Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τμήμα Χημείας

Τομέας Βιοχημείας

Διπλωματική εργασία

«Μελέτη ανάπτυξης του βακτηρίου *Bradyrhizobium sp.* για την καθήλωση N_2 και παραγωγή H_2»

Σταμοβλάση – Σπυροπούλου Φλωρεντία

Επιβλέπων Καθηγητής: Γανωτάκης Δημήτριος

Ηράκλειο 2023

University of Crete

Chemistry department

Biochemistry department

Bachelor thesis project

"A study of the growth, N_2 fixation and H_2 production by the bacterium *Bradyrhizobium sp*."

Stamovlasi – Spyropoulou Florentia

Thesis supervisor: Professor Ghanotakis Demetrios

Heraklion 2023

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε μια σειρά συνθηκών καλλιέργειας για την παραγωγή βιολογικού υδρογόνου από ένα απομονωμένο στέλεχος *Bradyrhizobium* sp.

Ειδικότερα, μελετήθηκαν παράγοντες που αφορούν τη σύσταση του θρεπτικού μέσου σε θρεπτικά συστατικά και πώς επιδρούν στην παραγωγή υδρογόνου αλλά και στην καθήλωση του αζώτου από το βακτήριο. Διερευνήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης των μετάλλων Fe^{2+} και Mg^{2+}, του $CaCO_3$, του NaCl αλλά και η συγκέντρωση της σουκρόζης, που αποτελεί την πηγή οργανικού άνθρακα στο θρεπτικό μέσο. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν και εναλλακτικές πηγές άνθρακα πέραν της σουκρόζης, όπως διαφορετικά σάκχαρα και άλλα οργανικά υποστρώματα. Τέλος, ερευνήθηκε η επίδραση της πηγής αζώτου αλλά και του αερίου απαέρωσης στην καθήλωση του αζώτου και την παραγωγή υδρογόνου. Στόχος των παραπάνω πειραμάτων ήταν η εύρεση των συνθηκών υπό τις οποίες το βακτήριο *Bradyrhizobium sp*. παράγει τη μέγιστη δυνατή ποσότητα υδρογόνου, αλλά και η διερεύνηση της σχέσης της παραγωγής βιολογικού υδρογόνου με την καθήλωση του αζώτου και τον μεταβολισμό της πηγής άνθρακα.

Από τη μελέτη των παραπάνω, διαπιστώθηκε ότι η παραγωγή αερίου υδρογόνου από το βακτήριο *Bradyrhizobium sp.* συνδέεται κατά κύριο λόγο στον μεταβολισμό του σακχάρου που περιέχεται στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, ενώ επίσης προσδιορίσθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για την παραγωγή του αερίου.

Η παραγωγή υδρογόνου από το συγκεκριμένο βακτήριο του γένους *Bradyrhizobium* αποτελεί αντικείμενο της αίτησης για χορήγηση διπλώματος ευρεσιτεχνίας (πατέντας) που έχει ήδη κατατεθεί στον Ο.Β.Ι. με αριθμό υπόθεσης 2413-0004708944 από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου.

Λέξεις κλειδιά: υδρογόνο, βιολογικό υδρογόνο, αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, *Bradyrhizobium* sp., καθήλωση αζώτου, μεταβολισμός σακχάρων.

Abstract

In this thesis, a series of culture conditions were studied to produce biological hydrogen from an isolated strain of *Bradyrhizobium sp.*

Factors related to the composition of the nutrient medium and how they affect hydrogen production and nitrogen fixation by the bacterium were studied. The effect of the concentration of the metals Fe^{2+} and Mg^{2+}, $CaCO_3$, NaCl and the concentration of sucrose, which is the source of organic carbon in the nutrient medium, was investigated. In addition, alternative carbon sources besides sucrose were used, such as different sugars and other organic substrates. Finally, the effect of the nitrogen source and degassing gas on nitrogen fixation and hydrogen production was investigated. The aim of the above experiments was to find the conditions under which the bacterium *Bradyrhizobium sp.* produces the maximum possible amount of hydrogen, but also investigating the relationship of biological hydrogen production with nitrogen fixation and carbon source metabolism.

From the study of the above, it was found that the production of hydrogen gas by the bacterium *Bradyrhizobium sp.* it is mainly linked to the metabolism of the sugar contained in the growth medium, and the optimal conditions to produce the gas were determined.

The production of hydrogen by the specific bacterium of the genus *Bradyrhizobium* is the subject of the patent application that has already been filed to H.I.P.A with case number 2413-0004708944 by the laboratory's research team.

Key words: hydrogen, biological hydrogen, nitrogen fixing bacteria, *Bradyrhizobium sp.*, nitrogen fixation, sugars metabolism.

Περιεχόμενα

Περίληψη…….σελίδα 3

Abstract……σελίδα 4

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή……σελίδες 7-16

1.1 Παραγωγή βιολογικού υδρογόνου…….σελίδες 7-8

1.2 Σκοτεινή ζύμωση – διεργασία παραγωγής βιολογικού υδρογόνου……σελίδες 8-11

1.3 Γλυκόλυση – ρόλος υδρογονάσης……....σελίδα 11

1.4 Καθήλωση του αζώτου – ρόλος νιτρογενάσης…….σελίδες 11-13

1.5 Ριζόβια βακτήρια – χαρακτηριστικά και συνθήκες ανάπτυξης……σελίδες 13-15

1.6 Σκοπός διπλωματικής εργασίας……σελίδα 16

Κεφάλαιο 2: Πειραματικό μέρος……σελίδες 17-25

2.1 Συνθήκες ανάπτυξης *Bradyrhizobium sp.* σε κανονικό θρεπτικό μέσο……σελίδες 17-20

2.2 Παρασκευή πειραματικών καλλιεργειών *Bradyrhizobium sp.* ……σελίδες 20-21

2.3 Μετρήσεις pH…….. σελίδα 21

2.4 Μετρήσεις ποσότητας υδρογόνου με αέρια χρωματογραφία ……...σελίδες 21-23

2.5 Ποσοτικός προσδιορισμός σακχάρων ……..σελίδα 23

2.6 Προετοιμασία δειγμάτων για φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (^{1}H – NMR) ……σελίδες 23-24

2.7 Προετοιμασία δειγμάτων για παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο …σελίδα 24

2.8 Προετοιμασία δειγμάτων για παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) ……σελίδες 24-25

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα και συζήτηση ……σελίδες 25-56

3.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά μικροοργανισμού ……...σελίδες 25-28

3.2 Σχέση παραγωγής H_2 με καθήλωση του αζώτου …….σελίδες 28-31

3.2.1 Αέριο απαέρωσης και πηγές N_2 στο θρεπτικό μέσο M3 …...σελίδες 28-31

3.3 Επίδραση συστατικών του θρεπτικού μέσου M3 στην παραγωγή H_2 ..σελίδες 31-43

3.3.1 Επίδραση του $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ στην παραγωγή H_2 ……...σελίδες 31-34

3.3.2 Επίδραση του $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ στην παραγωγή H_2 …….σελίδες 35-38

3.3.3 Επίδραση του $CaCO_3$ στην παραγωγή H_2 …….σελίδες 38-42

3.3.4 Επίδραση του NaCl στην παραγωγή H_2 ……σελίδες 42-43

3.4 Μελέτη παραγωγής H_2 συναρτήσει των πηγών άνθρακα του θρεπτικού μέσου M3 ……...σελίδες 44 -55

3.4. 1 Επίδραση της ποσότητας σουκρόζης στην παραγωγή H_2 ...σελίδες 44-47

3.4.2 Επίδραση της πηγής μονοσακχαρίτη και δισακχαρίτη στην παραγωγή H_2 ……σελίδες 47-51

3.4.3 Επίδραση πηγών άνθρακα στην παραγωγή H_2 …….σελίδες 51-55

3.5 Συμπεράσματα …….σελίδες 55-56

Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές ……σελίδες 56-58

Κεφάλαιο 5: Βιβλιογραφία ……σελίδες 58-62

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Παραγωγή βιολογικού υδρογόνου

Οι αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις που έχουν δημιουργηθεί, τόσο από τον σύγχρονο τρόπο ζωής, όσο και από την εκθετική αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού, έχουν οδηγήσει στην ανάγκη για ανάπτυξη νέων, φιλικών προς το περιβάλλον, καυσίμων. Η ανάγκη αυτή προκύπτει από το γεγονός ότι τα ορυκτά καύσιμα, που αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας, συνεισφέρουν σε μεγάλο ποσοστό στις ανθρωπογενείς εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου, με κυριότερο το CO_2, επιταχύνοντας έτσι την κλιματική αλλαγή και την υπερθέρμανση του πλανήτη. Το H_2, αποτελεί ένα αρκετά υποσχόμενο εναλλακτικό καύσιμο, καθώς αφενός είναι φιλικό προς το περιβάλλον, αφού κατά την καύση του παράγεται μόνο H_2O και αφετέρου, αποτελεί το καύσιμο με το μεγαλύτερο ενεργειακό περιεχόμενο – θερμαντική αξία, σε σχέση με τα συμβατικά ορυκτά καύσιμα, όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 1. Κυριότερα μειονεκτήματα του, H_2 ως καύσιμο αποτελούν το γεγονός ότι δεν είναι διαθέσιμο στη φύση, αλλά και το κόστος παραγωγής του το οποίο είναι σχετικά υψηλό σε σχέση με αυτό των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ορυκτών καυσίμων [1].

Πίνακας 1: Τιμές θερμότητας για το υδρογόνο και ορυκτά καύσιμα.

Καύσιμο	Υψηλές τιμές θερμότητας[1] (MJ/kg)	Χαμηλές τιμές θερμότητας[2] (MJ/kg)
Υδρογόνο	141,9	119,9
Μεθάνιο	55,5	50
Βενζίνη	47,5	44,5
Πετρέλαιο	44,8	42,5

Μέχρι σήμερα, το H_2 παράγεται κατά 48% από φυσικό αέριο, κατά 30% από αργό πετρέλαιο και νάφθα και κατά 18% από κάρβουνο. Οι μέθοδοι παραγωγή υδρογόνου δύναται να χωρισθούν σε δύο κύριες κατηγορίες: α) παραγωγή μέσω ορυκτών καυσίμων και β) παραγωγή μέσω ανανεώσιμων πηγών. Στην πρώτη

[1] Το ανώτατο όριο της διαθέσιμης θερμικής ενέργειας που παράγεται κατά την πλήρη καύση ενός καυσίμου.
[2] Η διαθέσιμη θερμική ενέργεια που παράγεται κατά την καύση ενός καυσίμου. Στην τιμή αυτή λαμβάνονται υπόψιν και οι απώλειες ενέργειας.

κατηγορία η παραγωγή υδρογόνου πραγματοποιείται μέσω πυρόλυσης ή αναμόρφωσης υδρογονανθράκων. Στη δεύτερη κατηγορία η διαδικασία παραγωγής του καυσίμου μπορεί να πραγματοποιηθεί θερμοχημικά, βιολογικά ή με μεθόδους διαχωρισμού νερού (ηλεκτρόλυση, θερμόλυση, πυρόλυση) [1].

Όσον αφορά τη βιολογική μέθοδο, η χρήση μικροοργανισμών για την παραγωγή υδρογόνου, αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη, μέθοδο παραγωγής, αφού το βιολογικό υδρογόνο, αποτελεί ανεξάντλητο, ανανεώσιμο και βιώσιμο καύσιμο. Η παραγωγή βιολογικού υδρογόνου μπορεί να πραγματοποιηθεί με τέσσερις διαφορετικές διεργασίες:

1. Βιοφωτόλυση του H_2O (άμεση, από πράσινα μικροφύκη, ή έμμεση από κυανοβακτήρια)

2. Φωτοαποικοδόμηση οργανικών ενώσεων από φωτοσυνθετικά βακτήρια

3. Σκοτεινή ζύμωση (Dark fermentation)

4. Υβριδικά συστήματα που είτε συνδυάζουν μικροοργανισμούς από δύο παραπάνω κατηγορίες, είτε βασίζονται σε βιοαντιδραστήρες που λειτουργούν βιοηλεκτροχημικά [2].

1.2 Σκοτεινή ζύμωση – διεργασία παραγωγής βιολογικού υδρογόνου

Η σκοτεινή ζύμωση πραγματοποιείται από μικροοργανισμούς και λαμβάνει χώρα υπό ανοξικές συνθήκες, δηλαδή απουσία διαλυμένου O_2, που θα μπορούσε να δράσει ως δέκτης ηλεκτρονίων. Επιπλέον, δεν απαιτείται η παρουσία φωτός για την πραγματοποίησή της. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό πως, για την παραγωγή υδρογόνου μέσω της συγκεκριμένης διαδικασίας χρησιμοποιούνται τόσο υποχρεωτικά αναερόβιοι, όσο και προαιρετικά αερόβιοι μικροοργανισμοί. Οι τελευταίοι αξιοποιούν ως υποστρώματα πηγές άνθρακα, όπως απλά σάκχαρα, απόβλητα κυτταρίνης ή αμύλου, αλλά και βιομηχανικά απόβλητα με υψηλό οργανικό φορτίο, τα οποία καταβολίζονται σε μονοσακχαρίτες [3]. Η γλυκόζη μεταβολίζεται μέσω της γλυκόλυσης σε πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο οξειδώνεται προς ακέτυλο-CoA. Στην παραπάνω οξείδωση συμμετέχουν τόσο η φερρεδοξίνη, ως γέφυρα μεταφοράς ηλεκτρονίων, όσο και η υδρογονάση, ένα μεταλλοένζυμο που εκμεταλλεύεται τα πρωτόνια και τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν για την παραγωγή H_2. Ειδικότερα, η

φερρεδοξίνη μεταβαίνει από την οξειδωμένη στην ανηγμένη της μορφή κατά τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακέτυλο-CoA. Ύστερα, η ανηγμένη φερρεδοξίνη μεταβαίνει εκ νέου στην οξειδωμένη της μορφή, μέσω της υδρογονάσης, και παράγεται H_2. Η προαναφερθείσα διαδικασία παρουσιάζεται στις αντιδράσεις που ακολουθούν [2].

$$Πυροσταφυλικό\ οξύ + CoA + 2Fd(ox) \rightarrow ακέτυλο - CoA + 2Fd(red) + CO_2 \quad (1)$$

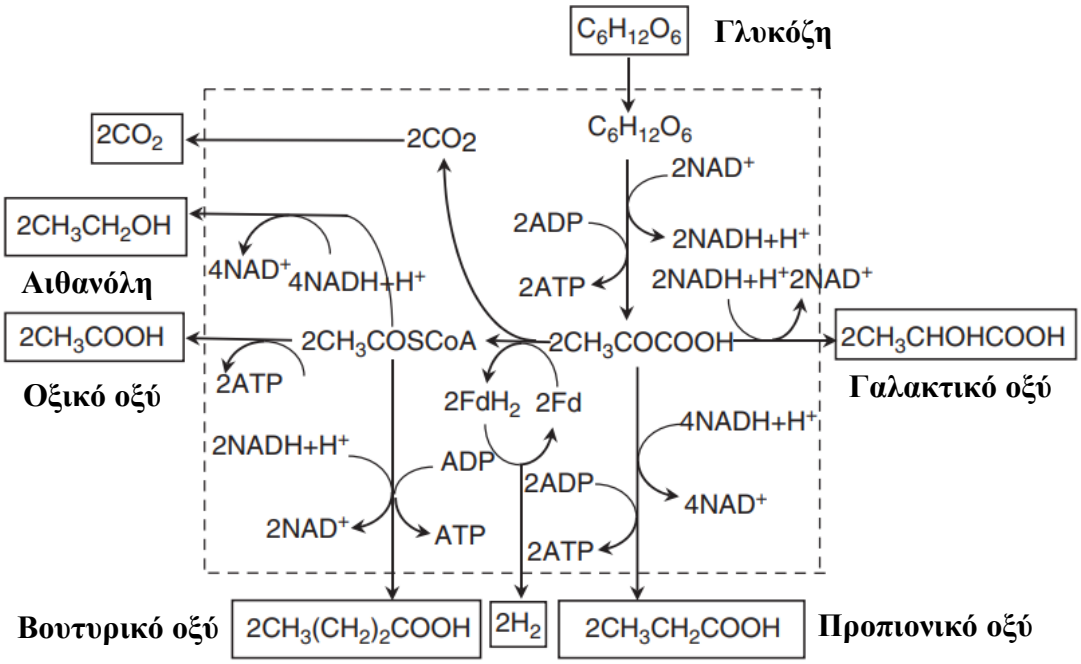
$$2H^+ + Fd(red) \rightarrow H_2 + Fd(ox) \quad (2)$$

Γενικά, η παραγωγή βιολογικού υδρογόνου με σκοτεινή ζύμωση διαφέρει αναλόγως της σχέσης του μικροοργανισμού με το οξυγόνο. Πιο συγκεκριμένα, στους υποχρεωτικά αναερόβιους μικροοργανισμούς, ο καταβολισμός ενός μορίου γλυκόζης, πραγματοποιείται μέσω διαμεσολάβησης του οξικού οξέος και οδηγεί στην παραγωγή τεσσάρων μορίων H_2, όπως φαίνεται στην αντίδραση 3. Από την άλλη, στους προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς, με την γλυκόλυση ενός μορίου γλυκόζης, παράγονται δύο μόρια H_2, όπως φαίνεται στην αντίδραση 4 και πραγματοποιείται με τη διαμεσολάβηση του προπιονικού οξέος [2].

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2 \uparrow \quad (3)$$

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2 \uparrow \quad (4)$$

Αξίζει να σημειωθεί, πως οι εν λόγω αντιδράσεις αφορούν τη θεωρητική παραγωγή H_2, αφού ποσότητα γλυκόζης καταναλώνεται για την ανάπτυξη και κάλυψη άλλων αναγκών του μικροοργανισμού, αλλά και για την παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs) [3]. Κατά τον καταβολισμό της γλυκόζης μέσω της διαδικασίας της γλυκόλυσης, προκύπτουν εκτός από το H_2, και παραπροϊόντα όπως CO_2, οξικό οξύ, αιθανόλη, γαλακτικό οξύ, βουτυρικό οξύ και προπιονικό οξύ όπως παρουσιάζονται στην εικόνα 1 [4].



Εικόνα 1: Καταβολισμός της γλυκόζης για την παραγωγή H_2 από αναερόβια βακτήρια[4].

Η διαδικασία της σκοτεινής ζύμωσης πλεονεκτεί σε σχέση με άλλες διαδικασίες, καθώς πραγματοποιείται χωρίς την παρουσία φωτός και δεν απαιτεί O_2 για την παραγωγή H_2. Επιπρόσθετα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή άνθρακα διάφορα υποστρώματα, όπως απόβλητα με υψηλό οργανικό φορτίο, συμβάλλοντας έτσι στη βιοαποικοδόμησή τους και ταυτόχρονα μειώνοντας τις ανάγκες σε πρώτες ύλες. Ακόμη, εφόσον πολλά παραπροϊόντα της σκοτεινής ζύμωσης είναι οργανικές ενώσεις με εμπορική αξία, περιορίζεται η παραγωγή αποβλήτων και μειώνεται το οικονομικό κόστος της διαδικασίας.Από την άλλη, η διαδικασία αυτή έχει και ορισμένα μειονεκτήματα. Συγκεκριμένα, η δράση του ενζύμου υδρογονάση αναστέλλεται από το O_2 και συνακόλουθα αναστέλλεται η παραγωγή H_2. Επιπλέον, το H_2 που παράγεται δεν είναι απόλυτως καθαρό, αφού περιλαμβάνει προσμίξεις CO_2 συνεπώς, απαιτείται περαιτέρω κατεργασία του μείγματος αερίων για τον διαχωρισμό τους και την απομόνωση του καθαρού H_2 [2]. Τέλος, η απόδοση της παραγωγής H_2 διαφέρει ανάλογα με το στέλεχος μικροοργανισμού που χρησιμοποιείται. Για παράδειγμα, τα υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια του γένους *Clostridium sp.* έχουν μελετηθεί ευρύτατα για την παραγωγή βιολογικού υδρογόνου μέσω σκοτεινής ζύμωσης, αφού σε αυτούς έχει παρατηρηθεί η μεγαλύτερη παραγωγή H_2.[5] Σε άλλα βακτήρια όμως, όπως το *Enterobacter aerogenes* η παραγωγή H_2, είναι φανερά μικρότερη (0.1-0.3 mol

H_2/mol γλυκόζης έναντι 2.4-3.1 mol H_2/mol γλυκόζης στο *Clostridium butyricum DSM 10702* [6].

1.3 Γλυκόλυση – ρόλος υδρογονάσης

Κατά την αναερόβια διεργασία της γλυκόλυσης, ένα μόριο γλυκόζης μεταβολίζεται προς δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος, ενώ προκύπτουν και δύο μόρια ATP.[7] Το πυροσταφυλικό οξύ, με τη σειρά του, οξειδώνεται σε ακέτυλο-CoA από το οποίο προκύπτουν αρκετά προϊόντα μέσω ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων, όπως γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, βουτυρικό οξύ κ.ά. Οι υδρογονάσες είναι μεταλλοένζυμα που δρουν ως μεταφορείς ηλεκτρονίων και καταλύουν το σχηματισμό H_2, κατά τη μετατροπή του σε ακέτυλο-CoA, μέσω της αμφίδρομης αντίδρασης που παρατίθεται παρακάτω.

$$2\mathrm{H} + 2e^- \leftrightarrow H_2 \quad (5)$$

Υπάρχουν τρεις κύριες κατηγορίες υδρογονασών που απαντούν στους μικροοργανισμούς, αναλόγως των ατόμων μετάλλων που διαθέτουν στα ενεργά κέντρα τους: α) οι [NiFe]-, β) οι [FeFe]- και γ) οι [Fe]- υδρογονάσες. [3] Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, συνήθως οι [FeFe] – υδρογονάσες, είναι αυτές που συμμετέχουν στην παραγωγή του H_2 και επηρεάζονται σε μεγαλύτερο βαθμό από τις υπόλοιπες από την παρουσία O_2 [5].

Οι υδρογονάσες απαντούν σε διάφορες τάξεις μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, κυανοβακτήρια, αρχαία, μεθανογόνα και ευκαρυώτες, ενώ εμφανίζουν και διαφορετικές λειτουργίες. Ειδικότερα, μπορούν να καταλύουν ζυμώσεις, να δρουν ως αισθητήρες H_2 και να συμβάλλουν τη διατήρηση ενέργειας του μικροοργανισμού [5]. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αζωτοδεσμευτικά βακτήρια που ζουν ελεύθερα στο χώμα, όπως τα *Azotobacter sp.* ή που ζουν συμβιωτικά σε φυμάτια στις ρίζες των φυτών, όπως τα *Rhizobium sp.* και τα *Bradyrhizobium sp.*, οι υδρογονάσες μπορούν να ρυθμίζουν την ανακύκλωση του H_2 που προκύπτει ως παραπροϊόν κατά την καθήλωση του N_2 [8].

1.4 Καθήλωση του αζώτου – ρόλος νιτρογενάσης

Τα βακτήρια των οικογένειων *Rhizobiaceae* και *Bradyrhizobiaceae* αποτελούν τα κυριότερα α-πρωτεοβακτήρια που καθηλώνουν το ατμοσφαιρικό N_2 και μπορεί να ζουν είτε ελεύθερα στο χώμα, είτε να συμβιώνουν με ψυχανθή φυτά. Συγκεκριμένα, τα

βακτήρια της δεύτερης κατηγορίας, απαντώνται σε ειδικές δομές στις ρίζες των φυτών που ονομάζονται φυμάτια και εκεί πραγματοποιούν την καθήλωση του αζώτου [9]. Η βιολογική καθήλωση του αζώτου αφορά τη διαδικασία μετατροπής του ατμοσφαιρικού N_2 σε NH_3, NH_4^+ ή άλλες μορφές αζώτου χρήσιμες σε βιολογικές διεργασίες [10].

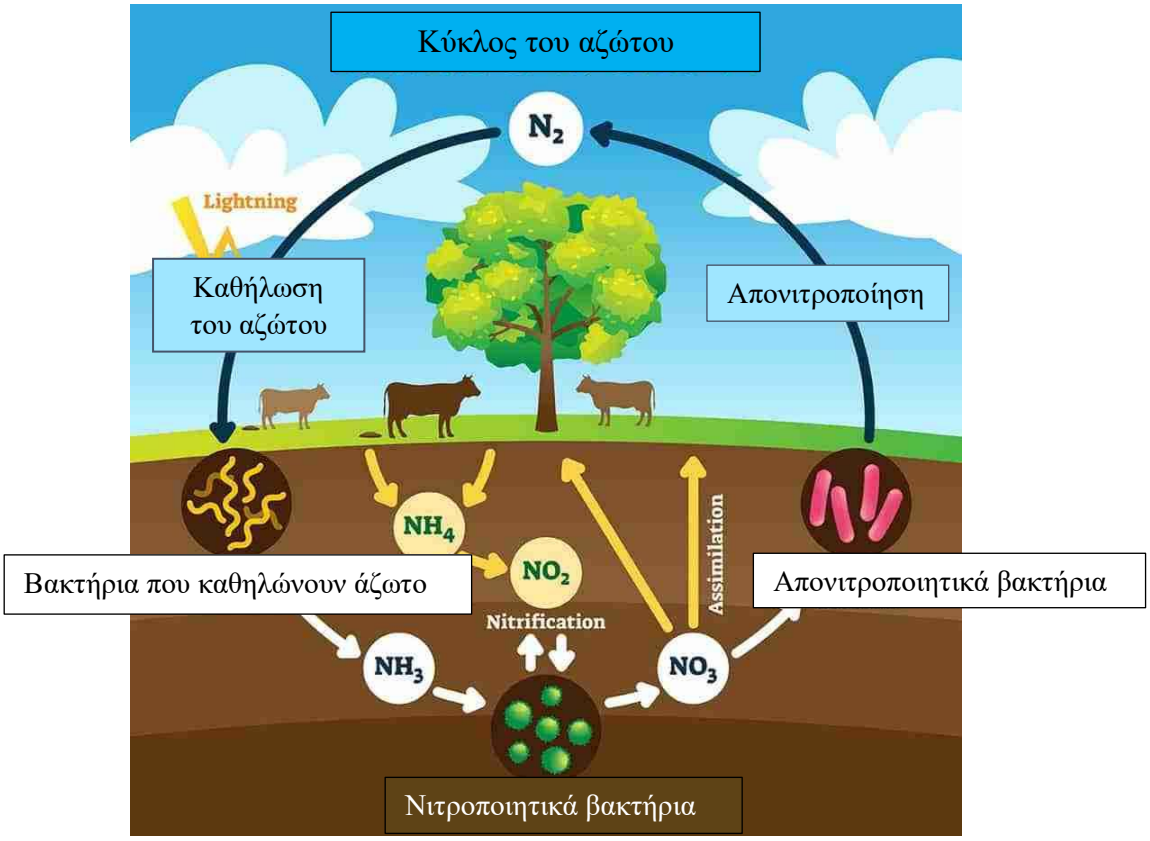
Τα κύρια ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση μετατροπής του ατμοσφαιρικού N_2 σε άλλες μορφές αζώτου είναι οι νιτρογενάσες, οι οποίες αναλόγως του μετάλλου που διαθέτουν στο ενεργό κέντρο τους εμφανίζονται σε τρεις μορφές: α) Mo-, β) Va- και γ) Fe- νιτρογενάσες. Η εκτενέστερα μελετημένη από τις παραπάνω είναι η Mo – νιτρογενάση, η οποία αποτελείται από δύο πρωτεΐνες, τη δινιτρογενάση και την αναγωγάση της δινιτρογενάσης. Το συγκεκριμένο ένζυμο καταλύει την ενδεργονική αντίδραση μετατροπής του ατμοσφαιρικού N_2 σε NH_3, κατά την οποία απαιτείται αρκετή ενέργεια σε μορφή ATP, όπως παρουσιάζεται στην αντίδραση 6. Ως παραπροϊόν της αντίδρασης προκύπτει H_2, συνεπώς η παραγωγή βιολογικού υδρογόνου μπορεί να πραγματοποιηθεί, εκτός από τη γλυκόλυση, και μέσω της καθήλωσης του ατμοσφαιρικού N_2. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η Mo – νιτρογενάση μπορεί να λειτουργήσει και απουσία ατμοσφαιρικού N_2, ως μία ATP – τροφοδοτούμενη υδρογονάση, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση [5]. Τέλος, άλλο ένα χαρακτηριστικό των ενζύμων αυτών αποτελεί η ευαισθησία τους στο O_2, το οποίο έχει τη δυνατότητα να αναστέλλει τη δράση τους μη αντιστρεπτά. Έτσι, μικροοργανισμοί που είναι υποχρεωτικά αερόβιοι ή προαιρετικά αερόβιοι, οφείλουν να διαθέτουν μηχανισμούς που να ρυθμίζουν την ποσότητα O_2 προστατεύοντας την νιτρογενάση [11].

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 \uparrow + 16ADP \quad (6)$$

$$8H^+ + 8e^- + 4ATP \rightarrow 4H_2 \uparrow + 4ADP \quad (7)$$

Η βιολογική καθήλωση του αζώτου μπορεί να αποτελεί μία αρκετά ενεργειακά δαπανηρή διαδικασία για τους μικροοργανισμούς, όμως είναι απαραίτητη για τη βιόσφαιρα. Ειδικότερα, η NH_3 που παράγεται μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση αμινοξέων που αποτελούν δομικούς λίθους στη σύνθεση νουκλεοτιδίων, βιταμινών και ορμονών, απαραίτητων στην ανάπτυξη του φυτού. Έτσι, η βιολογική καθήλωση του αζώτου συμβάλλει στη μείωση της χρήσης αζωτούχων λιπασμάτων, η παραγωγή των οποίων έχει υψηλό οικονομικό κόστος και οδηγεί στην εκπομπή μεγάλων ποσοτήτων CO_2 [12]. Ακόμη, τα μη συμβιωτικά βακτήρια που πραγματοποιούν την παραπάνω διαδικασία, συμμετέχουν στον κύκλο του αζώτου,

όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 2. Η NH_3 που παράγεται χρησιμοποιείται από νιτροποιητικά βακτήρια με σκοπό τη σύνθεση NO_2 και NO_3, τα οποία μετασχηματίζονται από απονιτροποιητικά βακτήρια για την απελευθέρωση N_2 στην ατμόσφαιρα.



Εικόνα 2: Διεργασίες στον κύκλο του αζώτου.

1.5 Ριζόβια βακτήρια – χαρακτηριστικά και συνθήκες ανάπτυξης

Η οικογένεια *Rhizobiaceae* περιλαμβάνει τα εξής γένη βακτηρίων: *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* και *Sinorhizobium* [9]. Τα βακτήρια του γένους *Bradyrhizobium* έχουν πιο αργή ανάπτυξη από τα υπόλοιπα γένη βακτηρίων της οικογένειας *Rhizobiaceae* και σχηματίζουν την οικογένεια *Bradyrhizobiaceae*. Η οικογένεια αυτή, συμπεριλαμβάνει γένη βακτηρίων που καθηλώνουν το ατμοσφαιρικό άζωτο και διαβιούν συμβιωτικά στα ριζικά φυμάτια των φυτών, αλλά αναπτύσσονται με πιο αργούς ρυθμούς σε σχέση με τα βακτήρια της οικογένειας *Rhizobiaceae* [13].

Τα βακτήρια της οικογένειας *Bradyrhizobiaceae*, ανήκουν στην κατηγορία των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, δηλαδή διαθέτουν ένα λεπτό τοίχωμα

πεπτιδογλυκάνης που περιβάλλεται από μία εξωτερική κυτταρική μεμβράνη. Ακόμη, εμφανίζουν σχήμα ράβδου, ενώ το μέγεθος τους κυμαίνεται από 0.5 – 1.3 μm σε πάχος και 1 – 5 μm σε μήκος. Αξίζει να σημειωθεί ότι, το μέγεθος και το σχήμα των βακτηρίων μπορεί να διαφέρει αναλόγως της φάσης ανάπτυξης, ενώ επίσης, επηρεάζεται από τις συνθήκες ανάπτυξης. Η οικογένεια *Bradyrhizobiaceae* περιλαμβάνει τα εξής γένη βακτηρίων: *Bradyrhizobium, Afipia, Agromonas, Blastobacter, Bosea, Nitrobacter, Oligotrophica, Rhodoblastus, Rhodopseudomonas* και *Salinarimonas*. Η σχέση του κάθε γένους βακτηρίου με το O_2 διαφέρει, αλλά η πλειονότητα των γενών ανήκει στην κατηγορία των αερόβιων βακτηρίων. Τα γένη *Nitrobacter* και *Oligotrophica* ανήκουν στην κατηγορία των προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών, ενώ τα γένη *Rhodoblastus, Rhodopseudomonas* και *Salinarimonas* μπορούν να αναπτύσσονται είτε σε περιβάλλοντα με χαμηλή ποσότητα O_2 2 – 10 % (μικροαερόφιλοι μικροοργανισμοί), είτε απουσία O_2 (υποχρεωτικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί) [12].

Εστιάζοντας στα βακτήρια του γένους *Bradyrhizobium,* καθώς στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ένας τέτοιος μικροοργανισμός, έχει παρατηρηθεί ότι σε στερεό θρεπτικό μέσο, αναπτύσσονται σε 5 – 6 ημέρες λευκές αδιαφανείς αποικίες με κοκκώδη όψη, οι οποίες έχουν διάμετρο περίπου 1 mm. Από την άλλη, σε υγρό θρεπτικό μέσο εμφανίζεται θολερότητα σε διάστημα 3 – 4 ημερών, που καταδεικνύει την αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού των βακτηρίων. Μπορούν να χαρακτηρισθούν ως μεσόφιλοι μικροοργανισμοί (εύρος θερμοκρασίας ανάπτυξης: 20 – 45 ^{o}C), καθώς η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξής τους είναι μεταξύ 25 – 30 ^{o}C. Τα εν λόγω βακτήρια, αναπτύσσονται βέλτιστα σε τιμές pH 6 – 7, αλλά έχουν τη δυνατότητα να επιβιώνουν και σε πιο όξινα περιβάλλοντα [12]. Σε συνθήκες όξινου pH (pH<5 ή κοντά στο 5), έχει παρατηρηθεί πως τα βακτήρια αυτά απαιτούν για την ανάπτυξή τους ιόντα Ca^{2+}. Συγκεκριμένα, τα ιόντα αυτά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στα ριζικά φυμάτια των ψυχανθών φυτών, ενώ επίσης συμβάλλουν στη σταθεροποίηση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων [14].

Διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στα ριζικά φυμάτια επηρεάζονται επίσης και από την ποσότητα φωσφόρου, σε μορφή φωσφορικών ιόντων. Οι απαιτήσεις σε φωσφορικά ιόντα διαφέρουν αναλόγως του γένους του ριζόβιου μικροοργανισμού. Τα πιο αργά αναπτυσσόμενα βακτήρια όπως τα Bradyrhizobium sp. δεν απαιτούν μεγάλες ποσότητες φωσφορικών ιόντων για την ανάπτυξη και τις λειτουργίες τους. Ακόμη, τα ιόντα αυτά συμμετέχουν και στην καθήλωση του N_2, συνεπώς είναι σημαντικό να

βρίσκονται σε αφθονία στα ριζικά φυμάτια, ώστε να πραγματοποιηθεί αυτή, η δαπανηρή από άποψη ενέργειας, διεργασία [15]. Η δημιουργία και ανάπτυξη των ριζικών φυματίων στα ψυχανθή φυτά έχει παρατηρηθεί να επηρεάζεται και σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου. Τα βακτήρια του γένους Bradyrhizobium λαμβάνουν το σίδηρο που απαιτείται για τις λειτουργίες τους, μέσω των ριζών του φυτού. Συνεπώς, σε συνθήκες έλλειψης του μετάλλου αυτού το φυτό δεν έχει τη δυνατότητα να το παρέχει στα βακτήρια στις απαιτούμενες ποσότητες. Έτσι, λειτουργίες όπως η δημιουργία φυματίων αλλά και η καθήλωση του αζώτου δε δύναται να πραγματοποιηθούν. Σημειώνεται ότι, κατά τη δεύτερη διαδικασία, ο σίδηρος είναι σημαντικός, αφού αποτελεί συμπαράγοντα του ενζύμου νιτρογενάση, που αποτελεί το βασικό ένζυμο που καταλύει την προαναφερθείσα διεργασία [16].

Τέλος, άλλος ένας παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη των βακτηρίων αυτών, είναι η αλατότητα του εδάφους, καθώς σε συνθήκες υψηλής αλατότητας εμφανίζονται φαινόμενα ώσμωσης που μπορούν να οδηγήσουν σε κυτταρική λύση. Ειδικότερα, υπάρχουν δύο κατηγορίες στελεχών Bradyrhizobium sp., τα στελέχη που αναπτύσσονται σε συνθήκες με ποσότητα NaCl έως 5%, και τα πιο ανθεκτικά στελέχη που επιβιώνουν σε συνθήκες με ποσότητα NaCl 7% [17].

1.6 Σκοπός διπλωματικής εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της παραγωγής βιολογικού H_2 και της καθήλωσης του αζώτου από ένα βακτήριο του γένους *Bradyrhizobium* σε συμβατικά θρεπτικά μέσα.

Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκαν μελέτες για τον προσδιορισμό του μεταβολικού μονοπατιού στο οποίο λαμβάνει χώρα η παραγωγή βιοϋδρογόνου. Αρχικά, ως πιθανή μεταβολική διεργασία μελετήθηκε η καθήλωση του N_2, ενώ στη συνέχεια διερευνήθηκε ο καταβολισμός της πηγής άνθρακα στο θρεπτικό μέσο. Πιο συγκεκριμένα, εξετάσθηκαν συνθήκες με διάφορες πηγές αζώτου, αέρια απαέρωσης και πηγές άνθρακα όπως, σάκχαρα και διάφορα αλλά οργανικά παράγωγα (ή μόρια, βάλε οποίο σου αρέσει περισσότερο) που εμφανίζονται στο μονοπάτι της γλυκόλυσης.

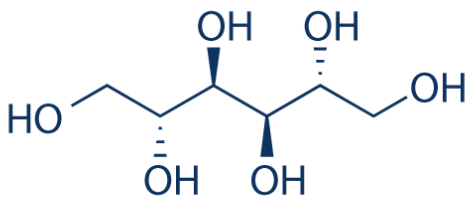
Επιπλέον, για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών παραγωγής βιολογικού H_2, μελετήθηκε ο ρόλος που διαδραματίζουν συστατικά του θρεπτικού μέσου εκτός της πηγής άνθρακα και αζώτου όπως, διάφορα μέταλλα και ιόντα.

Κεφάλαιο 2: Πειραματικό μέρος

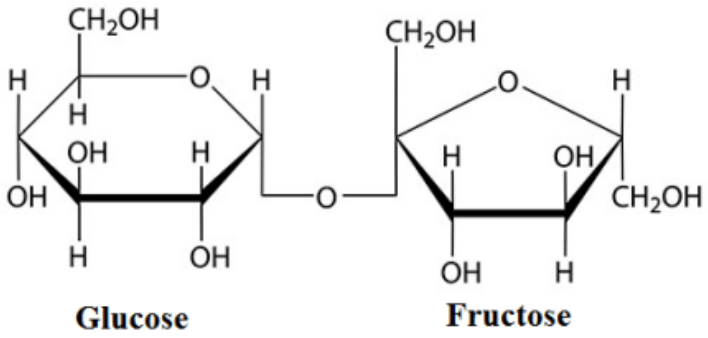
2.1 Συνθήκες ανάπτυξης Bradyrhizobium sp. σε κανονικό θρεπτικό μέσο

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε ένα βακτήριο του γένους *Bradyrhizobium* που αναπτύχθηκε σε συμβατικά θρεπτικά μέσα. Ο μικροοργανισμός απομονώθηκε από το χώμα και χαρακτηρίσθηκε γενετικά και μορφολογικά από μέλη του εργαστηρίου (τα αποτελέσματα αυτά δεν έχουν δημοσιευθεί).

Για την ανάπτυξη του βακτηρίου *Bradyrhizobium sp.* χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά μέσα YESB (Yeast Extract Sucrose Broth) και M3, η σύσταση των οποίων παρουσιάζεται στους πίνακες 2 και 3 αντίστοιχα. Το θρεπτικό μέσο YESB αποτελεί τροποποίηση του θρεπτικού μέσου YEMB (Yeast Extract Mannitol Broth), όπου αντί για το σάκχαρο μαννιτόλη περιλαμβάνει τησουκρόζη ως κύρια πηγή άνθρακα. Η μαννιτόλη είναι αλκοόλη με γλυκαντικές ιδιότητες, ενώ η σουκχρόζη αποτελεί τον δισακχαρίτη της γλυκόζης με τη φρουκτόζη. Οι δομές των δύο ενώσεων παρατίθενται στις εικόνες 3 και 4 αντίστοιχα, ενώ η σύσταση του θρεπτικού YEMB παρατίθεται στον πίνακα 4.



Εικόνα 3: Δομή μαννιτόλης.



Εικόνα 4: Δομή σουκρόζης.

Μία ακόμη τροποποίηση που πραγματοποιήθηκε στο θρεπτικό μέσο YEMB ήταν η ρύθμιση του pH από 6.8 (YEMB) σε 7,5 (YESB), με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (K_2HPO4 – KH_2PO_4). Από την άλλη μεριά, το θρεπτικό M3 ρυθμίζεται σε pH = 7,2 με διάλυμα βάσης KOH. Τα δύο θρεπτικά μέσα YESB και M3 που χρησιμοποιήθηκαν, εμφανίζουν ομοιότητες όσον αφορά τη σύστασή τους. Ειδικότερα, και τα δύο θρεπτικά περιλαμβάνουν σουκρόζη, $CaCO_3$, K_2HPO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl και NH_4Cl, σε διαφορετικές όμως συγκεντρώσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο το $CaCO_3$ όσο και ο $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ αποτελούν αδιάλυτα συστατικά του θρεπτικού μέσου.

Πίνακας 2: Σύσταση του θρεπτικού μέσου YESB.

YESB (Yeast Extract Sucrose Broth)	
Συστατικά	Ποσότητα σε g L^{-1}
Εκχύλισμα ζύμης[1]	1.0
Σουκρόζη	10.0
K_2HPO_4	0.9790
KH_2PO_4	0.1859
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.20
NaCl	0.10
$CaCO_3$	0.50
NH_4Cl	0.134

[1]Το εκχύλισμα ζύμης περιέχει αμινοξέα, ανόργανο άζωτο και ιχνοστοιχεία. [18]

Πίνακας 3: Σύσταση θρεπτικού μέσου M3.

M3	
Συστατικά	Ποσότητα σε g L^{-1}
Σουκρόζη	10.0
K_2HPO_4	1.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.50
NaCl	0.20
$CaCO_3$	20.0
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0
NH_4Cl	0.134

Πίνακας 4: Σύσταση του θρεπτικού μέσου YEMB.

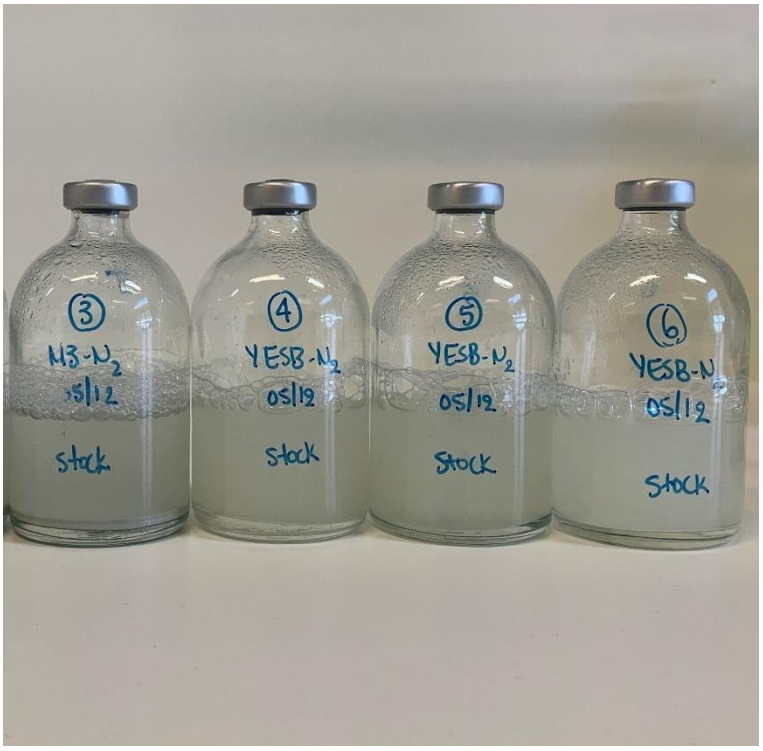
YEMB (Yeast Extract Mannitol Broth)	
Συστατικά	Ποσότητα σε g L^{-1}
Εκχύλισμα ζύμης[1]	1.0
Μαννιτόλη	10.0
K_2HPO_4	0.50
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.20
NaCl	0.10
$CaCO_3$	0.50
NH_4Cl	0.134

[1]Το εκχύλισμα ζύμης περιέχει αμινοξέα, ανόργανο άζωτο και ιχνοστοιχεία. [18]

2.2 Παρασκευή πειραματικών καλλιεργειών Bradyrhizobium sp.

Η διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε σε υγρές καλλιέργειες κυττάρων του στελέχους *Bradyrhizobium* sp. Για την παρασκευή των πειραματικών καλλιεργειών, σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα μπουκαλάκια (serum bottles) χωρητικότητας 120 mL, στα οποία η ποσότητα του θρεπτικού μέσου ήταν 50 mL. Ο εμβολιασμός των πειραματικών δειγμάτων με το βακτήριο πραγματοποιήθηκε μεταφέροντας γνωστή ποσότητα από μητρικές καλλιέργειες στα δείγματα, όπως περιγράφεται στην επόμενη παράγραφο. Έπειτα, τα μπουκαλάκια κλείνονται ερμητικά με butyl septa και σφραγίζουν με μεταλλικά δακτυλίδια (aluminum crimp caps, N20), για την εξασφάλιση ασηπτικών και αναερόβιων συνθηκών. Ύστερα, πραγματοποιείται απαέρωση με αέριο N_2 για 2 λεπτά ανά φιαλίδιο, και τα φιαλίδια τοποθετούνται σε οριζόντιο περιστροφικό αναδευτήρα στα 140 rpm στους 32°C για 7 ημέρες. Σημειώνεται ότι στις πειραματικές σειρές της ενότητας 3.2.1, όπου χρησιμοποιήθηκαν τα αέρια απαέρωσης CO_2 και He, ότι η διαδικασία απαέρωσης είναι ίδια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω για το N_2. Τα θρεπτικά μέσα και σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν πριν από κάθε διαδικασία παρασκευής των πειραματικών καλλιεργειών αποστειρώνονταν στους 120°C για 20 λεπτά για την αποφυγή επιμολύνσεων.

Καλλιέργειες του μικροοργανισμού στο θρεπτικό μέσο YESB, στο τέλος της εκθετικής φάσης, χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή stock δειγμάτων μητρικών καλλιεργειών του βακτηρίου (aliquots), τα οποία ήταν αποθηκευμένα σε καταψύκτη στους -80 ^{o}C. Τα διαλύματα stock περιλάμβαναν το θρεπτικό μέσο YESB, στο οποίο είχε προστεθεί ως κρυοπροστατευτικό γλυκερόλη 20 % v/v και ήταν συμπυκνωμένα σε όγκο 4× του αρχικού. Για παρασκευή των πειραματικών δειγμάτων, 200 μL από το stock μεταφέρθηκανσε κάθε δείγμα, όπως παρουσιάζονται στην εικόνα 5. Σημειώνεται πως στα φιαλίδια που απεικονίζονται, έχει ήδη προστεθεί η βακτηριακή καλλιέργεια και έχει πραγματοποιηθεί και απαέρωση με αέριο N_2. Επιπλέον, στα μπουκαλάκια είναι ορατά τα αδιάλυτα άλατα του $CaCO_3$ και $FeSO_4$.



Εικόνα 5: Φιαλίδια πειράματος με θρεπτικό μέσο YESB και απαέρωση με N_2.

2.3 Μετρήσεις pH

Πραγματοποιούνταν μετρήσεις pH του θρεπτικού μέσου με ηλεκτρόδιο υάλου μετά την αποστείρωση στο αυτόκαυστο, αλλά και μετρήσεις του pH της καλλιέργειας κατά την 7η ημέρα ανάπτυξης. Στη δεύτερη περίπτωση, πριν τη μέτρηση του pH, η καλλιέργεια φυγοκεντρούταν στα 10000 xg για 10 λεπτά και συλλεγόταν το υπερκείμενο, του οποίου το pH μετρούταν.

2.4 Μετρήσεις ποσότητας υδρογόνου με αέρια χρωματογραφία

Η παραγωγή υδρογόνου μετρούταν σε αέριο χρωματογράφο με ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας (GC – TCD) με το όργανο Shimadzu GC 2010 Plus, στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (TCD) και τριχοειδής στήλη Vici Metronics MC (Poulsbo, USA) μήκους 30 m, διαμέτρου 0,53 mm και στατικής φάσης πάχους 20 μm. Για τον διαχωρισμό των αερίων χρησιμοποιήθηκε ως το αργό (Ar) ως φέρον αέριο, με πίεση 5 bar. Η θερμοκρασία του φούρνου που βρισκόταν η στήλη ήταν 120°C, του ανιχνευτή TCD στους 200°C ενώ του injector στους 180°C Οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν αμέσως

μετά την απαέρωση με αέριο N_2 (ημέρα 0) και την 7η ημέρα ανάπτυξης. Οι παράμετροι του οργάνου παρατίθενται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 5: Παράμετροι χειρισμού αέριου χρωματογράφου με ανιχνευτή TCD.

Φέρον αέριο	Ar
Θερμοκρασία injector	180,0 ºC
Πίεση	59,8 kPa
Ολική ροή	42,8 mL/min
Purge ροή	Κλειστή
Θερμοκρασία στήλης	60,0 ºC
Θερμοκρασία ανιχνευτή	200,0 ºC
Ροή makeup αερίου	8,0 mL/min

Η ποσότητα H_2 που παράγεται προσδιορίσθηκε μέσω κατασκευής πρότυπης καμπύλης, κατά την οποία πραγματοποιήθηκαν ενέσεις γνωστής ποσότητας καθαρού H_2 στον αέριο χρωματογράφο. Πρότυπη καμπύλη κατασκευάσθηκε παρομοίως για την ποσότητα του N_2 αλλά και του O_2. Συγκεκριμένα, οι μετρήσεις της ποσότητας O_2 χρησιμοποιήθηκαν ως απόδειξη της αποτελεσματικής απαέρωσης του θρεπτικού μέσου. Οι εξισώσεις που προέκυψαν από τις καμπύλες, παρατίθενται παρακάτω και μέσω αυτών πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της ποσότητας H_2 και N_2 σε mL L^{-1} βακτηριακής καλλιέργειας, στις πειραματικές σειρές που πραγματοποιήθηκαν.

Ποσότητα H_2 για τιμές εμβαδού κορυφής χρωματογραφήματος μικρότερες από 10^6

$$H_2(mL\ L^{-1} culture^{-1}) = \frac{Εμβαδόν\ κορυφής - 3013.8249}{18631.9517} \quad (8)$$

Ποσότητα H_2 για τιμές εμβαδού κορυφής χρωματογραφήματος μεγαλύτερες από 10^6

$$H_2(mL\ L^{-1} culture^{-1}) = \frac{Εμβαδόν\ κορυφής - 143969.9912}{165614.47492} \quad (9)$$

Ποσότητα N_2

$$N_2(mL\ L^{-1}culture^{-1}) = \frac{Εμβαδόν\ κορυφής - 1957.07224}{1669.90256} \quad (10)$$

Ποσότητα O_2

$$O_2(mL\ L^{-1}culture^{-1}) = \frac{Εμβαδόν\ κορυφής + 4443.38}{2040.33} \quad (11)$$

2.5 Ποσοτικός προσδιορισμός σακχάρων

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των σακχάρων πραγματοποιήθηκε την 7η ημέρα ανάπτυξης με τη μέθοδο θυμόλης – θειικού οξέος. Η καλλιέργεια φυγοκεντρούταν στα 2500 xg για 10 λεπτά και συλλεγόταν το υπερκείμενο σε φιαλίδια τύπου Eppendorf. Ύστερα, σε 100 μL υπερκειμένου, προστέθηκαν 300 μL αντιδραστηρίου θυμόλης που παρασκευάστηκε προσθέτοντας 1 mg θυμόλης σε 1 mL H_2SO_4. Πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση του μείγματος του υπερκειμένου με το αντιδραστήριο θυμόλης σε αναδευτήρα vortex και στη συνέχεια το μείγμα επωάστηκε στους 110°C για 30 λεπτά. Η ίδια διαδικασία εφαρμόστηκε και σε μείγμα 100 μL απιονισμένου νερού με 300 μL αντιδραστηρίου θυμόλης, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό δείγμα. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 509 nm σε φασματοφωτόμερο. Η ποσοτικοποίηση του σακχάρου πραγματοποιήθηκε μέσω πρότυπης καμπύλης που κατασκευάσθηκε με γνωστές συγκεντρώσεις γλυκόζης με τη διαδικασία που αναφέρεται παραπάνω.

Σημειώνεται ότι το αντιδραστήριο θυμόλης – θειικού αντιδρά μόνο με μονοσακχαρίτες, συνεπώς για την ανάλυση δισακχαριτών πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου προηγήθηκε αντίδραση όξινης υδρόλυση του σακχάρου με HCl 4M. Συγκεκριμένα, σε ποσότητα υπερκειμένου καλλιέργειας που είχε φυγοκεντρηθεί στα 2500 xg για 10 λεπτά, προστέθηκε ίση ποσότητα HCl 2M. Το δείγμα αναδεύτηκε σε Vortex και ύστερα επωάστηκε στους 100 °C για 2 ώρες. Στη συνέχεια ακολουθήθηκαν τα βήματα που περιγράφονται παραπάνω.

2.6 Προετοιμασία δειγμάτων για φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (^1H – NMR)

Μικρή ποσότητα καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε την 7η ημέρα ανάπτυξης, σε φιαλίδια τύπου Eppendorf για 10 λεπτά στα 10000 xg. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό φιαλίδιο Eppendorf και πέρασε από φίλτρο 0,22 μm για να απομακρυνθούν υπολείμματα από τα βακτήρια ή τα αδιάλυτα άλατα του θρεπτικού μέσου. Ύστερα, 600 μL του φιλτραρισμένου υπερκειμένου αραιώθηκαν με 100 μL D_2O και το διάλυμα τοποθετήθηκε σε γυάλινο σωλήνα δειγμάτων NMR.

2.7 Προετοιμασία δειγμάτων για παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο

Για την παρατήρηση των δειγμάτων καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε το οπτικό μικροσκόπιο Nikon SC Binocular Microscope. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν μέσω ενός ελαιοβυθιζόμενου αντικειμενικού φακού μεγένθυσης 100x, και η συνολική μεγέθυνση στην οποία παρατηρήθηκαν τα δείγματα ήταν στα 1000x.

2.8 Προετοιμασία δειγμάτων για παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM)

Για την παρατήρηση των βακτηρίων *Bradyrhizobium sp.* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM), ακολουθείται πρωτόκολλο το οποίο περιλαμβάνει: α) την πλήρη απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου μέσω εκπλύσεων με ρυθμιστικό διάλυμα διμεθυλαρσινικού (κακοδυλικού) νατρίου 0,1 M, pH=7,4 (sodium cacodylate buffer, SCB), β) τη μονιμοποίηση των βακτηριακών κυττάρων με διάλυμα 2% γλουταρικής αλδεΰδης (glutaraldehyde, GDA) και 2% παραφορμαλδεΰδης (paraformaldehyde, PFA) σε διάλυμα SCB, γ) απομάκρυνση του διαλύματος μονιμοποιητών μέσω εκπλύσεων με διάλυμα SCB, δ) αφυδάτωση με διαδοχικά ξεπλύματα με διαλύματα αιθανόλης, σε αυξανόμενη συγκέντρωση και τέλος, ε) ξήρανση με δις-τριμεθυλσιλυλαμίνη (HMDS), ζ) εξάτμιση HMDS, η) επικάλυψη με στρώμα χρυσού που καθιστά τα δείγματα ηλεκτρικά αγώγιμα (sputtering), θ) παρατήρηση.

Αρχικά, μικρή ποσότητα καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στα 10000 xg σε σωλήνες τύπου Eppendorf. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε ποσότητα 200 – 300 μL SCB. Το δείγμα αφέθηκε για 10 λεπτά στους 4°C και έπειτα φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στα 10000 xg. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλη μία φορά. Ύστερα από τη δεύτερη

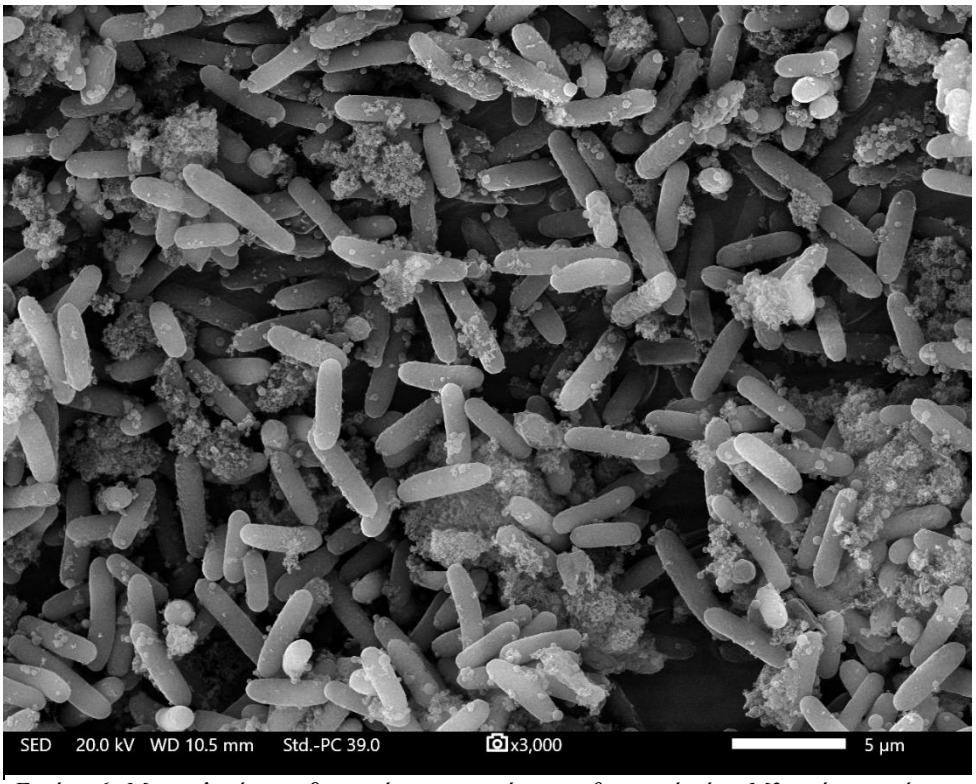
φυγοκέντριση και απόρριψη του υπερκειμένου, προστέθηκε ίδια ποσότητα από το διάλυμα μονιμοποιητών και το δείγμα αφέθηκε στους 4ºC για 45 λεπτά. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση για 5 λεπτά στα 10000 xg, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και τα κύτταρα εκπλύθηκαν με SCB δύο φορές. Στη συνέχεια, ακολούθησαν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και επαναιωρήσεις των κυττάρων σε διαλύματα καθαρής αιθανόλης περιεκτικότητας 20, 30, 50, 70, 90 και 100 % v/v σε νερό. Ειδικότερα, τα κύτταρα παρέμεναν για 10 λεπτά με κάθε διάλυμα αιθανόλης σε θερμοκρασία δωματίου και ύστερα φυγοκεντρούνταν για 5 λεπτά στα 10000 xg. Μετά τη φυγοκέντριση των κυττάρων με την αιθανόλη 100% v/v, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και προστέθηκε μικρή ποσότητα διαλύματος HMDS 50 % v/v σε καθαρή αιθανόλη. Τα κύτταρα παρέμειναν στο διάλυμα για 10 λεπτά και ακολούθησε φυγοκέντριση για 5 λεπτά στα 10000 xg. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε μικρή ποσότητα καθαρού HMDS και αφέθηκαν για μια ημέρα σε ανοιχτά φιαλίδια Eppendorf μέσα σε απαγωγό εστία, ώστε να απομακρυνθεί η αιθανόλη και να πραγματοποιηθεί πλήρης ξήρανση αυτών. Πριν την παρατήρηση των δειγμάτων στο μικροσκόπιο πραγματοποιήθηκε η διαδικασία του sputteringπραγματοποιήθηκε μέσω του οργάνου Sputter Coater SCD 050 της BAL-TEC για 58 δευτερόλεπτα σε ένταση 40 mA που αποδίδει περίπου 10 nm πάχος στοιβάδα χρυσού. Η παρατήρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο όργανο ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης JSM-IT700HR Field Emission SEM της JEOL, σε διαφορά δυναμικού 20 kV.

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά μικροοργανισμού

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία αποτελεί ένα βακτήριο το οποίο ανήκει στην οικογένεια των *Bradyrhizobiaceae* και συγκεκριμένα στο γένος *Bradyrhizobium*, σύμφωνα με αποτελέσματα φυλογενετικής ταξινόμησης που πραγματοποιήθηκαν από την ομάδα του εργαστηρίου μας (αδημοσίευτα αποτελέσματα). Στις εικόνες 6, 7 και 8 που παρατίθενται παρακάτω, κύτταρα του βακτηρίου που αναπτύχθηκαν στο θρεπτικό μέσο M3. Παρατηρείται, σύμφωνα με την εικόνα 6, πως τα κύτταρα έχουν ραβδοειδές σχήμα, πάχος 0,5 μm και μήκος 4 – 5 μm. Τα δεδομένα αυτά ταυτίζονται με τα αναμενόμενα της βιβλιογραφίας για τα βακτήρια

του γένους *Bradyrhizobium* [12]. Ακόμη, από τις εικόνες 6 και 7 γίνεται αντιληπτό πως σχηματίζονται συσσωματώματα κυττάρων, τα οποία πιθανώς να ευνοούν την ανάπτυξή του. Η εικόνα 6 έχει ληφθεί από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, ενώ οι εικόνες 7 και 8 από οπτικό μικροσκόπιο σε φακό μεγένθυσης 100x. Για την προετοιμασία των δειγμάτων ακολουθήθηκαν τα πρωτόκολλα που αναφέρονται στις ενότητες 2.6 και 2.7 αντίστοιχα. Τα δείγματα λήφθηκαν από καλλιέργειες σε θρεπτικό μέσο M3 που είχαν αναπτυχθεί σε pH = 7,2, 32°C σε οριζόντιο περιστροφικό αναδευτήρα στα 140 rpm. Στην εικόνα 8 διακρίνεται η δομή του $CaCO_3$, το οποίο αποτελεί αδιάλυτο συστατικό του θρεπτικού μέσου M3.



Εικόνα 6: Μορφολογία του βακτηρίου επωασμένου σε θρεπτικό μέσο M3 από παρατήρηση μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM).

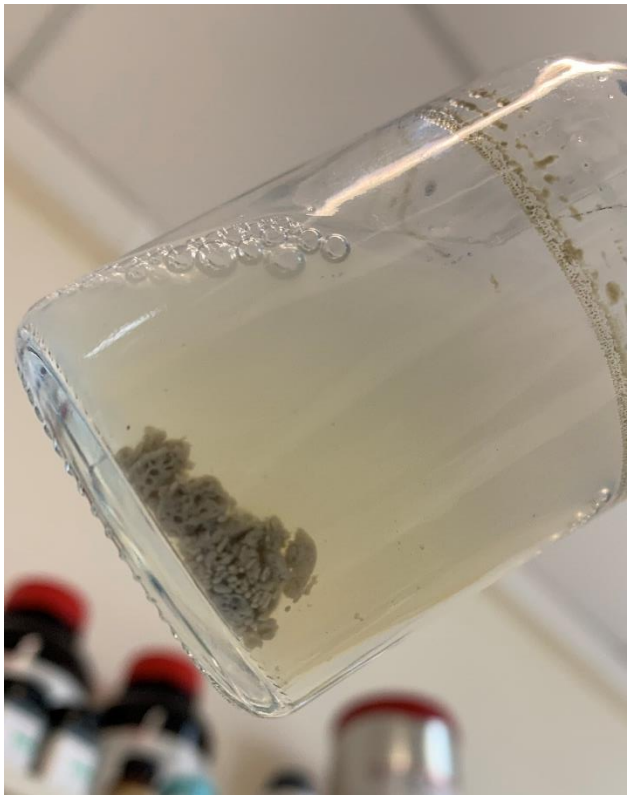
Εικόνα 7: Μορφολογία του βακτηρίου επωασμένου σε θρεπτικό μέσο M3 από παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο.

Εικόνα 8: Μορφολογία του βακτηρίου επωασμένου σε θρεπτικό μέσο M3 από παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο.

Σε στερεές καλλιέργειες YESA, όπου στο θρεπτικό μέσο YESB έχει προστεθεί ποσότητα 1,5% άγαρ, παρατηρείται ότι το βακτήριο σχηματίζει λευκές στρογγυλές μοναδιαίες αποικίες που έχουν γλοιώδη υφή και παρουσιάζονται στην εικόνα 9. Οι παρατηρούμενες καλλιέργειες συνάδουν με τις βιβλιογραφικές αναφορές για τα βακτήρια της οικογένειας *Bradyrhizobiaceae* που έχουν παρουσιασθεί στην ενότητα 1,5 [12].

Εικόνα 9: Τρυβλία Petri με θρεπτικό μέσο YESA και αποικίες του βακτηρίου Bradyrhizobium sp..

Σε υγρές καλλιέργειες, η πρώτη ένδειξη για την ανάπτυξη του βακτηρίου αποτελεί η θολερότητα του θρεπτικού μέσου και εμφανίζεται κατά τη πρώτη ή τη δεύτερη ημέρα επώασης. Κατά την 7η και τελευταία ημέρα επώασης, στον πάτο των υάλινων φιαλιδίων παρατηρούνται συσσωματώματα κυττάρων όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 10. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η παρατήρηση θολερότητας κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου είναι αναμενόμενη και σε αντίθεση με τις καλλιέργειες του εργαστηρίου μας, εμφανίζεται κατά την 3η ή 4η ημέρα επώασης. *(The Family Bradyrhizobiaceae)* [12]. Σημειώνεται ότι δεν έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ο σχηματισμός συσσωματωμάτων από τα βακτήρια του γένους Bradyrhizobium sp. σε εργαστηριακές συνθήκες ανάπτυξης σε υγρές καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο YESB ή M3.



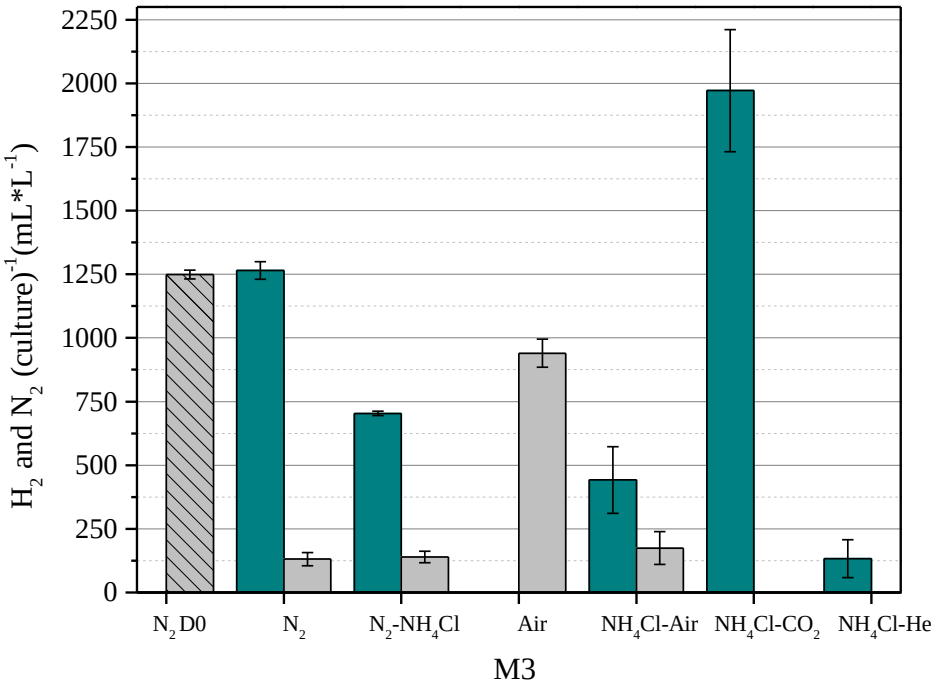
Εικόνα 10: Συσσωματώματα κυττάρων την 7η ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο M3.

3.2 Σχέση παραγωγής H_2 με καθήλωση του αζώτου

3.2.1 Αέριο απαέρωσης και πηγές N_2 στο θρεπτικό μέσο M3

Στις εν λόγω πειραματικές σειρές μελετήθηκε η παραγωγή H_2, μέσω της καθήλωσης του αζώτου από τον μικροοργανισμό. Το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης του

μικροοργανισμού στις σειρές αυτές ήταν το M3. Μελετήθηκαν συνθήκες απαέρωσης με N_2 (συνθήκη μάρτυρα) (ενότητα 2.1), CO_2, He και συνθήκες χωρίς απαέρωση, όπου ως πηγή N_2 λειτούργησε το N_2 του ατμοσφαιρικού αέρα (78% N_2 και 21% O_2). Στις συνθήκες με άερια απαέρωσης CO_2 και He είχε προστεθεί στο θρεπτικό μέσο M3, το NH_4Cl ως πηγή αζώτου. Επιπλέον, μελετήθηκαν και συνθήκες απαέρωσης με N_2 αλλά και με ατμοσφαιρικό αέρα στις οποίες είχε προστεθεί NH_4Cl. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων παρουσιάζονται στο διάγραμμα 1. Επισημαίνεται ότι σε όλες τις συνθήκες που έγινε απαέρωση με οποιοδήποτε αέριο δεν ανιχνευόταν O_2 στον αέριο χρωματογράφο.



Διάγραμμα 1: Ποσότητα H_2 που παράγεται από το βακτήριο Bradyrhizobium sp. και N_2 που παραμένει στο φιαλίδιο την τελευταία ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας, συναρτήσει συνθηκών ανάπτυξης με πηγή αζώτου και αέριο απαέρωσης διαφορετικό από τη συνθήκη του μάρτυρα. Οι ποσότητες των αερίων προσδιορίζονται σε mL L-1 culture -1 μέσω των εξισώσεων 8, 9 και 10 της ενότητας 2.4 και εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την $7^{η}$ ημέρα επώασης της καλλιέργειας σε τριπλέτα δειγμάτων, εκτός από τη συνθήκη M3-N_2 D0 που οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τριπλέτα δειγμάτων αμέσως μετά την απαέρωση με N_2 (ημέρα 0).

Στο διάγραμμα 1, παρουσιάζεται με μπλε χρώμα η ποσότητα H_2 σε mL που παράγεται ανά L βακτηριακής καλλιέργειας. Με γκρι χρώμα παρουσιάζεται η ποσότητα N_2 σε mL που έχει απομείνει στο φιαλίδιο ανά L βακτηριακής καλλιέργειας. Ακόμη, η στήλη γκρι χρώματος με σκίαση απεικονίζει την ποσότητα N_2 που υπάρχει

στο φιαλίδιο την ημέρα 0, δηλαδή την ημέρα όπου προστέθηκε η βακτηριακή καλλιέργεια στο θρεπτικό μέσο. Από τη διαφορά στο ύψος των στηλών του H_2 μπορεί να προσδιορισθεί το ποσό N_2 σε mL που έχει καθηλώσει ο μικροοργανισμός την 7η ημέρα ανάπτυξης. Στον άξονα των y παρουσιάζονται τα mL H_2 και N_2 ανά L βακτηριακής καλλιέργειας σε συνάρτηση των συνθηκών του θρεπτικού μέσου M3.

Στο διάγραμμα παρατηρείται ότι η συνθήκη όπου στο θρεπτικό μέσο M3 έχει προστεθεί NH_4Cl και έχει πραγματοποιηθεί απαέρωση με N_2, δεν εμφανίζει μεγαλύτερη παραγωγή υδρογόνου από τη συνθήκη του μάρτυρα όπως αναμενόταν. Παρόλο που η καθήλωση του N_2 είναι σε αρκετά κοντινές τιμές για τις δύο συνθήκες, η διαφορά στην τιμή H_2 που παράγεται είναι περίπου στα 600 mL L-1 καλλιέργειας. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αφομοίωση του NH_4^+ ως πηγή αζώτου, δεν επιδρά στη διεργασία καθήλωσης του αζώτου στους ριζόβιους μικροοργανισμούς [19]. Παρόλα αυτά, έχει παρατηρηθεί ότι επηρεάζει την παραγωγή υδρογόνου, καθώς παρεμποδίζει τη σύνθεση της νιτρογενάσης. Συγκεκριμένα, σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν παρατηρήθηκε ότι παρουσία NH_4^+ η παραγωγή H_2 από τα βακτήρια καθυστερεί σε σχέση με τη συνθήκη του μάρτυρα και μάλιστα ξεκινά αφού έχει καταναλωθεί η μεγαλύτερη ποσότητα NH_4^+. Επίσης, σύμφωνα με την ίδια μελέτη, η ποσότητα H_2 που παράγεται είναι αντιστρόφως ανάλογη της ποσότητας NH_4^+ που έχει προστεθεί στο θρεπτικό μέσο [20]. Συνεπώς, η διαφορά στην ποσότητα H_2 που παράγεται στην εν λόγω συνθήκη και τη συνθήκη του μάρτυρα στο διάγραμμα 1, οφείλεται τόσο στην ποσότητα του NH_4^+, όσο και στην ημέρα τερματισμού του πειράματος. Ενδεχομένως να παρατηρούταν διαφορετική ποσότητα H_2, πιθανώς πιο κοντά στην τιμή της συνθήκης ελέγχου, εάν στη συνθήκη παρουσία NH_4^+, ο μικροοργανισμός επωαζόταν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Όσον αφορά τη συνθήκη όπου δεν έχει πραγματοποιηθεί απαέρωση, παρατηρείται ότι ο μικροοργανισμός δεν έχει παράξει καθόλου H_2, ενώ έχει καθηλώσει και μικρότερη ποσότητα αζώτου σε σχέση με τη συνθήκη του μάρτυρα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η νιτρογενάση, το κύριο ένζυμο που καταλύει την καθήλωση του αζώτου, εμφανίζει ευαισθησία στο O_2. Συγκεκριμένα, το O_2 προκαλεί την οξείδωση των μετάλλων του ενεργού κέντρου του ενζύμου, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο ρυθμός παραγωγής H_2 [21]. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι στη συγκεκριμένη συνθήκη, η ανάπτυξη του μικροοργανισμού δεν ήταν η αναμενόμενη. Το γεγονός αυτό, καταδεικνύει ότι η αδυναμία παραγωγής υδρογόνου δύναται να οφείλεται στη σχέση

του βακτηρίου με το O_2. Βιβλιογραφικά, τα βακτήρια του γένους Bradyrhizobium sp. χαρακτηρίζονται ως αερόβια, παρόλα αυτά δεν αποκλείεται το γεγονός η σχέση του είδους βακτηρίου που μελετήθηκε στο εργαστήριο να αποκλίνει από την αναμενόμενη [12].

Στη συνθήκη όπου ο μικροοργανισμός είχε ως πηγή αζώτου τόσο το ατμοσφαιρικό άζωτο, όσο και άζωτο σε μορφή κατιόντων NH_4^+, παρατηρήθηκε αρκετά μειωμένη παραγωγή H_2 σε σχέση με τη συνθήκη του μάρτυρα. Όπως αναφέρεται και παραπάνω, η νιτρογενάση υπολειτουργεί παρουσία O_2, γεγονός που οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή H_2. Ακόμη, η ποσότητα H_2 που παράγεται στη συνθήκη αυτή, ενδέχεται να σχετίζεται και με τη σχέση του βακτηρίου με το O_2. Επιπλέον, συγκρίνοντας τη συνθήκη αυτή, με τη συνθήκη όπου ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται με μοναδική πηγή αζώτου το ατμοσφαιρικό N_2, διαπιστώνεται ότι το NH_4^+ ευνοεί την καθήλωση του αζώτου, αλλά και την παραγωγή H_2. Συνεπώς, το κατιόν NH_4^+ ενδέχεται να προστατεύει τη νιτρογενάση από το O_2 της ατμόσφαιρας, επιτρέποντας της να καταλύσει την αντίδραση καθήλωσης του αζώτου και παραγωγής H_2. Από την άλλη μεριά, συγκρίνοντας την συνθήκη αυτή με τη συνθήκη του μάρτυρα, αλλά και τη συνθήκη όπου εκτός από απαέρωση με N_2 στο θρεπτικό μέσο έχει πραγματοποιηθεί προσθήκη NH_4Cl, παρατηρείται ότι η ποσότητα N_2 που έχει καθηλωθεί από τον μικροοργανισμό είναι παρόμοια. Αντιθέτως, η ποσότητα H_2 στη συνθήκη αυτή, είναι μικρότερη σε σχέση με τη συνθήκη του μάρτυρα αλλά και τη συνθήκη όπου έχει προστεθεί ως επιπλέον πηγή αζώτου, εκτός από το αέριο N_2 της απαέρωσης, το NH_4Cl. Οι διαπιστώσεις αυτές σχετίζονται με την ευαισθησία της νιτρογενάσης στο O_2, αλλά και το ρόλο του NH_4^+ στην καθήλωση του αζώτου και την παραγωγή του H_2, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω.

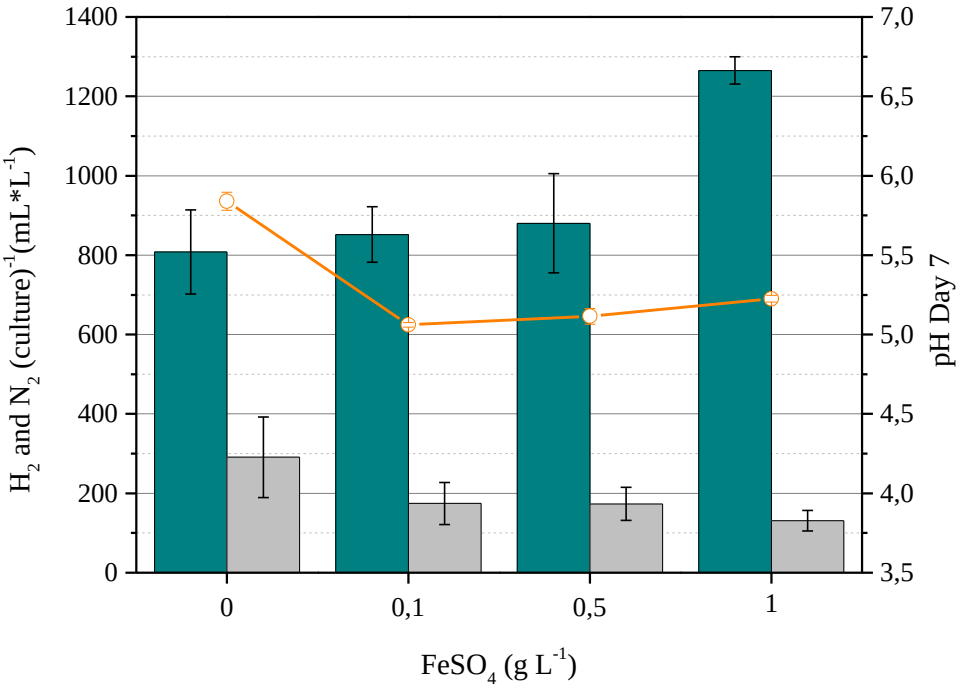
Όσον αφορά τη συνθήκη όπου έχει πραγματοποιηθεί απαέρωση με He, που αποτελεί αδρανές αέριο, αλλά έχει προστεθεί και NH_4Cl ως πηγή αζώτου στο θρεπτικό μέσο, παρατηρείται ότι η ποσότητα H_2 που παράγεται είναι σημαντικά μικρότερη από τη συνθήκη του μάρτυρα. Πιο συγκεκριμένα, η διαφορά στις τιμές του H_2 που παράγεται μεταξύ των συνθηκών είναι περίπου 1125 mL L^{-1}. Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι το NH_4^+ δε σχετίζεται με τη διεργασία καθήλωσης του αζώτου, αλλά επηρεάζει το ένζυμο νιτρογενάση και συνάμα την παραγωγή H_2 που αποτελεί παραπροϊόν της συγκεκριμένης διαδικασίας. Από τα δεδομένα του διαγράμματος συνεπώς προκύπτει ο εξής προβληματισμός: Με ποιον τρόπο πραγματοποιείται η παραγωγή H_2 από τη στιγμή που ως μοναδική πηγή αζώτου

στο θρεπτικό μέσο είναι το NH_4^+, το οποίο δε συνδέεται με την καθήλωση του αζώτου. Ο προβληματισμός αυτός, εντείνεται και από την ποσότητα H_2 που έχει παραχθεί στη συνθήκη με αέριο απαέρωσης το CO_2. Ειδικότερα, στη συνθήκη αυτή, παρατηρείται τιμή H_2 που ξεπερνά κατά πολύ την τιμή της συνθήκης ελέγχου, συνεπώς το NH_4Cl δεν επιδρά αρνητικά στην παραγωγή H_2, όπως έχει παρατηρηθεί βιβλιογραφικά. Συνεπώς η παραγωγή H_2 ενδέχεται να μην οφείλεται στο ένζυμο νιτρογενάση και στη διεργασία της καθήλωσης του αζώτου, αλλά να προέρχεται από κάποια άλλη διεργασία που απαιτεί λιγότερη ενέργεια. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η παραγωγή H_2, μπορεί να οφείλεται και στο ένζυμο υδρογονάση, του οποίου η σχέση με το NH_4^+ δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως [20]. Δύναται συνεπώς, η παραγωγή H_2 στις συνθήκες που μελετήθηκαν σε αυτή την πειραματική σειρά, να οφείλεται στο ένζυμο υδρογονάση, που συμμετέχει στη γλυκόλυση, και όχι στο ένζυμο νιτρογενάση που καταλύει τη διέργασία καθήλωσης του αζώτου.

3.3 Επίδραση συστατικών του θρεπτικού μέσου M3 στην παραγωγή H_2

3.3.1 Επίδραση του $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ στην παραγωγή H_2

Στις εν λόγω πειραματικές σειρές μελετήθηκε η επίδραση της ποσότητας του $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, που αποτελεί αδιάλυτο συστατικό του θρεπτικού μέσου M3, στην παραγωγή H_2 από το βακτήριο *Bradyrhizobium sp.*. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν συγκεντρώσεις $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0 g L^{-1}, 0.1 g L^{-1} και 0,5 g L^{-1} οι οποίες είναι μικρότερες από τη συγκέντρωση του $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ στη συνθήκη του μάρτυρα (1 g L^{-1}). Παράλληλα, μελετήθηκε η επίδραση της ποσότητας του άλατος στην καθήλωση του αζώτου αλλά και στην τιμή του pH την $7^η$ ημέρα της βακτηριακής καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών παρουσιάζονται στο διάγραμμα 2.



Διάγραμμα 2: Ποσότητα H_2 που παράγεται από το βακτήριο Bradyrhizobium sp. σε mL L^{-1} culture^{-1}, ποσότητα N_2 που παραμένει στο φιαλίδιο την τελευταία ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας σε mL L^{-1} culture^{-1}, αλλά και τιμή pH την ημέρα αυτή , συναρτήσει συνθηκών ανάπτυξης με διάφορες συγκεντρώσεις $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ σε g L^{-1}. Οι ποσότητες των αερίων προσδιορίζονται σε mL L-1 culture -1 μέσω των εξισώσεων 8, 9 και 10 της ενότητας 2.4 και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την 7η ημέρα επώασης της καλλιέργειας σε τριπλέτα δειγμάτων.

Από το διάγραμμα 2 γίνεται αντιληπτό ότι η μεγαλύτερη ποσότητα H_2 παράγεται στη συνθήκη του μάρτυρα (1 g L^{-1} $FeSO_4 \cdot 7H_2O$), ενώ οι υπόλοιπες συνθήκες εμφανίζουν παρόμοιες τιμές ποσότητας H_2, μικρότερες από τη συνθήκη του μάρτυρα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η ποσότητα των ιόντων Fe^{2+} επηρεάζει την παραγωγή H_2 σε βακτήρια. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι υπάρχει μία συγκεκριμένη ποσότητα του μετάλλου στην οποία η ποσότητα H_2 που παράγεται είναι η βέλτιστη, ενώ σε μεγαλύτερες ή μικρότερες ποσότητες από αυτή, ο Fe^{2+} δύναται να παρεμποδίσει την παραγωγή H_2, αφού ορισμένες από τις παραπάνω συγκεντρώσεις του μετάλλου μπορεί να γίνουν τοξικές για τα κύτταρα [22, 23]. Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, δε μελετήθηκαν συγκεντρώσεις $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ μεγαλύτερες από αυτή της συνθήκης του μάρτυρα, συνεπώς συμπεράσματα δύναται να εξαχθούν για τις ποσότητες $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ που είναι μικρότερες από αυτή που προστίθεται στη συνθήκη

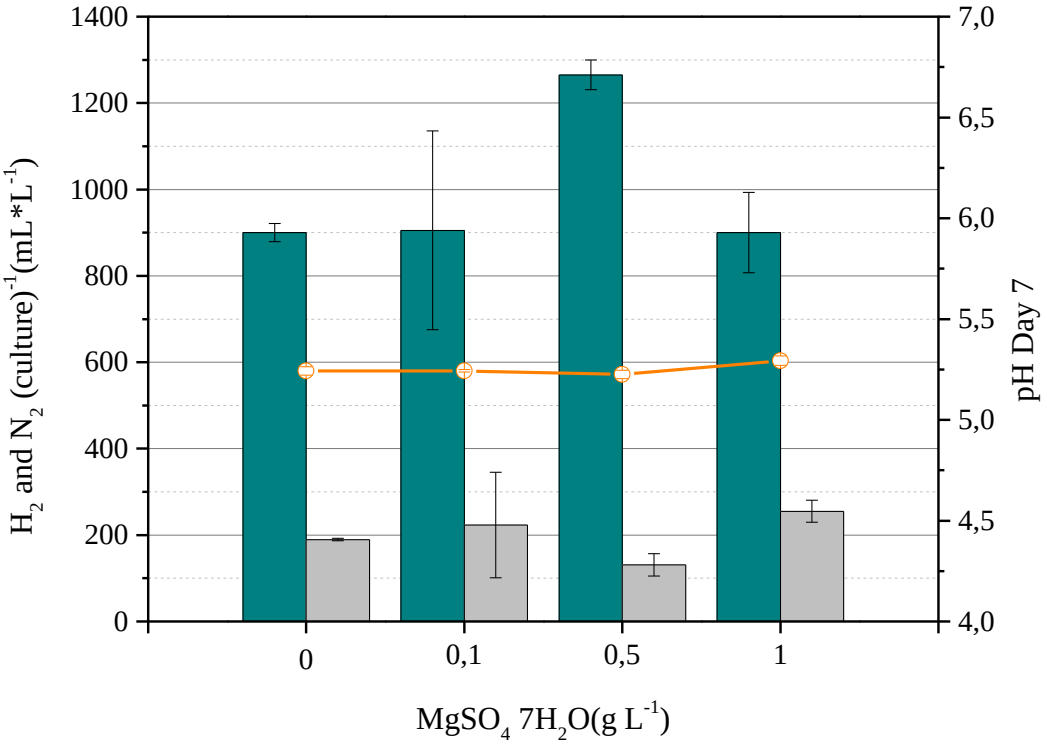
του μάρτυρα. Διαπιστώνεται συνεπώς, ότι η συμπεριφορά του μικροοργανισμού που μελετάται έρχεται σε συμφωνία με αυτή που έχει παρατηρηθεί βιβλιογραφικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι το δισθενές κατιόν Fe^{2+} διαδραματίζει σημαντικό ρόλο ως συμπαράγοντας σε όλους του τύπους υδρογονάσης που συναντώνται σε μικροοργανισμούς ([NiFe], [FeFe] και [Fe] υδρογονάσες), συνεπώς αναμένεται η ποσότητά του να επιδρά άμεσα στην παραγωγή H_2 [21].

Επιπροσθέτως, στο διάγραμμα 2 παρατίθενται με γκρι χρώμα οι τιμές του N_2 την 7η ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας. Συγκρίνοντας τις τιμές αυτές με τις τιμές N_2 της ημέρας 0 όπου πραγματοποιήθηκε η απαέρωση με το αέριο N_2 (διάγραμμα 1), διπιστώνεται ότι η καθήλωση του N_2 είναι παρόμοια ανεξαρτήτως της ποσότητας του μετάλλου. Τα δισθενή κατιόντα Fe^{2+} αποτελούν συμπαράγοντα και του ενζύμου νιτρογενάση και συνεπώς επηρεάζουν τη διεργασία καθήλωσης του αζώτου στους μικροοργανισμούς. Ειδικότερα, όλες οι νιτρογενάσες είναι ενζυμικά σύμπλοκα που αποτελούνται όπως έχει αναφερθεί από δύο ένζυμα, τη δινιτρογενάση και την αναγωγάση της δινιτρογενάσης, με το δεύτερο ένζυμο να απαιτεί ως συμπαράγοντα τα ιόντα Fe^{2+} [21]. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η έλλειψη των ιόντων Fe^{2+} επηρεάζει το σχηματισμό ριζικών φυματίων στα φυτά κυρίως στα αρχικά στάδια της συμβίωσης των βακτηρίων με τα φυτά [16, 24, 25]. Συνεπώς, δεν προκύπτει ούτε ύστερα από βιβλιογραφική αναζήτηση ότι η ποσότητα των ιόντων Fe^{2+} επηρεάζει άμεσα την ποσότητα N_2 που καθηλώνεται από τα βακτήρια που αναπτύσσονται συμβιωτικά στα ριζικά φυμάτια των φυτών.

Τέλος, στο διάγραμμα 2 με πορτοκαλί χρώμα απεικονίζεται η τιμή του pH του θρεπτικού μέσου την ημέρα τερματισμού του πειράματος. Παρατηρείται ότι οι τιμές pH των συνθηκών με ποσότητα $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g L^{-1} και 0,5 g L^{-1} είναι κοντά στην αναμενόμενη τιμή pH 5,3 που εμφανίζει η συνθήκη του μάρτυρα. Απόκλιση από την προαναφερθείσα τιμή παρουσιάζει η συνθήκη χωρίς προσθήκη $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. Η συνθήκη αυτή εμφανίζει τιμή pH κοντά στο 5,8, γεγονός που καταδεικνύει ότι η ανάπτυξη του μικροοργανισμού στην εν λόγω συνθήκη δεν ήταν η αναμενόμενη. Το παραπάνω, συμπεραίνεται και από τις τιμές της ποσότητας H_2 που έχει παραχθεί αλλά και από την ποσότητα N_2 το οποίο έχει καθηλώσει το βακτήριο. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η ποσότητα Fe^{2+} επηρεάζει την τιμή του pH του θρεπτικού μέσου και συγκεκριμένα, αύξηση της ποσότητας του μετάλλου συμβάλει σε μείωση του pH. Έτσι, είναι αναμενόμενο η συνθήκη όπου δεν έχει προστεθεί $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ να εμφανίζει τη μεγαλύτερη τιμή pH την 7η ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας [23].

3.3.2 Επίδραση του $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ στην παραγωγή H_2

Στα πειράματα αυτά μελετήθηκε η επίδραση της ποσότητας του $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, που αποτελεί συστατικό του θρεπτικού M3, στην παραγωγή H_2 από το βακτήριο του γένους *Bradyrhizobium sp*. Το Mg^{2+} αποτελεί δισθενές μέταλλο που λειτουργεί ως συμπαράγοντας αρκετών ενζύμων. Στόχος της συγκεκριμένης πειραματικής σειράς ήταν η μελέτη της επίδρασης της ποσότητας του μετάλλου στην παραγωγή H_2, αλλά και η εύρεση της ποσότητας που οδηγεί στη βέλτιστη παραγωγή H_2. Διερευνήθηκε επίσης, και η επίδραση της ποσότητας του Mg^{2+} στο ένζυμο νιτρογενάση και συνακόλουθα στην καθήλωση του αζώτου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα που ακολουθεί.



Διάγραμμα 3: Ποσότητα H_2 που παράγεται από το βακτήριο Bradyrhizobium sp. σε mL L^{-1} culture^{-1}, ποσότητα N_2 που παραμένει στο φιαλίδιο την τελευταία ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας σε mL L^{-1} culture^{-1}, αλλά και τιμή pH την ημέρα αυτή , συναρτήσει συνθηκών ανάπτυξης με διάφορες συγκεντρώσεις $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ σε g L^{-1}. Οι ποσότητες των αερίων προσδιορίζονται σε mL L-1 culture -1 μέσω των εξισώσεων 8, 9 και 10 της ενότητας 2.4 και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ±

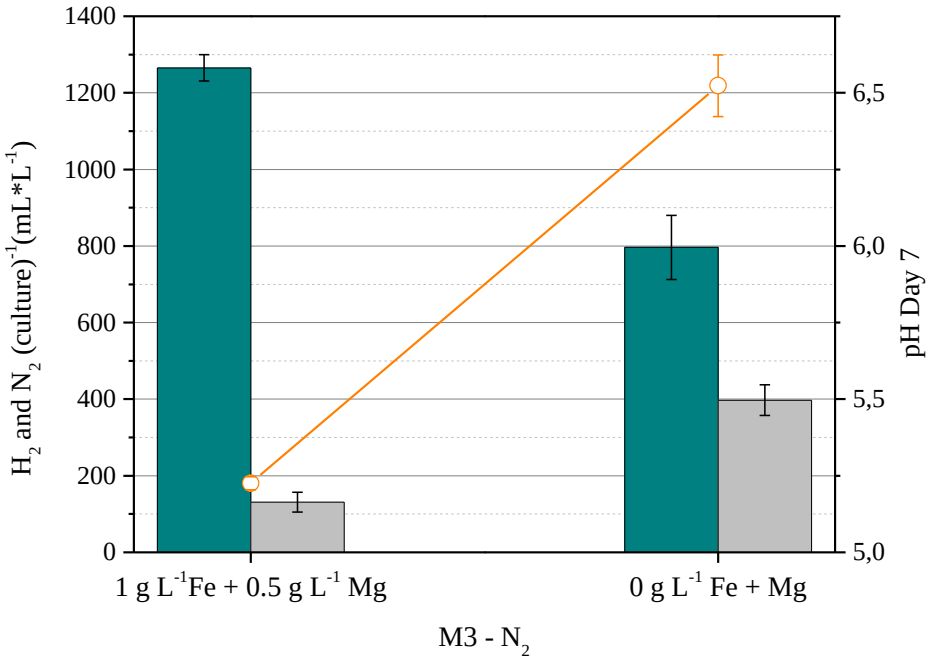
τυπική απόκλιση. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την 7η ημέρα επώασης της καλλιέργειας σε τριπλέτα δειγμάτων.

Στην εν λόγω πειραματική σειρά μελετήθηκαν συνθήκες όπου στο θρεπτικό μέσο M3 δεν είχε προστεθεί καμία πηγή Mg^{2+}, αλλά και συνθήκες με ποσότητα $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ μικρότερη και μεγαλύτερη από την ποσότητα της συνθήκης ελέγχου η οποία είναι 0,5 g L^{-1}. Από το διάγραμμα 3 γίνεται αντιληπτό ότι η μεγαλύτερη τιμή ποσότητας H_2 εμφανίζεται στη συνθήκη μάρτυρα (0,5 g L^{-1}), ενώ στις άλλες συνθήκες ο μικροοργανισμός έχει παραγάγει παρόμοια ποσότητα H_2, περίπου 300 mL L^{-1} μικρότερη από τη συνθήκη του μάρτυρα. Σύμφωνα με μελέτες σε άλλα είδη βακτηρίων η ποσότητα ιόντων Mg^{2+} φαίνεται να επηρεάζει την παραγωγή H_2. Συγκεκριμένα παρατηρείται ότι με σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του μετάλλου η ποσότητα H_2 που παράγεται αυξάνεται, έως ότου φτάσει μία μέγιστη τιμή. Ύστερα, παρατηρείται ότι με περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του μετάλλου η ποσότητα του H_2 που παράγεται μειώνεται γεγονός το οποίο μπορεί να αποδοθεί σε ωσμωτικά φαινόμενα [22, 26]. Σημειώνεται επίσης στη βιβλιογραφία, ότι το Mg^{2+} αποτελεί ένα από τα δισθενή μέταλλα που δρουν ως συμπαράγοντες στις υδρογονάσες του τύπου [NiFe], συνεπώς αναμένεται η συγκέντρωσή του να επηρεάζει τη λειτουργία του ενζύμου και συνακόλουθα την παραγωγή H_2 [21]. Όπως γίνεται αντιληπτό από το διάγραμμα 3, η προαναφερθείσα συμπεριφορά δεν παρατηρείται στο βακτήριο Bradyrhzobium sp.. Στο βακτήριο αυτό, φαίνεται η παραγωγή H_2 και θεωρητικά η λειτουργία της υδρογονάσης να μην επηρεάζονται τόσο έντονα από τη συγκέντρωση του Mg^{2+}. Πιθανώς λοιπόν, το βακτήριο να μη φέρει υδρογονάση που να απαιτεί ως συμπαράγοντα τα δισθενή ιόντα Mg^{2+}. Παρόλα αυτά, συμπεραίνεται ότι η συγκέντρωση $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ στην οποία η παραγωγή H_2 είναι η βέλτιστη είναι η ποσότητα 0.5 g L^{-1}, δηλαδή η ποσότητα της συνθήκης ελέγχου.

Στο διάγραμμα επίσης, με γκρι χρώμα απεικονίζεται η ποσότητα αζώτου που έχει παραμείνει στα φιαλίδια την 7η ημέρα επώασης, όπου τερματίστηκε το πείραμα. Εάν ληφθεί υπ' όψιν η τιμή της ποσότητας N_2 που παρουσιάζεται στο διάγραμμα 1 στην ενότητα 3.2.1, όπου αφορά την ποσότητα του αερίου ύστερα από την απαέρωση, δηλαδή την ημέρα 0 όπου προστίθεται η βακτηριακή καλλιέργεια στο θρεπτικό, διαπιστώνεται ότι η καθήλωση του N_2 είναι παρόμοια σε όλες τις συγκεντρώσεις Mg^{2+} που μελετήθηκαν πέραν της συνθήκης ελέγχου. Ειδικότερα, παρατηρείται μία μικρή

αύξηση στις τιμές της ποσότητας N_2 που παραμένει στο φιαλίδιο την 7η ημέρα της επώασης σε σχέση με την τιμή της συνθήκης ελέγχου. Η διαφορά αυτή καταδεικνύει ότι η ποσότητα του $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ δεν επηρεάζει ούτε την καθήλωση του αζώτου και ταυτόχρονα ούτε τη λειτουργία της νιτρογενάσης. Σε αντίθεση με αυτά τα ευρήματα, στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι με αύξηση της ποσότητας του Mg^{2+} παρατηρείται αυξημένη καθήλωση του αζώτου σε βακτήρια του γένους *Rhizobium* που ζουν συμβιωτικά σε ριζικά φυμάτια φυτών [27, 28]. Το γεγονός αυτό, καταδεικνύει ότι η συμπεριφορά του μικροοργανισμού που μελετήθηκε στην εν λόγω διπλωματική εργασία, διαφέρει αρκετά από τη σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αναμενόμενη σε ριζόβια βακτήρια.

Τέλος, στο διάγραμμα 3, με πορτοκαλί χρώμα σημειώνεται η τιμή του pH την τελευταία ημέρα επώασης των βακτηρίων στο θρεπτικό μέσο (7η ημέρα). Παρατηρείται, ότι η τιμή pH όλων των συνθηκών ανεξαρτήτως της ποσότητας $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ είναι κοντά στο 5,3 που είναι η αναμενόμενα παρατηρούμενη πηγή για τη συγκεκριμένη ημέρα επώασης της συνθήκης ελέγχου.



Διάγραμμα 4: Ποσότητα H_2 που παράγεται από το βακτήριο Bradyrhizobium sp. σε mL L^{-1} $culture^{-1}$, ποσότητα N_2 που παραμένει στο φιαλίδιο την τελευταία ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας σε mL L^{-1} $culture^{-1}$, αλλά και τιμή pH την ημέρα αυτή , συναρτήσει συνθηκών ανάπτυξης χωρίς σίδηρο και μαγνήσιο και σύγκρισή τους με τη συνθήκη μάρτυρα. Οι ποσότητες των αερίων προσδιορίζονται σε mL L-1 culture -1 μέσω των εξισώσεων 8, 9 και 10 της ενότητας 2.4 και τα αποτελέσματα

εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την 7η ημέρα επώασης της καλλιέργειας σε τριπλέτα δειγμάτων.

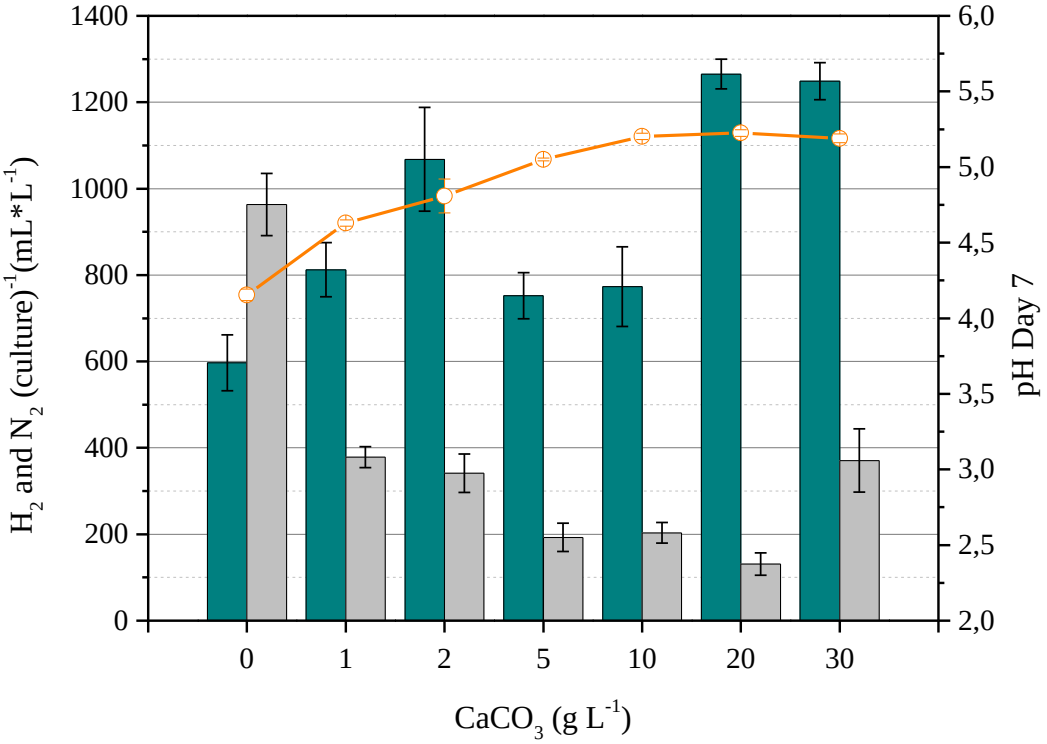
Εκτός από τις παραπάνω πειραματικές συνθήκες μελετήθηκε και συνθήκη όπου στο θρεπτικό μέσο M3 δεν είχε προστεθεί ποσότητα $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ και $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Αυτό που παρατηρείται στο διάγραμμα 4, είναι ότι απουσία των δύο μετάλλων η παραγωγή H_2 είναι μειωμένη σε σχέση με τη συνθήκη του μάρτυρα, κάτι το οποίο αιτιολογείται από το γεγονός ότι κυρίως ο Fe^{2+} διαδραματίζει σημαντικό ρόλο ως συμπαράγοντας του ενζύμου υδρογονάση. Επιπλέον, παρατηρείται ότι η τιμή N_2 την 7η ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας παρουσιάζει μεγαλύτερη τιμή σε σχέση με αυτή της συνθήκης ελέγχου. Διαπιστώνεται, λοιπόν, ότι απουσία των δύο μετάλλων ο μικροοργανισμός καθυστερεί ή αδυνατεί να καθηλώσει το N_2, λόγω της σχέσης του ενζύμου νιτρογενάση με τα κατιόντα Fe^{2+}. Τέλος, παρατηρείται ότι η τιμή pH που εμφανίζει το θρεπτικό μέσο την τελευταία ημέρα του πειράματος, είναι κοντά στο 6.5, γεγονός το οποίο καταδεικνύει ότι η ανάπτυξη του μικροοργανισμού δεν είναι η βέλτιστη, αφού η απόκλιση από την αναμενόμενη τιμή pH είναι σχεδόν μία μονάδα.

Συμπεραίνεται από τα παραπάνω πειράματα συνεπώς, ότι η βέλτιστη παραγωγή H_2 παρατηρείται στη συνθήκη του μάρτυρα, δηλαδή σε ποσότητα $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g L^{-1} και $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g L^{-1}. Η παραγωγή H_2 επηρεάζεται κυρίως από την ποσότητα του Fe^{2+}, που αποτελεί συμπαράγοντα του ενζύμου υδρογονάση, και όχι τόσο από την ποσότητα Mg^{2+}. Από την άλλη, όσον αφορά την καθήλωση του N_2 διαπιστώνεται ότι δεν επηρεάζεται από την ποσότητα των δύο μετάλλων και πραγματοποιείται ανεξαρτήτως της ποσότητάς τους. Τέλος, η ποσότητα των μετάλλων επηρεάζει αισθητά την τιμή του pH του θρεπτικού μέσου κατά την 7η ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, απουσία των δύο μετάλλων στο θρεπτικό μέσο, τόσο χωριστά, όσο και ταυτόχρονα, οδηγεί σε αυξημένη τιμή pH την τελευταία ημέρα του πειράματος, γεγονός το οποίο καταδεικνύει ότι οι συνθήκες αυτές, δεν είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

3.3.3 Επίδραση του $CaCO_3$ στην παραγωγή H_2

Στις συγκεκριμένες πειραματικές σειρές μελετήθηκε η επίδραση της ποσότητας του $CaCO_3$, που αποτελεί αδιάλυτο στερεό του θρεπτικού μέσου M3, στην παραγωγή βιολογικού H2 από το βακτήριο Bradyrhizobium sp.. Ειδικότερα, μελετήθηκαν

συγκεντρώσεις του $CaCO_3$ από 0 – 30 g L^{-1}, με την ποσότητα του άλατος στη συνθήκη του μάρτυρα να είναι 20 g L^{-1}. Παράλληλα, μελετήθηκε και η επίδραση του $CaCO_3$ στην καθήλωση του αζώτου, αλλά και στην τιμή του pH την 7η ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 5 που παρατίθεται παρακάτω.



Διάγραμμα 5: Ποσότητα H_2 που παράγεται από το βακτήριο Bradyrhizobium sp. σε mL L^{-1} culture^{-1}, ποσότητα N_2 που παραμένει στο φιαλίδιο την τελευταία ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας σε mL L^{-1} culture^{-1}, αλλά και τιμή pH την ημέρα αυτή , συναρτήσει συνθηκών ανάπτυξης με διάφορες συγκεντρώσεις $CaCO_3$. Οι ποσότητες των αερίων προσδιορίζονται σε mL L-1 culture -1 μέσω των εξισώσεων 8, 9 και 10 της ενότητας 2.4 και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την 7η ημέρα επώασης της καλλιέργειας σε τριπλέτα δειγμάτων.

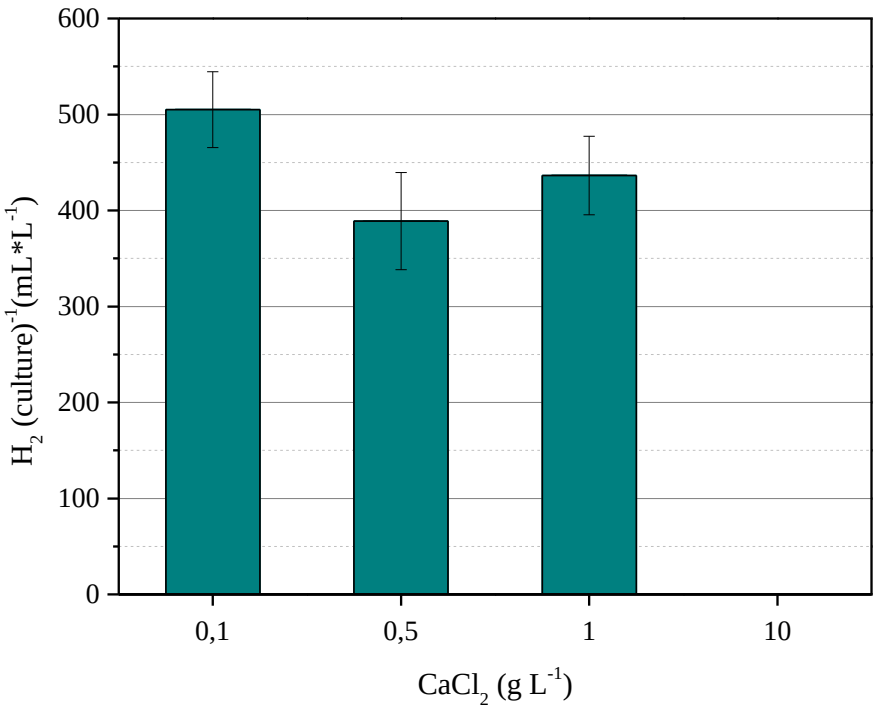
Στο διάγραμμα με μπλε χρώμα απεικονίζεται η ποσότητα H_2 που έχει παραγάγει ο μικροοργανισμός έως την 7η ημέρα επώασης της καλλιέργειας. Παρατηρείται ότι η μεγαλύτερη παραγωγή H_2 εμφανίζεται σε συγκεντρώσεις 20 και 30 g L^{-1} $CaCO_3$, ενώ η μικρότερη σε συγκέντρωση 0 g L^{-1} $CaCO_3$. Διαπιστώνεται ότι η ποσότητα H_2 που παράγεται εμφανίζει μία εκθετικά αυξανόμενη τάση ανάλογη με την αύξηση της ποσότητας $CaCO_3$ που προστίθεται στο θρεπτικό μέσο M3. Εξαίρεση στην παραπάνω

διαπίστωση, αποτελούν οι ποσότητες 5 και 10 g L^{-1} $CaCO_3$, όπου παρατηρείται μείωση της ποσότητας H_2 περίπου κατά 200 mL L^{-1} σε σχέση με την τιμή που εμφανίζει η συνθήκη με 2 g L^{-1} $CaCO_3$. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η προσθήκη $CaCO_3$ στο θρεπτικό μέσο ευνοεί την παραγωγή βιολογικού H_2 από βακτήρια. Ειδικότερα, αύξηση της συγκέντρωσης του $CaCO_3$ συμβάλει σε αύξηση της ποσότητας H_2 που παράγεται, η οποία φτάνει σε μία οριακή τιμή και δε μεταβάλλεται με περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του $CaCO_3$ [29]. Η συμπεριφορά αυτή συνεπώς, παρατηρείται και στα πειράματα που διεξήχθησαν με μοναδική εξαίρεση, όπως προαναφέρθηκε, τις συνθήκες με 5 και 10 g L^{-1} $CaCO_3$, κάτι το οποίο καταδεικνύει ότι η ανάπτυξη του βακτηρίου στις συνθήκες αυτές δεν ήταν η αναμενόμενη.

Επιπρόσθετα, άλλο ένα στοιχείο που καταδεικνύει ότι η παραγωγή H_2 στο βακτήριο *Bradyrhizobium sp.* ευνοείται παρουσία $CaCO_3$ αποτελεί η τιμή του N_2 τη $7^η$ ημέρα επώασης της καλλιέργειας που σημειώνεται με γκρι χρώμα στο διάγραμμα 5. Συγκρίνοντας την ποσότητα αυτή με την ποσότητα N_2 που υπάρχει στο φιαλίδιο την ημέρα όπου πραγματοποιείται απαέρωση (ημέρα 0), που παρατίθεται στο διάγραμμα 1, προσδιορίζεται η ποσότητα αζώτου που έχει καθηλώσει ο μικροοργανισμός. Από το διάγραμμα 5 παρατηρείται ότι η καθήλωση του αζώτου εμφανίζει κι αυτή παρόμοια τάση με την παραγωγή H_2. Συγκεκριμένα, όσο αυξάνεται η ποσότητα του $CaCO_3$, η ποσότητα του N_2 την τελευταία ημέρα του πειράματος μειώνεται, γεγονός που καταδεικνύει αυξημένη καθήλωση του αζώτου. Εξαίρεση στο παραπάνω, αποτελεί η συνθήκη 30 g L^{-1} $CaCO_3$ όπου η ποσότητα N_2 που έχει καθηλώσει ο μικροοργανισμός είναι παρόμοια με αυτή στις συνθήκες με 1 και 2 g L^{-1} $CaCO_3$. Στη βιβλιογραφία, αναφέρεται ότι η αυξημένη συγκέντρωση $CaCO_3$ στο έδαφος, ευνοεί το σχηματισμό ριζικών φυματίων στα φυτά, όπου όπως έχει αναφερθεί στην ενότητα 1.4, είναι το σημείο στο οποίο πραγματοποιείται η διεργασία της καθήλωσης του αζώτου από συμβιωτικά βακτήρια. Συμπεραίνεται συνεπώς, ότι το $CaCO_3$ συμβάλλει σε αύξηση της διεργασίας καθήλωσης του αζώτου μέσω ενίσχυσης του σχηματισμού ριζικών φυματίων [30]. Από τα παραπάνω λοιπόν προκύπτει, ότι κατά κύριο λόγο η συμπεριφορά του βακτηρίου Bradyrhizobium sp. συνάδει με αυτή που έχει παρατηρηθεί βιβλιογραφικά.

Τέλος, στο διάγραμμα 5 παρατίθεται με πορτοκαλί χρώμα η τιμή του pH του θρεπτικού μέσου την τελευταία ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας ($7^η$ ημέρα). Το $CaCO_3$ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταβολή της τιμής του pH του θρεπτικού μέσου, καθώς έχει ρυθμιστική ικανότητα, μέσω των ανθρακικών ιόντων.

Έτσι, το $CaCO_3$ βοηθά στη διατήρηση της τιμής του pH στο βέλτιστο εύρος τιμών pH 7,0 – 5,0 που έχει παρατηρηθεί βιβλιογραφικά ότι ευνοεί τόσον την ανάπτυξη του βακτηρίου, όσο και την παραγωγή βιολογικού H_2 [17]. Όσον αφορά τις συνθήκες που μελετήθηκαν στις εν λόγω πειραματικές σειρές διαπιστώνεται ότι αύξηση της ποσότητας του $CaCO_3$ συμβάλει στην αύξηση της τιμής του pH την 7η ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας και διατήρησής της στην τιμή 5,3. Προς επίρρωσιν του γεγονότος ότι το $CaCO_3$ έχει ρυθμιστική ικανότητα πραγματοποιήθηκαν πειράματα όπου στο θρεπτικό μέσο M3 αντί για το συγκεκριμένο άλας ασβεστίου, είχε προστεθεί $CaCl_2$, το οποίο δεν έχει ρυθμιστική ικανότητα. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών παρουσιάζονται στο διάγραμμα που ακολουθεί.



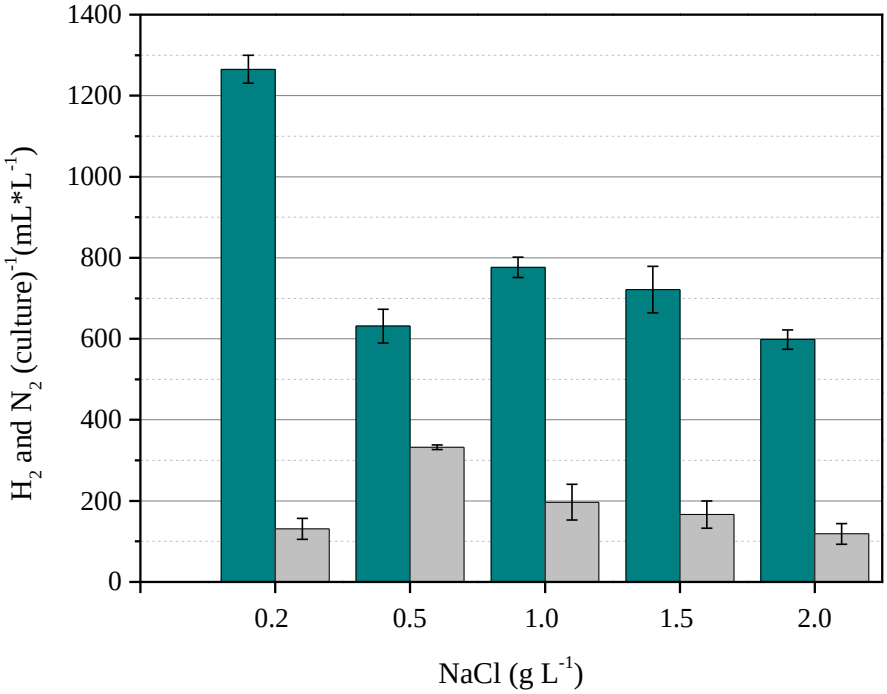
Διάγραμμα 6: Ποσότητα H_2 που παράγεται από το βακτήριο Bradyrhizobium sp. σε mL L^{-1} culture^{-1} συναρτήσει διαφόρων συγκεντρώσεων $CaCl_2$ σε g L^{-1}. Οι ποσότητες των αερίων προσδιορίζονται σε mL L-1 culture -1 μέσω των εξισώσεων 8, 9 και 10 της ενότητας 2.4 και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την 7η ημέρα επώασης της καλλιέργειας σε τριπλέτα δειγμάτων.

Από το διάγραμμα 6, προκύπτει ότι η αντικατάσταση του $CaCO_3$ από $CaCl_2$ δε συμβάλλει στην αύξηση της παραγωγής H_2, αφού οι τιμές της ποσότητας H_2 που παρήχθησαν σε αυτές τις συνθήκες είναι αρκετά μικρότερες από τη συνθήκη του

μάρτυρα που περιέχει 20 g L^{-1} $CaCO_3$ (1250 mL L^{-1} $culture^{-1}$). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι στην παραγωγή H_2 συμβάλλει η ρυθμιστική ικανότητα του $CaCO_3$ και όχι το Ca^{2+}, κάτι το οποίο συνάδει με τα αποτελέσματα που έχουν παρατηρηθεί βιβλιογραφικά [29].

3.3.4 Επίδραση του NaCl στην παραγωγή H_2

Στις συγκεκριμένες πειραματικές σειρές μελετήθηκε η επίδραση της αλατότητας του θρεπτικού μέσου M3 στην παραγωγή βιολογικού H_2 από το βακτήριο Bradyrhizobium sp.. Συγκεκριμένα, εκτός από τη συνθήκη του μάρτυρα όπου περιέχει 0,2 g L^{-1} NaCl, μελετήθηκαν συνθήκες με ποσότητα άλατος έως και 2,0 g L^{-1}. Εκτός από την παραγωγή H_2, μελετήθηκε και η επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του άλατος στη διεργασία καθήλωσης του αζώτου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα που ακολουθεί.



Διάγραμμα 7 Ποσότητα H_2 που παράγεται από το βακτήριο Bradyrhizobium sp. σε mL L^{-1} $culture^{-1}$, ποσότητα N_2 που παραμένει στο φιαλίδιο την τελευταία ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας σε mL L^{-1} $culture^{-1}$, συναρτήσει συνθηκών ανάπτυξης με διάφορες συγκεντρώσεις NaCl. Οι ποσότητες των αερίων προσδιορίζονται σε mL L-1 culture -1 μέσω των εξισώσεων 8, 9 και 10 της ενότητας 2.4

και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την 7η ημέρα επώασης της καλλιέργειας σε τριπλέτα δειγμάτων.

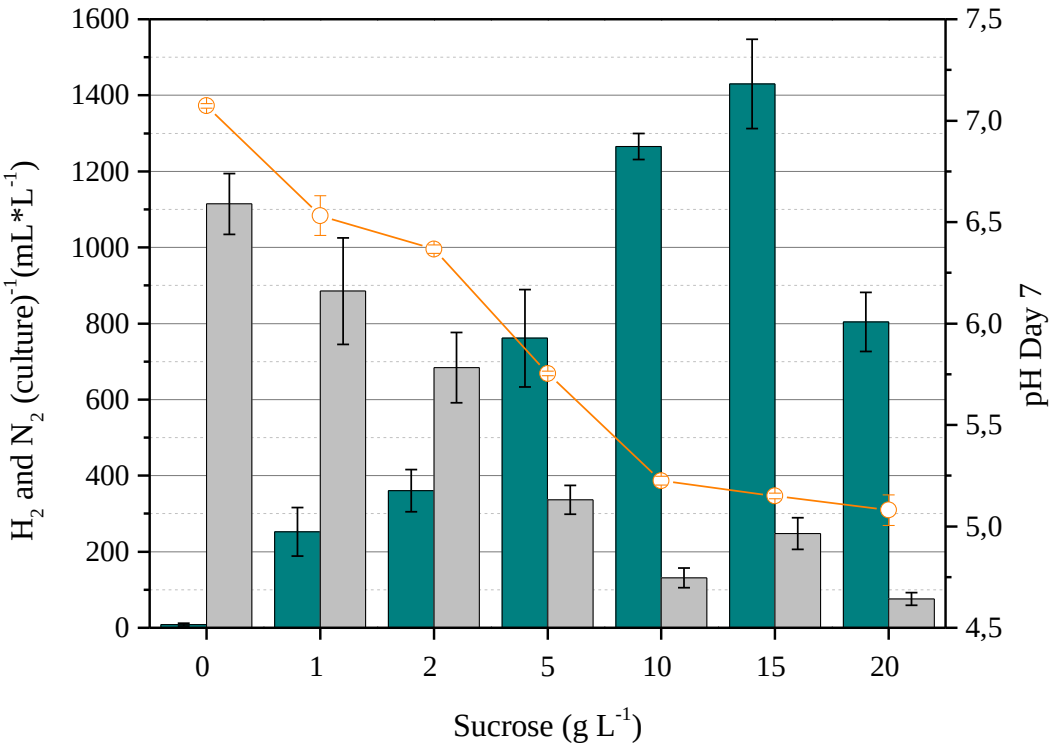
Στο διάγραμμα 7, με μπλε χρώμα απεικονίζεται η ποσότητα του H_2 σε mL L^{-1} καλλιέργειας που έχει παραγάγει ο μικροοργανισμός έως την 7η ημέρα επώασης. Παρατηρείται ότι η βέλτιστη παραγωγή H_2 εμφανίζεται στη συνθήκη του μάρτυρα, η οποία περιέχει 0,2 g L^{-1} NaCl. Αντιθέτως, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις NaCl διαπιστώνεται ότι η ποσότητα H2 που παράγεται είναι μειωμένη περίπου κατά 200 – 400 mL L-1 αναλόγως της συνθήκης. Η μειωμένη παραγωγή H_2 σχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη του μικροοργανισμού στις συνθήκες υψηλής αλατότητας, αφού όλοι οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων άλατος. Συγκεκριμένα, η ποσότητα του άλατος επηρεάζει τους μικροοργανισμούς λόγω της εμφάνισης ωσμωτικών φαινομένων, τα οποία δύναται να οδηγήσουν σε λύση της κυτταρικής μεμβράνης αλλά και κυτταρικό θάνατο. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, υπάρχουν δύο κατηγορίες στελεχών *Bradyrhizobium sp.*, τα στελέχη που αναπτύσσονται σε συνθήκες με ποσότητα NaCl έως 5%, και τα πιο ανθεκτικά στελέχη που επιβιώνουν σε συνθήκες με ποσότητα NaCl 7% [17]. Από τα δεδομένα αυτά συμπεραίνεται, πως το βακτήριο του γένους *Bradyrhizobium* που μελετήθηκε σε αυτή την εργασία ανήκει στην κατηγορία των λιγότερο ανθεκτικών στελεχών.

Με γκρι χρώμα στο διάγραμμα 7, παρουσιάζονται οι τιμές N_2 που έχει παραμείνει στο φιαλίδιο την 7η ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας. Διαπιστώνεται ότι δεν παρατηρείται μεγάλη διαφορά στην ποσότητα N_2 μεταξύ των συνθηκών, γεγονός το οποίο καταδεικνύει ότι η καθήλωση του αζώτου δεν επηρεάζεται από την αλατότητα του θρεπτικού μέσου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αλατότητα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη συμβίωση αλλά και στην καθήλωση του αζώτου που λαμβάνει χώρα στα ριζικά φυμάτια των φυτών. Συγκεκριμένα, η επίδραση της αλατότητας αφορά την ανθεκτικότητα των ίδιων των ριζόβιων βακτηρίων και φαίνεται να μη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο μόνο στα ανθεκτικά στελέχη των μικροοργανισμών αυτών [31]. Σημειώνεται ότι οι συνθήκες των εν λόγω πειραματικών σειρών δεν περιλαμβάνουν ακραίες ποσότητες άλατος και για το λόγο αυτόν συνεπώς δεν παρατηρείται κάποια ιδιαίτερη απόκλιση μεταξύ των τιμών της ποσότητας N_2 που έχει καθηλώσει το βακτήριο σε κάθε συνθήκη.

3.4 Μελέτη παραγωγής H_2 συναρτήσει των πηγών άνθρακα του θρεπτικού μέσου M3

3.4. 1 Επίδραση της ποσότητας σουκρόζης στην παραγωγή H_2

Στις εν λόγω πειραματικές σειρές μελετήθηκε η παραγωγή H_2, η καθήλωση του αζώτου αλλά και η τιμή του pH την τελευταία ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας, σε διαφορετικές ποσότητες σουκρόζης, η οποία αποτελεί την πηγή άνθρακα του θρεπτικού μέσου M3. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ανάπτυξη του βακτηρίου σε θρεπτικό μέσο M3 με ποσότητες από 0 έως 20 g L^{-1} σουκρόζη. Υπενθυμίζεται ότι η συνθήκη του μάρτυρα περιέχει 10 g L^{-1} σουκρόζη, συνεπώς πραγματοποιήθηκε μελέτη ποσότητας μικρότερης, αλλά και μεγαλύτερης από αυτής της συνθήκης ελέγχου. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στο ακόλουθο διάγραμμα.



Διάγραμμα 8: Ποσότητα H_2 που παράγεται από το βακτήριο Bradyrhizobium sp. σε mL L^{-1} culture^{-1}, ποσότητα N_2 που παραμένει στο φιαλίδιο την τελευταία ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας σε mL L^{-1} culture^{-1}, αλλά και τιμή pH την ημέρα αυτή , συναρτήσει συνθηκών ανάπτυξης με διάφορες συγκεντρώσεις σουκρόζης. Οι ποσότητες των αερίων προσδιορίζονται σε mL L-1 culture -1 μέσω των εξισώσεων 8, 9 και 10 της ενότητας 2.4 και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την 7^{η} ημέρα επώασης της καλλιέργειας σε τριπλέτα δειγμάτων.

Στο διάγραμμα με μπλε χρώμα απεικονίζεται η ποσότητα H_2 που έχει παραχθεί από το βακτήριο Bradyrhizobium sp.. Παρατηρείται ότι η μεγαλύτερη ποσότητα H_2 παράγεται παρουσία 15 g L^{-1} σουκρόζης, ενώ απουσία σακχάρου δεν παράγεται H_2. Ακόμη, διαπιστώνεται ότι η παραγωγή H_2 αυξάνεται γραμμικά με την αύξηση της ποσότητας σακχάρου που έχει προστεθεί στο θρεπτικό μέσο M3. Η αύξηση αυτή ανακόπτεται σε ποσότητα σουκρόζης 20 g L^{-1}, πιθανώς λόγω ωσμωτικών φαινομένων από τον κορεσμό του θρεπτικού μέσου με σουκρόζη, τα οποία δυσχεραίνουν την ανάπτυξη του βακτηρίου. Η παραπάνω διαπίστωση αντιτίθεται στην αρχική θεώρηση ότι η παραγωγή βιολογικού H_2 από το βακτήριο προέρχεται από την καθήλωση του N_2, και οδηγεί στο συμπέρασμα πως ίσως, η παραγωγή H_2 στο βακτήριο *Bradyrhizobium sp.* να οφείλεται στον μεταβολισμό του σακχάρου. Το συμπέρασμα αυτό, ενισχύεται και από τα δεδομένα της ποσότητας σακχάρου που έχει καταναλώσει το βακτήριο κατά τη διάρκεια των 7 ημερών της επώασης. Τα προαναφερθέντα δεδομένα παρατίθενται στον πίνακα 6 και έχουν προκύψει μέσω της μεθόδου θυμόλης – θειικού. Από τα δεδομένα του πίνακα γίνεται αντιληπτό ότι το βακτήριο καταναλώνει σχεδόν ολόκληρη την ποσότητα σουκρόζης που είναι διαθέσιμη στο θρεπτικό μέσο, μεταβολίζοντάς τη σε H_2 και άλλα παραπροϊόντα. Τα παραπροϊόντα του μεταβολισμού της σουκρόζης παρατίθενται στον πίνακα 7 και προέκυψαν από λήψη φάσματος ^{1}H-NMR.

Πίνακας 6: Αρχική συγκέντρωση σουκρόζης και συγκέντρωση σουκρόζης που καταναλώθηκε από το βακτήριο Bradyrhizobium sp. κατά τη επώαση για 7 ημέρες σε θρεπτικό μέσο M3.

Συγκέντρωση σουκρόζης ($g \cdot L^{-1}$)	Αρχική συγκέντρωση σουκρόζης (mM)	Μείωση στη συγκέντρωση σουκρόζης (mM)
0	0	0
1	3	2,9 ± 0,1
2	6	5,8 ± 0
5	15	14,7 ± 0,1
10	30	29,4 ± 0,1
15	44	36,5 ± 5,0
20	58	41,9 ± 2,0

Πίνακας 7: Παραπροϊόντα μεταβολισμού του βακτηρίου Bradyrhizobium sp. που ανιχνεύθηκαν σε φάσματα ^{1}H-NMR στη συνθήκη του μάρτυρα.

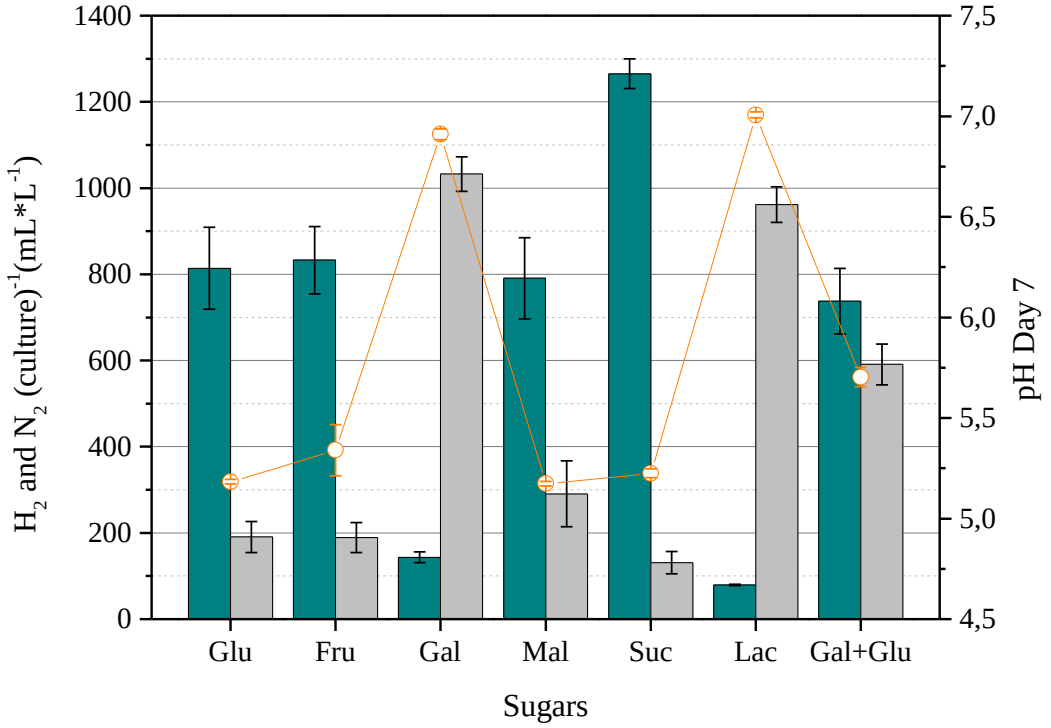
Παραπροϊόν	Συγκέντρωση προϊόντος (mM)
Βουτυρικό οξύ	36,8
Οξικό οξύ	24,0
Αιθανόλη	0,4
1,3 – προπανοδιόλη	0,6
Γλυκερόλη	5,8

Με γκρι χρώμα στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι τιμές του N_2 την 7^η ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας. Παρατηρείται πως η τιμή του N_2 που είναι διαθέσιμο στα φιαλίδια, φθίνει με την αύξηση της συγκέντρωσης της σουκρόζης, γεγονός το οποίο καταδεικνύει ότι με αύξηση της ποσότητας σουκρόζης, ευνοείται η διεργασία καθήλωσης του αζώτου. Το αποτέλεσμα αυτό είναι λογικό, καθώς με το μεταβολισμό του σακχάρου προκύπτει ενέργεια σε μορφή ATP, την οποία ο μικροοργανισμός μπορεί να διαθέσει για τη διεργασία καθήλωσης του αζώτου, που όπως έχει αναφερθεί, αποτελεί μία ενεργειακά κοστοβόρα διαδικασία. Επιπρόσθετα, από το διάγραμμα, διαπιστώνεται ότι η καθήλωση του N_2 δε διαδραματίζει τον κύριο ρόλο στην παραγωγή του βιολογικού H_2 από το βακτήριο *Bradyrhizobium sp.*. Ειδικότερα, στη συνθήκη με συγκέντρωση σουκρόζης 20 g L^{-1}, παρατηρείται ότι ο μικροοργανισμός έχει αφενός καθηλώσει τη μεγαλύτερη ποσότητα N_2 σε σχέση με τις υπόλοιπες συνθήκες, αλλά αφετέρου, η ποσότητα H_2 που παράγεται είναι μικρότερη σε σχέση με τη συνθήκη του μάρτυρα, αλλά και τη συνθήκη με ποσότητα 15 g L^{-1} σουκρόζης. Μάλιστα, η ποσότητα H_2 που παράγεται στη συνθήκη με 20 g L^{-1} σακχάρου, εμφανίζει παρόμοια τιμή με την ποσότητα που παράγεται σε συγκέντρωση σουκρόζης 5 g L^{-1}. Η ομοιότητα αυτή δε συμβαδίζει όμως με τις τιμές του N_2 που έχει καθηλώσει ο μικροοργανισμός, αφού παρατηρείται ότι η ποσότητα N_2 στη συνθήκη με 5 g L^{-1} σουκρόζη, είναι επταπλάσια από αυτή των 20 g L^{-1} σουκρόζης. Από τα παραπάνω συνεπώς, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η καθήλωση του αζώτου ευνοείται από τις αυξημένες συγκεντρώσεις σουκρόζης, αλλά δεν αποτελεί την κύρια διεργασία για την παραγωγή H_2 από το μικροοργανισμό.

Τέλος, στο διάγραμμα παρατίθεται η τιμή του pH την $7^{η}$ ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας, το οποίο παρατηρείται να έχει πτωτική τάση κατά την αύξηση της συγκέντρωσης της σουκρόζης. Το γεγονός αυτό οφείλεται στα παραπροϊόντα του μεταβολισμού του σακχάρου, στα οποία περιλαμβάνονται οξέα όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 7. Συνεπώς, διαπιστώνεται ότι αυξημένη παραγωγή H_2 οδηγεί σε μειωμένη τιμή pH την τελευταία ημέρα διεξαγωγής του πειράματος.

3.4.2 Επίδραση της πηγής μονοσακχαρίτη και δισακχαρίτη στην παραγωγή H_2

Στη συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων μελετήθηκε η επίδραση της πηγής σακχάρου στην παραγωγή H_2 από το βακτήριο *Bradyrhizobium sp.*. Ο μικροοργανισμός επωάστηκε σε θρεπτικό μέσο M3, τόσο παρουσία μονοσακχαριτών (γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη), όσο και δισακχαριτών (μαλτόζη, σουκρόζη, λακτόζη). Εκτός, από την παραγωγή H_2 μελετήθηκαν η καθήλωση του αζώτου, αλλά και η τιμή του pH την $7^{η}$ ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας συναρτήσει της πηγής σακχάρου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση των μονοσακχαριτών ήταν 60 mM, ενώ των δισακχαριτών 30 mM. Οι συγκεντρώσεις αυτές επιλέχθηκαν, καθώς από 1 μόριο δισακχαρίτη προκύπτουν 2 μόρια μονοσακχαρίτη. Επισημαίνεται τέλος, ότι η πηγή σακχάρου της συνθήκης ελέγχου είναι ο δισακχαρίτης σουκρόζη που προστίθεται σε συγκέντρωση 30 mM στο θρεπτικό μέσο M3. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων παρατίθενται στο διάγραμμα 9.



Διάγραμμα 9 Ποσότητα H_2 που παράγεται από το βακτήριο Bradyrhizobium sp. σε mL L^{-1} $culture^{-1}$, ποσότητα N_2 που παραμένει στο φιαλίδιο την τελευταία ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας σε mL L^{-1} $culture^{-1}$, αλλά και τιμή pH την ημέρα αυτή , συναρτήσει συνθηκών ανάπτυξης με διάφορες πηγές μονοσακχαριτών και δισακχαριτών. Οι ποσότητες των αερίων προσδιορίζονται σε mL L-1 culture -1 μέσω των εξισώσεων 8, 9 και 10 της ενότητας 2.4 και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την $7^η$ ημέρα επώασης της καλλιέργειας σε τριπλέτα δειγμάτων.

Στο διάγραμμα με μπλε χρώμα παρουσιάζεται η ποσότητα H_2 που έχει παραχθεί από το βακτήριο έως και την $7^η$ ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας. Όσον αφορά τους μονοσακχαρίτες παρατηρείται ότι η παραγωγή H_2 είναι παρόμοια για τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη, ενώ στη γαλακτόζη η τιμή της ποσότητας H_2 που παράγεται είναι περίπου τέσσερις φορές μικρότερη. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η παραγωγή H_2 εμφανίζεται αυξημένη κατά την επώαση των βακτηρίων παρουσία γλυκόζης, ενώ είναι αρκετά μειωμένη σε συνθήκες ανάπτυξης με φρουκτόζη αλλά και γαλακτόζη [32]. Διαπιστώνεται συνεπώς, ότι το βακτήριο *Bradyrhizobium sp.* έχει τη δυνατότητα να μεταβολίζει το μονοσακχαρίτη φρουκτόζη και να παράγει H_2 σε αντίθεση με άλλα βακτήρια της βιβλιογραφίας. Βέβαια, η συμπεριφορά του εν λόγω μικροοργανισμού δε

διαφέρει από άλλα βακτήρια, όσον αφορά την παραγωγή H_2 από γλυκόζη και γαλακτόζη.

Από την άλλη μεριά, όσον αφορά τους δισακχαρίτες, παρατηρείται ότι η μεγαλύτερη παραγωγή H_2 εμφανίζεται στη συνθήκη του μάρτυρα, όπου πηγή άνθρακα στο θρεπτικό μέσο είναι η σουκρόζη. Στη συνθήκη όπου έχει προστεθεί στο θρεπτικό μέσο η μαλτόζη, που συνιστά δισακχαρίτη της γλυκόζης, η ποσότητα H_2 που παράγεται εμφανίζει παρόμοια τιμή με αυτή που παράγεται με τον μονοσακχαρίτη γλυκόζη. Αντιθέτως, όσον αφορά τη λακτόζη, που αποτελεί δισακχαρίτη γλυκόζης και γαλακτόζης, παρατηρείται ότι η παραγωγή H_2 δεν ευνοείται. Παρατηρώντας τη συνθήκη, όπου ως πηγή άνθρακα στο θρεπτικό μέσο έχουν προστεθεί οι μονοσακχαρίτες γλυκόζη και γαλακτόζη σε ίσες συγκεντρώσεις 30 mM, γίνεται αντιληπτό ότι η ποσότητα H_2 που παράγεται είναι παρόμοια με αυτή που παράγεται παρουσία της γλυκόζης. Συνεπώς, ο μικροοργανισμός εμφανίζει αδυναμία μεταβολισμού της γαλακτόζης και για το λόγο αυτόν, παράγει μειωμένη ποσότητα H_2 στις συνθήκες με γαλακτόζη και λακτόζη. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η μεγαλύτερη παραγωγή βιολογικού H_2 από βακτήρια παρατηρείται παρουσία σουκρόζης, ενώ είναι μικρότερη, τόσο παρουσία μαλτόζης, όσο και λακτόζης [33, 34]. Τα δεδομένα της βιβλιογραφίας συμβαδίζουν κατά ένα βαθμό με τις παρατηρήσεις από τις εν λόγω πειραματικές σειρές, με μοναδική διαφορά ότι η ποσότητα H_2 που παράγεται παρουσία μαλτόζης είναι αρκετά μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή της λακτόζης. Επισημαίνεται βέβαια ότι, ο μεταβολισμός κάθε σακχάρου διαφέρει μεταξύ των βακτηρίων και συνεπώς είναι λογικό να παρατηρούνται αποκλίσεις μεταξύ τους όσον αφορά την παραγωγή H_2.

Τα παραπάνω αποτελέσματα, δύναται να αιτιολογηθούν και από την κατανάλωση του εκάστοτε μονοσακχαρίτη και δισακχαρίτη, τα οποία παρατίθενται στον πίνακα 8. Τα δεδομένα του πίνακα έχουν προκύψει από λήψη φάσματος ^{1}H-NMR. Όπως γίνεται αντιληπτό, ο μικροοργανισμός την 7^η ημέρα επώασης καταναλώνει ολόκληρη την ποσότητα φρουκτόζης και σχεδόν όλη τη γλυκόζη που έχει προστεθεί στο θρεπτικό μέσο. Παρόμοια κατανάλωση παρατηρείται και στους δισακχαρίτες μαλτόζη και σουκρόζη, με τη δεύτερη να καταναλώνεται πλήρως. Τα αποτελέσματα αυτά, συμβαδίζουν με τις τιμές της ποσότητας H_2 του διαγράμματος 9, και έτσι διαπιστώνεται ότι ο μεταβολισμός της πηγής σακχάρου διαδραματίζει τον κύριο ρόλο στην παραγωγή H_2 από το βακτήριο *Bradyrhizobium sp.*. Από την άλλη μεριά, ο μικροοργανισμός φαίνεται να μην έχει τη δυνατότητα κατανάλωσης μεγάλης

ποσότητας γαλακτόζης κάτι το οποίο έρχεται σε συμφωνία με την παραγωγή H_2 που παρουσιάζεται στο διάγραμμα 9 για τη συνθήκη αυτή. Επιπλέον, το βακτήριο εμφανίζει δυσκολία κατανάλωση και του δισακχαρίτη λακτόζη, το οποίο οφείλεται στην αδυναμία διάσπασης του γλυκοζιτικού δεσμού της γλυκόζης και της γαλακτόζης. Το τελευταίο προκύπτει από τις τιμές κατανάλωσης σακχάρου της συνθήκης όπου στο θρεπτικό μέσο έχουν προστεθεί γλυκόζη και γαλακτόζη, οι οποίες αποτελούν τους μονοσακχαρίτες της λακτόζης. Συγκεκριμένα, ο μικροοργανισμός στη συνθήκη αυτή διαπιστώνεται πως έχει καταναλώσει ολόκληρη τη διαθέσιμη ποσότητα γλυκόζης και μικρή ποσότητα από τη γαλακτόζη. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα δεδομένα του πίνακα 8 για τις συνθήκες με πηγή σακχάρου λακτόζη αλλά και γλυκόζη και γαλακτόζη, συμβαδίζουν με τις ποσότητες βιολογικού H_2 που παρουσιάζονται στο διάγραμμα 9.

Πίνακας 8: Αρχική συγκέντρωση σακχάρου και συγκέντρωση σακχάρους που καταναλώθηκε από το βακτήριο Bradyrhizobium sp. *κατά τη επώαση για 7 ημέρες σε θρεπτικό μέσο M3.*

Σάκχαρο	Αρχική συγκέντρωση σακχάρου (mM)	Μείωση της συγκέντρωσης του σακχάρου (mM)
Γλυκόζη	60	51,5
Φρουκτόζη	60	60
Γαλακτόζη	60	23,5
Μαλτόζη	30	24,6
Σουκρόζη	30	30
Λακτόζη	30	10,1
Γλυκόζη και Γαλακτόζη	30 και 30	30 (γλυκόζη) και 8,7 (γαλακτόζη)

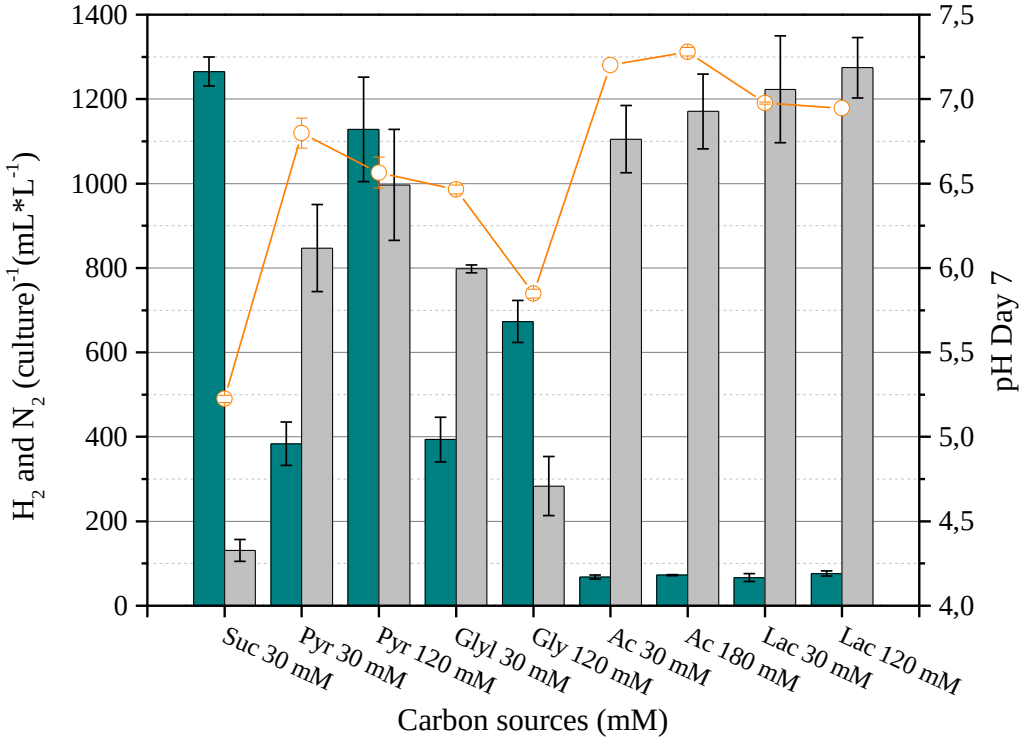
Επίσης, στο διάγραμμα με γκρι χρώμα, απεικονίζεται η ποσότητα N_2 που έχει παραμείνει στα φιαλίδια την $7^η$ ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας. Όσον αφορά του μονοσακχαρίτες γλυκόζη και φρουκτόζη, η ποσότητα N_2 είναι παρόμοια, ενώ στη συνθήκη ανάπτυξης παρουσία γαλακτόζης ο μικροοργανισμός έχει καθηλώσει αρκετά μικρή ποσότητα αζώτου. Από την άλλη μεριά, όσον αφορά του δισακχαρίτες, διαπιστώνεται ότι η μεγαλύτερη ποσότητα N_2 έχει καθηλωθεί από το βακτήριο στη συνθήκη του μάρτυρα, ενώ μικρή είναι και η ποσότητα N_2 που παραμένει την $7^η$ ημέρα

επώασης του βακτηρίου παρουσία μαλτόζης. Η καθήλωση του N_2 δυσχεραίνεται περισσότερο παρουσία λακτόζης, ενώ δυσκολία εμφανίζεται επίσης και κατά την ανάπτυξη με πηγή σακχάρου γλυκόζη και γαλακτόζη. Συνεπώς, στις συνθήκες επώασης παρουσία λακτόζης, γαλακτόζης και γλυκόζης με γαλακτόζη, η διεργασία καθήλωσης του αζώτου δεν ευνοείται λόγω του ότι δεν υπάρχει η απαιτούμενη ποσότητα ATP από το μεταβολισμό του σακχάρου. Όπως έχει αναφερθεί, η καθήλωση του αζώτου αποτελεί μία δαπανηρή ενεργειακά διεργασία που απαιτεί αρκετή ενέργεια σε μορφή ATP για να πραγματοποιηθεί.

Τέλος, στο διάγραμμα παρατίθεται με πορτοκαλί χρώμα η τιμή pH κατά την τελευταία ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας. Ειδικότερα, υψηλές τιμές pH εμφανίζονται στις συνθήκες παρουσία γαλακτόζης και λακτόζης στο θρεπτικό μέσο M3, γεγονός το οποίο καταδεικνύει ότι η ανάπτυξη του μικροοργανισμού στις συνθήκες αυτές δεν ήταν η αναμενόμενη. Επιπλέον, άλλη μία συνθήκη που εμφανίζει υψηλή τιμή pH είναι παρουσία γαλακτόζης και γλυκόζης. Η τιμή αυτή, είναι κατά 0,5 μονάδα υψηλότερη από την τιμή pH της συνθήκης ελέγχου, το οποίο οφείλεται στη δυσκολία ανάπτυξης του βακτηρίου παρουσία γαλακτόζης. Τέλος, στις συνθήκες ανάπτυξης παρουσία γλυκόζης, φρουκτόζης και μαλτόζης οι τιμές pH είναι αρκετά κοντινές και συνάδουν με την αναμενόμενη τιμή της συνθήκης ελέγχου, παρουσία σουκρόζης.

3.4.3 Επίδραση πηγών άνθρακα στην παραγωγή H2

Στις συγκεκριμένες πειραματικές σειρές μελετήθηκε η επίδραση στην παραγωγή H_2, την καθήλωση του αζώτου αλλά και την τιμή του pH την $7^{η}$ ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας άλλων πηγών άνθρακα που δεν ανήκουν στην κατηγορία των σακχάρων. Ειδικότερα, ο μικροοργανισμός επωάστηκε σε θρεπτικό μέσο M3 παρουσία πυροσταφυλικού οξέος, γλυκερόλης, οξικού οξέος και γαλακτικού οξέος. Οι παραπάνω πηγές επιλέχθηκαν καθώς προέκυψαν ως παραπροϊόντα του μεταβολισμού των σακχάρων στα φάσματα που λήφθηκαν μέσω ^{1}H – NMR. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 10.



Διάγραμμα 10: Ποσότητα H_2 που παράγεται από το βακτήριο Bradyrhizobium sp. σε mL L^{-1} $culture^{-1}$, ποσότητα N_2 που παραμένει στο φιαλίδιο την τελευταία ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας σε mL L^{-1} $culture^{-1}$, αλλά και τιμή pH την ημέρα αυτή , συναρτήσει συνθηκών ανάπτυξης με διάφορες πηγές άνθρακα. Οι ποσότητες των αερίων προσδιορίζονται σε mL L-1 culture -1 μέσω των εξισώσεων 8, 9 και 10 της ενότητας 2.4 και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την $7^η$ ημέρα επώασης της καλλιέργειας σε τριπλέτα δειγμάτων.

Με μπλε χρώμα στο διάγραμμα παρουσιάζεται η ποσότητα H_2 που παράγεται σε κάθε συνθήκη. Από το διάγραμμα γίνεται αντιληπτό ότι η μικρότερη ποσότητα H_2 παράγεται στις συνθήκες όπου ως πηγή άνθρακα στο θρεπτικό μέσο έχει προστεθεί οξικό οξύ και γαλακτικό οξύ. Πιο συγκεκριμένα, οι συνθήκες αυτές εμφανίζουν παρόμοιες τιμές ποσότητας H_2 ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης τους. Διαπιστώνεται συνεπώς, ότι ο μικροοργανισμός αδυνατεί να αναπτυχθεί και να παραγάγει H_2 στις συνθήκες αυτές πιθανώς λόγω του ότι δυσκολεύεται να καταναλώσει τις συγκεκριμένες πηγές άνθρακα.

Αντιθέτως, όσον αφορά τις υπόλοιπες συνθήκες παρατηρείται διαφορά στην παραγωγή H_2 αναλόγως της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα. Όσον αφορά το πυροσταφυλικό οξύ, παρατηρείται ότι σε τετραπλάσια συγκέντρωση (120 mM) η ποσότητα H_2 που παράγεται είναι υψηλή, αλλά κατά περίπου 200 mL L^{-1} μικρότερη

από αυτή της συνθήκης ελέγχου. Στη συνθήκη συγκέντρωσης πυροσταφυλικού οξέος ίδια με αυτή της σουκρόζης της συνθήκης ελέγχου (30 mM), η τιμή της ποσότητας H_2 που παράγεται είναι περίπου τέσσερις φορές μικρότερη από τη συνθήκη με 120 mM πυροσταφυλικού οξέος αλλά και από τη συνθήκη του μάρτυρα. Οι διαφορές αυτές οφείλονται στο μεταβολικό μονοπάτι καταβολισμού της γλυκόζης, σύμφωνα με το οποίο από το μεταβολισμό ενός μορίου γλυκόζης προκύπτουν δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος. Η σουκρόζη αποτελεί δισακχαρίτη φρουκτόζης και γλυκόζης και συνεπώς, από το μεταβολισμό της προκύπτουν τέσσερα μόρια πυροσταφυλικού οξέος. Συγκεκριμένα, η φρουκτόζη μεταβολίζεται σε 6 – φωσφορική φρουκτόζη, η οποία αποτελεί πρόδρομο μόριο της σύνθεσης πυροσταφυλικού οξέος κατά τη γλυκόλυση. Διαπιστώνεται συνεπώς, ότι η παραγωγή H_2 οφείλεται στον μεταβολισμό της σουκρόζης κατά τον οποίο η γλυκόζη καταβολίζεται σε πυροσταφυλικό οξύ. Η ποσότητα πυροσταφυλικού οξέος που καταναλώθηκε από το βακτήριο για την παραγωγή H_2 παρουσιάζεται στον πίνακα 9 και έχει προκύψει από λήψη φάσματος ^1H – NMR. Παρατηρείται από τα δεδομένα του πίνακα πως ο μικροοργανισμός δεν έχει καταναλώσει ολόκληρη την ποσότητα πυροσταφυλικού οξέος στη συνθήκη των 120 mM, κάτι το οποίο εξηγεί το γεγονός ότι δεν παρατηρείται απόλυτη συσχέτιση μεταξύ των τιμών της ποσότητας H_2 που παράγεται με τη συγκέντρωση της πηγής άνθρακα.

Πίνακας 9: Αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα και συγκέντρωση πηγής άνθρακα που καταναλώθηκε από το βακτήριο Bradyrhizobium sp. *κατά τη επώαση για 7 ημέρες σε θρεπτικό μέσο Μ3.*

Πηγή άνθρακα	Αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα (mM)	Μείωση της συγκέντρωσης πηγής άνθρακα (mM)
Πυροσταφυλικό οξύ	30	30
	120	101,6
Γλυκερόλη	30	30
	120	120

Όσον αφορά τη συνθήκη όπου ως πηγή άνθρακα στο θρεπτικό μέσο Μ3 έχει προστεθεί γλυκερόλη παρατηρείται ότι η παραγωγή H_2 είναι αρκετά μικρότερη από αυτή της συνθήκης ελέγχου, τόσο σε συγκέντρωση γλυκερόλης 30 mM, όσο και σε τετραπλάσια συγκέντρωση. Επιπλέον, δεν παρατηρείται αναλογία μεταξύ της

συγκέντρωσης γλυκερόλης και της παραγωγής H_2, καθώς η ποσότητα H_2 που παράγεται στη συνθήκη με συγκέντρωση γλυκερόλης 120 mM δεν είναι τετραπλάσια από την ποσότητα H_2 που παράγεται με 30 mM γλυκερόλης. Ακόμη, από τον πίνακα 9 διαπιστώνεται ότι η ποσότητα γλυκερόλης που προστίθεται στο θρεπτικό μέσο καταναλώνεται ολόκληρη τόσο σε συγκέντρωση 30 mM όσο και σε 120 mM. Συνεπώς, από τα παραπάνω προκύπτει ότι, η γλυκερόλη αποτελεί πηγή άνθρακα με την οποία ο μικροοργανισμός παράγει H_2 αλλά δεν έχει τη δυνατότητα να παραγάγει ποσότητα αντάξια της συνθήκης ελέγχου.

Με γκρι χρώμα στο διάγραμμα 10 παρουσιάζεται η ποσότητα N_2 που παραμένει στο δοχείο την $7^η$ ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας. Παρατηρείται ότι στις συνθήκες με οξικό οξύ αλλά και γαλακτικό οξύ, ο μικροοργανισμός δεν καθηλώνει σχεδόν καθόλου άζωτο. Επιπλέον, στις συνθήκες με πυροσταφυλικό οξύ η ποσότητα αζώτου που καθηλώνεται είναι αρκετά μεγαλύτερη από τη συνθήκη του μάρτυρα. Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρείται και στις συνθήκες όπου στο θρεπτικό μέσο έχει προστεθεί συγκέντρωση γλυκερόλης 30 mM. Εξαίρεση στις παραπάνω περιπτώσεις αποτελεί η συνθήκη γλυκερόλης 120 mM στην οποία διαπιστώνεται πως ο μικροοργανισμός έχει καθηλώσει μεγάλη ποσότητα αζώτου. Συγκεκριμένα η ποσότητα N_2 που παραμένει στο φιαλίδιο είναι κατά 100 mL L^{-1} περισσότερη από αυτή της συνθήκης ελέγχου. Συγκρίνοντας όλες τις πηγές άνθρακα που μελετήθηκαν παρατηρείται ότι η καθήλωση του αζώτου ευνοείται περισσότερο σε θρεπτικό μέσο M3 παρουσία γλυκερόλης. Μέσω του μεταβολισμού της γλυκερόλης συνεπώς, δύναται το βακτήριο να λαμβάνει την απαραίτητη ενέργεια σε μορφή ATP για την πραγματοποίηση της διεργασίας καθήλωσης του αζώτου.

Τέλος, με πορτοκαλί χρώμα στο διάγραμμα παρουσιάζεται η τιμή pH του υπερκειμένου της εκάστοτε συνθήκης την $7^η$ ημέρα επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας. Ειδικότερα, γίνεται αντιληπτό ότι οι τιμές pH σε όλες τις συνθήκες αποκλίνουν από την αναμενόμενη τιμή που εμφανίζει η συνθήκη του μάρτυρα. Μεγαλύτερη απόκλιση εμφανίζεται στις συνθήκες παρουσία οξικού οξέος και γαλακτικού οξέος, στις οποίες η τιμή pH κυμαίνεται από 7.00 στις συνθήκες με γαλακτικό οξύ, έως 7,2 στις συνθήκες με οξικό οξύ. Οι τιμές αυτές είναι αρκετά κοντά στην τιμή pH στην οποία ρυθμίζεται το θρεπτικό μέσο M3 την ημέρα εμβολιασμού της βακτηριακής καλλιέργειας. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η ανάπτυξη του μικροοργανισμού στις συνθήκες αυτές δεν ήταν η βέλτιστη, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και από την ποσότητα H_2 που έχει παραγάγει το βακτήριο αλλά και την

ποσότητα αζώτου που έχει καθηλώσει. Παρόλα αυτά, υψηλές τιμές pH εμφανίζονται και σε συνθήκες όπου ο μικροοργανισμός έχει παραγάγει ποσότητα H_2. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία πυροσταφυλικού οξέος, ανεξαρτήτως της συγκέντρωσής του, αλλά και της παραγωγής H_2, η τιμή pH κυμαίνεται από 6,5 έως 6,8. Οι τιμές αυτές είναι υψηλότερες της αναμενόμενης 5,2 που παρατηρείται στη συνθήκη του μάρτυρα. Βέβαια, ο μικροοργανισμός σε αυτές τις συνθήκες και συγκεκριμένα σε συγκέντρωση πυροσταφυλικού οξέος 120 mM, έχει παραγάγει ποσότητα H_2 παρόμοια με της συνθήκης ελέγχου, γεγονός το οποίο καταδεικνύει ότι η τιμή pH δεν επηρεάζει την ανάπτυξη και το μεταβολισμό του. Τέλος, όσον αφορά τις συνθήκες παρουσία γλυκερόλης, διαπιστώνεται ότι υπάρχει απόκλιση στις τιμές pH αναλόγως της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα. Οι δύο συνθήκες έχουν απόκλιση στην τιμή pH κατά 0,75, γεγονός το οποίο πιθανώς να οφείλεται σε όξινα παραπροϊόντα του μεταβολισμού της γλυκερόλης, τα οποία θα παράγονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στη συνθήκη με 120 mM γλυκερόλης.

3.5 Συμπεράσματα

Από τις πειραματικές σειρές που διεξάχθηκαν γίνεται αντιληπτό ότι η διεργασία καθήλωσης του αζώτου και η παραγωγή H_2 είναι διαδικασίες που δε σχετίζονται μεταξύ τους στο βακτήριο. Συγκεκριμένα, η παραγωγή H_2 στον μικροοργανισμό συμπεραίνεται ότι οφείλεται κατά κύριο λόγο στο μεταβολισμό του σακχάρου που περιλαμβάνει το θρεπτικό μέσο. Βέβαια, από τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν, δεν καταδεικνύεται ότι η συνεισφορά της καθήλωσης του αζώτου στην παραγωγή H_2 δεν είναι μηδαμινή. Πιθανώς, ποσότητα του παραγόμενου H_2 να οφείλεται και στην καθήλωση του αζώτου.

Από τις πειραματικές σειρές που διεξάχθηκαν όσον αφορά την πηγή αζώτου και το αέριο απαέρωσης που χρησιμοποιήθηκαν, διαπιστώθηκε ότι η βέλτιστη παραγωγή H_2 εμφανίζεται σε συνθήκη όπου στο θρεπτικό μέσο ως πηγή αζώτου έχει προστεθεί NH_4Cl και ως αέριο απαέρωσης λειτουργεί το CO_2. Μάλιστα, η παραγωγή H_2 στη συνθήκη αυτή ήταν κατά 750 mL L^{-1} μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρείται στη συνθήκη του μάρτυρα. Οι λόγοι για τους οποίους η συνθήκη αυτή φαίνεται να είναι η ευνοϊκότερη για την παραγωγή H_2 από το μικροοργανισμό δεν έχουν εξακριβωθεί. Συνεπώς, θα ήταν χρήσιμο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω πειράματα στο μέλλον

ώστε να διαπιστωθεί ο ρόλος που διαδραματίζουν το CO_2 αλλά και το NH_4Cl στο μεταβολισμό του μικροοργανισμού για την παραγωγή H_2.

Επιπλέον, όσον αφορά τα συστατικά του θρεπτικού μέσου M3, διαπιστώθηκε ότι για την ποσότητα των μετάλλων Fe^{2+} και Mg^{2+} η βέλτιστη παραγωγή H_2 παρατηρείται στη συνθήκη του μάρτυρα, αλλά και ότι παραγωγή H_2 επηρεάζεται κυρίως από την ποσότητα του Fe^{2+} και όχι τόσο από την ποσότητα Mg^{2+}. Στη συνέχεια, όσον αφορά την ποσότητα του $CaCO_3$, συμπεραίνεται ότι τα ιόντα CO_3^{2-} διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή H_2 από τον μικροοργανισμό και όχι τα κατιόντα Ca^{2+}, πιθανότατα λόγω της ιδιότητας των ανθρακικών ιόντων να λειτουγούν ως ρυθμιστικά για το pH. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση $CaCO_3$ για την παραγωγή βιολογικού H_2 ήταν η συνθήκη του μάρτυρα, αλλά και η συνθήκη με 30 g L^{-1} $CaCO_3$. Ακόμη, η αλατότητα του θρεπτικού μέσου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή H_2, η οποία διαπιστώθηκε ότι εμφανίζει τη βέλτιστη τιμή στη συνθήκη του μάρτυρα. Όσον αφορά τη συγκέντρωση της σουκρόζης στο θρεπτικό μέσο M3, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η ποσότητα του σακχάρου για τη βέλτιστη παραγωγή H_2 είναι 15 g L^{-1}, δηλαδή μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της συνθήκης ελέγχου.

Τέλος, όσον αφορά τις πηγές σακχάρων αλλά και άνθρακα που μελετήθηκαν διαπιστώθηκε ότι η ανάπτυξη του βακτηρίου αλλά και η παραγωγή H_2 είναι βέλτιστες στη συνθήκη του μάρτυρα παρουσία σουκρόζης. Ακόμη, τεκμηριώθηκε το γεγονός ότι η παραγωγή H_2 στο βακτήριο *Bradyrhizobium sp.* οφείλεται στο μεταβολισμό του σακχάρου.

Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασία ήταν η μελέτη της παραγωγής H_2 από το βακτήριο *Bradyrhizobium sp.* το οποίο αναπτύχθηκε σε συμβατικά θρεπτικά μέσα. Μέσα από τις μελέτες που διεξάχθηκαν προέκυψαν συμπεράσματα σχετικά με την προέλευση της παραγωγής H_2 από το βακτήριο, αλλά και τις συνθήκες ανάπτυξής του όσον αφορά τα συστατικά του θρεπτικού μέσου M3. Η ικανότητα του βακτηρίου να παράγει βιολογικό υδρογόνο, χωρίς κάποια γενετική τροποποίηση, σε μεγάλη ποσότητα και σε συμβατά θρεπτικά μέσα αποτελεί πλεονέκτημα του μικροοργανισμού αυτού σε σχέση με άλλους της βιβλιογραφίας. Συνεπώς, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί εκτενέστερη μελέτη του βακτηρίου *Bradyrhizobium sp.* για να

αποσαφηνιστούν πλήρως τα μεταβολικά μονοπάτια και οι συνθήκες υπό τις οποίες η παραγωγή υδρογόνου είναι βέλτιστη.

Συγκεκριμένα, προτείνεται η μελέτη των μεταβολικών μονοπατιών και των ενζύμων που συμμετέχουν στην παραγωγή H_2, αλλά και η εύρεση πιθανών χρήσιμων παραπροϊόντων που προκύπτουν. Επιπλέον, θα μπορούσε να διερευνηθεί η ανάπτυξη και παραγωγή βιολογικού υδρογόνου και σε άλλες πηγές άνθρακα όπως αρωματικές ενώσεις ή πολυσακχαρίτες, αλλά και η χρήση αποβλήτων πλούσιων σε οργανικό φορτίο ως αντικατάσταση συμβατικών θρεπτικών μέσων. Ειδικότερα, η χρήση αποβλήτων, όπως απόβλητα τυροκομείου, λυματολάσπη, απόβλητα βιομηχανιών τροφίμων κ.ά., αποτελεί σημαντική προοπτική της εν λόγω έρευνας, καθώς ο μικροοργανισμός δύναται εάν αναπτυχθεί σε αυτά τα υποστρώματα, να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο βιοαποικοδόμησης και παραγωγής αξιοποιήσιμων προϊόντων, όπως το λίπασμα. Επιπρόσθετα, μελέτη των μεταβολικών μονοπατιών δύναται να πραγματοποιηθεί και για τη διεργασία καθήλωσης του αζώτου, καθώς και αυτή διαδραματίζει μικρό ρόλο στην παραγωγή βιολογικού υδρογόνου.

Τέλος, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν μελέτες για τη μετατροπή του παραγόμενου βιολογικού υδρογόνου σε καθαρό καύσιμο το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά για αντικατάσταση, των επιβλαβών για το περιβάλλον, ορυκτών καυσίμων. Συγκεκριμένα, μπορεί να πραγματοποιηθεί μελέτη του ποσοστού της καθαρότητας του υδρογόνου που παράγεται από το βακτήριο, το οποίο είναι εμπλουτισμένο με προσμίξεις CO_2. Για την απομάκρυνση των προσμίξεων αυτών θα μπορούσε να επιχειρηθεί συμβίωση του βακτηρίου *Bradyrhizobium sp.* με κάποιον άλλο φωτοσυνθετικό μικροοργανισμό, ο οποίος θα είχε τη δυνατότητα να δεσμεύσει το παραγόμενο CO_2.

Κεφάλαιο 5: Βιβλιογραφία

1. Nikolaidis, Pavlos, and Andreas Poullikkas. "A Comparative Overview of Hydrogen Production Processes." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 67 (2017): 597–611. https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.09.044.
2. DAS, D, and T VEZIROGLU. "Advances in Biological Hydrogen Production Processes." *International Journal of Hydrogen Energy* 33, no. 21 (2008): 6046–57. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.098.
3. Akhlaghi, Neda, and Ghasem Najafpour-Darzi. "A Comprehensive Review on Biological Hydrogen Production." *International Journal of Hydrogen Energy* 45, no. 43 (2020): 22492–512. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.06.182.
4. REN, N, J LI, B LI, Y WANG, and S LIU. "Biohydrogen Production from Molasses by Anaerobic Fermentation with a Pilot-Scale Bioreactor System." International Journal of Hydrogen Energy 31, no. 15 (2006): 2147–57. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.02.011.
5. Kim, Dong-Hoon, and Mi-Sun Kim. "Hydrogenases for Biological Hydrogen Production." *Bioresource Technology* 102, no. 18 (2011): 8423–31. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.113.
6. Hu, Cheng Cheng, Apostolos Giannis, Chia-Lung Chen, Wei Qi, and Jing-Yuan Wang. "Comparative Study of Biohydrogen Production by Four Dark Fermentative Bacteria." *International Journal of Hydrogen Energy* 38, no. 35 (2013): 15686–92. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.03.131.
7. Berg, Jeremy M., Gregory J. Gatto, John L. Tymoczko, and Lubert Stryer. "Glucolysis Gluconeogenesis." Essay. In *Biochemistry*, 499–550. New York, NY: Macmillan Learning, 2019.
8. Barate, M., P. Reyes, R. Munilla, V.M. Fernández, A. Ballesteros, and T. Ruiz-Argüeso. "Effect of Ph on Tritium Exchange and Hydrogen Production and Uptake in Free-Living Cells and in Bacteroids of Bradyrhizobium Japonicum." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 259, no. 2 (1987): 639–44. https://doi.org/10.1016/0003-9861(87)90530-3.
9. Barate, M., P. Reyes, R. Munilla, V.M. Fernández, A. Ballesteros, and T. Ruiz-Argüeso. "Effect of Ph on Tritium Exchange and Hydrogen Production and Uptake

in Free-Living Cells and in Bacteroids of Bradyrhizobium Japonicum." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 259, no. 2 (1987): 639–44. https://doi.org/10.1016/0003-9861(87)90530-3.

10. *P. Worsfold, A. Townshend, C. F. Poole, G. Hanrahan and G. Chan, in Encyclopedia of analytical science, Elsevier Academic Press, Oxford, 2nd edn., 2005, pp. 191–196*
11. *Soto-Urzúa L, Baca BE. Mecanismos de protección de la nitrogenasa a la inactivación por oxígeno [Mechanisms for protecting nitrogenase from inactivation by oxygen]. Rev Latinoam Microbiol. 2001 Jan-Mar;43(1):37-49. Spanish. PMID: 17061570., AEROBIC NITROGEN FIXATION BY RHODOPSEUDOMONAS CAPSULATA*
12. Marcondes de Souza, Jackson Antônio, Lucia Maria Carareto Alves, Alessandro de Mello Varani, and Eliana Gertrudes de Macedo Lemos. "The Family Bradyrhizobiaceae." *The Prokaryotes*, 2014, 135–54. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_253.
13. Carareto Alves, Lucia Maria, Jackson Antônio de Souza, Alessandro de Varani, and Eliana Gertrudes Lemos. "The Family Rhizobiaceae." *The Prokaryotes*, 2014, 419–37. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_297.
14. Macció, D. "Acidity and Calcium Interaction Affect the Growth of Bradyrhizobium Sp. and the Attachment to Peanut Roots." *Soil Biology and Biochemistry* 34, no. 2 (2002): 201–8. https://doi.org/10.1016/s0038-0717(01)00174-2.
15. Graham, Peter H. "Stress Tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and Nodulation under Adverse Soil Conditions." *Canadian Journal of Microbiology* 38, no. 6 (1992): 475–84. https://doi.org/10.1139/m92-079.
16. O'HARA, G. W., M. J. DILWORTH, N. BOONKERD, and P. PARKPIAN. "Iron-deficiency Specifically Limits Nodule Development in Peanut Inoculated with *Bradyrhizobium sp*." *New Phytologist* 108, no. 1 (1988): 51–57. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1988.tb00203.x.
17. Raza, S., B. Jornsgard, H. Abou-Taleb, and J.L. Christiansen. "Tolerance of Bradyrhizobium Sp. (Lupini) Strains to Salinity, Ph, Caco3 and Antibiotics." *Letters in Applied Microbiology* 32, no. 6 (2001): 379–83. https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.00925.x.

18. BENREBAH, F, D PREVOST, A YEZZA, and R TYAGI. “Agro-Industrial Waste Materials and Wastewater Sludge for Rhizobial Inoculant Production: A Review.” *Bioresource Technology* 98, no. 18 (2007): 3535–46. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.066.
19. Patriarca, Eduardo J., Rosarita Tatè, and Maurizio Iaccarino. “Key Role of Bacterial NH^{4+} Metabolism in Rhizobium-Plant Symbiosis.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, no. 2 (2002): 203–22. https://doi.org/10.1128/mmbr.66.2.203-222.2002.
20. Zhu, H. “Hydrogen Production by Four Cultures with Participation by Anoxygenic Phototrophic Bacterium and Anaerobic Bacterium in the Presence of NH^{4+}.” *International Journal of Hydrogen Energy* 26, no. 11 (2001): 1149–54. https://doi.org/10.1016/s0360-3199(01)00038-6.
21. *Xuan, J.; He, L.; Wen, W.; Feng, Y. Hydrogenase and Nitrogenase: Key Catalysts in Biohydrogen Production. Molecules 2023, 28, 1392. https://doi.org/10.3390/molecules2803139*
22. Zhang, Lu, JongShik Chung, Nanqi Ren, and Rui Sun. “Effects of the Ecological Factors on Hydrogen Production and [Fe–Fe]-Hydrogenase Activity in Ethanoligenens Harbinense Yuan-3.” *International Journal of Hydrogen Energy* 40, no. 21 (2015): 6792–97. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.02.015.
23. Wang, Jianlong & Wan, Wei. (2008). Effect of Fe 2 + concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures. International Journal of Hydrogen Energy - INT J HYDROGEN ENERG. 33. 1215-1220. 10.1016/j.ijhydene.2007.12.044.
24. O’hara, Graham W., Nantakorn Boonkerd, and Michael J. Dilworth. “Mineral Constraints to Nitrogen Fixation.” *Plant and Soil* 108, no. 1 (1988): 93–110. https://doi.org/10.1007/bf02370104.
25. Abd-Alla, M. H. “Nodulation and Nitrogen Fixation of Lupinus Species with Bradyrhizobium (Lupin) Strains in Iron-Deficient Soil.” *Biology and Fertility of Soils* 28, no. 4 (1999): 407–15. https://doi.org/10.1007/s003740050513.
26. Feng, Yao, Guang Hao Li, Hong Yuan Mei, and Lu Si Zhang. “The Effect of Magnesium Ions on the Hydrogen-Producing Bacteria in the Water during the Ecological Restoration Process.” *Advanced Materials Research* 610–613 (2012): 264–67. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.610-613.264.

27. Kiss, Sandor A., Eva Stefanovits-Bányai, and Maria Takács-Hájos. “Magnesium-Content of*Rhizobium*Nodules in Different Plants: The Importance of Magnesium in Nitrogen-Fixation of Nodules.” *Journal of the American College of Nutrition* 23, no. 6 (2004). https://doi.org/10.1080/07315724.2004.10719422.
28. Miller, Richard W., and Jean Claude Sirois. “Calcium and Magnesium Effects on Symbiotic Nitrogen Fixation in the Alfalfa (M. Sativa) - Rhizobium Meliloti System.” *Physiologia Plantarum* 58, no. 4 (1983): 464–70. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1983.tb05728.x.
29. Tian, Qing-Qing, Lei Liang, and Ming-Jun Zhu. “Enhanced Biohydrogen Production from Sugarcane Bagasse by Clostridium Thermocellum Supplemented with Caco 3.” *Bioresource Technology* 197 (2015): 422–28. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.111.
30. Mulder, E. G., and W. L. Van Veen. “Effect of Ph and Organic Compounds on Nitrogen Fixation by Red Clover.” *Plant and Soil* 13, no. 2 (1960): 91–113. https://doi.org/10.1007/bf01394106.
31. Zahran, Hamdi Hussein. “*Rhizobium* -Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, no. 4 (1999): 968–89. https://doi.org/10.1128/mmbr.63.4.968-989.1999.
32. LI, J, N REN, B LI, Z QIN, and J HE. “Anaerobic Biohydrogen Production from Monosaccharides by a Mixed Microbial Community Culture.” *Bioresource Technology* 99, no. 14 (2008): 6528–37. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.072.
33. Show, K.Y., D.J. Lee, J.H. Tay, C.Y. Lin, and J.S. Chang. “Biohydrogen Production: Current Perspectives and the Way Forward.” *International Journal of Hydrogen Energy* 37, no. 20 (2012): 15616–31. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.109.
34. Muri, Petra, Ilja Gasan Osojnik-Črnivec, Petar Djinovič, and Albin Pintar. “Biohydrogen Production from Simple Carbohydrates with Optimization of Operating Parameters.” *Acta Chimica Slovenica* 63, no. 1 (2016): 164–154. https://doi.org/10.17344/acsi.2015.2085.

URL links

- https://www.adda247.com/school/nitrogen-fixation/
- https://www.researchgate.net/figure/sucrose-chemical-structure_fig1_322992873
- https://www.selleckchem.com/products/D-Mannitol%28Osmitrol%29.html