, 2001; Antal et al., 2003) το οποίο είναι ανεξάρτητο από το PSII μιας και τα απαραίτητα ηλεκτρόνια παρέχονται από τον καταβολισμό των οργανικών αποθεμάτων του κυττάρου.

Πιο συγκεκριμένα σε συνθήκες καλλιέργειας παρουσία φωτός και απουσία S, (Εικόνα 9 b) όπου το PSII απενεργοποιείται, η αλυσίδα τροφοδοτείται από ηλεκτρόνια στο επίπεδο της δεξαμενής της πλαστοκινόνης. Την σύζευξη του καταβολισμού των οργανικών υποστρωμάτων με την πλαστοκινόνη και κατά συνέπεια την εισαγωγή τους στην φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, την κάνει μια NAD(P)H οξειδοαναγωγή της πλαστοκινόνης.



**Εικόνα 9** : Σχηματική απεικόνιση της φωτοσυνθετικής μεταφοράς ηλεκτρονίων στο μονοκύτταρο φύκος *Chlamydomonas reinhardtii* σε φυσιολογικές συνθήκες (α) και σε συνθήκες παραγωγής H<sub>2</sub> απουσίας S (β). Η απουσία S προκαλεί δραστηκή μείωση της δραστηριότητας του PSII (σημειώνεται με διακεκομμένη γραμμή στο PSII). Η φωτοσυλλεκτική κεραία (LHCII) μεταφέρεται μερικώς στο φωτοσύστημα I (PSI) (state 2 κατάσταση). Η μειωμένη παραγωγή O<sub>2</sub> συντελεί στην δημιουργία ανοξικών συνθηκών, σε σφραγισμένες καλλιέργειες του μικροφύκου, και έτσι η υδρογενάση (HYD) ενεργοποιείται. Πέραν της υποτυπώδους δραστηριότητας του PSII, η οξειδωτική αποικοδόμηση οργανικών υποστρωμάτων (άμυλο), αποτελεί άλλη μία σημαντική πηγή ηλεκτρονίων για την υδρογενάση. Τα ηλεκτρόνια αυτά πιθανόν μεταφέρονται στην φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω μιας πλαστιδιακής NAD(P)H αφυδρογονάσης (NDH) διατηρώντας λειτουργική την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και ενεργή την παραγωγή ATP. Συντομώσεις : ATP συνθάση (ATPase), κυτόχρωμα b6f (Cytb6f), φερρεδοξίνη (Fdx), φερρεδοξίνη-NADPH αναγωγή (FNR), πλαστιδιακή εναλλακτική οξειδάση (PTOX), πλαστοκυανίνη (PC), πλαστοκινόνη (PQ)

Η δυνατότητα των μικροφυκών να ενεργοποιούν τέτοιους μηχανισμούς σε συνθήκες ανοξίας, όπως η παραγωγή υδρογόνου, είτε είναι PSII εξαρτώμενη είτε όχι, πιθανότατα συνεισφέρει στην διατήρησης μιας μερικώς οξειδωμένης κατάστασης της φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και επομένως στην παραγωγή της ελάχιστης ενέργειας που χρειάζεται ώστε να αποφευχθεί η κατάρρευση της χλωροπλαστικής και μιτοχονδριακής δραστηριότητας (Melis and Harpe, 2001).

### **1.2.3 Βιοαποικοδόμηση meta-υποκατεστημένων διχλωροφαινολών (m-dcps) από το χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* και παραγωγή υδρογόνου.**

Η δυνατότητα του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* να αποικοδομεί φαινολικές ενώσεις αποδείχτηκε από την (Paparazi, 2009) κατά την εκπόνηση της Διδακτορικής της Διατριβής. Η χρήση meta-υποκατεστημένων διχλωροφαινολών σε πειράματα βιοαποικοδόμησης, παρουσία εξωγενούς πηγής άνθρακα, παρουσία φωτός και απουσία οξυγόνου, φανέρωσε αρχικά την ενεργοποίησης μηχανισμών βιοαποικοδόμησης, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε η ενεργοποίηση ενός άλλου μηχανισμού, αυτού της παραγωγής υδρογόνου.

Η δυνατότητα των διχλωροφαινολών να έλκουν ηλεκτρόνια και να ανάγονται κατά την διαδικασία της βιοαποικοδόμησης τους, καθώς επίσης και η πιθανή συμμετοχή τους ως δότες ηλεκτρονίων στην φωτοσυνθετική αλυσίδα, αποδείχθηκε πειραματικά με αναστολείς, τεχνητούς δότες και δέκτες της φωτοσυνθετικής αλυσίδας. Επιπλέον οι διχλωροφαινόλες βρέθηκε πως προκαλούν μοριακές αλλαγές που προκαλούν στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό μέσω της απενεργοποίησης του φωτοσυστήματος II, αλλά και αύξηση της μεταβολικής δραστηριότητας (αυξημένη αναπνοή). Ο παραπάνω συνδυασμός οδηγεί στην εδραίωση αναερόβιων συνθηκών, γεγονός που ευνοεί την παράγωγή υδρογόνου, (Paparazi, 2009).

Αναλυτικά σύμφωνα με το μοντέλο που προτείνει η Paparazi, (2009) φαίνεται πως γίνεται ένας κύκλος με τα εξής βήματα: αρχικά η φαινολική ένωση εισέρχεται στο κύτταρο και ξεκινάει η βιοαποικοδόμηση της, επηρεάζοντας όπως αναφέρθηκε παραπάνω την φωτοσυνθετική και αναπνευστική δραστηριότητα. Οι διχλωροφαινόλες από την στιγμή που

θα έρθουν σε επαφή με τα κύτταρα έλκουν ηλεκτρόνια, ανάγονται και με την ανηγμένη μορφή τους καταλαμβάνουν κάποια θέση στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, πιθανότατα πριν την πλαστοκινόνη, μεταφέροντας ηλεκτρόνια στο φωτοσύστημα I, με αποδέκτες την φερρεδοξίνη και εν συνεχεία την υδρογενάση. Εναλλακτικά οι διχλωροφαινόλες μπορούν να μεταφέρουν ηλεκτρόνια απευθείας στα σχηματιζόμενα πρωτόνια με αποτέλεσμα την ενίσχυση της ποσότητας του παραγόμενου υδρογόνου.

Οι δύο αυτοί μηχανισμοί δρουν συνεργιστικά και αρχίζουν με την βιοποικοδόμηση μέρους της φαινολικής ένωσης, έπεται η έναρξη της παραγωγής υδρογόνου με σκοπό την παραγωγή ενέργειας για περαιτέρω αποικοδόμηση, ώστε τελικά να ξαναρχίσει η βιοαποικοδόμηση και ούτω κάθε εξής. Με αυτό τον τρόπο το χλωροφύκος παράγει >100φορές, περισσότερο H<sub>2</sub> από ότι με την κλασική ανοξία (χωρίς προσθήκη dcp).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η βελτιστοποίηση της παραγωγής υδρογόνου από το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* με τον συνδυασμό της βιοαποικοδόμησης των διχλωροφαινολών, μαζί με στοχευμένες ελλείψεις θρεπτικών συστατικών (N, K, P, Mg, S Ca, Cl, Mn, Cu, Fe, Na) από το θρεπτικό μέσο των καλλιεργειών, και διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης (αυτότροφες ή μικτότροφες καλλιέργειες με υψηλή συγκέντρωση κυττάρων)

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1. Οργανισμός

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* (Εικόνα 10<sup>3</sup>). Η φυλογενετική του ταξινόμηση είναι η εξής:

**Βασίλειο :** Φυτά

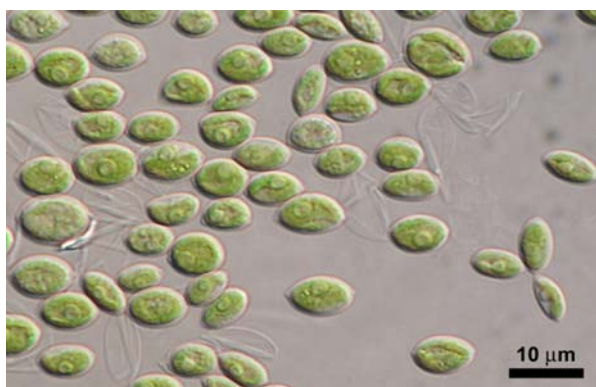
**Διαίρεση :** Χλωρόφυτα

**Κλάση :** Χλωροφύκη

**Τάξη :** Chlorococcales

**Γένος :** Scenedesmus

**Είδος :** *Scenedesmus obliquus*



Εικόνα 10. Κύτταρα *Scenedesmus obliquus*

Ο οργανισμός αυτός είναι μονοκύτταρος ευκαρυωτικός, με ελλειψοειδή κύτταρα, μήκους περίπου 5-10 μm. Ο κύκλος ζωής του διαρκεί γύρω στις 20 ώρες. Στη διάρκεια αυτή, διαιρείται μία φορά δίνοντας 4-8 θυγατρικά κύτταρα, τα οποία μόλις σχηματιστούν πλήρως, συνήθως αποκόπτονται μεταξύ τους (δεν σχηματίζουν κοινόβια). Εξελικτικά βρίσκεται πολύ κοντά στα άλλα δύο γνωστά στο ερευνητικό πεδίο φύκη τη Χλαμυδομονάδα (*Chlamydomonas*) και τη Χλωρέλλα (*Chlorella*).

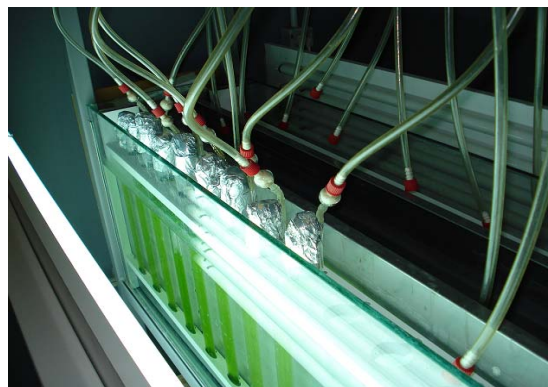
Πρόκειται για φωτοσυνθετικό μικροοργανισμό, που παράγει οξυγόνο κατά τη φωτοσύνθεσή του. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά της φωτοσυνθετικής του δραστηριότητας μοιάζει με τα γυμνόσπερμα φυτά. Ο άγριος τύπος (wt) έχει την ικανότητα βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης και στο σκοτάδι, όπως και στο φως. Δηλαδή, ακόμα και σε

<sup>3</sup> [http://www.butbn.cas.cz/ccala/col\\_images/453.jpg](http://www.butbn.cas.cz/ccala/col_images/453.jpg)

ετερότροφες συνθήκες έχει διαμορφωμένους χλωροπλάστες και ενεργά φωτοσυστήματα I και II (εφ' όσον του παρέχεται κάποια πηγή οργανικού άνθρακα στο θρεπτικό μέσο).

## 2.2. Συνθήκες Ανάπτυξης

Η ανάπτυξη των οργανισμών έγινε σε επιμήκεις γυάλινους σωλήνες (διαμέτρου 5 cm), με ειδικό στόμιο στο κάτω μέρος του σωλήνα, που επιτρέπει τον αερισμό της καλλιέργειας, ενώ τοποθετήθηκαν σε ενυδρείο σταθερής θερμοκρασίας 30 °C, μπροστά από λάμπες λευκού φωτισμού, με ένταση φωτός 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Σύστημα προκαλλιέργειας του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*

Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε αυτές τις συνθήκες για 4-5 ημέρες περίπου, σε υγρό μέσο καλλιέργειας (Πίνακας 1) (Bishop and Senger, 1971), ενώ ακολούθως, χρησιμοποιήθηκαν ως μητρική καλλιέργεια για τη διεξαγωγή του εκάστοτε πειράματος.

Όλα τα πειράματα έλαβαν χώρα σε ερμητικά κλειστά μπουκαλάκια με septa, των 100 mL (Εικόνα 12). Η δειγματοληψία γινόταν καθημερινά την ίδια ώρα με αποστειρωμένες σύριγγες, ενώ η διάρκεια διεξαγωγής του κάθε πειράματος ήταν 5 ημέρες. Η διάρκεια των 5 ημερών επιλέχθηκε ως η ιδανικότερη για την αποφυγή του προβλήματος της έλλειψης θρεπτικών, μετά από προκαταρκτικά πειράματα αναφορικά με την καμπύλη ανάπτυξης του χλωροφύκου στις συγκεκριμένες συνθήκες. Ο τελικός όγκος της καλλιέργειας στο κάθε μπουκάλι ήταν 50 mL. Η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων ήταν 2  $\mu\text{L PCV/mL}$  καλλιέργειας (Packed Cell Volume–Πακεταρισμένα Κύτταρα), ενώ η τελική συγκέντρωση της διχλωροφαινόλης στο μπουκάλι ήταν 0,15 mM. Σημειώνεται ότι τα stock διαλύματα



Εικόνα 12 Μπουκαλάκι των 100 mL, με καλλιέργεια του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*, ερμητικά κλειστό με septa.

της 2,3-dcp ήταν διαλυμένα σε μεθανόλη, η ίδια μικροποσότητα της οποίας προστέθηκε και στις καλλιέργειες του μάρτυρα, ώστε να είναι απολύτως συγκρίσιμα τα αποτελέσματα. Τα μπουκαλάκια αυτά τοποθετήθηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (30 °C), ενώ το φως που έφτανε στην επιφάνεια της καλλιέργειας ήταν 50-60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

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

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (σε g/L)
<i>CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O</i>	1,50
<i>KNO<sub>3</sub></i>	80,0
<i>MgSO<sub>4</sub> x7H<sub>2</sub>O</i>	24,6
<i>NaCl</i>	47,0
<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x2H<sub>2</sub>O</i>	17,8
<i>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x1H<sub>2</sub>O</i>	40,5
<i>CuSO<sub>4</sub> x5H<sub>2</sub>O</i>	0,079
<i>MoO<sub>3</sub> (85%-99.5%)</i>	0,0177
<i>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></i>	2,86
<i>MnCl<sub>2</sub> x4H<sub>2</sub>O</i>	1,81
<i>ZnSO<sub>4</sub> x7H<sub>2</sub>O</i>	0,222
<i>FeSO<sub>4</sub> x1H<sub>2</sub>O</i>	0,06
<i>Fe(III)citrate</i>	0,24

Τα χημικά από το *CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O* έως το *NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x1H<sub>2</sub>O* παρασκευάζονται χωριστά και απαρτίζουν το stock διάλυμα Α, από το οποίο χρησιμοποιούμε 50 mL/L καλλιέργειας, ενώ τα υπόλοιπα από *CuSO<sub>4</sub> x5H<sub>2</sub>O* ως το *ZnSO<sub>4</sub> x7H<sub>2</sub>O* συνιστούν το διάλυμα Β από το οποίο χρησιμοποιούμε 1mL/L καλλιέργειας. Τέλος από το διάλυμα *FeSO<sub>4</sub> x1H<sub>2</sub>O* χρησιμοποιούμε 1 mL/L καλλιέργειας και από τον κιτρικό σίδηρο 0,24 g/L.

Στη διάρκεια της παρούσας εργασίας επιλέχθηκε ως οργανική πηγή άνθρακα, η D<sup>+</sup>-γλυκόζη (5 g/L) (Bishop and Senger, 1971), η οποία υπήρχε στο θρεπτικό όλων των μικτότροφων χειρισμών.

### 2.3. Υπολογισμός Κυτταρικής Συγκέντρωσης

Δείγματα των 5 mL από τις καλλιέργειες των φυκών φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 1500g προκειμένου να καθιζήσουν σε βαθμονομημένο τριχοειδή υαλοσωλήνα (Εικόνα 13) (Logothetis et al., 2004). Η εκτίμηση της κυτταρικής συγκέντρωσης παρουσιάζεται ως όγκος καθιζαμένων κυττάρων (Packed Cell Volume; PCV) ανά mL καλλιέργειας (μL PCV/mL καλλιέργειας).



**Εικόνα 13.**  
**Διαβαθμισμένοι**  
**σωλήνες PCV**

Ως εναλλακτικός τρόπος μέτρησης της κυτταρικής πυκνότητας –για εξοικονόμηση ποσότητας δείγματος και χρόνου– χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική καταγραφή της θολερότητας του μέσου καλλιέργειας στα 550 nm (PERKIN ELMER lamda 20 UV/VIS SPECTROPHOTOMETER – (Εικόνα 14) (DellaGreca et al., 2001), ενώ παράλληλα συσχετίστηκαν οι δύο τρόποι εκτίμησης της κυτταρικής συγκέντρωσης με βάση την ακόλουθη καμπύλη αναφοράς:



**Εικόνα 14.** Φασματοφωτόμετρο UV/VIS  
(PERKIN ELMER lamda 20)

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

$$R^2 = 0,9973$$



## 2.4. Επαγωγικός Φθορισμός-Φυσικοχημικές Αναλύσεις της Μοριακής Δομής και Λειτουργίας του Φωτοσυνθετικού Μηχανισμού

Μόνο ένα μέρος της ενέργειας που απορροφάται από τις χρωστικές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού χρησιμοποιείται για τη φωτοχημεία της φωτοσύνθεσης. Το υπόλοιπο εκπέμπεται είτε ως θερμότητα είτε ως **φθορισμός**. Η επαγωγή του φθορισμού από φωτοσυνθετικούς οργανισμούς παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τους Kautsky & Hirsch (1931). Η επαγωγή του φθορισμού από τα φυτά πραγματοποιείται σε δύο φάσεις, εκ των οποίων η πρώτη είναι ταχεία και η δεύτερη αργή. Σήμερα, η μελέτη της καμπύλης του επαγωγικού φθορισμού –ιδιαίτερα της ταχείας φάσης- έχει εξελιχθεί σε πολύτιμο ερευνητικό μέσο για τη μελέτη της μοριακής δομής και λειτουργίας, αλλά και της απόδοσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Βάσει της μεθόδου των Strasser & Strasser (1995), μπορούν να εκτιμηθούν, σειρά από παραμέτρους, που αφορούν τη δομή και τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Ο φθορισμός αυξάνεται όταν η φωτοχημική απόδοση της φωτοσύνθεσης παρεμποδίζεται για οποιοδήποτε λόγο, για παράδειγμα όταν δεν υπάρχει διαθέσιμος οξειδωμένος δέκτης ηλεκτρονίων σε κάποιο σημείο στην πορεία της ηλεκτρονιακής μεταφοράς. Όταν ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός (wt κύτταρα), μετά από την προσαρμογή του στο σκοτάδι, δεχτεί την επίδραση συνεχούς φωτισμού, τότε ο φθορισμός του αυξάνεται από το αρχικό του επίπεδο ( $F_0$ ) σε ένα μέγιστο επίπεδο ( $F_m$ ) και στη συνέχεια μειώνεται βαθμιαία μέχρι ένα σταθερό επίπεδο ( $F_s$ ).

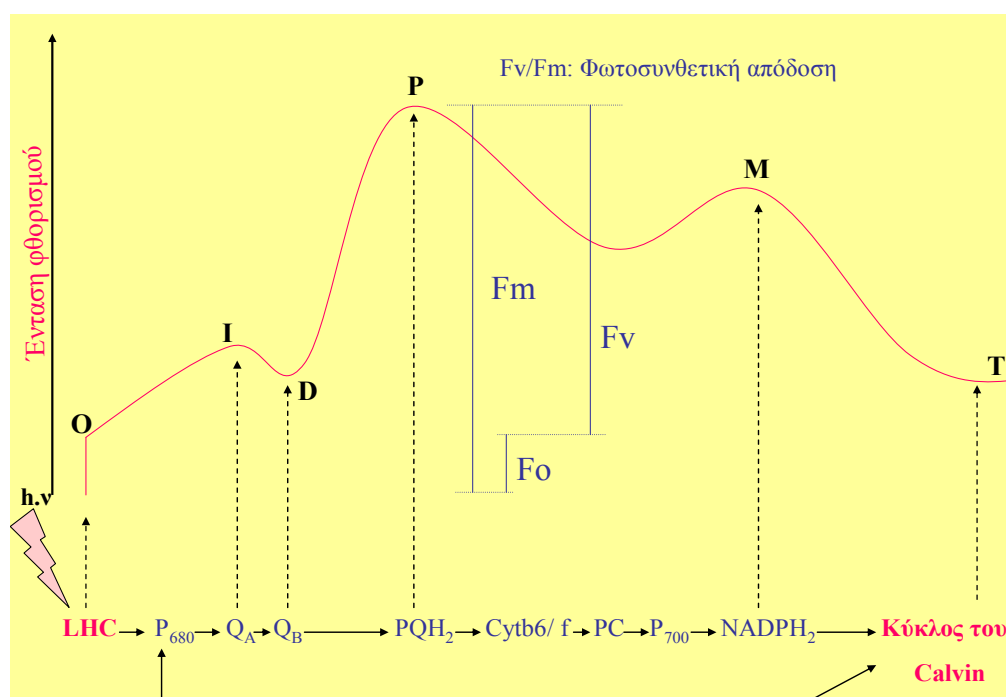
Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού έγιναν με τη φορητή συσκευή Plant Efficiency Analyser (Handy PEA Hansatech Instruments) (**Εικόνα 15**), και ακολούθησε επεξεργασία των δεδομένων με χρήση εξειδικευμένου λογισμικού εφαρμογής του JIP-test (Biolyzer HP 4.0), σύμφωνα με τη μέθοδο των Strasser & Strasser (1995).

Όλες οι μετρήσεις έγιναν σε δείγματα καλλιεργειών όγκου 1 mL, τα οποία προτού διεγερθούν είχαν παραμείνει στο σκοτάδι για 10 min, προκειμένου να «αδειάσουν» τα κέντρα αντίδρασης από ηλεκτρόνια. Από τις μετρήσεις



**Εικόνα 15.** Handy PEA για τις μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού

υπολογίστηκε ο λόγος  $F_v/F_m$ , που συνδέεται άμεσα με τη φωτοσυνθετική απόδοση. (Strasser and Strasser, 1995). Επίσης με εφαρμογή του JIP-TEST για τιμές φθορισμού, που αντιστοιχούν σε καθορισμένα στάδια [J, I και P (Εικόνα 16)] υπολογίστηκαν τα επιμέρους χαρακτηριστικά του φωτοσυνθετικού μηχανισμού: ο λόγος ABS/RC, που συνδέεται με το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PSII, ο λόγος  $Dl_o/RC$ , που συνδέεται με την ενέργεια που χάνεται με τη μορφή θερμότητας και ο λόγος  $RC/CS_o$ , που συνδέεται με την πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης του PSII, καθώς και μια σειρά άλλων παραμέτρων που αφορούν την μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, όπως αυτές περιγράφονται στον Πίνακα 2.



Εικόνα 16. Τυπική καμπύλη επαγωγικού φθορισμού

Η μέθοδος βασίζεται σε μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού με ανάλυση 10 μs σε χρονικό διάστημα 1 δευτερολέπτου. Ο φθορισμός μετρήθηκε με 12-bit ανάλυση και η διέγερση έγινε από 3 διόδους φωτισμού (LEDs) με ένταση ακτινοβολίας μέχρι  $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ερυθρού φωτός (650nm).

**Πίνακας 2. Βασικές παράμετροι του JIP-TEST**

Μεταβλητή OJIP καμπύλης	Ορισμός
$F_t$	Τιμή φθορισμού σε χρόνο $t$ μετά την ακτινοβόληση
$F_{50\mu s}$	Ένταση φθορισμού στα 50 $\mu s$
$F_{300\mu s}$	Ένταση φθορισμού στα 300 $\mu s$
$F_J = F_{2ms}$	Ένταση φθορισμού στο βήμα J (2 ms) της καμπύλης OJIP
$F_I = F_{30ms}$	Ένταση φθορισμού στο βήμα I (30 ms) της καμπύλης OJIP
$F_P (= F_m)$	Μέγιστη ένταση φθορισμού στο P της καμπύλης OJIP
$t_{F_m}$	Χρόνος σε (ms) που απαιτείται για να μεγιστοποιηθεί η ένταση του φθορισμού $F_m$
Area	Συνολική συμπληρωματική περιοχή ανάμεσα στην καμπύλη OJIP και την ευθεία που διέρχεται από το $F = F_m$
<b>Παράμετροι JIP-test</b>	
$F_o$	Ελάχιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί σε «ανοιχτά» κέντρα (open PSII RCs, $t = 0$ )
$F_m$	Μέγιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί στο χρόνο όπου όλα τα κέντρα είναι «κλειστά» (closed PSII RCs, $t = t_{F_m}$ )
$F_v$	Μεταβλητή τιμή φθορισμού τη χρονική στιγμή $t$
$F_v = F_m - F_o$	Μέγιστη τιμή μεταβλητής τιμής φθορισμού
$V_t = (F_t - F_o)/(F_m - F_o)$	Σχετική μεταβολή φθορισμού τη χρονική στιγμή $t$
$V_J = (F_J - F_o)/(F_m - F_o)$	Σχετική μεταβολή φθορισμού στο βήμα J
$M_o = (\Delta V/\Delta t)_o = 4(F_{300\mu s} - F_o)/(F_m - F_o)$	Αρχική κλίση σε ms της καμπύλης $V = f(t)$
$S_m = (Area)/(F_m - F_o)$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης OJIP (Area), ομαλοποιούμενο ως προς $F_v$ (αποτελεί μέτρο του αριθμού των οξειδοαναγωγικών κύκλων της $Q_A$ )
$S_s = V_J/M_o$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης OJIP που αντιστοιχεί μόνο στην OJ φάση (διάστημα όπου η $Q_A$ των RC ανάγεται μία φορά)
$N = S_m/S_s = S_m M_o (1/V_J)$	Μέτρο αριθμού κύκλων αναγωγής της $Q_A$ στο διάστημα $t_{F_m}$
<b>Ειδικές ροές ενέργειας (ανά κέντρο που ανάγει <math>Q_A</math>)</b>	
$ABS/RC = M_o (1/V_J)(1/\Phi_{P_o})$	Μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας
$TR_o/RC = M_o (1/V_J)$	Ενέργεια που παγιδεύεται ανά κέντρο αντίδρασης (για $t = 0$ )
$ET_o/RC = M_o (1/V_J)\Psi_o$	Ροή ηλεκτρονίων ανά κέντρο αντίδρασης (για $t = 0$ )
$DI_o/RC = (ABS/RC) - (TR_o/RC)$	Διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης (για $t = 0$ )
<b>Αποδόσεις ή λόγοι επιμέρους ροών</b>	
$\Phi_{P_o} = TR_o/ABS = [1 - (F_o/F_m)]$	Μέγιστη κβαντική απόδοση της πρωτογενούς φωτοχημείας (για $t = 0$ )
$\Psi_o = ET_o/TR_o = 1 - V_J$	Πιθανότητα να προκαλέσει μια διέγερση (exciton) τη μετακίνηση ενός ηλεκτρονίου κατά μήκος της αλυσίδας πέρα από την $Q_A^-$ (για $t = 0$ )
$\Phi_{E_o} = ET_o/ABS = [1 - (F_o/F_m)]\Psi_o$	Κβαντική απόδοση της μεταφοράς ηλεκτρονίων (για $t = 0$ )
$\Phi_{D_o} = 1 - \Phi_{P_o} = F_o/F_m$	Κβαντική απόδοση της διάχυσης ηλεκτρονίων (για $t = 0$ )
<b>Εκτιμώμενες ροές ενέργειας ανά</b>	

<b>διεγερμένη περιοχή</b>	
$ABS/CS_0$	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το $F_0$
$ABS/CS_m$	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το $F_m$
$TR_0/CS_0 = \Phi_{P_0}(ABS/CS_0)$	Παγιδευμένη ενέργεια ανά διεγερόμενη περιοχή της μεμβράνης (για $t = 0$ )
$ET_0/CS_0 = \Phi_{E_0}(ABS/CS_0)$	Ροή ηλεκτρονίων ανά περιοχή διέγερσης (για $t = 0$ )
$DI_0/CS_0 = (ABS/CS_0) - (TR_0/CS_0)$	Διαχεόμενη ενέργεια ανά περιοχή διέγερσης (για $t = 0$ )
<b>Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης</b>	
$RC/CS_0$	Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης
<b>Δείκτες επίδοσης</b>	
$PI_{ABS} = (RC/ABS) (\Phi_{P_0}/1-\Phi_{P_0})(\Psi_0/1-\Psi_0)$	Επιδόσεις ανά απορροφώμενη ενέργεια
$PI_{CS_0} = (RC/CS_0) (\Phi_{P_0}/1-\Phi_{P_0})(\Psi_0/1-\Psi_0)$	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης ( $t = 0$ )
$PI_{CS_m} = (RC/CS_m) (\Phi_{P_0}/1-\Phi_{P_0})(\Psi_0/1-\Psi_0)$	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης ( $t = t_{Fm}$ )
$SFI_{abs} = (1-\Phi_{P_0})(1-\Psi_0)$	Δείκτης λειτουργικότητας
<b>Ικανότητα παραγωγής έργου</b>	
$DF_{ABS} = \log(PI_{ABS})$	Εκτιμώμενη παραγωγή έργου ανά απορροφώμενη ενέργεια

## 2.5. Πολαρογραφικές Μετρήσεις Μέγιστης Φωτοσυνθετικής Δραστηριότητας και Αναπνοής

Οι μετρήσεις της μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και της αναπνοής έγιναν με σύστημα Clark type ηλεκτροδίου της Hansatech (Εικόνα 17). Μεταξύ ενός ηλεκτροδίου πλατίνας (κάθοδος) και ενός άλλου από άργυρο (άνοδος) τίθεται, μέσω ενός ηλεκτρολύτη (κορεσμένο διάλυμα KCl), μία μικρή ηλεκτρική τάση (~50V). Για τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ ανόδου και καθόδου, χρειάζεται  $O_2$  το οποίο περνά από μία ημιπερατή μεμβράνη, που χωρίζει το δείγμα από τα ηλεκτρόδια. Η καταγραφή της έντασης του ρεύματος (σε A) είναι ανάλογη της συγκέντρωσης οξυγόνου του δείγματος.

Η φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου από το δείγμα (φωτοσυνθετικά κύτταρα) επιτυγχάνεται μόνο με το φωτισμό του δείγματος. Η αποφυγή του περιοριστικού για τη φωτοσύνθεση παράγοντα (συγκέντρωση  $CO_2$  στο διάλυμα του δείγματος)



Εικόνα 17: Οξυγονόμετρο

επιτυγχάνεται με την προσθήκη  $\text{NaHCO}_3$ . Μονοκύτταρα φύκη *Scenedesmus obliquus* συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρηση 5 min στα 1500 g και επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα A (34 mg  $\text{NaHCO}_3$  και 8,96 mg Tricin σε 100 mL  $\text{dH}_2\text{O}$ , PH: 7,6 με KOH), έτσι ώστε η πυκνότητα του αιωρήματος σε κύτταρα να είναι 10  $\mu\text{L PCV/mL}$ . Η οριοθέτηση του επιπέδου συγκέντρωσης του οξυγόνου από το 0-100% στο διάλυμα του δείγματος γίνεται μέσω αέριου αζώτου και κορεσμένου σε οξυγόνο νερού, αντίστοιχα. Η μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα καταγράφηκε σε ένταση φωτισμού  $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , μετά από προκαταρκτικά πειράματα σε διάφορες εντάσεις φωτισμού (ώστε να αποφευχθεί τόσο ο αυτοσκιασμός όσο και η φωτοαναστολή), ενώ η αναπνευστική δραστηριότητα σε απόλυτο σκοτάδι. Τόσο η μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα όσο και η αναπνοή ανήχθησαν ανά  $\mu\text{L PCV}$ .

## **2.6. Ποιοτική και Ποσοτική Ανάλυση των meta-διχλωροφαινολών με HPLC.**

Τα δείγματα καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στα 1500 g (Heraeus SEPATECH, Biofuge 13), με απώτερο σκοπό την καθίζηση των κυττάρων, ενώ το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιήθηκε για την ποιοτική και την ποσοτική ανάλυση της 2,3 dcp με την χρήση ενός diode array – narrow bore – HPLC συστήματος (Shimadzu, SPD-M10A, VP). Για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε μία narrow bore χρωματογραφική στήλη (Hewlett Packard, 2.1X200mm, C-18, 5  $\mu\text{m}$  particle size) που αυξάνει την ευαισθησία του διαχωρισμού για επιπλέον 5-10 φορές σε σύγκριση με τις κλασσικές στήλες.

Για το διαχωρισμό της 2,3-dcp χρησιμοποιήθηκε διαλύτης έκλυσης, ο οποίος περιείχε υπερκάρθαρο νερό ( $\text{H}_2\text{O}$ ), μεθανόλη ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) και οξικό οξύ ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) σε αναλογία όγκων 49:50:1 αντίστοιχα, με σταθερή ροή 0,2 mL/min και θερμοκρασία διαχωρισμού τους  $25^\circ\text{C}$  (Lovell et al., 2002). Η ποιοτική ανάλυση έγινε βάσει του φάσματος απορρόφησης των επιμέρους μεγίστων του HPLC-προφίλ, ενώ η ποσοτική εκτίμηση έγινε με την βοήθεια γνωστών συγκεντρώσεων 2,3 dcp.

## 2.7. Ποιοτική και Ποσοτική Ανάλυση Υδρογόνου (H<sub>2</sub>) με Αέρια Χρωματογραφία Θερμικής Αγωγιμότητας (GC-TCD)

Για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του παραγόμενου υδρογόνου χρησιμοποιήθηκε Αέρια Χρωματογραφία Θερμικής Αγωγιμότητας GC-TCD (Hewlett Packard 5890 Series II – **Εικόνα 18**), με φέρον αέριο Αργό (5bar Πίεση - 23.5 ml min<sup>-1</sup>). 250 μl αέριου δείγματος ενύονταν στην GC-TCD με ειδική gas type σύριγγα, όπου και ο διαχωρισμός του H<sub>2</sub> από τα υπόλοιπα αέρια (O<sub>2</sub>



**Εικόνα 18** Αέριος χρωματογράφος θερμικής αγωγιμότητας (Hewlett Packard 5890 Series II)

και N<sub>2</sub>) γίνεται με βάση τη διαφορά στη θερμική αγωγιμότητα των αερίων. Η θερμική αγωγιμότητα του Αργού είναι 0.0001772 W/cmK, του Αζώτου 0.0002598 W/cmK, του Οξυγόνου 0.0002674 W/cmK και του Υδρογόνου 0.001815 W/cmK<sup>4</sup>. Για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε μια τριχοειδής στήλη μεγάλου μήκους (5A μεγέθους), ενώ η θερμοκρασία του TCD ανιχνευτή ήταν 170°C, του φούρνου 160°C, και του σημείου εισόδου της ένεσης ήταν 180°C (Chader et al., 2009). Η ποσοτικοποίηση έγινε κάνοντας καμπύλη αναφοράς για γνωστές ποσότητες υδρογόνου.

## 2.8 Λυοφιλοποίηση κυττάρων

Η λυοφιλοποίηση των κυττάρων για τον υπολογισμό του ξηρού βάρους, αλλά και για την περαιτέρω χρήση τους για την εκχύλιση των λιπαρών ουσιών, μετά από φυγοκέντρηση των καλλιιεργειών λάμβανε χώρα σε λυοφιλοποιητή (Heto, MAXI dry Iyo) για 10-12 ώρες.

<sup>4</sup> <http://environmentalchemistry.com/yogi/periodic/thermal.html>

## 2.9 Εκχύλιση λιπαρών

Για την εκχύλιση των λιπαρών οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν (5min στα 1500g) και στην συνέχεια λυοφιλοποιήθηκαν για περίπου 10-12 ώρες. Το ξηρό βάρος κάθε δείγματος ζυγίστηκε και προστέθηκαν οι ανάλογες ποσότητες χλωροφορμίου και μεθανόλης με αναλογία 2:1 (για κάθε 1g ξηρής βιομάζας προστέθηκαν 14 mL χλωροφόρμιο και 7 mL μεθανόλη). Μετά την προσθήκη των διαλυτών το κάθε δείγμα ομογενοποιήθηκε με την χρήση ειδικού μίξερ (ULTRA TURRAX T25, IKA LABORTECHNIK) για 1,5 λεπτό. Το ομογενοποιημένο δείγμα παρέμεινε σε συνεχή ανάδευση για 20min, μετά φυγοκεντρήθηκε για 5 min στις 1500g και κρατήθηκε το υπερκείμενο στο οποίο προστέθηκε ξανά η ίδια ποσότητα  $\text{CHCl}_3$  και  $\text{CH}_3\text{OH}$  που είχε υπολογιστεί αρχικά για το κάθε δείγμα. Ακολούθως αναδεύτηκε στο μίξερ για λίγα δευτερόλεπτα και τοποθετήθηκε σε υπέρηχους για καλύτερο σπάσιμο των κυττάρων. Από την φυγοκέντρηση που ακολούθησε (5 min στα 1500g) συλλέχθηκε το υπερκείμενο. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται για ακόμη μία φορά. Μετά το τέλος της διαδικασίας ο διαλύτης με τα λιπαρά που έχουν συλλεχθεί από κάθε φυγοκέντρηση κάθε δείγματος τοποθετούνται σε διαχωριστική χοάνη και με την προσθήκη  $\text{NaCl}$  1%(v/v) σε αναλογία 2mL ανά g ξηρής βιομάζας , γίνεται ο διαχωρισμός των φάσεων. Η κάτω φάση που περιλαμβάνει τα λιπαρά διαλυμένα στο χλωροφόρμιο συλλέγεται προσεκτικά και οδηγείται για εξάτμιση. Η εξάτμιση έγινε σε περιστρεφόμενο αποστακτήρα της BUCHI παρουσία κενού και σε θερμοκρασία υδατόλουτρου 70 °C, ενώ το σύστημα ψύξης λειτουργούσε με νερό σε θερμοκρασία δωματίου.

## 3.Αποτελέσματα και Συζήτηση

### **3.1 Επίδραση της έλλειψης ιόντων από το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης μικτότροφων καλλιέργειών *Scenedesmus obliquus* παρουσία της 2,3-dcp.**

Ο κύριος μηχανισμός παραγωγής H<sub>2</sub> από το χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* που οδηγεί σε μαζικές ποσότητες παραγόμενου αερίου, αναπτύχθηκε στο διδακτορικό της Παραζι, (2009). Η αρχική παρατήρηση του φαινομένου, έλαβε χώρα κατά την διεξαγωγή πειραμάτων βιοαποικοδόμησης meta υποκατεστημένων διχλωροφαινολών (m-dcps). Το μικροφύκος υπό αυτές τις συνθήκες παράγει ως και 125 φορές περισσότερο αέριο υδρογόνο σε σχέση με τον ανοξικό μάρτυρα απουσία της 2,3-dcp.

Αναλυτικά συμφωνά με την Παραζι, (2009), η παρουσία διχλωροφαινολών στο μέσο καλλιέργειας του χλωροφύκου που αναπτύσσεται σε ερμητικά κλειστά δοχεία, αναστέλλει την λειτουργία του PSII (και κατ' επέκταση τη φωτόλυση του νερού και την παραγωγή οξυγόνου), ενώ ταυτόχρονα αυξάνει την αναπνευστική λειτουργία των κυττάρων, δημιουργώντας έτσι πολύ γρήγορα ανοξικές συνθήκες.

Η σημαντικότερη όμως βιοχημική συγκυρία σε αυτές τις συνθήκες, είναι ότι οι διχλωροφαινόλες όταν ανάγονται (κατά την διαδικασία της βιοδιάσπασής τους), έχουν την δυνατότητα να μεταφέρουν ηλεκτρόνια στο PSI, αφού φαίνεται να λαμβάνουν θέση μεταφορέα ηλεκτρονίων στην περιοχή των κινονών της φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, με τις οποίες εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια τόσο στη δομή όσο και στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό. Με άλλα λόγια η αναστολή του PSII που θα οδηγούσε, κάτω από άλλες συνθήκες, σε κατάρρευση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού αλλά και του χλωροφύκου, αναπληρώνεται από ένα πομπό ηλεκτρονίων (τις διχλωροφαινόλες) προς το PSI, το οποίο και υπερεπάγεται. Οι συνθήκες αυτές είναι οι πλέον κατάλληλες για την σταθερά αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου της υδρογενάσης και την συνεχή (όσο συντηρούμε την καλλιέργεια) παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων υδρογόνου. Συνδυαστικά οι ανηγμένες διχλωροφαινόλες μπορούν να μεταφέρουν ηλεκτρόνια απευθείας σε πρωτόνια σχηματίζοντας επιπλέον υδρογόνο σύμφωνα με την αντίδραση:  $2\text{H}^+ + \text{D}_{\text{red}} \rightarrow \text{H}_2 + \text{D}_{\text{ox}}$ , οδηγώντας στην σύνθεση ιδιαίτερα υψηλών συγκεντρώσεων υδρογόνου (100-125 φορές υψηλότερες) σε σύγκριση με τον ανοξικό μάρτυρα (ανοξικές καλλιέργειες χλωροφυκών χωρίς την προσθήκη διχλωροφαινολών).



Ένας εναλλακτικός μηχανισμός για την παραγωγή υδρογόνου από μικροφύκη και συγκεκριμένα στο *Scenedesmus obliquus*, προτείνεται από τους Melis et al (2000) όπου η παραγωγή H<sub>2</sub> επιτυγχάνεται χάρη στην τεχνητή εγκαθίδρυση αναερόβιων συνθηκών. Τέτοιες συνθήκες, σύμφωνα με τον προτεινόμενο μηχανισμό, επιτυγχάνονται σε καλλιέργειες που αναπτύσσονται σε ερμητικά σφραγισμένα δοχεία, παρουσία φωτός και απουσία θείου (S) από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Η παραγωγή υδρογόνου στις παραπάνω συνθήκες συσχετίστηκε με την απενεργοποίηση του φωτοσυστήματος II (PSII), λόγω της έλλειψης του θείου (Melis et al., 2000);(Melis and Harpe, 2001).

Αναλυτικότερα η απουσία θείου σύμφωνα με τους Melis et al., (2000) αδρανοποιεί μερικώς το PSII. Η μερική αυτή απενεργοποίηση του PSII, καταστέλλει το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η υδρογενάση και κατά συνέπεια η παραγωγή υδρογόνου (Melis et al., 2000). Φαινομενικά η έλλειψη θείου μπορεί να βελτιστοποιήσει την παραγωγή H<sub>2</sub>, στην πραγματικότητα όμως το κύτταρο έχει περιορισμένη ικανότητα παραγωγής του αερίου, που μπορεί να αρθεί με την προσθήκη θείου εκ νέου στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Η παρουσία του θείου στα αμινοξέα μεθειονίνη και κυστεΐνη αποτελεί την εξήγηση στην διακοπτόμενη παραγωγή υδρογόνου, δεδομένου ότι η απουσία του θείου συνοδεύεται με ταυτόχρονη έλλειψη των παραπάνω κρίσιμων αμινοξέων απαραίτητων για την πρωτεϊνσύνθεση. Σε κάθε περίπτωση ο μηχανισμός αυτός υστερεί αφού χαρακτηρίζεται από μικρή παραγωγή αερίου H<sub>2</sub>, αλλά και από ασυνέχεια.

Συνδυάζοντας τα παραπάνω ευρήματα, με απώτερο στόχο την περαιτέρω έρευνα του μηχανισμού και την αριστοποίηση της παραγωγής του H<sub>2</sub> από τα μικροφύκη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε μικτότροφες καλλιέργειες *Scenedesmus obliquus* απουσία συγκεκριμένων θρεπτικών στοιχείων (N, K, P, S, Mg, Ca, Cl, Mn, Fe, Cu και Na) από το μέσο ανάπτυξης του χλωροφύκου και παρουσία dcp. Για τις ανάγκες των πειραμάτων, από τις διάφορες m-dcps επιλέχθηκε η 2,3-dcp στη συγκέντρωση των 0,15 mM, δεδομένου ότι ενεργειακά είναι η λιγότερο απαιτητική για τη βιοδιάσπασή της ένωση και επομένως η λιγότερο τοξική.

Στον **Πίνακα 3** που ακολουθεί παρουσιάζεται ο ρόλος κάθε ιόντος, που περιέχεται στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας του μικροφύκου, για την ομαλή λειτουργία του φυτικού κυττάρου, καθώς και οι βιοχημικές αλλαγές που προκαλούνται από την έλλειψή του. Σημειώνεται ότι πολλά από τα δεδομένα του παρακάτω πίνακα, αναφέρονται σε ανώτερα φυτά και όχι σε μικροφύκη, εξαιτίας της περιορισμένης βιβλιογραφίας.

**Πίνακας 3: Ρόλος των διαφόρων ιόντων του πλήρους θρεπτικού μέσου καλλιέργειας του *Scenedesmus obliquus* στην ομαλή λειτουργία του φυτικού κυττάρου, καθώς και βιοχημικές αλλαγές που προκαλούνται απουσία αυτών.**

Χημικό στοιχείο	Ρόλος:χημικού στοιχείου στην ανάπτυξη	Βιοχημικές αλλαγές που προκαλούνται από την έλλειψη του.
N	Βιοσύνθεση πρωτεϊνών, νουκλεϊνικών οξέων και χλωροφυλλών	Συσώρευση λιπαρών οξέων και υδατανθράκων. (Richardson et al., 1969; Zhila et al., 2005) Αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης Μείωση των χρωστικών και ιδιαίτερα των χλωροφύλλων. (Allen et al., 1990) Μείωση της φωτοσύνθεσης μέσω απενεργοποίησης του PSII .(Peltier and Schmidt, 1991) Μείωση της παραγωγής O <sub>2</sub> και της δέσμευσης CO <sub>2</sub> . (Berges et al., 1996; Huang et al., 2004).
K	Άνοιγμα στομάτων –ανταλλαγή αερίων. Ενεργοποίηση ενζύμων. Διατήρηση ωσμωτικότητας. Εκτάσεις και κινήσεις φυτικών κυττάρων. Τροπισμοί .	Μείωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης. Αύξηση της αναπνοής (Terry and Ulrich, 1973) Μείωση της δέσμευσης CO <sub>2</sub> . (Alahari and Arpte, 1998)
P	Σύνθεση ενεργειακών βιομορίων καθώς και βιομορίων που εμπλέκονται στη φωτοσύνθεση, την αναπνοή και άλλες μεταβολικές διαδικασίες. Βιοσύνθεση νουκλεϊκών οξέων.	Αύξηση της σύνθεσης αποθηκευτικών υδατανθράκων. Μείωση του λόγου πρωτεϊνών/υδατανθράκων. Μείωση των χλωροφυλλών και του λόγου RNA/DNA. Μείωση της δραστηριότητας του PSII. (F.P.Healey and Hendzel, 1975) Αύξηση της μη φωτοχημικής απόσβεσης (Xu et al., 2007).
S	Βιοσύνθεση αμινοξέων, συνενζύμου CoA. Απαραίτητο για την δημιουργία χλωροπλαστών.	Επιλεκτική αποδόμηση της Rubisco (Lemna minor). Μειωμένη αναγωγή C Μείωση της δραστηριότητας ή και καταστροφή του PSII ( <i>Chlamydomonas reinhartii</i> ). (Melis et al., 2000; Antal et al., 2003) Μειωμένη ηλεκτρονιακή ροή στη φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς. (Wykoff et al., 1998)
Mg	Συστατικό των χλωροφυλλών. Συμπαράγοντας πολλών ενζύμων. Απαραίτητο για την σύνθεση και την αξιοποίηση του ATP.	Αποδιοργάνωση των μεμβρανών του χλωροπλάστη (Hall et al., 1972). Μείωση της φωτοσύνθεσης. Δραστηκή μείωση του ποσοστού των χλωροφυλλών (FINKLE and APPLEMAN, 1952; UTKILEN, 1982)
Ca	Δευτερογενείς διαβιβαστής. Ρυθμιστής της βιοσύνθεσης και ενεργοποίησης πολλών ενζύμων. Μεταφορά ιόντων.	Αλλαγή στις χλωροπλαστικές μεμβράνες. (KARIM and VLAMIS, 1962)
Cl	Σύνθεση βιομορίων (π.χ αυξίνη). Φωτόλυση του νερού μέσω προστασίας του PSII από αναστολείς. Ωσμωτική ρύθμιση.	Μειωμένη έκλυση O <sub>2</sub> από το PSII.
Mn	Συμμετοχή στη φωτόλυση του νερού μέσω PSII. Ενεργοποίηση αρκετών ενζύμων. Συμμετέχει στη δόμηση των χλωροπλαστών.	Μείωση ενεργότητας πολλών ενζύμων Μείωση της φωτοφωσφορυλίωσης, της ροής ηλεκτρονίων στην φωτοσυνθετική αλυσίδα και του ποσοστού των χλωροφυλλών.(CHENIAE and MARTIN, 1968 )
Fe	Σύνθεση βιομορίων φωτοσυνθετικής και αναπνευστικής αλυσίδας (χλωροφύλλες, κυτοχρώματα, φερεδοξίνη).	Μείωση του PSI. Αντικατάσταση της φερεδοξίνης με την φλαβοδοξίνη. Δραστηκά μειωμένη βιοσύνθεση χλωροφυλλών και φυκοκυανινών. Μειωμένη απόδοση φωτοσύνθεσης. (SANDMANN, 1985)
Cu	Συστατικό ενζύμων της φωτοσύνθεσης (πλαστοκυανίνη) και της αναπνοής (κυτοχρωμική οξειδάση).	Μείωση της φωτοσύνθεσης. Μείωση της βιοσύνθεσης χλωροφυλλών. (Olszewska et al., 2008)
Na	Ρυθμιστής ώσμωσης. Μεταφορά ιόντων.	Διαταραχή της ώσμωσης και των συγκεντρώσεων διαφόρων ιόντων.

Τα στοιχεία που αφαιρέθηκαν σε κάθε χειρισμό χωριστά είναι αυτό που περιγράφεται στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 3 ) (N, K, P, S, Mg, Ca, Cl, Mn, Fe, Cu και Na). Μερικές

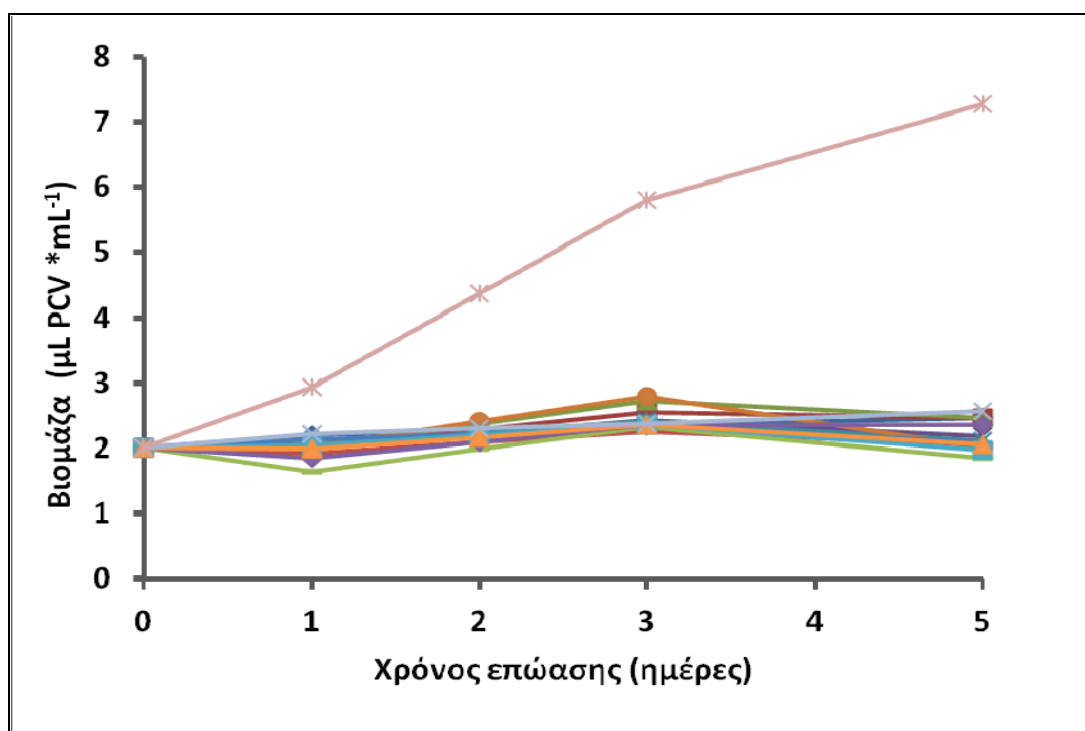
φορές η αφαίρεση ενός στοιχείου από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας συνεπάγεται και ταυτόχρονη αναγκαστική έλλειψη κάποιου άλλου ιόντος. Πιο συγκεκριμένα για να επιτευχθεί έλλειψη του ιόντος χλωρίου ( $\text{Cl}^-$ ) αφαιρείται το  $\text{CaCl}_2$ , με αποτέλεσμα την πρόκληση αναγκαστικής απουσίας και του ιόντος ασβεστίου ( $\text{Ca}^{+2}$ ). Σε αυτές τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν εναλλακτικά άλατα, όπως ακριβώς παρουσιάζονται στον (Πίνακα 4), που ακολουθεί, ώστε να εμπλουτιστεί το θρεπτικό στο εκάστοτε ιόν. Σημειώνεται ότι οι ποσότητες των νέων-εναλλακτικών αλάτων υπολογίστηκαν με τέτοιο τρόπο, ώστε η μοριακότητα του ιόντος που αφαιρείται αναγκαστικά, να είναι η ίδια ακριβώς με αυτήν του αρχικού ιόντος στο πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.

**Πίνακας 4:** Αναλυτική περιγραφή των αλατιών που αφαιρέθηκαν από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, ώστε να επιτευχθεί η εκάστοτε ιοντική έλλειψη, καθώς και των εναλλακτικών αλατιών που προστέθηκαν σε περίπτωση αναγκαστικής παράλληλης έλλειψης κάποιου άλλου ιόντος.

Έλλειψη ιόντος	Αλάτι/α που αφαιρείται/ούνται από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας	Αλάτι/α που προστέθηκε/καν για την αναπλήρωση των ιόντων που αφαιρέθηκαν αναγκαστικά παράλληλα με την επιδιωκόμενη έλλειψη
$-\text{NO}_3^-$	$\text{KNO}_3$	$\text{KCl}$
$-\text{K}^+$	$\text{KNO}_3$	$\text{NaNO}_3$
$-\text{PO}_4^{-2}$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4, \text{NaH}_2\text{PO}_4$	--
$-\text{SO}_4^{-2}$	$\text{MgSO}_4, \text{ZnSO}_4, \text{CuSO}_4, \text{Fe}_2\text{SO}_4$	$\text{MgCl}_2, \text{ZnCl}_2, \text{CuCl}_2$
$-\text{Mg}^{+2}$	$\text{MgSO}_4$	--
$-\text{Ca}^{+2}$	$\text{CaCl}_2$	--
$-\text{Cl}^-$	$\text{CaCl}_2, \text{NaCl}, \text{MnCl}_2$	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, \text{MnSO}_4$
$-\text{Mn}^{+2}$	$\text{MnCl}_2$	--
$-\text{Fe}^{+2}, -\text{Fe}^{+3}$	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3, \text{Fe(III)citrate}$	--
$-\text{Cu}^{+2}$	$\text{CuSO}_4$	--
$-\text{Na}^+$	$\text{NaCl}, \text{Na}_2\text{HPO}_4, \text{NaH}_2\text{PO}_4$	$\text{KCl}$

Οι μητρικές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, ενώ χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή του πειράματος μετά από επτά ημέρες καλλιέργειας. Η επιλογή της επταήμερης επώασης έγινε με βάση το γεγονός ότι μετά την τέταρτη ημέρα της καλλιέργειας τα κύτταρα βρίσκονται ήδη στην φάση της στασιμότητας, ενώ οι επιπλέον 3 ημέρες δόθηκαν για την άντληση των αποθηκευμένων ιόντων

Η ικανότητα του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* να αποικοδομεί τη 2,3-dcp έχει ήδη αποδειχθεί (Pαραζι, 2009) . Η βιοαποικοδόμηση όμως είναι μία ενεργοβόρα διεργασία, ιδιαίτερα στην περίπτωση της συγκεκριμένης κατηγορίας φαινολικών ενώσεων (meta υποκατεστημένες διχλωροφαινόλες), και κατά συνέπεια το μικροφύκος πρέπει να διαχειριστεί τη διαθέσιμη ενέργεια μοιράζοντάς την ανάμεσα στην αποτοξικοποίηση του περιβάλλοντός του και στην ανάπτυξή του, ακολουθώντας πάντα την πιο συμφέρουσα ενεργειακά διαδρομή. Στην περίπτωση της 2,3-dcp έχει αποδειχθεί ότι περισσότερη ενέργεια αποδίδεται στη βιοαποικοδόμησή της, σε αντίθεση με αυτήν που προορίζεται για την ανάπτυξη του μικροφύκου, η οποία εμφάνισε παρεμποδιστικές τάσεις σε σύγκριση με την περίπτωση του μάρτυρα (απουσία 2,3-dcp) (Pαραζι, 2009). Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα της ανάπτυξης, που παρατηρήθηκαν στους χειρισμούς που απεικονίζονται στην [Εικόνα 19](#).



**Εικόνα 19:** Κινητική ανάπτυξης του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*. Οι χειρισμοί: \* control, ◆ control+dcp, ■ -Ca+dcp, ▲ -Cl+dcp, ◆ -K +dcp, ● -Mg+dcp, ◆ -S+dcp, ◆ -P+dcp, ◆ -N+dcp, ◆ -Fe+dcp, ◆ -Mn+dcp, ◆ -Zn+dcp, ◆ -Cu+dcp, ◆ -Na+dcp

Η παρουσία της 2,3-dcp καταστέλλει την ανάπτυξη σε όλους τους χειρισμούς, αφού η συνολική βιομάζα από την 1<sup>η</sup> έως και την 5<sup>η</sup> ημέρα παραμένει σχετικά σταθερή με πτωτικές τάσεις. Μάλιστα σε σύγκριση με τον χειρισμό απουσία dcp [control] η παρεμποδιστική

δράση φτάνει το 80%. Ανάλογη παρεμποδιστική δράση της 2,3-dcp στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών παρατηρήθηκε και από τους (Boyd and Shelton, 1984). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι τιμές της ανάπτυξης (PCV) έχουν μικρή απόκλιση μεταξύ των χειρισμών, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η επίδραση της 2,3-dcp έχει κυρίαρχο-περιοριστικό ρόλο, ενώ η εκάστοτε έλλειψη δεν επηρεάζει επιπλέον την ανάπτυξη στις συγκεκριμένες συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος, (Εικόνα 19).

Η παρεμποδιστική δράση της 2,3-dcp δεν αντικατοπτρίζεται μόνο στις καμπύλες ανάπτυξης, αλλά και στη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Η τοξικότητα της 2,3-dcp είναι τόσο έντονη, ώστε οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού ήταν ανέφικτο να πραγματοποιηθούν πέραν της πρώτης ημέρας διεξαγωγής του πειράματος, αφού ακολούθως απενεργοποιείται το PSII. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 5).

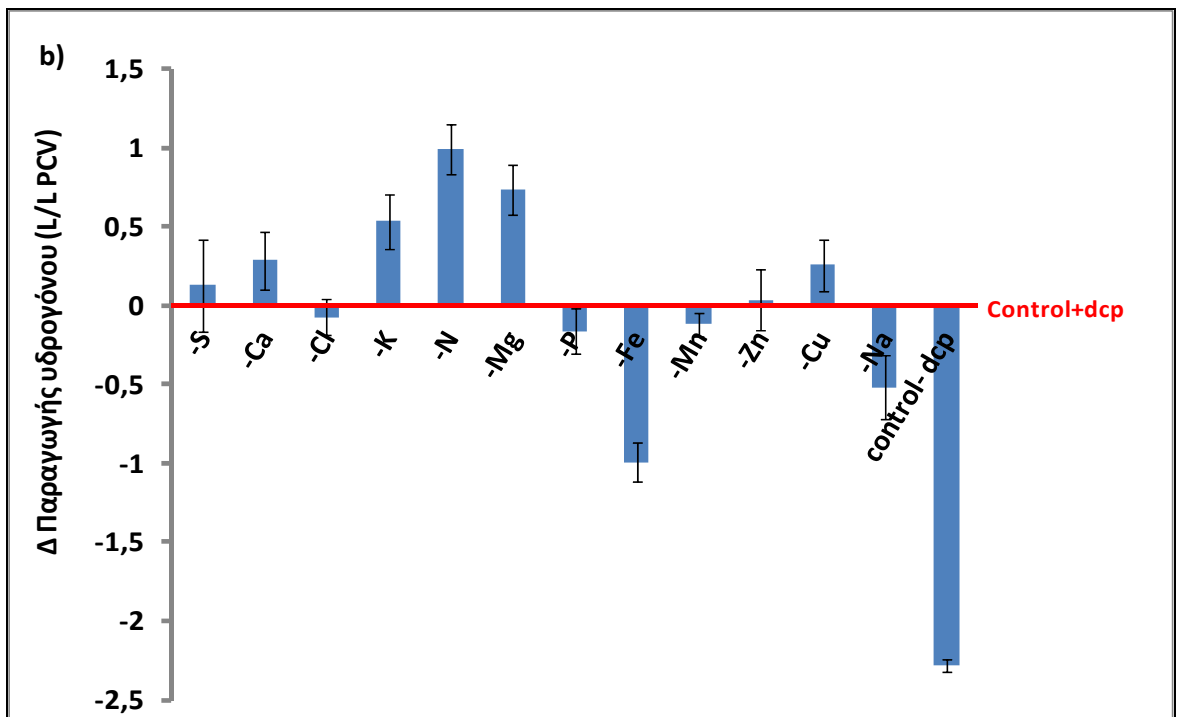
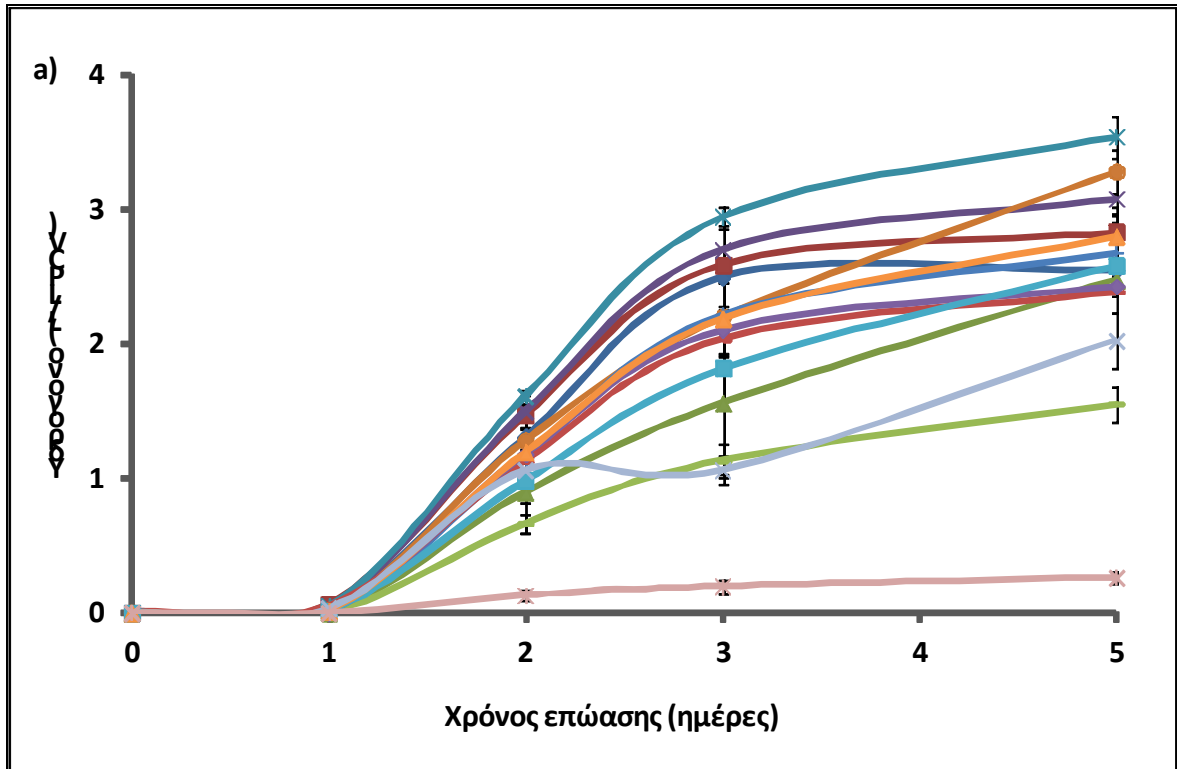
Η παρουσία της 2,3-dcp μειώνει δραστικά τη φωτοσυνθετική απόδοση ( $F_v/F_m$ ) σε όλους τους χειρισμούς σε σύγκριση με έναν υγιή μάρτυρα (απουσία φαινολικής ένωσης) [control]. Επιπλέον φαίνεται πως ενεργοποιείται ένας μηχανισμός απόσβεσης ενέργειας, ως απόκριση στην έντονη καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, γεγονός που αντικατοπτρίζεται στην αύξηση του μεγέθους των λειτουργικών κεραιών (ABS/RC), με άμεση συνέπεια την αύξηση της ενέργειας που διαχέεται μη φωτοχημικά ( $D_{10}/RC$ ) και τη μείωση της πυκνότητας των ενεργών κέντρων (RC/CS<sub>0</sub>).

Αντίστοιχες καταστάσεις στρες έχουν περιγραφεί και σε διάφορες άλλες αβιοτικές καταπονήσεις όπως αυτές που παρατηρήθηκαν σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας (Sfakianaki et al., 2006), υψηλής UV-B ακτινοβολίας (Sfichi et al., 2004; Lutz et al., 2005), οσμωτικής καταπόνησης (Demetriou et al., 2007), αυξημένων συγκεντρώσεων όζοντος (Navakoudis et al., 2003; Lutz et al., 2005).

**Πίνακας 5:** Παράμετροι του JIP-Test την 1<sup>η</sup> ημέρα διεξαγωγής του πειράματος που αφορούν την μοριακή δομή και την λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* παρουσία 0,15 mM 2,3-dcp, σε ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  για τις διάφορες ελλείψεις θρεπτικών. Fv/Fm: φωτοσυνθετική απόδοση, ABS/RC: μέγεθος λειτουργικής φωτοσυνθετικής κεραίας, Dlo/RC: ενέργεια που διαχέεται με την μορφή θερμότητας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης, RC/CSo: πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης, nd: no detected.

Χειρισμός	Fv/Fm	ABS/RC	Dlo/RC	RC/CSo
<b>Cntrl</b>	0,442	3,26	1,86	25,79
<b>Cntrl+dcp</b>	0,089	19,98	18,19	6,65
<b>-Ca</b>	0,070	nd	nd	nd
<b>-Cl</b>	0,233	7,11	5,53	19,26
<b>-K</b>	0,027	nd	nd	nd
<b>-N</b>	0,083	nd	nd	nd
<b>-Mg</b>	0,087	8,49	7,92	11,42
<b>-S</b>	0,148	13,33	11,51	11,40
<b>-P</b>	0,139	13,81	12,04	6,37
<b>-Fe</b>	0,395	1,38	0,84	55,16
<b>-Mn</b>	0,250	7,72	5,97	17,22
<b>-Zn</b>	0,199	14,32	11,75	8,93
<b>-Cu</b>	0,156	7,38	6,38	11,23

Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα καθιστούν τη δράση της φαινολικής ένωσης πολύ πιο ισχυρή σε σύγκριση με τη δράση της απουσίας θρεπτικών συστατικών από το μέσο καλλιέργειας, δεδομένου ότι δεν παρατηρείται ουσιαστική διαφορά μεταξύ των χειρισμών, όσον αφορά την ανάπτυξη και τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Σε αντίθεση με την ανάπτυξη, οι μετρήσεις του παραγόμενου H<sub>2</sub> δίνουν διαφοροποιήσεις μεταξύ των ελλείψεων, όπως παρουσιάζονται στην [Εικόνα 20](#).



Εικόνα 20 :α) Κινητική παραγωγής υδρογόνου από το χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus*. Οι χειρισμοί ήταν: \* control, ◆ control+dcp, ■ -Ca+dcp, ▲ -Cl+dcp, ◆ -K+dcp, ● -Mg+dcp, ◆ -S+dcp, ■ -P+dcp, \* -N+dcp, ▲ -Fe+dcp, ◆ -Mn+dcp, ◆ -Zn+dcp, ● -Cu+dcp, ◆ -Na+dcp, β) Διαφορές στην παραγωγή υδρογόνου των χειρισμών από τον μάρτυρα **Control+dcp** εκφρασμένες σε απόλυτες τιμές.

Η παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του μικροφύκου (Εικόνα 19) και η κατάρρευση του φωτοσυνθετικού του μηχανισμού (Πίνακας 3), μέσω της απενεργοποίησης του PSII, δε φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά την παραγωγή του υδρογόνου, δεδομένου ότι η αδυναμία παραγωγής  $O_2$  (ισχυρός αναστολέας της υδρογενάσης), ενεργοποιεί την υδρογενάση και την παραγωγή του αερίου  $H_2$ . Η διακεκομμένη φαινομενικά, λόγω της καταστροφής του PSII, αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων επανατίθεται σε λειτουργία, αφού η 2,3-dcp φαίνεται να λειτουργεί ως εναλλακτικός δότης ηλεκτρονίων, ενισχύοντας την κυκλική ροή ηλεκτρονίων, όπως αποδείχτηκε (Parazi, 2009). Η δημιουργία της απαραίτητης ανοξίας, που απαιτείται για τη δράση της υδρογενάσης, ενισχύεται από την παρουσία της γλυκόζης στο μέσο της καλλιέργειας, η οποία αυξάνει την αναπνευστική δραστηριότητα, όπως επίσης ενισχύεται και από την αδυναμία παραγωγής οξυγόνου, λόγω απενεργοποίησης του PSII, και κατά συνέπεια αναστολής της φωτόλυσης του νερού.

Όλα τα παραπάνω ισχύουν σε όλους τους χειρισμούς, όπου απουσιάζουν συγκεκριμένα ιόντα από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, αφού παρατηρείται παραγωγή  $H_2$  μετά την πρώτη ημέρα επώασης στην 2,3-dcp, όταν πλέον έχει καταναλωθεί όλο το οξυγόνο του συστήματος. Επισημαίνεται για ακόμη μια φορά ότι ενώ στην ανάπτυξη και στη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, οι ελλείψεις ιόντων δεν έδιναν σπουδαίες διαφοροποιήσεις, στην παραγωγή του υδρογόνου (Εικόνα 20) η απουσία μερικών ιόντων πέραν του βιβλιογραφικά μελετημένου θείου (S) παίζει σημαντικό ρόλο, αφού οδηγεί σε ακόμα υψηλότερες τιμές παραγόμενου  $H_2$ . Πιο συγκεκριμένα παρατηρείται ότι οι ελλείψεις  $NO_3^-$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{+2}$  επάγουν υψηλότερες συγκεντρώσεις  $H_2$  σε σύγκριση με την καλλιέργεια μάρτυρα [Control+dcp] ή ακόμη και με το βιβλιογραφικά μελετημένο χειρισμό όπου απουσιάζει το ιόν  $SO_4^{-2}$  (Εικόνα 20).

Αναλυτικότερα, ο χειρισμός [-N+dcp] παράγει τις μεγαλύτερες ποσότητες  $H_2$  ανά κυτταρικό όγκο (PCV) ξεπερνώντας την παραγωγικότητα του μάρτυρα κατά 39%, ακολουθεί ο χειρισμός [-Mg+dcp] με παραγωγικότητα 29% περισσότερη από το μάρτυρα, ενώ ο χειρισμός [-K+dcp] έχει παραγωγικότητα 21% μεγαλύτερη από τον μάρτυρα. Στις ίδιες συνθήκες η παραγωγικότητα του χειρισμού [-S+dcp] είναι μόλις 5% υψηλότερη από τον μάρτυρα.

Οι υπόλοιποι χειρισμοί κυμαίνονται κοντά στο μάρτυρα [control+dcp]. Η έλλειψη σιδήρου πέραν της επιρροής που ασκεί στην βιοσύνθεση των χλωροφυλλών και στο PSI, πιθανότατα επηρεάζει και τη βιοσύνθεση της υδρογενάσης, αφού η τελευταία χρησιμοποιεί ιόντα Fe για τη δόμηση και την λειτουργικότητα του ενεργού της κέντρου. Ίσως αυτός να είναι και ο



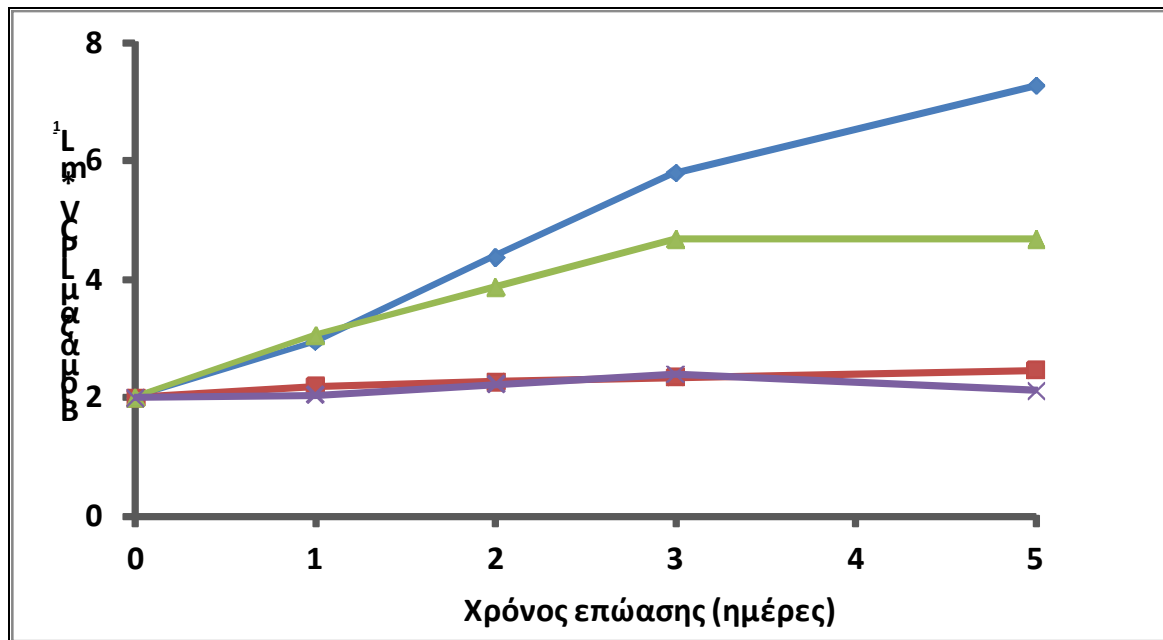
βασικότερος λόγος που ο χειρισμός με την έλλειψη σιδήρου έχει τη μικρότερη παραγωγικότητα σε υδρογόνο (**Εικόνα 20**).

Με στόχο της παρούσας διατριβής την βελτιστοποίηση της παραγωγής υδρογόνου από το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus*, ώστε να μελετηθεί ο μηχανισμός παραγωγής του αερίου, ο χειρισμός απουσία αζώτου παρουσία 2,3-dcp θα επιλεγεί για τη διεξαγωγή επιπλέον πειραμάτων.

### **3.2 Επίδρασης της έλλειψης του αζώτου στην παραγωγή υδρογόνου σε καλλιέργειες *Scenedesmus obliquus* παρουσία της 2,3-dcp.**

Στο προηγούμενο πείραμα παρατηρήθηκε μια ιδιαίτερα αυξημένη παραγωγή υδρογόνου [39% παραπάνω από τον μάρτυρα(control+dcp)] στον χειρισμό όπου το άζωτο απουσίαζε από το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης τους μικροφύκους [-N+dcp]. Επίσης η έλλειψη του στοιχείου αυτού δεν έδωσε σημαντικές αλλαγές στη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, σε σύγκριση πάντα με τον αντίστοιχο μάρτυρα [Control+dcp], γιατί η παρουσία της 2,3-dcp είχε καθολική επίδραση στην καλλιέργεια, με αποτέλεσμα η δράση του αζώτου να υπερκαλύπτεται από τη δράση της διχλωροφαινόλης. Σκοπός λοιπόν αυτού του πειράματος είναι η μελέτη της επίδρασης της απουσίας του N, ανεξάρτητα της επίδρασης της 2,3-dcp, στην παραγωγή του υδρογόνου. Για τον σκοπό αυτό αναπτύχθηκαν καλλιέργειες με και χωρίς άζωτο [N και -N αντίστοιχα], με και χωρίς 2,3-dcp [N+dcp και -N+dcp].

Η παρεμποδιστική δράση της 2,3-dcp στην ανάπτυξη, επαληθεύεται για ακόμα μία φορά (**Εικόνα 21**) ανεξάρτητα ή όχι από την παρουσία ή την απουσία του αζώτου στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας του χλωροφύκους. Αυτό που αξίζει να σημειωθεί είναι ότι απουσία της 2,3-dcp υπάρχει έντονη διαφορά στις καμπύλες ανάπτυξης μεταξύ της απουσίας [-N] και της παρουσίας του αζώτου[N]. Η διαφοροποίηση ξεκινά μετά την πρώτη ημέρα διεξαγωγής του πειράματος, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε χρήση αζώτου που πιθανόν να υπάρχει ακόμα στη μητρική καλλιέργεια. Η παρεμποδιστική δράση της απουσίας του αζώτου (με παράλληλη απουσία της dcp) γίνεται ορατή μετά την πρώτη ημέρα, φτάνοντας σε ποσοστό 35% την πέμπτη ημέρα του πειράματος, όπου οι καμπύλες ανάπτυξης του χλωροφύκους έχουν φτάσει στη φάση της στασιμότητας (**Εικόνα 21**).



**Εικόνα 21:** Κινητική ανάπτυξης του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*. Οι χειρισμοί ήταν : —◆— N, —■— N + dcp, —▲— -N, —×— -N + dcp.

Η συμπεριφορά αυτή ήταν αναμενόμενη δεδομένου ότι το άζωτο είναι σημαντικό στοιχείο για τη βιοσύνθεση των αμινοξέων και κατά συνέπεια την πρωτεϊνοσύνθεση, διαδικασίες οι οποίες παρέχουν τα δομικά υλικά για την κυτταροδιαίρεση.

Η φωτοσυνθετική δραστηριότητα φαίνεται να επηρεάζεται την πρώτη ημέρα της απουσίας αζώτου (Πίνακας 6). Σε συνθήκες απουσίας αζώτου παρατηρείται μείωση στην φωτοσυλλεκτική κεραία (ABS/RC), με ταυτόχρονη αύξηση των ενεργών κέντρων αντίδρασης (RC/CS<sub>0</sub>), γεγονός που οδηγεί σε μείωση της ενέργειας που χάνεται με την μορφή θερμότητας (Dio/RC). Οι χειρισμοί με την παρουσία της διχλωροφαινόλης [N+dcp] και [-N+dcp] εμφανίζουν τα αποτελέσματα της τοξικότητας της 2,3-dcp με πολύ χαμηλό δείκτη φωτοσυνθετικής απόδοσης F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> και με τους άλλους δείκτες σε ακραίες τιμές ή μη ανιχνεύσιμες τιμές. Σε κάθε περίπτωση γίνεται σαφές πως τόσο η διχλωροφαινόλη όσο και η απουσία του αζώτου δημιουργούν αλλαγές στη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

**Πίνακας 6.** Παράμετροι φωτοσυνθετικής απόδοσης του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* κατά την πρώτη ημέρα διεξαγωγής του πειράματος. σε ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Fv/Fm: φωτοσυνθετική απόδοση, ABS/RC: μέγεθος λειτουργικής φωτοσυνθετικής κεραίας, D1o/RC: ενέργεια που διαχέεται με την μορφή θερμότητας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης, RC/CSo: πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης, nd: no detected

#### Ημέρα 1

	Fv/Fm	ABS/RC	D1o/RC	RC/CSo
<b>N</b>	0,442	3,25	1,86	25,79
<b>-N</b>	0,446	2,12	1,19	34,29
<b>N+dcp</b>	0,089	19,97	18,19	6,65
<b>-N+dcp</b>	0,083	nd	nd	nd

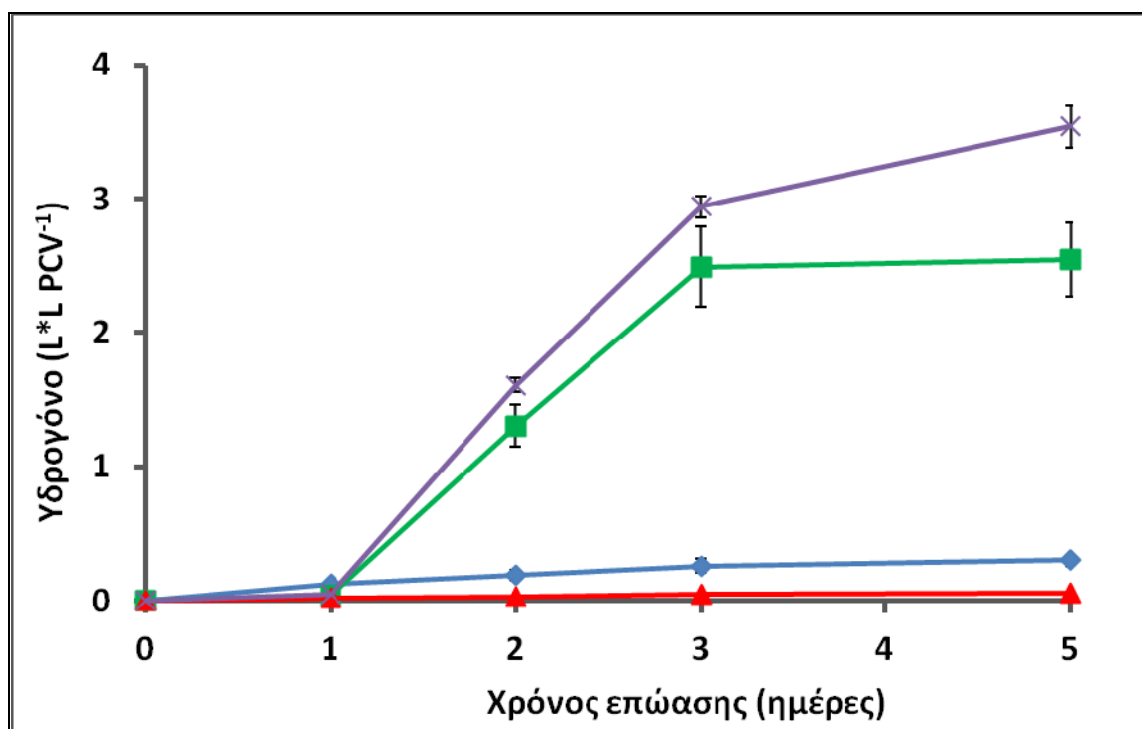
Όσον αφορά στην παραγωγή του  $\text{H}_2$  (**Εικόνα 22**) διακρίνονται δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα συνιστάται από τους χειρισμούς που δεν έχουν 2,3-dcp [N και -N] στους οποίους η παραγωγή του υδρογόνου δεν ξεπερνά τα 0,3 L/L PCV, ενώ η δεύτερη ομάδα αποτελείται από τους χειρισμούς που περιλαμβάνουν 2,3-dcp [N+dcp και -N+dcp] οι οποίοι παρουσιάζουν εξαιρετικά μεγάλες τιμές παραγόμενου υδρογόνου (> 2 L/L PCV).

Να σημειωθεί εδώ πως προκύπτει μια διαφοροποίηση στις τιμές του παραγόμενου υδρογόνου από τον χειρισμό [N] (ή αλλιώς [control]) σε σχέση με τα αποτελέσματα της Παραζι (2009). Οι μεγαλύτερες ποσότητες παραγόμενου υδρογόνου που παρατηρούμε στον χειρισμό αυτό, οφείλονται στο γεγονός ότι οι καλλιέργειες μας ξεκινούν με τετραπλάσια συγκέντρωση κυττάρων σε σχέση με της Παραζι (2009), με αποτέλεσμα την ταχύτερη εγκαθίδρυση ανοξικών συνθηκών, που με την σειρά τους ευνοούν την παραγωγή υδρογόνου.

Μεγάλης σημασίας είναι η παρατήρηση ότι μεταξύ των χειρισμών [N+dcp] και [-N+dcp] υπάρχει έντονη διαφοροποίηση ως προς το παραγόμενο υδρογόνο αφού την πέμπτη ημέρα είναι κατά 39% περισσότερο.

Αξίζει να σημειώσουμε πως έχει αποδειχθεί ότι σε συνθήκες έλλειψης αζώτου υπάρχει δραματική αύξηση των λιπαρών (Richardson et al., 1969; Zhila et al., 2005; Karamalaki,

2011). Αυτό σε συνδυασμό με την λιπόφιλη φύση των φαινολικών ενώσεων γεννά τις υποψίες για είσοδο μεγαλύτερης ποσότητας φαινόλης στον χειρισμό [-N+dcp],σε σύγκριση με τον χειρισμό [N+dcp], γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει και τη μεγαλύτερη παραγωγή H<sub>2</sub> στον [-N+dcp] σε σύγκριση με τον[N+dcp]. Αντίθετα απουσία της 2,3-dcp, ο χειρισμός που αντιστοιχεί στο θρεπτικό χωρίς άζωτο εμφανίζει πολύ μικρότερη παραγωγή H<sub>2</sub> (80%) σε σύγκριση με τον χειρισμό [N] (Εικόνα 22).



**Εικόνα 22:** Κινητική παραγωγής υδρογόνου του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*. Οι χειρισμοί ήταν: —♦— N, —■— N+dcp, —▲— -N, —×— -N+dcp.

Αυτό λοιπόν που πρέπει να επισημάνουμε είναι ότι η παρουσία της 2,3-dcp και η απουσία του αζώτου [-N+dcp] ευνοούν την παραγωγή του αερίου H<sub>2</sub> στις συνθήκες του πειράματος, αφού το παραγόμενο υδρογόνο είναι 56 φορές περισσότερο σε σύγκριση με τον χειρισμό [-N]. Αντίστοιχα στους χειρισμούς [N] και [N+dcp] παρατηρείται πως η προσθήκη της 2,3-dcp οδηγεί σε 8 φορές μεγαλύτερη παραγωγή υδρογόνου. Αξίζει να σημειωθεί πως η απουσία αζώτου όταν συνδυάζεται με απουσία της φαινολικής ένωσης [-N], οδηγεί το χλωροφύκος σε σχεδόν μηδενική παραγωγή H<sub>2</sub>, ενώ όταν συνδυάζεται με παρουσία της 2,3-dcp οδηγεί το μικροφύκος στην μέγιστη παραγωγή υδρογόνου (Εικόνα 22). Φαίνεται λοιπόν ότι λαμβάνει χώρα κάποια αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των μεταχειρίσεων, απουσία αζώτου και παρουσία dcp, που ενεργοποιεί τους μηχανισμούς εκείνους, που μεγιστοποιούν την παραγωγή του H<sub>2</sub>.

Οι Peltier and Schmidt, (1991) απέδειξαν ότι η δραστική μείωση του αζώτου στο θρεπτικό του μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* ενισχύει την αναπνοή έως και 3 φορές περισσότερο σε σχέση με τον μάρτυρα, αυξάνει δραματικά τη χλωροαναπνοή, μειώνει το LHClI και παράλληλα καταστέλλει το LHCl. Αναλυτικότερα παρατήρησαν πως στα κύτταρα που μεγάλωσαν με συνθήκες πολύ χαμηλής συγκέντρωσης αζώτου, παρατηρήθηκε αύξηση της αναπνοής, οφειλόμενη εν μέρει στην κατά 30% αύξηση της χλωροαναπνοής, αλλά και στην συνολική αύξηση της μιτοχονδριακής αναπνοής. Επιπροσθέτως η διαδικασία της χλωροαναπνοής διατηρεί την δεξαμενή της πλαστοκινόνης ανηγμένη με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται ένας μηχανισμός αναδιοργάνωσης των LHCs, με έντονη μετανάστευση LHCs από το PSII στο PSI (state 2).

Η αύξηση της αναπνοής σε συνδυασμό με την σταδιακή απενεργοποίηση του PSII θα μπορούσαν να αποτελέσουν σημαντικούς λόγους για μία υψηλή επερχόμενη παραγωγή H<sub>2</sub>. Όμως η έλλειψη αζώτου προκαλεί παράλληλη καταστολή του LHCl, γεγονός που εμποδίζει την ροή των ηλεκτρονίων και κατ' επέκταση την παραγωγή βιο-υδρογόνου. Αυτός μάλλον είναι και ο πιθανότερος λόγος που η παραγωγή H<sub>2</sub> στο [-N] είναι σχεδόν μηδενική.

Ενισχυμένη αναπνοή παρατηρήθηκε και από την Parazi (2009), σε πειράματα βιοαποικοδόμης meta υποκατεστημένων διχλωροφαινολών από το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus* σε καλλιέργειες [N +dcp]. Η παρουσία της 2,3-dcp όμως, δε φάνηκε να ενισχύει συγκεκριμένα την χλωροαναπνοή, αλλά τις άλλες οξειδάσες [εναλλακτική οξειδάση (AOX) και κυτοχρωμική οξειδάση (COX)] με συνέπεια την αύξηση της συνολικής κατανάλωσης οξυγόνου. Επιπροσθέτως μηδενική ήταν η φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου μετά από 24 ώρες επώασης παρουσία της 2,3-dcp. Από αναλύσεις western blot των ανοσοενεργών πρωτεϊνών των κέντρων αντίδρασης των φωτοσυστημάτων PSI (PSaA) και PSII (D1), είναι εμφανές ότι η παρουσία της 2,3-dcp οδηγεί σε υπερέκφραση του PSI σε σχέση με τον μάρτυρα ενώ το PSII υποεκφράζεται, γεγονός που συμφωνεί με τους (Peltier and Schmidt, 1991).

### 3.3 Αλληλεπίδραση της 2,3-dcp με την περίσσεια συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών στην παραγωγή υδρογόνου.

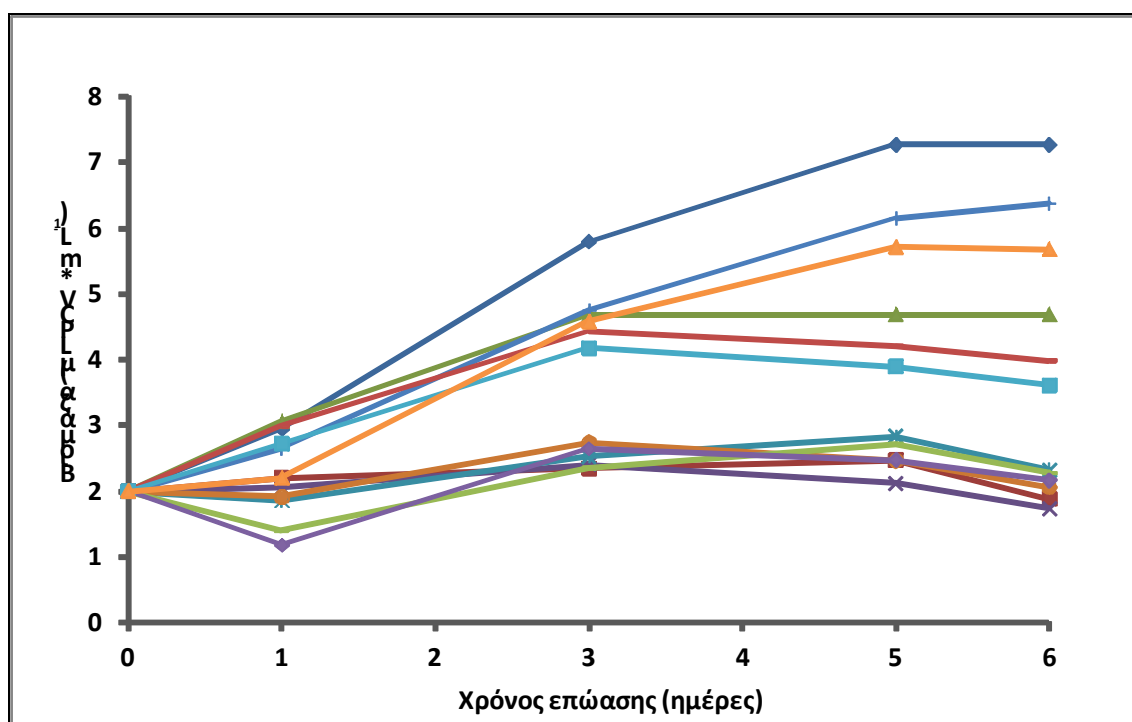
Από τις καμπύλες κινητικής της ανάπτυξης του *Scenedesmus obliquus* των προηγούμενων πειραμάτων παρατηρείται πως μετά την πέμπτη ημέρα το μικροφύκος εισέρχεται σε μια στατική φάση, όπου ο πληθυσμός στην καλλιέργεια διατηρείται σταθερός. Η ίδια στατική φάση παρατηρείται και στις καμπύλες παραγωγής υδρογόνου. Η πιθανότερη αιτία για αυτές τις παρατηρήσεις είναι η εξάντληση ενός ή περισσοτέρων θρεπτικών ουσιών του διαλύματος δεδομένου του περιορισμένου όγκου του διαλύματος που περιέχει κάθε μπουκάλι (50mL). Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να θέσει υπό αμφισβήτηση τις μέγιστες τιμές του υδρογόνου κατά την πέμπτη ημέρα, καθώς επιπλέον της αρχικής έλλειψης που έχει επιλεγεί για τον χειρισμό παρουσιάζονται νέες ελλείψεις από την εξάντληση των υπολοίπων θρεπτικών, οπότε η παραγωγή υδρογόνου θα μπορούσε να φτάνει σε υψηλότερα από τα πραγματικά επίπεδα.

Για να μπορέσει να συσχετιστεί με ασφάλεια ο αντίκτυπος της έλλειψης ενός θρεπτικού συστατικού στην παραγωγή υδρογόνου, θα πρέπει να εξασφαλιστεί η επάρκεια στα υπόλοιπα θρεπτικά συστατικά του διαλύματος για χρονικό διάστημα μέχρι ή και πέραν της πέμπτης ημέρας, γεγονός που αποτέλεσε και στόχο του νέου πειράματος. Η ανατροφοδότηση του ερμητικά κλειστού δοχείου με επιπλέον θρεπτικό απορρίφθηκε λόγω της μεγάλης πιθανότητας μόλυνσης του συστήματος, αντί αυτού επιλέχθηκε να προστεθεί περίσσεια θρεπτικών εξ' αρχής μέσα στο μπουκάλι κάθε χειρισμού.

Για τις ανάγκες του πειράματος αναπτύχθηκαν καλλιέργειες με και χωρίς άζωτο (N, -N) σε συνδυασμό με και χωρίς 2,3-dcp (N+dcp, -N+dcp). Για τους χειρισμούς αυτούς χρησιμοποιήθηκε κανονική, διπλάσια (2N, -2N, 2N+dcp, -2N+dcp) και τετραπλάσια συγκέντρωση (4N, -4N, 4N+dcp, -4N+dcp) θρεπτικού διαλύματος, λαμβάνοντας κάθε φορά υπόψη την επιθυμητή έλλειψη και διατηρώντας τον όγκο του διαλύματος και την συγκέντρωση της φαινολικής ένωσης αμετάβλητα. Για παράδειγμα ο χειρισμός [-4N+dcp] διατηρεί την έλλειψη αζώτου και την παρουσία dcp, μα φέρει όλα τα άλλα θρεπτικά συστατικά σε συγκέντρωση 4 φορές πάνω από το κανονικό θρεπτικό διάλυμα που χρησιμοποιούταν έως τώρα [-N+dcp].

Από την **Εικόνα 23** της κινητικής της ανάπτυξης τους μικροφύκους ξεχωρίζουν δύο ομάδες. Την πρώτη ομάδα συνιστούν οι χειρισμοί απουσία της 2,3-dcp, οι οποίοι ομαδοποιούνται μαζί μιας και παρουσιάζουν αύξηση της βιομάζας τους από 2 έως 4 φορές σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση των κυττάρων κατά τη μέρα 0 (έναρξη πειράματος), ενώ τη δεύτερη ομάδα συνιστούν όλοι οι χειρισμοί παρουσία της διχλωροφαινόλης (2,3-dcp).

Αναλυτικότερα η μεγαλύτερη αύξηση της βιομάζας παρατηρείται στον χειρισμό [N] όπου η συγκέντρωση των κυττάρων του αυξάνει κατά 3,5 φορές, σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση. Ακολουθεί ο χειρισμός με την διπλή περίσσεια θρεπτικών [2N] με αύξηση περίπου 3 φορές και ο χειρισμός με την τετραπλή περίσσεια [4N] με αντίστοιχη αύξηση περί των 2,5 φορές. Είναι προφανές, από τις καμπύλες της **Εικόνας 23**, πως η περίσσεια θρεπτικών επηρεάζει αντιστρόφως ανάλογα την ανάπτυξη, αφού όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των θρεπτικών στο διάλυμα, τόσο μειώνεται η τελική συγκέντρωση των κυττάρων του κάθε χειρισμού κατά το τέλος του πειράματος. Φαίνεται λοιπόν πως η περίσσεια των θρεπτικών αλάτων αποτελεί ένα στρεσογόνο και κατασταλτικό παράγοντα για την ανάπτυξη του μικροφύκους.



**Εικόνα 23:** Κινητική ανάπτυξης του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*. Οι χειρισμοί ήταν: N, N+dcp, -N, -N+dcp, 2N+dcp, -2N+dcp, 2N, -2N, 4 N+dcp, - 4N+dcp, -4N, 4N.

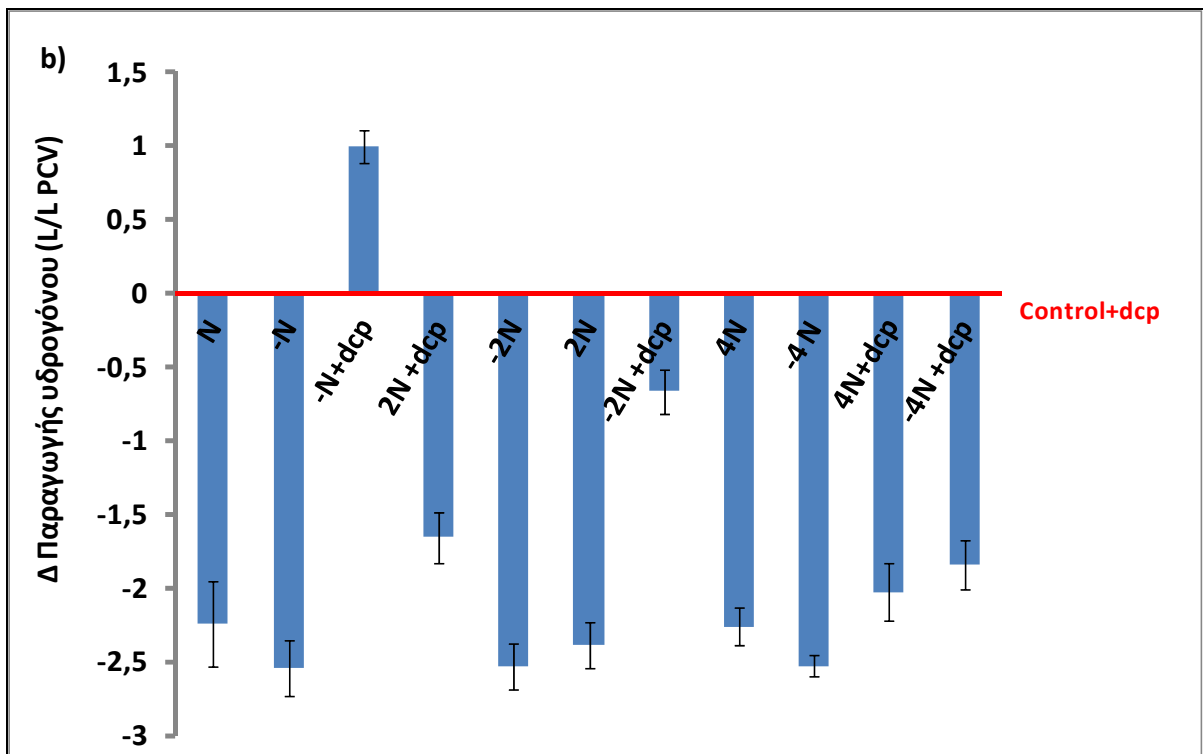
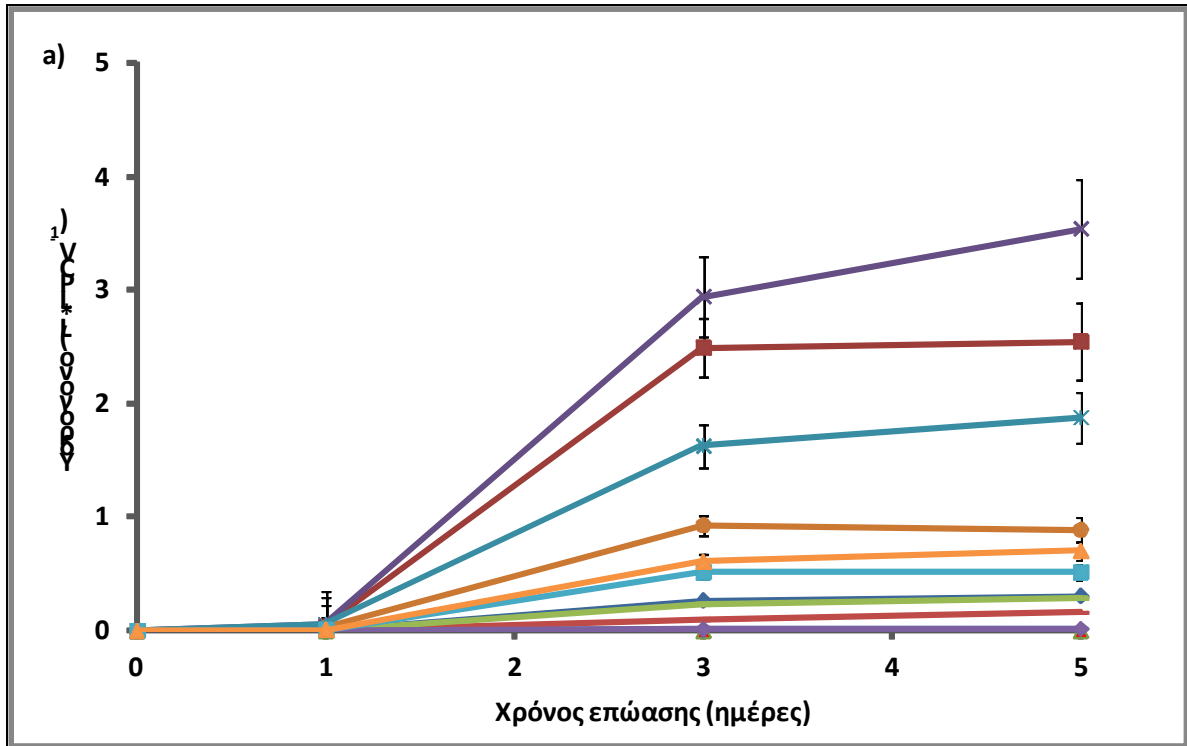
Αυτό που αξίζει να σημειωθεί είναι πως η καμπύλη ανάπτυξης του χειρισμού με την απουσία αζώτου [-N] παρατηρείται χαμηλότερα από αυτήν του χειρισμού με την τετραπλάσια συγκέντρωση θρεπτικών [4N]. Για άλλη μια φορά γίνεται εμφανής η σπουδαιότητα του αζώτου για την ανάπτυξη του μικροφύκου, αφού η απουσία του μακροστοιχείου αυτού από τον χειρισμό [-N] οδηγεί σε μείωση της ανάπτυξης κατά 35% σε σχέση με τον χειρισμό με το πλήρες θρεπτικό διάλυμα [N] κατά την 5<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος. Με περαιτέρω πτωτική πορεία στην ανάπτυξη ακολουθούν οι χειρισμοί [-2N] και [-4N] αντίστοιχα, αποδεικνύοντας για άλλη μία φορά ότι η περίσσεια των θρεπτικών αποτελεί στρεσογόνο και κατασταλτικό παράγοντα ανάπτυξης για το διάστημα των 5 ημερών.

Τέλος οι χειρισμοί παρουσία της 2,3-dcp παρουσιάζουν παρεμποδιστική τάση ανεξάρτητα της όποιας περιόδου θρεπτικών. Η απουσία διαφοροποιήσεων σε αυτή την ομάδα χειρισμών φανερώνει την τοξικότητα της φαινολικής ένωσης, η οποία υπερκαλύπτει οποιοδήποτε άλλη καταπόνηση δημιουργεί η έλλειψη κάποιου θρεπτικού στοιχείου ή/και η αυξημένη συγκέντρωση θρεπτικών, γεγονός που αποδείχθηκε και στα προηγούμενα δύο πειράματα όπου έγινε λόγος για την καθολική δράση της 2,3- dcp.

Στην παραγωγή υδρογόνου στην **Εικόνα 24** διακρίνονται 3 χειρισμοί [-N+dcp, N+dcp, -2N +dcp] με παραγωγή μεγαλύτερη από 2 L υδρογόνου/L PCV, ενώ οι υπόλοιποι χειρισμοί έχουν παραγωγή μικρότερη ή ίση με 1 L υδρογόνου/L PCV. Η μεγαλύτερη παραγωγή υδρογόνου παρατηρείται στον χειρισμό απουσία αζώτου και παρουσία της διχλωροφαινόλης [-N+dcp] όπως αποδείχθηκε και σε προηγούμενα πειράματα. Η επώαση του χειρισμού για 5 ημέρες οδηγεί στην μέγιστη παραγωγή υδρογόνου στα 3,5 L υδρογόνου/L PCV, τη στιγμή που ο χειρισμός [N+dcp] φτάνει μόλις τα 2,5 L υδρογόνου/L PCV. Η αύξηση της τάξης του 39% επιβεβαιώνει για άλλη μια φορά τα προηγούμενα πειράματα.

Επίσης αξίζει να παρατηρήσουμε ότι πάντα ο χειρισμός [-N+dcp] παράγει περισσότερο H<sub>2</sub> σε σύγκριση με τον [N+dcp] είτε πρόκειται για μονά, είτε για διπλά, είτε για τετραπλά θρεπτικά κατά την εκκίνηση του πειράματος, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην υπόθεση που έγινε για τα αυξημένα λιπαρά των καλλιεργειών που αναπτύσσονται απουσία αζώτου (Richardson et al., 1969; Zhila et al., 2005; Karamalaki, 2011).





**Εικόνα 24:** a) Κινητική παραγωγή υδρογόνου του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*. Οι χειρισμοί ήταν: — N, — N+dcp, — -N, — -N+dcp, — 2N+dcp, — -2N, — 2N, — -2N+dcp, — 4N, — -4N, — 4N+dcp, — -4N+dcp. b) Διαφορές στην παραγωγή υδρογόνου των χειρισμών από τον μάρτυρα **Control+dcp** εκφρασμένες σε απόλυτες τιμές.

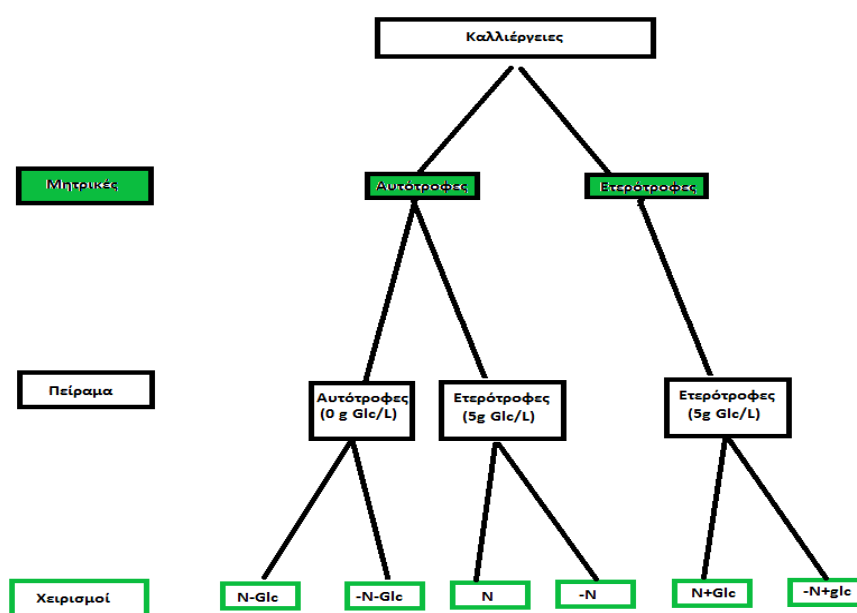
Στη συνέχεια ακολουθεί ο χειρισμός με την απουσία αζώτου, παρουσία dcp με τη διπλάσια συγκέντρωση των υπολοίπων θρεπτικών[-2N+dcp] με παραγωγή υδρογόνου 1,87 L /L PCV μικρότερη κατά περίπου 50%, σε σχέση με τον αντίστοιχο χειρισμό με την κανονική συγκέντρωση θρεπτικών[-N+dcp]. Φαίνεται πως η προσθήκη διπλάσιας συγκέντρωσης θρεπτικών για την αντιστάθμιση της πιθανής έλλειψης από εξάντληση του θρεπτικού μέσου, κατά την πέμπτη ημέρα, επηρεάζει σημαντικά την φωτοχημική παραγωγή του υδρογόνου, προκαλώντας ένα επιπρόσθετο στρες πέραν της παρουσίας της διχλωροφαινόλης, του οποίου η συνεργιστική και κατασταλτική δράση απεικονίζεται και στο μηχανισμό παραγωγής υδρογόνου εκτός από την ανάπτυξη (Εικόνα 23). Παράλληλα αξίζει να παρατηρηθεί ότι ο χειρισμός [-2N+dcp] παράγει 1,87 L υδρογόνου /L PCV, ενώ ο [2N+dcp] 0,89 L υδρογόνου /L PCV, δηλαδή υπάρχει συγκριτικά αύξηση της τάξης του 110% περίπου. Ανάλογη τάση παρατηρείται και στα τετραπλά θρεπτικά όπου ο χειρισμός [-4N+dcp] παράγει 0,7 L υδρογόνου /L PCV, περισσότερο από τον [4N+dcp] με παραγωγή υδρογόνου 0,51L /L PCV και εδώ παρατηρούμε μια αύξηση της τάξης του 40%

### **3.4 Επίδραση της παρουσίας της γλυκόζης από τις μητρικές καλλιέργειες στην παραγωγή υδρογόνου.**

Στα προηγούμενα πειράματα έγινε σαφές πως απουσία πηγής αζώτου στο θρεπτικό διάλυμα του *Scenedesmus obliquus* και παρουσία της ένωσης 2,3-dcp σε ένα ερμητικά κλειστό περιβάλλον, δύναται να παραχθούν σημαντικές ποσότητες υδρογόνου με παραγωγή περί των 3,5 λίτρων υδρογόνου ανά λίτρο πακεταρισμένων κυττάρων (PCV). Η γρήγορη αναεροβίωση που εγκαθίσταται λόγω της αυξημένης αναπνοής που δημιουργεί η παρουσία της γλυκόζης στο μέσο καλλιέργειας, η παρουσία της διχλωροφαινόλης (Parazi, 2009) και η απουσία πηγής αζώτου (Peltier and Schmidt, 1991), δημιουργούν τις ιδανικές συνθήκες για τη λειτουργία της υδρογενάσης. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα στο εισαγωγικό μέρος, η έναρξη της παραγωγής υδρογόνου φαίνεται πως αποτελεί ένα έκτακτο μηχανισμό παραγωγής ενέργειας (ATP), που θα χρειαστεί το μικροφύκος για να καλύψει τις αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις του για την αποικοδόμηση της τοξικής φαινολικής ένωσης, αλλά και μία σανίδα σωτηρίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Η σύλληψη αυτού του πειράματος έγινε σε μια προσπάθεια να «ντοπαριστεί» το κύτταρο με επιπλέον ενέργεια, αποθηκευμένη υπό την μορφή αμύλου, ώστε να ανταπεξέλθει

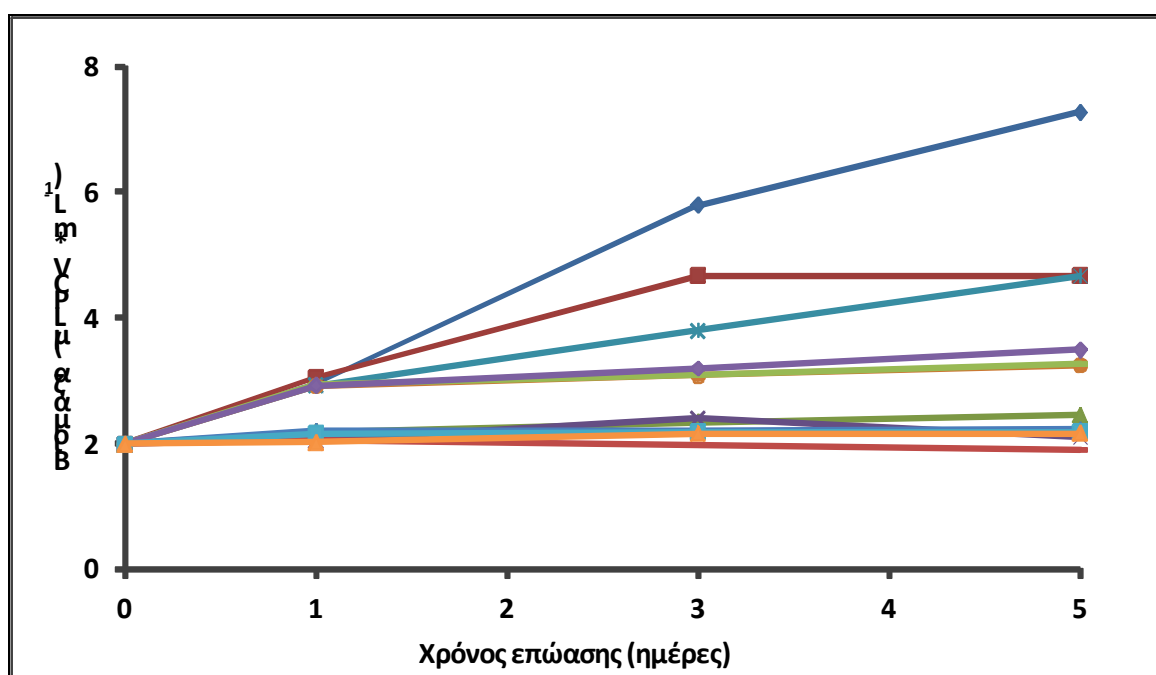
καλύτερα στην ενεργειοβόρα διαδικασία της βιοαποικοδόμησης. Επιπλέον ελήφθη υπόψιν πως η παρουσία αμύλου μπορεί να τροφοδοτήσει με αναγωγικά μόρια τη φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο επίπεδο της πλαστοκινόνης, ενισχύοντας έτσι την κυκλική ροή ηλεκτρονίων και ευνοώντας την παραγωγή ενέργειας (Gfeller and Gibbs, 1984). Για τις ανάγκες του πειράματος οι μητρικές καλλιέργειες μεγάλωσαν με προσθήκη γλυκόζης (5g/L) στο θρεπτικό τους διάλυμα και αφέθηκαν στο ενυδρείο για 5 ημέρες όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι ώστε αυξηθεί η συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού αμύλου. Ταυτόχρονα μπήκαν και χειρισμοί από αυτότροφες μητρικές καλλιέργειες ως μάρτυρες. Οι χειρισμοί παρουσιάζονται αναλυτικά στην [Εικόνα 25](#) που ακολουθεί



**Εικόνα 25 :** Σχεδιάγραμμα απεικόνισης όλων των χειρισμών καθώς και της προέλευσης τους. Οι χειρισμοί με το σύμβολο –Glc είναι απουσία γλυκόζης, με το +Glc είναι παρουσία 5g γλυκόζης/L, ενώ οι χειρισμοί χωρίς σύμβολο είναι μεγαλωμένοι όπως αναγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι.

Η παρουσία της γλυκόζης στα κύτταρα των μικτότροφων καλλιεργειών θα αναμενόταν να δίνει ένα ενεργειακό προβάδισμα που θα εκμεταλλευόταν το μικροφύκος για την ανάπτυξη του, ωστόσο στην [Εικόνα 26](#) παρατηρείται πως τόσο οι χειρισμοί [N+glc] και [-N+glc], όσο και οι χειρισμοί [N +dcr+glc] και [- N+dcr+glc] χαρακτηρίζονται από σημαντικά μικρότερη ανάπτυξη από τους αντίστοιχους χειρισμούς που προέρχονται από αυτότροφες καλλιέργειες.

Η βιομάζα του χειρισμού [N+glc], που προερχεται από την μικτότροφη με γλυκόζη μητρική καλλιέργεια, εμφανίζεται μειωμένη κατά περίπου 35% την τελευταία ημέρα του πειράματος σε σχέση με αυτή του χειρισμού από την αυτότροφη καλλιέργεια [N]. Μειωμένη εμφανίζεται κατά 30 % και η βιομάζα του χειρισμού [-N + glc] σε σχέση με τον χειρισμό μάρτυρα[-N]. Οι παραπάνω παρατηρήσεις εγείρουν το ερώτημα για το αν το μικροφύκος επενδύει την ενέργεια που του παρέχει η γλυκόζη σε άλλες διεργασίες όπως στη παραγωγή υδρογόνου και στην βιοαποικοδόμηση της 2,3-dcp, έναντι της ανάπτυξης του.



**Εικόνα 26:** Κινητική ανάπτυξης του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*,. Οι χειρισμοί αναλυτικά: ◆ N, ■ -N, ▲ N+dcp, ■ -N+dcp, ✱ N+glc, ▲ -N+glc, — N+glc+dcp, — -N+glc+dcp, — N-glc, — -N-glc, — N-glc+dcp, — -N-glc+dcp.

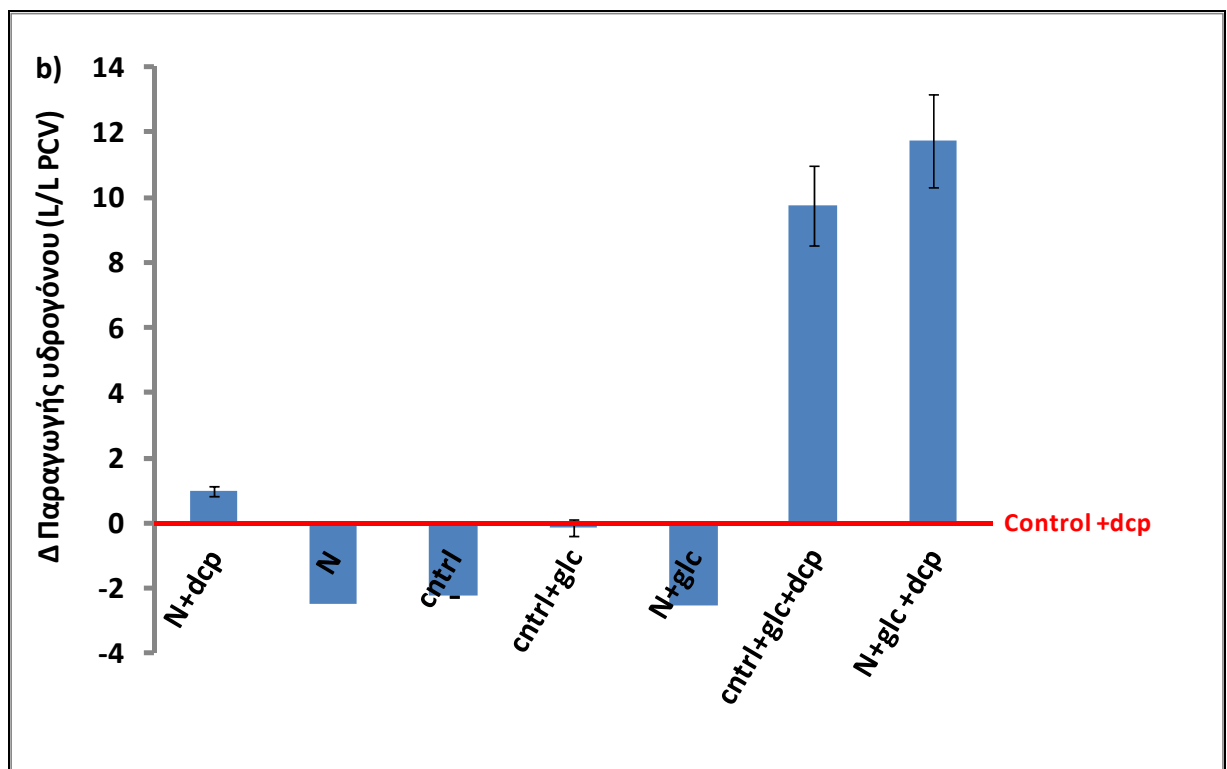
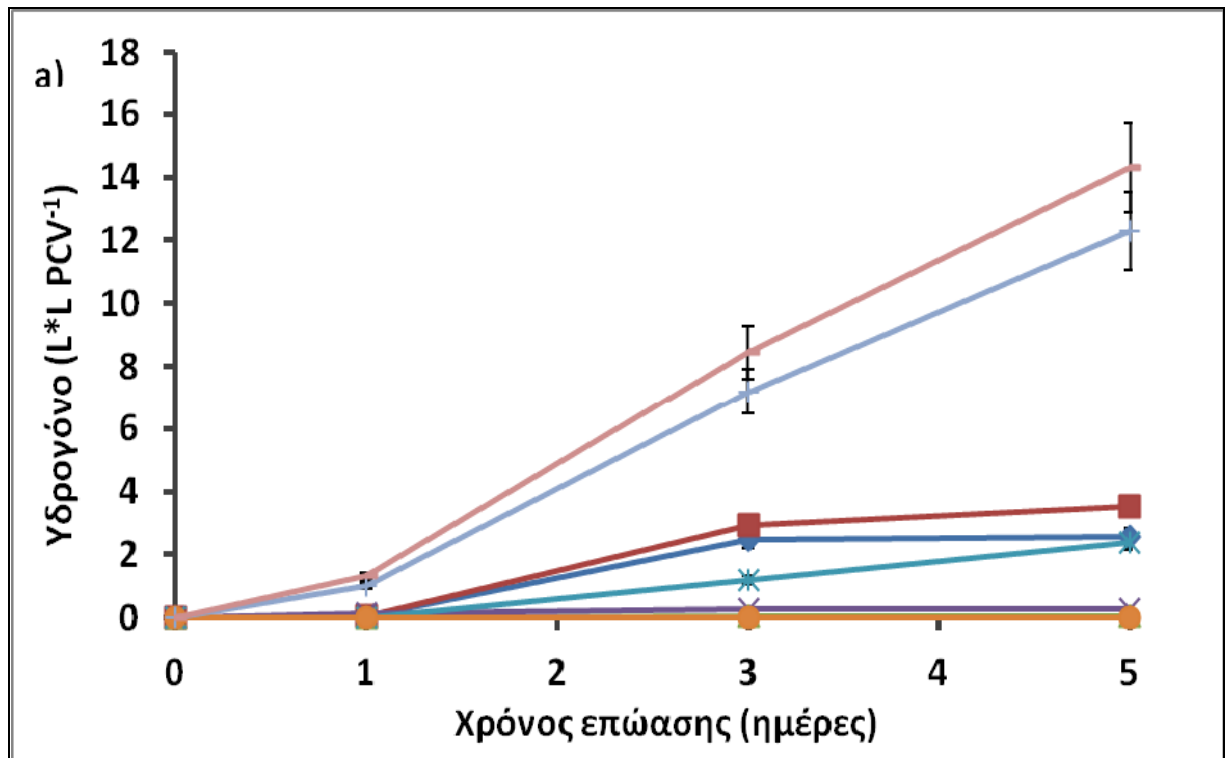
Στους χειρισμούς παρουσία της διχλωροφαινόλης δεν παρατηρούνται αποκλίσεις στις καμπύλες ανάπτυξής τους μίας και αυτές συμφωνούν με τα προηγούμενα πειράματα γεγονός που επαληθεύει και πάλι την καθολική δράση της διχλωροφαινόλης στην ανάπτυξη. Οι χειρισμοί που προήλθαν από αυτότροφες μητρικές καλλιέργειες, [N], [N+dcp],[ -N] και [ -N+dcp] και κατέληξαν σε μικτότροφες σχολιάστηκαν αναλυτικά σε προηγούμενα πειράματα.

Η απουσία της γλυκόζης στους χειρισμούς που προήλθαν από αυτότροφες μητρικές καλλιέργειες και κατέληξαν σε αυτότροφες στα μπουκάλια όπως φαίνεται στην **Εικόνα 26**

εμφανίζουν μειωμένη ανάπτυξη. Χαρακτηριστικά οι χειρισμοί [N-glc] και [-N-glc] εμφανίζουν μείωση στην ανάπτυξη της τάξης του 55% και 25 % αντίστοιχα σε σύγκριση με τους χειρισμούς [N] και [-N] αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την αναγκαιότητα μιας εξωγενούς πηγής άνθρακα όπως η γλυκόζη για την ομαλή ανάπτυξη των μικροφυκών στις συνθήκες των σφραγισμένων μπουκαλιών. Οι χειρισμοί [N-glc+dcp] και [-N-glc+dcp] παρουσιάζουν χαρακτηριστική καμπύλη ανάπτυξης όπως παρουσιάστηκε και σε προηγούμενα πειράματα. Η κατασταλτική δράση της 2,3 -dcp γίνεται και εδώ εμφανής ανεξάρτητα με την παρουσία ή απουσία της γλυκόζης στο τελικό θρεπτικό διάλυμα.

Η παρουσία της γλυκόζης φαίνεται να επηρεάζει θετικά και την παραγωγή υδρογόνου (Εικόνα 27). Η μέγιστη παραχθεσα ποσότητα υδρογόνου ,του χειρισμού με την απουσία αζώτου και παρουσία γλυκόζης[-N+glc+dcp], εμφανίζεται αυξημένη κατά 300 % σε σύγκριση με τον αντίστοιχο χειρισμό [-N+dcp]. Αναλυτικά, ενώ στα προηγούμενα πειράματα η μέγιστη παραγωγή υδρογόνου δεν ξεπερνούσε τα 3,5 L υδρογόνου /L PCV η εξ αρχής ύπαρξη της γλυκόζης φαίνεται πως ευνοεί την παραγωγή H<sub>2</sub>, αφού φτάνει κατά την πέμπτη ημέρα τα 14 L υδρογόνου /L PCV! Θετική είναι η επίδραση της γλυκόζης και στον χειρισμό [N+glc+dcp] μίας και σημειώνεται αύξηση της παραγωγής κατά 380% (12,3 L υδρογόνου /L PCV) σε σχέση με τον αντίστοιχο χειρισμό μάρτυρα απουσία γλυκόζης [N+dcp] (2,55 L υδρογόνου /L PCV).

Χαρακτηριστικό είναι στην Εικόνα 27 ότι η παραγωγή υδρογόνου φαίνεται να ξεκινάει νωρίτερα στους χειρισμούς [N+glc+dcp] και [-N+glc+dcp] από ότι συνήθως μιας και από την ημέρα έναρξης του πειράματος παρατηρείται παραγωγή υδρογόνου. Οι παρατηρήσεις αυτές φαίνεται να οφείλονται στην έντονη αναπνευστική δραστηριότητα που προκαλεί τόσο η εξ αρχής παρουσία της γλυκόζης, αλλά και η μετέπειτα δράση της διχλωροφαινόλης . Με άλλα λόγια η ταχεία κατανάλωση του οξυγόνου του συστήματος και η εγκαθίδρυση ανοξικών συνθηκών φαίνεται να δίνουν την ευκαιρία στο μικροφύκος να ξεκινήσει νωρίτερα την παραγωγή υδρογόνου και έτσι ενώ την πρώτη ημέρα η παραγωγή υδρογόνου είναι σχεδόν μηδενική για τους περισσότερους χειρισμούς, οι χειρισμοί [N+glc+dcp] και [-N+glc+dcp] έχουν παράξει 1 και 1,3 L υδρογόνου /L PCV αντίστοιχα. Οι διαφορές αυτές, δεδομένου ότι η παραγωγή του υδρογόνου σχετίζεται άμεσα με την βιοαποικοδόμηση της διχλωροφαινόλης, είναι πιθανόν να οφείλονται και σε αυξημένη ικανότητα βιοαποικοδόμησης των κυττάρων με τα αποθέματα γλυκόζης έναντι με αυτά των αυτότροφων καλλιεργειών.



**Εικόνα 27:** a) Κινητική παραγωγή υδρογόνου του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*. Οι χειρισμοί αναλυτικά: —●— N+dcp, —■— -N+dcp, —▲— -N, —×— N, —\*— N+glc, —●— N, —■— N+glc+dcp, —■— - N+glc+dcp. b) Διαφορές στην παραγωγή υδρογόνου των χειρισμών από τον μάρτυρα **Control+dcp** εκφρασμένες σε απόλυτες τιμές.

Αυτή η υπόθεση στηρίζεται βιβλιογραφικά στην θεωρία του Sandermann (1992) που περιγράφει πως η γλυκόζη είναι ένα σημαντικό υπόστρωμα για την βιοαποικοδόμηση ξενοβιοτικών ουσιών στα φυτά, η οποία σύμφωνα με την ίδια θεωρία λαμβάνει μέρος σε αντιδράσεις συμπλοκοποίησης των ξενοβιοτικών ενώσεων (Φάση II κατά την βιοαποικοδόμηση). Έχει αποδειχθεί ότι η 2,3-dcp βιοαποικοδομείται μέσω του ίδιου μηχανισμού (Parazi, 2009). Έτσι η ύπαρξη της γλυκόζης από τις μητρικές καλλιέργειες δίνει στα κύτταρα την δυνατότητα να ξεκινήσουν δυναμικότερα και ταχύτερα τη βιοαποικοδόμηση της 2,3-dcp και επομένως την ταχεία εκκίνηση της παραγωγής  $H_2$ .

Αυξημένη κλίση στις καμπύλες κινητικής της παραγωγής υδρογόνου παρατηρείται και από την πρώτη στην τρίτη ημέρα στους χειρισμούς παρουσία γλυκόζης. Η δυνατότητα των κυτταρικών ενεργειακών αποθεμάτων, όπως το άμυλο, να τροφοδοτούν με αναγωγικά κατά των μεταβολισμό τους το κύτταρο, τα οποία μπορούν και ανάγουν την πλαστοκινίνη, έχουν σαν αποτέλεσμα την ενίσχυση της κυκλικής ροής ηλεκτρονίων (Gfeller and Gibbs, 1984). Η παραπάνω υπόθεση σε συνδυασμό με μία αναμενόμενη ταχύτερη εγκαθίδρυση ανοξίας, λόγω των εξ αρχής μικτότροφων καλλιεργειών, πιθανότατα να αποτελούν την εξήγηση για την ενισχυμένη παραγωγή υδρογόνου. Από την τρίτη μέρα και έπειτα παρατηρείται μικρότερη κλίση στην παραγωγή υδρογόνου που πιθανόν να οφείλεται, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, στην στρατηγική που ακολουθεί το φύκος να αλλάζει το βιοχημικό προφίλ των διεργασιών του από την παραγωγή του υδρογόνου, στην βιοαποικοδόμηση και την ανάπτυξη, ανάλογα με το ενεργειακό του ισοζύγιο (Parazi, 2009) .

Αυτό όμως που είναι πολύ ενδιαφέρον, είναι ότι οι χειρισμοί που ξεκίνησαν αυτότροφοι και κατέληξαν χωρίς γλυκόζη παρουσιάζουν μηδενική παραγωγή  $H_2$ , με και χωρίς άζωτο, με και χωρίς dcp. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην αδυναμία εγκαθίδρυσης αναερόβιων συνθηκών, είτε λόγω απουσίας της γλυκόζης που θα ενίσχυε την αναπνοή, είτε γιατί απουσία της γλυκόζης είναι αδύνατον να λάβει χώρα η βιοαποικοδόμηση της 2,3-dcp, οπότε και να πραγματοποιηθεί η αποδεδειγμένη επίδραση της στην φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Parazi, 2009), ενισχύοντας την παραγωγή υδρογόνου είτε μέσω κυκλικής ροής, είτε μέσω των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων της που λαμβάνουν χώρα για την βιοαποικοδόμηση της.

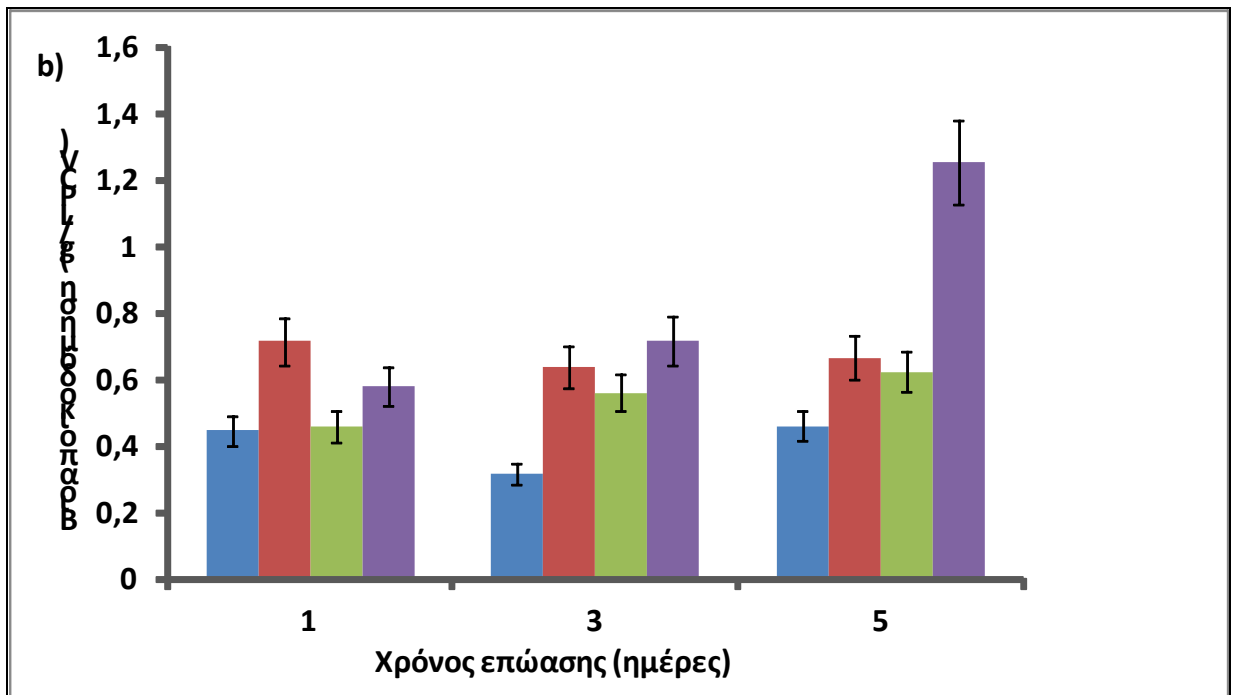
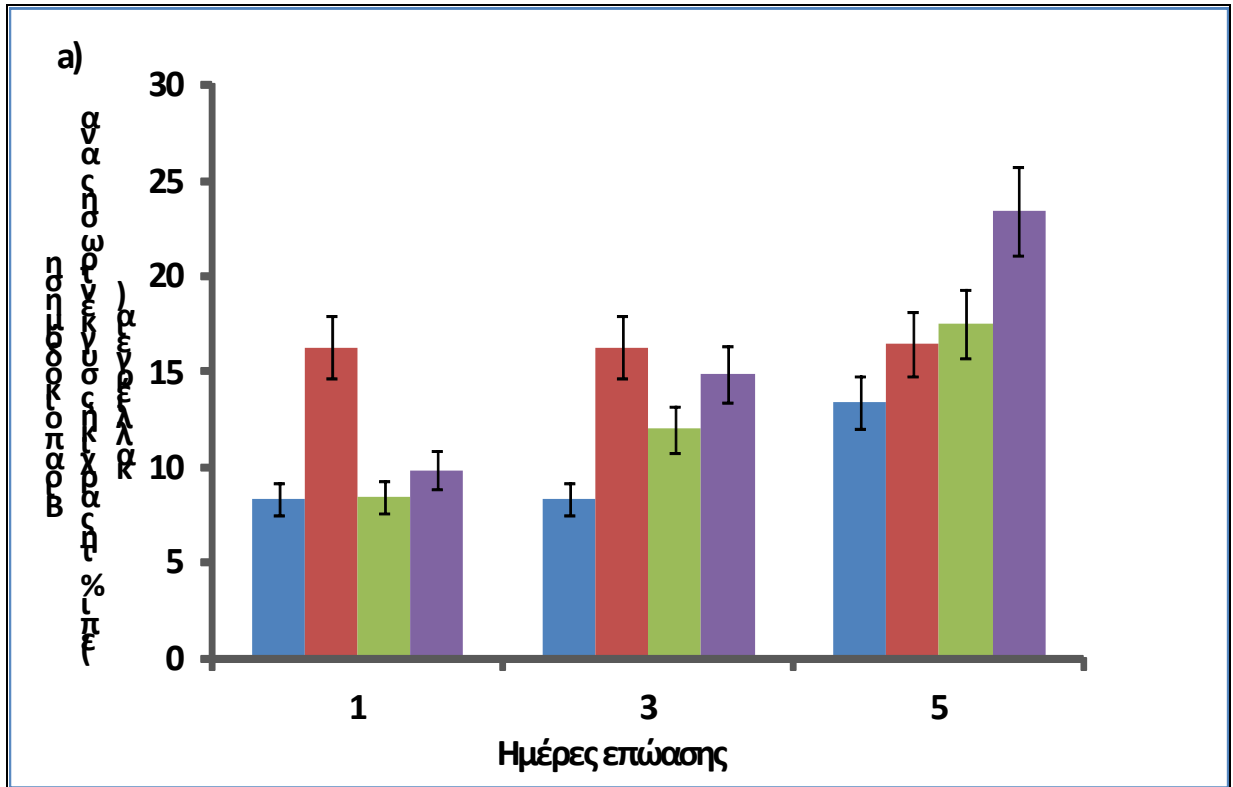
Ο χειρισμός [N+glc] φαίνεται να έχει όμοια καμπύλη κινητικής με τον χειρισμό [N+dcp] με τελική παραγωγή υδρογόνου 2,5 L/L PCV την πέμπτη ημέρα, γεγονός που υποστηρίζει την ικανότητα τόσο της διχλωροφαινόλης όσο και της αποθηκευμένης υπο την μορφή αμύλου γλυκόζης να αυξάνουν την αναπνευστική δραστηριότητα και να οδηγούν γρήγορα σε

ανοξικές συνθήκες. Με άλλα λόγια σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα φαίνεται πως η εξ αρχής παρουσία της γλυκόζης στην μητρική καλλιέργεια παίζει τον ρόλο της dcr, βάση του παραγόμενου H<sub>2</sub>, μιλώντας για αρχικά αυτότροφη καλλιέργεια που κατέληξε σε μικτότροφη. Συγκρίνοντας τις τιμές των χειρισμών αυτών με τον χειρισμό [N+glc+dcr] φαίνεται πως η διχλωροφαινόλη και η γλυκόζη δρούν αθροιστικά στην μεγιστοποίηση του παραγόμενου υδρογόνου, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι ο ρόλος της dcr δεν εξιδεικεύεται μόνο στην εγκαθίδρυση της ανοξίας, αλλά κυρίως στην θέση μεταφορέα ηλεκτρονίων που λαμβάνει στην φωτοσυνθετική αλυσίδα, τροφοδοτώντας το PSI και την παραγωγή H<sub>2</sub>. Από τα παραπάνω φαίνεται πως ο ρόλος της γλυκόζης και της διχλωροφαινόλης είναι διαφορετικός. Σχεδόν μηδενική παραγωγή υδρογόνου παρατηρείται στους χειρισμούς με την απουσία αζώτου [-N] ακόμη και παρουσία γλυκόζης, [-N+glc] γεγονός που συμφωνεί με τα προηγούμενα πειράματα.

Για την εξήγηση των τιμών του παραγόμενου H<sub>2</sub> στους διάφορους χειρισμούς χρησιμοποιήθηκαν υποθέσεις που στηρίζονται στα δεδομένα βιοαποικοδόμησης, παραγωγής και κατανάλωσης O<sub>2</sub> και τέλος σε δεδομένα ολικών λιπαρών. Έτσι στις καλλιέργειες όπου ξεκίνησαν από αυτότροφες μητρικές και κατέληξαν σε μικτότροφες, όπως και στις καλλιέργειες που ξεκίνησαν από μικτότροφες μητρικές και κατέληξαν σε μικτότροφες, έλαβαν χώρα οι παραπάνω μετρήσεις ώστε να ενισχυθούν ή όχι οι αρχικές μας υποθέσεις. Οι καλλιέργειες που ξεκίνησαν από αυτότροφες μητρικές και κατέληξαν χωρίς γλυκόζη δεν μετρήθηκαν γιατί παράγαν μηδενικό υδρογόνο, για τους προφανείς λόγους που εξηγήθηκαν νωρίτερα.

Στην **Εικόνα 28** που ακολουθεί παρουσιάζεται η κινητική της βιοαποικοδόμησης του κάθε χειρισμού χωριστά από την πρώτη έως την πέμπτη ημέρα. Στην **Εικόνα 28α** παρουσιάζεται η βιοαποικοδόμηση επι % της αρχικής ποσότητας διχλωροφαινόλης ανά καλλιέργεια. Ο χειρισμός του μάρτυρα [N+dcr] φαίνεται να έχει την μικρότερη δυνατότητα αποικοδόμησης της φαινολικής ένωσης με τελικό ποσοστό 13,3 % κατά την πέμπτη ημέρα. Το μεγαλύτερο ποσό της διχλωροφαινόλης φαίνεται πως αποικοδομείται την πρώτη ημέρα (8,3%) ενώ την πέμπτη αποικοδομείται άλλο ένα 5%. Συγκρίνοντας τα διαγράμματα της **Εικόνας 28α** (ανά καλλιέργεια) & **28b** (ανά PCV) είναι εμφανές ότι την τρίτη ημέρα, όπου δεν υπάρχει βιοαποικοδόμηση η αποθηκευμένη ενέργεια αποδίδεται στην ανάπτυξη. Αυτός είναι ο λόγος που η βιοαποικοδόμηση ανά PCV (**Εικόνας 28b**) την τρίτη ημέρα είναι μικρότερη από την αντίστοιχη της πρώτης ημέρας.



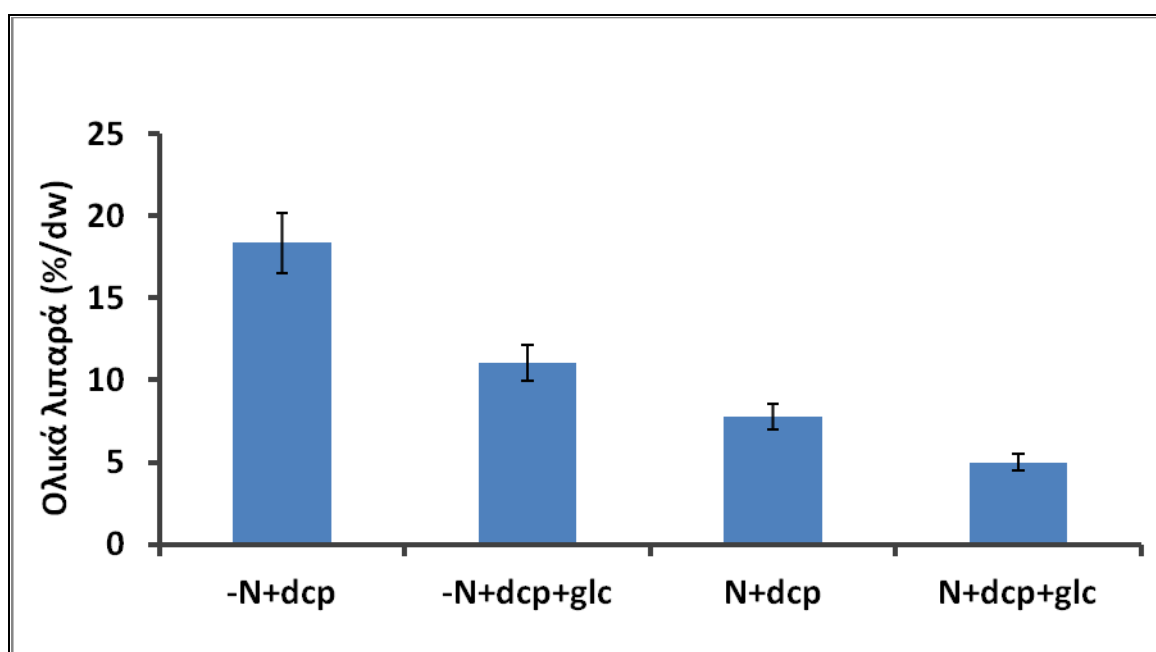


**Εικόνα 28:** Κινητική της βιοαποικοδόμησης της 2,3-dcp από το χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* παρουσία 0,15mM 2,3-dcp, σε ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Οι χειρισμοί ■ N+dcp, ■ -N+dcp, ■ N+glc+dcp, ■ -N+glc+dcp.

Συνοψίζοντας τα δεδομένα της βιοαποικοδόμησης (Εικόνα 28) αποδεικνύεται ότι ο χειρισμός [-N+glc+dcp] έχει την μεγαλύτερη ικανότητα βιοαποικοδόμησης dcp, ακολουθεί ο

χειρισμός [-N+dcp], μετά ο [N+glc+dcp] και τέλος ο [N +dcp]. Φαίνεται λοιπόν ότι η απουσία αζώτου έχει μεγαλύτερη επίδραση στην ικανότητα βιοπαικοδόμησης του κάθε χειρισμού , από ότι η παρουσία της γλυκόζης (εξ' αρχής στις μητρικές καλλιέργειες). Αν όμως οι δύο αυτοί παράγοντες συνδυαστούν τότε παρατηρείται το βέλτιστο αποτέλεσμα ως προς την βιοπαικοδόμηση της 2,3-dcp (**Εικόνα 28**).

Μια πιθανή εξήγηση για την τάση της βιοπαικοδόμησης όπως παρουσιάστηκε προηγουμένως είναι ότι η απουσία αζώτου προκαλεί αύξηση των λιπαρών του κυττάρου, που σε συνδυασμό με την λιπόφιλη φύση της διχλωροφαινόλης αυξάνει την είσοδο της μέσα στα κύτταρα και κατά συνέπεια την βιοπαικοδόμηση της, σε όλους τους χειρισμούς όπου το άζωτο απουσιάζει από το μέσο καλλιέργειας. Για τον έλεγχο αυτής της υπόθεσης εργασίας έγινε έλεγχος των ολικών λιπαρών σε κάθε μία από τις παραπάνω περιπτώσεις. Στην **Εικόνα 29** που ακολουθεί παρουσιάζονται οι περιεκτικότητες του μικροφύκου σε λιπαρά οξέα εκφρασμένα σε ποσοστό επι τα % του ξηρού βάρους της βιομάζας.



**Εικόνα 29.** Λιπαρά οξέα εκφρασμένα ως επι % της ξηρής βιομάζας του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* την πέμπτη ημέρα του πειράματος, παρουσία 0,15mM 2,3 dcp, σε ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Είναι φανερό ότι οι χειρισμοί όπου απουσιάζει το άζωτο εμφανίζουν πάντα υψηλότερα λιπαρά από τους αντίστοιχους μάρτυρες. Ο χειρισμός [-N+dcp] για παράδειγμα έχει σχεδόν διπλάσια ποσότητα λιπαρών σε σύγκριση με τον [N+dcp], όπως ακριβώς ισχύει και με τον

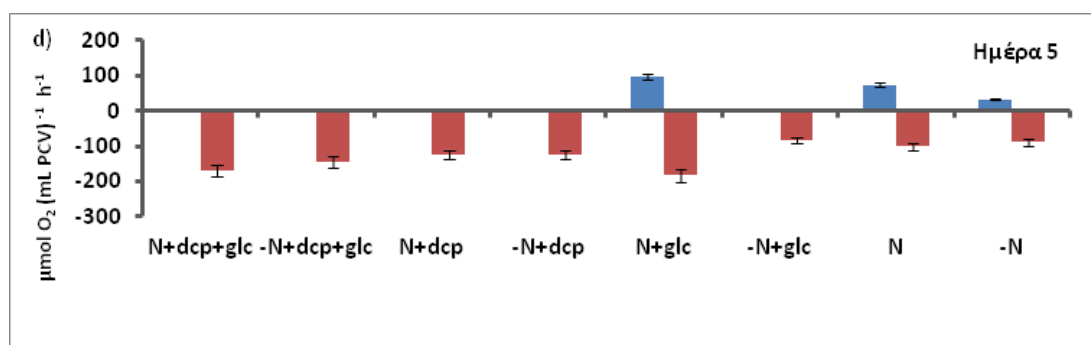
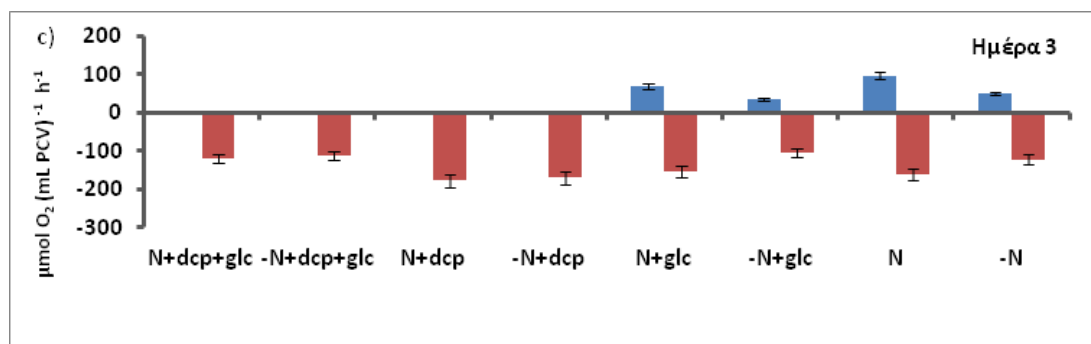
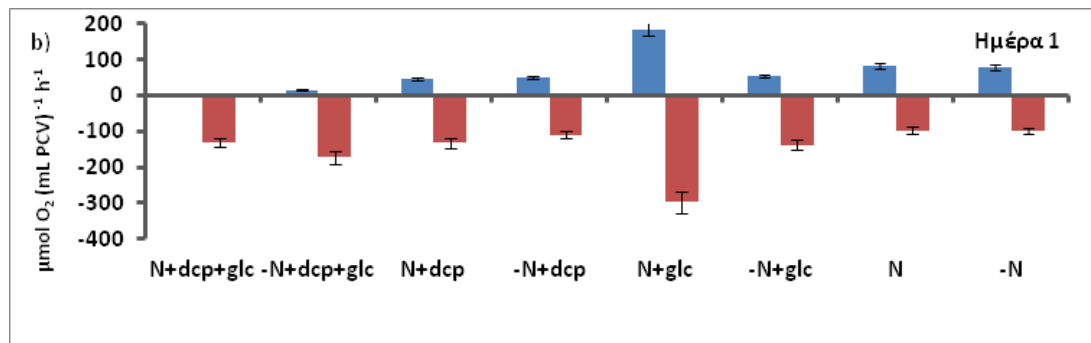
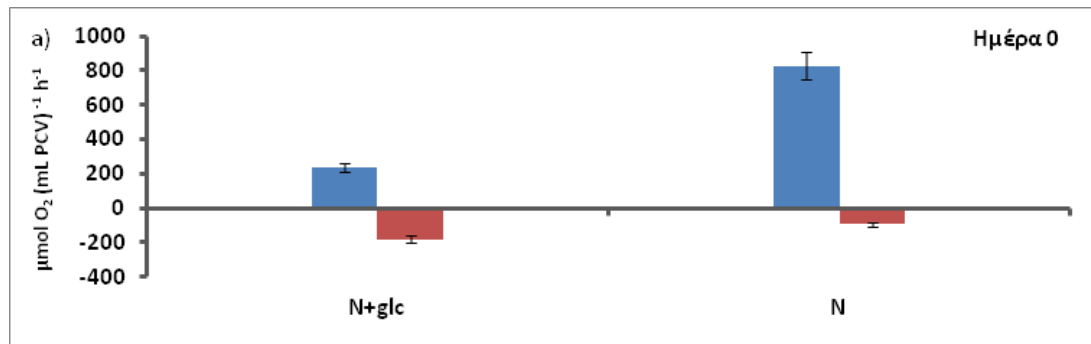
[-N+glc+dcp] αν συγκριθεί με τον [N+glc+dcp]. Επομένως η υπόθεσης εργασίας που συνδέει την αύξηση των λιπαρών με την αυξημένη βιοαποικοδομησιμότητα είναι πιθανή.

Για την αποσαφήνιση λοιπόν της επίδρασης της γλυκόζης αλλά και της διχλωροφαινόλης στην επίτευξη της ανοξίας που χρειάζεται για την παραγωγή υδρογόνου έγιναν πειράματα πολαρογραφίας για την εκτίμηση της μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και αναπνοής. Στην **Εικόνα 30a** παρουσιάζεται η φωτοσυνθετική και η αναπνευστική ικανότητα του μικροφύκου, ανάλογα με την προέλευση του (αυτότροφη ή μικτότροφη καλλιέργεια) την ημέρα εκκίνησης του πειράματος.

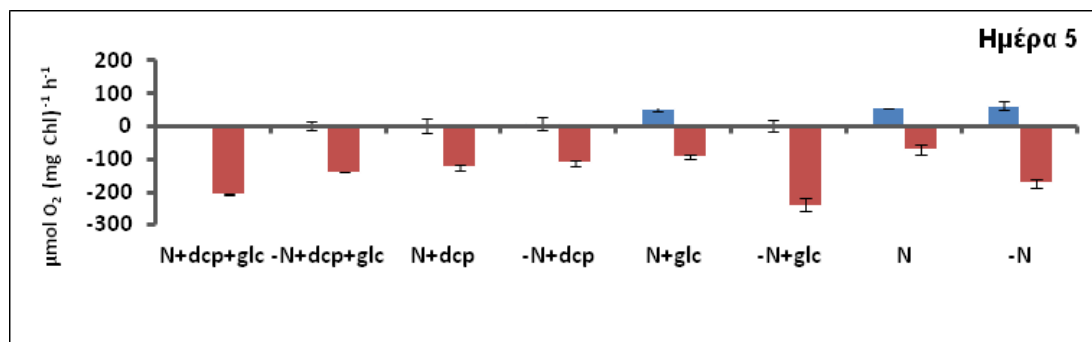
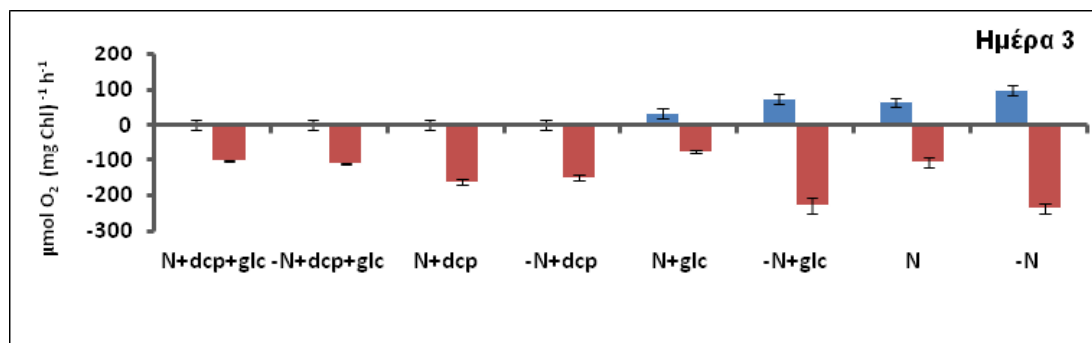
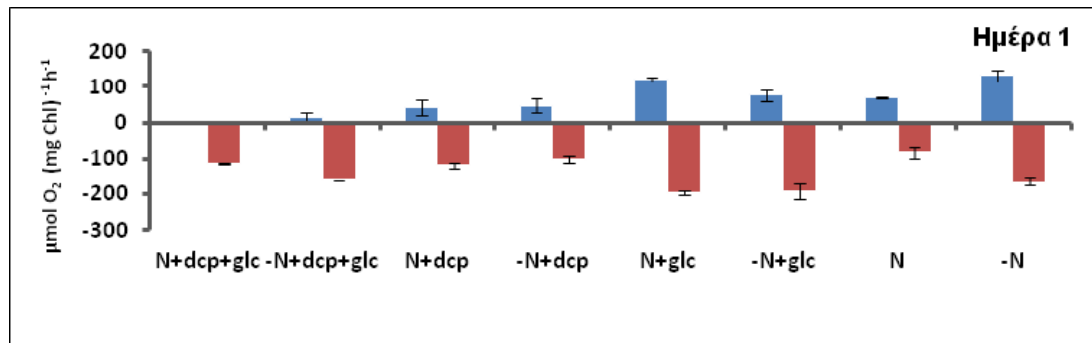
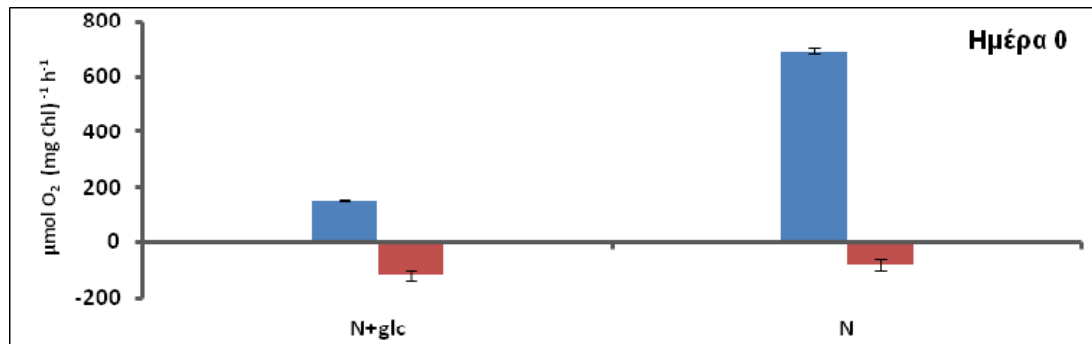
Η προσθήκη της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των μητρικών καλλιεργειών επιφέρει σημαντικές αλλαγές στην φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου αλλά και στην αναπνευστική δραστηριότητα. Χαρακτηριστικά οι μητρικές καλλιέργειες με την γλυκόζη έχουν μειωμένο μέγιστο της φωτοσύνθετικής δραστηριότητας κατά 70% ενώ παράλληλα μία αύξηση παρατηρείται στην αναπνευστική δραστηριότητα 90% σε σχέση με τα δεδομένα των αυτότροφων καλλιεργειών. Ο συνδυασμός αυτός επιτρέπει την ταχύτερη επίτευξη ανοξικών συνθηκών σε σχέση με τα κύτταρα των αυτότροφων καλλιεργειών, γεγονός που αποδεικνύεται και από την ικανότητα των χειρισμών αυτών να ξεκινούν την παραγωγή υδρογόνου ακόμη και πριν από το πέρας του πρώτου εικοσιτετράωρου καλλιέργειας στα κλειστά βουκάλια.

Η κυριότερη αλλαγή που παρατηρείται μετά την πρώτη ημέρα (**Εικόνα 30**) είναι η εξάλειψη κάθε φωτοσυνθετικής δραστηριότητας στους χειρισμούς με την διχλωροφαινόλη [N+dcp], [-N+dcp], [N+dcp+glc], [-N+dcp+glc], ενώ η αναπνευστική δραστηριότητα διατηρείται σε υψηλά επίπεδα. Ανάλογα προφίλ απαντώνται και την 5<sup>η</sup> ημέρα (**Εικόνα 30d**).

Η φωτοσυνθετική δραστηριότητα καθώς και η αναπνοή δύναται να εκφραστούν και ανά μονάδα χλωροφύλλης (mg/L). Τα νέα διαγράμματα (**Εικόνα 31**) παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις από τα προηγούμενα αλλά αυτό που παραμένει κοινό και σταθερό είναι η αναστολή της φωτοσύνθεσης σε όλους τους χειρισμούς και ακόμη πιο έντονα στους χειρισμούς απουσία αζώτου και παρουσία διχλωροφαινόλης.



**Εικόνα 30:** Μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα και αναπνοή του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*. ■ Αναπνευστική δραστηριότητα ■ Μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα (Net photosynthesis).



**Εικόνα 31:** Μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα και αναπνοή του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* εκφρασμένη ανα mg χλωροφυλλών. ■ Αναπνευστική δραστηριότητα, ■ Μέγιστη φωτοσύνθετική δραστηριότητα.

## 4. Συζήτηση- Επίλογος

Η μακρόχρονη χρήση των ορυκτών καυσίμων ως πηγή ενέργειας είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση δυσμενών επιπτώσεων στο περιβάλλον, όπως η μόλυνση αλλά και η ενίσχυση του φαινομένου του θερμοκηπίου. Η έντονη ανησυχία για κλιματικές αλλαγές, καθώς και ο πεπερασμένος αριθμός των κοιτασμάτων των ορυκτών καυσίμων, καθιστούν αναγκαία την έρευνα και ανάπτυξη εναλλακτικών πηγών ενέργειας, ανανεώσιμων και φιλικότερων προς το περιβάλλον.

Η χρήση του  $H_2$  ως εναλλακτικό καύσιμο φαίνεται να υπόσχεται πολλά για την εξυγίανση του τρόπου παραγωγής ενέργειας. Το υδρογόνο μπορεί να παραχθεί με πρώτη ύλη το νερό, η καύση του χαρακτηρίζεται από 3 φορές μεγαλύτερο ενεργειακό περιεχόμενο σε σχέση με τα συμβατικά καύσιμα και τέλος τα παράγωγα της καύσης του δεν επιβαρύνουν το περιβάλλον, καθώς το  $H_2$  καίγεται παρουσία  $O_2$  και δημιουργείται  $H_2O$ . Ο κύριος περιοριστικός παράγοντας που μέχρι σήμερα καθιστά «απαγορευτική» την ευρεία χρήση του, έγκειται στα μεγάλα ποσά ενέργειας (συνήθως υπό την μορφή θερμότητας) που απαιτούνται για την παραγωγή του. Η κύρια ερευνητική κατεύθυνση που ακολουθήθηκε για την οικονομικά βιώσιμη μαζική παραγωγή υδρογόνου ήταν τα βιολογικά συστήματα. Τα χλωροφύκη αποτέλεσαν υποσχόμενα βιολογικά συστήματα παραγωγής υδρογόνου, όταν αυτά καλλιεργούνται παρουσία φωτός σε ανοξικές συνθήκες (Gaffron 1939), χωρίς ωστόσο να παρουσιάζεται μέχρι σήμερα, μια ολοκληρωμένη και οικονομικά συμφέρουσα μέθοδος παραγωγής μαζικών ποσοτήτων βιο-υδρογόνου.

Με την παρούσα εργασία, κάνοντας χρήση ενός εναλλακτικού μηχανισμού παραγωγής υδρογόνου από το χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* μέσω βιοαποικοδόμησης μετα-υποκατεστημένων διχλωροφαινολών (m-dcps), όπως αυτός περιγράφεται στην Διδακτορική Διατριβή της Παράζι (2009), καθώς και με την συνδυαστική χρήση στοχευμένων ελλείψεων θρεπτικών στοιχείων και διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης (αυτότροφες ή μικτότροφες καλλιέργειες), επιτεύχθηκε η μέγιστη παραγωγή υδρογόνου που αναφέρθηκε ποτέ βιβλιογραφικά (14 L  $H_2$ / L PCV).

Συνοψίζοντας τα δεδομένα των πειραμάτων σημειώνεται, πως η παρουσία της 2,3-dcp είναι απαραίτητος παράγοντας για τη παραγωγή υδρογόνου, μιας και οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής του αερίου έως και κατά 100 φορές στον χειρισμό [Control+dcp] σε σύγκριση με τον ανοξικό μάρτυρα [Control] (Παράζι, 2009). Οι συνδυαστικοί χειρισμοί παρουσία της διχλωροφαινόλης 2,3-dcp και στοχευμένης έλλειψης θρεπτικών στοιχείων (N, K, P, S, Mg,

Ca, Cl, Mn, Fe και Na) έδειξαν σημαντική επιπλέον αύξηση της παραγωγής του αερίου στους χειρισμούς [-K+dcp] (21%), [-Mg+dcp] (30%) και [-N+dcp] (40%) σε σχέση με τον μάρτυρα [Control+dcp].

Επιπλέον θετική επίδραση στην παραγωγή H<sub>2</sub> φαίνεται να έχει και η παρουσία γλυκόζης στις μητρικές καλλιέργειες, μιας και οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παραγόμενου υδρογόνου παρατηρήθηκαν σε καλλιέργειες που προήλθαν από μικτότροφες μητρικές και συνέχισαν ως μικτότροφες, κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων. Η παρουσία της γλυκόζης είναι σημαντική για την παραγωγή υδρογόνου γιατί τροφοδοτεί με ενέργεια το μικροφύκος, ευνοεί την ταχύτερη εγκαθίδρυση ανοξικών συνθηκών και τέλος γιατί είναι απαραίτητη για τις διαδικασίες γλυκοζιδίωσης που απαιτούνται για την βιοαποικοδόμηση των διχλωροφαινόλων.

Η μέγιστη παραγωγή υδρογόνου επιτεύχθηκε συνδυάζοντας τις συνθήκες της απουσίας αζώτου, παρουσία 2,3-dcp και τον μικτότροφο τρόπο καλλιέργειας οδηγώντας στην παραγωγή 14L H<sub>2</sub>/ L PCV! Συγκριτικά, για να γίνει κατανοητή η σημασία του παραπάνω συνδυασμού, ο χειρισμός [control+dcp] αποδίδει 2,5L H<sub>2</sub>/ L PCV και ο χειρισμός χωρίς την διχλωροφαινόλη [control] μόλις 0,3L H<sub>2</sub>/ L PCV.

Οι συνθήκες αυτού του συνδυαστικού χειρισμού [-N+dcp+glc] φάνηκε να επηρεάζουν θετικά τόσο τους ρυθμούς της βιοαποικοδόμησης της διχλωροφαινόλης, όσο και βασικές λειτουργίες του κυττάρου, αυξάνοντας την αναπνοή και καταστέλλοντας ολοσχερώς την φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου (που είχε ως αποτέλεσμα την ταχεία εγκαθίδρυση ανοξίας στην καλλιέργεια). Το ενεργειακό προβάδισμα από την παρουσία αποθεμάτων γλυκόζης λόγω των μικτότροφων μητρικών καλλιεργειών επιτρέπει την ταχεία έναρξη της βιοαποικοδόμησης της διχλωροφαινόλης και κατά συνέπεια και την έναρξη της παραγωγής υδρογόνου.

Η συνδυαστική λοιπόν δράση της απουσίας αζώτου, των μικτότροφων καλλιεργειών και της παρουσίας 2,3-dcp αποτελούν το τρίπτυχο για την βέλτιστη παραγωγή υδρογόνου. Αξίζει να σημειωθεί, πως η εντυπωσιακή αύξηση της παραγωγής H<sub>2</sub> του εν λόγω χειρισμού[-N+ dcp+glc] επιτεύχθηκε εξολοκλήρου χωρίς την χρήση μεθόδων γενετικής τροποποίησης αφήνοντας περαιτέρω προοπτικές βελτίωσης του μηχανισμού παραγωγής υδρογόνου, ανοίγοντας τον δρόμο για τη ευρεία χρήση του στα πλαίσια μίας πράσινης βιοτεχνολογικής προσέγγισης.

## 5. Συμπεράσματα

Η έλλειψη συγκεκριμένων ιόντων,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  από το μέσο καλλιέργειας του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*, παρουσία της διχλωροφαινόλης 2,3-dcp και συνεχούς παροχής γλυκόζης αυξάνει σημαντικά (έως 40%) την παραγωγή υδρογόνου σε σύγκριση με τον μάρτυρα [Control+dcp].

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι οι παράγοντες με την εντονότερη επίδραση στην παραγωγή  $\text{H}_2$ , είναι η παρουσία της 2,3-dcp, ο μικτότροφος τρόπος καλλιέργειας (συνεχής παροχή γλυκόζης από την αρχή της καλλιέργειας) και η έλλειψη αζωτούχας πηγής από το θρεπτικό του χλωροφύκου. Ο συνδυασμός των τριών αυτών παραγόντων [-N+glc+dcp] επηρεάζει δραματικά τις βασικές λειτουργίες του χλωροφύκου, με κυρίαρχες αλλαγές την αύξηση της αναπνευστικής λειτουργίας, την εξάλειψη της φωτοσυνθετικής παραγωγής  $\text{O}_2$  (ταχεία εγκαθίδρυση ανοξίας) και την αύξηση της ταχύτητας βιοαποικοδόμησης της διχλωροφαινόλης. Οι καλλιέργειες *Scenedesmus obliquus* που αναπτύχθηκαν υπό αυτές τις συνθήκες παρήγαγαν σε 5 ημέρες την μέγιστη ποσότητα υδρογόνου, 14 L  $\text{H}_2$ / L PCV, σε αντίθεση με τα 2,5 L  $\text{H}_2$ / L PCV που παράγουν οι καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν μόνο με την παρουσία 2,3 διχλωροφαινόλης [Control+dcp] και τα 0,3 L  $\text{H}_2$ / L PCV που παράγουν οι καλλιέργειες μάρτυρες [Control].



## 6. Βιβλιογραφία

- Alahari A, Apte SK (1998) Pleiotropic effects of potassium deficiency in a heterocystous, nitrogen-fixing cyanobacterium, *Anabaena torulosa*. *Microbiology* June 144: 1557-1563
- Allen MM, Law A, Evans EH (1990) Control of photosynthesis during nitrogen depletion and recovery in a non-nitrogen-fixing cyanobacterium. *Arch Microbiol* 153: 428-431
- Antal TK, Krendeleva TE, Laurinavichene TV, Makarova VV, Ghirardi ML, Rubin AB, Tsygankov AA, Seibert M (2003) The dependence of algal H<sub>2</sub> production on Photosystem II and O<sub>2</sub> consumption activities in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Biochim Biophys Acta* 1607: 153-160
- Benemann JR, Berenson N, Kaplan N, Kauren M (1973) Hydrogen evolution by a chloroplast-ferredoxin-hydrogenase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70
- Bennoun P (1982) Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 4352-4356
- Berges JA, Charlebois DO, Mauzerall DC, Falkowski PG (1996) Differential Effects of Nitrogen Limitation on Photosynthetic Efficiency of Photosystems I and II in Microalgae. *Plant Physiol.* 110: 689-696
- Bishop NL, Senger H (1971) Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of *Scenedesmus*, Vol 23. Academic Press, New York
- Boyd S, Shelton D (1984) Anaerobic Biodegradation of Chlorophenols in Fresh and Acclimate Sludge. *Appl Environ Microbiol* 47: 272-277
- Chader S, Hacene H, Agathos SN (2009) Study of hydrogen production by three strains of *Chlorella* isolated from the soil in the Algerian Sahara. *Int J Hyd. Energy* 34: 4941-4946
- Cheniae GM, Martin IF (1968) Site of Magnanese function in photosynthesis *Biochim. Biophys. Acta* 153: 819-837
- DellaGreca M, Monaco P, Pinto G, Pollio A, Previtiera L, Temussi F (2001) Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill waste waters. *Bull Environ Contam Toxicol* 67: 352-359
- Demetriou G, Neonaki C, Navakoudis E, Kotzabasis K (2007) Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus--the protective role of polyamines. *Biochim Biophys Acta* 1767: 272-280
- F.P.Healey, Hendzel LL (1975) Effect of Phosphorus deficiency on two algae growing in chemostats. *J. Phycol* 11: 303-309
- Finkle BJ, Appleman D (1952) The effect of Magnesium concentration on chlorofyll and catalase development in *Chlorella*. *Plant physiology*: 652-663
- Florin L, Tsokoglou A, T.Happe (2001) A novel type of iron hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetic electron transport chain. *J Biol Chem.* 276: 6125-6132
- Gaffron H, Rubin J (1942) Fermentative and Photochemical Production of Hydrogen in Algae. *J Gen Physiol* 26: 219-240
- Gfeller RP, Gibbs M (1984) Fermentative Metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. Analysis of fermentative products from starch in dark and light. *Plant Physiol.* 75: 212-218

- Ghirardi ML, Togasaki RK, Seibert M (1997) Oxygen sensitivity of algal H<sub>2</sub>- production. Appl Biochem Biotechnol 63-65: 141-151
- Hall JD, Barr R, Al-Abbas AH, Crane FL (1972) The Ultrastructure of Chloroplasts in Mineral-deficient Maize Leaves. Plant Physiol 50: 404-409
- Happe T, Hemschemeier A, Winkler M, Kaminski A (2002) Hydrogenases in green algae: do they save the algae's life and solve our energy problems? TRENDS in Plant Science 7
- Happe T, Naber JD (1993) Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Eur J Biochem 214: 475-481
- Huang ZA, D.A.Jiang, Y.Yang, J.W.Sun, S.H.Jin (2004) Effects of Nitrogen Deficiency on Gas Exchange, Chlorophyll Fluorescence, and Antioxidant Enzymes in Leaves of Rice Plants. PHOTOSYNTHETICA 42: 357-364
- Karamalaki A (2011) Βιοενεργητική στρατηγική βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* για την παραγωγή βιοντίζελ. Διατριβή μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης
- Karim AQMB, Vlamis J (1962) Micronutrient deficiency symptoms of rice grown in culture solutions. Plant and Soil 16
- Kautsky H, Hirsch A (1931) Neue versuche zur kohlenfaure-assimilation. Naturwissenschaften 19: 964
- Logothetis K, Dakanali S, Ioannidis N, Kotzabasis K (2004) The impact of high CO<sub>2</sub> concentrations on the structure and function of the photosynthetic apparatus and the role of polyamines. J Plant Physiol 161: 715-724
- Lovell CR, Eriksen NT, Lewitus AJ, P. CY (2002) Resistance of the marine diatom *Thalassiosira* sp. to toxicity of phenolic compounds. Mar Ecol Prog Ser 229: 11-18
- Lutz C, Navakoudis E, Seidlitz HK, Kotzabasis K (2005) Simulated solar irradiation with enhanced UV-B adjust plastid- and thylakoid-associated polyamine changes for UV-B protection. Biochim Biophys Acta 1710: 24-33
- Melis A, Happe T (2001) Hydrogen production. Green algae as a source of energy. Plant Physiol 127: 740-748
- Melis A, Zhang L, Forestier M, Ghirardi ML, Seibert M (2000) Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol 122: 127-136
- Melis A, Zhang L, Forestier M, Ghirardi ML, Seibert M (2000) Sustained Photobiological Hydrogen Gas Production upon Reversible Inactivation of Oxygen Evolution in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiology 122: 127-135
- Navakoudis E, Lutz C, Langebartels C, Lutz-Meindl U, Kotzabasis K (2003) Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines. Biochim Biophys Acta 1621: 160-169
- Niyogi KK (2000) Safety valves for photosynthesis. Curr Opin Plant Biol 3: 455-460
- Olszewska M, Grzegorzczak S, Alberski J, Baluch-Malecka A, Kozikowski A (2008) Effect of Copper deficiency on gas exchange parameters, leaf greenness (SPAD) and yield of perennial ryegrass (*LOLIUM PERENNE* L.) and orchard grass (*DACTYLIS GLOMERATA* L.). J. Elementol. 13: 597-604
- Papazi A (2009) Βιοενεργητική στρατηγική βιοαποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων απο το χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus*. Βιοτεχνολογικές προεκτάσεις. Διδακτορική διατριβή
- Peltier G, Schmidt GW (1991) Chlororespiration: an adaptation to nitrogen deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 4791-4795

- Richardson B, Orcutt DM, Schwertner HA, Martinez CL, Wickline HE (1969) Effects of nitrogen limitation on the growth and composition of unicellular algae in continuous culture. *Appl Microbiol* 18: 245-250
- Rumeau D, Peltier G, Cournac L (2007) Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant Cell Environ* 30: 1041-1051
- Sandermann H, Jr. (1992) Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem Sci* 17: 82-84
- Sandmann G (1985) Consequences of iron deficiency on photosynthetic and respiratory electron transport in blue-green algae. *Photosynthesis Research* 6: 261-271
- Sfakianaki M, Sfichi L, Kotzabasis K (2006) The involvement of LHCII-associated polyamines in the response of the photosynthetic apparatus to low temperature. *J Photochem Photobiol B* 84: 181-188
- Sfichi L, Ioannidis N, Kotzabasis K (2004) Thylakoid-associated Polyamines Adjust the UV-B Sensitive of the Photosynthetic apparatus by means of Light-harvesting Complex II Changes. *Photochem Photobiol* 80: 499-506
- Strasser BJ, Strasser RJ (1995) Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test, Vol V. Kluwer Academic Press, Dordrecht
- Terry N, Ulrich A (1973) Effects of Potassium Deficiency on the Photosynthesis and Respiration of Leaves of Sugar Beet. *Plant Physiol.* 51: 783–786
- Thauer RK (1998) Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* 144: 2377-2406
- Utliken HC (1982) Magnesium-limited Growth of the C yanobacterium *Anacystis nidulans*. *Journal of General Microbiology* 128: 1849-1862
- Vignais PM, Billoud B (2007 ) Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. . *Chem Rev* 107: 4206–4272
- Wykoff DD, Davies JP, Melis A, Grossman AR (1998) The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 117: 129-139
- Xu HX, Weng XY, Yang Y (2007) Effect of phosphorus deficiency on the photosynthetic characteristics of rice plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 54: 741-748
- Zhila NO, Kalacheva GS, Volova TG (2005) Influence of nitrogen deficiency on biochemical composition of the green alga *Botryococcus*. *Journal of Applied Phycology* 17: 309-315