ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

“Διερεύνηση των συνθηκών ανάπτυξης και παραγωγής υδρογόνου στο μικροφύκος *Chlorella sp.*”

Γεώργιος Γεωργίτσης
Επιβλέπων καθηγητής: Δημήτριος Γανωτάκης

Ηράκλειο 2023

UNIVERSITY OF CRETE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

DIVISION OF BIOCHEMISTRY

Bachelor thesis

“Investigation of growth conditions and hydrogen production by *Chlorella sp*.”

Georgios Georgitsis

Supervisor: Demetrios Ghanotakis

Heraklion 2023

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, οφείλω ένα ευχαριστώ, στον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δημήτριο Γανωτάκη, καθώς μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο του και ήταν πρόθυμος για οποιαδήποτε βοήθεια ανά πάσα στιγμή. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον δεύτερο επιβλέποντα καθηγητή μου, Γεώργιο Τσιώτη, για τον χρόνο που αφιέρωσε για την αξιολόγηση της παρούσας εργασίας.

Φυσικά, δε θα μπορούσα να παραλείψω, τα μέλη του εργαστηρίου και ιδιαίτερα τον Θεοχάρη Νάζο και τον Ναπολέων Στρατηγάκη, των οποίων η πόρτα των γραφείων τους ήταν πάντα ανοιχτή κι ήταν πάντα πρόθυμοι να με ακούσουν για θέματα επιστημονικής φύσεως ή μη! Η συμβολή τους ήταν ιδιαίτερα σημαντική τόσο στο κομμάτι των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν όσο και στο κομμάτι της αντιμετώπισης των προβλημάτων που προέκυπταν. Ακόμη, ένα ευχαριστώ οφείλω και στην μεταπτυχιακό του εργαστηρίου, Σοφία Λιουδάκη, με την οποία συνεργαστήκαμε, εντατικά, κατά την διάρκεια ενός απαιτητικού -για εμένα- εξαμήνου. Η βοήθεια της και η εμπειρία της ήταν πολύτιμη.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που βρίσκονται “πίσω από τις κάμερες”! Ένα τεράστιο ευχαριστώ πρέπει να αποδοθεί στους γονείς μου, Ειρήνη και Γιάννη, που με στήριξαν (με κάθε τρόπο) όλα αυτά τα χρόνια και κατάφερα να φτάσω στην ολοκλήρωση των σπουδών μου on time! Ακόμη, για εμένα η συχνή παρουσία μου, στην πόλη μου, την Αθήνα, δεν αποτελούσε απλά ένα ταξίδι αναψυχής αλλά εξαιτίας αυτών οι μπαταρίες μου, γέμιζαν και μου έδιναν όρεξη να συνεχίσω.

Επίσης, θα ήταν λάθος μου να μην αναφέρω τους φίλους μου σε Αθήνα και Ηράκλειο που άκουγαν την ασταμάτητη γκρίνια μου επί τέσσερα κυρίως χρόνια! Ο κάθε ένας με τον τρόπο του έκανε και συνεχίζει να κάνει πιο ευχάριστη την παραμονή μου στην Κρήτη, με τις αξέχαστες στιγμές που έχουμε ζήσει (ξέρουν αυτοί ποιοι είναι). Κλείνοντας, ευχαριστώ την παρέα μου στην Αθήνα που μέχρι και σήμερα η υποστήριξη και η πίστη τους σε μένα δεν έχει σβήσει ποτέ…

… αυλαία…

Εξεταστική επιτροπή

Δημήτριος Γανωτάκης (επιβλέπων καθηγητής)
Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Γεώργιος Τσιώτης
Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της επίδρασης μιας σειράς συνθηκών καλλιέργειας στην κυτταρική ανάπτυξη, φωτοσυνθετική δραστηριότητα και στην παραγωγή υδρογόνου από ένα φωτοσυνθετικό μικροφύκος του γένους *Chlorella*, το οποίο είχε απομονώθηκε από ευτροφικό ποτάμι στην πόλη του Ηρακλείου Κρήτης.

Τα φωτοσυνθετικά μικροφύκη έχουν τη δυνατότητα μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης να παράγουν βιο-υδρογόνο, ενός φιλικού προς το περιβάλλον καύσιμο, που δύναται να περιορίσει την ατμοσφαιρική ρύπανση. Σε αυτό το πλαίσιο, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών στις οποίες τα κύτταρα *Chlorella* είναι ικανά να παράγουν υψηλότερες ποσότητες υδρογόνου, καθώς και την επίδραση των συνθηκών αυτών στην ανάπτυξη, φωτοσυνθετική δραστηριότητα και στο βιοχημικό περιεχόμενο των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν η επίδραση μιας σειράς υποστρωμάτων άνθρακα, θερμοκρασίας, εντάσεων φωτισμού και ανάδευσης των καλλιεργειών. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μελέτη της παραγωγής υδρογόνου σε θρεπτικά μέσα από τα οποία απουσιάζουν μακροθρεπτικά συστατικά, όπως ενώσεις θείου, αζώτου, φωσφόρου και καλίου σε διαφορετικά pH. Επίσης, προσδιορίστηκε το βιοχημικό περιεχόμενο των κυττάρων στις παραπάνω συνθήκες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα κύτταρα του στελέχους παράγουν τις μεγαλύτερες ποσότητες υδρογόνου όταν καλλιεργηθούν σε θρεπτικό μέσο όπου απουσιάζουν ενώσεις του καλίου σε ελαφρά όξινο περιβάλλον. Το υπόστρωμα άνθρακα που προσφέρει την μεγαλύτερη παραγωγή υδρογόνου μεταξύ άλλων πηγών άνθρακα είναι η γλυκόζη, ενώ η μέτρια ένταση φωτισμού υπό ανάδευση της καλλιέργειας παράγει μεγαλύτερους όγκους αερίου σε σχέση με τις υπόλοιπες συνθήκες που μελετήθηκαν.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής καθιστούν σαφές ότι το στέλεχος *Chlorella* sp. μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιοκαυσίμων με χαμηλότερο περιβαλλοντικό αποτύπωμα.

Λέξεις κλειδιά: Φωτοσυνθετικά μικροφύκη, *Chlorella sp*, συνθήκες ανάπτυξης, παραγωγή υδρογόνου, στέρηση θείου - αζώτου - φωσφόρου - καλίου, βιοχημικό περιεχόμενο

ABSTRACT

In this thesis, the effect of a series of culture conditions on cell growth, photosynthetic activity and hydrogen production by a photosynthetic microalga of the genus *Chlorella*, which had been isolated from a eutrophic river in the city of Heraklion, Crete, was investigated.

Through the process of photosynthesis, photosynthetic microalgae produce biohydrogen, an environmentally sustainable fuel that has a lower impact on atmospheric pollution. In this context, an investigation was carried out to find the optimal conditions in which *Chlorella* cells are able to produce higher amounts of hydrogen gas, as well as the effect of these conditions on growth, photosynthetic activity and the biochemical content of the cells. More specifically, the effect of a carbon substrate, temperature, light intensity and agitation of the cultures with an orbital shaker were studied. In addition, a study of hydrogen production in nutrient media with macronutrient deprivation such as sulfur, nitrogen, phosphorus and potassium at different pH was carried out. Also, the biochemical content of the cells in the above conditions was determined.

Our results showed that microalgal cells produced the largest amounts of hydrogen when cultured in a nutrient medium where potassium compounds are absent, under slightly acidic conditions. The carbon substrate that led to the highest hydrogen production among other carbon sources was glucose, while medium light intensity regimes, under shaking of the culture produces larger volumes of gas, compared to the other conditions studied.

The results of this thesis make it clear that the *Chlorella* sp. strain has the potential to be used for the production of biofuels with a lower environmental footprint.

Key words: Photosynthetic algae, *Chlorella sp*, growth conditions, hydrogen production, sulfur-nitrogen-phosphorus-potassium deprivation, biochemical content

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ……..……9
1.1 Φωτοσύνθεση……9
1.2 Φωτεινές αντιδράσεις φωτοσύνθεσης……..……..……9
1.3 Φωτοσυνθετικές χρωστικές…….……..…12
1.4 Φθορισμός Χλωροφύλλης…….……12
1.5 Φωτοσυνθετικά Μικροφύκη……..…14
1.5.1 Μικροφύκη του γένους *Chlorella*……..……14
1.5.2 Εφαρμογές *Chlorella*……..15
1.6 Καλλιέργειες μικροφύκων…….……16
1.6.1 Αυτότροφες καλλιέργειες……..……16
1.6.2 Ετερότροφες καλλιέργειες……..……..…..16
1.6.3 Μικτότροφες καλλιέργειες……..……..…16
1.7 Ανάπτυξη μικροοργανισμών……..……..……17
1.8 Υδρογόνο ως βιοκαύσιμο……..…… 17
1.9 Παραγωγή υδρογόνου από φωτοσυνθετικά μικροφύκη……..……..…19
1.10 Σκοπός διπλωματικής εργασίας…….……22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ……..23
2.1 Μικροοργανισμός και συνθήκες ανάπτυξης……23
2.2 Πειραματικές καλλιέργειες…….…….……24
2.2.1 Πειραματικές καλλιέργειες προς μελέτη βιοχημικού περιεχομένου……..…27
2.2.2 Πειραματικές καλλιέργειες προς μελέτη παραγωγής υδρογόνου……..…28
2.3 Μετρήσεις κυτταρικής ανάπτυξης……..……..29
2.3.1 Μέτρηση ανάπτυξης μικροοργανισμού μέσω του όγκου
καθιζάμενων κυττάρων (PCV)…….…..……30
2.3.2 Προσδιορισμός φωτοσυνθετικών Χρωστικών…….……..……30
2.4 Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού…….……..……31
2.5 Μέτρηση παραγόμενου υδρογόνου με αέρια χρωματογραφία (GC-TCD)…..…31
2.6 Μετρήσεις βιοχημικού περιεχομένου C*hlorella*…..……..32
2.6.1 Προσδιορισμός σακχάρων με την μέθοδο θυμόλης- θειικού……32

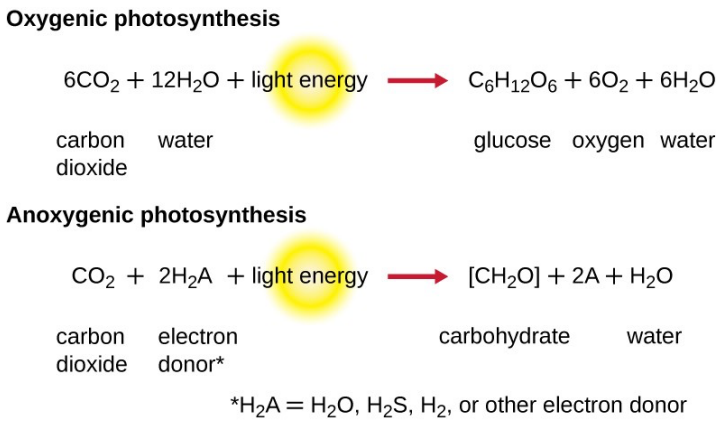
2.6.2 Προσδιορισμός λιπιδίων με την μέθοδο θειικού - φωσφορικού-
βανιλλίνης…….……..33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ……..…..……34
3.1 Διερεύνηση ανάπτυξης και παραγωγής υδρογόνου από *Chlorella sp.*,
από κύτταρα υπό και χωρίς ανάδευση…….……..…….34
3.2 Διερεύνηση ανάπτυξης και παραγωγής υδρογόνου από *Chlorella sp.*,
χρησιμοποιώντας διαφορετικές πηγές άνθρακα……..……..……..…..37
3.3 Διερεύνηση ανάπτυξης και παραγωγής υδρογόνου από *Chlorella sp.*,
σε διαφορετικές θερμοκρασίες…….…….….…42
3.4 Διερεύνηση ανάπτυξης και παραγωγής υδρογόνου από *Chlorella sp.*,
σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού…….…..44
3.5 Διερεύνηση παραγωγής υδρογόνου από *Chlorella sp.*, από καλλιέργειες
με στερήσεις K, S, N και P από το θρεπτικό μέσα σε διαφορετικά pH….…….……48
3.6 Διερεύνηση παραγωγής υδρογόνου από *Chlorella sp.*, από καλλιέργειες
με στερήσεις K, και P από το θρεπτικό μέσα σε διαφορετικά pH….……..…53
3.7 Αποτελέσματα πάνω στην μελέτη του βιοχημικού περιεχομένου
κυττάρων *Chlorella sp*, όταν αυτά αναπτύσσονται σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα..55
3.8 Συμπεράσματα……..58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ……59
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ…….60

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φωτοσύνθεση

Φωτοσύνθεση είναι η διαδικασία που εκτελούν οι πολυκύτταροι φυτικοί οργανισμοί και μερικοί μικροοργανισμοί (όπως πράσινα μικροφύκη) προκειμένου να εξασφαλίσουν την απαραίτητη ενέργεια για την ανάπτυξη και τις μεταβολικές τους πορείες. Για τον σκοπό αυτό, οι οργανισμοί, χρησιμοποιούν φωτεινή ενέργεια και την μετατρέπουν σε χημική. [1] Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα στους χλωροπλάστες και διακρίνεται στις φωτεινές και σκοτεινές αντιδράσεις.

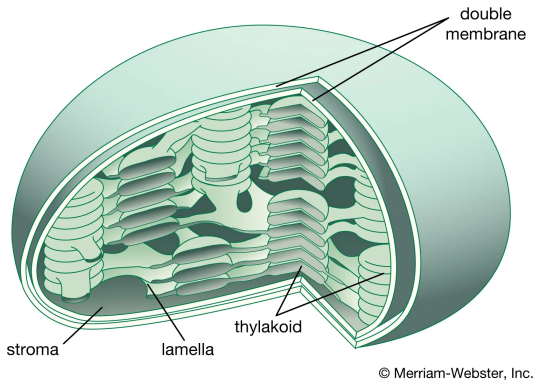
Η φωτοσύνθεση διακρίνεται στην οξυγονική και την μη - οξυγονική [2]. Στην πρώτη περίπτωση, παράγεται οξυγόνο, ενώ στην τελευταία, το οξυγόνο δεν παρατηρείται ως προϊόν της διαδικασίας. Αυτό το είδος της φωτοσύνθεσης είναι πιο συνηθισμένο σε κάποια φωτοσυνθετικά βακτήρια. [2,3]. Η παρακάτω εικόνα (Εικόνα 1), συνοψίζει τη γενική αντίδραση σε κάθε είδος φωτοσύνθεσης.

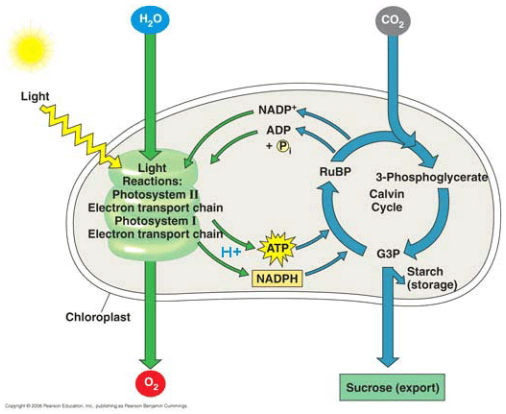


Εικόνα 1: Γενική εξίσωση της οξυγονικής φωτοσύνθεσης (πάνω). Διακρίνεται πως μαζί με την οργανική ύλη που παράγεται, απελευθερώνεται και μοριακό οξυγόνο, ενώ στη μη οξυγονική φωτοσύνθεση (κάτω) μαζί με την οργανική ύλη, το προϊόν που σχηματίζεται είναι διαφορετικό από το οξυγόνο. [4]

1.2 Φωτεινές αντιδράσεις φωτοσύνθεσης

Οι φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης πραγματοποιούνται στις μεμβράνες των θυλακοειδών, στους χλωροπλάστες (Εικόνα 2) και για την πραγματοποίηση τους απαιτείται η παρουσία φωτός. Κατά την ολοκλήρωση των φωτεινών αντιδράσεων παράγεται ενέργεια, υπό μορφή ATP, και αναγωγική ισχύς ως NADPH, που χρησιμοποιούνται στις σκοτεινές αντιδράσεις (κύκλος Calvin). Οι τελευταίες οδηγούν στην παραγωγή υδατανθράκων, εξασφαλίζοντας την απαραίτητη ενέργεια κατά τον καταβολισμό τους στον εκάστοτε οργανισμό. [5, 6].

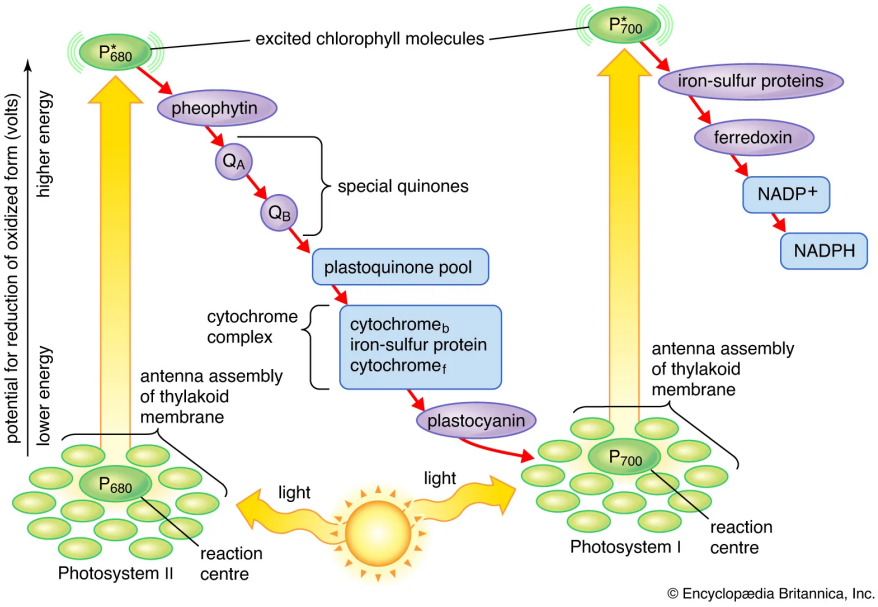




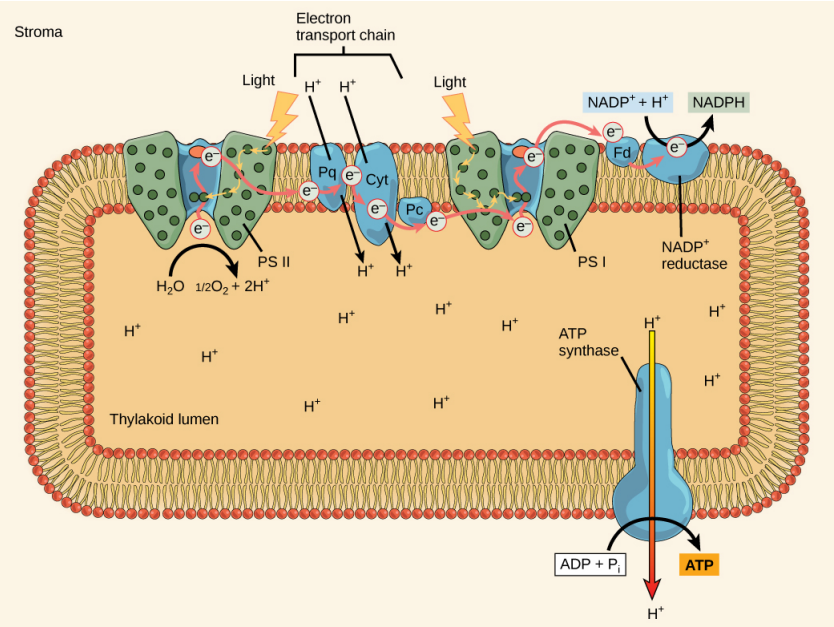
Εικόνα 2: Απεικόνιση του χλωροπλάστη.(αριστερά) Στην εικόνα διακρίνονται οι θυλακοειδείς μεμβράνες όπου λαμβάνουν χώρα οι φωτεινές αντιδράσεις καθώς φαίνεται και το stroma του χλωροπλάστη όπου πραγματοποιούνται οι σκοτεινές αντιδράσεις (κύκλος Calvin) [5]. Απεικόνιση γενικού σχήματος της φωτοσύνθεσης - φωτεινών και σκοτεινών αντιδράσεων (δεξιά) [7].

Οι φωτεινές αντιδράσεις, αφορούν την απορρόφηση φωτός από τα φωτοσυστήματα I και II, την μεταφορά της ενέργειας μέσω αλυσίδας ηλεκτρονίων και τελικά την παραγωγή ATP και NADPH. Η απορρόφηση του φωτός λαμβάνει χώρα στα φωτοσυστήματα, τα οποία στο κέντρο αντίδρασης διαθέτουν χρωστικές, οι κυριότερες των οποίων είναι οι χλωροφύλλες. Η χλωροφύλλη στο φωτοσύστημα II (PSII) απορροφά ακτινοβολία μήκους κύματος 680 nm και καλείται P680. Όταν ένα φωτόνιο απορροφηθεί από την χλωροφύλλη P680 αυτή μεταβαίνει σε μία διεγερμένη κατάσταση (P680*). Το διεγερμένο μόριο της χλωροφύλλης, μεταβιβάζει το ηλεκτρόνιο σε ένα μόριο φαιοφυτίνης [8]. Η απώλεια του ηλεκτρονίου στο κέντρο αντίδρασης στο φωτοσύστημα II, αναπληρώνεται με την οξείδωση του νερού στο κέντρο μαγγανίου. Κατά την οξείδωση του νερού παράγεται μοριακό οξυγόνο, στην οξυγονική φωτοσύνθεση. [4, 9] Η ανηγμένη φαιοφυτίνη, μεταβιβάζει το ηλεκτρόνιο που έλαβε από την χλωροφύλλη σε μία σειρά από πλαστοκινόνες οι οποίες ανάγονται σε πλαστοκινόλες. Έπειτα, το κυτόχρωμα bf είναι υπέυθυνο για την επανοξείδωση της πλαστοκινόλης σε πλαστοκινόνη, με την μεταφορά του ηλεκτρονίου σε ένα μόριο πλαστοκυανίνης. [9,10].

Όσον αφορά το κέντρο του φωτοσυστήματος I, υπάρχει ένα ζεύγος χλωροφύλλης το οποίο απορροφά ακτινοβολία μήκους κύματος 700 nm (αποκαλείται P700) και η χλωροφύλλη μεταβαίνει σε μία διεγερμένη κατάσταση. Από την διεγερμένη χλωροφύλλη τα ηλεκτρόνια οδηγούνται προς την φερρεδοξίνη και την αναγωγάση του ζεύγους φερρεδοξίνης-$NADP^+$, από την οποία παράγεται και το αναγωγικό NADPH. Τέλος, το ηλεκτρόνιο που χάθηκε από την χλωροφύλλη αναπληρώνεται από την πλαστοκυανίνη [9,10]. Στην Εικόνα 3 παρουσιάζεται, η διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως.



Εικόνα 3: Διαγραμματική απεικόνιση (σχήμα Z) των φωτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης [10].



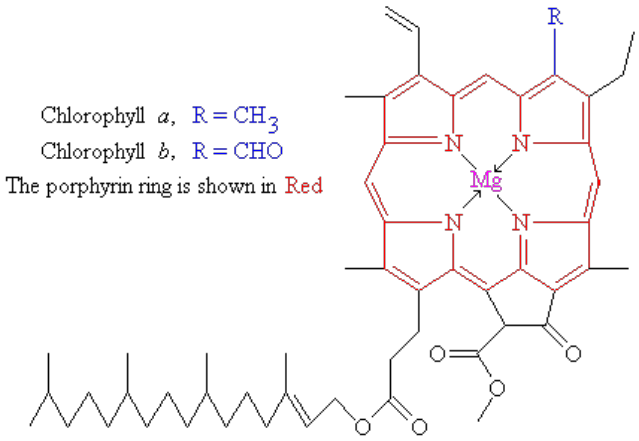
Εικόνα 4: η βαθμίδωση της συγκέντρωσης πρωτονίων οδηγεί στην παραγωγή ATP [11].

Παράλληλα, με την παραγωγή του NADPH, παράγεται και ATP, μέσω της ATP- συνθάσης (Εικόνα 4). Η συνολική ροή των ηλεκτρονίων προς την αναγωγάση του του ζεύγους φερρεδοξίνης-$NADP^+$, δημιουργεί διαφορά δυναμικού στις δύο πλευρές της μεμβράνης του θυλακοειδούς, γεγονός που αποτελεί κινητήρια δύναμη για την σύνθεση ATP [11].

1.3 Φωτοσυνθετικές Χρωστικές

Οργανικές ουσίες που είναι υπεύθυνες για την απορρόφηση ορατού φωτός και κατ' επέκταση για την πραγματοποίηση των φωτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης καλούνται φωτοσυνθετικές χρωστικές [12]. Οι χρωστικές οι οποίες βρίσκονται σε αφθονία στους φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς, που αφορούν την παρούσα εργασία, χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τις χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή.

Οι χλωροφύλλες, διαθέτουν πράσινο χρώμα με σημαντικότερες, την χλωροφύλλη-a και την χλωροφύλλη-b (Εικόνα 5). Η χλωροφύλλη-a παρουσιάζει μέγιστα απορρόφησης στα μήκη κύματος 430 και 662 nm ενώ η χλωροφύλλη-b στα 453 και 642 nm [9]. Αποτελούνται από έναν τετραπυρολικό δακτύλιο (πορφυρίνη) που στο κέντρο του έχει συναρμοσμένο ένα ιόν μαγνησίου (Mg^{2+}). Εξαιτίας της παρουσίας της πορφυρίνης, και των δομών συντονισμού της, τα ηλεκτρόνια μπορούν να μετακινούνται ελεύθερα στο αρωματικό σύστημα και να μεταβαίνουν με ευκολία σε διεγερμένες καταστάσεις. Η ικανότητα αυτή του δακτυλίου, καθιστά, την χλωροφύλλη κατάλληλο μόριο στα κέντρα αντίδρασης για την μεταβίβαση ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας σε άλλα μόρια [13].

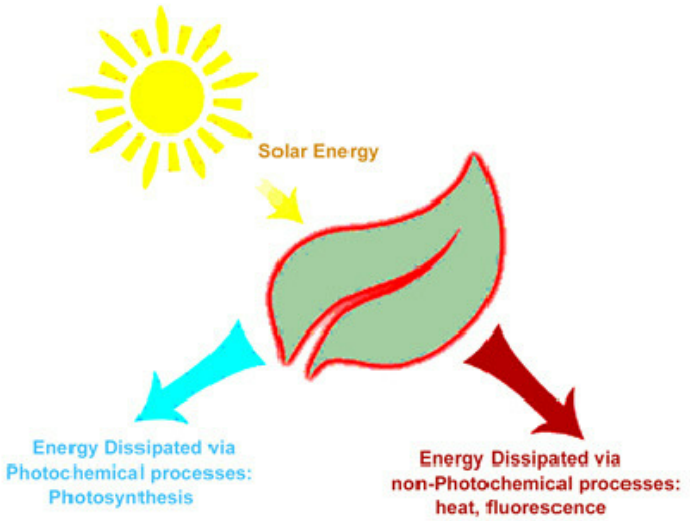


Εικόνα 5: Απεικόνιση των δομών της χλωροφύλλης-a και της χλωροφύλλης-b. Η χλωροφύλλη-a διαφέρει από την b, σε έναν υποκαταστάτη του πυρπολικού δακτυλίου, όπως φαίνεται στην εικόνα. Η χλωροφύλλη-α στην θέση που έχει επισημανθεί διαθέτει ομάδα μεθυλίου ενώ η b στην αντίστοιχη θέση διαθέτει μια αλδευδομάδα [14].

Η άλλη κύρια κατηγορία χρωστικών, είναι τα καροτενοειδή, τα οποία είναι οργανικές ενώσεις με εκτενές συζυγιακό σύστημα και εντοπίζονται στην φωτοσυνθετική κεραία (κέντρα απορρόφησης φωτός στα φωτοσυστήματα). Αυτά, απορροφούν ακτινοβολία στην πράσινη και μπλε περιοχή του ορατού φάσματος του φωτός. Τα καροτενοειδή, προσφέρουν προστασία στους οργανισμούς που απαντώνται (ως αντιοξειδωτικά) αλλά και μεταβιβάζουν ενέργεια στην χλωροφύλλη, από το φως που απορροφούν [15].

1.4 Φθορισμός Χλωροφύλλης

Η ενέργεια, που απορροφάται από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές και διοχετεύεται στην χλωροφύλλη, μπορεί να ακολουθήσει διαφορετικές πορείες. Μεγάλο μέρος της φωτεινής ενέργειας, αξιοποιείται και προσφέρεται για την φωτοσύνθεση. Τμήμα της ενέργειας διαφεύγει από το σύστημα υπό μορφή θερμότητας και άλλο μέρος αυτής, εκπέμπεται υπό μορφή φθορισμού από την χλωροφύλλη [9]. Ως φθορισμός, ορίζεται η εκπομπή ενός φωτονίου χαμηλότερης ενέργειας σε σχέση με την ενέργεια που απορροφήθηκε από το μόριο που διεγέρθηκε. Ο φθορισμός είναι ένα φαινόμενο το οποίο έχει μικρή διάρκεια ζωής (περίπου 10^{-8} sec) [16]. Ο φθορισμός χλωροφύλλης είναι μία τεχνική για να προσδιοριστεί η λειτουργικότητα του φωτοσυτήματος ΙΙ. Σε φωτοσύστημα το οποίο είναι παρεμποδισμένο με κάποιον αναστολέα ή βρίσκεται υπό συνθήκες βιολογικής καταπόνησης (stress), η ενέργεια δεν μπορεί να διοχετευτεί στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα η εκπομπή φθορισμού είναι μεγαλύτερη [17].



Εικόνα 6: Οι πιθανές διαδρομές που μπορεί να ακολουθήσει η ενέργεια αφού έχει απορροφηθεί από την φωτοσυνθετική κεραία [18].

Για τον προσδιορισμό της λειτουργικότητας του φωτοσυστήματος ΙΙ, οποιοδήποτε δείγμα μετρηθεί θα πρέπει αρχικά να προσαρμοστεί στο σκοτάδι, για να επανέλθουν όλα τα μόρια χλωροφύλλης στη θεμελιώδη κατάσταση. Έπειτα, το δείγμα δέχεται συνεχή κόκκινη ακτινοβολία (laser), προκειμένου όλα τα λειτουργικά φωτοσυστήματα στο βιολογικό δείγμα να απορροφήσουν ακτινοβολία. Έτσι, ο φθορισμός από μία αρχική τιμή (F_0), αποκτά μία μέγιστη τιμή (F_{max}) και εν συνεχεία μειώνεται σε μία σταθερή τιμή (F_s). Η διαφορά των τιμών F_{max} και F_0 καλείται F_v και ο λόγος F_v/F_{max} (πάντα μικρότερος από την μονάδα) είναι χαρακτηριστικός για τον προσδιορισμό της λειτουργικότητας του φωτοσυστήματος ΙΙ. Χαμηλός λόγος F_v/F_{max} υποδηλώνει καταπόνηση (stress) του φωτοσυνθετικού μηχανισμού ενώ μεγαλύτερες τιμές του λόγου φανερώνουν την ορθή λειτουργία της φωτοσύνθεσης [9 ,17].

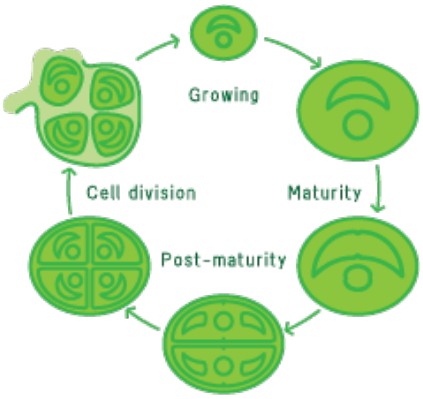
1.5 Φωτοσυνθετικά Μικροφύκη

Τα φωτοσυνθετικά πράσινα μικροφύκη, είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί και αποτελούν μία από τις αρχαιότερες μορφές ζωής στον πλανήτη. Το μήκος τους, κυμαίνεται από μερικά έως και μερικές εκατοντάδες μικρόμετρα (μm) [19]. Τα φωτοσυνθετικά μικροφύκη, όπως και τα ανώτερα φυτά, είναι αυτότροφοι οργανισμοί, οι οποίοι με την απορρόφηση φωτεινής ενέργειας, είναι ικανά να συνθέσουν υδατάνθρακες - μέσω του κύκλου Calvin - ο μεταβολισμός των οποίων παρέχει στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς την απαραίτητη ενέργεια [5]. Τα μικροφύκη μαζί με τα κυανοβακτήρια, είναι ζωτικής σημασίας για την ζωή στον πλανήτη, καθώς αυτά μέσω της φωτοσύνθεσης, παράγουν σχεδόν, το μισό οξυγόνο που βρίσκεται στην ατμόσφαιρα [19].

1.5.1 Μικροφύκη γένους *Chlorella*

Το μικροφύκος *Chlorella*, είναι ένας πράσινος, σφαιρικός, χωρίς μαστίγια, φωτοσυνθετικός μονοκύτταρος μικροοργανισμός, το μέγεθος του οποίου κυμαίνεται από 2 έως 10 μm. Τα μικροφύκη του γένους *Chlorella*, είναι ικανά να αναπτύσσονται σε ακραία περιβάλλοντα, καθώς προσαρμόζονται εύκολα σε νέες συνθήκες. Μικροοργανισμοί αυτού του γένους, μπορούν να αναπτυχθούν σε αστικά λύματα, σε λύματα βυρσοδεψίας, καθώς αποτελούν εξαιρετικό εργαλείο για την βιοαποικοδόμηση αποβλήτων. Στην παρούσα εργασία, το μικροφύκος *Chlorella sp*., απομονώθηκε από τον ευτροφικό ποταμό Γιόφυρο, στο Ηράκλειο Κρήτης και χαρακτηρίστηκε από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου σε προηγούμενες μελέτες [20, 21]. Τα κύτταρα *Chlorella sp*, περιβάλλονται από εξωκυττάρια μήτρα ετεροπολυσακχαρίτη, η οποία αποτελείται από γλυκοζαμίνη, αραβινόζη, γαλακτόζη και ραμνόζη [22]. Η μήτρα, σχηματίζεται γύρω από το κύτταρο, όταν αυτό βρεθεί σε δυσμενή, για την ανάπτυξη του, περιβάλλοντα, εξασφαλίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Εικόνα 7) [21].

Τέλος, μέσω ανάλυσης του βιοχημικού περιεχομένου των κυττάρων, προσδιορίστηκε πως αυτά είναι άφθονα σε πρωτεΐνες 39,09 (±2,61)%. Οι υδατάνθρακες επίσης βρίσκονται σε μεγάλη αναλογία 26,87 (±2,29)% ενώ περιέχονται φωτοσυνθετικές χρωστικές, συνολικές χλωροφύλλες και καροτενοειδή σε αναλογίες 4,30 (±0,08)% και 0,73 (±0,02)% αντίστοιχα [21].



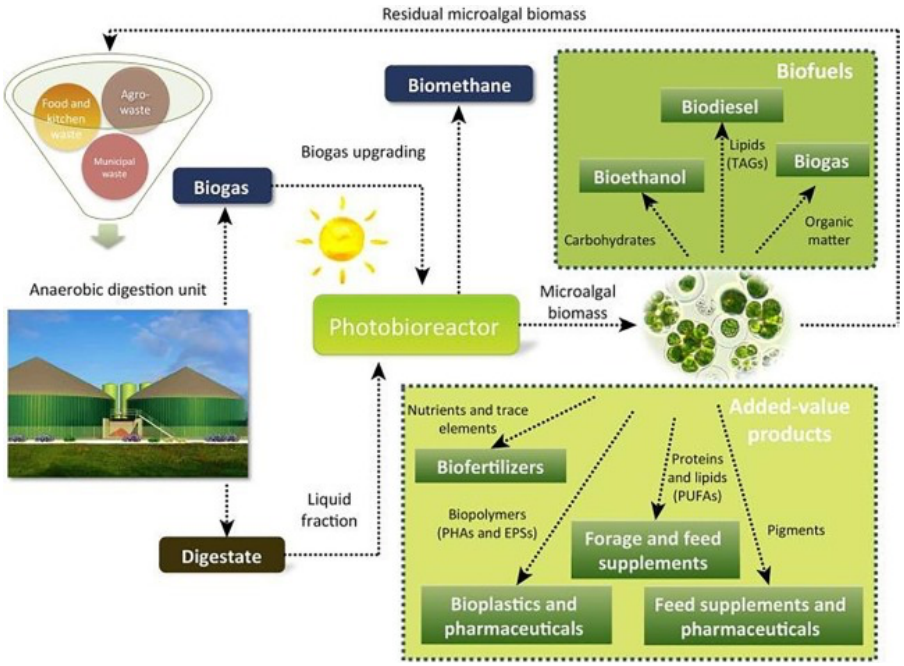
Chlorella's life cycle

Εικόνα 7: Ο κύκλος ζωής των κυττάρων *Chlorella*. Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και διαιρούνται ενός της εξωκυττάριας μήτρας. Έπειτα, η εξωκυττάρια μήτρα σπάει και τα θυγατρικά κύτταρα απελευθερώνονται στο περιβάλλον. Η παρουσία μήτρας αποτελεί τρόπο προστασίας των ευάλωτων θυγατρικών κυττάρων [23].

1.5.2 Εφαρμογές *Chlorella*

Την τελευταία δεκαετία υπάρχει ένα διαρκώς αυξανόμενο ενδιαφέρον, γύρω από τα μικροφύκη και τις δυνατότητες τους. Η εύκολη ανάπτυξη τους σε μεγάλη κλίμακα έχει διεγείρει το επιστημονικό ενδιαφέρον σε πολλούς τομείς, όπου τα μικροφύκη ή τα προϊόντα του μεταβολισμού τους, μπορούν να απομονωθούν και να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή προϊόντων. Πιο συγκεκριμένα, η *Chlorella*, μπορεί να χορηγηθεί στο ανθρώπινο διαιτολόγιο, ως συμπληρώματα διατροφής, καθώς είναι εξαιρετική πηγή βιταμινών (κυρίως της D και B12) ενώ αποτελεί εξαιρετική φυτική πηγή πρωτεϊνών [24]. Ακόμη, διαθέτει αντιοξειδωτικά (καροτενοειδή) τα οποία ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν από φαρμακοβιομηχανίες ως φυσικές χρωστικές ή συμπληρώματα [25].

Τέλος, μία ακόμη σημαντική εφαρμογή των φωτοσυνθετικών μικροφύκων (και της *Chlorella)* είναι η παραγωγή βιοκαυσίμων, όπως το υδρογόνο, στο οποίο γίνεται εκτενής αναφορά σε αντίστοιχη ενότητα. Στην εικόνα 9, συνοψίζονται μερικές από τις εφαρμογές των μικροφύκων.



Εικόνα 9: Συνοπτική απεικόνιση των εφαρμογών που προκύπτουν από την καλλιέργεια μικροφύκων. Προϊόντα του μεταβολισμού τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρώματα διατροφής, λιπάσματα, ενώ γίνεται λόγος και στην μαζική παραγωγή βιοκαυσίμων από τα μικροφύκη [26].

1.6 Καλλιέργεια Μικροφύκων

Για την καλλιέργεια και την ανάπτυξη οποιουδήποτε μικροοργανισμού απαιτείται η ύπαρξη ενός θρεπτικού μέσου, από το οποίο ο μικροοργανισμός εξασφαλίζει τα απαραίτητα στοιχεία για την ανάπτυξή του. Ανάλογα με την πηγή των οργανικών υποστρωμάτων που διατίθεται στο μικροφύκος, οι καλλιέργειες μπορούν να ταξινομηθούν σε αυτότροφες, ετερότροφες και μικτότροφες καλλιέργειες.

1.6.1 Αυτότροφες καλλιέργειες

Ο αυτότροφος τύπος καλλιέργειας, αφορά την κατανάλωση του ατμοσφαιρικού διοξειδίου του άνθρακα από τον μικροοργανισμό, δηλαδή την καθήλωση αυτού κατά τον κύκλο Calvin [5], για την παραγωγή της τροφής του. Κατ' αυτόν τον τρόπο καλλιέργειας, τα φωτοσυνθετικά μικροφύκη, εκμεταλευόμενα, την παρουσία του διοξειδίου του άνθρακα συνθέτουν σάκχαρα τα οποία μεταβολίζονται για την παραγωγή ενέργειας. Αυτός ο τύπος καλλιέργειας, στηρίζεται στην φωτοσυνθετική δραστηριότητα του οργανισμού για την ανάπτυξη, η οποία γίνεται, με πιο βραδείς ρυθμούς συγκριτικά με τους άλλους δύο τύπους [27].

1.6.2 Ετερότροφες καλλιέργειες

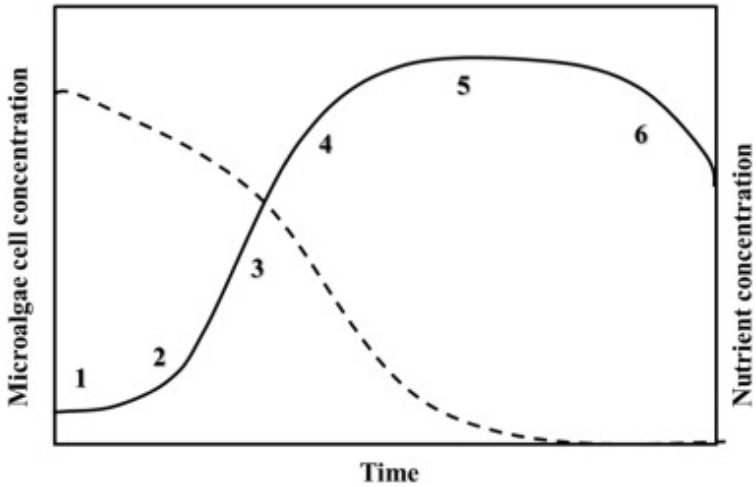
Οι ετερότροφες καλλιέργειες, αφορούν την κατανάλωση ενός οργανικού υποστρώματος (εκτός του CO_2) από το μικροφύκος. Το οργανικό υπόστρωμα μπορεί να είναι οξικό, γλυκόζη, γαλακτόζη, φρουκτόζη, άλλα σάκχαρα ακόμη και πυροσταφυλικό [28]. Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού μπορεί να πραγματοποιηθεί και παρουσία φωτός (φωτοετερότροφη καλλιέργεια). Σε αυτού του τύπου καλλιέργειες, αξιοποιείται η ηλιακή ενέργεια, επικουρικά, διότι το CO_2 δεν είναι άφθονο, για να υπάρχει ανάπτυξη αποκλειστικά από την λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Στις ετερότροφες καλλιέργειες, η ανάπτυξη μπορεί να πραγματοποιηθεί και στο σκοτάδι, καθώς η ενέργεια εξασφαλίζεται από τον μεταβολισμό του οργανικού υποστρώματος που προστίθεται στο θρεπτικό μέσο και δεν παράγεται από τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό [27].

1.6.3 Μεικτότροφες καλλιέργειες

Στις μεικτότροφες καλλιέργειες τα μικροφύκη, αναπτύσσονται παρουσία φωτός, οργανικού υποστρώματος και ανόργανης πηγής άνθρακα. Αυτός ο τρόπος ανάπτυξης, επομένως, περιέχει χαρακτηριστικά και από τις δύο προαναφερθείσες καλλιέργειες. Τα κύτταρα χρησιμοποιούν την ενέργεια από τον μεταβολισμό του οργανικού υποστρώματος για την κυτταρική ανάπτυξη, ενώ αποθηκεύουν την ενέργεια προερχόμενη από την ακτινοβολία την οποία απορροφούν [27].

1.7 Ανάπτυξη Μικροφύκων

Η ανάπτυξη των φωτοσυνθετικών μικροφύκων, αποτελείται από πολλές συνιστώσες, όπως η ένταση του φωτός, η διαθεσιμότητα θρεπτικών μέσων, η θερμοκρασία, το pH του περιβάλλοντος και η παρουσία ή μη, παρεμποδιστών της φωτοσύνθεσης. Στην Εικόνα 8, απεικονίζεται η καμπύλη ανάπτυξης μικροφύκους σε συνάρτηση με τον χρόνο, λαμβάνοντας υπόψιν, μόνο έναν παράγοντα ανάπτυξης, την διαθεσιμότητα θρεπτικών υλικών.



Εικόνα 8: καμπύλη ανάπτυξης (συνεχής γραμμή) του μικροφύκους συναρτήσει του χρόνου. Με διακεκομμένη γραμμή απεικονίζεται η διαθεσιμότητα θρεπτικών μέσων σε συνάρτηση με τον χρόνο [29].

Ο μικροοργανισμός, αρχικά, προσαρμόζεται στο νέο περιβάλλον και έτσι η κυτταρική ανάπτυξη δεν είναι γρήγορη (λανθάνουσα φάση - 1). Την λανθάνουσα φάση διαδέχεται η εκθετική φάση (2) στην οποία η κυτταρική διαίρεση είναι ραγδαία. Ακολουθεί η γραμμική φάση ανάπτυξης (3), κατά την οποία ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων είναι γρήγορος αλλά με σταθερό ρυθμό. Εν συνεχεία, έπεται η φθίνουσα φάση ανάπτυξης (4), όπου ο ρυθμός κυτταρικής διαίρεσης είναι μεγαλύτερος από τον ρυθμό θανάτου των κυττάρων. Οι ρυθμοί κυτταρικής διαίρεσης και κυτταρικού θανάτου εξισώνονται στην στατική φάση (5), όπου ο κυτταρικός πληθυσμός παραμένει σταθερός. Τέλος, ακολουθεί η φάση θανάτου (6), που οφείλεται κατά κύριο λόγο στην κατανάλωση θρεπτικού υλικού, όπου ο κυτταρικός πληθυσμός μειώνεται [29]. Διαρκής τροφοδοσία της καλλιέργειας με νέο θρεπτικό υλικό, πυροδοτεί την συνεχή ανάπτυξη του οργανισμού. Αυτό βέβαια προϋποθέτει το pH το μέσου να είναι κατάλληλο για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και να μην έχουν συσσωρευτεί τοξικά προϊόντα του μεταβολισμού στο μέσο.

1.8 Υδρογόνο ως Βιοκαύσιμο

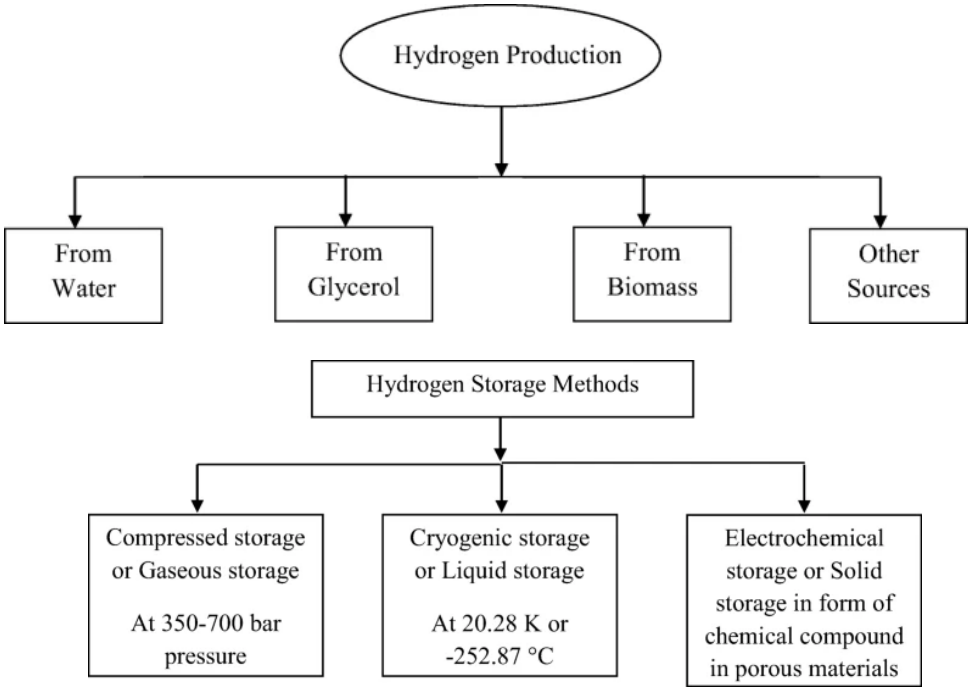
Οι αυξημένες καθημερινές ενεργειακές ανάγκες του πληθυσμού, έχουν θέσει ως πρόκληση, την χρήση εναλλακτικών μορφών ενέργειας, οι οποίες δεν επιδεινώνουν την ατμοσφαιρική ρύπανση. Η χρήση ορυκτών καυσίμων, ως λύση απέναντι στις ενεργειακές ανάγκες, θα αυξήσει τα επίπεδα αερίων του θερμοκηπίου, δυσχεραίνοντας το φαινόμενο της κλιματικής αλλαγής [30].

Βιώσιμη και οικολογική λύση, στις ενεργειακές ανάγκες εμφανίζονται τα βιοκαύσιμα. Ως βιοκαύσιμο, μπορεί να θεωρηθεί, οποιαδήποτε ουσία η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο και προέρχεται από βιομάζα [31]. Φιλικές προς το περιβάλλον πηγές βιοκαυσίμων μπορούν να αποτελέσουν τα πράσινα φύκη (green algae), παρέχοντας προιόντα μεταβολισμού τους όπως τριάκυλο γλυκερόλες, λιπαρά οξέα και παραγόμενα αέρια (όπως υδρογόνο). Τα βιοκαύσιμα, ταξινομούνται στις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, δεδομένο πως εκείνα μπορούν να αναπληρώνονται γρήγορα και είναι φιλικά προς το περιβάλλον.

Ενδιαφέρον, παρουσιάζει το υδρογόνο. Εκείνο, εξαιτίας της αφθονίας του στην φύση και του μεγάλου ενεργειακού περιεχομένου του, αποτελεί μία ελκυστική επιλογή για την αντικατάσταση πηγών ενέργειας, με βάση τον άνθρακα, καθώς έχει μηδενικές εκπομπές ρύπων [32]. Πολλές προσπάθειες στο παρελθόν είχαν πραγματοποιηθεί για την υλοποίηση αυτή αλλά δεν ήταν καρποφόρες. Τα τελευταία χρόνια βέβαια, η χρήση υδρογόνου ως καύσιμο δεν φαίνεται ουτοπική. Στην εικόνα 10, απεικονίζονται οι τρόποι από τους οποίους μπορεί να γίνει παραγωγή υδρογόνου καθώς και οι τρόποι με τους οποίους το υδρογόνο μπορεί να αποθηκευτεί πριν χρησιμοποιηθεί.

- Για την μετακίνηση, χρησιμεύοντας ως καύσιμο σε μέσα μαζικής μεταφοράς και σε προσωπικά οχήματα ιδιωτών. Το υδρογόνο χρησιμοποιείται για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας μέσω των κυψελών καυσίμου (fuel cells), η οποία χρησιμοποιείται για κίνηση οχημάτων [32].
- Για την παραγωγή θερμότητας, για οικιακούς, εμπορικούς ή βιομηχανικούς σκοπούς.

Παρόλα αυτά, απαιτούνται κατάλληλες υποδομές για την χρήση υδρογόνου και παγκόσμια πολιτική υποστήριξη [33].



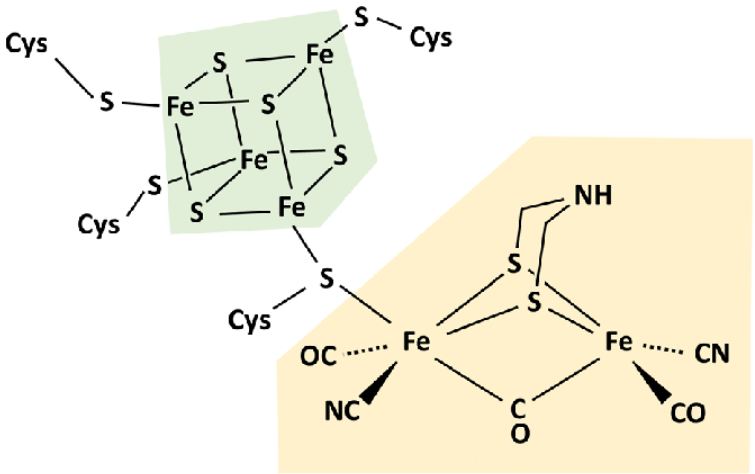
Εικόνα 10: Απεικόνιση τρόπων παραγωγής υδρογόνου (επάνω διάγραμμα) και παρουσίαση τρόπων αποθήκευσης υδρογόνου προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο (κάτω διάγραμμα) [32].

Η βιολογική παραγωγή υδρογόνου αποτελεί μία καινούρια προσέγγιση και δεν είναι αρκετά διαδεδομένη [33]. Το υδρογόνο, σε αυτήν την περίπτωση, παράγεται από κύτταρα σε ελεγχόμενες καλλιέργειες, το οποίο αποτελεί αντικείμενο της παρούσας εργασίας.

1.9 Παραγωγή υδρογόνου από φωτοσυνθετικά μικροφύκη

Τα φωτοσυνθετικά μικροφύκη είναι ικανά, να παράγουν μοριακό υδρογόνο, καθώς διαθέτουν το ένζυμο της υδρογονάσης. Οι υδρογονάσες, απαντώνται σε μικροφύκη, κυανοβακτήρια, ζυμωτικά βακτήρια και ο ρόλος τους έγκειται είτε στην πρόσληψη υδρογόνου είτε στην παραγωγή του. Υπάρχουν διάφορα είδη υδρογονασών, που στο ενεργό τους κέντρο περιέχουν ζεύγος μετάλλων NiFe, NiFeSe ή FeFe. Το τελευταίος είδος υδρογονάσης (FeFe) εντοπίζεται στα πράσινα μικροφύκη και είναι υπεύθυνο για την παραγωγή υδρογόνου [34].

Η υδρογονάση FeFe, όπως και όλες οι υδρογονάσες είναι ένζυμα πολύ ευαίσθητα στο οξυγόνο, το οποίο λειτουργεί ως αναστολέας του ενζύμου, είναι ένζυμα μονομερή ή διμερή και εντοπίζονται στην μεμβράνη του χλωροπλάστη [34]. Στην εικόνα 11, απεικονίζεται το ενεργό κέντρο μιας υδρογονάσης FeFe.



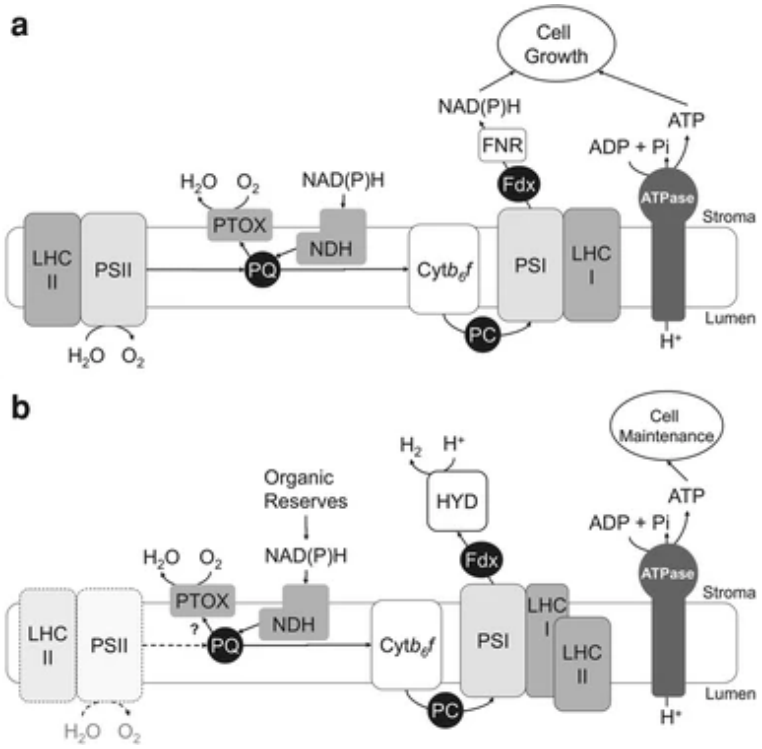
Εικόνα 11: Απεικόνιση του ενεργού κέντρο της FeFe υδρογονάσης. Στην εικόνα είναι ευδιάκριτες οι δύο υπομονάδες, οι οποίες συνδέονται με ένα κατάλοιπο κυστείνης. Η μία υπομονάδα αποτελείται από ένα σύμπλοκο 4Fe-4S και η άλλη υπομονάδα περιέχει δύο άτομα σιδήρου τα οποία γεφυρώνονται από CO και αζαδιθειολικές ομάδες [35].

Για να παραχθεί υδρογόνο, η υδρογονάση, πρέπει να λάβει ηλεκτρόνια από την ανηγμένη φερρεδοξίνη. Η αντίδραση που καταλύεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου είναι η:

$2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$ ή διαφορετικά: $2H^+ + 2Fd^- \longrightarrow H_2 + 2Fd$ [36].

Μελέτες, πάνω σε φωτοσυνθετικά μικροφύκη, έδειξαν πως στερώντας από αυτά -κυρίως- ανόργανο θείο, ενεργοποιείται ένα διαφορετικό μονοπάτι αλυσίδας ηλεκτρονίων που ως τελικό βήμα έχει την παραγωγή υδρογόνου από την υδρογονάση [36, 37]. Εξαιτίας, αυτής της στέρησης, παρατηρήθηκε αναστολή της βιοσύνθεσης πρωτεϊνών (διότι το θείο απαντάται σε κυστείνη και μεθειονίνη) και ως αποτέλεσμα αυτού, ο κυτταρικός πληθυσμός παρέμεινε σταθερός [37]. Ακόμα, η αδυναμία παροχής θείου στον χλωροπλάστη, μείωσε τον ρυθμό ανανέωσης της πρωτεΐνης D1(32 kDa) στο φωτοσύστημα II (PSII). Αποτέλεσμα αυτού, είναι η αδυναμία λειτουργίας του, και κατ' επέκταση οδήγησε σε μειωμένους ρυθμούς έκλυσης οξυγόνου [36, 37]. Τέλος, παρατηρήθηκε και μειωμένη ικανότητα πρόσληψης διοξειδίου του άνθρακα. Η μειωμένη δέσμευση διοξειδίου του άνθρακα, οφείλεται στην αποικοδόμηση του ενζύμου Rubisco, το οποίο είναι υπεύθυνο για την δέσμεύση του, και καταλύει την πρώτη αντίδραση στον κύκλο του Calvin [5].

Τα κύτταρα, όταν βρεθούν υπό συνθήκες στέρησης ζωτικών για αυτά στοιχείων- όπως και το θείο (S), τότε βρίσκονται σε συνθήκες βιολογικής καταπόνησης (stress). Για να μπορούν να αντεπεξέλθουν σε αυτό το περιβάλλον, η ροή των ηλεκτρονίων μεταβάλλεται. Πρέπει να σημειωθεί, πως, ενώ η φωτοσυνθετική δραστηριότητα μειώνεται, το επίπεδο της αναπνοής παραμένει σταθερό, διότι πρέπει να εξασφαλιστεί η απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωση του κυττάρου. Στην εικόνα 12, παρουσιάζονται οι διαφορές στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων όταν τα κύτταρα βρεθούν σε συνθήκες βιολογικής καταπόνησης.



Εικόνα 12: (a) Ροή ηλεκτρονίων όταν το φωτοσύστημα δύο (PSII) λειτουργεί κανονικά (b) Εναλλακτική ροή ηλεκτρονίων, όταν τα κύτταρα βρίσκονται υπό συνθήκες stress [38].

Σε συνθήκες βιολογικής καταπόνησης, το φωτοσύστημα ΙΙ, όπως έχει αναφερθεί δεν είναι λειτουργικό. Παρόλα αυτά, για την παραγωγή υδρογόνου, απαιτείται ένα λειτουργικό φωτοσύστημα Ι (PSI) και πηγή φωτισμού [36]. Στην περίπτωση στέρησης θείου, τα κύτταρα επιλέγουν διαφορετικό μονοπάτι μεταφοράς ηλεκτρονίων. Σε αυτό το μονοπάτι, τελικός αποδέκτης δεν είναι η αναγωγάση ζεύγους φερρεδοξίνης - NADP, προς δημιουργία αναγωγικής ισχύος (NADPH), αλλά η υδρογονάση και συγκεκριμένα, πρωτόνια (H^+), προς δημιουργία υδρογόνου. Και στις δύο συνθήκες, το PSI, απορροφώντας ακτινοβολία μήκους κύματος 700 nm, διεγείρει μόριο χλωροφύλλης a, όπου στην συνέχεια το ηλεκτρόνιο μεταβαίνει στην φερρεδοξίνη, ανάγοντας την. Στην περίπτωση στέρησης θείου, το ηλεκτρόνιο καταλήγει στην υδρογονάση και δεν παράγεται αναγωγική ισχύς. Την ανάκτηση του χαμένου ηλεκτρονίου, η χλωροφύλλη a, την εξασφαλίζει από την δεξαμενή πλαστοκινόνης μέσω μεταφοράς του ηλεκτρονίου από το κυτόχρωμα bf, και την πλαστοκυανίνη. Πλέον, η πλαστοκινόνη δεν ανάγεται σε πλαστοκινόλη από τα ηλεκτρόνια που προέρχονται από το φωτοσύστημα ΙΙ, αλλά από τον καταβολισμό οργανικού υποστρώματος. Το οργανικό υπόστρωμα είναι το άμυλο, και μέσω του καταβολισμού του και της διαδικασίας της γλυκόλυσης εξασφαλίζεται η απαραίτητη ενέργεια για την διαβίωση του κάθε κυττάρου [38]. Παραγωγή υδρογόνου παρατηρείται όταν το άμυλο καταβολίζεται και προσφέρει ηλεκτρόνια στην υδρογονάση μέσω της διαδικασίας που αναλύθηκε ανωτέρω. Μέρος του αμύλου, προέρχεται και από τον καταβολισμό της Rubisco [37].

Επιπλέον, όπως είναι ευδιάκριτο και στην εικόνα 12, στην περίπτωση ορθής λειτουργίας του PSII, η κυτταρική ανάπτυξη είναι εφικτή, ενώ στην περίπτωση βιολογικής καταπόνησης, που ο μικροοργανισμός καλείται να αναπτύξει μηχανισμούς επιβίωσης, ο κυτταρικός πληθυσμός είναι στάσιμος. Σε αυτές τις συνθήκες, η περιεκτικότητα των κυττάρων σε χλωροφύλλη μειώνεται λόγω της μη λειτουργίας του PSII [36].

Περαιτέρω μελέτες στο στέλεχος που αναφέρεται στην παρούσα εργασία, *Chlorella sp*., έδειξαν, πως παραγωγή υδρογόνου συμβαίνει όταν τα κύτταρα βρεθούν σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσιάζουν κάθε φορά ενώσεις των στοιχείων του θείου (S), καλίου (K), αζώτου (N) και φωσφόρου (P) [30]. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις, για την παραγωγή υδρογόνου, απαιτείται λειτουργική υδρογονάση. Πιο συγκεκριμένα, όταν τα κύτταρα στερούνται τον φώσφορο, παρατηρείται μειωμένη παραγωγή ATP, συσσώρευση πρωτονίων στο εσωτερικό του θυλακοειδούς και αυξανόμενη ροή ηλεκτρονίων προς την φερρεδοξίνη [39]. Στην περίπτωση απουσίας αζώτου, παρατηρείται μειωμένη παραγωγή πρωτεϊνών και μειωμένη συλλογή φωτός από την φωτοσυνθετική κεραία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μη ορθή λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και της αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων [40]. Τέλος, η ανεπάρκεια καλίου προκαλεί το φαινομένου της χλώρωσης, η οποία προκαλείται από την συσσώρευση δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) [41]. Σε όλες τις προαναφερθείσες περιπτώσεις, για την παραγωγή υδρογόνου, εκτός της λειτουργικής υδρογονάσης, απαιτούνται αναερόβιες συνθήκες για την έκφραση των γονιδίων της υδρογονάσης και κατ' επέκταση την παραγωγή υδρογόνου μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων.

1.10 Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη ανάπτυξης, με ταυτόχρονη παραγωγή υδρογόνου από το μικροφύκος *Chlorella sp,* που απομονώθηκε από τον ευτροφικό ποταμό Γιόφυρο στο Ηράκλειο Κρήτης. Το συγκεκριμένο μικροφύκος παρουσιάζει επιστημονικό ενδιαφέρον καθώς μπορεί να προσαρμοστεί σε δυσμενή περιβάλλοντα, γεγονός που μπορεί να αξιοποιηθεί στην παραγωγή υδρογόνου. Το στέλεχος *Chlorella sp.*, όταν βρεθεί σε υγρά θρεπτικά μέσα στερούμενα ζωτικών στοιχείων (N, S, P, K), είναι ικανό να παράγει υδρογόνο. Έτσι, κύριος άξονας, της παρούσας εργασίας, είναι η καλλιέργεια κυττάρων *Chlorella,* σε θρεπτικά μέσα που υπάρχει στέρηση ενός μακροθρεπτικού στοιχείου. Παράλληλα, στην εύρεση βέλτιστων συνθηκών για την παραγωγή υδρογόνου, εξετάζονται η συνεισφορά της πηγής άνθρακα, η ένταση φωτισμού, η θερμοκρασία και το pH του μέσου. Τέλος, η παρούσα εργασία, ολοκληρώνεται με την μελέτη του βιοχημικού περιεχομένου κυττάρων *Chlorella* (σε υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπίδια και φωτοσυνθετικές χρωστικές) όταν αυτά αναπτύσονται σε θρεπτικό μέσο με έλλειψη ενός μακροθρεπτικού στοιχείου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Μικροοργανισμός και συνθήκες ανάπτυξης

Για την υλοποίηση όλων των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες του στελέχους *Chlorella sp.* Οι μητρικές καλλιέργειες του στελέχους, αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο TAP (Tris - Acetate - Phosphate) medium σε φωτοετερότροφες συνθήκες. Οι μητρικές καλλιέργειες είχαν όγκο 1,4 L και ήταν τοποθετημένες σε κωνικές φιάλες 2 L. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε δωμάτιο με σταθερή θερμοκρασία 25°C ± 1°C, σταθερή ένταση φωτισμού 50 - 80 μmol φωτονίων $m^{-2} \bullet s^{-1}$, χρησιμοποιώντας λευκούς λαμπτήρες φθορισμού - cool white. Για τα πειράματα που διεξήχθησαν η συλλογή κυττάρων από τις μητρικές καλλιέργειες έγινε πριν την στατική φάση, την πέμπτη ημέρα ανάπτυξης.

Στον παρακάτω πίνακα, πίνακας 1, αναγράφονται τα συστατικά του θρεπτικού μέσου TAP medium.

Πίνακας 1: συστατικά θρεπτικού μέσου TAP medium [9].

Συστατικό	**Ποσότητα**
Trizma base	2,42 g/L
Phosphate buffer I (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών I)	1 mL/L
Hutner's trace elements (διάλυμα ιχνοστοιχείων)	1 mL/L
Solution A (τροποποιημένο διάλυμα Beijerinck)	10 mL/L
Acetic acid	1,048 g/L

Κατά την ολοκλήρωση προσθήκης των παραπάνω συστατικών, το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7,2 με HCl. Σε περίπτωση που η μητρική καλλιέργεια είναι στρερεή, στο θρεπτικό προστίθεται άγαρ με συγκέντρωση 1,5% w/v. Στους παρακάτω πίνακες, αναγράφονται τα συστατικά για τα stock υδατικά διαλύματα, το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, το διάλυμα Hutner's trace elements και το τροποποιημένο διάλυμα Beijerinck (φυλλάσονται στους 4°C).

Πίνακας 2: συστατικά ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών I (αποστειρώνεται μετά την παρασκευή του)

Συστατικό	**Ποσότητα**
K_2HPO_4	104,4 g/L
KH_2PO4	54,0 g/L

Πίνακας 3: συστατικά διαλύματος Hutner's trace elements

Συστατικό	**Ποσότητα**
EDTA	50,00 g/L
$FeSO_4 \bullet 7H_2O$	4,99 g/L
$ZnSO_4 \bullet 7H_2O$	22,0 g/L
H_3BO_3	11,40 g/L
$MnCl_2 \bullet 4H_2O$	5,06 g/L
$CuSO_4 \bullet 5H_2O$	1,57 g/L
$Mo_7O_{24}(NH_4)_6 \bullet 4H_2O$	1,10 g/L
$CoCl_2 \bullet 6H_2O$	1,61 g/L

Πίνακας 4: συστατικά τροποποιημένου διαλύματος Beijering (Solution A)

Συστατικό	**Ποσότητα**
NH_4Cl	40,0 g/L
$MgSO_4 \bullet 7H_2O$	10,0 g/L
$CaCl_2$	3,8 g/L

Για την αποφυγή επιμολύνσεων από άλλους μικροοργανισμούς, τα σκεύη με τα θρεπτικά μέσα τοποθετούνταν για 20 min στους 120°C σε αυτόκαυστο. Η παρασκευή τόσο των μητρικών όσο και των πειρατικών καλλιεργειών, πραγματοποιήθηκε στον θάλαμο νοηματικής ροής (laminar flow hood) παρουσία φλόγας, ο οποίος προηγουμένως, είχε απολυμανθεί με διάλυμα αιθανόλης 70% v/v και επίδραση υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας.

2.2 Πειραματικές Καλλιέργειες

Τα πειράματα που διεξήχθησαν και αναλύονται στην παρούσα εργασία αποσκοπούν στην παραγωγή υδρογόνου, ενώ άλλες πειραματικές σειρές, αφορούν τη μελέτη του βιοχημικού περιεχομένου των κυττάρων *Chlorella sp.* Για τα πειράματα που αναλύονται στην παρούσα εργασία, σχεδιάστηκαν θρεπτικά μέσα με στερήσεις μακροθρεπτικών συστατικών όπως αναφέρονται στην βιβλιογραφία [30]. Παρακάτω αναγράφονται τα συστατικά των θρεπτικών μέσων TAP-S, TAP-N, TAP-K και TAP-P. Όλα αυτά τα θρεπτικά μέσα αποτελούν τροποποιημένα διαλύματα TAP στα οποία ενώσεις του θείου, του αζώτου, του φωσφόρου και του καλίου απουσιάζουν, στο αντίστοιχο θρεπτικό.

Πίνακας 5: συστατικά θρεπτικού μέσου TAP-S

Συστατικό	**Ποσότητα**
Trizma base	2,42 g/L
Phosphate buffer I (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών I)	1 mL/L
Hutner's trace elements -S (τροποποιημένο διάλυμα ιχνοστοιχείων χωρίς ενώσεις θείου)	1 mL/L
Solution A -S (τροποποιημένο διάλυμα Beijerinck χωρίς ενώσεις θείου)	10 mL/L
Acetic acid	1,048 g/L

Για την παρασκευή διαλυμάτων TAP-S σε διαφορετικά pH, γίνεται ρύθμιση με HCl ή KOH.

Πίνακας 6: συστατικά διαλύματος Hutner's trace elements -S

Συστατικό	**Ποσότητα**
EDTA	50,00 g/L
$FeCl_2 \bullet 4H_2O$	3,57 g/L
$ZnCl_2$	10,42 g/L
H_3BO_3	11,40 g/L
$MnCl_2 \bullet 4H_2O$	5,06 g/L
$CuCl_2 \bullet 2H_2O$	1,07 g/L
$Mo_7O_{24}(NH_4)_6 \bullet 4H_2O$	1,10 g/L
$CoCl_2 \bullet 6H_2O$	1,61 g/L

Πίνακας 7: συστατικά τροποποιημένου διαλύματος Beijering -S (Solution A)

Συστατικό	**Ποσότητα**
NH_4Cl	40,0 g/L
$MgCl_2 \bullet 6H_2O$	8,25 g/L
$CaCl_2$	3,8 g/L

Πίνακας 8: συστατικά θρεπτικού μέσου TAP-N

Συστατικό	**Ποσότητα**
Trizma base	2,42 g/L
Phosphate buffer I (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών I)	1 mL/L
Hutner's trace elements -N (τροποποιημένο διάλυμα ιχνοστοιχείων χωρίς ενώσεις αζώτου)	1 mL/L
Solution A -N (τροποποιημένο διάλυμα Beijerinck χωρίς ενώσεις αζώτου)	10 mL/L
Acetic acid	1,048 g/L

Για την παρασκευή διαλυμάτων TAP-N σε διαφορετικά pH, γίνεται ρύθμιση με HCl ή KOH.

Πίνακας 9: συστατικά διαλύματος Hutner's trace elements -N

Συστατικό	**Ποσότητα**
EDTA	50,00 g/L
$FeSO_4 \bullet 7H_2O$	4,99 g/L
$ZnSO_4 \bullet 7H_2O$	22,0 g/L
H_3BO_3	11,40 g/L
$MnCl_2 \bullet 4H_2O$	5,06 g/L
$CuSO_4 \bullet 5H_2O$	1,57 g/L
$Na_2MoO_4 \bullet 2H_2O$	0,21 g/L
$CoCl_2 \bullet 6H_2O$	1,61 g/L

Πίνακας 10: συστατικά τροποποιημένου διαλύματος Beijering -N (Solution A)

Συστατικό	**Ποσότητα**
$NaCl$	55,75 g/L
$MgSO_4 \bullet 7H_2O$	10,0 g/L
$CaCl_2$	3,8 g/L

Πίνακας 11: συστατικά θρεπτικού μέσου TAP-K

Συστατικό	Ποσότητα
Trizma base	2,42 g/L
Phosphate buffer -K (τροποποιημένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών χωρίς ενώσεις καλίου)	1 mL/L
Hutner's trace elements	1 mL/L
Solution A (τροποποιημένο διάλυμα Beijerinck)	10 mL/L
Acetic acid	1,048 g/L

Για την παρασκευή διαλυμάτων TAP-K σε διαφορετικά pH, γίνεται ρύθμιση με HCl ή NaOH.

Πίνακας 12: συστατικά ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών -K

Συστατικό	Ποσότητα
Na_2HPO_4	85,08 g/L
NaH_2PO4	47,96 g/L

Πίνακας 13: συστατικά θρεπτικού μέσου TAP-P

Συστατικό	Ποσότητα
Trizma base	2,42 g/L
Διάλυμα KCl (για την αντιστάθμιση των ιόντων του διαλύματος φωσφορικών)	1 mL/L
Hutner's trace elements	1 mL/L
Solution A (τροποποιημένο διάλυμα Beijerinck)	10 mL/L
Acetic acid	1,048 g/L

Για την παρασκευή διαλυμάτων TAP-P σε διαφορετικά pH, γίνεται ρύθμιση με HCl ή KOH.

Πίνακας 14: συστατικό και ποσότητα διαλύματος KCl

Συστατικό	Ποσότητα
KCl	74,48 g/L

2.2.1 Πειραματικές καλλιέργειες προς μελέτη βιοχημικού περιεχομένου

Για την διεξαγωγή πειραμάτων που αποσκοπούσαν στην μελέτη του βιοχημικού περιεχομένου των κυττάρων *Chlorella sp.,* παρασκευάστηκε θρεπτικό μέσο TAP και τοποθετήθηκαν 1,4L σε πέντε κωνικές φιάλες των 2L. Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν

φωτοετερότροφα σε θάλαμο θερμοκρασίας 25°C ±1ºC, με ήπια ανάδευση με μαγνήτη και υψηλής έντασης φωτισμό (140-160 μmol φωτονίων • $m^{-2} \bullet s^{-1}$ **).** Τα κύτταρα συλλέχθηκαν μέσω φυγοκέντρισης στα 5000 g για 5 min στους 15°C, χρησιμοποιώντας την φυγόκεντρο Multifuge X Pro Series Centrifuge. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με λίγο απιονισμένο νερό και υπέστησαν λυοφυλίωση (freeze drying) για την συλλογή ξηρής βιομάζας.

Για την προσαρμογή των κυττάρων *Chlorella* στις συνθήκες στέρησης θρεπτικών συστατικών, αρχικά παρασκευάστηκαν καλλιέργειες στο θρεπτικό μέσο TAP, στις ίδιες συνθήκες με παραπάνω. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από 7 ημέρες ανάπτυξης, και ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό για την απομάκρυνση θρεπτικών συστατικών από το αρχικό μέσο. Έπειτα, τα κυτταρικά ιζήματα επαναιρήθηκαν σε μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού και μεταφέθηκαν σε φρέσκα θρεπτικά μέσα με στέρηση θρεπτικών συστατικών (TAP-S, TAP-N, TAP-K, TAP-P). Η προσαρμογή των κυττάρων έλαβε χώρα σε κωνικές φιάλες των 2 L, με όγκο θρεπτικού 1,4 L. Οι καλλιέργειες προσαρμόστηκαν σε φωτοετερότροφες συνθήκες σε θάλαμο θερμοκρασίας 25°C ± 1ºC, με ήπια ανάδευση με μαγνήτη, και υψηλής έντασης φωτισμό (140 - 160 μmol φωτονίων • $m^{-2} \bullet s^{-1}$). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από 7 ημέρες μέσω φυγοκέντρισης στα 5000 g για 5 min στους 15°C). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με λίγο απιονισμένο νερό και υπέστησαν λυοφυλίωση (freeze drying) για τη συλλογή ξηρής βιομάζας.

2.2.2 Πειραματικές καλλιέργειες προς μελέτη παραγωγής υδρογόνου

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων που αποσκοπούσαν στην παραγωγή υδρογόνου, χρησιμοποιήθηκαν μητρικές καλλιέργειες ανεπτυγμένες στο θρεπτικό μέσο TAP. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν στο τέλος της εκθετικής φάσης μέσω φυγοκέντρισης όπως περιγράφεται παραπάνω, και ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό για την απομάκρυνση θρεπτικών συστατικών από το αρχικό μέσο. Παρασκευάστηκαν υγρές καλλιέργειες όγκου 50 mL, αρχικής κυτταρικής συγκέντρωσης 1 μL PCV/ mL, οι οποίες αναπτύσσονταν σε γυάλινα μπουκαλάκια (serum bottles) των 120 mL (Εικόνα 13) τα οποία κλείνουν αεροστεγώς με septum και μεταλλικό δαχτυλίδι.

Εικόνα 13: μπουκαλάκι (serum bottle) 120 mL, στο οποίο αναπτυσσόταν ο μικροοργανισμός. Αυτό το σκεύος εξαιτίας της ικανότητας να κλείνει αεροστεγώς, δίνει την ικανότητα μέτρησης παραγόμενου αερίου στον κενό χώρο πάνω από την καλλιέργεια [I].

Για την αποφυγή επιμόλυνσης από άλλους μικροοργανισμούς, το θρεπτικό υλικό μαζί με το σκεύος και το septum, τοποθετήθηκαν για 20 min στους 120ºC σε αυτόκαυστο. Τέλος, μετά την μεταφορά κυττάρων, οι καλλιέργειες σφραγίζονται και απαερώνονται για 2 min με ροή αζώτου (N_2), προκειμένου να επιτευχθούν αναερόβιες συνθήκες (και κατ' επέκταση πιο γρήγορη λειτουργία υδρογονάσης).

Πειραματικές σειρές που παρουσιάζονται παρακάτω, αφορούν την ανάπτυξη και παραγωγή υδρογόνου από κύτταρα *Chlorella sp,* χρησιμοποιώντας διαφορετική πηγή άνθρακα στο θρεπτικό μέσο (γλυκόζη, σουκρόζη και CO_2). Και σε αυτά τα πειράματα η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ήταν 1 μL PCV/ mL. Στους πίνακες 15 και 16, παρουσιάζονται τα συστατικά τέτοιων θρεπτικών μέσων.

Πίνακας 15: συστατικά θρεπτικού μέσου TP - glucose

Συστατικό	**Ποσότητα**
Trizma base	2,42 g/L
Phosphate buffer I (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών I)	1 mL/L
Hutner's trace elements (διάλυμα ιχνοστοιχείων)	1 mL/L
Solution A (τροποποιημένο διάλυμα Beijerinck)	10 mL/L
Glucose	5 g/L

Πίνακας 16: συστατικά θρεπτικού μέσου TP - sucrose

Συστατικό	**Ποσότητα**
Trizma base	2,42 g/L
Phosphate buffer I (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών I)	1 mL/L
Hutner's trace elements (διάλυμα ιχνοστοιχείων)	1 mL/L
Solution A (τροποποιημένο διάλυμα Beijerinck)	10 mL/L
Sucrose	5 g/L

Στην περίπτωση που η πηγή άνθρακα είναι το CO_2, εκείνο προστίθεται με σύριγγα μετά την απαέρωση της καλλιέργειας. Ο όγκος του CO_2 που προστίθεται είναι 20mL σε κάθε καλλιέργεια.

2.3 Μετρήσεις κυτταρικής ανάπτυξης

2.3.1 Μετρήσεις ανάπτυξης μικροοργανισμού μέσω του όγκου καθιζάμενων κυττάρων (PCV)

Οι μετρήσεις κυτταρικής ανάπτυξης πραγματοποιήθηκαν μετρώντας τον όγκο καθιζάμενων κυττάρων (packed Cell Volume). Πιο αναλυτικά, λαμβάνεται ποσότητα καλλιέργειας από τα μπουκαλάκια, τρυπώντας το septum με σύριγγα ινσουλίνης (1 mL), για τη διατήρηση των αναερόβιων συνθηκών στα δείγματα. Στην συνέχεια, με πιπέτα ακριβείας μεταφέρεται ποσότητα καλλιέργειας σε σωλήνες PCV (Εικόνα 14). Οι σωλήνες, φυγοκεντρούνται σε φυγόκεντρο eppendorf για 5 min στα 1000 g και έπειτα προσδιορίεται ο όγκος των καθιζαμένων κυττάρων στην καλλιέργεια. Οι σωλήνες PCV είναι βαθμονομημένοι με μέγιστη τιμή τα 5 μL κυττάρων. Η κυτταρική συγκέντρωση εκφράζεται σε μονάδες μL κυττάρων PCV/mL καλλιέργειας.

Εικόνα 14: απεικόνιση ενός PCV tube. Είναι ευδιάκριτο στην εικόνα, πως το κάτω μέρος του σωλήνα, είναι λεπτό και βαθμονομημένο [42].

2.3.2 Προσδιορισμός Φωτοσυνθετικών Χρωστικών

Για ποσοτικό προσδιορισμό των φωτοσυνθετικών χρωστικών, λαμβάνεται από τα δείγματα μέσω σύριγγας ποσότητα καλλιέργειας και με πιπέτα ακριβείας μεταφέρεται γνωστή ποσότητα σε Eppendorf vials. Ακολουθεί φυγοκέντριση στα 1000 g για 5 min. Κατόπιν, το υπερκείμενο απορρίφθηκε, τα καθιζάμενα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 1 mL θερμής μεθανόλης (55°C) και τα δείγματα επωάστηκαν για 30 min στους 55°C σε υδατόλουτρο στο σκοτάδι. Μετά την επώαση, ακολούθησε φυγοκέντριση των δειγμάτων για 5 min για την καθίζηση ιζημάτων και μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα μήκη κύματος 470,0 nm, 652,4 nm και στα 665,2 nm. Για την μέτρηση των απορροφήσεων χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους - ορατού Shimazdu UV - 2700. Οι συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης - a, της χλωροφύλλης - b και των συνολικών καροτενοειδών υπολογίζονται από τις παρακάτω εξισώσεις [43]:

- Υπολογισμός συγκέντρωσης (μg/mL) χλωροφύλλης - a

$$C_a = 16{,}72 \bullet A_{665,2} - 9{,}16 \bullet A_{652,4}$$

• Υπολογισμός συγκέντρωσης (μg/mL) χλωροφύλλης - b

$$C_b = 34{,}09 \bullet A_{652,4} - 15{,}28 \bullet A_{665,2}$$

• Υπολογισμός καροτενοειδών

$$C_{x+c} = \frac{1000 \bullet A_{470} - 1{,}63 \bullet C_a - 104{,}96 \bullet C_b}{221}$$

2.4 Μετρήσεις Επαγωγικού Φθορισμού

Οι μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού υλοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την συσκευή Handy Plant Efficiency Analyser (Hansatech Instruments, Kings' Lynn, Norfolk, UK), σύμφωνα με την μέθοδο των Strasser & Strasser [20, 44]. Για να μετρηθεί ο φθορισμός χλωροφύλλης, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό θάλαμο προκειμένου τα μόρια χλωροφύλλης - a, στο φωτοσύστημα II, να επιστρέψουν στην θεμελιώδη τους κατάσταση. Αυτό έχει ως στόχο, να εκτιμηθεί η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση του φωτοσυστήματος II. Η μέθοδος, στηρίζεται σε γρήγορες μεταβολές φθορισμού με ανάλυση ανά 10 μs, έχοντας συνολική διάρκεια ανάλυσης 1 sec. Η διέγερση των μορίων της χλωροφύλλης - a, έλαβε χώρα από τρεις διόδους LED φωτισμού, με κόκκινη ακτιβολία μήκους κύματος 650 nm και έντασης 3000 μmol φωτονίων • m^{-2} • s^{-1}. Κατά την ολοκλήρωση της μέτρησης, λαμβάνεται η τιμή της παραμέτρου F_v/F_{max} όπου και αποτελεί ένδειξη της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης.

2.5 Μέτρηση παραγόμενου υδρογόνου με αέρια χρωματογραφία (GC-TCD)

Στο παρόν τμήμα, αναλύεται η διαδικασία που ακολουθείται για την μέτρηση του παραγόμενου υδρογόνου από τις πειραματικές καλλιέργειες. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, με το όργανο Shimadzu GC 2010 Plus, όπου χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (TCD) και τριχοειδής στήλη VIci Metronics MC (Poulsbo, USA) μήκους 30 m, διαμέτρου 0,53 mm, στατικής φάσης πάχους 20 μm. Για να διαχωριστούν τα αέρια που βρίσκονταν στον υπερκείμενο χώρο της καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε ως φέρουν αέριο το αργό (Ar) 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 [45].

Η μέτρηση υδρογόνου από τις καλλιέργειες πραγματοποιείται τρυπώντας τα seprta με σύριγγα ινσουλίνης χωρητικότητας 500 μL, αφού πρώτα εκείνα είχαν απολυμανθεί με αιθανόλη 70% v/v. Η ποσότητα που απομονώνεται από τις καλλιέργειες και γίνεται ένεση στον αέριο

χρωματογράφο είναι 200 μL. Τέλος, οι κορυφές στο χρωματογράφημα ολοκληρώνονται και ποσοτικοποιείται το παραγόμενο υδρογόνο μέσω πρότυπης καμπύλης.

Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης, γίνονται ενέσεις (injections) γνωστής ποσότητας υδρογόνου.

2.6 Μετρήσεις Βιοχημικού περιεχομένου *Chlorella*

Στο τμήμα αυτό ακολουθούν οι μέθοδοι με τις οποίες έγινε προσδιορισμός του περιεχομένου των κυττάρων *Chlorella,* σε σάκχαρα, πρωτεΐνες και λιπίδια.

2.6.1 Προσδιορισμός σακχάρων με την μέθοδο θυμόλης- θειικού

Για την ποσοτικοποίηση των σακχάρων στις καλλιέργειες και στα κύτταρα *Chlorella sp*, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος θυμόλης-θειικού [20, 46], η οποία τροποποιήθηκε σύμφωνα με την αναφορά [47]. Αρχικά, για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ουσία γλυκόζη. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε διάλυμα γλυκόζης συγκέντρωσης 1mg/mL και έπειτα πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες αραιώσεις σε εύρος συγκεντρώσεων από 0,01 - 0,1 mg/mL. Για την πρότυπη καμπύλη, 100 μL από τα αραιωμένα διαλύματα γλυκόζης και 300 μL, από το αντιδραστήριο θυμόλης-θειικού (1mg θυμόλης σε 1mL θειικού οξέος) προστέθηκαν σε eppendorf και ακολούθησε σύντομη ανάδευση σε Vortex. Τα δείγματα, επωάστηκαν σε φούρνο, σε σταθερή θερμοκρασία (110°C) για 30 min. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 509 nm. Ως τυφλό δείγμα, χρησιμοποιήθηκαν 100 μL, απιονισμένου νερού που υπέστησαν την ίδια κατεργασία.

Για τον προσδιορισμό σακχάρων στα κύτταρα *Chlorella sp,* σε γνωστή μάζα λυοφυλιωμένων κυττάρων, προστίθεται 1 mL HCl 2N, με στόχο την υδρόλυση των κυττάρων και των σακχάρων. Τα δείγματα επωάζονται σε eppendorf στον φούρνο στους 100°C για 2h, έπειτα φιλτράρονται από φίλτρο 0,22 μm και αραιώνονται ώστε η απορρόφηση του δείγματος να βρεθεί στα όρια απορρόφησης της πρότυπης καμπύλης. Τέλος, 100 μL από το δείγμα και 300 μL, από το αντιδραστήριο θυμόλης επωάζονται για 30 min σε φούρνο σταθερής θερμοκρασίας (110°C) και μετριέται η απορρόφηση του στα 509 nm. Ως τυφλό δείγμα και σε αυτή την διαδικασία, χρησιμοποιήθηκαν 100 μL, απιονισμένου νερού που υπέστησαν την ίδια κατεργασία.

2.6.2 Προσδιορισμός λιπιδίων με την μέθοδο θειικού - φωσφορικού- βανιλλίνης

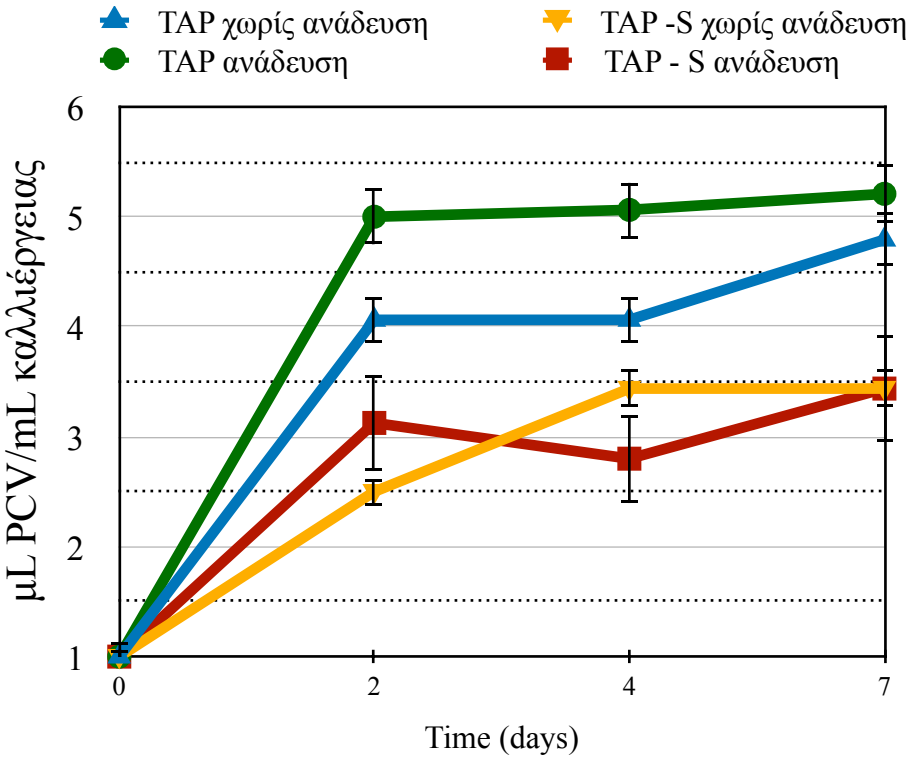
Για τον προσδιορισμό των λιπιδίων στα κύτταρα *Chlorella sp*, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος θειικού - φωσφορικού - βανιλλίνης [48], τροποποιημένη κατά [20]. Αρχικά, για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήθηκε κραμβέλαιο, διάλυμα του οποίου παρασκευάστηκε, με συγκέντρωση 1 mg κραμβέλαιου/ mL χλωροφορμίου. Στην συνέχεια, απομονώθηκαν ποσότητες από το αρχικό διάλυμα με εύρος 10-70 μL και τοποθετήθηκαν σε γυάλινα δοχεία στους 90°C με σκοπό την εξάτμιση του χλωροφόρμιου. Εν συνεχεία, έγινε προσθήκη 100 μL θειικού οξέος και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους 90°C προς επώαση για 15 min. Μετά την επώαση, τα δείγματα αφού επέστρεψαν σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκαν σε αυτά 2,4 mL αντιδραστηρίου φωσφορικού - βανιλλίνης, το οποίο παρασκευάζεται διαλύοντας 1,2 mg βανιλλίνης σε 1mL φωσφορικού οξέος 68%. Με την προσθήκη αυτή, τα δείγματα επωάστηκαν για ακόμη 10 min έως ότου αποκτήσουν ιώδες χρώμα. Τέλος, η διαδικασία ολοκληρώθηκε με την μέτρηση απορρόφησης στα 530 nm. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 100 μL θειικού οξέος με 2,4 mL αντιδραστηρίου φωσφορικού βανιλλίνης.

Στην περίπτωση ποσοτικοποίησης των λιπιδίων από κύτταρα *Chlorella sp,* σε λυοφιλιωμένη μάζα κυττάρων προστέθηκε 3 mL διαλύματος χλωροφορμίου:μεθανόλης σε αναλογία 2:1 v/v. Μετά την προσθήκη του διαλύματος, προστέθηκαν και γυάλινα σφαιρίδια και ακολούθησε έντονη ανάδευση, με στόχο της εκχύλιση των λιπιδίων. Σε αυτό το διάλυμα προστέθηκε 1,5 mL υδατικού διαλύματος 0,9 % w/v NaCl και ακολούθησε φυγοκέντριση στα 3500 rpm για 15 min. Κατόπιν, απορρίφθηκε η πάνω φάση (η υδατική φάση) και από την κάτω φάση απομονώθηκαν γνωστές ποσότητες όπου θερμάνθηκαν στους 90°C για να εξατμιστεί το χλωροφόρμιο. Τέλος, η διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια με παραπάνω.

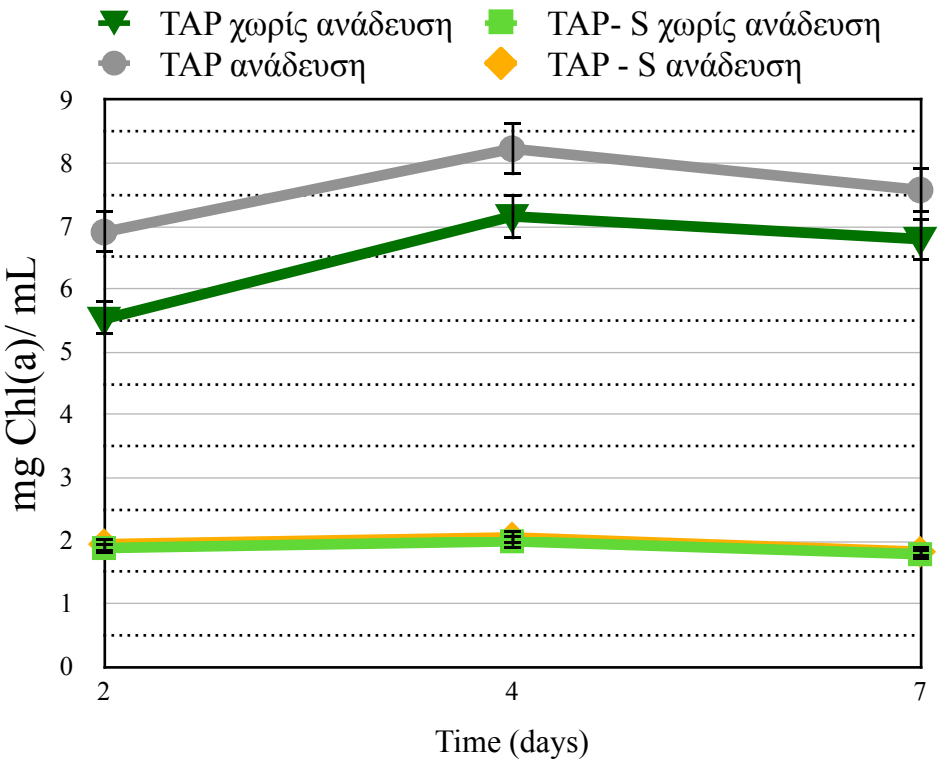
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Διερεύνηση ανάπτυξης και παραγωγής υδρογόνου από *Chlorella sp.*, από κύτταρα υπό και χωρίς ανάδευση

Στις ακόλουθες πειραματικές σειρές, πρωταρχικός στόχος είναι η εύρεση βέλτιστων συνθηκών ανάπτυξης με ταυτόχρονη μεγιστοποίηση της παραγωγής υδρογόνου από κύτταρα *Chlorella sp*. Τα κύτταρα *Chlorella* αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο TAP και TAP - S, με ανάδευση και χωρίς, της καλλιέργειας, προκειμένου να επιλεχθεί η καττάλληλη συνθήκη για την μέγιστη παραγωγή υδρογόνου. Η ανάπτυξη έλαβε χώρα παρουσία φωτός για επτά ημέρες. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων, έδειξε, πως τα κύτταρα στο θρεπτικό μέσο TAP - S δεν αναπτύσσονται τόσο, όσο στην συνθήκη μάρτυρα (Control), όπως επιβεβαιώνεται από την βιβλιογραφία, εξαιτίας της έλλειψης θείου. Η μειωμένη ανάπτυξη στην συνθήκη TAP - S φανερώνεται από τις μετρήσεις του όγκου καθιζάμενων κυττάρων και από την μέτρηση της χλωροφύλλης - a (Εικόνα 15, 16).



Εικόνα 15: Καμπύλες ανάπτυξης καλλιεργειών *Chlorella* σε θρεπτικό μέσο TAP, TAP - S μέσω της μέτρησης Packed Cell Volume (PCV). Οι καλλιέργειες βρίσκονταν υπό ανάδευση για επτά ημέρες, ενώ στην συνθήκη χωρίς ανάδευση οι καλλιέργειες αφέθηκαν σε ηρεμία σε φωτεινό θάλαμο.

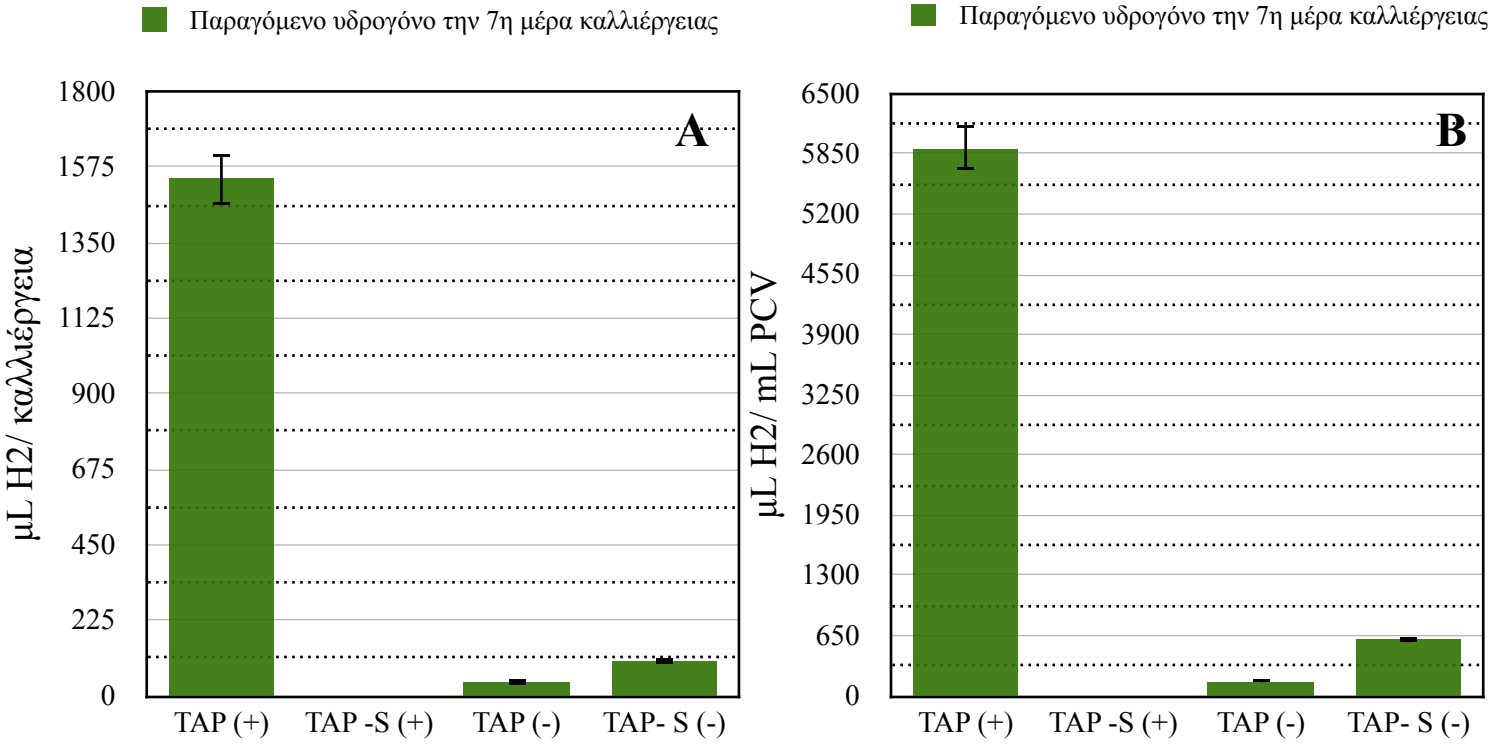


Εικόνα 16: Καμπύλες ανάπτυξης καλλιεργειών *Chlorella* σε θρεπτικό μέσο TAP, TAP - S, μετρώντας την ποσότητα χλωροφύλλης - a στις αναπτυσσόμενες καλλιέργειες.

Στην καλλιέργεια Control (TAP - ανάδευση), υπάρχει μεγαλύτερη ανάπτυξη, σύμφωνα με τις μετρήσεις όγκου κυττάρων και χλωροφύλλης - a. Αυτό, οφείλεται στην ομοιόμορφη κατανομή του φωτός, εξαιτίας της ανάδευσης της καλλιέργειας, πράγμα που εξασφαλίζει καλύτερες συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων. Στην περίπτωση που τα κύτταρα βρίσκονται χωρίς ανάδευση το φως δεν φτάνει σε αυτά επαρκώς, καθώς αυτά καθιζάνουν στον πυθμένα του δοχείου, με αποτέλεσμα αυτά να παρουσιάζουν μικρότερη ανάπτυξη και μικρότερο περιεχόμενο χρωστικής - Chl(a).

Είναι διακριτό πως, η έλλειψη θείου, επηρεάζει την ποσότητα των φωτοσυνθετικών χρωστικών και κατ' επέκταση την ποσότητα της χλωροφύλλης - a, που αποτελεί δείκτη ανάπτυξης του μικροφύκους. Όπως παρατηρήθηκε σε προηγούμενες μελέτες, στο μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* [36], η στέρηση θείου εμποδίζει την ανάπτυξη του μικροφύκους, γεγονός που στην *Chlorella sp,* δεν επαληθεύεται, αλλά παρατηρείται ανάπτυξη - μειωμένη, όμως - σε σχέση με την συνθήκη του μάρτυρα. Αυτή η ανάπτυξη, οφείλεται στο ότι τα κύτταρα δεν έχουν προσαρμοστεί πλήρως στις συνθήκες στέρησης, και στο εσωτερικό τους έχουν απόθεμα θρεπτικών συστατικών προηγούμενου μέσου. Σε αυτό, προστίθεται το γεγονός πως κατά τον κυτταρικό θάνατο, τα κύτταρα λύονται και απελευθερώνουν στο θρεπτικό μέσο συστατικά τα οποία μπορούν να προσληφθούν από άλλα κύτταρα που αναπτύσσονται. Όσον αφορά την παραγωγή υδρογόνου, το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* παράγει μεγαλύτερες ποσότητες στην περίπτωση που το

θείο απουσιάζει από το θρεπτικό μέσο, παρά στην συνθήκη μάρτυρα. Η διαπίστωση αυτή, δεν επαληθεύεται για το μικροφύκος *Chlorella sp,* το οποίο παράγει μεγαλύτερη ποσότητα υδρογόνου σε θρεπτικό μέσο όπου το θείο είναι παρόν (Εικόνα 17Α, 17Β). Ακόμη, τα κύτταρα *Chlorella sp,* παράγουν μεγαλύτερο όγκο υδρογόνου όταν αυτά βρίσκονται υπό ανάδευση. Όπως είναι γνωστό, για την παραγωγή υδρογόνου απαιτείται φως, για την μεταφορά ηλεκτρονίων προς την υδρογονάση. Ωστόσο, στην καλλιέργεια χωρίς ανάδευση δεν πραγματοποιείται ομοιόμορφη κατανομή του φωτός, στα κύτταρα, με αποτέλεσμα τα κέντρα αντίδρασης να μην απορροφούν μεγάλο μέρος της ακτινοβολίας. Επομένως, λιγότερο ποσό ενέργειας προσφέρεται στην μεταφορά των ηλεκτρονίων, καθιστώντας την παραγωγή υδρογόνου μειωμένη στην συνθήκη όπου τα κύτταρα δεν αναδεύονται.

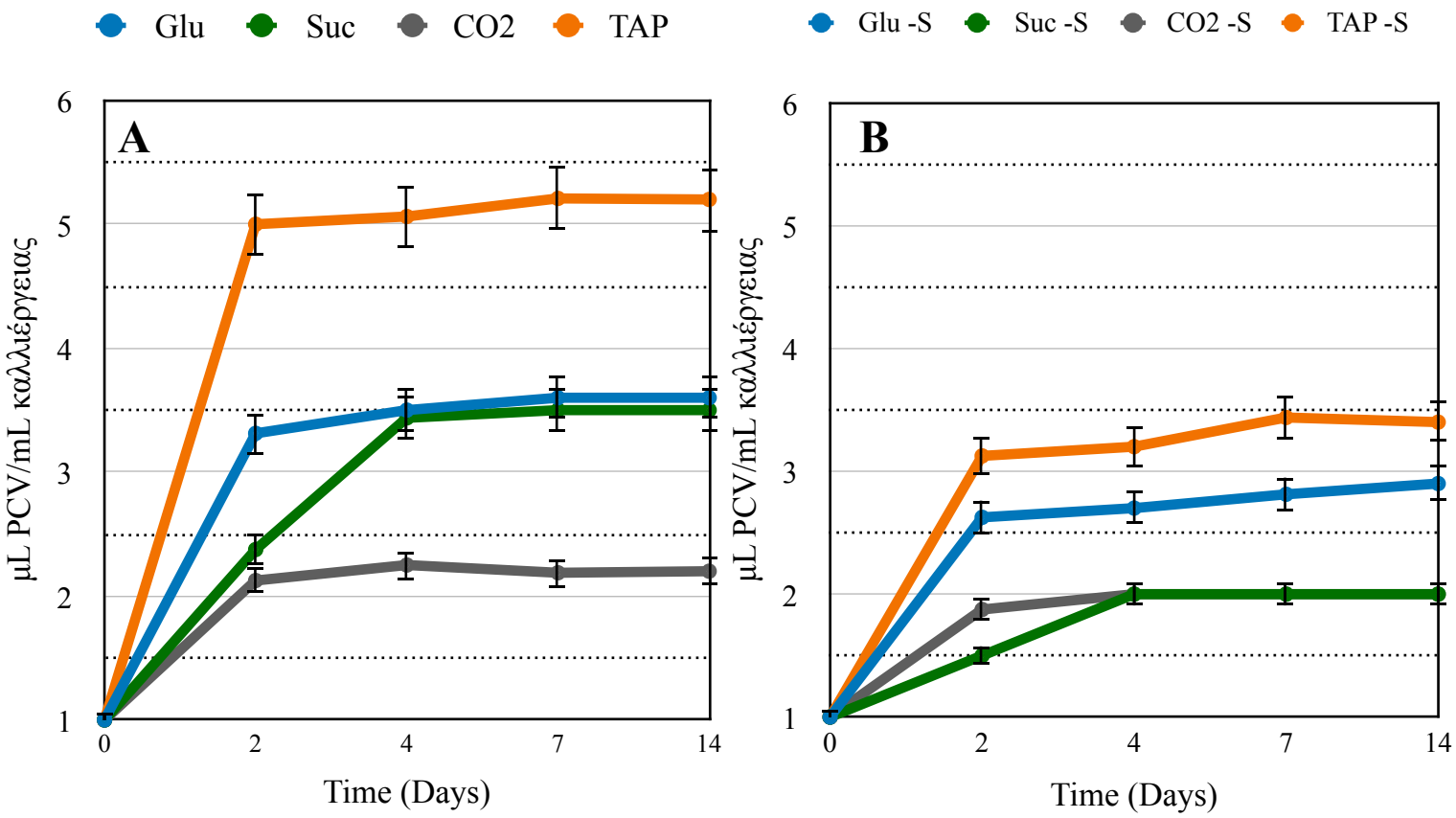


Εικόνα 17: (Α): μL παραγόμενου υδρογόνου ανά υγρή καλλιέργεια 50mL, σε όλες τις συνθήκες που μελετήθηκαν. Το σύμβολο (+) δηλώνει πως η συνθήκη βρισκόταν υπό ανάδευση ενώ το (-) δηλώνει πως η καλλιέργεια είχε αφεθεί σε ηρεμία καθόλη την διάρκεια ανάπτυξης του μικροφύκους. (Β): μL παραγόμενου υδρογόνου ανά mL καθιζάμενων κυττάρων (οι τιμές υπολογίστηκαν λαμβάνοντας υπόψιν την ανάπτυξη των κυττάρων μετρώντας το όγκο καθιζάμενων κυττάρων).

Συμπερασματικά, η ανάδευση των καλλιεργειών, στην ανάπτυξη και στην παραγωγή υδρογόνου είναι σημαντική. Έτσι, οι επόμενες πειραματικές σειρές, που μελετώνται στην παρούσα εργασία, αφορούν καλλιέργειες που βρίσκονται υπό ανάδευση.

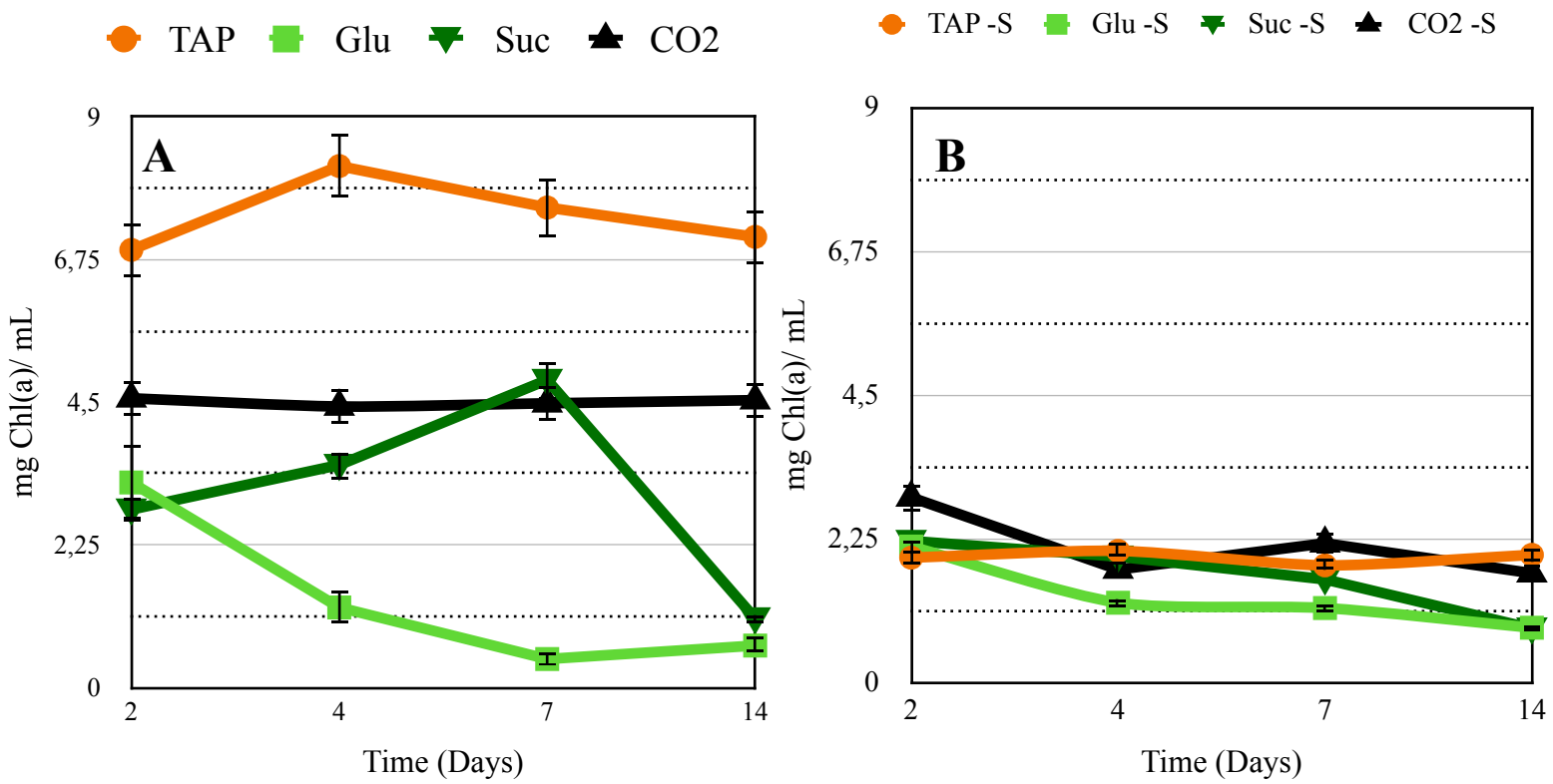
3.2 Διερεύνηση ανάπτυξης και παραγωγής υδρογόνου από *Chlorella sp.*, χρησιμοποιώντας διαφορετικές πηγές άνθρακα

Σε αυτή την πειραματική σειρά, μελετάται η ανάπτυξη του μικροφύκους *Chlorella sp,* με ταυτόχρονη μελέτη στην παραγωγή υδρογόνου, χρησιμοποιώντας διαφορετικές πηγές άνθρακα στο θρεπτικό μέσο. Ως πηγές άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν τα σάκχαρα γλυκόζη και σουκρόζη, το CO_2 και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με την συνθήκη Control - TAP και TAP - S (CH_3COOH στο θρεπτικό μέσο). Η ανάπτυξη των καλλιεργειών έλαβε χώρα παρουσία ανάδευσης, σε χρονική διάρκεια 14 ημερών. Οι πειραματικές τιμές, φανερώνουν και σε αυτή την περίπτωση πως στην συνθήκη στέρησης του θείου από το θρεπτικό μέσο, τα κύτταρα εμφανίζουν περιορισμένη ανάπτυξη σε σχέση με την συνθήκη που στο θρεπτικό υπάρχει θείο. Αυτό επιβεβαιώνεται από τον όγκο καθιζάμενων κυττάρων (PCV) και από την μέτρηση της ποσότητας χλωροφύλλης - a στις καλλιέργειες όπου το θείο απουσιάζει (Εικόνα 18B, 19B).



Εικόνα 18: (A) καμπύλες ανάπτυξης μετρώντας τον όγκο καθιζάμενων κυττάρων σε θρεπτικό μέσο παρουσίας θείου (S), με διαφορετικό υπόστρωμα άνθρακα. (B) καμπύλες ανάπτυξης μετρώντας τον όγκο καθιζάμενων κυττάρων σε θρεπτικό μέσο απουσίας θείου (S), με διαφορετικό υπόστρωμα άνθρακα.

Από την Εικόνα 18A, 18B, συμπεραίνουμε πως η ανάπτυξη του μικροφύκους, είναι μικρότερη όταν στο μέσο υπάρχει διαφορετικό υπόστρωμα άνθρακα εκτός του οξικού οξέος. Στην περίπτωση της γλυκόζης, το μικροφύκος εμφανίζει μεγαλύτερη ανάπτυξη συγκριτικά με τις άλλες πηγές άνθρακα και η καλλιέργεια φτάνει στην στατική φάση την δεύτερη ημέρα, ενώ κατά την παρουσία σουκρόζης, τα κύτταρα παρουσιάζουν παρόμοια ανάπτυξη, με πιο βραδείς ρυθμούς, καθώς η στατική φάση έρχεται την τέταρτη ημέρα καλλιέργειας. Η αυξημένη ανάπτυξη παρουσία γλυκόζης έναντι της σουκρόζης, επιβεβαιώνεται και στην περίπτωση όπου το θείο απουσιάζει από την καλλιέργεια. Ωστόσο, όταν η πηγή άνθρακα είναι το CO_2, τα κύτταρα παρουσιάζουν την μικρότερη ανάπτυξη, καθώς βασίζονται αποκλειστικά, στην παραγωγή σακχάρων μέσω της καθήλωσης του CO_2, και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Η ποσότητας της Chl(a), όπως φαίνεται και από την εικόνα 19, αποτελεί ένδειξη για την χρήση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού από τα κύτταρα για την ανάπτυξη τους.

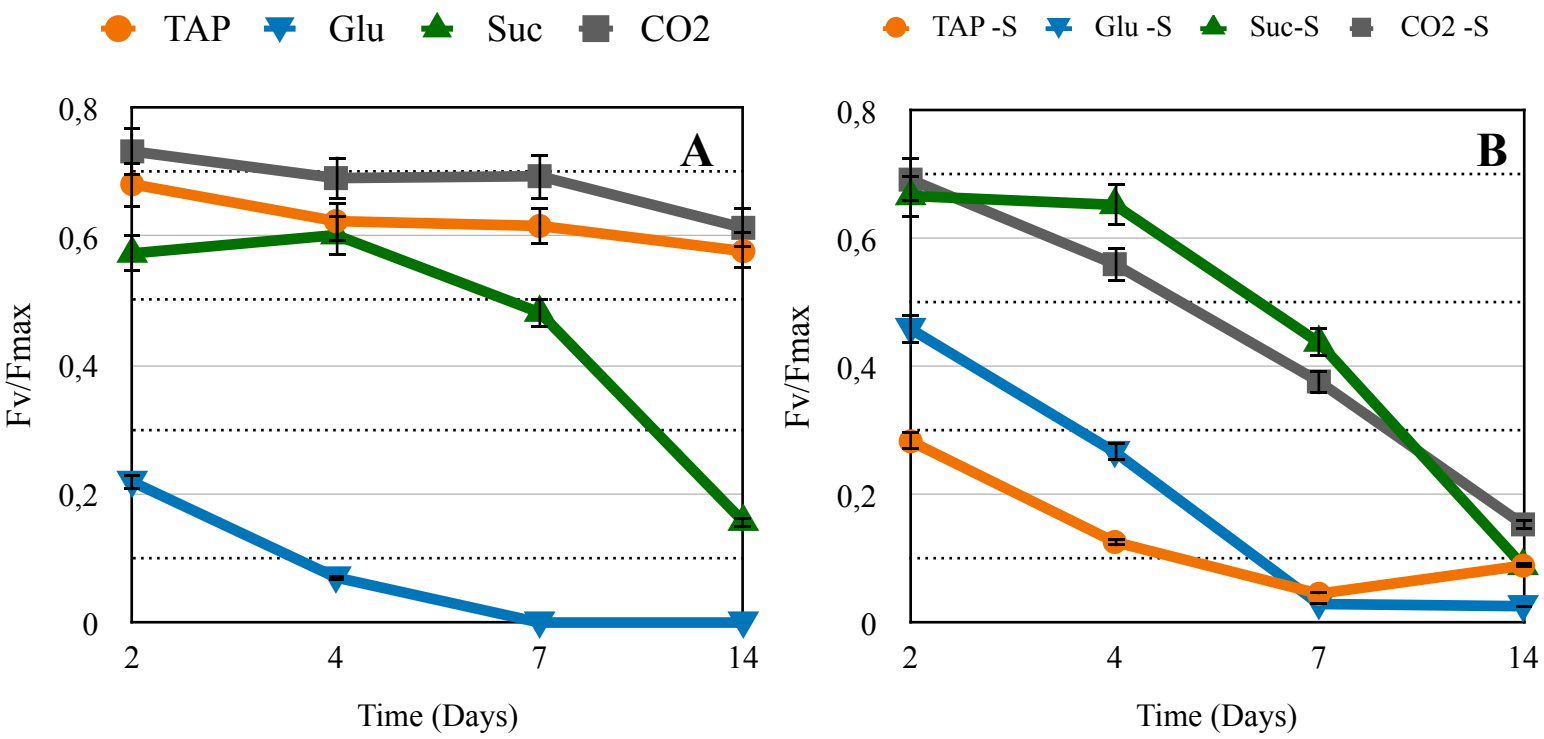


Εικόνα 19: (A) καμπύλες ανάπτυξης μικροφύκους, μετρώντας την ποσότητα χλωροφύλλης - a, σε θρεπτικό μέσο παρουσία θείου (S). (B) καμπύλες ανάπτυξης μικροφύκους, μετρώντας την ποσότητα χλωροφύλλης - a, σε θρεπτικό μέσο απουσίας θείου (S).

Στην περίπτωση απουσίας θείου από το θρεπτικό μέσο, σύμφωνα με την βιβλιογραφία [37], ο ρυθμός φωτοσύνθεσης μειώνεται και η ανάπτυξη περιορισμένη, πράγμα που επιβεβαιώνεται και από την χαμηλή συγκέντρωση Chl(a) στην καλλιέργεια. Όταν στο θρεπτικό μέσο, το θείο είναι

παρόν, η ποσότητα Chl(a), στις προς μελέτη συνθήκες, είναι μικρότερη από την ποσότητα στην συνθήκη του μάρτυρα (TAP). Αυτό, έχει ως αποτέλεσμα, τον καταβολισμό του σακχάρου (που υπάρχει στο θρεπτικό μέσο) προκειμένου να εξασφαλιστεί η απαιτούμενη ενέργεια, ώστε να μην απαιτείται η σύνθεση σακχάρων μέσω του κύκλου Calvin. Είναι ευδιάκριτο, πως στην περίπτωση της γλυκόζης, τα κύτταρα βασίζονται σε έναν ετερότροφο τρόπο ανάπτυξης, καθώς το περιεχόμενο της χρωστικής μειώνεται κατά την διάρκεια της καλλιέργειας [49]. Στην περίπτωση της σουκρόζης, το περιεχόμενο της Chl(a) αυξάνεται έως την έβδομη ημέρα καλλιέργειας, που σημαίνει πως η ανάπτυξη των κυττάρων βασίζεται κατά κύριο λόγο στην λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Μετά το πέρας της έβδομης μέρας καλλιέργειας, ο μικροοργανισμός, διασπά την σουκρόζη, και την καταναλώνει, περνώντας έτσι σε έναν ετερότροφο τρόπο ανάπτυξης. Η μείωση της ποσότητας της χρωστικής - Chl(a) - υποδηλώνει την κατανάλωση του σακχάρου και μείωση δραστηριότητας των φωτοσυστημάτων. Τέλος, όσον αφορά το CO_2, η ανάπτυξη του μικροοργανισμού στηρίζεται αποκλειστικά στην καθήλωση του CO_2 και παραγωγή σακχάρων, γεγονός που υποδηλώνει έντονη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, μέχρι την ολοκλήρωση του πειράματος. Η έντονη λειτουργία, φανερώνεται από την αυξημένη ποσότητα Chl(a) στην καλλιέργεια.

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 20, η τιμή του λόγου F_v/F_{max} σχετίζεται με την μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση του φωτοσυστήματος II. Χαμηλές τιμές του λόγου F_v/F_{max}, υποδηλώνουν μειωμένη φωτοσυνθετική δραστηριότητα ενώ υψηλότερες την ορθή λειτουργία του PSII.

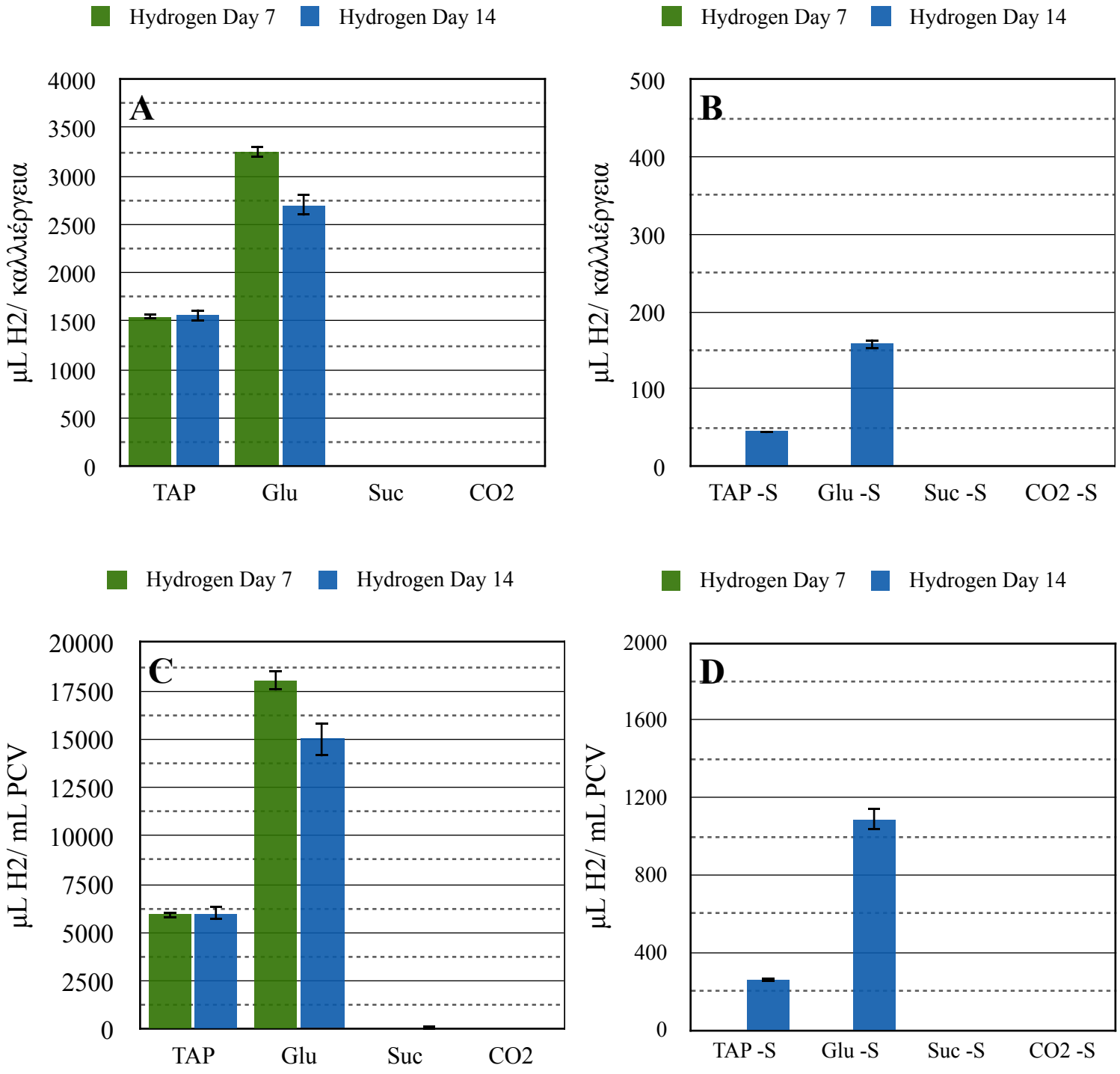


Εικόνα 20: (A) μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση (F_v/F_{max}) κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό παρουσίας θείου (S) υπό διαφορετικές πηγές άνθρακα. (B) μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση (F_v/F_{max}) κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό απουσίας θείου (S) υπό διαφορετικές πηγές άνθρακα.

Στο θρεπτικό μέσο όπου το θείο απουσιάζει, σε όλα τα δείγματα παρουσιάζεται μείωση της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης, εξαιτίας βιολογικής καταπόνησης, όπως έχει μελετηθεί και στο μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* [36, 37]. Στην περίπτωση που το θρεπτικό μέσο, διαθέτει θείο (S) (Εικόνα 20A), η φωτοσυνθετική απόδοση στην συνθήκη μάρτυρα (TAP) υποδηλώνει υγιή κύτταρα - μη καταπονημένα. Σε συνδυασμό με τις πληροφορίες που απορρέουν από την Εικ. 19A, όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη, την καταβολίζουν, προς παραγωγή ενέργειας. Ο ετερότροφος τρόπος ανάπτυξης εξασφαλίζει ευκολότερα την ενέργεια στο μικροφύκος, με αποτέλεσμα η φωτοσυνθετική ικανότητα να μειώνεται, ενώ παράλληλα μειώνεται και το περιεχόμενο χλωροφύλλης - a. Η φωτοσυνθετική ικανότητα επίσης μειώνεται καθώς η καλλιέργεια είναι ένα κλειστό σύστημα και το CO_2 δεν αφθονεί. Όταν τα κύτταρα αναπτυχθούν παρουσία σουκρόζης, στο πέρας των επτά ημερών, η ανάπτυξη των κυττάρων βασίζεται στην λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Οι αυξημένες τιμές Chl(a) είναι σύμφωνες με αυτήν την διαπίστωση, καθώς και οι τιμές του λόγου F_v/F_{max}, υποδηλώνουν ένα υγιές φωτοσύστημα II. Μετά το πέρας της πρώτης εβδομάδας, τα κύτταρα αναπτυσσόμενα στην σουκρόζη, παρουσιάζουν μείωση στο περιεχόμενο Chl(a), η καλλιέργεια αποχρωματίζεται ελαφρώς, καθώς και μειωμένες τιμές του λόγου Fv/Fmax. Η αλλαγή αυτή, οφείλεται στον διαφορετικό ρυθμό κατανάλωσης της σουκρόζης, τις πρώτες μέρες η πρόσληψη είναι μειωμένη ενώ μετά το πέρας των επτά ημερών η πρόσληψη αυξάνεται και ο ρυθμός φωτοσύνθεσης μειώνεται. Τα κύτταρα, προσλαμβάνουν τον δισακχαρίτη, διασπούν τον γλυκοζιτικό δεσμό και καταβολίζουν τα επιμέρους σάκχαρα για την εξασφάλιση της ενέργειας που απαιτείται για την ανάπτυξη. Τέλος, στην περίπτωση που στον αέριο χώρο πάνω από την καλλιέργεια υπάρχει CO_2, η φωτοσυνθετική απόδοση είναι μεγαλύτερη (αυξημένες τιμές Fv/Fmax) από την συνθήκη του μάρτυρα, διότι η ανάπτυξη στηρίζεται αποκλειστικά στην διαδικασία της φωτοσύνθεσης για την παραγωγή ενέργειας.

Είναι γνωστό, όπως αναλύθηκε και στο Κεφάλαιο 1, πως η παραγωγή υδρογόνου από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii,* απαιτεί ένα μη λειτουργικό φωτοσύστημα II. Στην περίπτωση της *Chlorella sp*, η παρεμπόδιση λειτουργίας του PSII δεν αποτελεί αναγκαία συνθήκη για την παραγωγή υδρογόνου (Εικόνα 21). Συγκεκριμένα, μεγαλύτερος όγκος υδρογόνου παράγεται

από κύτταρα, που δεν στερούνται το θείο (S) παρά από κύτταρα που αναπτύσσονται υπό συνθήκες στέρησης αυτού.



Εικόνα 21: (A): μL παραγόμενου υδρογόνου ανά υγρή καλλιέργεια 50mL, υπό διαφορετικές πηγές άνθρακα σε θρεπτικό μέσο παρουσίας θείου (S). (B): μL παραγόμενου υδρογόνου ανά υγρή καλλιέργεια 50mL, υπό διαφορετικές πηγές άνθρακα σε θρεπτικό μέσο απουσίας θείου (S). (C): μL παραγόμενου υδρογόνου ανά mL καθιζάμενων κυττάρων σε θρεπτικό μέσο παρουσίας θείου (S). (D): μL παραγόμενου υδρογόνου ανά mL καθιζάμενων κυττάρων σε θρεπτικό μέσο απουσίας θείου (S).

Τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε θρεπτικά που το θείο απουσιάζει, βρίσκονται αρκετές ημέρες στην στατική φάση, έως ότου εξαντληθεί πλήρως το θείο και τα κύτταρα προσαρμοστούν σε συνθήκες στέρησης. Σε αυτή την περίπτωση παράγεται υδρογόνο αλλά η ποσότητα αυτού είναι μικρότερη του μάρτυρα.

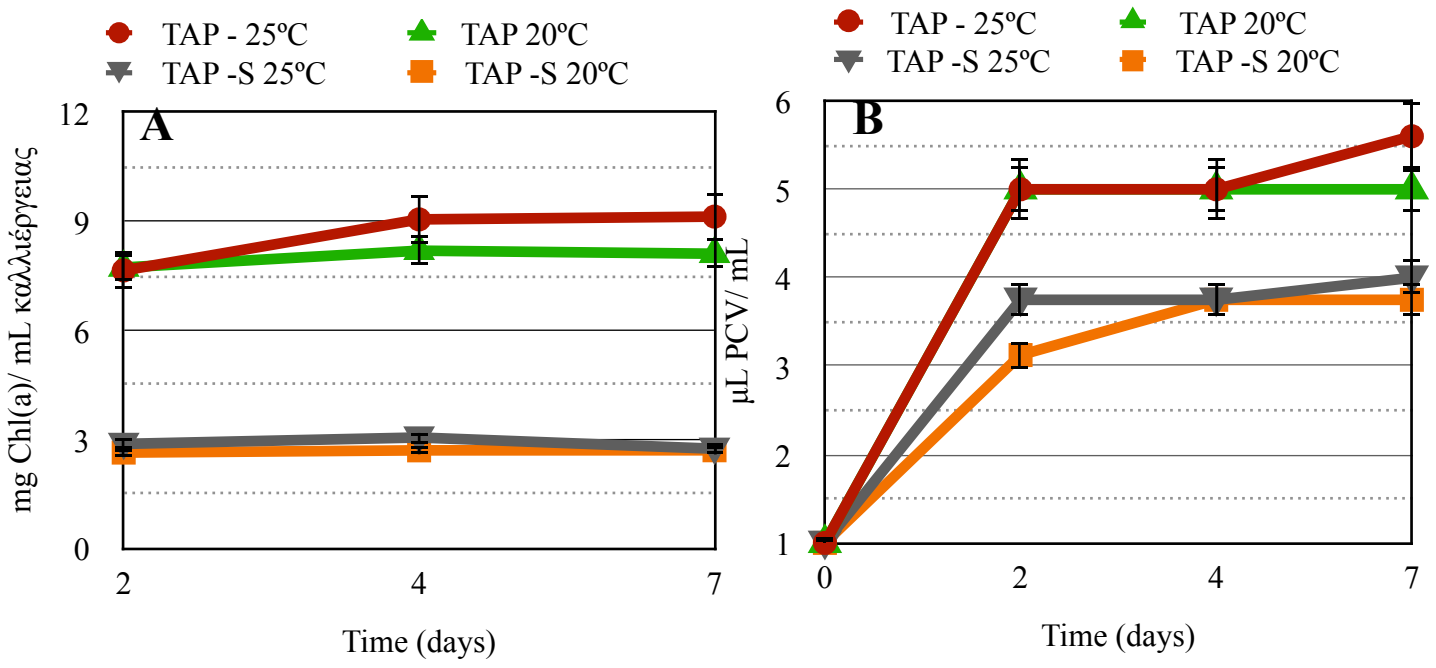
Η γλυκόζη προτιμάται από τον μικροοργανισμό για την παραγωγή ενέργειας, καθώς τα κύτταρα την προσλαμβάνουν και την καταβολίζουν, ενώ δεν χρησιμοποιούν την διαδικασία της φωτοσύνθεσης, όπως φανερώνουν οι μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού και χλωροφύλλης - a. Τα ηλεκτρόνια που παράγονται από την γλυκόλυση, οδηγούνται στην υδρογονάση με την διαδικασία που αναλύθηκε παραπάνω, προς παραγωγή υδρογόνου [37]. Στα δείγματα που περιέχουν διαφορετική πηγή άνθρακα, δεν παράγονται μετρήσιμες ποσότητες υδρογόνου. Η γλυκόζη, αναδεικνύεται η καταλληλότερη πηγή άνθρακα προς παραγωγή υδρογόνου, όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε βάση θρεπτικού μέσου TP (Trizma - Phosphate).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως στην περίπτωση της *Chlorella sp,* θρεπτικό μέσο που περιέχιει θείο, αποτελεί καταλληλότερη συνθήκη για την παραγωγή υδρογόνου. Η παραγωγή υδρογόνου σε συνθήκες παρουσίας θείου, μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός πως τα γονίδια της υδρογονάσης εκφράζονται εξαιτίας της αναερόβιας ατμόσφαιρας πάνω από την καλλιέργεια και όχι στην παρεμπόδιση του PSII.

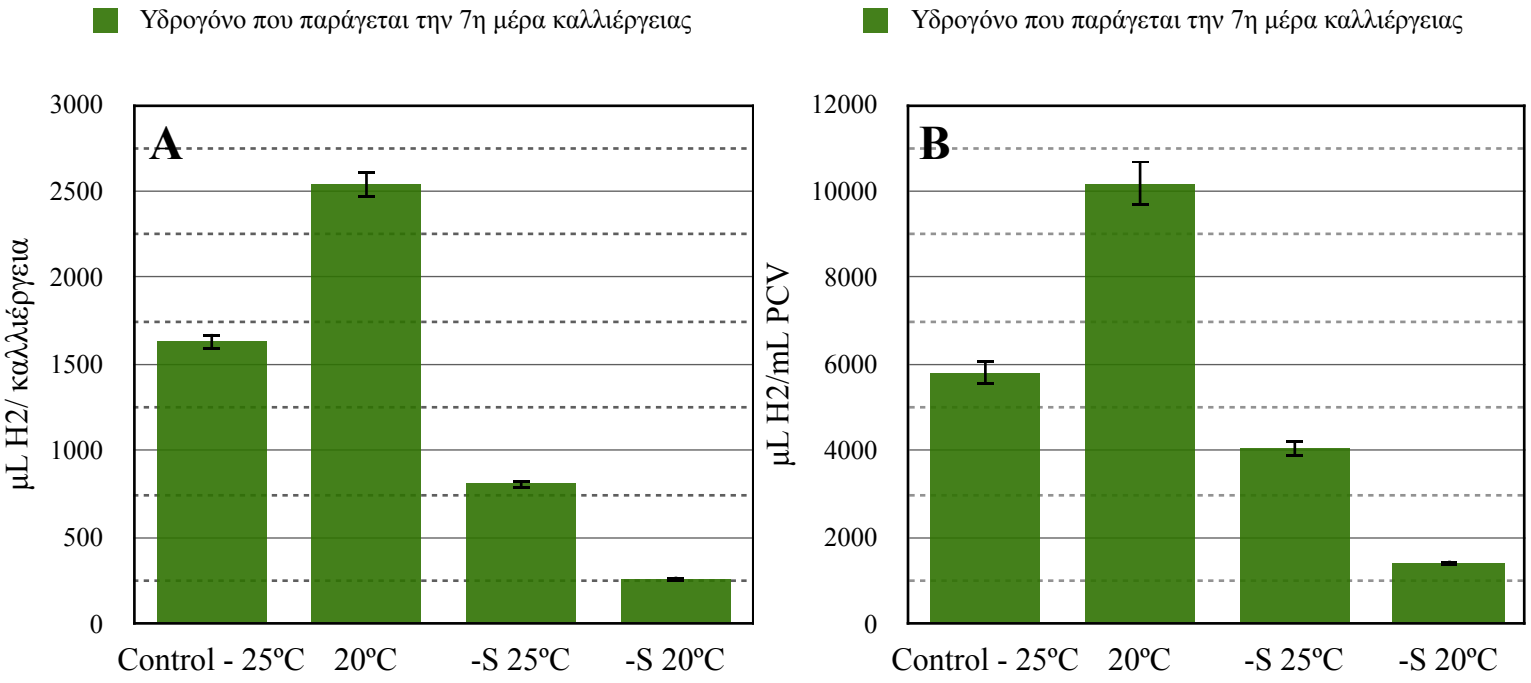
3.3 Διερεύνηση ανάπτυξης και παραγωγής υδρογόνου από *Chlorella sp.*, σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Σε αυτήν την πειραματική σειρά, μελετάται η επίδραση της θερμοκρασίας, στην ανάπτυξη του μικροφύκους και στην ικανότητα αυτού να παράγει υδρογόνο. Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιήθηκε μελέτη εκτός της συνθήκης μάρτυρα (25°C) αφορά την ανάπτυξη και παραγωγή υδρογόνου στους 20°C, σε θρεπτικό μέσο TAP και TAP - S σε διάστημα επτά ημερών. Στην Εικόνα 22, απεικονίζεται η ανάπτυξη των κυττάρων *Chlorella* στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες.

Όπως φαίνεται από τα γραφήματα στην Εικ. 22, στην συνθήκη των 20°C, τα κύτταρα παρουσιάζουν ελαφρώς μειωμένη ανάπτυξη, σε σχέση με την συνθήκη Control. Σε αυτήν την περίπτωση, η μειωμένη ανάπτυξη του μικροφύκους, δεν συνοδεύεται από μειωμένη παραγωγή υδρογόνου. Στην Εικόνα 23, παρουσιάζονται οι όγκοι υδρογόνου που παράχθηκαν. Ακόμη, επιβεβαιώνεται και σε αυτήν την πειραματική σειρά, πως στην συνθήκη TAP - S, η ανάπτυξη είναι και πάλι μειωμένη σχέση με το θρεπτικό μέσο TAP.



Εικόνα 22: (A): καμπύλες κυτταρικής ανάπτυξης μετρώντας την χλωροφύλλη - a. (B): καμπύλες κυτταρικής ανάπτυξης μετρώντας τον όγκο καθιζάμενων κυττάρων.



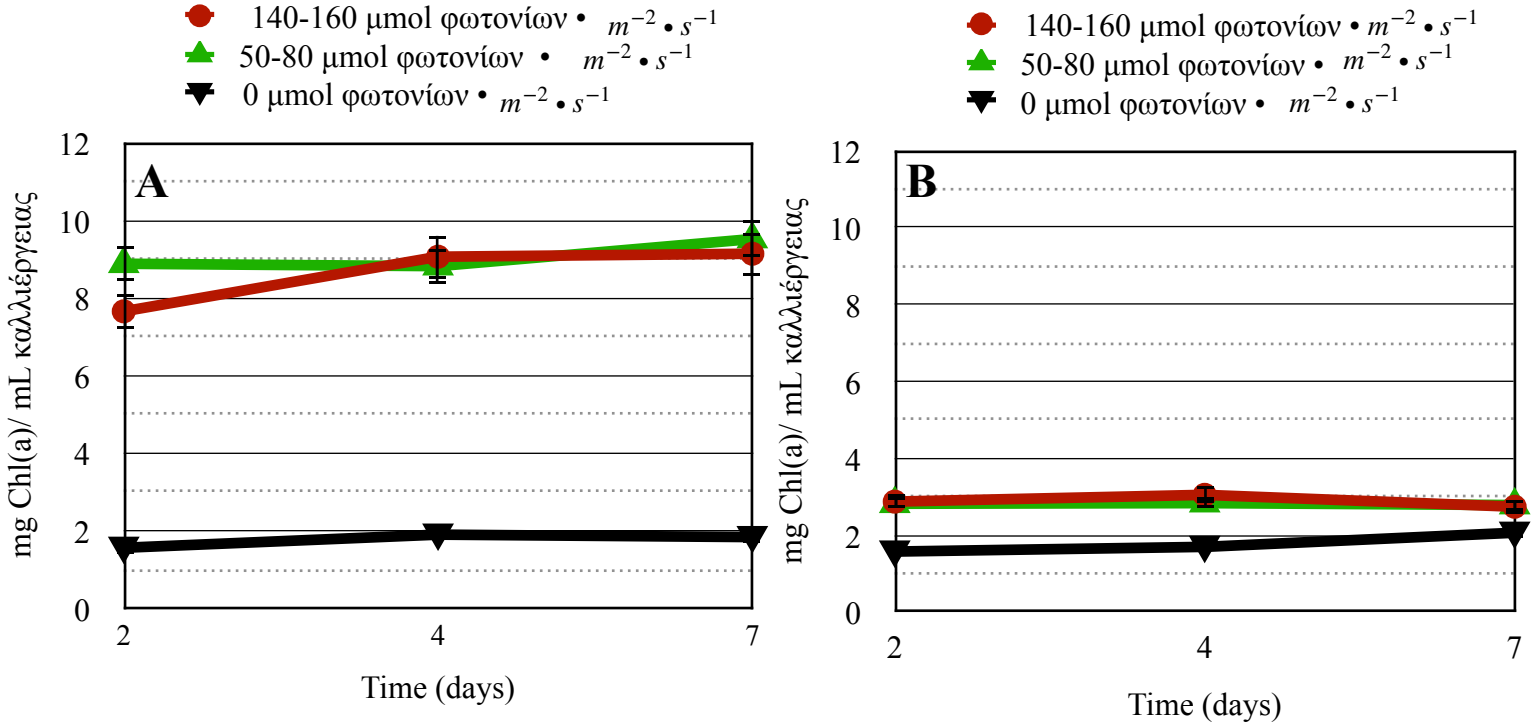
Εικόνα 23: (A): μL παραγόμενου υδρογόνου ανά υγρή καλλιέργεια 50mL, υπό διαφορετικές θερμοκρασίες σε θρεπτικά μέσα TAP & TAP -S. (B) μL παραγόμενου υδρογόνου ανά mL καθιζάμενων κυττάρων, υπό διαφορετικές θερμοκρασίες σε θρεπτικά μέσα TAP & TAP -S.

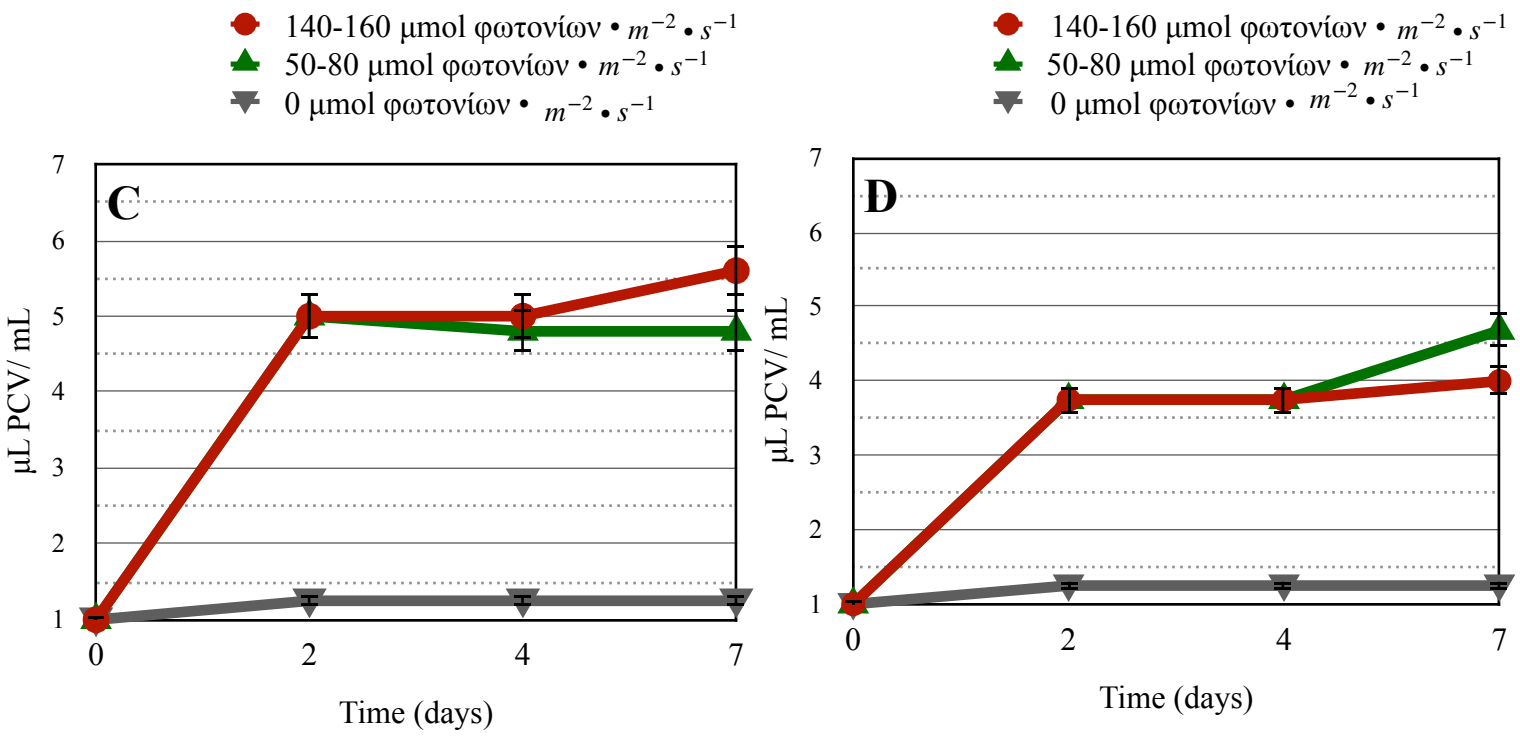
Συνεπώς, από τα παραπάνω γραφήματα, συμπεραίνουμε πως η θερμοκρασία 20°C είναι πιο ιδανική συνθήκη για την παραγωγή υδρογόνου από ότι η συνθήκη 25°C. Και σε αυτήν την

πειραματική σειρά, επιβεβαιώνεται η διαπίστωση πως κύτταρα αναπτυσσόμενα σε θρεπτικό μέσο TAP - S, δεν είναι ικανά να παράξουν μεγάλες ποσότητες υδρογόνου.

3.4 Διερεύνηση ανάπτυξης και παραγωγής υδρογόνου από *Chlorella sp.*, σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού

Στην παρούσα πειραματική σειρά, μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών εντάσεων φωτισμού, στην ανάπτυξη και στην παραγωγή υδρογόνου από κύτταρα *Chlorella sp*. Οι προς μελέτη συνθήκες αφορούσαν την ανάπτυξη με ένταση φωτισμού 50 - 80 μmol φωτονίων • $m^{-2} \bullet s^{-1}$ και με ένταση φωτισμού 0 μmol φωτονίων • $m^{-2} \bullet s^{-1}$, σε σύγκριση πάντα με την συνθήκη μάρτυρα (Control) στα 140 - 160 μmol φωτονίων • $m^{-2} \bullet s^{-1}$. Η ανάπτυξη των κυττάρων έλαβε χώρα σε θρεπτικό μέσο TAP & TAP - S για επτά ημέρες. Στην Εικόνα 24 παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης του μικροοργανισμού με την επίδραση διαφορετικής έντασης ακτινοβολίας.



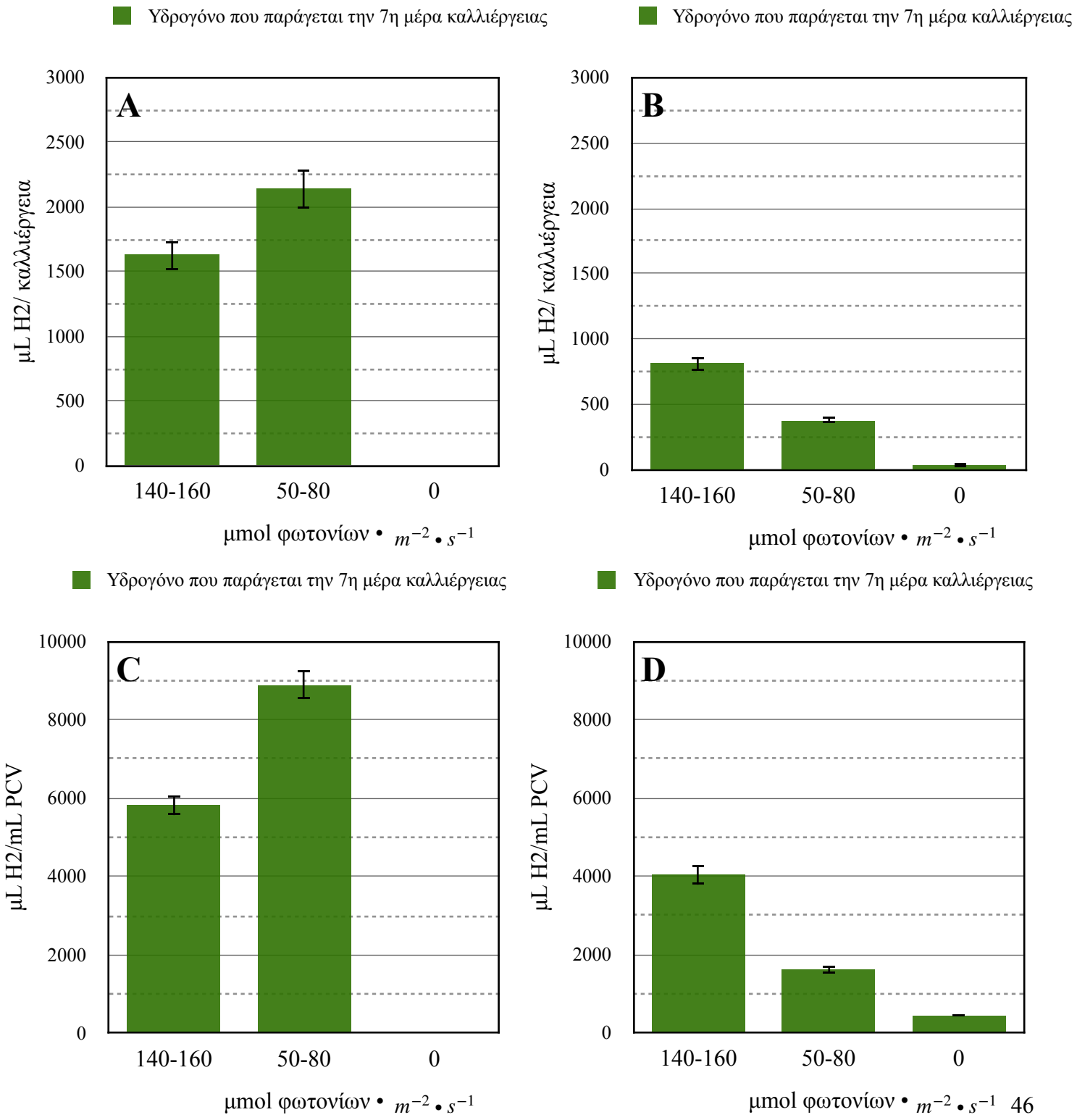


Εικόνα 24: (A): καμπύλες ανάπτυξης μικροφύκους, μετρώντας την χλωροφύλλη - a, σε θρεπτικό μέσο TAP. (B) καμπύλες ανάπτυξης μικροφύκους, μετρώντας την χλωροφύλλη - a, σε θρεπτικό μέσο TAP - S. (C): καμπύλες ανάπτυξης μικροφύκους μετρώντας τον όγκο καθιζάμενων κυττάρων σε θρεπτικό μέσο TAP. (D) καμπύλες ανάπτυξης μικροφύκους μετρώντας τον όγκο καθιζάμενων κυττάρων σε θρεπτικό μέσο TAP - S.

Από την Εικ. 24 συμπεραίνουμε, πως στις συνθήκες που το δείγμα δέχεται ακτινοβολία παρουσιάζει αυξημένη ανάπτυξη και αυξημένο περιεχόμενο χλωροφύλλης - a. Σε αντίθετη περίπτωση, που το δείγμα βρίσκεται στο σκοτάδι (0 μmol φωτονίων) η ανάπτυξη του είναι ελάχιστη όπως φαίνεται και από τον όγκο καθιζάμενων κυττάρων και από το περιεχόμενο χρωστικών. Το γεγονός αυτό, οφείλεται στο ότι η ανάπτυξη του μικροφύκους, πραγματοποιείται παρουσία φωτός, το οποίο απορροφάται για την εξασφάλιση της ενέργειας προς την επιβίωση και ανάπτυξη του. Στην περίπτωση που οι καλλιέργειας αναπτύσσονται στο σκοτάδι, ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός βρίσκεται σε αδράνεια με αποτέλεσμα την μείωση στην ανάπτυξη, όπως φανερώνουν και τα ανωτέρω γραφήματα.

Η παρόμοια ανάπτυξη των κυττάρων *Chlorella*, στις διαφορετικές εντάσεις φωτισμού (140 - 160 και 50 - 80 μmol φωτονίων), θα σήμαινε και παρόμοια παραγωγή υδρογόνου από τα κύτταρα. Κάτι τέτοιο, δεν συμβαίνει αλλά η συνθήκη 50 - 80 μmol φωτονίων • $m^{-2} \bullet s^{-1}$, φαίνεται να είναι η βέλτιστη για την παραγωγή υδρογόνου στο συγκεκριμένο στέλεχος του μικροφύκους. Μεγάλη ένταση φωτισμού, όπως στην συνθήκη μάρτυρα, δεν είναι ιδανική για την μεγιστοποίηση της παραγωγής υδρογόνου. Εν αντιθέσει, χαμηλότερη ένταση φωτισμού -μειωμένη στο μισό της αρχικής- αποτελεί προτιμότερη συνθήκη για αυξημένη παραγωγή αερίου. Η ακτινοβολία μέτριας

έντασης, διαθέτει την κατάλληλη ενέργεια, η οποία προσφέρεται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων με τελικό αποδέκτη την υδρογονάση, με αποτέλεσμα, να παράγεται μεγαλύτερος όγκος υδρογόνου. Τέλος, επιβεβαιώνεται πάλι, πως στο θρεπτικό μέσο TAP - S, τα κύτταρα παρουσιάζον μειωμένο περιεχόμενο χρωστικών εξαιτίας της παρεμπόδισης λειτουργίας του φωτοσυστήματος ΙΙ. Η παρεμπόιδηση αυτή, όπως έχει αναφερεθεί ανωτέρω, δεν οδηγεί τα κύτταρα *Chlorella sp*, στην αυξημένη παραγωγή υδρογόνου. Στην Εικόνα 25, απεικονίζονται οι όγκοι παραγόμενου υδρογόνου υπό διαφορετικές εντάσεις φωτισμού.



Εικόνα 25: (A): μL παραγόμενου υδρογόνου ανά υγρή καλλιέργεια 50 mL, υπό την επίδραση διαφορετικών εντάσεων φωτισμού, σε θρεπτικό μέσο TAP. (B) μL παραγόμενου υδρογόνου ανά υγρή καλλιέργεια 50 mL, υπό την επίδραση διαφορετικών εντάσεων φωτισμού, σε θρεπτικό μέσο TAP - S. (C): μL υδρογόνου ανά mL καθιζάμενων κυττάρων υπό την επίδραση διαφορετικών εντάσεων φωτισμού, σε θρεπτικό μέσο TAP. (D): μL υδρογόνου ανά mL καθιζάμενων κυττάρων υπό την επίδραση διαφορετικών εντάσεων φωτισμού, σε θρεπτικό μέσο TAP - S.

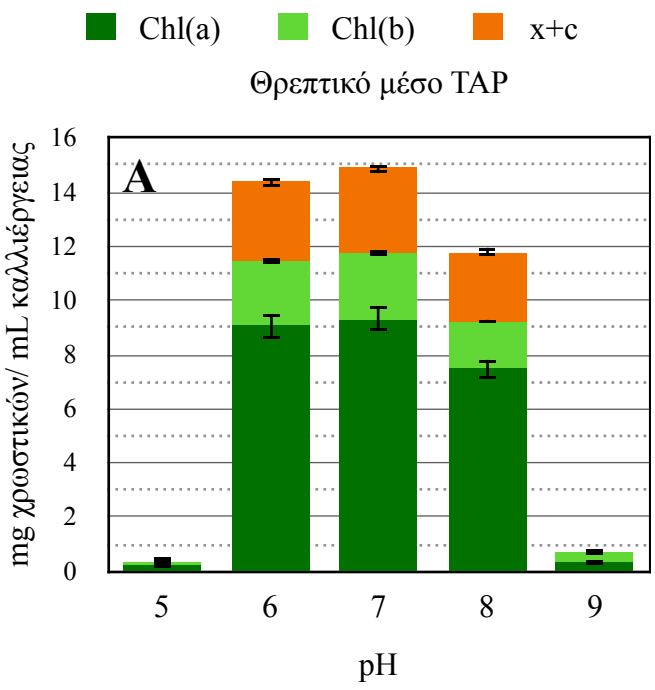
Από τα παραπάνω δεδομένα, επιβεβαιώνεται η υπόθεση, πως για να παραχθεί υδρογόνο, απαιτείται φως. Η ενέργεια του φωτός είναι υπαίτια για την μεταφορά των ηλεκτρονίων στην υδρογονάση, που σε σκοτεινές συνθήκες καλλιέργειας, η συγκεκριμένη προϋπόθεση δεν ικανοποιείται, επομένως, δεν παράγονται αξιοποιήσιμες ποσότητες υδρογόνου. Συνεπώς, η κατάλληλη συνθήκη καλλιέργειας στην παραγωγή υδρογόνου, αφορά ακτινοβολία έντασης 50 - 80 μmol φωτονίων • m^{-2} • s^{-1}.

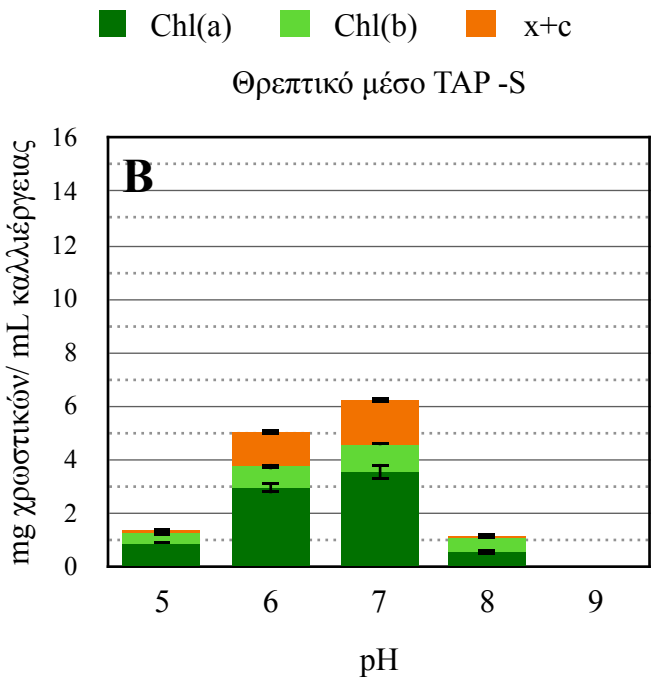
3.5 Διερεύνηση παραγωγής υδρογόνου από *Chlorella sp.*, από καλλιέργειες με στερήσεις K, S, N και P από το θρεπτικό μέσο, σε διαφορετικά pH

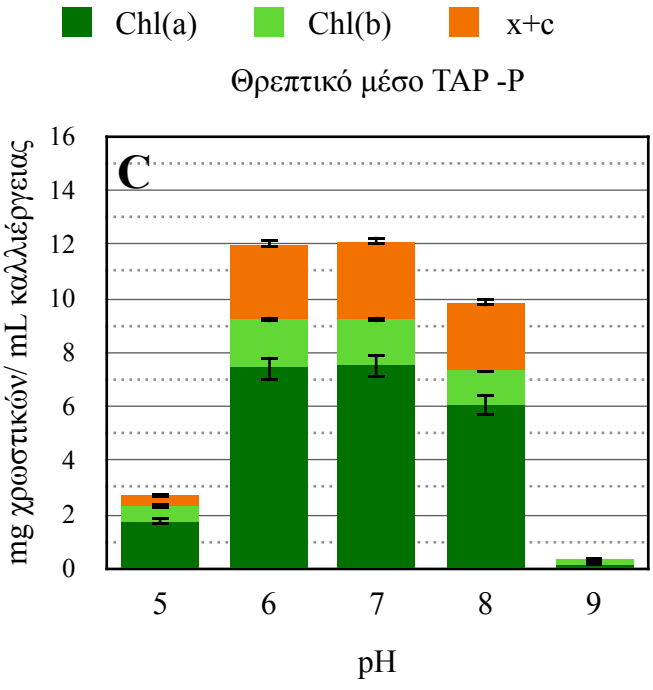
Στην παρακάτω πειραματική σειρά, μελετήθηκε η παραγωγή υδρογόνου από καλλιέργειες *Chlorella sp*, σε θρεπτικά μέσα τα οποία στερούνται ένα μακροθρεπτικό στοιχείο τη φορά. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά μέσα TAP (Control), TAP - S, TAP - P, TAP - N και TAP - K. Για την μεγιστοποίηση της παραγωγής υδρογόνου, μελετήθηκε και η επίδραση του pH, στο μέσο ανάπτυξης του μικροφύκους για επτά ημέρες. Έτσι, για κάθε θρεπτικό μέσο, μελετήθηκαν 5 συνθήκες, με εύρος pH= 5-9. Αυτή η πειραματική σειρά αποσκοπεί στην εύρεση της βέλτιστης συνθήκης (θρεπτικό μέσο και pH του μέσου) για την μεγιστοποίηση της παραγωγής υδρογόνου. Στην Εικόνα 26, παρουσιάζεται το περιεχόμενο των κυττάρων σε φωτοσυνθετικές χρωστικές σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα και σε διαφορετικά pH. Η ποσότητα των φωτοσυνθετικών χρωστικών, αποτελεί δείκτη για την ανάπτυξη του μικροφύκους σε αυτές τις διαφορετικές συνθήκες. Ο παρακάτω πίνακας (Πίνακας 17), παρουσιάζει τα αποτελέσματα μετρήσεων PCV/mL την έβδομη ημέρα καλλιέργειας και δρα επικουρικά σε συνδυασμό με την Εικ. 26 αποτελώντας μέτρο της ανάπτυξης των καλλιεργειών.

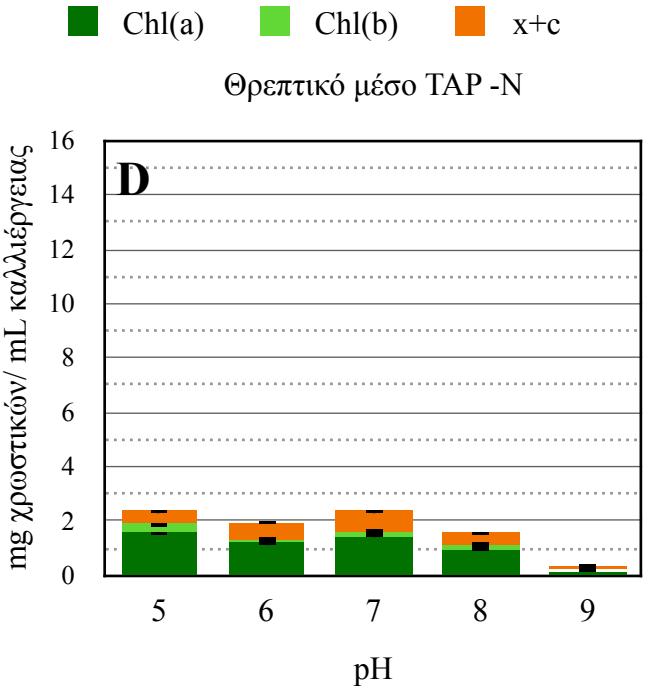
Πίνακας 17: αποτελέσματα μετρήσεων κυτταρικής ανάπτυξης (υπολογιζόμενα σε μL PCV/mL) την έβδομη ημέρα καλλιέργειας

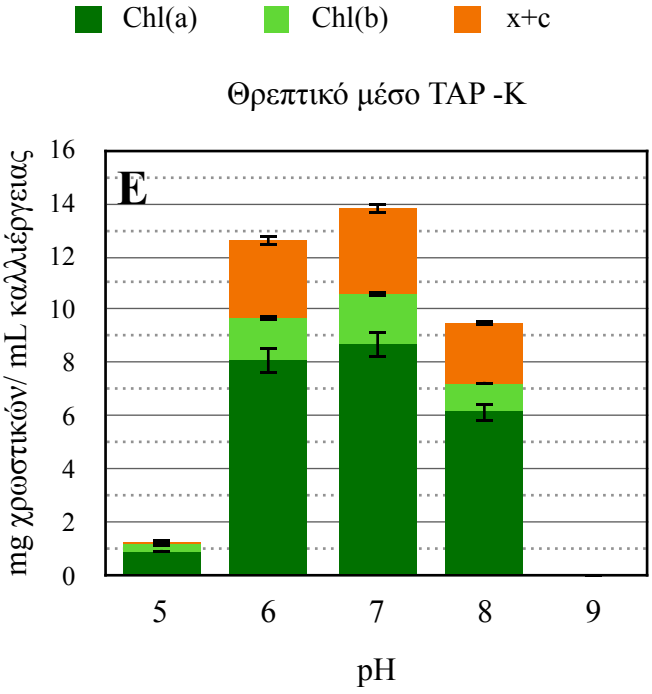
pH\ θρεπτικό	TAP (Control)	TAP - S	TAP - P	TAP - N	TAP - K
5	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
6	5	3,75	4,58	3,75	5
7	6,67	3,75	5	3,75	6,67
8	5,83	3,75	6,67	5,83	5
9	2,5	1,25	4,17	1,25	1,25


Chl(a)
Chl(b)
x+c
Θρεπτικό μέσο TAP
A
mg χρωστικών/ mL καλλιέργειας
0
2
4
6
8
10
12
14
16
5
6
7
8
9
pH


Chl(a)
Chl(b)
x+c
Θρεπτικό μέσο TAP -S
B
mg χρωστικών/ mL καλλιέργειας
0
2
4
6
8
10
12
14
16
5
6
7
8
9
pH


Chl(a)
Chl(b)
x+c
Θρεπτικό μέσο TAP -P
C
mg χρωστικών/ mL καλλιέργειας
0
2
4
6
8
10
12
14
16
5
6
7
8
9
pH

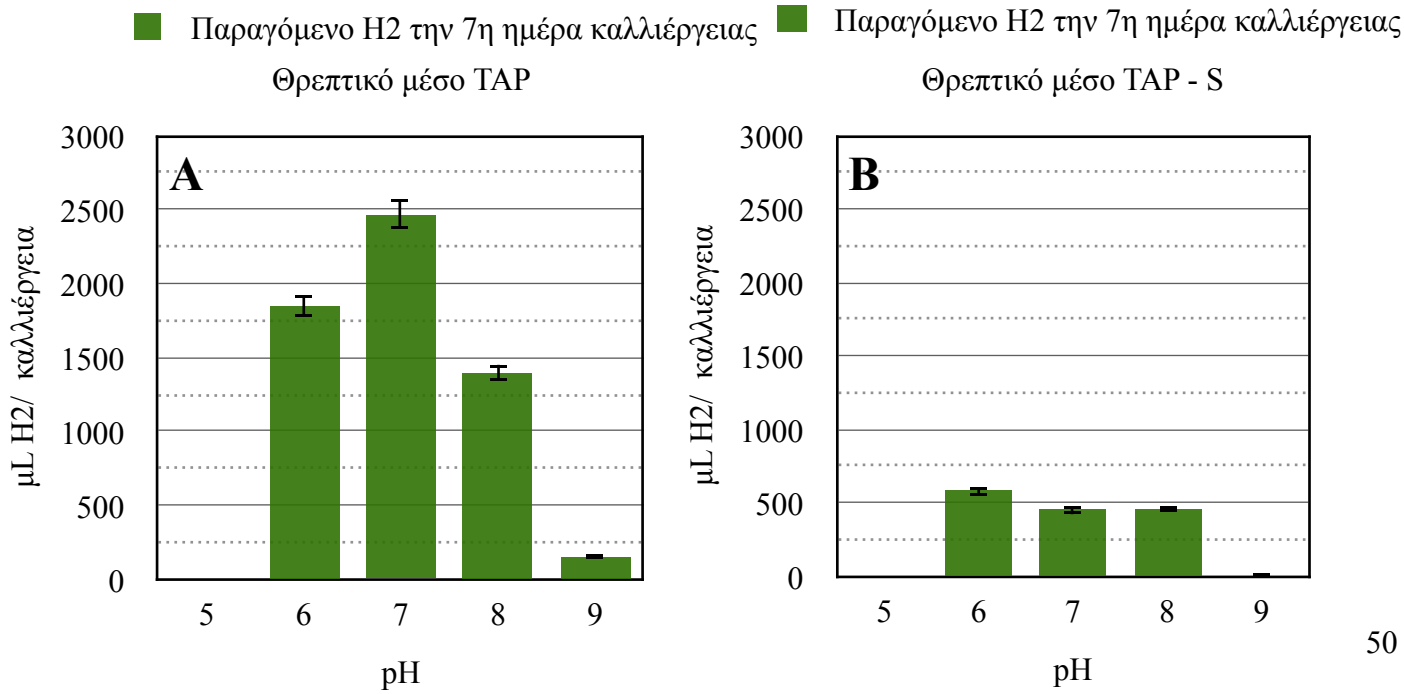

Chl(a)
Chl(b)
x+c
Θρεπτικό μέσο TAP -N
D
mg χρωστικών/ mL καλλιέργειας
0
2
4
6
8
10
12
14
16
5
6
7
8
9
pH

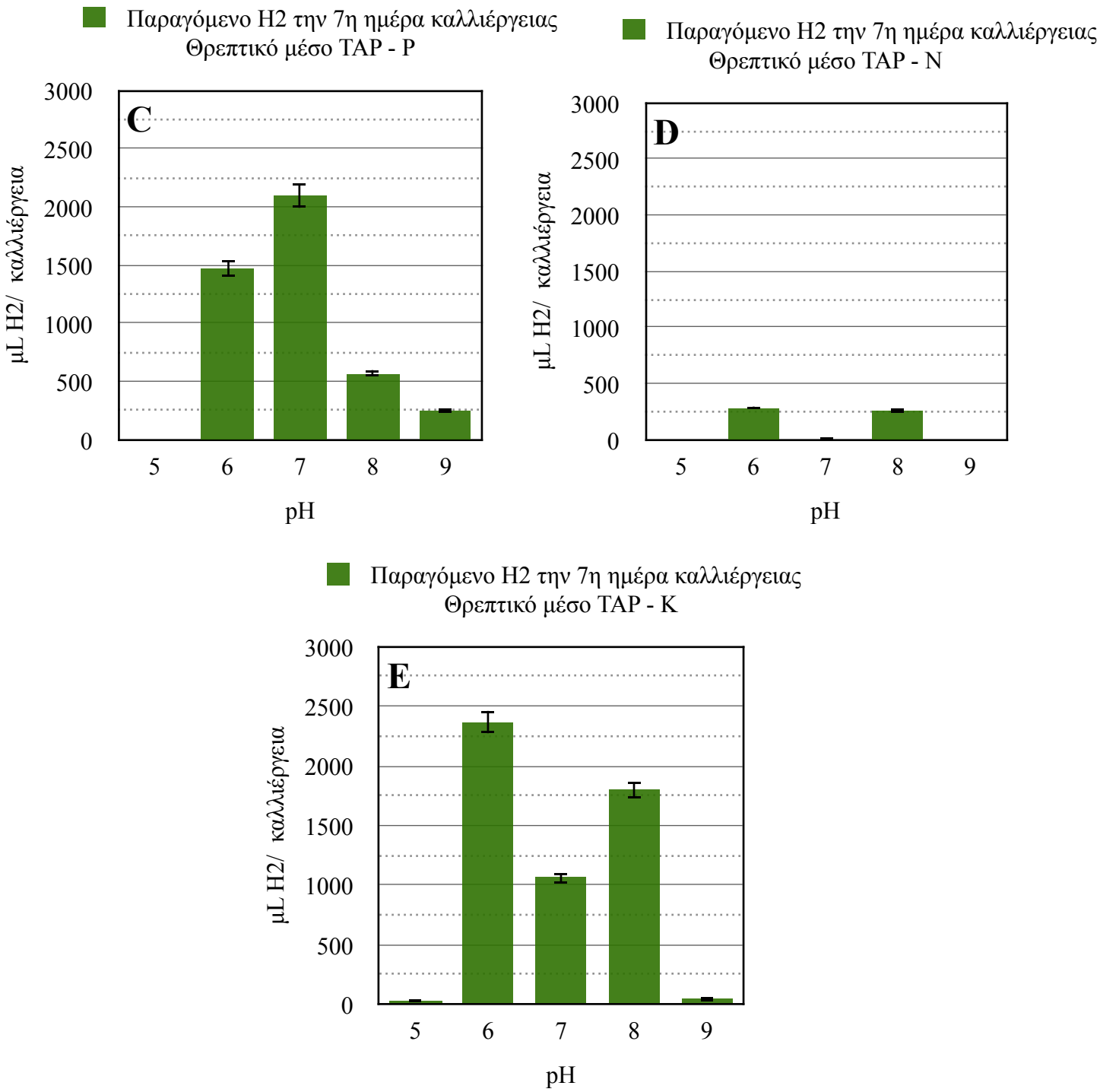

Chl(a)
Chl(b)
x+c
Θρεπτικό μέσο TAP -K
E
mg χρωστικών/ mL καλλιέργειας
0
2
4
6
8
10
12
14
16
5
6
7
8
9
pH

Εικόνα 26: (A): περιεχόμενο κυττάρων *Chlorella sp,* σε φωτοσυνθετικές χρωστικές όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο TAP, σε διαφορετικά pH (B): περιεχόμενο κυττάρων *Chlorella sp,* σε φωτοσυνθετικές χρωστικές όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο TAP - S, σε διαφορετικά pH (C): περιεχόμενο κυττάρων *Chlorella sp,* σε φωτοσυνθετικές χρωστικές όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο TAP - P, σε διαφορετικά pH (D): περιεχόμενο κυττάρων *Chlorella sp,* σε φωτοσυνθετικές χρωστικές όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο TAP - N, σε διαφορετικά pH (E): περιεχόμενο κυττάρων *Chlorella sp,* σε φωτοσυνθετικές χρωστικές όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο TAP - K, σε διαφορετικά pH. Συντομογραφίες: **Chl(a)** - χλωροφύλλη -a, **Chl(b)** - χλωροφύλλη -b, **x+c** - ξανθοφύλλες και καροτενοειδή.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι ευδιάκριτο πως, σε ακραίες τιμές pH (5 και 9) η ανάπτυξη του μικροοργανισμού παρεμποδίζεται. Η μειωμένη ποσότητα χρωστικών σε αυτές τις τιμές φανερώνει την μειωμένη ανάπτυξη των καλλιεργειών αυτών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση που από το θρεπτικό υλικό απουσιάζει το θείο και το άζωτο. Στην περίπτωση του θείου, όπως έχει αναλυθεί, η απουσία του παρεμποδίζει την λειτουργία του PSII και έτσι η ποσότητα των φωτοσυνθετικών χρωστικών στα κύτταρα είναι μειωμένη σε σχέση με την συνθήκη Control (TAP). Στην περίπτωση του θρεπτικού μέσου TAP - N, η ποσότητα των χρωστικών είναι εμφανώς μικρότερη καθώς το άζωτο είναι στοιχείο που απαντάται στις χλωροφύλλες. Απουσία αζώτου από το θρεπτικό μέσο, υποδηλώνει αδυναμία σύνθεσης της πορφυρίνης και κατ' επέκταση μειωμένες χρωστικές και ανάπτυξη της καλλιέργειας.

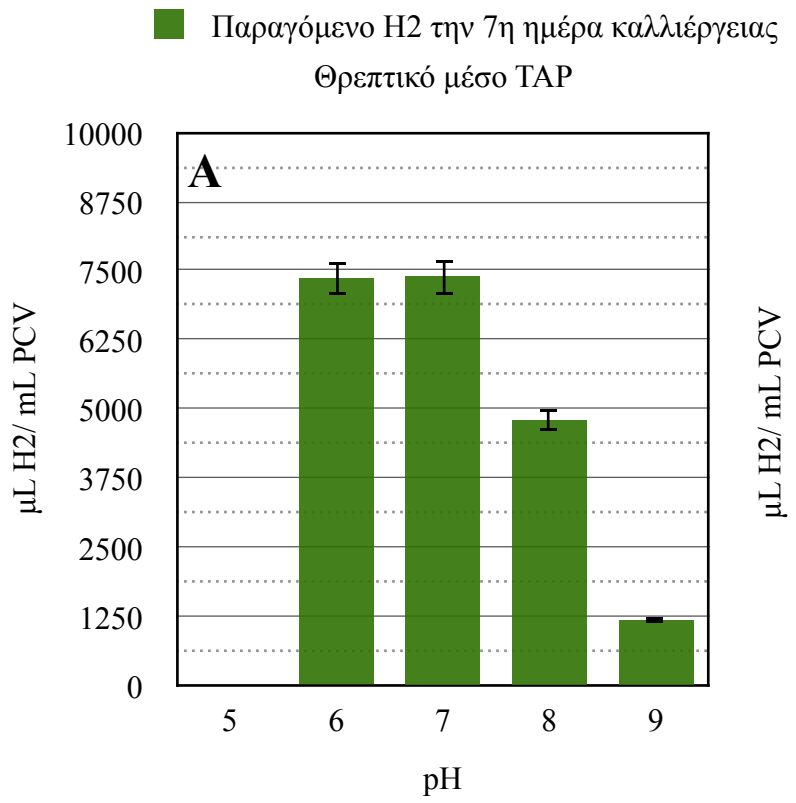
Τέλος, για την εύρεση της συνθήκης στην οποίο το μικροφύκος παράγει μεγαλύτερο όγκο υδρογόνου, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις με αέριο χρωματογράφο την έβδομη ημέρα καλλιέργειας. Στην Εικόνα 27 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα παραγόμενου υδρογόνου ανά καλλιέργεια ενώ στην Εικόνα 28, παρουσιάζονται διαγράμματα παραγόμενου υδρογόνου ανά mL καθιζάμενων κυττάρων.

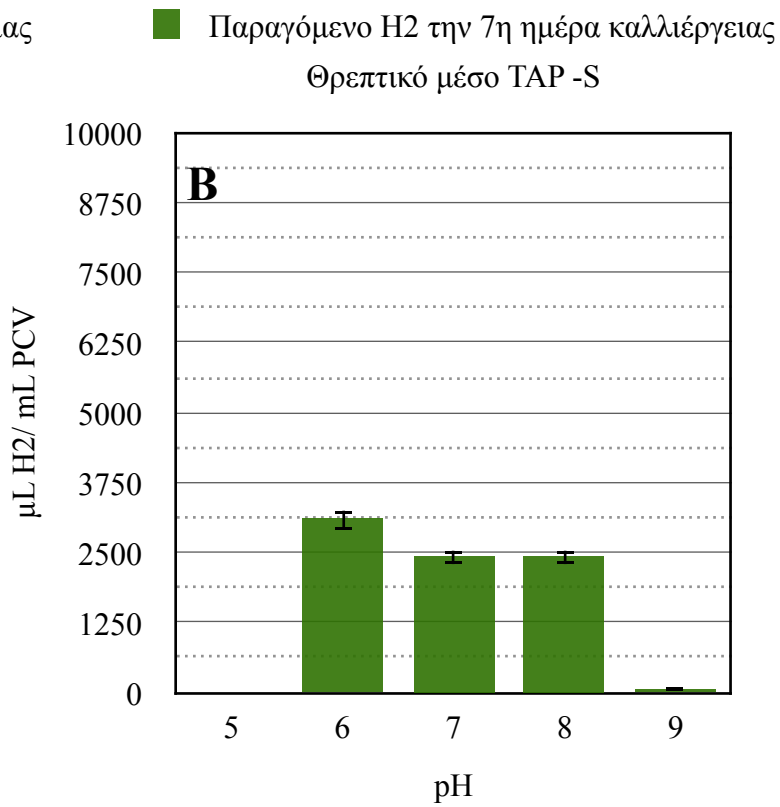


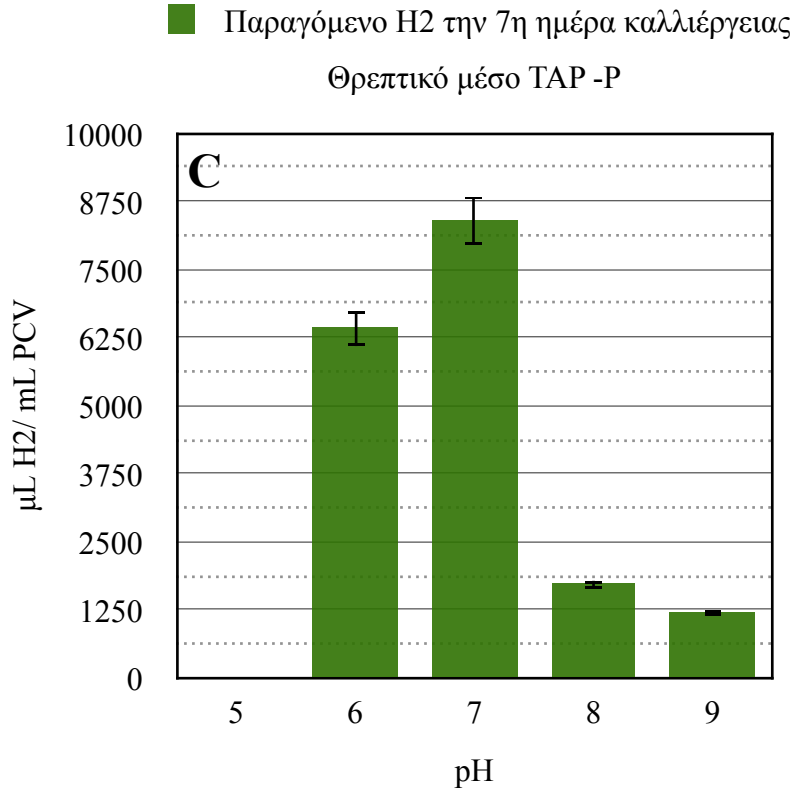


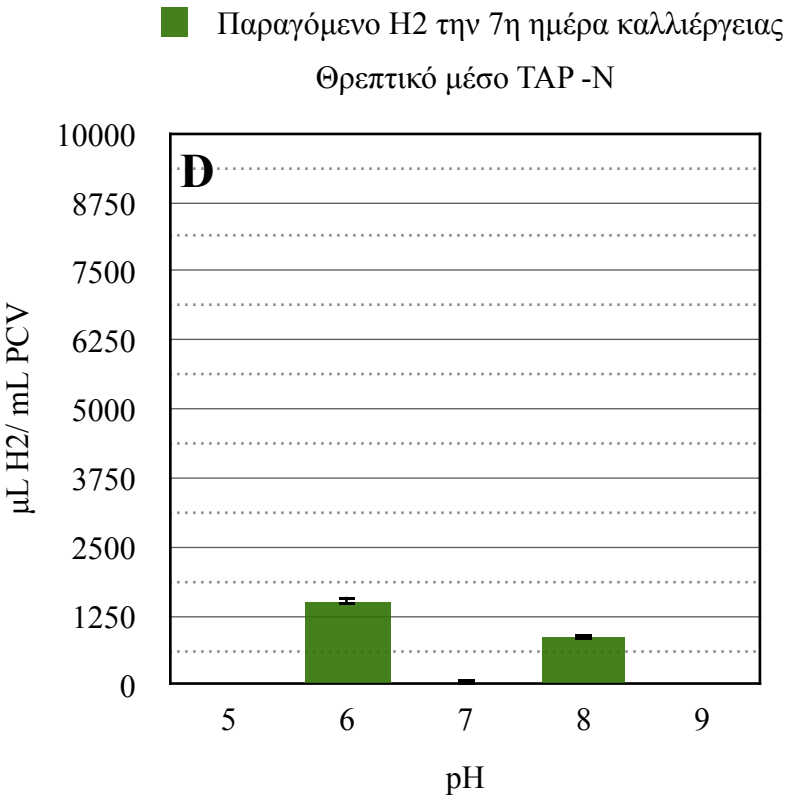
Εικόνα 27: απεικόνιση μL παραγόμενου υδρογόνου ανά 50 mL υγρής καλλιέργειας σε διαφορετικά pH σε θρεπτικό μέσο (A): TAP, (B): TAP - S , (C): TAP - P , (D): TAP - N, (E): TAP - K.

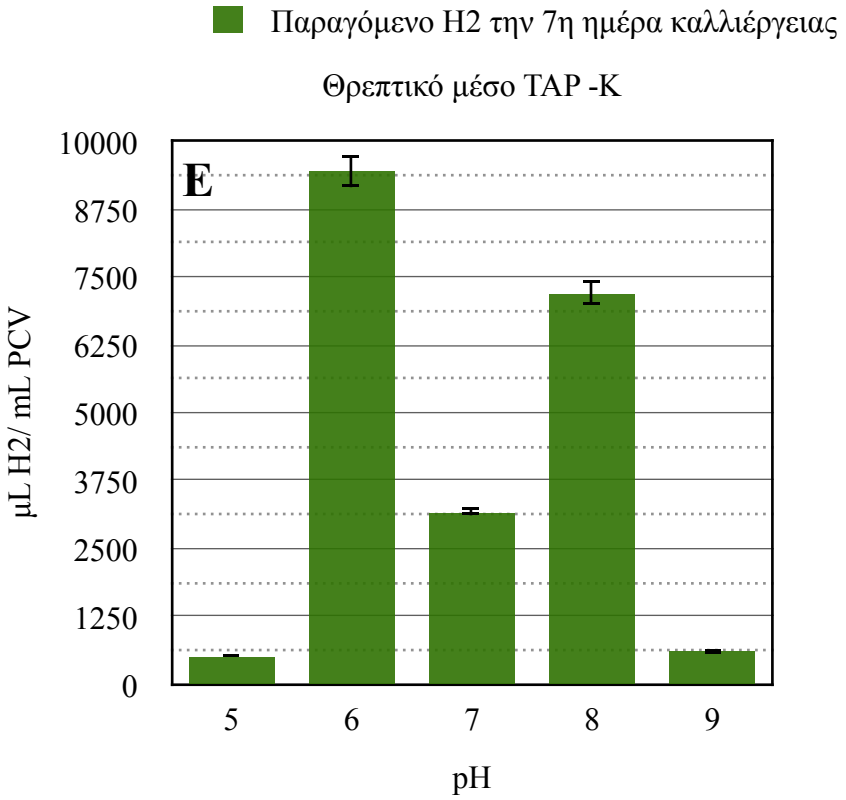
Η απεικόνιση των αποτελεσμάτων, φανερώνει πως **ανά καλλιέργεια** η μεγαλύτερη ποσότητα υδρογόνου παράγεται στην συνθήκη **TAP pH= 7** ενώ μεγάλες ποσότητες **ανά καλλιέργεια** παράγονται επίσης και στην συνθήκη **TAP - P pH= 7** και στην συνθήκη **TAP - K pH= 6**. Η έκφραση των αποτελεσμάτων ανά καλλιέργεια μπορεί να βρει εφαρμογή στην βιομηχανία προς παραγωγή υδρογόνου σε μεγάλη κλίμακα. Στην Εικόνα 28, απεικονίζεται ο όγκος υδρογόνου που παράγεται σε μL, ανά mL καθιζάμενων κυττάρων.


Παραγόμενο H2 την 7η ημέρα καλλιέργειας
Θρεπτικό μέσο TAP
A
μL H2/ mL PCV
10000
8750
7500
6250
5000
3750
2500
1250
0
5
6
7
8
9
pH


Παραγόμενο H2 την 7η ημέρα καλλιέργειας
Θρεπτικό μέσο TAP -S
B
μL H2/ mL PCV
10000
8750
7500
6250
5000
3750
2500
1250
0
5
6
7
8
9
pH


Παραγόμενο H2 την 7η ημέρα καλλιέργειας
Θρεπτικό μέσο TAP -P
C
μL H2/ mL PCV
10000
8750
7500
6250
5000
3750
2500
1250
0
5
6
7
8
9
pH


Παραγόμενο H2 την 7η ημέρα καλλιέργειας
Θρεπτικό μέσο TAP -N
D
μL H2/ mL PCV
10000
8750
7500
6250
5000
3750
2500
1250
0
5
6
7
8
9
pH



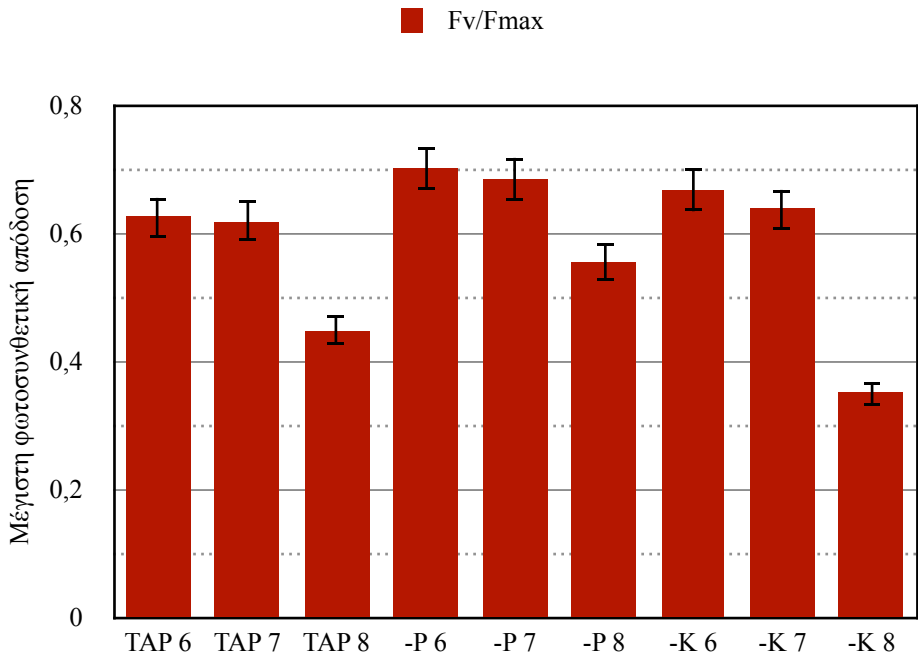
Εικόνα 28: απεικόνιση μL παραγόμενου υδρογόνου ανά mL καθιζάμενων κυττάρων, σε διαφορετικά pH σε θρεπτικό μέσο (A): TAP, (B): TAP - S , (C): TAP - P , (D): TAP - N, (E): TAP - K.

Από την αναγωγή των αποτελεσμάτων, ανά mL καθιζάμενων κυττάρων, διαπιστώνουμε πως κύτταρα τα οποία αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο TAP - P και TAP - K, έχουν την ικανότητα να παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες υδρογόνου σε σχέση με την συνθήκη μάρτυρα (TAP). Πιο συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη ποσότητα υδρογόνου παράγεται σε pH= 6 όταν τα κύτταρα καλλιεργηθούν σε θρεπτικό μέσο TAP - K. Ακολουθεί η συνθήκη TAP - P σε pH= 7. Έτσι, με γνώμονα αυτές τις δύο στερήσεις (P, K) πραγματοποιείται εκτενέστερη μελέτη στην ενότητα που ακολουθεί.

3.6 Διερεύνηση παραγωγής υδρογόνου από *Chlorella sp.*, από καλλιέργειες με στερήσεις K, και P από το θρεπτικό μέσο, σε διαφορετικά pH

Στόχος αυτής της πειραματικής σειράς, είναι η εκτενέστερη μελέτη στην παραγωγή υδρογόνου από κύτταρα *Chlorella sp*, όταν αυτά αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο TAP - K και TAP - P. Αυτή η πειραματική σειρά αποτελεί επαναληπτικό πείραμα του παραπάνω πειράματος. Στην παραπάνω ενότητα μελετήθηκαν όλες οι συνθήκες στις οποίες θα μπορούσε να υπάρξει κυτταρική ανάπτυξη. Παρόλα αυτά, οι συνθήκες που παρουσιάζουν ενδιαφέρον στην παραγωγή υδρογόνου εντοπίζονται στις τιμές pH 6, 7 και 8. Την έβδομη ημέρα ανάπτυξης, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού, μέτρηση όγκου καθιζάμενων κυττάρων και μετρήσεις παραγόμενου υδρογόνου. Η

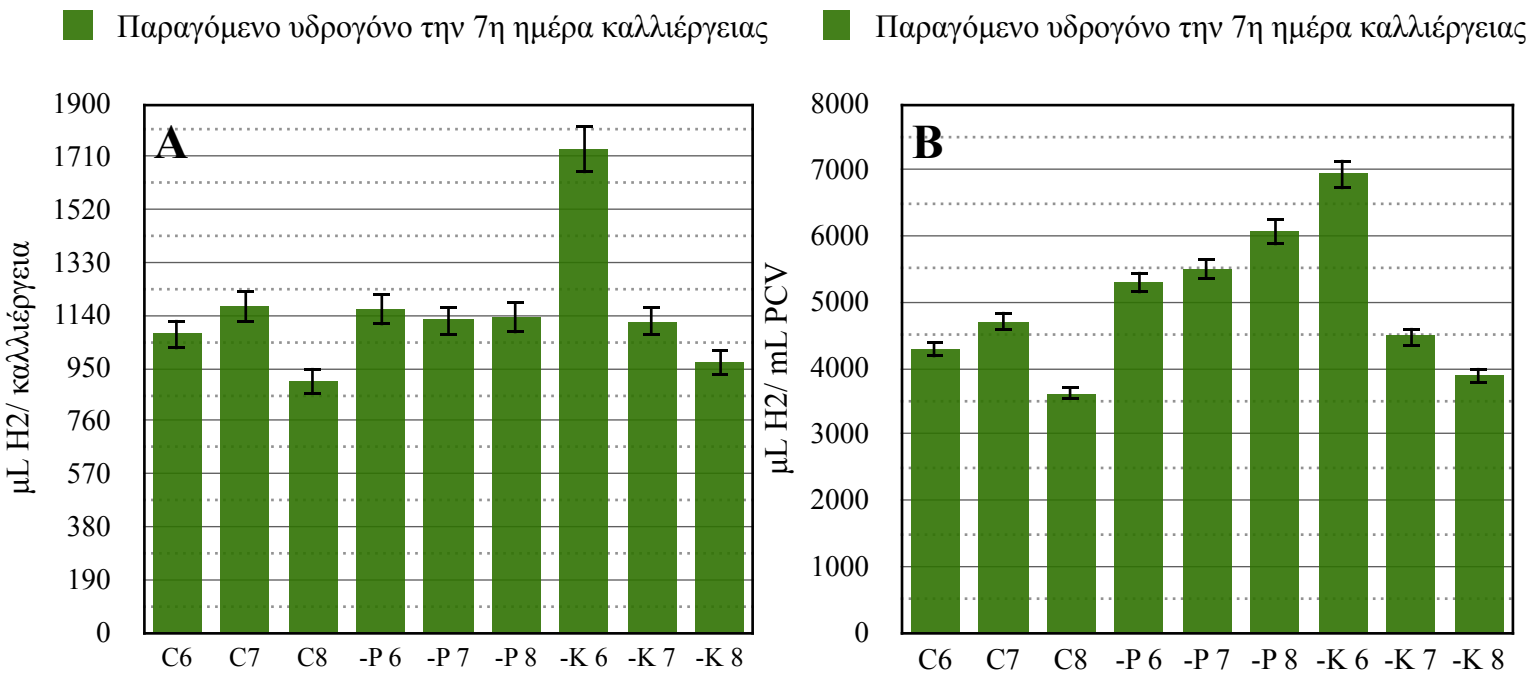
Εικόνα 29, παρουσιάζει την μέγιστη φωτοσυνθετική ικανότητα (μετρώντας τον λόγο Fv/Fmax), στις διαφορετικές καλλιέργειες.



Εικόνα 29: τιμές λόγου Fv/Fmax, που εκφράζει την μέγιστη φωτοσυνθετική ικανότητα (αφορά το PSII).

Είναι φανερό, πως στις συνθήκες (TAP - P, TAP - K και TAP) που η παραγωγή υδρογόνου είναι αυξημένη, το PSII δεν παρουσιάζει μειωμένη ικανότητα. Τιμές του λόγου στην περιοχή του 0,6 υποδηλώνουν ένα υγιές φωτοσύστημα. Σε αλκαλικές τιμές (pH= 8), τα κύτταρα βρίσκονται υπό συνθήκες βιολογικής καταπόνησης επομένως η τιμή του λόγου είναι μειωμένη.

Μετρήσεις υδρογόνου που πραγματοποιήθηκαν, έδειξαν πως και σε αυτήν την περίπτωση η βέλτιστη συνθήκη για την παραγωγή μεγαλύτερων ποσοτήτων υδρογόνου είναι εκείνη της καλλιέργειας κυττάρων σε θρεπτικό μέσο με στέρηση καλίου (K) σε pH= 6. Ωστόσο, στην περίπτωση που ο φώσφορος απουσιάζει από το θρεπτικό μέσο, παράγονται μεγαλύτερες ποσότητες υδρογόνου (σε επίπεδο κυττάρου) στην τιμή pH= 8. Αυτό το γεγονός, έρχεται σε αντίθεση με την προηγούμενη πειραματική σειρά, που έδειξε πως η συνθήκη TAP -P, έχει την μέγιστη παραγωγή στην τιμή pH= 7. Στην Εικόνα 30, φαίνονται οι τιμές υδρογόνου που παράγονται.



Εικόνα 30: (A): απεικόνιση μL παραγόμενου υδρογόνου ανά 50 mL υγρής καλλιέργειας σε διαφορετικά pH σε θρεπτικό μέσο TAP (Control -C), TAP - P και TAP - K. (B): απεικόνιση μL παραγόμενου υδρογόνου ανά mL καθιζάμενων κυττάρων σε διαφορετικά pH σε θρεπτικό μέσο TAP (Control - C), TAP - P και TAP - K.

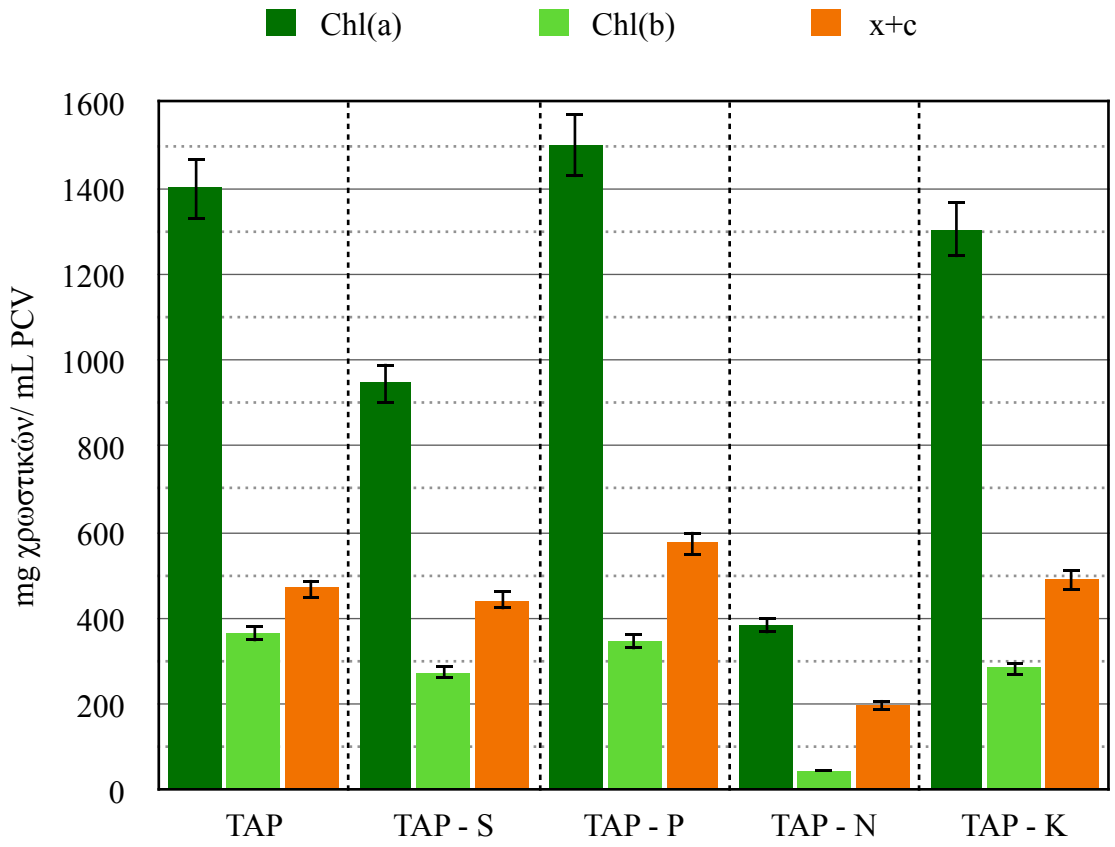
Συμπερασματικά, η μεγαλύτερη παραγωγή υδρογόνου σε επίπεδο καλλιέργειας και σε επίπεδο κυττάρου, επιτυγχάνεται όταν το μέσο διαθέτει pH= 6, σε συνθήκες έλλειψης καλίου (K).

3.7 Αποτελέσματα πάνω στην μελέτη του βιοχημικού περιεχομένου κυττάρων *Chlorella sp*, όταν αυτά αναπτύσσονται σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα

Σε αυτό το τμήμα της εργασίας, παρατίθενται τα αποτελέσματα που αφορούν την μελέτη του βιοχημικού περιεχομένου των κυττάρων του μικροφύκους όταν αυτό αναπτύσσεται σε θρεπτικά μέσα με έλλειψη θείου, καλίου, αζώτου και φωσφόρου. Το περιεχόμενο σε λιπίδια, υδατάνθρακες και χρωστικές συγκρίνεται με το περιεχόμενο των κυττάρων που αναπτύχθηκαν στην συνθήκη μάρτυρα (θρεπτικό μέσο TAP). Η μελέτη αυτή, αποσκοπεί στην κατανόηση της μεταβολής του κυτταρικού περιεχομένου όταν τα κύτταρα στερούνται κάποιο μακροθρεπτικό στοιχείο.

Στην Εικόνα 31, απεικονίζεται το περιεχόμενο των κυττάρων σε φωτοσυνθετικές χρωστικές, χλωροφύλλη a,b, και καροτενοειδή. Στην περίπτωση του θείου και του αζώτου, όπως έχει αναφερθεί, η ποσότητα σε φωτοσυνθετικές χρωστικές είναι μειωμένη. Όσον αφορά στην έλλειψη θείου, αυτό οφείλεται στην μειωμένη παραγωγή της πρωτεΐνης D1 του PSII, και ως αποτέλεσμα την μειωμένη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Μειωμένη λειτουργία συνεπάγεται και ελάττωση συγκέντρωσης των χρωστικών στην φωτοσυνθετική κεραία. Στην περίπτωση της

έλλειψης αζώτου -καίριο στοιχείο για τον δακτύλιο της πορφυρίνης- η σύνθεση της χλωροφύλλης είναι μειωμένη και το μικροφύκος παρουσιάζει αδυναμία στην ανάπτυξη, εξαιτίας της χαμηλής φωτοσυνθετικής δραστηριότητας. Τέλος, είναι εμφανές, πως η ανάπτυξη σε θρεπτικό που στερείται τον φώσφορο ή το κάλιο, δεν εμφανίζει σημαντικές διαφορές στο περιεχόμενο των χρωστικών ανά mL καθιζάμενων κυττάρων. Το περιεχόμενο των χρωστικών σε συνδυασμό με την λειτουργικότητα του PSII, όπου προκύπτει από την Εικ. 29, υποδηλώνει, πως δεν επηρεάζεται η φωτοσυνθετική δραστηριότητα κάτω από συνθήκες στέρησης K ή P.



Εικόνα 31: Συγκεντρώσεις φωτοσυνθετικών χρωστικών (mg χρωστικών/ mL PCV) στα κύτταρα *Chlorella sp*, όταν η ανάπτυξη πραγματοποιείται σε θρεπτικό μέσο TAP, TAP - S, TAP - P, TAP - N και TAP - K σε pH= 7.

Μετά την μελέτη του περιεχομένου σε χρωστικές, ακολουθεί ο προσδιορισμός των κυττάρων σε λιπίδια και υδατάνθρακες (σάκχαρα). Ο παρακάτω πίνακας (Πίνακας 18) συνοψίζει τις τιμές που προέκυψαν από την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 18: βιοχημικό περιεχόμενο κυττάρων *Chlorella sp.*

Θρεπτικό Μέσο	TAP (Control)	TAP - S	TAP - P	TAP - N	TAP - K
Σάκχαρα	11,25% (±1,10%)	19,29% (±1,22%)	11,16% (±2,23%)	20,65% (±2,70%)	9,44% (±1,15%)
Λιπίδια	17,97% (±5,14%)	30,76% (±6,47%)	23,39% (±5,40%)	30,09% (±8,74%)	17,20% (±4,94%)

Από τα παραπάνω δεδομένα είναι ευδιάκριτο πως, το περιεχόμενο σε υδατάνθρακες και λιπίδια στις καλλιέργειες TAP - P και TAP - K δεν διαφέρει σημαντικά σε σύγκριση με την συνθήκη του μάρτυρα (TAP). Όσον αφορά το περιεχόμενο σε υδατάνθρακες, τα κύτταρα που έχουν καλλιεργηθεί σε συνθήκες στέρησης αζώτου και θείου παρουσιάζουν αυξημένα ποσοστά. Στην περίπτωση στέρησης του θείου, αυτό συμβαίνει διότι η απουσία αυτού παρεμποδίζει την λειτουργία του PSII και οδηγεί στην συσσώρευση αμύλου, το οποίο καταβολίζεται για την παραγωγή ενέργειας [37]. Η αύξηση αμύλου φανερώνεται με τις αυξημένες τιμές υδατανθράκων στο κύτταρο. Ανάλογη συμπεριφορά υιοθετούν τα κύτταρα που αναπτύσσονται απουσία αζώτου. Εξαιτίας της στέρησης αζώτου το περιεχόμενο σε χρωστικές μειώνεται πράγμα που υποβαθμίζει τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό και το κύτταρο στρέφεται στην συσσώρευση υδατανθράκων τους οποίους τους καταβολίζει για να εξασφαλίσει την απαραίτητη ενέργεια [50].

Παρόμοια αύξηση εμφανίζεται και στο περιεχόμενο των λιπιδίων όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται υπό συνθήκες στέρησης αζώτου και θείου. Η αύξηση των λιπιδίων έχει ως στόχο την εξασφάλιση της απαραίτητης ενέργειας, μέσω του καταβολισμού τους, για την επιβίωση των κυττάρων σε στερήσεις N και S. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί πως το βιοχημικό περιεχόμενο των κυττάρων σε πρωτεΐνες σε συνθήκες στέρησης S και N είναι μειωμένο καθώς αυτά είναι στοιχεία απαραίτητα για την βιοσύνθεση νέων πρωτεϊνών. Τα φωτοσυστήματα ως πρωτεϊνικά σύμπλοκα σε αυτές τις συνθήκες στέρησης δεν είναι ικανά να λειτουργήσουν ή να δημιουργηθούν νέα με αποτέλεσμα η ενέργεια στο κύτταρο να μην εξασφαλίζεται μέσω της φωτοσύνθεσης αλλά με καταβολισμό υδατανθράκων και λιπιδίων. Έτσι, με την ταυτόχρονη αύξηση του περιεχομένου σε λιπίδια και υδατάνθρακες στις καλλιέργειες TAP- S και TAP - N, παρατηρείται μειωμένο ποσοστό πρωτεινών (ανακατανομή του άνθρακα σε λιπίδια και υδατάνθρακες) [50].

3.8 Συμπεράσματα

Τα παραπάνω αποτελέσματα φανερώνουν πως τα κύτταρα του συγκεκριμένου στελέχους του μικροφύκους, παρουσιάζουν αυξημένη ανάπτυξη και παραγωγή υδρογόνου όταν αυτά αναπτύσσονται υπό ανάδευση της κυτταροκαλλιέργειας. Σε αυτό, έρχεται να προστεθεί το γεγονός πως το θρεπτικό μέσο στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα, κατέχει τον σημαντικότερο ρόλο στην ανάπτυξη και στην παραγωγή υδρογόνου. Όπως διαπιστώθηκε από τα αποτελέσματα, σε θρεπτικό μέσο TAP - S και TAP - N, η κυτταρική ανάπτυξη είναι μειωμένη, εξαιτίας χαμηλών συγκεντρώσεων φωτοσυνθετικών χρωστικών, συνοδευόμενη από μικρότερη παραγωγή υδρογόνου. Συμπληρωματικά, το pH του μέσου, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη. Σε ακραίες τιμές (5 και 9), τα κύτταρα αδυνατούν να αναπτυχθούν ενώ η παραγωγή υδρογόνου δείχνει να είναι χαμηλή. Μεγαλύτερα ποσά υδρογόνου παράγονται όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο TAP - K και TAP - P, στα οποία το φωτοσύστημα II είναι λειτουργικό. Η παραγωγή υδρογόνου, ακόμη, μπορεί να ρυθμιστεί όταν τα κύτταρα καλλιεργηθούν σε θρεπτικό μέσο με διαφορετικές πηγές άνθρακα. Εκείνη, μεγιστοποιείται, όταν τα κύτταρα αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο Tris- phosphate με πηγή άνθρακα την γλυκόζη.

Η γλυκόζη, καταβολίζεται από τα μικροφύκος προς παραγωγή ενέργειας και ηλεκτρονίων τα οποία διοχετεύονται στην υδρογονάση, με τελικό αποδέκτη, πρωτόνια και παραγωγή υδρογόνου. Η ενέργεια του μικροφύκους εξασφαλίζεται σε αυτήν την περίπτωση από την κατανάλωση του οργανικού υποστρώματος και δεν βασίζεται στην φωτοσυνθετική δραστηριότητα η οποία απουσιάζει. Περαιτέρω, διερεύνηση των συνθηκών για την παραγωγή υδρογόνου φανερώνει πως οι βέλτιστες συνθήκες αφορούν φωτεινότητα μέτριας έντασης (50 - 80 μmol φωτονίων $\bullet m^{-2} \bullet s^{-1}$) και θερμοκρασία 20°C.

Τέλος, οι μετρήσεις στο βιοχημικό περιεχόμενο των κυττάρων φανερώνουν πως όταν τα κύτταρα καλλιεργηθούν σε θρεπτικό μέσο που απουσιάζουν ενώσεις του θείου και του αζώτου, τότε το περιεχόμενο σε λιπίδια και υδατάνθρακες είναι ιδιαίτερα αυξημένο ενώ το περιεχόμενο σε πρωτεΐνες χαμηλό. Αντίθετα, η καλλιέργεια του μικροφύκους σε θρεπτικά μέσα που στερούνται ενώσεις καλίου ή φωσφόρου, δεν έδειξαν έντονη μεταβολή στο βιοχημικό τους περιεχόμενο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Βασικός στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας, είναι η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για την ανάπτυξη με ταυτόχρονη παραγωγή υδρογόνου από το απομονωμένο στέλεχος *Chlorella sp*. Το συγκεκριμένο στέλεχος, έχει απομονωθεί από την ομάδα του εργαστηρίου από τον ευτροφικό ποταμό Γιόφυρο στην Κρήτη, και έχουν γίνει εκτενείς μελέτες στην βιοαποκατάσταση λυμάτων από τυροκομεία. Το συγκεκριμένο στέλεχος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμη και στην παραγωγή βιο-υδρογόνου, εξαιτίας του ενζύμου, της υδρογονάσης, που διαθέτει. Εκμεταλλευόμενοι, αυτήν την ικανότητα του μικροφύκους, πραγματοποιήθηκαν σειρές πειραμάτων για την εύρεση της βέλτιστης συνθήκης παραγωγής υδρογόνου. Καλλιέργεια του στελέχους σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα, με διαφορετικές πηγές άνθρακα, εντάσεις φωτισμού και θερμοκρασία οδήγησαν στην καταλληλότερη συνθήκη παραγωγής υδρογόνου.

Επομένως, το μικροφύκος, μπορεί να καλλιεργηθεί σε μεγάλη κλίμακα, σε βιομηχανικό επίπεδο, με στόχο την παραγωγή υδρογόνου και την χρήση του στην θέρμανση - στην μετακίνηση, ως ανανεώσιμη πηγή ενέργειας που δεν θα επιβαρύνει το περιβάλλον και την ατμοσφαιρική ρύπανση. Τέλος, εκτός από την παραγωγή του υδρογόνου, η παραγόμενη βιομάζα του μικροφύκους μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπληρώματα διατροφής, με στόχο την ενίσχυση του ανοσοποιητικού, να ενσωματωθεί στο ανθρώπινο διαιτολόγιο και να χρησιμοποιηθεί ακόμη και στις ζωοτροφές.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lambers, Hans and Bassham, James Alan. "*photosynthesis*". Encyclopedia Britannica, 4 Dec. 2022, https://www.britannica.com/science/photosynthesis. Accessed 5 February 2023

2. Daisy Dobrijevic. "*What is photosynthesis*?". Live Science, November 3, 2022, https://www.livescience.com/51720-photosynthesis.html. Accessed 5 February 2023

3. "*Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*", Biology Libre Texts. 25 December 2022 (Last update). https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_(Boundless)/08:_Microbial_Evolution_Phylogeny_and_Diversity/8.09:_Nonproteobacteria_Gram-Negative_Bacteria/8.9B:_Anoxygenic_Photosynthetic_Bacteria. Accessed 5 February 2023

4. "*Photosynthesis*" OER services. https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_(Boundless)/08:_Microbial_Evolution_Phylogeny_and_Diversity/8.09:_Nonproteobacteria_Gram-Negative_Bacteria/8.9B:_Anoxygenic_Photosynthetic_Bacteria . Accessed 5 February 2023

5. Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "*chloroplast*". Encyclopedia Britannica, 18 Oct. 2022, https://www.britannica.com/science/chloroplast. Accessed 5 February 2023.

6. "*The light depended reactions*". Khan Academy. https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/cellular-energetics/photosynthesis/a/light-dependent-reactions Accessed 5 February 2023.

7. Nel Anton, "*The influence of different winemaking techniques on the extraction of grape tannins*" ResearchGate, 2011 https://www.researchgate.net/figure/Diagram-of-photosynthesis-in-the-chloroplast-of-a-leaf_fig1_50369895

8. Klimov, Vyachelsalv, "*Discovery of pheophytin function in the photosynthetic energy conversion as the primary electron acceptor of photosystem II*". ResearchGate, 2005, 20 p:275-281.

9. Νάζος Θ. "*Μελέτη της αποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων από μικροοργανισμούς*", Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, Ηράκλειο Κρήτης, 2018.

10. "*The Pathway of electrons*" Encyclopedia Brittanica, https://www.britannica.com/science/photosynthesis/The-pathway-of-electrons. Accessed 5 February 2023

11. "*The light- depended Reactions of photosynthesis*" Biology Libre Texts 9, April 2022 (Last update). https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_and_General_Biology/General_Biology_1e_(OpenStax)/2:_The_Cell/08:_Photosynthesis/8.2:_The_Light-Dependent_Reactions_of_Photosynthesis Accessed 6 February 2023

12. "*Photosynthetic Pigments*" Plant & soil eLibrary. https://passel2.unl.edu/view/lesson/920a6340a995/2. Accessed 6 February 2023
13. "*Photosynthetic Pigments*" Berkley University of California (1997), https://ucmp.berkeley.edu/glossary/gloss3/pigments.html Accessed 6 February 2023

14. Paul May, "*Chlorophyll*". http://www.chm.bris.ac.uk/motm/chlorophyll/chlorophyll_h.htm Accessed 6 February 2023

15. Hashimoto, H., Uragami, C., Cogdell, R.J. (2016). *Carotenoids and Photosynthesis*. In: Stange C. (Eds) Carotenoids in Nature. Subcellular Biochemistry, vol 79. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_4

16. "*Fluorescence*" Chemistry Libre Texts, January 30, 2023 (Last update) https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Radiative_Decay/Fluorescence. Accessed 6 February 2023

17. Journal of Experimental Botany, Volume 64, Issue 13, October 2013, p3983-3998 https://doi.org/10.1093/jxb/ert208

18. Kalaji Hazem, Guo Peiguo "*Chlorophyll fluorescence*"ResearchGate, 2008 p: 439-463

19. Anni Lehmuskero, Matilde Skogen Chauton, Tobias Boström, "*Light and photosynthetic microalgae: A review of cellular- and molecular-scale optical processes*" Progress in Oceanography, Volume 168, 2018, p: 43-56 https://doi.org/10.1016/j.pocean.2018.09.002

20. Στρατηγάκης, Ν. Χ., *Χαρακτηρισμός ενός στελέχους Chlorella που απομονώθηκε από ποταμό στην Κρήτη και πιθανές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και διαχείριση αποβλήτων.*, Τμήμα Χημείας. 2020, Πανεπιστήμιο Κρήτης: Ηράκλειο, Κρήτης.

21. Nazos, T.T., et al., *Characterization of a novel herbicide and antibiotic-resistant Chlorella sp. with an extensive extracellular matrix.* Photosynth Res, 2020. 143(3): p. 315-334.

22. Κοκαράκης, Ε., Απομόνωση και χαραχτηρισμός φυσικών προϊόντων απόφωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς. 2018, Μεταπτυχιακή Διατριβή. ΠανεπιστήμιοΚρήτης, Τμήμα Χημείας: Ηράκλειο

23. "*What is Chlorella?"* Chlorella Industry. https://www.chlorella.co.jp/en/about/chlorella/ Accessed 15 February 2023.

24. Bito T, Okumura E, Fujishima M, Watanabe F. *Potential of Chlorella as a Dietary Supplement to Promote Human Health. Nutrients.* 2020 Aug 20;12(9):2524. doi: 10.3390/nu12092524. PMID: 32825362; PMCID: PMC7551956.

25. Liu, J., Chen, F. (2014). Biology and Industrial Applications of *Chlorella*: Advances and Prospects. In: Posten, C., Feng Chen, S. (eds) Microalgae Biotechnology. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, vol 153. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/10_2014_286

26. Josef Maroušek, Otakar Strunecký, Vojtěch Bartoš, Marek Vochozka, Revisiting competitiveness of hydrogen and algae biodiesel, Fuel, Volume 328, (2022), https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.125317

27. Sunjin Kim, Jeong-eun Park, Yong-Beom Cho, Sun-Jin Hwang, *Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of Chlorella sorokiniana in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions,* Bioresource Technology, Volume 144, (2013), p: 8-13, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.068

28. Dvořáková-Hladká, J. Utilization of organic substrates during mixotrophic and heterotrophic cultivation of algae. *Biol Plant* **8**, 354–361 (1966). https://doi.org/10.1007/BF02930672

29. Eunyoung Lee, Mehregan Jalalizadeh, Qiong Zhang, *Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review,* Algal Research, Volume 12, (2015), p: 497-512, https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.004

30. Laokua, N., Rittiyan, N., Kornrawudaphikasama, Y. *et al.* Optimal conditions for maximized H2 yield from a new green algal strain *Chlorella* sp. KLSc61. *J Appl Phycol* **34**, 1909–1919 (2022). https://doi.org/10.1007/s10811-022-02779-y

31. Selin, Noelle Eckley and Lehman, Clarence. "biofuel". Encyclopedia Britannica, 1 Mar. 2023, https://www.britannica.com/technology/biofuel. Accessed 10 March 2023.

32. Singla, M.K., Nijhawan, P. & Oberoi, A.S. Hydrogen fuel and fuel cell technology for cleaner future: a review. *Environ Sci Pollut Res* **28**, 15607–15626 (2021). https://doi.org/10.1007/s11356-020-12231-8

33. Iain Staffell *et al*. "*The role of hydrogen and fuel cells in the global energy system"* Energy Environ. Sci., 2019, 12, p: 463- 491

34. Ela Eroglu, Anastasios Melis, *Photobiological hydrogen production: Recent advances and state of the art,* Bioresource Technology, Volume 102, Issue 18, (2011) ,p:8403-8413, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.026

35. King Samuel *et al.* "*Synthetic biology for improved hydrogen production in Chlamydomonas Reinhardtii"* Microbial Biotechnology (2022) Volume 15 https://doi.org/10.1111/1751-7915.14024

36. Melis A, Zhang L, Forestier M, Ghirardi ML, Seibert M. *Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga Chlamydomonas reinhardtii.* Plant Physiol. 2000 Jan;122(1):127-36. doi: 10.1104/pp.122.1.127. PMID: 10631256; PMCID: PMC58851.

37. Melis, A. Photosynthetic H2 metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* (unicellular green algae). *Planta* **226**, 1075–1086 (2007). https://doi.org/10.1007/s00425-007-0609-9

38. Hemschemeier, A., Melis, A. & Happe, T. Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae. *Photosynth Res* **102**, 523–540 (2009). https://doi.org/10.1007/s11120-009-9415-5

39. Andreas Carstensen, Andrei Herdean, Sidsel Birkelund Schmidt, Anurag Sharma, Cornelia Spetea, Mathias Pribil, Søren Husted, The Impacts of Phosphorus Deficiency on the Photosynthetic Electron Transport Chain, *Plant Physiology*, Volume 177, Issue 1, May 2018, Pages 271–284, https://doi.org/10.1104/pp.17.01624

40. Xiaohuan Mu, Yanling Chen, "*The physiological response of photosynthesis to nitrogen deficiency*", Plant Physiology and Biochemistry, Volume 158,(2021), p:76-82, https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.11.019

41. Qi DU, Xin-hua ZHAO *et al.*, *Effects of potassium deficiency on photosynthesis, chloroplast ultrastructure, ROS, and antioxidant activities in maize (Zea mays L.)*, Journal of Integrative Agriculture, Volume 18, Issue 2, (2019) p: 395-406, https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)61953-7

42. Luecke, J. Fast, reproducible and reliable determination of biomass in suspension cell cultures with VoluPAC tubes. *Nat Methods* **3**, 868 (2006). https://doi.org/10.1038/nmeth942

43. Wellburn, A.R., *The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution*. Journal of Plant Physiology 1994. 144(3): p. 307-313.

44. Strasser, B. and R. Strasser, *Measuring Fast Fluorescence Transients to Address Environmental Questions: The JIP-Test.* Photosyn Thesis: From Light to Biosphere, 1995: p. 977-980.

45. Μίχογλου - Σεργίου Α. *Μελέτη της παραγωγής βίο- υδρογόνου (H2) από το μικροφύκος Chlamydomonas reinhardtii,* Τμήμα Χημείας. 2014, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο Κρήτης

46. Groger, W.K., *Determination of sugars in biological media with thymol in sulphuric acid.* Clin Chim Acta, 1961. 6: p. 866-73.

47. Schulze, C., M. Wetzel, J. Reinhardt, M. Schmidt, et al., *Screening of microalgae for primary metabolites including β-glucans and the influence of nitrate starvation and irradiance on β-glucan production*. J Appl Phycol, 2016. 28(5): p. 2719-2725.

48. Knight, J.A., S. Anderson, and J.M. Rawle, *Chemical basis of the sulfo-phospho- vanillin reaction for estimating total serum lipids*. Clin Chem, 1972. 18(3): p. 199- 202.

49. Yueqin Cao, Shuling Yang, Juhua Wang, Weibao Kong, Baomin Guo, Yuqin Xi, Aimei Zhang, Bin Yue, *Metabolomic exploration of the physiological regulatory mechanism of the growth and metabolism characteristics of Chlorella vulgaris under photoautotrophic, mixotrophic, and heterotrophic cultivation conditions*, Biomass and Bioenergy, Volume 173, 2023, https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2023.106775.

50. Yong, WK., Lim, PE., Vello, V. *et al.* Metabolic and physiological regulation of *Chlorella* sp. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) under nitrogen deprivation. *J. Ocean. Limnol.* **37**, 186–198 (2019). https://doi.org/10.1007/s00343-019-7263-5

URL

I. https://www.medisca.com/Pages/ProductDetails.aspx?StockCode=9391&C=DEV&C4=164