



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ



ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ & ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ &
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Διδακτορική διατριβή

Μελέτη της Παραγωγής H_2 από Κυανοβακτήρια

Παναγιώτης Ηλίας Μπρούσος

Επιστημονικός Υπεύθυνος:

Κώστας Σταματάκης, Διευθυντής Ερευνών, ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος"

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Κώστας Σταματάκης, Διευθυντής Ερευνών, ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος"

Γεώργιος Καραμπουρνιώτης, Ομότιμος Καθηγητής ΓΠΑ

Γεώργιος Λιακόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ



ΑΘΗΝΑ 2024

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ & ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ &
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Διδακτορική διατριβή

Μελέτη της Παραγωγής H_2 από Κυανοβακτήρια

Study on the H_2 Production by Cyanobacteria

Παναγιώτης Ηλίας Μπούσος

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Κώστας Σταματάκης, Διευθυντής Ερευνών, ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος" (Επιβλέπων)

Γεώργιος Καραμπουρνιώτης, Ομότιμος Καθηγητής ΓΠΑ

Γεώργιος Λιακόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Δημήτριος Γεωργακόπουλος, Καθηγητής ΓΠΑ

Σταμάτιος Ρήγας, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Μαρία Δήμου, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Στυλιανή Χωριανοπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Μελέτη της Παραγωγής H₂ από Κυανοβακτήρια

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής / Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Εργαστήριο Βιοφυσικής & Βιοτεχνολογίας Μεμβρανών / Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών /
ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος"

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το υδρογόνο (H) είναι το πιο κοινό χημικό στοιχείο στο σύμπαν, ωστόσο στην αέρια κατάσταση (H₂) υπάρχει σε ελάχιστες ποσότητες στη γήινη ατμόσφαιρα. Το H₂ αποτελεί ένα άχρωμο, άοσμο και μη τοξικό καύσιμο, η καθαρή καύση του οποίου παράγει μόνο νερό (H₂O). Ήδη από τα τέλη του 20ού αιώνα, η μετάβαση σε μία οικονομία βασισμένη στο υδρογόνο προτείνεται ως λύση απέναντι στις περιβαλλοντικές και ενεργειακές προκλήσεις που αντιμετωπίζει η ανθρωπότητα. Η αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας για τη βιολογική παραγωγή H₂ αποτελεί μια ιδιαίτερα υποσχόμενη οδό σε αυτή την κατεύθυνση.

Τα κυανοβακτήρια είναι οι πρώτοι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί που υιοθέτησαν την οξυγονική φωτοσύνθεση, γνωστοί για την ανθεκτικότητά τους σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες και ευρέως χρησιμοποιούμενοι σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές, ακόμη και ως «κύτταρα-εργοστάσια» για την παραγωγή H₂. Ένα μονοκύτταρο κυανοβακτήριο του γλυκού νερού, το *Synechococcus elongatus* PCC7942 (στέλεχος PAMCOD), έχει αποδειχθεί ικανό να παράγει H₂ μέσω μιας διαδικασίας δύο σταδίων. Σε πρώτο στάδιο, το PAMCOD συσσωρεύει ως φωτοσυνθετικό προϊόν σακχαρόζη υπό καταπόνηση αλατότητας, και σε δεύτερο στάδιο, μέσω της αναερόβιας ζύμωσης της σακχαρόζης παράγει H₂ στο σκοτάδι (Vayenos et al., 2020). Στο στέλεχος αυτό η σακχαρόζη αποτελεί τον κύριο συμβατό ωσμωλύτη σε καταπόνηση αλατότητας. Κατά τη σκοτεινή αναερόβια ζύμωση, η συσσωρευμένη σακχαρόζη υδρολύεται από την ενδογενή ιμπερτάση και χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή H₂ σε μια αμφίδρομη αντίδραση που καταλύει η [NiFe]-υδρογενάση. Ο χρονικός διαχωρισμός της παραγωγής σακχαρόζης με απελευθέρωση O₂ στο φως και της παραγωγής H₂ στο σκοτάδι, διασφαλίζει τις ανοξικές συνθήκες που απαιτούνται για την δραστηριότητα της υδρογενάσης.

Για τη βελτίωση της παραγωγής H₂ μέσω της διαδικασίας που προαναφέρθηκε, αρχικά προκαλέσαμε την αύξηση της συσσώρευσής της ως ωσμωλύτη στα κύτταρα PAMCOD. Ο συνδυασμός καταπόνησης υψηλής θερμοκρασίας (35°C) και αλατότητας (0.4 M NaCl) προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης (κατά 50%). Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε το βέλτιστο pH για τη δραστηριότητα των ενζύμων στη σκοτεινή ζύμωση. Η πλήρης διάσπαση της σακχαρόζης από την ιμπερτάση του PAMCOD επιτεύχθηκε σε pH 7.5, και η παραγωγή H₂ αυξήθηκε από 2 nmol H₂ ·mg Chl_a⁻¹ ·h⁻¹ (Vayenos et al., 2020) σε 23 nmol H₂ ·mg Chl_a⁻¹ ·h⁻¹.

Το *Synechocystis* sp. PCC6714, ένα άλλο μονοκύτταρο κυανοβακτήριο του γλυκού νερού, μελετήθηκε και αυτό ως προς την ικανότητά του να συσσωρεύει σακχαρόζη κατά τη φωτοσύνθεση για να ανταπεξέλθει στην αλατότητα και τις υψηλές θερμοκρασίες. Επιπλέον, είναι γνωστό πως διαθέτει τα απαραίτητα ένζυμα (μια αλκαλική/ουδέτερη ιμπερτάση και μια αμφίδρομη [NiFe]-υδρογενάση), για την παραγωγή H₂ μέσω της σκοτεινής ζύμωσης. Η βελτιωμένη μέθοδος παραγωγής H₂ από το PAMCOD, εφαρμόστηκε και στο στέλεχος *Synechocystis* sp. PCC6714, με παραπλήσια αποτελέσματα. Με τον συνδυασμό των καταπονήσεων αλατότητας (0.4 M NaCl) και υψηλής θερμοκρασίας (35°C) στο *Synechocystis* sp. PCC6714 παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση της ενδοκυτταρικής σακχαρόζης (κατά 108%). Κατά τη διάρκεια της σκοτεινής αναερόβιας ζύμωσης, η πλήρης

διάσπαση της σακχαρόζης από την ιμβερτάση του *Synechocystis* sp. PCC6714 επιτεύχθηκε σε pH 8, αποδίδοντας 22 nmol H₂ ·mg Chlα⁻¹ ·h⁻¹.

Παρότι τα κυανοβακτήρια έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες σακχαρόζης, ο βασικός αποθηκευτικός τους υδατάνθρακας είναι το γλυκογόνο. Γι' αυτό το λόγο, το ενδοκυτταρικό γλυκογόνο χρησιμοποιήθηκε μαζί με τη σακχαρόζη ως υπόστρωμα για την παραγωγή H₂ κατά τη σκοτεινή ζύμωση του PAMCOD. Η αποδόμηση του γλυκογόνου στα κύτταρα, πραγματοποιήθηκε απουσία αζώτου από το θρεπτικό μέσο της ζύμωσης. Η διάσπαση του ενδοκυτταρικού γλυκογόνου ενίσχυσε σημαντικά την παραγωγή H₂ από το PAMCOD (6.55 μmol H₂ h⁻¹·mg Chlα⁻¹), διατηρώντας παράλληλα τη δομική ακεραιότητα της φωτοσυνθετικής συσκευής. Η προσέγγιση αυτή παρουσίασε 10.000 φορές μεγαλύτερη απόδοση σε σύγκριση με τη μέθοδο των Vayenos et al. (2020), καθιστώντας το στέλεχος PAMCOD έναν από τους πιο ικανούς οργανισμούς για την παραγωγή H₂.

Η βιωσιμότητα των δύο μεθόδων που εφαρμόστηκαν και στα δύο στελέχη, επιβεβαιώθηκε με την επιτυχή αναγέννηση της κυανοβακτηριακής βιομάζας μετά τις σκοτεινές ζυμώσεις σε θρεπτικά μέσα ανάπτυξης εμπλουτισμένα με νιτρικά άλατα. Τα στελέχη PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714, μέσω της φωτοσυνθετικής δέσμευσης ατμοσφαιρικού CO₂, μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκτός των περιορισμένων πηγών γλυκού νερού ως ανανεώσιμες πηγές H₂, με ελάχιστες ανάγκες καλλιέργειας (θρεπτικά συστατικά, ένταση φωτισμού και ανανέωση).

Επιστημονική περιοχή: Βιοκαύσιμα

Λέξεις κλειδιά: Κυανοβακτήρια, Βιοϋδρογόνο, Σκοτεινή ζύμωση, *Synechococcus elongatus* PCC7942, PAMCOD, *Synechocystis* sp. PCC6714

Study on the H₂ Production by Cyanobacteria

Faculty of Crop Science / Agricultural University of Athens
Biophysics & Biotechnology of Membranes Laboratory / Institute of Biosciences & Applications /
NCSR "Demokritos"

ABSTRACT

Hydrogen (H) is the most common chemical element in the universe, yet it exists in minute quantities in the Earth's atmosphere in its gaseous state (H₂). H₂ is a colourless, odourless and non-toxic fuel, the combustion of which produces only water (H₂O). Already since the end of the 20th century, the transition to an H₂-based economy has been proposed as a solution to the environmental and energy challenges that humanity is facing. Employing solar energy for the biological production of H₂ is a highly promising pathway to this direction.

Cyanobacteria are the first photosynthetic organisms on Earth, known for their resistance to extreme environmental conditions and are widely used in biotechnological applications, even as "cell factories" for hydrogen production. A single-celled freshwater cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* PCC7942 (strain PAMCOD), has recently been shown to be capable of hydrogen production through a 2-step process. In the first stage, it accumulates sucrose by photosynthesis under salinity stress, and in the second stage, it produces hydrogen via dark fermentation of sucrose (Vayenos et al., 2020). During photosynthesis, sucrose is synthesized in PAMCOD cells as the main compatible osmolyte under salinity stress. During dark anaerobic fermentation, the accumulated sucrose is hydrolyzed by endogenous invertase and used as a carbon source for hydrogen production by endogenous bi-directional [NiFe]-hydrogenase. The temporal separation of O₂-emitting sucrose production in the light and H₂ production in the dark anaerobic fermentation, ensures the anoxic conditions required for the hydrogenase activity.

To improve hydrogen production via dark fermentation of sucrose, we first induced an increase in its accumulation as an osmolyte in PAMCOD cells. By inducing high-temperature stress (35°C) in addition to the salinity stress (0.4 M NaCl) during photosynthesis, a significantly higher accumulation of sucrose (by 50%) was observed. The optimum pH for enzyme activity in dark fermentation was then determined. Complete sucrose breakdown by PAMCOD invertase was achieved at pH 7.5 and H₂ production increased from 2 nmol H₂ · mg Chl α ⁻¹ · h⁻¹ (Vayenos et al., 2020) to 23 nmol H₂ · mg Chl α ⁻¹ · h⁻¹.

Synechocystis sp. PCC6714, another unicellular freshwater cyanobacterium, is also capable of accumulating sucrose during photosynthesis when coping with salinity and high temperatures. In addition, it possesses the necessary enzymes (an alkaline/neutral invertase and a bi-directional [NiFe]-hydrogenase) for the production of hydrogen in dark anaerobic fermentation. The improved method of hydrogen production from PAMCOD was applied also to *Synechocystis* sp. strain PCC6714, and revealed its similar ability for H₂ synthesis. By combining salinity (0.4 M NaCl) with high-temperature (35°C) stresses, a large increase in intracellular sucrose of *Synechocystis* sp. PCC6714 (by 108%) was observed. In dark anaerobic fermentation, complete sucrose breakdown by *Synechocystis* sp. PCC6714 invertase was achieved at pH 8, yielding 22 nmol H₂ · mg Chl α ⁻¹ · h⁻¹.

Although cyanobacteria have the ability to accumulate significant amounts of sucrose, their main storage hydrocarbon is glycogen. For this reason, intracellular glycogen was used together with sucrose as a substrate for the production of H₂ during the dark fermentation of PAMCOD. Degradation of glycogen in the cells was achieved by the lack of nitrogen from the

fermentation nutrient. The degradation of intracellular glycogen significantly enhanced the production of H₂ by PAMCOD (6.55 μmol H₂ · mg Chl α ⁻¹ · h⁻¹). This method was 10,000-fold more efficient and places the PAMCOD strain among the most capable organisms for hydrogen production.

The viability of both methods on PAMCOD and *Synechocystis* sp. PCC6714 was confirmed by the successful regeneration of cyanobacterial biomass after dark fermentations in both double-concentrated and nitrate-enriched growth media. PAMCOD and *Synechocystis* sp. PCC6714 strains can be used as renewable hydrogen sources, with minimal cultivation requirements (nutrients, light, and replenishment) outside of limited freshwater sources and by sequestering atmospheric CO₂.

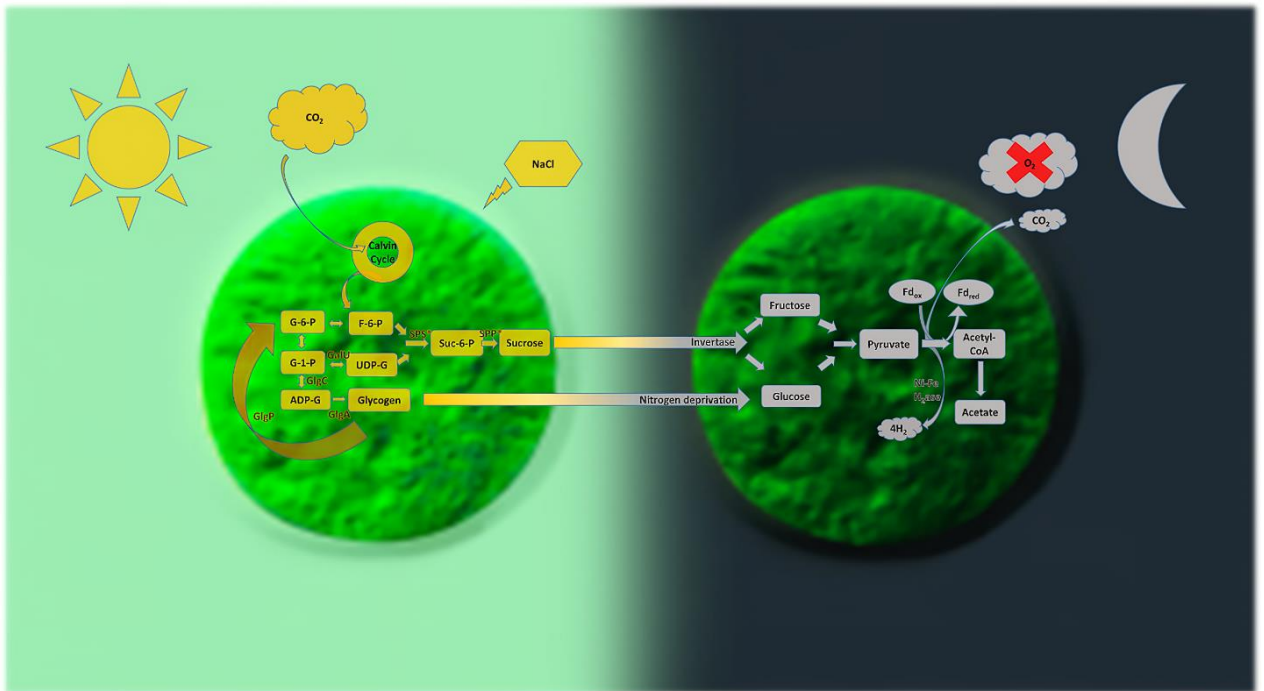
Scientific area: Biofuels

Keywords: Cyanobacteria, Biohydrogen, Dark fermentation, *Synechococcus elongatus* PCC7942, PAMCOD, *Synechocystis* sp. PCC6714

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

Στην Alexandra Elbakyan

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ



ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- Broussos, P. I., Romanos, G. E., & Stamatakis, K. (2024). H₂ production by the unicellular freshwater cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942 PAMCOD strain. *International Journal of Hydrogen Energy*, 52, 1298-1303.
- Broussos, P. I., Romanos, G. E., & Stamatakis, K. (2024). Salt and heat stress enhances hydrogen production in cyanobacteria. *Photosynthesis Research*, 1-9.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	i
ABSTRACT	iii
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ	vi
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	vi
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ.....	ix
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ	x
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1. Οι παγκόσμιες ενεργειακές προκλήσεις	1
1.1 Ενεργειακή κρίση	1
1.2 Φωτοσύνθεση	2
1.3 Υδρογόνο	4
2. Κυανοβακτήρια.....	5
2.1 Προέλευση	5
2.2 Οικολογία	6
2.3 Ταξινόμηση.....	6
2.4 Δομή και φυσιολογία	8
2.5 Περιβαλλοντικές προσαρμογές και σύνθεση οργανικών ενώσεων.....	11
3. Κύτταρα-εργοστάσια	18
3.1 Παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας από κυανοβακτήρια.....	18
3.2 Παραγωγή H ₂ από κυανοβακτήρια.....	19
3.3 Βελτίωση της παραγωγής H ₂	29
II. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	36
III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	38
1. Στελέχη και συνθήκες καλλιέργειας	38
2. Συνολική φωτοσυνθετική δραστηριότητα και δραστηριότητα του PSII.....	38
3. Ποσοτικός προσδιορισμός της σακχαρόζης	38
4. Ποσοτικός προσδιορισμός του γλυκογόνου	39
5. Σκοτεινή ζύμωση και παραγωγή H ₂	39
6. Ακεραιότητα των φυκοβιλισωμάτων	41
7. Αναγέννηση της κυανοβακτηριακής βιομάζας	41
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	43

1. Καταπόνηση αλατότητας και υψηλής θερμοκρασίας σε κύτταρα PAMCOD και <i>Synechocystis</i> sp. PCC6714	43
2. Παραγωγή H ₂ από το PAMCOD και το <i>Synechocystis</i> sp. PCC6714 με σκοτεινή ζύμωση της σακχαρόζης.....	47
3. Παραγωγή H ₂ από το PAMCOD με σκοτεινή ζύμωση σακχαρόζης και γλυκογόνου	48
4. Αναγέννηση της κυανοβακτηριακής βιομάζας	53
V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	56
VI. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	60
VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	61

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των κυττάρων PAMCOD, σε καταπόνηση αλατότητας και υψηλής θερμοκρασίας. (-●-) Κύτταρα PAMCOD στους 31°C απουσία NaCl, (-◆-) Κύτταρα PAMCOD στους 31°C παρουσία 0.4 M NaCl, (-■-) Κύτταρα PAMCOD στους 35°C απουσία NaCl (-▲-) Κύτταρα PAMCOD στους 35°C παρουσία 0.4 M NaCl. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.43

Γράφημα 2. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των κυττάρων *Synechocystis* sp. PCC6714, σε καταπόνηση αλατότητας και υψηλής θερμοκρασίας. (-●-) Κύτταρα *Synechocystis* sp. PCC6714 στους 31°C απουσία NaCl, (-◆-) Κύτταρα *Synechocystis* sp. PCC6714 στους 31°C παρουσία 0.4 M NaCl, (-■-) Κύτταρα *Synechocystis* sp. PCC6714 στους 35°C απουσία NaCl (-▲-) Κύτταρα *Synechocystis* sp. PCC6714 στους 35°C παρουσία 0.4 M NaCl. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.44

Γράφημα 3. Συνολική φωτοσυνθετική δραστηριότητα του PAMCOD (a) και του *Synechocystis* sp. PCC6714 (b), σε όρους φωτοσυνθετικής έκλυσης O₂ (H₂O → CO₂), κατά τη διάρκεια 14 ημερών συνεχούς έκθεσης σε λευκό φως στους 35°C, παρουσία και απουσία 0.4 M NaCl. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.45

Γράφημα 4. Δραστηριότητα του PSII των κυττάρων PAMCOD (a) και *Synechocystis* sp. PCC6714 (b), σε όρους φωτοσυνθετικής έκλυσης O₂, παρουσία του δέκτη ηλεκτρονίων PBQ (H₂O → PBQ), κατά τη διάρκεια 14 ημερών συνεχούς έκθεσης σε λευκό φως, στους 35°C, παρουσία και απουσία 0.4 M NaCl. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.45

Γράφημα 5. Συγκέντρωση γλυκογόνου στα κύτταρα PAMCOD σε αναερόβιες συνθήκες, παρουσία NaNO₃ στο σκοτάδι (μαύρες στήλες), απουσία NaNO₃ στο σκοτάδι (ανοιχτές γκρίζες στήλες) και απουσία NaNO₃ στο φως (σκούρες γκρίζες στήλες). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.50

Γράφημα 6. Ρυθμός πολλαπλασιασμού μετά τη σκοτεινή ζύμωση των καλλιεργειών PAMCOD (a) και *Synechocystis* sp. PCC6714 (b), σε απλό μέσο BG-11 (-●-), μέσο BG-11 διπλάσιας συγκέντρωσης θρεπτικών (-○-) και μέσο BG-11 εμπλουτισμένο με NaNO₃ (-▼-). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.54

Γράφημα 7. Ρυθμός πολλαπλασιασμού μετά από σκοτεινή ζύμωση κυττάρων PAMCOD σε απλό μέσο BG-11 (-●-), μέσο BG-11 διπλάσιας συγκέντρωσης θρεπτικών συστατικών (-○-) και μέσο BG-11 διπλάσιας συγκέντρωσης NaNO₃ (-▼-). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.55

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

- Πίνακας 1.** Περιεκτικότητα σε σακχαρόζη στα κύτταρα PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714 κατά τη σταθερή έκθεση σε συνδυασμένη καταπόνηση αλατότητας (0.4M NaCl) και υψηλής θερμοκρασίας (35°C). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.....46
- Πίνακας 2.** Μέγιστη περιεκτικότητα σε σακχαρόζη των κυττάρων PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714 μετά την ανάπτυξη για 14 ημέρες στους 31°C (τυπική θερμοκρασία ανάπτυξης) και στους 35°C (υψηλή θερμοκρασία), παρουσία 0.4 M NaCl. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.47
- Πίνακας 3.** Η επίδραση του pH στην παραγωγή H₂ από τις καλλιέργειες PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.....48
- Πίνακας 4.** Συγκέντρωση σακχαρόζης και γλυκογόνου στα κύτταρα PAMCOD την 4η ημέρα καλλιέργειας, παρουσία και απουσία 0.4M NaCl. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.....49
- Πίνακας 5.** Παραγωγή H₂ από διαφορετικές συγκεντρώσεις καλλιεργειών PAMCOD, σε σκοτεινή ζύμωση παρουσία και απουσία NaNO₃. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.....51
- Πίνακας 6.** Λόγος απορρόφησης A_{620nm}/A_{678nm} και μεταβολή του ενδοκυτταρικού γλυκογόνου (σε σύγκριση με την ημέρα 0) των κυττάρων PAMCOD κατά τη ζύμωση παρουσία και απουσία NaNO₃. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν τις ημέρες 0, 7 και 15 της ζύμωσης στο φως ή στο σκοτάδι και είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.52

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

"Το νερό κάποια μέρα θα χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο - το υδρογόνο και το οξυγόνο που το αποτελούν, χρησιμοποιούμενα μαζί ή μεμονωμένα, θα παρέχουν μια ανεξάντλητη πηγή θερμότητας και φωτός." Ιούλιος Βερν, 1874

1. Οι παγκόσμιες ενεργειακές προκλήσεις

1.1 Ενεργειακή κρίση

Από την έναρξη της βιομηχανικής επανάστασης στα τέλη του 18ου αιώνα, η παγκόσμια ενεργειακή ζήτηση έχει αυξηθεί ραγδαία, με αποτέλεσμα την ταχεία εξάντληση των προσβάσιμων αποθεμάτων ορυκτών καυσίμων και την κλιμάκωση του ενεργειακού κόστους. Η καύση ορυκτών καυσίμων όπως η βενζίνη, το φυσικό αέριο και ο άνθρακας απελευθερώνει CO₂ στην ατμόσφαιρα, επιδεινώνοντας το φαινόμενο του θερμοκηπίου (IPCC, 2007). Επί του παρόντος, οι εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου συνεχίζουν να αυξάνονται λόγω των ανθρώπινων δραστηριοτήτων και της αύξησης του πληθυσμού (οι ατμοσφαιρικές συγκεντρώσεις CO₂ έχουν αυξηθεί από περίπου 270-280 ppm στην αρχή της βιομηχανικής επανάστασης σε 400 ppm). Οι κύριοι παράγοντες που συμβάλλουν σε αυτή την αύξηση των αερίων του θερμοκηπίου είναι οι εκπομπές CO₂ από την καύση ορυκτών καυσίμων (65%) μαζί με τις εκπομπές μεθανίου (16%), οξειδίου του αζώτου (N₂O) (6%), φθορανθράκων και άλλων αερίων (2%) και οι αλλαγές στη χρήση γης (IPCC, 2007). Ως εκ τούτου, η υιοθέτηση βιώσιμων τεχνολογιών ανανεώσιμων πηγών ενέργειας είναι απαραίτητη για τη μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου από την καύση ορυκτών καυσίμων και για τον μετριασμό της κλιματικής αλλαγής.

Πολλές εναλλακτικές λύσεις έχουν παρουσιαστεί για την ανάπτυξη περιβαλλοντικά πιο φιλικών υποκατάστατων των ορυκτών καυσίμων υδρογονανθράκων. Υποσχόμενες τεχνολογίες ανανεώσιμων πηγών ενέργειας, όπως τα φωτοβολταϊκά, η αιολική ενέργεια και τα βιοκαύσιμα, έχουν σημειώσει ταχεία πρόοδο, ξεπερνώντας τις αρχικές προσδοκίες. Ωστόσο, η δημιουργία ακόμα πιο καινοτόμων μεθόδων με μηδενικές εκπομπές CO₂ είναι πλέον αναγκαία για την εξασφάλιση βιώσιμων ενεργειακών πόρων στο μέλλον.

1.2 Φωτοσύνθεση

Ο Ήλιος αποτελεί μια σταθερή πηγή ενέργειας σε όλη τη γεωλογική ιστορία της Γης, παρέχοντας το φως και τη θερμότητα που απαιτούνται για την υποστήριξη της ζωής στον πλανήτη. Σε ετήσια βάση, η Γη είναι αποδέκτης περίπου 3.850.000 exajoules προσπίπτουσας ηλιακής ενέργειας ($1 \text{ EJ} = 10^{18} \text{ joules}$) (Schenk et al., 2008). Η ενέργεια αυτή προέρχεται από πυρηνικές αντιδράσεις στον πυρήνα του Ήλιου, οι οποίες θεωρείται πως θα συνεχιστούν για περίπου 5-6 δισεκατομμύρια χρόνια, μέχρι να εξαντληθούν τα κύρια καύσιμά του.

Η εξέλιξη της ζωής στη Γη, δημιούργησε έναν μηχανισμό για τη μετατροπή της άφθονης ηλιακής ενέργειας σε χημική, πριν από περίπου 3.5 δισεκατομμύρια χρόνια, τη φωτοσύνθεση. Η φωτοσύνθεση αποτελεί μια σειρά αντιδράσεων, η οποία επιτρέπει τη σύλληψη και την αποθήκευση της ηλιακής ενέργειας σε χημικά σταθερή μορφή, κυρίως ως βιομάζα. Στην απλούστερη μορφή της, η αντίδραση της οξυγονικής φωτοσύνθεσης περιλαμβάνει την παραγωγή βιομάζας (υδατάνθρακες) και οξυγόνου (O_2) από διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) και νερό (H_2O), παρουσία φωτισμού (Bjorn et al., 2009).



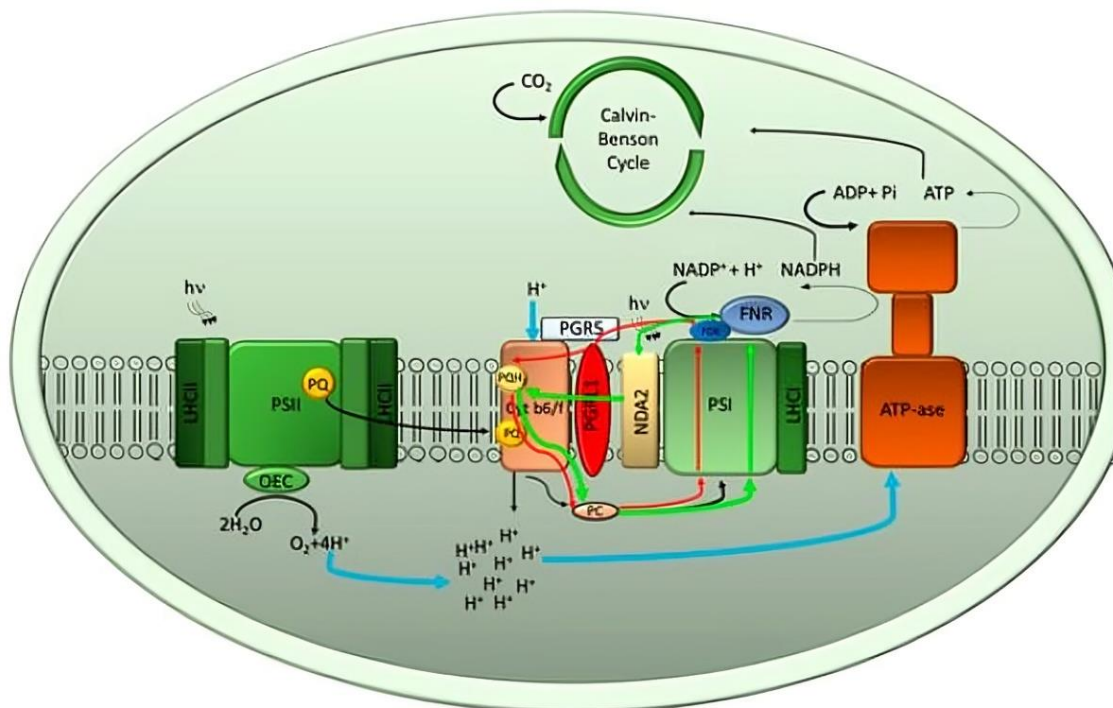
1.2.1 Βιοχημεία της φωτοσύνθεσης

Η οξυγονική φωτοσύνθεση παρατηρείται στα φυτά, στα φύκη και στα κυανοβακτήρια. Συγκεκριμένα, η δέσμευση του φωτός και η παραγωγή O_2 λαμβάνει χώρα στις μεμβράνες των θυλακοειδών που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των κυανοβακτηρίων και στους χλωροπλάστες των φυτών και των φυκών.

Οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί βασίζονται σε μια ποικιλία χρωστικών για τη δέσμευση της φωτεινής ενέργειας, κυρίως στο φάσμα της φωτοσυνθετικά ενεργής ακτινοβολίας (PAR) (Rittmann et al., 2008; Stephens et al., 2010). Η χλωροφύλλη α (Chl_a), είναι η κύρια φωτοσυνθετική χρωστική σε όλους τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, προσδίδοντάς τους το πράσινο χρώμα απορροφώντας φωτόνια κυρίως στην μπλε-ιώδη και στην κόκκινη περιοχή του φάσματος. Στα φυτά και στα φύκη, εντοπίζονται και άλλες μορφές χλωροφυλλών (b, c_1 , c_2 , d, e και f), που λειτουργούν ως βοηθητικές φωτοσυνθετικές χρωστικές. Αντίθετα, τα κυανοβακτήρια εκτός από τη χλωροφύλλη α, χρησιμοποιούν ως βοηθητικές φωτοσυνθετικές χρωστικές φυκοβιλίνες (φυκοκυανίνη, αλλοφυκοκυανίνη, και ορισμένα φυκοερυθρίνη), οι οποίες εντοπίζονται στα φυκοβιλιώματα (PBS) και απορροφούν κυρίως στην κόκκινη, πορτοκαλί, κίτρινη και πράσινη περιοχή του φάσματος. Τα καροτενοειδή (CARs), λειτουργούν

ως βοηθητικές χρωστικές, αλλά και προστατεύουν το φωτοσυνθετικό μηχανισμό από βλάβες που προκαλούνται από την περίσσεια του φωτός και τις ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS), απορροφώντας φως στη μπλε-πράσινη και στην κίτρινη περιοχή του φάσματος (Gantt et al., 1980; Sidler, 1994; Govindjee, 2004; Stirbet et al., 2019).

Στις μεμβράνες των θυλακοειδών των χλωροπλαστών, οι χλωροφύλλες *a* και *b* συνδέονται με τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα LHC (Light-Harvesting Complexes) και οργανώνονται σε δύο φωτοσυστήματα: το φωτοσύστημα II (PSII) και το φωτοσύστημα I (PSI) (Gantt, 1980). Στα κυανοβακτήρια, τα φυκοβιλιώματα λειτουργούν παρόμοια με τα LHC, απορροφώντας τη φωτεινή ενέργεια και μεταφέροντάς την στα κέντρα αντίδρασης των φωτοσυστημάτων. Στο κέντρο αντίδρασης κάθε φωτοσυστήματος βρίσκεται ένα μόριο χλωροφύλλης *a* το οποίο εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 700 nm για το PSI (P700) και στα 680 nm για το PSII (P680). Η φωτεινή ενέργεια που απορροφάται εκκινεί μια σειρά οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων που προκαλούν ροή ηλεκτρονίων (φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης), που οδηγούν στην παραγωγή μορίων με υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο: της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) μέσω της συνθετάσης του ATP και του φωσφορικού δινουκλεοτιδίου της νικοτιναμίδης (NADPH) μέσω της αναγωγής της οξειδωμένης μορφής (NADP⁺) (Wydrzynski et al., 2005; Morton et al., 2006; Haeder, 2022). Στο PSII, τα μόρια νερού υπόκεινται σε φωτόλυση, απελευθερώνοντας O₂ ως παραπροϊόν, ενώ τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν μεταφέρονται μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η ροή των ηλεκτρονίων μεταξύ του PSII και του PSI, η οποία διευκολύνεται από ενδιάμεσους φορείς (πλαστοκυανίνη, πλαστοκινόνη και σύμπλοκο κυτοχρώματος *b₆f*) δημιουργεί διαφορά στην συγκέντρωση πρωτονίων (pH) μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης των θυλακοειδών (Haeder, 2022). Το NADPH και το ATP χρησιμεύουν ως οι κύριοι φορείς ενέργειας για ενδεργονικές μεταβολικές διεργασίες, κυρίως στον κύκλο Calvin (σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης), όπου το διοξείδιο του άνθρακα δεσμεύεται για την παραγωγή γλυκόζης (Behrenfeld et al., 2001).



Εικόνα 1. Σχηματική παρουσίαση της φωτοσυνθετικής μεταφοράς ηλεκτρονίων. Παρουσιάζεται η διάταξη των συμπλόκων του Φωτοσυστήματος I (PSI), του Φωτοσυστήματος II (PSII), του κυτοχρώματος b_6/f και της συνθετάσης της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) εντός των μεμβρανών των θυλακοειδών. Πηγή: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1383586622005081>

1.2.2 Απόδοση φωτοσυνθετικών αντιδράσεων

Οι φωτεινές αντιδράσεις εκτελούνται με κβαντική απόδοση 80-85% και σε ιδανικές συνθήκες, η τελική ενεργειακή απόδοση της σύνθεσης γλυκόζης μπορεί να φθάσει το 35%. Ωστόσο, λόγω απωλειών σε διάφορα βιοχημικά στάδια, η απόδοση μετατροπής του φωτός σε βιομάζα στα περισσότερα ανώτερα φυτά κυμαίνεται μεταξύ μόλις 0.5-3%. Τα κυανοβακτήρια είναι πιο αποτελεσματικά στη δέσμευση της ηλιακής ενέργειας σε σχέση με τα φυτά και τα φύκη, μετατρέποντας έως και το 9% της ηλιακής ενέργειας (Knoor et al., 2018) σε βιομάζα. Σε κάθε περίπτωση, λαμβάνοντας υπόψη την ετήσια εισροή ηλιακής ενέργειας στη Γη, ακόμη και αυτή η μέτρια απόδοση μετατροπής του φωτός αποδίδει σημαντική ποσότητα σταθερής και αποθηκεύσιμης χημικής ενέργειας.

1.3 Υδρογόνο

Τα ορυκτά καύσιμα που αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των ενεργειακών πόρων του πλανήτη μας, ουσιαστικά έχουν προκύψει από τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα που συνέβη στο απώτερο γεωλογικό παρελθόν. Ωστόσο, η ηλιακή ενέργεια μπορεί επίσης να αξιοποιηθεί από τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς και για την παραγωγή καύσιμου υδρογόνου (H_2). Τα απαραίτητα ένζυμα και τις μεταβολικές οδούς για τη παραγωγή H_2 τις

διαθέτουν πολυάριθμα κυανοβακτήρια και μικροφύκη (Schulz et al., 1996; Vignais et al., 2001; Weaver et al., 1980) και για το λόγο αυτό παρατηρείται ένα ευρύ φάσμα προσεγγίσεων που σκοπεύουν τη βιοτεχνολογική παραγωγή του.

Το H₂ είναι ένα άχρωμο, άοσμο, μη τοξικό και φιλικό προς το περιβάλλον καύσιμο, και αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική πηγή ενέργειας έναντι των ορυκτών καυσίμων λόγω της καύσης του σε υδρατμούς (H₂O), ενός καθαρού προϊόντος, αλλά και της υψηλής ενεργειακής του πυκνότητας ανά μονάδα μάζας (120 MJ kg⁻¹) (McCay et al., 2020; Abraham et al., 2002). Η ελκυστικότητα του έγκειται επίσης στην πρόοδο της τεχνολογίας κυψελών καυσίμου H₂, για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας. Περίπου 55 εκατομμύρια τόνοι H₂ παράγονται ετησίως, ενώ η χρήση του αυξάνεται κατά περίπου 6%. Η παραγωγή H₂ αποτελεί αντικείμενο ενδιαφέροντος πολλών βιομηχανικών εταιρειών, ωστόσο το κόστος παραγωγής του παραμένει υψηλό (1 kg H₂ κοστίζει περίπου 1.25 USD) (Bolatkhan et al., 2019).

Για την οικονομικά αποδοτική και βιώσιμη παραγωγή του H₂ σε μεγάλη κλίμακα, απαιτείται η αντικατάσταση των συμβατικών ρυπογόνων διεργασιών παραγωγής όπως η αναμόρφωση φυσικού αερίου, η διύλιση πετρελαίου και η αεριοποίηση άνθρακα (Show et al., 2019). Εκτός από τις βιολογικές μεθόδους παραγωγής H₂, έχουν σχεδιαστεί και άλλα συστήματα παραγωγής, όπως η διάσπαση και η ηλεκτρόλυση του νερού, η ηλεκτρόλυση υψηλής θερμοκρασίας, η φωτοηλεκτρόλυση (φωτόλυση), το ηλιακό θερμοχημικό H₂ (STCH) και η μετατροπή βιομάζας (McCay and Shafiee, 2020). Εξ αυτών, οι βιολογικές μέθοδοι θεωρούνται φιλικότερες προς το περιβάλλον και λιγότερο ενεργοβόρες σε σύγκριση με τις θερμοχημικές και ηλεκτροχημικές μεθόδους, κυρίως επειδή τα βιολογικά συστήματα λειτουργούν σε κανονική θερμοκρασία και πίεση.

2. Κυανοβακτήρια

2.1 Προέλευση

Τα κυανοβακτήρια είναι μια μεγάλη και μορφολογικά ετερογενής ομάδα φωτοτροφικών βακτηρίων (Brock et al., 2003; Stanier and Cohen-Bazire, 1977; Hentschke and Junior, 2022) απολιθώματα των οποίων με τη μορφή στρωματόλιθων έχουν ηλικία 3.5*10⁹ ετών (Walter et al., 1983; Buick et al., 1992). Ως οι μόνοι προκαρυωτικοί οργανισμοί που επιτελούν οξυγονική φωτοσύνθεση, θεωρούνται υπεύθυνα για την αύξηση του O₂ στην ατμόσφαιρα και τους ωκεανούς γύρω στα 2.4 δισεκατομμύρια χρόνια πριν, κατά το Μεγάλο Οξειδωτικό

Γεγονός (Great Oxidation Event - GOE), ευνοώντας την εξέλιξη πιο πολύπλοκων μορφών ζωής. Σύμφωνα με την ενδοσυμβιωτική θεωρία (Margulis and Bermudes, 1985) πριν από τουλάχιστον 1.05 Ga, ευκαρυωτικά κύτταρα ξεκίνησαν να ενσωματώνουν τα κυανοβακτήρια, εγκαθιδρύοντας μια συμβιωτική σχέση με την πάροδο του χρόνου. Αυτοί οι κυανοβακτηριακοί ενδοσυμβιώτες εξελίχθηκαν τελικά σε χλωροπλάστες, τα φωτοσυνθετικά οργανίδια μέσα στα ευκαρυωτικά κύτταρα των φυκών και των φυτών (Demoulin et al., 2019).

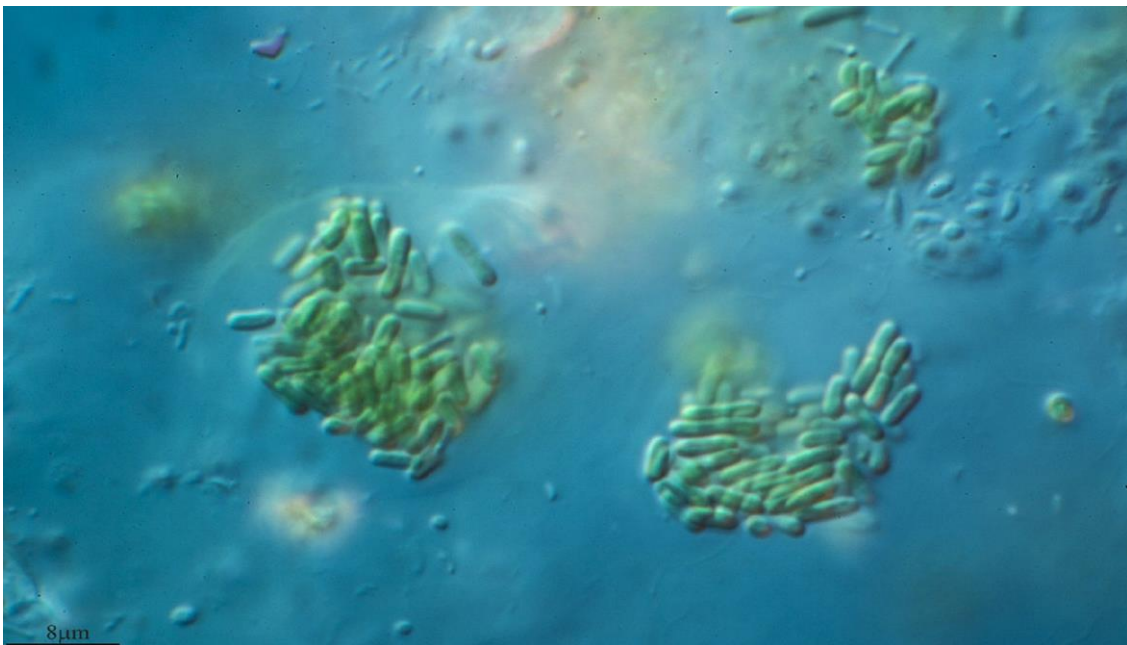
2.2 Οικολογία

Τα κυανοβακτήρια έχουν αποικίσει με επιτυχία ένα ευρύ φάσμα χερσαίων και υδάτινων ενδιαιτημάτων, από θερμές πηγές μέχρι πολικές περιοχές και από γλυκά νερά μέχρι υπεραλατούχες λίμνες και ερήμους (εξαιρουμένων των ενδιαιτημάτων με $\text{pH} < 4$) (Mehdizadeh Allaf and Peerhossaini, 2022). Τα περισσότερα είδη είναι υποχρεωτικά φωτοαυτότροφα, αν και ορισμένα διαθέτουν την ικανότητα ετερότροφης ανάπτυξης μέσω της αναπνοής. Ως βασικοί πρωτογενείς παραγωγοί, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στον κύκλο του άνθρακα στη Γη, με περίπου το 20-30% του οργανικού άνθρακα του πλανήτη να προέρχεται από τη φωτοσυνθετική τους δραστηριότητα, και τα θαλάσσια είδη να είναι υπεύθυνα για το 25% της ετήσιας δέσμευσης άνθρακα (El-Seedi et al., 2023). Ακόμα, τα κυανοβακτήρια είναι οι κύριοι ρυθμιστές του κύκλου του αζώτου στη γη, μετατρέποντας το μοριακό άζωτο σε αμμωνία ($\text{N}_2 \rightarrow \text{NH}_3$). Ορισμένα από αυτά τα αζωτοδεσμευτικά είδη κυανοβακτηρίων δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις με φυτά, παρέχοντάς τους το δεσμευμένο άζωτο (Álvarez et al., 2023). Μερικά κυανοβακτήρια είναι ικανά να συμβιώνουν και με ηπατικά βρύα, πτέρες και κυκαδόφυτα, ενώ άλλα αποτελούν το φωτοετεροτροφικό εταίρο των λειχήνων (Brock et al., 2003).

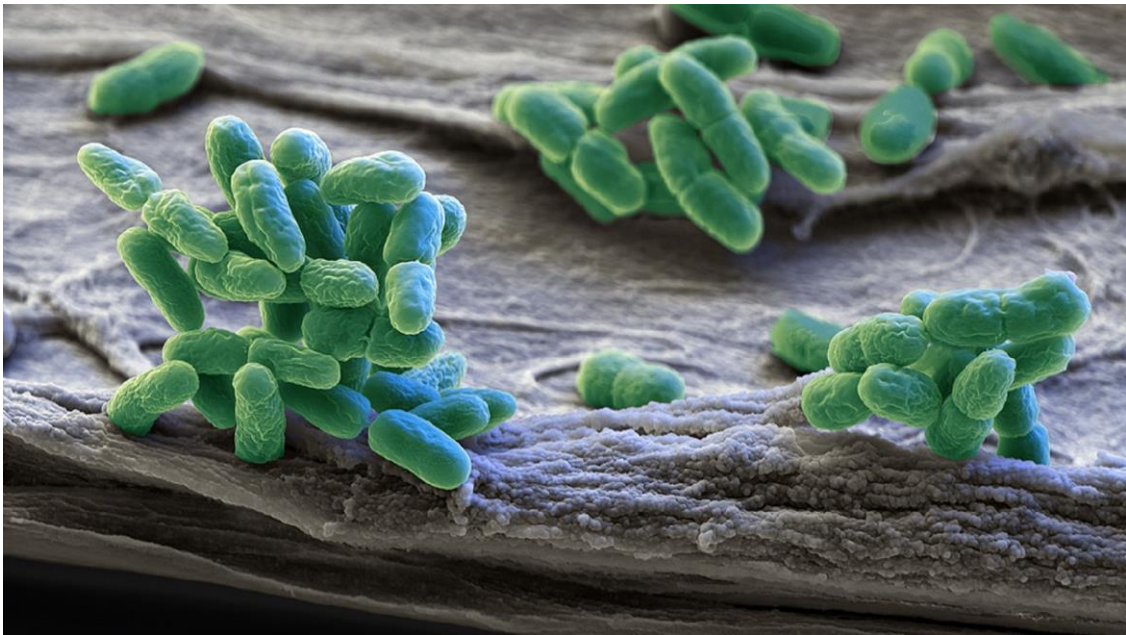
2.3 Ταξινόμηση

Σήμερα, θεωρείται ότι υπάρχουν περίπου 8000 είδη κυανοβακτηρίων σε 374 γένη. Από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, τα κυανοβακτήρια υποδιαιρούνται σε πέντε τύπους: (α) μονοκύτταρα που διαιρούνται με απλή διχοτόμηση, (β) μονοκύτταρα που διαιρούνται με πολλαπλή διχοτόμηση, (γ) νηματοειδή με ετεροκύστες (κύτταρα εξειδικευμένα στην αζωτοδέσμευση), (δ) νηματοειδείς μορφές χωρίς ετεροκύστες και (ε) νηματοειδείς μορφές με διακλαδώσεις (Brock et al., 2003). Με τη συμβολή μοριακών αναλύσεων (αλληλουχίες 16S rRNA), έχουν αναγνωριστεί συνολικά 5185 είδη σε 232 γένη και έχουν ταξινομηθεί στις τάξεις: Chroococcales, Gloeobacterales, Pleurocapsales, Spirulinales, Synechococcales,

Nostocales, Oscillatoriales και Stigonematales (Anagnostidis et al., 1985, 1988, 1990; Guiry et al., 2022). Τα Chroococcales περιλαμβάνουν κοκκοειδή κυανοβακτήρια (μονοκύτταρα ή σε αποικίες) μέσα σε ένα βλεννώδες περίβλημα. Τα Gloeobacterales είναι ραβδοειδή κυανοβακτήρια (μονοκύτταρα ή σε ακανόνιστες ομάδες) του γλυκού νερού, χωρίς θυλακοειδή. Στην τάξη Nostocales ανήκουν νηματοειδή είδη, ορισμένα εκ των οποίων έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν άζωτο. Τα Oscillatoriales περιλαμβάνουν τα περισσότερα βενθικά νηματώδη είδη και τα Pleurocapsales, τα οποία εμφανίζονται είτε ως κοκκοειδή κύτταρα είτε με ψευδονημάτια, σχηματίζουν πολύπλοκες αποικίες. Τα είδη της τάξης Spirulinales χαρακτηρίζονται από περιελιγμένα νημάτια, ενώ τα είδη της Synechococcales περιέχουν τόσο μονοκύτταρους (και σε αποικίες) όσο και νηματώδεις τύπους. Η τάξη Synechococcales έχει περισσότερα από 70 γένη και θεωρείται η παλαιότερη, πιο κοινή και οικολογικά σημαντική (Mehdizadeh Allaf and Peerhossaini, 2022). Στη Synechococcales, ανήκουν ιδιαίτερα μελετημένα είδη του γλυκού νερού, όπως τα είδη *Synechococcus* (*Anacystis nidulans*, αναφέρεται ως το *Escherichia coli* των κυανοβακτηριολόγων από τον R. Stanier) (Stanier and Cohen-Bazire, 1977) και τα είδη *Synechocystis* (Mehdizadeh Allaf and Peerhossaini, 2022).



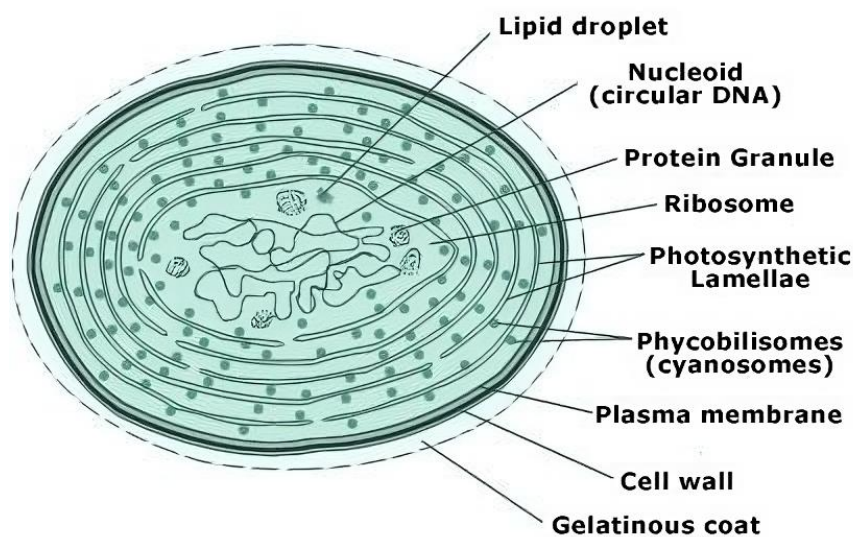
Εικόνα 2. Τάξη Synechococcales. Πηγή: <https://uk.inaturalist.org>



Εικόνα 3. *Synechocystis* sp. PCC6803. Πηγή: <https://micropia.nl>

2.4 Δομή και φυσιολογία

Τα κυανοβακτήρια διαθέτουν πολυάριθμα στερεά έγκλειστα και μια περίπλοκη εσωτερική διάταξη θυλακοειδών, που τα διαφοροποιεί δομικά από άλλους τύπους βακτηρίων. Μια ενδεικτική απεικόνιση της δομής ενός κυανοβακτηρίου παρατίθεται στην Εικόνα 4.



Εικόνα 4. Κυτταρική δομή ενός κυανοβακτηρίου. (i) Σταγονίδια λιπιδίων - σφαιρικά σταγονίδια που αποτελούνται από λιπίδια και πρωτεΐνες και χρησιμοποιούνται για αποθήκευση λιπιδίων, (ii) Νουκλεοειδές (κυκλικό DNA) - διατηρεί γενετικές πληροφορίες, (iii) Πρωτεϊνικός κόκκος - κόκκοι που παρέχουν πρωτεΐνη σε όλο το κύτταρο, (iv) Ριβόσωμα - συνθέτει πρωτεϊνικές αλυσίδες από μόρια αμινοξέων, (v) Φωτοσυνθετικό έλασμα - ένα λεπτό στρώμα, πλάκα ή μεμβράνη για δομική ακεραιότητα, (vi) Φυκοβιλιώματα (κυανοσώματα) - υπεύθυνα για 95% αποτελεσματική μεταφορά ενέργειας, (vii) Πλασματική μεμβράνη - περιβάλλει τα βακτήρια, ελέγχοντας την κίνηση των ουσιών μέσα και έξω από το κύτταρο, (viii) Κυτταρικό τοίχωμα - δομική στήριξη και προστασία, φιλτράρισμα ουσιών, (ix)

Ζελατινώδες περίβλημα - ένα εξωτερικό ινώδες πηκτώμα που προστατεύει το κύτταρο από τραυματισμούς. Πηγή: <https://www.e-education.psu.edu>

2.4.1 Κυτταρικό τοίχωμα

Η δομή του κυτταρικού τοιχώματος ορισμένων κυανοβακτηρίων είναι παρόμοια με εκείνη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Brock et al., 2003; Golecki et al., 1988). Αυτό το κυτταρικό τοίχωμα λειτουργεί ως ο εξωσκελετός του κυττάρου, αποτελούμενο από την εξωτερική μεμβράνη (outer membrane) και το στρώμα πεπτιδογλυκάνης. Η εξωτερική μεμβράνη, που αποτελείται από πρωτεΐνες και λιποπολυσακχαρίτες, είναι περατή σε μόρια με μέγεθος μικρότερο των 600 Da και εκλεκτικά περατή σε μακρομόρια. Το στρώμα πεπτιδογλυκάνης είναι ένα πολυμερές που αποτελείται από μακριές αλυσίδες εναλλασσόμενων μορίων N-ακετυλογλυκοζαμίνης (NAG) και N-ακετυλομουραμικού οξέος (NAM) που συνδέονται μεταξύ τους με β(1-4) γλυκοζιτικούς δεσμούς. Οι ελαστικές ιδιότητες του στρώματος πεπτιδογλυκάνης είναι καθοριστικές για τη ρύθμιση του κυτταρικού όγκου και της διαστολής του κυττάρου πριν από τη διαίρεση, όπως και για την προστασία του από την οσμωτική πίεση και άλλες περιβαλλοντικές πιέσεις (Murata, 1989, Ladas, 2002).

2.4.2 Εσωτερικές Μembrάνες

Η πλασματική μεμβράνη του κυττάρου λειτουργεί ως φραγμός εκλεκτικής διαπερατότητας. Περιέχει πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που σχηματίζουν σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας, ATPάσες, μεταφορείς, κανάλια ανταλλαγής ουσιών και καρτενοπρωτεΐνες (Ladas, 2002). Οι θυλακοειδείς μεμβράνες, οι οποίες καλύπτουν σημαντικό τμήμα του εσωτερικού του κυττάρου, είναι απαραίτητες για την οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Στα ραβδόμορφα κύτταρα του *Synechococcus*, οι θυλακοειδείς μεμβράνες σχηματίζουν κανονικά διατεταγμένους ομόκεντρους κυλίνδρους ευθυγραμμισμένους κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα *Synechococcus elongatus* PCC7942 περιέχουν 3-4 συγκεντρικές θυλακοειδείς μεμβράνες, ωστόσο άλλα γένη κυανοβακτηρίων παρουσιάζουν ποικίλους αριθμούς και διατάξεις θυλακοειδών μεμβρανών (Stevens and Nierzwicki-Bauer, 1991, Ladas, 2002). Το σφαιρικό μονοκύτταρο κυανοβακτήριο *Synechocystis* εμφανίζει ακανόνιστη οργάνωση των θυλακοειδών, με τις μεμβράνες να συγκλίνουν σε διάφορα σημεία κοντά στην πλασματική μεμβράνη (Van de Meene et al., 2006; Nevo et al., 2007), γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτές οι περιοχές σύγκλισης μπορεί να λειτουργούν ως βιογενετικές θέσεις των θυλακοειδών (Stengel et al., 2012). Στις θυλακοειδείς μεμβράνες εντοπίζονται φωτοσυνθετικές χρωστικές

(χλωροφύλλη α, καροτενοειδή), φωτοσυνθετικά σύμπλοκα μεταφοράς ηλεκτρονίων, η ATP-συνθετάση και διάφορα αναπνευστικά ένζυμα (Ladas, 2002).

2.4.3 Φυκοβιλιώματα

Τα φυκοβιλιώματα, είναι οι βασικοί φωτοσυλλεκτικοί μηχανισμοί της κυανοβακτηριακής φωτοσύνθεσης (Gantt et al., 1980; Sidler et al., 1994). Πρόκειται για υπερμοριακά οργανίδια που συλλέγουν το φως, αποτελούνται από τις φυκοβιλιπρωτεΐνες και συνδέονται μη ομοιοπολικά με την κυτταροπλασματική πλευρά κάθε θυλακοειδούς μεμβράνης (Ladas, 2002). Οι φυκοβιλίνες, όπως η φυκοκυανίνη, η αλλοφυκοκυανίνη και η φυκοερυθρίνη, χρησιμεύουν ως χρωστικές που συλλέγουν το φως μέσα στα φυκοβιλιώματα. Οι φυκοβιλίνες απορροφούν φωτεινή ενέργεια σε ένα ευρύ φάσμα, που περιλαμβάνει κυρίως κόκκινο, πορτοκαλί, κίτρινο και πράσινο φως και τη μεταφέρουν στα μόρια της χλωροφύλλης, ενισχύοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της φωτοσύνθεσης. Η φυκοκυανίνη μαζί με τη χλωροφύλλη α, προσδίδουν στα κυανοβακτήρια το χαρακτηριστικό κυανοπράσινο χρώμα τους (Brock et al., 2003).

Οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας μπορούν να επηρεάσουν την περιεκτικότητα και τη σύνθεση των φυκοβιλινών στα κυανοβακτήρια, συμπεριλαμβανομένων κάποιων στελεχών *Synechococcus* και *Synechocystis*. Οι αυξημένες θερμοκρασίες μπορεί να μεταβάλλουν τη σύνθεση των χρωστικών ή τη σχετική αφθονία των διαφόρων τύπων φυκοβιλίνης, επηρεάζοντας ενδεχομένως την αποτελεσματικότητα της συγκομιδής του φωτός κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης (Guyet et al., 2020).

2.4.4 Λιπίδια

Η σύσταση των λιπιδίων στις θυλακοειδείς μεμβράνες των κυανοβακτηρίων ομοιάζει με αυτή των μεμβρανών των θυλακοειδών των χλωροπλαστών (Wada and Murata, 1998). Υπάρχουν τέσσερις βασικοί τύποι λιπιδίων: η μονογαλακτοζυλο-διακυλογλυκερόλη (MGDG), η διγαλακτοζυλο-διακυλογλυκερόλη (DGDG), ένα σουλφολιπίδιο (σουλφοκινοβοζυλο-διακυλογλυκερόλη SQDG) και η φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG). Το MGDG αποτελεί πάνω από το 50% των λιπιδίων αυτών, ενώ τα υπόλοιπα λιπίδια συμμετέχουν σε ποσοστά που κυμαίνονται από 5 έως 25% (Ladas, 2002). Η αναλογία των κορεσμένων προς τα ακόρεστα λιπαρά οξέα ποικίλλει ανάλογα με το κυανοβακτηριακό είδος. Είδη όπως τα *Synechococcus* sp. και *Synechocystis* sp. συνθέτουν κορεσμένα και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα C₁₆ και C₁₈

(Jurgens and Weckesser, 1985), αλλά στερούνται τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που απαντώνται σε άλλα κυανοβακτήρια.

Τα κυανοβακτήρια έχουν επίσης την ικανότητα να τροποποιούν τη σύνθεση των λιπιδίων της κυτταρικής τους μεμβράνης ανάλογα με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Με αυτό τον τρόπο, μεταβάλλουν τις φυσικές ιδιότητες των μεμβρανών τους, ώστε να ευδοκιμούν σε ένα ευρύτερο φάσμα θερμοκρασιών (Hewelt-Belka et al., 2020). Σε υψηλότερες θερμοκρασίες, τα κυανοβακτήρια μπορούν να αυξήσουν την αναλογία των κορεσμένων λιπαρών οξέων ή να ρυθμίσουν διαφορετικά τη σύνθεση των λιπιδίων για να μειώσουν τη ρευστότητα της μεμβράνης. Αντίθετα, σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, τα κυανοβακτήρια τείνουν να αυξάνουν την αναλογία των ακόρεστων λιπαρών οξέων στις μεμβράνες τους. Αυτά τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, με διπλούς δεσμούς στις ανθρακικές αλυσίδες τους, ενισχύουν τη ρευστότητα των μεμβρανών, αποτρέποντας την υπερβολική ακαμψία και διευκολύνοντας την ορθή κυτταρική λειτουργία (Yadav et al., 2022).

2.4.5 Στερεά Έγκλειστα

Τα στερεά έγκλειστα στα κυανοβακτηριακά κύτταρα περιλαμβάνουν πολυφωσφορικά άλατα, κοκκία γλυκογόνου, κοκκία κυανοφυκίνης και καρβοξυσώματα. Τα πολυφωσφορικά άλατα χρησιμεύουν ως δεξαμενές φωσφόρου και ως χηλικοί παράγοντες για διάφορα τοξικά μέταλλα, συμμετέχοντας σε αντιδράσεις φωσφορυλίωσης και επίσης στη ρύθμιση των ενζυμικών δραστηριοτήτων (Ladas, 2002). Το γλυκογόνο αποτελεί την κυριότερη οργανική αποθηκευτική ένωση στα κυανοβακτήρια και είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και την διατήρηση της αναπνοή (Sadvakasova et al., 2020). Η κυανοφυκίνη, συμπολυμερές του ασπαρτικού οξέος με την αργινίνη, λειτουργεί ως αποθηκευτική μορφή αζώτου (Brock et al., 2003). Τα καρβοξυσώματα είναι πολυεδρικές δομές που καλύπτονται από ένα πρωτεϊνικό κέλυφος, περιέχουν τη καρβοξυλάση της διφωσφορικής ριβουλόζης (RuBisCo) και έχουν κεντρικό ρόλο στη αφομοίωση του CO₂. Τα στερεά έγκλειστα και τα ριβοσώματα, περιβάλλουν το κέντρο του κυτταροπλάσματος (κεντρόπλασμα), όπου βρίσκεται το κυκλικό DNA του κυανοβακτηρίου (Walsby, 1994).

2.5 Περιβαλλοντικές προσαρμογές και σύνθεση οργανικών ενώσεων

Η διατήρηση ενός σταθερού εσωτερικού περιβάλλοντος ενόψει των εξωτερικών περιβαλλοντικών αλλαγών αποτελεί θεμελιώδη προϋπόθεση για όλους τους οργανισμούς. Στα κυανοβακτήρια, οι μηχανισμοί εγκλιματισμού ποικίλλουν ανάλογα με το είδος, τις

περιβαλλοντικές συνθήκες και τις τρέχουσες μεταβολικές απαιτήσεις, και καθορίζουν τις οργανικές ενώσεις που παράγονται με τη φωτοσυνθετική αφομοίωση του CO₂. Οι ενώσεις αυτές είναι απαραίτητες για την ανθεκτικότητά τους σε αντίξοες συνθήκες μέσω της αποθήκευσης ενέργειας, της ωσμωτικής ρύθμισης και της αποκατάστασης της ενεργειακής ισορροπίας (Tandeu de Marsac and Houmard, 1993).

Οι συνηθέστερες δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες για τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς σχετίζονται με τις διακυμάνσεις της έντασης φωτισμού, της ποιότητας του φωτισμού, της θερμοκρασίας, της αλατότητας, της επάρκειας νερού, οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών.

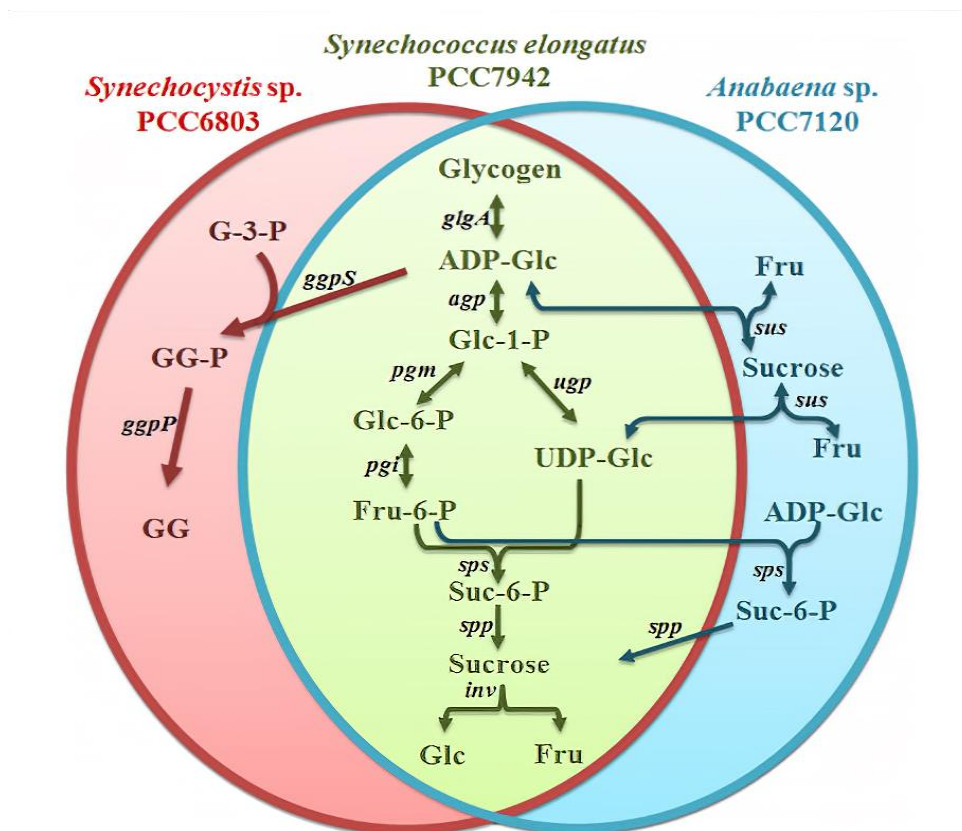
2.5.1 Αλατότητα

Ο εγκλιματισμός σε περιβάλλοντα ελαττωμένου υδατικού δυναμικού περιλαμβάνει τη συσσώρευση οργανικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους που ονομάζονται ωσμωρρυθμιστές ή ωσμωλύτες. Αυτές οι ενώσεις λειτουργούν ως συμβατές διαλυτές ουσίες για την αντιμετώπιση της ωσμωτικής καταπόνησης από τα αυξημένα επίπεδα αλατότητας των υδάτινων οικοσυστημάτων (Hagemann, 2011; Pade et al., 2016) και για την αντιστάθμιση των αυξημένων ιοντικών συγκεντρώσεων εντός των κυανοβακτηριακών κυττάρων (Ladas and Parageorgiou, 2000; Kolman et al., 2015). Ανάλογα με τη χημική τους δομή, οι ωσμωλύτες κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες: πολυόλες (π.χ. μανιτόλη, σορβιτόλη, δισακχαρίτες όπως η σακχαρόζη και η τρεχαλόζη και ετεροζίτες όπως η γλυκοζυλ-γλυκερόλη), αμινοξέα (προλίνη) και παράγωγα αμινοξέων (όπως η βεταΐνη της γλυκίνης και η βεταΐνη του γλουταμικού) (Parageorgiou and Murata, 1995; Hays and Ducat, 2015; Hagemann, 2011; Reed and Stewart, 1985; Galinski et al., 1993).

Η έκθεση σε αυξημένη αλατότητα προκαλεί κυτταρική απώλεια νερού λόγω ωσμωτικής καταπόνησης και αλλαγές στην κυτταροπλασματική ιοντική σύνθεση, προκαλώντας την ενεργοποίηση των συστημάτων μεταφοράς (salt-out/salt-in) και τη συνακόλουθη συσσώρευση ωσμωπροστατευτικών ενώσεων (Hagemann, 2011; Reed and Stewart, 1985; Du et al., 2013). Με βάση την αλατανθεκτικότητά τους και τη συσσώρευση ωσμωλυτών, τα κυανοβακτήρια κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες: στελέχη με χαμηλή ανθεκτικότητα στην αλατότητα που συσσωρεύουν δισακχαρίτες, μέτρια αλατανθεκτικά στελέχη που συσσωρεύουν ετεροζίτες και αλόφιλα στελέχη που συνθέτουν αμινοξέα και παράγωγά τους (Reed and Stewart, 1988). Τα στελέχη του γλυκού νερού με σχετικά χαμηλή

αλατανθεκτικότητα (έως 0.7M NaCl) συσσωρεύουν κυρίως σακχαρόζη ή/και η τρεχαλόζη ως κύριες συμβατές διαλυτές ουσίες (Ladas and Parageorgiou, 2000; Kolman et al., 2015). Αντίθετα, τα κυανοβακτήρια με μέτρια ανθεκτικότητα (έως 1.7M NaCl) συνθέτουν κυρίως γλυκοζυλ-γλυκερόλη και γλυκολικό οξύ (Mackay et al., 1984; Reed et al., 1984; Reed and Stewart, 1985), με τη σακχαρόζη να λειτουργεί ως δευτερεύων ωσμωλύτης (Higo et al., 2006; Kolman et al., 2015).

Τα στελέχη *Synechococcus elongatus* PCC7942 και *Synechocystis* sp. PCC6714 βρίσκονται κυρίως σε ενδιαιτήματα γλυκού νερού που σπάνια εκτίθενται σε υψηλή αλατότητα. Ωστόσο, σε εργαστηριακές καλλιέργειες, το *Synechococcus elongatus* PCC7942 και το *Synechocystis* sp. PCC6714 μπορούν να ανταπεξέλθουν μέχρι 0.4M NaCl και 1M NaCl, αντίστοιχα (Ladas and Parageorgiou, 2000; Reed, Richardson and Stewart, 1985). Γι' αυτό τον λόγο, έχουν μελετηθεί εκτενώς ως εργαστηριακά μοντέλα για τη διερεύνηση μηχανισμών εγκλιματισμού στην αλατότητα.



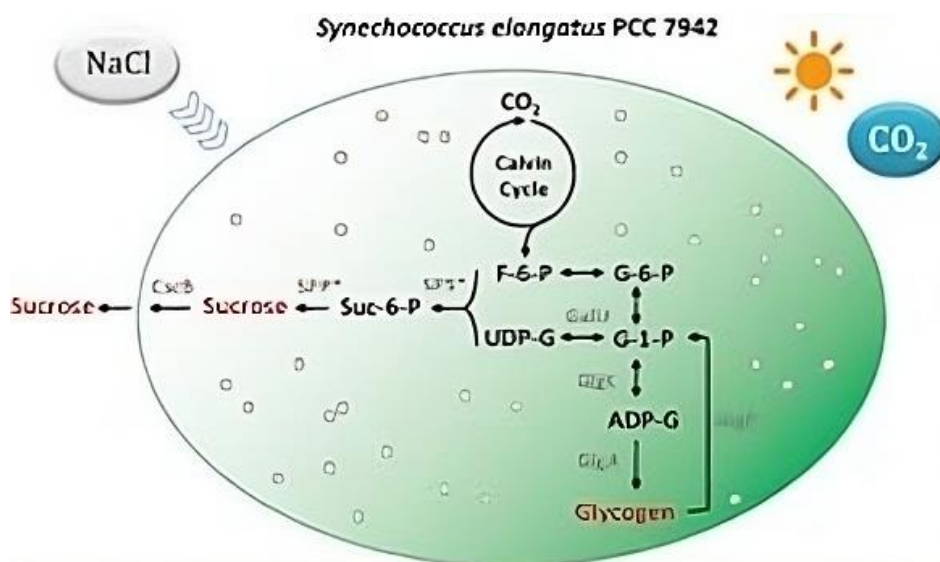
Εικόνα 5 Οι βιοσυνθετικές οδοί για την παραγωγή σακχαρόζης στα *Synechocystis* sp. PCC6803, *S. elongatus* PCC7942 και *Anabaena* sp. PCC7120. Συντομογραφίες: ADP-Glc, ADP-γλυκόζη- Glc-1-P, φωσφορική γλυκόζη-1- Glc-6-P, φωσφορική γλυκόζη-6- Fru-6-P, φωσφορική φρουκτόζη-6- UDP-Glc, UDP-γλυκόζη- Suc-6-P, φωσφορική σακχαρόζη-6, Glc, γλυκόζη- Fru, φρουκτόζη- G-3-P, φωσφορική γλυκερόλη-3- GG-P, φωσφορική γλυκοζυλ-γλυκερόλη- GG, γλυκοζυλ-γλυκερόλη- glgA, συνθετάση του γλυκογόνου- agp, πυροφωσφορυλάση της ADP-γλυκόζης, pgm, φωσφογλουκομουτάση- pgi, ισομεράση της γλυκόζης-6-φωσφορικής- ugp, πυροφωσφορυλάση της UDP-γλυκόζης- sps,

συνθετάση της φωσφορικής σακχαρόζης- sprr, φωσφατάση της φωσφορικής σακχαρόζης- inv, ιμπερτάση- sus, συνθετάση της σακχαρόζης- ggrS, συνθετάση της φωσφορικής γλυκοζυλ-γλυκερόλης- ggrp, φωσφατάση της φωσφορικής γλυκοζυλ-γλυκερόλης (Pengcheng Fu, 2008). Πηγή: <https://onlinelibrary.wiley.com>

Στα αρχικά στάδια της έκθεσης σε υψηλή αλατότητα, το NaCl προκαλεί μείωση του κυτταρικού όγκου και στη συνέχεια διόγκωση των κυττάρων, καθώς εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα συνοδευόμενο από μόρια νερού (Stamatakis et al., 1999). Η μεταφορά νερού στο κυτταρόπλασμα πραγματοποιείται μέσω των ενυδατωμένων ιόντων Na⁺ και Cl⁻ καθώς και μέσω παθητικής διάχυσης διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης, λόγω των αυξημένων συγκεντρώσεων διαλυμένων ουσιών στο εσωτερικό του κυττάρου. Η ταχεία εισροή Na⁺ στο κυτταρόπλασμα, που φθάνει σε συγκεντρώσεις αρκετών εκατοντάδων mM, έχει δυσμενείς επιπτώσεις στο κύτταρο του *Synechococcus*: (α) διαταραχή της κυτταροπλασματικής ιοντικής ισορροπίας, (β) μείωση του αρνητικού επιφανειακού φορτίου των πρωτεϊνών και των μεμβρανών, (γ) μεταβολή των ενζυμικών δραστηριοτήτων. Επιπλέον, παρατηρείται παρεμπόδιση της έκλυσης O₂ στη φωτοσύνθεση και γενική καταστολή της ίδιας της φωτοσύνθεσης (Allakhverdiev et al., 2000b). Για την αντιμετώπιση των διαταραχών αυτών, το κύτταρο ενεργοποιεί διάφορους ταυτόχρονους αμυντικούς μηχανισμούς. Η άμεση αντίδραση περιλαμβάνει την αποβολή ιόντων Na⁺ και Cl⁻ μέσω ενεργού μεταφοράς αντίθετα στη διαβάθμιση της συγκέντρωσής τους. Στα κύτταρα του *Synechococcus elongatus* PCC7942, η κυτταροπλασματική συγκέντρωση Na⁺ είναι περίπου 10mM υπό φωτισμό (παρόμοια παρατηρήθηκε στο *Synechocystis* sp. PCC6714) (Reed, Richardson and Stewart, 1985) και περίπου 30mM στο σκοτάδι (Ritchie, 1992). Το χαμηλότερο κυτταροπλασματικό επίπεδο Na⁺ κατά τη διάρκεια του φωτισμού οφείλεται στην ενεργό εξώθηση του ιόντος από το κύτταρο. Η εξώθηση του Na⁺ πραγματοποιείται μέσω του αντιμεταφορέα Na⁺/H⁺ της πλασματικής μεμβράνης (Billini et al., 2008) και ενδεχομένως μέσω της ηλεκτρογενετικής Na⁺-ΑΤΡάσης (p-ΑΤΡάση) της πλασματικής μεμβράνης (Blumwald et al., 1984; Nitschmann and Packer, 1992; Ritchie, 1992; Papageorgiou et al., 2001; Reed, Richardson and Stewart, 1985). Ταυτόχρονα, παράλληλα με την ενεργό εξώθηση Na⁺, τα κύτταρα των *Synechococcus elongatus* PCC7942 και *Synechocystis* sp. PCC6714 ξεκινούν τη σύνθεση και τη συσσώρευση του συμβατού ωσμωλύτη σακχαρόζη για τη ρύθμιση του κυτταροπλασματικού ωσμωτικού δυναμικού (Ladas and Papageorgiou, 2000; Warr et al., 1985). Έχει επίσης παρατηρηθεί ενεργοποίηση μεταγραφικών και μεταφραστικών μηχανισμών για τη σύνθεση πρωτεϊνών καταπόνησης (Joset et al., 1996). Η αποτελεσματικότητα των αμυντικών μηχανισμών γίνεται εμφανής μετά από 30-40 ώρες, όταν τα κύτταρα επιτυγχάνουν μια νέα κατάσταση ισορροπίας που

χαρακτηρίζεται από φυσιολογική συγκέντρωση Na^+ και υψηλή συγκέντρωση σακχαρόζης στο κυτταρόπλασμα, αποκαθιστώντας έτσι τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα (Nitschmann and Packer, 1992).

Η ανθεκτικότητα του *Synechococcus elongatus* PCC7942 στη χαμηλή αλατότητα (<0,4M NaCl) έχει ενισχυθεί μέσω τροποποίησης με το γονίδιο της οξειδάσης της χολίνης (codA) από το *Arthrobacter globiformis* (Deshnium et al., 1995). Το γονίδιο codA κωδικοποιεί την οξειδάση της χολίνης, ένα ένζυμο που μετατρέπει τη χολίνη σε βεταΐνη της γλυκίνης. Τα τροποποιημένα κύτταρα του *Synechococcus elongatus* PCC7942 (στέλεχος PAMCOD) συσσωρεύουν στο κυτταρόπλασμά τους βεταΐνη της γλυκίνης ως συμβατό ωσμωλύτη, σε συγκεντρώσεις 60-80mM. Το τροποποιημένο στέλεχος PAMCOD παρουσιάζει αυξημένη ανθεκτικότητα στην αλατότητα όσον αφορά στην ανάπτυξη και στη φωτοσυνθετική δραστηριότητα (Parageorgiou and Murata, 1995; Ladas and Parageorgiou, 2000).



Εικόνα 6. Σύνθεση σακχαρόζης που προκαλείται από αλατότητα σε ένα τροποποιημένο στέλεχος του *Synechococcus elongatus* PCC7942. Πηγή: <https://english.cas.cn>

2.5.2 Θερμοκρασία

Οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας επηρεάζουν σημαντικά τη φυσιολογία των κυανοβακτηρίων, μεταβάλλοντας τα κυτταρικά συστατικά και το μεταβολισμό ανάλογα με τη διάρκεια και την έντασή τους και προκαλώντας αλλαγές στη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Ιδίως οι υψηλότερες θερμοκρασίες, προκαλούν υπερβολική ρευστότητα, οδηγώντας σε δομικές αλλαγές και διαρροή ιόντων (Yadav et al., 2022).

Μαζί με την ενίσχυση της ανθεκτικότητας των κυττάρων στην αλατότητα, οι συμβατοί ωσμωλύτες όπως η σακχαρόζη λειτουργούν και ως προστατευτικές ενώσεις έναντι ακραίων

θερμοκρασιών (Maksimov et al., 2017). Οι ωσμωλύτες παίζουν ρόλο στη σταθεροποίηση μακρομοριακών δομών, όπως οι πρωτεΐνες, μέσω του αποκλεισμού των ιόντων των αλάτων από τη σφαίρα ενυδάτωσης των πρωτεϊνών (hydration shell; Timasheff, 1993). Η σακχαρόζη εμφανίζει συγκεκριμένα προστατευτικά χαρακτηριστικά, αλληλεπιδρώντας άμεσα με τις πρωτεΐνες ή τα λιπίδια της μεμβράνης, αντικαθιστώντας τις υδροξυλομάδες των σακχάρων με νερό στο κέλυφος ενυδάτωσης (Hays and Ducat, 2015). Μαζί με την τρεχαλόζη, δρουν ως ωσμοπροστατευτικοί παράγοντες σε είδη όπως τα *Anabaena* sp. (Higo et al., 2006) και *Nostoc*, αντιμετωπίζοντας την υπερβολική ρευστότητα των μεμβρανών που προκαλεί το θερμικό στρες (Hagemann, 1997; Maksimov et al., 2017). Στο *Synechocystis* sp., η σακχαρόζη δρα επίσης ως ωσμωλύτης για την ενίσχυση της ανθεκτικότητας έναντι κυρίως της αφυδάτωσης και των υψηλών θερμοκρασιών, και δευτερεύοντως έναντι της αλατότητας (Billi et al., 2000; Hagemann and Klahn, 2011).

2.5.3 Σκοτάδι και αναερόβωση

Σε συνθήκες απουσίας φωτός, δεν είναι δυνατό για τα κυανοβακτήρια να παράγουν ενέργεια μέσω της φωτοσύνθεσης. Ωστόσο, μέσω της αερόβιας αναπνοής, είναι ικανά να διασπών οργανικά μόρια και να παράγουν ATP για τις βασικές κυτταρικές τους διεργασίες.

Επιπλέον, ορισμένα κυανοβακτήρια έχουν την ικανότητα να παράγουν ενέργεια αναερόβια, είτε σε μόνιμα ανοξικά είτε σε προσωρινά ανοξικά περιβάλλοντα, όπως κατά τη διάρκεια της νύχτας (Stal and Moezelaar, 1997). Τα είδη που ευδοκούν σε αυτές τις συνθήκες, διατηρούν το μεταβολισμό τους μέσω της αναερόβιας αναπνοής και της ζύμωσης. Μέσω της αναερόβιας αναπνοής, τα κυανοβακτήρια παράγουν ATP χρησιμοποιώντας εναλλακτικούς δέκτες ηλεκτρονίων αντί του O₂, όπως τα νιτρικά ή τα θειικά άλατα. Αντίθετα, μέσω της ζύμωσης τα κυανοβακτήρια παράγουν ATP μαζί με διάφορα μεταβολικά υποπροϊόντα, διασπώντας αποθηκευμένους υδατάνθρακες όπως το γλυκογόνο και φυσικούς ωσμωλύτες όπως η σακχαρόζη (Guerra et al., 2013; Stal and Moezelaar, 1997). Η σακχαρόζη μπορεί να μεταφερθεί όπου χρειάζεται μέσα στο κύτταρο ενώ το γλυκογόνο, ως διακλαδισμένο πολυμερές της γλυκόζης, αποτελεί μια τεράστια αποθήκη ενέργειας σε περιόδους περιορισμένου φωτισμού (Troshina et al., 2002; Welkie et al., 2018).

2.5.4 Έλλειψη αζώτου

Τα κυανοβακτήρια είναι οργανισμοί με ελάχιστες διατροφικές απαιτήσεις. Στην πλειονότητά τους, είναι υποχρεωτικώς φωτοαυτότροφα και δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό CO₂ για τη

σύνθεση των οργανικών τους ενώσεων, ενώ ορισμένα είδη είναι ικανά να αφομοιώνουν απλές οργανικές ενώσεις όπως η γλυκόζη και τα οξικά ιόντα (Brock et al., 2003). Εκτός από τον άνθρακα, το άζωτο είναι εξίσου απαραίτητο ως δομικό στοιχείο των πρωτεϊνών, των νουκλεϊκών οξέων, των φωτοσυνθετικών χρωστικών και πολλών συνενζύμων. Τα κυανοβακτήρια αξιοποιούν το άζωτο από διάφορες πηγές, συμπεριλαμβανομένων των νιτρικών αλάτων (NaNO_3), του αμμωνίου (NH_4^+), της ουρίας ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), και του μοριακού αζώτου (N_2) εάν διαθέτουν αζωτοδεσμευτική ικανότητα (Flores and Herrero, 2005). Οι μικροοργανισμοί αυτοί παρουσιάζουν αξιοσημείωτη προσαρμοστικότητα στη μεταβαλλόμενη διαθεσιμότητα αζώτου, χρησιμοποιώντας μια πληθώρα μηχανισμών εγκλιματισμού στην περίσσεια ή στην έλλειψή του. Επίσης, αυτές οι διακυμάνσεις στις πηγές αζώτου όχι μόνο διαμορφώνουν τη φυσιολογία των κυανοβακτηρίων αλλά επηρεάζουν και τον οικολογικό τους ρόλο, επιδρώντας στην ανακύκλωση των θρεπτικών συστατικών στα υδάτινα οικοσυστήματα (Flores and Herrero, 2005).

Πιο συγκεκριμένα, σε συνθήκες επάρκειας αζώτου, τα κυανοβακτήρια παρουσιάζουν μειωμένη πρόσληψη και χρησιμοποιούν μηχανισμούς για να αποτρέψουν την περίσσειά του, συμπεριλαμβανομένης της αποθήκευσής του με τη μορφή κυανοφυκίνης ή της αυξημένης έκκρισής του από το κύταρο (Brock et al., 2003). Αντίθετα, η έλλειψη αζώτου πυροδοτεί ένα φάσμα μηχανισμών εγκλιματισμού που αποσκοπούν στην αντιμετώπιση της περιορισμένης διαθεσιμότητάς του. Οι αποκρίσεις αυτές περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση μεταφορέων και ενζύμων υψηλής συγγένειας για την ενίσχυση της απορρόφησης αζώτου από το περιβάλλον, μαζί με την αναδιαμόρφωση των μεταβολικών μονοπατιών για την ιεράρχηση των βασικών κυτταρικών λειτουργιών. Ταυτόχρονα, ενεργοποιούνται ρυθμιστικοί μηχανισμοί και γονίδια που διαμορφώνουν τις κυτταρικές δομές για την προσαρμογή στην έλλειψη. Αυτή η διαμόρφωση περιλαμβάνει προσαρμογές στο μέγεθος των κυττάρων, στη μορφολογία και στην παραγωγή αποθηκευτικών ενώσεων (Forchhammer and Schwarz, 2019). Επιπλέον, στα μη αζωτοδεσμευτικά κυανοβακτήρια, ο περιορισμός του αζώτου προκαλεί σημαντική αύξηση της ενδοκυτταρικής αποθήκευσης γλυκογόνου (Troshina et al. 2002), η οποία ανέρχεται περίπου στο 50% του κυτταρικού ξηρού βάρους σε ορισμένα είδη ή υπό συγκεκριμένες συνθήκες (Suzuki et al., 2010). Για παράδειγμα, στον *Synechococcus elongatus* PCC7942, η στέρηση αζώτου σε συνθήκες που ευνοούν τη φωτοσύνθεση οδηγεί στη συσσώρευση του γλυκογόνου που μπορεί να φθάσει στο 40-60% του ξηρού βάρους του κυττάρου. Αυτή η απόκριση συνήθως συνοδεύεται και από την πρωτεολυτική αποικοδόμηση

των φυκοβιλιωμάτων, οδηγώντας σε χλώρωση (Suzuki et al., 2007). Στα κύτταρα των *Synechococcus* sp. και *Synechocystis* sp., η ορατή απώλεια των φωτοσυνθετικών χρωστικών αρχίζει κατά την αρχική φάση της χλώρωσης, συνήθως μέσα σε λίγες ώρες μετά τη στέρηση αζώτου (Antal et al., 2005; Khanna et al., 2015). Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης "λεύκανσης", σχεδόν το 50% του περιεχομένου των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών στο *S. elongatus* αποικοδομείται, παρέχοντας συμπληρωματικό άζωτο για τη διατήρηση του κυτταρικού μεταβολισμού και της ανάπτυξης. Ωστόσο, η χλώρωση δεν οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Αντίθετα, κατά τη διάρκεια παρατεταμένης έλλειψης αζώτου, τα κύτταρα μεταπίπτουν σταδιακά σε μια αδρανή κατάσταση, διατηρώντας τη βιωσιμότητά τους για παρατεταμένες περιόδους, που μερικές φορές διαρκούν μήνες (Hickman et al., 2013).

3. Κύτταρα-εργοστάσια

3.1 Παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας από κυανοβακτήρια

Μέσω της φωτοσύνθεσης, τα κυανοβακτήρια μετατρέπουν ανόργανα στοιχεία όπως το CO₂, τα νιτρικά και τα φωσφορικά ιόντα σε βιομάζα. Αυτή η διαδικασία οδηγεί στην παραγωγή πρωτογενών μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένων υδατανθράκων, λιπιδίων και πρωτεϊνών, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τις βασικές τους φυσιολογικές διεργασίες. Επιπλέον, συντίθενται περίπου 2000 δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως τερπένια, καροτενοειδή, αλκαλοειδή και πρόσθετα λιπίδια, με ποικίλες βιοδραστικές ιδιότητες (αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιμικροβιακή και αντιαγκιακή δράση). Τα κυανοβακτήρια παράγουν επίσης τοξίνες, βιταμίνες και ένζυμα, που επιτελούν συγκεκριμένες λειτουργίες στο μεταβολισμό τους, στους αμυντικούς μηχανισμούς και σε άλλες βασικές βιολογικές διεργασίες (Kim Tiam et al., 2019; Jones et al., 2021). Κατά συνέπεια, τα τελευταία χρόνια τα κυανοβακτήρια προσελκύουν όλο και περισσότερη προσοχή ως ζωντανά κύτταρα-εργοστάσια για την παραγωγή βιοχημικών ουσιών εμπορικού ενδιαφέροντος σε διάφορους βιοτεχνολογικούς τομείς (Gao et al., 2012; Tan et al., 2011, Vayenos et al., 2020; Santos-Merino et al., 2023). Χαρακτηριστικά, συμβάλλουν στην παραγωγή τροφίμων, βιοδιασπώμενων πλαστικών (πολυϋδροξυαλκανοειδή; PHA's), φαρμακευτικών και χρωστικών ουσιών, όπως και σε εφαρμογές υδατοκαλλιεργειών και επεξεργασίας λιπασμάτων (Smith et al., 2014; Rastogi et al., 2014; Kim Tiam et al., 2019).

Παράλληλα, ένα από τα πιο αναπτυσσόμενα πεδία εφαρμογής αυτών των μικροοργανισμών είναι και η σύνθεση καυσίμων. Από τα κυανοβακτήρια μπορούν να παραχθούν υδρογονάνθρακες όπως αλκάνια και αλκένια, syngas (μείγμα μονοξειδίου του άνθρακα και H_2), λιπαρά οξέα για την παραγωγή βιοντίζελ και ισοπρενοειδή (ισοπρένιο και τερπενοειδή) (Formighieri and Melis, 2016) που μπορούν να χρησιμεύσουν ως πρόδρομοι σύνθετων βιοκαυσίμων (Knoot et al., 2018). Ακόμα, μπορούν να παραχθούν καύσιμα με ελάχιστο περιβαλλοντικό αποτύπωμα, όπως η αιθανόλη και το H_2 (Wang et al., 2013; Zhu et al., 2015; Vayenos et al., 2020, Sadvakasova et al., 2020).

Τα μοναδικά χαρακτηριστικά των κυανοβακτηρίων τα τοποθετούν σε πλεονεκτική θέση σε σύγκριση με τα μικροφύκη και τα φυτά ως προς την εκτεταμένη *ex situ* καλλιέργεια. Τα κυανοβακτήρια χαρακτηρίζονται από ταχύτερη ανάπτυξη, μεγαλύτερη φωτοσυνθετική απόδοση ανά μονάδα επιφάνειας και ευέλικτο μεταβολισμό (Gao et al. 2012; Tan et al. 2011; Wang et al. 2013; Zhu et al. 2015). Επιπλέον, μπορούν να καλλιεργηθούν σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. θερμοκρασία, πίεση, αλατότητα, pH, χημική σύσταση) και σε πηγές νερού ακατάλληλες για τη γεωργία, μειώνοντας τον ανταγωνισμό με τις καλλιέργειες τροφίμων για την περιορισμένη καλλιεργήσιμη γη και το γλυκό νερό (Catone et al. 2021; Santos-Merino et al. 2019, 2023). Ταυτόχρονα, τα κυανοβακτήρια είναι εξαιρετικά αποτελεσματικά στην αφομοίωση του CO_2 του περιβάλλοντος, συμβάλλοντας καθοριστικά στην αντιμετώπιση των υπερβολικών επιπέδων ατμοσφαιρικού διοξειδίου του άνθρακα (Knoot et al., 2018).

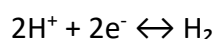
3.2 Παραγωγή H_2 από κυανοβακτήρια

3.2.1 Ένζυμα

Η ικανότητα ορισμένων μικροοργανισμών να μεταβολίζουν μοριακό υδρογόνο (H_2) ανακαλύφθηκε στα τέλη του 19ου αιώνα. Τα κυανοβακτήρια και τα πράσινα φύκη, όπως και άλλα βακτήρια, αρχαία και μύκητες, διαθέτουν ένζυμα για την παραγωγή H_2 με διαφορετική δραστηριότητα, ωρίμανση και δομική ποικιλομορφία ανάλογα με το είδος. Οι περισσότερες έρευνες στα κυανοβακτήρια επικεντρώνονται στα μεταβολικά χαρακτηριστικά των αζωτοδεσμευτικών ειδών (Khanna et al., 2015), ωστόσο η ανίχνευση ενζύμων μεταβολισμού του H_2 σε μονοκύτταρα μη αζωτοδεσμευτικά είδη έχει επίσης προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών (Sadvakasova et al., 2020). Οι δύο βασικές κατηγορίες ενζύμων που εμπλέκονται με το μεταβολισμό του H_2 είναι οι νιτρογενάσες και οι υδρογενάσες.

Οι νιτρογενάσες απαντώνται μόνο στα αζωτοδεσμευτικά κυανοβακτήρια, καταλύοντας την αναγωγή του ατμοσφαιρικού αζώτου σε αμμωνία και την παραγωγή του H₂ ως παραπροϊόντος (Tamagnini et al., 2002). Η αζωτοδέσμευση, είναι μια άκρως ενδεδειγμένη αντίδραση που απαιτεί μεταβολική ενέργεια με τη μορφή ATP. Επιπλέον, η νιτρογενάση είναι πολύ ευαίσθητη στο O₂ και τα αζωτοδεσμευτικά κυανοβακτήρια έχουν αναπτύξει διαφορετικούς μηχανισμούς για να προστατεύουν το ενζυμικό σύμπλοκο από τις επιβλαβείς επιδράσεις του ατμοσφαιρικού O₂, αλλά και του O₂ που παράγεται με τη φωτοσύνθεση. Σε ορισμένα κυανοβακτήρια η δέσμευση του αζώτου μπορεί να λάβει χώρα μόνο υπό ανοξικές συνθήκες, ενώ σε άλλα έχει παρατηρηθεί χωρικός ή χρονικός διαχωρισμός της φωτοσύνθεσης και της αζωτοδέσμευσης. Συγκεκριμένα, σε πολλά νηματώδη κυανοβακτήρια ο χωρικός διαχωρισμός των δύο διαδικασιών επιτυγχάνεται με τη δημιουργία εξειδικευμένων δομών που διασφαλίζουν τις αναερόβιες συνθήκες για τη δέσμευση του αζώτου, των ετεροκύστεων. Αντίθετα, για τα κυανοβακτήρια που δε σχηματίζουν ετεροκύστες, ο χρονικός διαχωρισμός των δύο διαδικασιών είναι πιο διαδεδομένος. Σε αυτή την περίπτωση, η δέσμευση του αζώτου λαμβάνει χώρα σε περιόδους μειωμένης διαθεσιμότητας οξυγόνου ή στο σκοτάδι, ώστε να αποφεύγεται η αναστολή από το οξυγόνο που παράγεται κατά τη φωτοσύνθεση (Tamagnini et al., 2002).

Οι υδρογενάσες απαντώνται σε αζωτοδεσμευτικά, όπως και σε μη αζωτοδεσμευτικά κυανοβακτήρια. Έχουν επίσης παρατηρηθεί και χαρακτηριστεί σε πολλούς άλλους μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων φυκών, τριχομονάδων, αναερόβιων βλεφαριδοφόρων και χιτριδιομυκήτων. Τα ένζυμα αυτά μπορεί να είναι είτε σταθερά παρόντα είτε επαγωγίμα (η σύνθεση των ενζύμων πραγματοποιείται υπό συγκεκριμένες συνθήκες; Dagan et al., 2008), και καταλύουν μια θεμελιώδη χημική αντίδραση, τον αντιστρεπτό αναγωγικό σχηματισμό H₂ από πρωτόνια και ηλεκτρόνια (Tamagnini et al., 2002):



Οι γνωστές υδρογενάσες ταξινομούνται σε τρεις ομάδες με βάση τη δομή των ενεργών κέντρων τους: τις [NiFe]-υδρογενάσες (υδρογενάσες νικελίου-σιδήρου), τις [FeFe]-υδρογενάσες (υδρογενάσες σιδήρου-σιδήρου) και τις [Fe]-υδρογενάσες (υδρογενάσες σιδήρου) (Forzi and Sawers, 2007). Οι περισσότερες υδρογενάσες στους φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των κυανοβακτηρίων, ανήκουν στις [NiFe]-υδρογενάσες (Sadvakasova et al., 2020).

Τα κυανοβακτήρια μπορεί να διαθέτουν δύο διαφορετικές [NiFe]-υδρογενάσες: μια υδρογενάση πρόσληψης (HupSL) που βρίσκεται κυρίως στα αζωτοδεσμευτικά στελέχη και μια αμφίδρομη υδρογενάση (HoxEFUYH) που υπάρχει τόσο σε αζωτοδεσμευτικά όσο και σε μη αζωτοδεσμευτικά στελέχη, όπως και σε διάφορα βακτήρια και αρχαία (Baymann et al., 2003; Vignais et al., 2001). Η υδρογενάση πρόσληψης εμπλέκεται στην αντίδραση μονόδρομης κατανάλωσης του H₂ που παράγεται από τη νιτρογενάση στα αζωτοδεσμευτικά κυανοβακτήρια, ενώ η αμφίδρομη υδρογενάση καταλύει την αμφίδρομη αντίδραση κατανάλωσης, αλλά και παραγωγής H₂. Η αμφίδρομη [NiFe]-υδρογενάση αποτελείται από ένα τμήμα υδρογενάσης και ένα τμήμα διαφοράσης, ενώ η βιοσύνθεση και η ωρίμανσή της είναι εξαιρετικά πολύπλοκη, απαιτώντας αρκετές συνεργιστικές πρωτεΐνες (Tamagnini et al., 2007).

Οι υδρογενάσες, ιδιαίτερα οι αμφίδρομες, είναι και αυτές ευπαθείς στο μοριακό O₂ (η Hox-υδρογενάση απουσιάζει από τα κυανοβακτήρια της επιφάνειας ωκεανών) (Baymann et al., 2003). Ωστόσο, είναι πιο ανεκτικές σε σύγκριση με τις νιτρογενάσες και αδρανοποιούνται αντιστρεπτά από το O₂, παραμένοντας σταθερές σε θερμοκρασίες έως και 70°C (Houchins et al., 1981; Serebryakova et al., 1996). Ο ακριβής ρόλος των αμφίδρομων υδρογενάσεων στα κυανοβακτήρια παραμένει ασαφής. Προτείνεται ότι συμμετέχουν τόσο στη ζύμωση, απελευθερώνοντας την περίσσεια αναγωγικής δύναμης κατά την αναερόβια ανάπτυξη (Antal et al., 2005), όσο και στη φωτοσύνθεση, λειτουργώντας ενδεχομένως ως βαλβίδα εκτόνωσης της περίσσειας ηλεκτρονίων (Appel et al., 2000). Η αμφίδρομη [NiFe]-υδρογενάση Hox αποτελείται από ένα σύμπλοκο που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες HoxE, HoxF, HoxU, HoxY και HoxH. Στο σύμπλοκο HoxYH, η πρωτεΐνη HoxH περιέχει ένα καταλυτικό κέντρο για την οξείδωση του H₂. Η HoxY περιέχει ένα σύμπλοκο [Fe₄S₄], το οποίο διευκολύνει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από και προς το καταλυτικό κέντρο. Τα ηλεκτρόνια απελευθερώνονται από το ενεργό κέντρο της HoxH μέσω της μικρής υπομονάδας HoxY και μέσω των HoxEFU συμπλόκων σιδήρου-θείου. Αυτή η υδρογενάση αλληλεπιδρά άμεσα με το NAD(P), ανάγοντάς το παρουσία H₂ ή αντίστροφα, σχηματίζοντας H₂ παρουσία NADH και NADPH (Khetkorn et al., 2012).

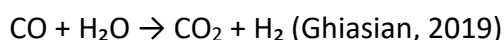
Μία αμφίδρομη H1 [NiFe]-υδρογενάση HoxEFUYH (συνδεδεμένη μόνο με την αναπνευστική μεταφορά ηλεκτρονίων στην κυτταρική μεμβράνη) και μία [NiFe]-υδρογενάση πρόσληψης HupSL, έχουν αναγνωρισθεί στα στελέχη *Synechocystis* sp. PCC6714 (Schmitz et al., 2001;

Bothe et al., 1999) και *Synechococcus elongatus* PCC7942 (συμπεριλαμβανομένου του PAMCOD) (Schmitz et al., 2001; Frenkel et al., 1950; Peschek, 1979a, b, c).

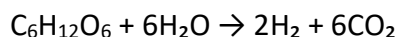
3.2.2 Μέθοδοι παραγωγής H₂ ex situ

Η παραγωγή H₂ ex situ από μικροοργανισμούς (συμπεριλαμβανομένων των κυανοβακτηρίων), είναι εφικτή μέσω διάφορων μεθόδων. Οι πιο διαδεδομένες, είναι η αντίδραση αλλαγής νερού-αερίου, η σκοτεινή ζύμωση, η φωτοζύμωση, η άμεση και η έμμεση βιοφωτόλυση (Das et al., 2001; Hallenbeck et al., 2002; Nandi et al., 1998; Levin et al., 2004).

Η αντίδραση αλλαγής νερού-αερίου, παράγει H₂ μέσω της μετατροπής του CO σε CO₂ από ατμό. Ορισμένα φωτοετεροτροφικά βακτήρια, όπως αυτά της οικογένειας *Rhodospirillaceae* (Holladay et al., 2009) και τα θετικά κατά Gram βακτήρια, όπως το *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* (Lazarus et al. 2009), είναι ικανά να εκτελούν την αντίδραση αλλαγής νερού-αερίου σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ατμοσφαιρική πίεση. Αυτά τα βακτήρια μπορούν να επιβιώσουν στο σκοτάδι χρησιμοποιώντας το CO ως μοναδική πηγή άνθρακα για την παραγωγή ATP, συνδέοντας την οξείδωση του CO με την αναγωγή του H⁺ σε H₂ σε μια εξώθερμη αντίδραση (Holladay et al. 2009):

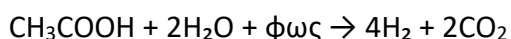


Η σκοτεινή ζύμωση, είναι μια αναερόβια διαδικασία ανεξάρτητη από το φως, που χρησιμοποιεί υδατάνθρακες ή άλλα οργανικά υποστρώματα για την παραγωγή ενέργειας από πολλούς υποχρεωτικά και προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς (π.χ. *Clostridium* sp., *Enterobacter* sp.), όπως και από ορισμένα κυανοβακτήρια (*Synechocystis* sp. PCC6803, *Nostoc* sp., *O. terebriformis*, *M. aeruginosa* και κάποια συμβιωτικά είδη) (Stal and Moezelaar, 1997; Yamamoto et al., 2013). Οι υδατάνθρακες (γλυκόζη), τα αμινοξέα και τα λιπαρά οξέα, παρέχουν άνθρακα και ενέργεια για την παραγωγή H₂, CO₂ με CH₄ ή H₂S και άλλων αναγωγικών τελικών προϊόντων. Σε ανοξικές συνθήκες, τα πρωτόνια (H⁺) ανάγονται σε H₂, ενεργώντας ως δέκτες ηλεκτρονίων αντί του O₂.

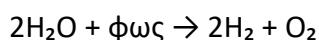


Στη φωτοζύμωση, μια διαδικασία που εξαρτάται από το φως, χρησιμοποιούνται γενετικά τροποποιημένα κυανοβακτήρια και μη οξυγονικά φωτοσυνθετικά βακτήρια (PNS; π.χ. *Rhodobacter sphaeroides* O.U001, *Rhodobacter capsulatus*, *R. sphaeroides*-RV, *Rhodobacter*

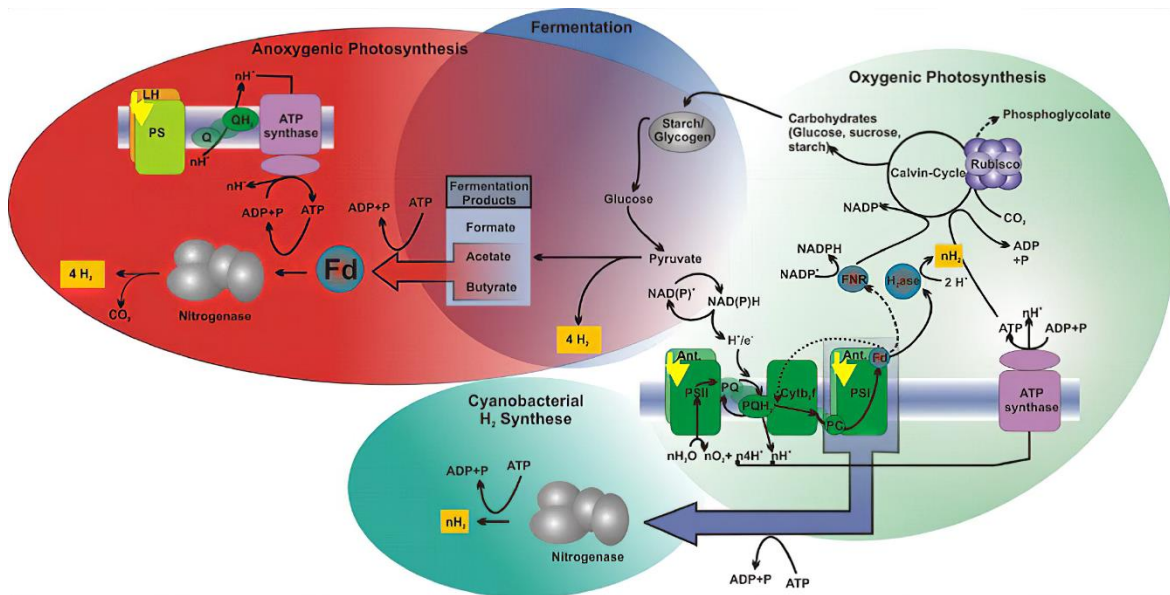
sulfidophilus, *Rhodopseudomonas palustris* και *Rhodospirillum rubrum*) για την παραγωγή H₂ (Singh et al. 2022). Η διεργασία αυτή βασίζεται σε ανηγμένες ενώσεις που λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων, όπως τα οργανικά οξέα (οξικό, γαλακτικό, βουτυρικό, μηλικό, ηλεκτρικό κ.λπ.), τα σάκχαρα (γλυκόζη, σακχαρόζη) και το υδρόθειο (H₂S) (Argun and Kargi 2011). Το φως είναι απαραίτητο για τη φωτοετεροτροφική μετατροπή των ενώσεων του υποστρώματος σε CO₂ και H₂ (Srirangan et al. 2011). Η αντίδραση όταν στο μέσο ζύμωσης υπάρχει οξικό οξύ είναι η εξής (Ghiasian, 2019):



Η βιοφωτόλυση, μια επίσης φωτοεξαρτώμενη διαδικασία, αξιοποιεί την ικανότητα των φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών να δεσμεύουν το φως για τη διάσπαση του νερού σε O₂ και H₂. Συγκεκριμένα, κατά την άμεση βιοφωτόλυση, τα απαραίτητα ηλεκτρόνια για την παραγωγή H₂ παρέχονται απευθείας από το PSII που διασπά το νερό μέσω της γραμμικής ροής ηλεκτρονίων. Τα πρωτόνια και τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν από τη διάσπαση χρησιμοποιούνται από το ένζυμο της υδρογενάσης για τη μετατροπή H⁺ σε H₂ (Srirangan et al., 2011; Sadvakasova et al., 2020):



Ωστόσο, στα μικροφύκη και στα κυανοβακτήρια η μέθοδος περιορίζεται από την ταυτόχρονη απελευθέρωση O₂, στο οποίο οι υδρογενάσες είναι ιδιαίτερα ευπαθείς. Για το λόγο αυτό, η παραγωγή H₂ μέσω άμεσης φωτόλυσης στα κυανοβακτήρια διαρκεί μόνο μερικά δευτερόλεπτα, κατά τη διάρκεια μιας μετάβασης από το σκοτάδι στο φως (Cournac et al. 2004).



Εικόνα 7. Παραγωγή H₂ στα κυανοβακτήρια με αερόβιες και αναερόβιες μεθόδους. Πηγή: <http://www.kg-applchem.jp>

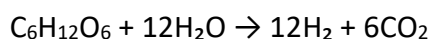
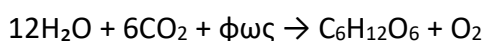
Σε επίπεδο εφαρμογής, λόγω των δυσχεριών στο σχεδιασμό φωτοβιοαντιδραστήρων στους οποίους να μην επικρατούν συνθήκες σκίασης και χαμηλής αξιοποίησης του φωτισμού, η βιοφωτόλυση και οι φωτοζυμωτικές διεργασίες αντιμετωπίζουν προβλήματα (Wang and Wan, 2009; Ullhiza et al., 2017). Αντίθετα, η σκοτεινή ζύμωση λειτουργεί ανεξάρτητα από τη φωτεινή ενέργεια, με αποτέλεσμα το εκτιμώμενο κόστος παραγωγής H₂ να είναι 340 φορές χαμηλότερο από εκείνο των φωτοσυνθετικών διεργασιών, καθιστώντας την μια πιο αποτελεσματική προσέγγιση (Morimoto et al., 2002; Ullhiza et al., 2017). Ωστόσο, η σκοτεινή ζύμωση δεν έχει διαδοθεί ευρέως λόγω της χαμηλής παραγωγικότητας H₂. Ο μεταβολισμός των μικροβίων και η βιωσιμότητα της διαδικασίας μπορούν να περιοριστούν σημαντικά από διάφορες τοξικές ενώσεις, μικροθρεπτικά και μακροθρεπτικά συστατικά, ιόντα μετάλλων, οργανικά οξέα, την υψηλή θερμοκρασία, το όξινο pH και τα ανταγωνιστικά μικρόβια (Bolatkhani et al., 2019). Στη σκοτεινή ζύμωση χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο εξωγενή οργανικά υποστρώματα, των οποίων η καταλληλότητα εξαρτάται από παράγοντες όπως η διαθεσιμότητα, η αποδοτικότητα, η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και η βιοαποικοδομησιμότητα. Η γλυκόζη, η σακχαρόζη, και σε μικρότερο βαθμό το άμυλο και η κυτταρίνη, έχουν διερευνηθεί εκτενώς ως υποστρώματα ζύμωσης σε εργαστηριακές συνθήκες λόγω της εύκολης βιοαποικοδομησιμότητάς τους και της αφθονίας τους μέσα σε απόβλητα και γεωργικά υπολείμματα. Η αξιοποίηση όμως τέτοιων σύνθετων στερεών αποβλήτων από μικτές ή αμιγείς καλλιέργειες, οδηγεί στην παραγωγή H₂ μέσω δύο βασικών μονοπατιών: (α) του οξικού μονοπατιού που έχει θεωρητική απόδοση 4 mol H₂ από 1 mol

γλυκόζης και (β) του βουτυρικού μονοπατιού με θεωρητική απόδοση 2 mol H₂ από 1 mol γλυκόζης (Ghiasian, 2019). Έτσι, η υδρόλυση των πολύπλοκων πολυμερών μακράς αλυσίδας (υδατανθράκων, πρωτεϊνών και λιπιδίων), συνήθως αποδίδει χαμηλές ποσότητες H₂, με ταυτόχρονη σύνθεση διάφορων μεταβολικών υποπροϊόντων, όπως οξικού οξέος, προπιονικού οξέος, βουτυρικού οξέος, γαλακτικού οξέος και άλλων πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs) και αλκοολών (Mizuno et al., 2000; Ueno et al., 2001; Fang et al., 2002; Bolatkhan et al., 2019; Kayfeci et al., 2019).

Τα υβριδικά συστήματα παραγωγής H₂ συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα των φωτολυτικών και των ζυμωτικών μεθόδων. Ορισμένα από αυτά μπορούν να αξιοποιήσουν τις ιδιότητες φωτοσυνθετικών και μη φωτοσυνθετικών οργανισμών, συνδυάζοντας τη φωτοζύμωση με τη σκοτεινή ζύμωση. Σε ένα τέτοιο σύστημα, η αναερόβια ζύμωση υδατανθράκων (ή οργανικών αποβλήτων) παράγει ενδιάμεσα προϊόντα, όπως βουτυρικό, οξικό και προπιονικό οξύ, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε H₂ από τα φωτοσυνθετικά βακτήρια σε φωτοβιοαντιδραστήρα (Chaubey et al., 2013; Nikolaidis and Poullikkas, 2017). Ωστόσο, τα περισσότερα υβριδικά συστήματα λειτουργούν μόνο με φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς, συνδυάζοντας φωτολυτικές με ζυμωτικές μεθόδους. Η πιο διαδεδομένη υβριδική μέθοδος, είναι η έμμεση βιοφωτόλυση (Ghiasian et al., 2019). Η διαδικασία περιλαμβάνει δύο στάδια: τη φωτοσύνθεση, που ανάγει το CO₂ σε υδατάνθρακες (άμυλο στα φύκη και γλυκογόνο στα κυανοβακτήρια) και συνοδεύεται από την έκλυση O₂, και τη σκοτεινή ζύμωση, που μετατρέπει τους αποθηκευμένους υδατάνθρακες σε H₂ (Brentner et al., 2010; Ghirardi, 2015; Khanna et al., 2015; Singh and Das, 2019). Με αυτό τον τρόπο, η έμμεση βιοφωτόλυση διαχωρίζει χωρικά ή χρονικά την έκλυση του O₂ από την έκλυση του H₂ στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, εξασφαλίζοντας την προστασία των ευπαθών ενζύμων από το μοριακό O₂, καθώς και η ελάχιστη παρουσία O₂ στη ζύμωση, καταναλώνεται με την αναπνοή (Khetkorn et al., 2013).

Με την έμμεση βιοφωτόλυση, τα ένζυμα που εμπλέκονται στην παραγωγή H₂ δεν απαιτούν εξωγενή υποστρώματα ζύμωσης, αφού αξιοποιούν τα μεταβολικά προϊόντα των φωτοσυνθετικών αντιδράσεων (Stal and Moezelaar, 1997) και συγκεκριμένα αναγωγικά που παράγονται από το νερό (Show et al., 2019). Αυτά τα μεταβολικά προϊόντα είναι ενδογενείς υδατάνθρακες που μπορούν να αξιοποιηθούν ως υποστρώματα μόνο μετά τον καταβολισμό τους σε γλυκόζη (Stal and Moezelaar, 1997). Ακολούθως, η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων που σχετίζεται με τη διάσπαση της γλυκόζης διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην παραγωγή H₂

(Levin et al., 2004). Η γλυκόζη με τη ζύμωσή της, οδηγεί στη συσσώρευση NADH ή NADPH (Khanna et al., 2015; De Porcellinis et al., 2017; Baebprasert et al., 2010; Taikhao et al., 2013) και χρησιμεύει ως πηγή ηλεκτρονίων και ATP για την αμφίδρομη υδρογενάση Hox. Αρχικά, η γλυκόζη μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό παράγοντας τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) από διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και την ανηγμένη μορφή του δινουκλεοτιδίου νικοτιναμιδίου αδενίνης (NADH). Στη συνέχεια, το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε ακετυλο-συνένζυμο Α (ακετυλο-CoA), CO₂ και H₂ από την οξειδοαναγωγή της φερρεδοξίνης του πυροσταφυλικού και την υδρογενάση (Ghimire et al. 2015). Το πυροσταφυλικό μπορεί επίσης να μετατραπεί σε ακετυλο-CoA και μυρμηκικό οξύ με τη χρήση του ενζυμικού συμπλόκου πυροσταφυλικού-φορμικού-υδρογενάσης (PFHL), το οποίο μπορεί να μετατραπεί περαιτέρω σε H₂ και CO₂ από εντερικά βακτήρια όπως η *Escherichia coli* (Turner et al. 2008; Stal and Moezelaar, 1997).



Στην πλειονότητά τους, τα κυανοβακτήρια είναι υποχρεωτικά φωτοαυτότροφα, συσσωρεύοντας γλυκογόνο το οποίο χρησιμεύει ως πηγή ενέργειας στο σκοτάδι. Άλλα θαλάσσια κυανοβακτήρια, μπορούν να χρησιμοποιούν τις ωσμωπροστατευτικές τους ενώσεις ως υποστρώματα ζύμωσης, όπως έχει αποδειχθεί για το *Oscillatoria Limosa* και το *Microcoleus chthonoplastes* (Stal and Moezelaar, 1997). Με τον ίδιο τρόπο, κυανοβακτήρια του γλυκού νερού που υπόκεινται σε ωσμωτική καταπόνηση μπορούν να συνθέσουν ωσμωπροστατευτικές ενώσεις και να τις χρησιμοποιήσουν ως υποστρώματα ζύμωσης, όπως το *S. elongatus* PCC7942 (στέλεχος PAMCOD) (Vayenos et al., 2020). Το στέλεχος PAMCOD έχει χαρακτηριστεί ως "κύτταρο-εργοστάσιο", συσσωρεύοντας σακχαρόζη κατά τη φωτοσύνθεσή του σε καταπόνηση αλατότητας και διαθέτοντας όλα τα απαραίτητα ενδογενή ένζυμα για την υδρόλυση της σακχαρόζης και την παραγωγή H₂. Η φωτοσύνθεση και η απελευθέρωση H₂ λαμβάνουν χώρα στο ίδιο κύτταρο και διαχωρίζονται χρονικά σε δύο φάσεις. Στην πρώτη φάση, η φωτοσύνθεση σε καταπόνηση αλατότητας επάγει τη συσσώρευση σακχαρόζης και στη δεύτερη φάση, η σκοτεινή ζύμωση προκαλεί την υδρόλυση της σακχαρόζης και παράγει H₂. Ειδικότερα, η ενδογενής αλκαλική/ουδέτερη ιμβερτάση (A/N-Inv) (Vayenos et al., 2020; Kolman et al., 2015), καταλύει τη μη αντιστρεπτή υδρόλυση της συσσωρευμένης σακχαρόζης σε εξόζες (γλυκόζη και φρουκτόζη). Η γλυκόλυση των εξοζών οδηγεί στο σχηματισμό NADPH και αναγωγή του H⁺ σε H₂ από το NADPH με τη μεσολάβηση της ενδογενούς αμφίδρομης [NiFe]-υδρογενάσης (Vayenos et al., 2020).

3.2.3 Είδη κυανοβακτηρίων που παρουσιάζουν προοπτικές για την παραγωγή H₂

Πολλά φωτολυτικά, ζυμωτικά και υβριδικά συστήματα παρουσιάζουν προοπτικές για την παραγωγή H₂ με κυανοβακτήρια, εμπλέκοντας ένα ευρύ φάσμα ειδών και στελεχών. Η αποτελεσματικότητα της παραγωγής εξαρτάται από το είδος του κυανοβακτηρίου και τη γενετική του τροποποίηση, τη βιωσιμότητα των καλλιεργειών του και τις μεταβολικές του δυνατότητες σε ελεγχόμενες συνθήκες και με διάφορες προσαρμογές. Αυτές συμπεριλαμβάνουν την έκθεσή του στο φως, τη θερμοκρασία, το αέριο μείγμα και το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και ζύμωσης (pH, θρεπτικά συστατικά, αλατότητα, αναστολείς κ.ά.). Επί του παρόντος, περισσότερα από 14 γένη κυανοβακτηρίων έχουν μελετηθεί για παραγωγή H₂ σε διάφορες συνθήκες (Sadvakasova et al., 2020).

Τα αζωτοδεσμευτικά νηματώδη κυανοβακτήρια του γένους *Anabaena* παρουσιάζουν ικανότητα αυξημένης παραγωγής H₂ με εφαρμογές άμεσης και έμμεσης βιοφωτόλυσης. Τα κύτταρα *Anabaena cylindrica* παράγουν ταυτόχρονα H₂ και O₂ υπό συνθήκες χαμηλής έντασης φωτισμού σε ατμόσφαιρα αργού για 30 ημέρες (Jeffries et al., 1978; Dutta et al., 2005), ενώ επιτυγχάνουν προσωρινά την υψηλότερη παραγωγή H₂ απουσία αζώτου, αποδίδοντας 30 ml H₂ L⁻¹ h⁻¹ (Sadvakasova et al., 2020). Επιπλέον, το *Anabaena variabilis* PK84 μπορεί να παράγει 167.6 mmol H₂ ·mg chl⁻¹ h⁻¹ με παροχή συγκεκριμένου μίγματος αερίων κατά την ανάπτυξη (Fedorov et al., 2001; Sveshnikov et al., 1997). Το *Anabaena variabilis* ATCC 29413 παρουσιάζει επίσης αξιοσημείωτη παραγωγή H₂ (45.16 mmol H₂ ·mg chl⁻¹ h⁻¹) (Kamshybayeva et al., 2022). Τα είδη *Nostoc*, επίσης αζωτοδεσμευτικά νηματώδη κυανοβακτήρια, παρουσιάζουν βραχυπρόθεσμη απελευθέρωση H₂ με αποδόσεις που κυμαίνονται από 0.17 έως 0.60 mmol H₂ ·mg chl⁻¹ h⁻¹ (Sadvakasova et al., 2020).

Ανάμεσα στα μονοκύτταρα αζωτοδεσμευτικά κυανοβακτήρια, τα είδη *Cyanothece* είναι εξαιρετικά παραγωγικά με ρυθμό παραγωγής έως και 465 mmol H₂ ·mg chl⁻¹ h⁻¹ παρουσία γλυκερόλης ως πηγής άνθρακα (Kufryk, 2013). Το *Gloeocapsa alpicola* εμφανίζει επίσης αυξημένη παραγωγή H₂ υπό συνθήκες έλλειψης θείου (0.58 μmol H₂ ·mg πρωτεΐνης⁻¹) (Dutta et al., 2005), ενώ το *Aphanothece halophytica*, ένα αλατανθεκτικό μονοκύτταρο κυανοβακτήριο, είναι ικανό να παράγει 82.79 nmol H₂ ·mg ξηρού βάρους⁻¹ h⁻¹ (Taikhao et al., 2015).

Μεταξύ των μη αζωτοδεσμευτικών ειδών, το στέλεχος *Oscillatoria* sp. Miami BG7 είναι το πιο εκτενώς μελετημένο νηματώδες είδος, το οποίο εμφανίζει μέγιστο ρυθμό παραγωγής 260

$\mu\text{mol H}_2 \cdot \text{mg chl}^{-1} \text{h}^{-1}$ μέσω βιοφωτόλυσης (Heyer et al., 1989; Philips et al., 1983; Kossalbayev et al., 2020).

Το μονοκύτταρο μη αζωτοδεσμευτικό *Arthrospira (Spirulina platensis)*, παράγει 1 $\mu\text{mole H}_2/12 \text{ hr/mg}$ ξηρού βάρους σε πλήρως αναερόβιες συνθήκες στο σκοτάδι (Kamshybayeva et al., 2022). Άλλα μονοκύτταρα μη αζωτοδεσμευτικά στελέχη *Synechocystis*, ιδίως το PCC6803, έχουν ερευνηθεί διεξοδικά, παρουσιάζοντας υψηλές αποδόσεις με εφαρμογές άμεσης ($2.23 \text{ H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (McCormick et al., 2013) και έμμεσης βιοφωτόλυσης ($40.6 \mu\text{mol mg Chl}^{-1} \text{h}^{-1}$) (Τουλουράκης et al., 2016). Το *Synechocystis* sp. PCC6714, όταν τροφοδοτείται με αργό και CO σε συνθήκες φωτός, αποδίδει $0.07 \mu\text{mol H}_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Howarth and Codd 1984; Dutta et al., 2005).

Από τα είδη *Synechococcus*, το *S. elongatus* PCC7942 έχει μελετηθεί εκτενώς για την παραγωγή H_2 (Sadvakasova et al., 2020). Ωστόσο, η παραγωγή H_2 από το *S. elongatus* PCC7942 παραμένει χαμηλή, πιθανώς λόγω της μειωμένης δραστηριότητας της υδρογενάσης σε φωτοεξαρτώμενες εφαρμογές ή του κυρίαρχου ρόλου άλλων ενώσεων στην κατανάλωση αναγωγικών ισοδυνάμων (Suzuki et al., 2010). Για την αντιμετώπιση της ευπάθειας της υδρογενάσης στο O_2 και την ενίσχυση της παραγωγικότητας του H_2 , έχουν σχεδιαστεί ορισμένες γενετικές και μεταβολικές βελτιώσεις, όπως η φωτοεξαρτώμενη αναερόβια παραγωγή H_2 σε μεταλλαγμένα στελέχη του *S. elongatus* PCC7942 που δε συνθέτουν γλυκογόνο και χρησιμοποιούν αναγωγικά ισοδύναμα για την απελευθέρωση του H_2 . Επίσης, έχει διερευνηθεί η παρεμπόδιση της φωτοσυνθετικής λειτουργίας του *S. elongatus* PCC7942 με καταπόνηση θείου για τη δημιουργία του απαραίτητου αναερόβιου περιβάλλοντος για την παραγωγή H_2 . Ακόμα, έχουν γίνει προσπάθειες έκφρασης γονιδίων υδρογενασών με ανθεκτικότητα στο O_2 , σε κύτταρα του *S. elongatus*. Με εξαίρεση την ετερόλογη έκφραση υδρογενάσης από την *Thiocapsa roseopersicina* (Weyman et al., 2011), η πλειονότητα των γενετικών τροποποιήσεων αφορούσαν ετερόλογη έκφραση υδρογενασών από το *Clostridium* (Dutta et al., 2005). Μια σημαντική in vivo δοκιμή των Fu και Knowles (1989) έδειξε πως η κυανοβακτηριακή φερρεδοξίνη ενεργεί ως φορέας ηλεκτρονίων μεταξύ του φωτοσυνθετικού συστήματος και της υδρογενάσης του *Clostridium*. Αυτό οδήγησε σε ταυτόχρονη φωτοεξαρτώμενη απελευθέρωση H_2 και O_2 με ρυθμό $11 \text{ nmol H}_2 \text{ h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, χρησιμοποιώντας ανηγμένο μεθυλβιογόνο (Fu and Knowles 1989; Khetkorn et al., 2013). Στη συνέχεια, οι Ducat et al. υπερέκφρασαν με επιτυχία την ανθεκτική στο O_2 υδρογενάση του *Clostridium* στο *S. elongatus* PCC7942 (Ducat et al., 2011). Η δραστηριότητα της υδρογενάσης

των στελεχών που περιείχαν την υδρογενάση HydA απέδωσε κατά μέσο όρο $2.8 \mu\text{mol H}_2 \text{ h}^{-1} \text{ mg Chl a}^{-1}$ κατά τις πρώτες 96 ώρες (Khetkorn et al., 2013).

Συνεπώς, οι περισσότερες μελέτες στο *S. elongatus* έχουν επικεντρωθεί στην παραγωγή H_2 με φωτεινή ζύμωση και στην υπέρβαση της ευπάθειας της υδρογενάσης στο O_2 , κυρίως με την ετερόλογη έκφραση ανθεκτικών ενζύμων υδρογενάσης (Sadvakasova et al., 2020). Μέχρι σήμερα, η υψηλότερη καταγεγραμμένη απόδοση H_2 στο *S. elongatus* PCC7942 έχει επιτευχθεί από ένα μετασηματισμένο στέλεχος που εκφράζει την υδρογενάση I του *Clostridium pasteurianum*, χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο pKE4-9SH ($162.52 \mu\text{mol H}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ από εκχυλίσματα ελεύθερα κυττάρων) (Asada et al., 2000; Sadvakasova et al., 2020). Ωστόσο, καθώς η έκλυση του H_2 και η φωτοσύνθεση λαμβάνουν χώρα στο ίδιο κύτταρο στο *S. elongatus* PCC7942 (όπως και στο στέλεχος PAMCOD), ο διαχωρισμός των δύο διαδικασιών είναι απαραίτητος για να διασφαλιστεί η προστασία της υδρογενάσης από το O_2 . Με τη μέθοδο που ανέπτυξαν οι Vayenos et al. (2020), τα κύτταρα PAMCOD φωτοσυνθέτουν και παράγουν H_2 σε δύο φάσεις, σε συνθήκες φωτός και σκοτεινής ζύμωσης αντίστοιχα ($2 \text{ nmol H}_2 \cdot \text{mg Chl a}^{-1} \text{ h}^{-1}$ για 192 ώρες). Το H_2 στη σκοτεινή ζύμωση παρήχθη ως εξής: α) 7 ημέρες χωρίς έκλυση H_2 , (πιθανώς η χρονική περίοδος για την αποδόμηση της συσσωρευμένης σακχαρόζης), και β) 8 ημέρες έκλυσης H_2 (περίοδος ζύμωσης) (Vayenos et al., 2020).

3.3 Βελτίωση της παραγωγής H_2

Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα για την παραγωγή H_2 από κυανοβακτήρια έχει κάνει σημαντικά βήματα προόδου, με τις πρακτικές εφαρμογές να γίνονται όλο και πιο διαδεδομένες. Ωστόσο, παρά τις δυνατότητες των σύγχρονων προσεγγίσεων, υπάρχουν προκλήσεις που σχετίζονται με τη χαμηλή αποδοτικότητα, την ανανεωσιμότητα για τη σταθεροποίηση των καλλιεργειών κυανοβακτηρίων σε υποδομές μεγάλης κλίμακας και την αναβάθμιση των διαδικασιών παραγωγής (Sadvakasova et al., 2020; Kossalbayev et al., 2022; Kamshybayeva et al., 2022).

Πολλές καινοτόμες προσεγγίσεις έχουν βελτιώσει την απόδοση των βιοαντιδραστήρων με ταυτόχρονη μείωση του κόστους παραγωγής, μελετώντας παράγοντες όπως ο σχεδιασμός του αντιδραστήρα και η αποτελεσματικότητα της ανάμιξης, για τη μεγιστοποίηση της παραγωγής H_2 με παράλληλη διατήρηση των βέλτιστων συνθηκών ανάπτυξης (Morimoto et al., 2002; Kossalbayev et al., 2022). Πέραν των τεχνολογικών πτυχών, είναι επίσης απαραίτητη η έρευνα για την ενίσχυση της κυανοβακτηριακής παραγωγής H_2 με την αύξηση τόσο του

ρυθμού έκλυσης του H₂ όσο και της διάρκειας της διαδικασίας (Khetkorn et al., 2012; Nyberg et al., 2015). Για τα συστήματα που εκμεταλλεύονται τη δυνατότητα των κυανοβακτηρίων να φωτοσυνθέτουν και να παράγουν H₂ σε δύο ξεχωριστά στάδια, οι μεταβολικές προσεγγίσεις που διερευνώνται αποσκοπούν στη μεγιστοποίηση τόσο της συσσώρευσης υδατανθράκων στο φως, όσο και της παραγωγής H₂ στη σκοτεινή ζύμωση, κατά κύριο λόγο με τον περιορισμό της ανασταλτικής δράσης παραγόντων που επηρεάζουν ένζυμα, όπως και του ανταγωνισμού μεταξύ των διαφορετικών μονοπατιών που χρησιμοποιούν ηλεκτρόνια (Morimoto et al., 2002; Khetkorn et al., 2012). Αυτές οι προσεγγίσεις περιλαμβάνουν τροποποιήσεις στους αβιοτικούς παράγοντες και στις περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, αλατότητα, pH, θρεπτικά συστατικά), επιτρέποντας την επιλογή διαφορετικών βιοχημικών οδών για την παραγωγή H₂.

3.3.1 Ενίσχυση της σύνθεσης υδατανθράκων στη φωτοσύνθεση

Η αύξηση της περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες εντός των κυανοβακτηριακών κυττάρων κατά τη φωτοσύνθεση μπορεί να ενισχύσει την παραγωγή H₂ στη σκοτεινή ζύμωση, καθώς οι υδατάνθρακες χρησιμεύουν ως βασικά υποστρώματα στα ζυμωτικά βιοχημικά μονοπάτια. Η ρύθμιση της συσσώρευσης σακχάρων στα κυανοβακτηριακά κύτταρα καθορίζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η παρουσία φωτός, η αλατότητα, η θερμοκρασία και τα θρεπτικά συστατικά.

Σε συνθήκες φωτοτροφικής καλλιέργειας, η ωσμωτική καταπόνηση που μπορεί να προκληθεί από υψηλή αλατότητα ή υψηλές θερμοκρασίες συνοδεύεται συνήθως από τη συσσώρευση ωσμωπροστατευτικών ουσιών. Χαρακτηριστικά, η αύξηση της αλατότητας του θρεπτικού μέσου, επάγει την αύξηση της συσσώρευσης σακχαρόζης σε πολλά στελέχη των *Synechococcus* και *Synechocystis*, υπό την προϋπόθεση ότι η αλατότητα παραμένει σε χαμηλά επίπεδα (έως 0.7M NaCl) (Ladas and Papageorgiou, 2000; Warr et al., 1985). Επιπλέον, ορισμένα στελέχη *Synechocystis*, όπως το PCC6714, έχουν την ικανότητα σε θρεπτικά μέσα θαλασσινού νερού, αυξανομένης της θερμοκρασίας να ενισχύουν τη συσσώρευση σακχαρόζης (Warr et al., 1985).

Στους φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς, εκτός της ωσμωτικής καταπόνησης, τη συσσώρευση υδατανθράκων θα μπορούσε να προκαλέσει και η περιορισμένη διαθεσιμότητα μακροστοιχείων (Davies and Grossman, 1998). Σε ορισμένα μη αζωτοδεσμετικά κυανοβακτήρια σε συνθήκες που ευνοούν τη φωτοσύνθεση, η στέρηση

θρεπτικών συστατικών (θείου, αζώτου ή φωσφόρου) μπορεί να προκαλέσει μαζική συσσώρευση γλυκογόνου (Lindblad et al., 1999; Tamagnini et al., 2002; Troshina et al., 2002), το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή H_2 (Serebryakova et al., 1999). Τα είδη *Gloeocapsa alpicola* CALU 734 και *Synechocystis* sp. PCC 6803, κατά τη φωτοσύνθεση σε συνθήκες απουσίας $NaNO_3$, συσσωρεύουν γλυκογόνο και στη συνέχεια το χρησιμοποιούν ως δότη ηλεκτρονίων για την παραγωγή H_2 μέσω της αμφίδρομης Hox-υδρογενάσης στο σκοτάδι (Klotz et al., 2015; Troshina et al., 2002; Sadvakasova et al., 2020; Guerra et al., 2013; Khetkorn et al., 2013).

3.3.2 Αύξηση της παραγωγής H_2 στη σκοτεινή αναερόβια ζύμωση

Σε σκοτεινές αναερόβιες συνθήκες, εκτός από το κυανοβακτηριακό στέλεχος και το υπόστρωμα ζύμωσης, διάφοροι άλλοι παράγοντες επηρεάζουν την επιλογή της βιοχημικής οδού, τα προϊόντα που προκύπτουν και την αποτελεσματικότητα της παραγωγής H_2 . Οι σημαντικότεροι από αυτούς είναι το pH, η θερμοκρασία, η κυτταρική συγκέντρωση και η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών. Ενώ ο ρόλος αυτών των παραμέτρων στη ζυμωτική παραγωγή H_2 έχει γίνει κατανοητός, ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών για κάθε παράγοντα απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

3.3.2.1 Επιλογή της βιοχημικής οδού

Η θεωρητική απόδοση της παραγωγής H_2 διαφέρει μεταξύ της γλυκόλυσης και της οξειδωτικής οδού των φωσφορικών πεντοζών (OPP). Στη γλυκόλυση, η θεωρητικά μέγιστη απόδοση είναι περίπου 4 mol H_2 ανά mol γλυκόζης μέσω της οξειδοαναγωγής πυροσταφυλικού-φερεδοξίνης. Αντίθετα, η οδός OPP επιτρέπει θεωρητικά την πλήρη οξείδωση της γλυκόζης, παράγοντας έως και 12 mol H_2 ανά mol γλυκόζης. Ωστόσο στην πράξη, η παραγωγή H_2 μέσω της οδού OPP σε ζωντανά συστήματα αντιμετωπίζει θερμοδυναμικούς περιορισμούς (Khetkorn et al., 2013).

Ειδικότερα, η αποικοδόμηση της γλυκόζης μέσω της οδού Embden-Meyerhof-Parnas (EMP; γλυκόλυση) οδηγεί στην παραγωγή NADH κατά την οξείδωση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης. Από την άλλη πλευρά, η καταβολική ροή μέσω της οξειδωτικής οδού των φωσφορικών πεντοζών (OPP) παράγει NAD(P)H σε δύο οξειδωτικές αντιδράσεις που καταλύονται από την αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης και την αφυδρογονάση του 6-φωσφογλυκονικού, παράγοντας 5-φωσφορική ριβουλόζη, η οποία οξειδώνεται περαιτέρω σε 7-φωσφορική σεδοεπτουλόζη και 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη. Η 3-

φωσφορική γλυκεραλδεΐδη οξειδώνεται περαιτέρω στα επόμενα γλυκολυτικά στάδια. Οι καθαρές αποδόσεις ανά γλυκόζη από αυτές τις ανταγωνιστικές οδούς είναι 2 mol NADH στην περίπτωση του γλυκολυτικού καταβολισμού, και 6 mol NADPH και 1 mol NADH όταν χρησιμοποιούνται οι οδοί OPP και κατώτερης γλυκόλυσης. Όταν 1 mol γλυκόζης οξειδώνεται πλήρως μέσω της οδού OPP, αποδίδει 12 mol NADPH, αλλά αυτή η πλήρης οξείδωση δεν συμβαίνει σε συνθήκες *in vivo*. Έτσι, η ατελής οξείδωση ενός mol γλυκόζης με τη χρήση του OPP και της κατώτερης γλυκόλυσης παράγει 1 mole πυροσταφυλικού, 3 moles CO₂ και 7 moles NAD(P)H. Το πυροσταφυλικό που παράγεται από οποιαδήποτε από τις δύο οδούς μπορεί να οξειδωθεί περαιτέρω από την οξειδοαναγωγή πυροσταφυλικού:φερρεδοξίνης (PFOR) ή το σύμπλοκο της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PDC), δημιουργώντας Fdred ή NADH αντίστοιχα και παράγοντας CO₂ και ακετυλο-CoA. Έτσι, συμπεριλαμβανομένης της οξείδωσης του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-CoA, η μέγιστη θεωρητική απόδοση H₂ μέσω μόνο της γλυκόλυσης είναι 4 mol H₂ (όριο Thauer) (Thauer et al., 1977), ενώ στην περίπτωση του συνδυασμού της OPP με κατώτερη γλυκόλυση είναι 8 mol H₂. Τα κυανοβακτήρια σε σκοτεινές αναερόβιες συνθήκες παράγουν πολύ λιγότερα από 4 mol H₂ ανά mol καταβολιζόμενου υδατάνθρακα, και η παρατηρούμενη απόδοση παραμένει μικρότερη από 1 H₂ ανά ισοδύναμο γλυκόζης (Das and Veziroglu, 2001; McNeely et al., 2014).

Τα κυανοβακτήρια χρησιμοποιούν κατά κύριο λόγο την οδό EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) για τη διάσπαση της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό, τόσο σε συνθήκες φωτός όσο και σε συνθήκες σκότους (Stal and Mozelaar, 1997; Baebprasert et al., 2010). Η οδός EMP αποδίδει λιγότερο NADPH αλλά περισσότερο ATP σε σύγκριση με τις άλλες γλυκολυτικές οδούς, όπως την OPP ή την ED (Entner-Doudoroff) (Koch et al., 2020). Σε κάθε περίπτωση, για την ενίσχυση της παραγωγής H₂ μέσω των οδών που εξαρτώνται από το NADPH ή τη φερρεδοξίνη, απαιτείται η ρύθμιση της ισορροπίας NADPH/NADH με βάση τον προτιμώμενο συμπαράγοντα και η ενίσχυση της δεξαμενής NADPH με την ελαχιστοποίηση των ανταγωνιστικών οδών (Khetkorn et al., 2013; Tamagnini et al., 2002; Troshina et al., 2002).

3.3.2.2 pH

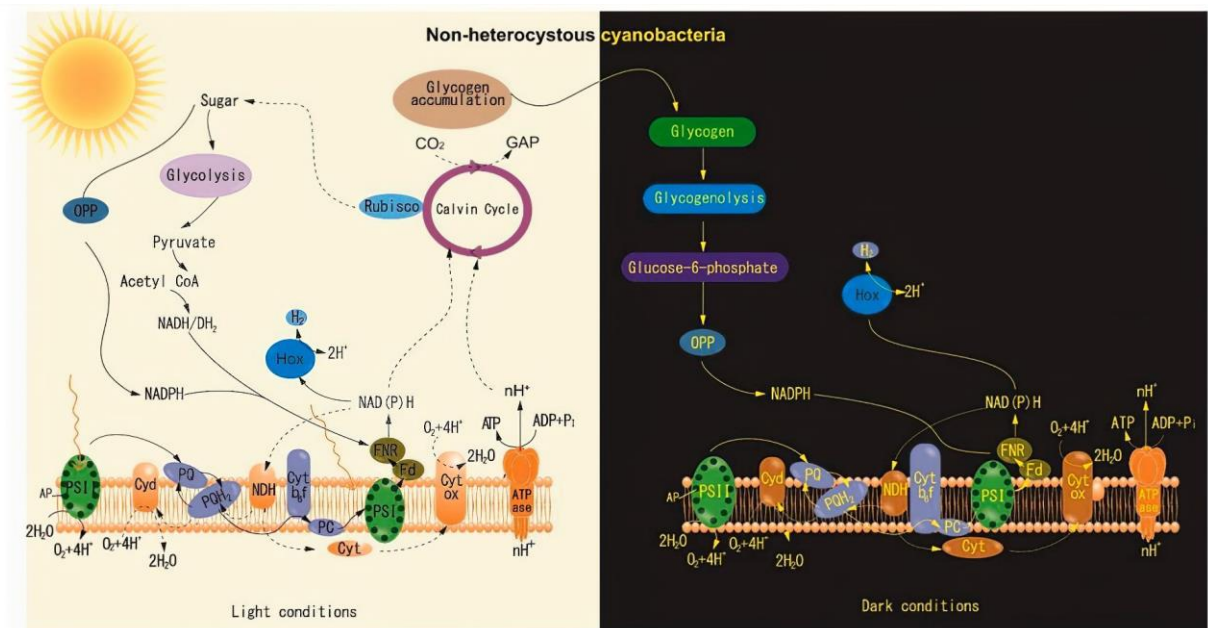
Το pH παίζει καθοριστικό ρόλο στις δραστηριότητες των μικροοργανισμών που παράγουν H₂, επιδρώντας άμεσα στη δραστικότητα της υδρογενάσης (Dabrock et al., 1992) και στην επιλεγμένη μεταβολική οδό, καθορίζοντας έτσι το κυτταρικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό. Στη σκοτεινή ζύμωση, το κοινώς αποδεκτό βέλτιστο εύρος pH κυμαίνεται μεταξύ 5 και 7.5 (Fang et al., 2002a; Calli et al., 2008; Bolatkhan et al., 2019). Ωστόσο, έχουν προταθεί εναλλακτικές

τιμές pH για την επίτευξη της μέγιστης απόδοσης H₂ στα κυανοβακτήρια, συμπεριλαμβανομένων χαμηλότερων (pH 4.5) (Ren et al., 1997) και υψηλότερων επιπέδων pH (pH 6.8-8.3; Troshina et al., 2002). Αυτή η απόκλιση μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές τιμές βέλτιστου pH των διαφορετικών ενζύμων που εμπλέκονται στην παραγωγή H₂ (π.χ. υδρογενάσες) και στο μεταβολισμό των υδατανθράκων (π.χ. ινβεράσες). Για παράδειγμα, οι ενδογενείς (A/N) ινβεράσες των κυανοβακτηρίων PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714 παρουσιάζουν μέγιστη δραστηριότητα στη μη αντιστρεπτή μετατροπή της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη εντός του εύρους pH 6.5 έως 7 (Vargas et al., 2003). Αντίθετα, οι ενδογενείς [NiFe]-υδρογενάσες παρουσιάζουν μέγιστη δραστηριότητα σε αλκαλικό pH (pH 8) (McIntosh et al., 2011).

3.3.2.3 Έλλειψη θρεπτικών συστατικών

Σε ορισμένα κυανοβακτήρια, η απόδοση παραγωγής H₂ από υδρογενάσες μπορεί να αυξηθεί σημαντικά και με την έλλειψη αζώτου (απουσία NaNO₃) από το θρεπτικό μέσο της σκοτεινής ζύμωσης. Απουσία NaNO₃ τα στελέχη *Spirulina platensis* και *Arthrospira maxima*, μέσω της σκοτεινής ζύμωσης συσσωρεύουν γλυκογόνο και παράγουν H₂ σε ένα στάδιο (Ananyev et al., 2008; Khetkorn et al., 2013). Με αυτή την προσέγγιση, η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη δεν επηρεάζεται, δεδομένου ότι το άζωτο είναι απαραίτητο κυρίως κατά τη φωτοσύνθεση, για την ανάπτυξη, την κυτταρική διαίρεση και το μεταβολισμό των κυανοβακτηριακών κυττάρων (Khetkorn et al., 2013).

Κατά την αποικοδόμηση του γλυκογόνου, το μεγαλύτερο μέρος της παραγόμενης γλυκόζης διοχετεύεται απευθείας στην οξειδωτική οδό των φωσφορικών πεντοζών (OPPP) και όχι στη γλυκολυτική οδό (Welkie et al., 2018). Η πρωταρχική λειτουργία του OPPP στο σκοτάδι είναι η παραγωγή αναγωγικής ενέργειας με τη μορφή NADPH (Yang et al., 2002; Osanai et al., 2007). Ελλείπει NaNO₃ ως ανταγωνιστικού υποστρώματος για την κατανάλωση NADPH (Khetkorn et al., 2013), ενισχύεται η αναγωγή των πρωτονίων σε H₂. Με αυτό τον τρόπο, η προτίμηση της OPPP έναντι της γλυκόλυσης έχει λειτουργική σημασία όσον αφορά την παραγωγή NADPH έναντι NADH, όπως και της ανηγμένης έναντι της οξειδωμένης φερρεδοξίνης (Fdred/Fdox), καταλήγοντας σε αυξημένη παραγωγή H₂ (McNeely et al., 2014; Welkie et al., 2018).



Εικόνα 8. Οι μεταβολικές οδοί του O_2 και του H_2 σε μη αζωτοδεσμευτικά κυανοβακτήρια στο φως και στο σκοτάδι (Sadvakasova et al., 2020). Cyt_d, οξειδάση της κινόλης- Cyt_{b₆f}, κυτόχρωμα _{b₆f}- Cyt_{c553}, κυτόχρωμα _{c553}- Cyt_{ox}, οξειδάση του κυτοχρώματος _c- Fd, φερρεδοξίνη- FNR, αναγωγή φερρεδοξίνης-NADP- Hoc, αμφίδρομη υδρογνάση Hoc, Hup, υδρογνάση πρόσληψης- N_2 άση, νιτρογενάση- NDH-I, αφυδρογνάση NADPH (σύμπλοκο I)- OPP, οξειδωτική οδός φωσφορικών πεντοζών- PC, πλαστοκυανίνη- PS, φωτοσύστημα- PQ: Rubisco, οξυγενάση της ριβουλόζης-1,5-διφωσφορικής καρβοξυλάσης- SDH: αφυδρογνάση του ηλεκτρικού οξέος. Source: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110054>.

3.3.3 Αναγέννηση της κυανοβακτηριακής καλλιέργειας

Για τα περισσότερα είδη κυανοβακτηρίων, η ζύμωση δεν είναι μια μεταβολική απόκριση επαρκής για την επιβίωση σε παρατεταμένες περιόδους σκοταδιού και αναερόβιωσης σε εργαστηριακές συνθήκες (Hayer and Krumbein, 1991). Γι' αυτό το λόγο, η έρευνα για την αξιοποίηση της κυανοβακτηριακής καλλιέργειας μετά την παραγωγή H_2 επικεντρώνεται κυρίως σε μεθόδους διαχωρισμού των συστατικών της για τη χρήση τους σε εφαρμογές παραγωγής βιοκαυσίμων ή βιολιπασμάτων.

Επιπλέον, με εξαίρεση ορισμένα ετεροτροφικά στελέχη, οι ενεργειακές απαιτήσεις συντήρησης των κυανοβακτηρίων σε σκοτεινή αναερόβια ζύμωση παραμένουν άγνωστες (Stal and Moezelaar, 1997). Ως εκ τούτου, η αποκατάσταση της ικανότητας πολλαπλασιασμού των κυττάρων μετά από ζυμωτικές διεργασίες παραγωγής H_2 , είναι ένα πεδίο που δεν έχει ερευνηθεί. Η ανάκτηση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας μετά την επαναφορά των κυττάρων στο φως, μπορεί να εξασφαλίσει την επανάληψη του κύκλου παραγωγής H_2 ή τη χρήση της ζωντανής κυανοβακτηριακής βιομάζας σε άλλες βιοτεχνολογικές εφαρμογές, βελτιώνοντας έτσι τη συνολική παραγωγικότητα. Με αυτό τον τρόπο θα ήταν εφικτή η συνεχής καλλιέργεια για την ανανεώσιμη παραγωγή H_2 και άλλων βιοπροϊόντων, με βιώσιμες

διαδικασίες μειωμένης πολυπλοκότητας και κόστους. Ακόμα, επαναφέροντας τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα των κυττάρων, διευκολύνεται ο διαχωρισμός της καλλιέργειας από πιθανούς μολυσματικούς παράγοντες.

II. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σε συνθήκες χαμηλής αλατότητας, τα μονοκύτταρα μη αζωτοδεσμευτικά κυανοβακτήρια του γλυκού νερού *Synechococcus elongatus* PCC7942 (στέλεχος PAMCOD) και *Synechocystis* sp. PCC6714, συσσωρεύουν μέσω της φωτοσύνθεσης σακχαρόζη ως μοναδικό συμβατό ωσμωλύτη (Warr et al., 1985; Ladas and Papageorgiou, 2000). Στις συνθήκες αυτές άνοδος της θερμοκρασίας σε υψηλά επίπεδα μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του ωσμωλύτη μέσω της φωτοσύνθεσης (Warr et al., 1985). Συνεπώς, ο πρώτος στόχος της παρούσας έρευνας, είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης στα κύτταρα PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714, μέσω του συνδυασμού των καταπονήσεων χαμηλής αλατότητας και υψηλής θερμοκρασίας κατά τη φωτοσυνθετική τους ανάπτυξη.

Τα κυανοβακτήρια αυτά διαθέτουν αλκαλικές/ουδέτερες ινβερτάσες (A/N-Inv) που καταλύουν την υδρόλυση της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη (Kolman et al., 2015), όπως και δύο [NiFe]-υδρογενάσες (Peschek 1979 a, b, c; Bothe et al., 1999), μία αμφίδρομη υδρογενάση H1, που καταλύει την αντίδραση μετατροπής H^+ σε H_2 (Schmitz et al., 2001), και μία υδρογενάση πρόσληψης HupSL (Vayenos et al., 2020). Το στέλεχος PAMCOD είναι ικανό να παράξει H_2 μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει δύο στάδια: Ένα φωτοσυνθετικό, κατά το οποίο συσσωρεύει σακχαρόζη, και ένα σκοτεινής ζύμωσης, κατά το οποίο χρησιμοποιεί τη σακχαρόζη ως πηγή γλυκόζης για την παραγωγή H_2 από την ενδογενή αμφίδρομη [NiFe]-υδρογενάση (Vayenos et al., 2020). Ο χρονικός διαχωρισμός μεταξύ του πρώτου και δεύτερου σταδίου (φωτοσύνθεσης και παραγωγής H_2), διασφαλίζει τις ανοξικές συνθήκες που απαιτούνται για την προστασία της υδρογενάσης από την ύπαρξη O_2 στο περιβάλλον. Με αυτά τα δεδομένα, ο δεύτερος στόχος της διατριβής είναι η εφαρμογή αυτής της μεθόδου παραγωγής H_2 στο στέλεχος *Synechocystis* sp. PCC6714. Επιπλέον, θα εντοπιστούν οι βέλτιστες τιμές pH στα θρεπτικά μέσα της σκοτεινής ζύμωσης για την καταλυτική δραστικότητα της ινβερτάσης και της υδρογενάσης στα κύτταρα PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714.

Στη συνέχεια, θα διερευνηθεί η αποτελεσματικότητα μιας νέας μεθόδου παραγωγής H_2 σε δύο στάδια από το στέλεχος PAMCOD, που περιλαμβάνει τη συνδυαστική ζύμωση σακχαρόζης και γλυκογόνου. Όπως και στη μέθοδο των Vayenos et al. (2020), η καταπόνηση αλατότητας κατά τη φωτεινή περίοδο θα προκαλέσει τη συσσώρευση σακχαρόζης στα

κύτταρα PAMCOD. Στη συνέχεια, η αφαίρεση του αζώτου από το θρεπτικό μέσο (απουσία NaNO_3) κατά τη σκοτεινή φάση και τη ζύμωση μπορεί να εξαναγκάσει τα κύτταρα να διασπασούν, εκτός από τη σακχαρόζη, και μεγάλες ποσότητες γλυκογόνου.

Η παρατεταμένη ζύμωση σε σκοτεινές αναερόβιες συνθήκες σε συνδυασμό με την έλλειψη μακροστοιχείων όπως το άζωτο, μπορεί να αναστείλει την ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων και την ανάκτηση της κυανοβακτηριακής καλλιέργειας μετά την παραγωγή H_2 . Ως εκ τούτου, ένας ακόμη στόχος αυτής της μελέτης είναι ο προσδιορισμός των απαραίτητων συνθηκών για την αναγέννηση των καλλιεργειών PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714 μετά από τη σκοτεινή ζύμωση, ώστε η διαδικασία να είναι συνεχής και ανανεώσιμη.

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Στελέχη και συνθήκες καλλιέργειας

Το μετασχηματισμένο στέλεχος PAMCOD του *S. elongatus* και το στέλεχος *Synechocystis* sp. PCC6714, καλλιεργήθηκαν φωτοαυτοτροφικά στους 31°C (Parageorgiou et al., 1998) και στους 35°C, στο μέσο BG-11 των Rippka et al. (1979; περιέχει 17.6 mM NaNO₃ ως πηγή αζώτου), παρουσία 0.4M NaCl (Deshnium et al., 1995; Ladas and Parageorgiou, 2000) ή απουσία NaCl. Οι καλλιέργειες φωτίστηκαν με λαμπτήρες φθορισμού day light (100μmol m⁻² φωτόνια s⁻¹) και τροφοδοτήθηκαν με εμπλουτισμένο μείγμα αέρα-CO₂ (5.0% CO₂ v/v). Τα θρεπτικά μέσα καλλιέργειας ρυθμίστηκαν με 20 mM HEPES-NaOH σε pH 7.5 (Stamatakis et al., 2005). Στα μέσα καλλιέργειας του PAMCOD προστέθηκε 1 mM χλωριούχου χολίνης (υπόστρωμα για την οξειδάση της χολίνης) (Ladas and Parageorgiou, 2000). Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν υπό στείρες συνθήκες σε αεροθάλαμο Gelaire Laminar Class 100 Air Flow (Gelman, UK). Η συγκέντρωση Chl_a προσδιορίστηκε σε εκχυλίσματα N, N-διμεθυλοφορμαμίδης (DMF) από κυτταρικά ιζήματα σύμφωνα με τον Moran (1982). Η συγκέντρωση των κυτταροκαλλιιεργειών, σε cfu/ml, προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται από τους Ellinas et al. (2017).

2. Συνολική φωτοσυνθετική δραστηριότητα και δραστηριότητα του PSII

Οι ρυθμοί της φωτοεπαγόμενης μεταφοράς ηλεκτρονίων σε κύτταρα PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714 προσδιορίστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου οξυμετρικά με O₂-ηλεκτρόδιο τύπου Clark (DW1; Oxygraph, Hansatech, King's Lynn, U.K.). Η συνολική φωτοσύνθεση προσδιορίστηκε με τη μέτρηση του ρυθμού έκλυσης του O₂ (H₂O → CO₂) των κυττάρων. Η δραστηριότητα PSII προσδιορίστηκε με τη μέτρηση του ρυθμού έκλυσης του O₂, με νερό ως δότη ηλεκτρονίων και p-βενζοκινόνη ως δέκτη ηλεκτρονίων (H₂O → PBQ). Το μίγμα αντίδρασης περιείχε κύτταρα (5 μg Chl_a ml⁻¹) και την p-βενζοκινόνη (1 mM). Το ακτινικό φως (4.0 mE m⁻² s⁻¹, Hansatech LS2), περνούσε μέσα από ένα πορτοκαλί γυάλινο φίλτρο (Corning CS 3-69, διαπερατότητα ≥510 nm).

3. Ποσοτικός προσδιορισμός της σακχαρόζης

Η σακχαρόζη εκχυλίστηκε από τα κύτταρα PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714 που εκπλύθηκαν δύο φορές με 80% (v/v) αιθανόλη σε 25 mM HEPES-KOH, pH 7.1 (Reed et al.,

1986). Μετά από επώαση μίας ώρας σε υδατόλουτρο στους 75-80 °C, τα κυανοβακτηριακά κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν (10.000×g, 15 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου. Τα συγκεντρωμένα εκχυλίσματα αιθανόλης χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της σακχαρόζης. Αφού εξατμίστηκαν υπό μειωμένη ατμοσφαιρική πίεση σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα, τα στερεά υπολείμματα διαλύθηκαν σε 50 mM Na-acetate, pH 5.1, και η ολική περιεκτικότητα σε σακχαρόζη προσδιορίστηκε με τη μέθοδο 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

4. Ποσοτικός προσδιορισμός του γλυκογόνου

Το γλυκογόνο εκχυλίστηκε από τα κύτταρα PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714 ως εξής: Τα κύτταρα λύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 25 mM HEPES-KOH, pH 7.1 που περιείχε 80% (v/v) αιθανόλη (Reed et al., 1986). Τα κυτταρικά υπολείμματα επώαστηκαν για 1 ώρα σε υδατόλουτρο στους 75-80 °C, και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν (10.000×g, 15 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου. Τα ιζήματα χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του ολικού γλυκογόνου όπως περιγράφεται από τους Hickman et al. (2013), με τις ακόλουθες τροποποιήσεις: 200 μl του βρασμένου δείγματος προστέθηκαν σε 100 μl Na-acetate buffer (25 mM, pH 5.0) που περιείχε 30 μονάδες ml⁻¹ αμυλογλυκοσιδάσης (Sigma-Aldrich cat no. A9228) και επώαστηκαν στους 60 °C για 2 h. Η περιεκτικότητα σε ολικό γλυκογόνο εκφράστηκε ως περιεκτικότητα σε γλυκόζη σύμφωνα με τη μέθοδο 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

5. Σκοτεινή ζύμωση και παραγωγή H₂

Τα στελέχη PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714 καλλιεργήθηκαν φωτοαυτοτροφικά για 14 ημέρες στους 35°C, σε θρεπτικό μέσο BG-11 με pH 7.5 και 0.4 M NaCl. Στη συνέχεια, τα κυανοβακτηριακά κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (4.000×g για 10 λεπτά στους 20°C), πλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5) και μεταφέρθηκαν σε φρέσκα θρεπτικά μέσα BG-11, ρυθμισμένα ως προς το pH ως εξής: (α) με 20 mM MES-NaOH σε pH 6.5, (β) με 20 mM PIPES-HCl σε pH 7, (γ) με 20 mM HEPES-NaOH σε pH 7.5 και (δ) με 20 mM HEPES-NaOH σε pH 8.

Κύτταρα PAMCOD που καλλιεργήθηκαν φωτοαυτοτροφικά για 4 ημέρες στους 31°C, σε μέσο BG-11 με pH 7.5 και παρουσία 0.4 M NaCl, επίσης συλλέχθηκαν και πλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5) και στη συνέχεια επαναιωρήθηκαν σε συγκεντρώσεις 2.3×10^7 και 4.6×10^7 cfu/ml αντίστοιχα, σε κανονικό μέσο BG-11 και σε μέσο BG-11 χωρίς NaNO_3 (ρυθμισμένα σε pH 7.5).

Και στις δύο περιπτώσεις, όλα τα εναιωρήματα μεταφέρθηκαν σε αεροστεγή γυάλινα δοχεία (έως το 1/4 του συνολικού όγκου της φιάλης) από τα οποία απομακρύνθηκαν τα αέρια με τη βοήθεια περιστροφικής αντλίας κενού. Τα αεροστεγή γυάλινα δοχεία ήταν εφοδιασμένα με γυάλινη βαλβίδα στρόφιγγας τριών οδών υψηλού κενού (σειρά ACE GLASS 8196-250), ώστε να αποφεύγεται η μόλυνση από αέρα κατά τη μεταφορά των εναιωρημάτων. Η κοινή θύρα της βαλβίδας στρόφιγγας συνδεόταν με το αεροστεγές γυάλινο δοχείο και οι δύο θύρες επιλογής, η μία με την περιστροφική αντλία και η άλλη με το δοχείο κυτταρικού εναιωρήματος (μέσω σωλήνα εμβάπτισης). Με την επιλογή της κατάλληλης θέσης της στρόφιγγας της τρίοδης βαλβίδας, το αεροστεγές γυάλινο δοχείο εκκενώθηκε αρχικά σε πίεση 3-10-3 mbar. Ακολουθώντας, αλλάζοντας τη στρόφιγγα, το αεροστεγές γυάλινο δοχείο συνδέθηκε με το δοχείο κυτταρικού εναιωρήματος και το εναιώρημα αναρροφήθηκε μέσα στο σωλήνα εμβάπτισης μέχρι να φτάσει στη στρόφιγγα της βαλβίδας. Η θέση της στρόφιγγας άλλαξε και πάλι προς την κατεύθυνση της περιστροφικής αντλίας και το σύστημα αφέθηκε να απομακρύνει όλο τον αέρα που είχε αρχικά παγιδευτεί μέσα στο σωλήνα εμβάπτισης. Στο τελικό στάδιο το πλήρως εκκενωμένο αεροστεγές γυάλινο δοχείο συνδέθηκε και πάλι με το δοχείο εναιωρήματος και το εναιώρημα αναρροφήθηκε υπό κενό και γέμισε το αεροστεγές γυάλινο δοχείο. Το αεροστεγές γυάλινο δοχείο με το εναιώρημα εκκενώθηκε περαιτέρω για 5 λεπτά, ώστε να εξασφαλιστεί ότι απομακρύνθηκε όλος ο αέρας που είχε διαλυθεί στην υγρή φάση. Στη συνέχεια, τα απαερωμένα δοχεία τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα Gallenkamp Orbital Incubator (INR-401 Series, UK) στο σκοτάδι, στους 31 °C, για 15 ημέρες. Το παραγόμενο H_2 προσδιορίστηκε με αέρια χρωματογραφία σε χρωματογράφο Hewlett-Packard HP 5890 Series II, εξοπλισμένο με βαλβίδα δειγματοληψίας αερίου 6 θυρών, στήλη Heysep D και ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας, χρησιμοποιώντας αργό (Ar) ως φέρον αέριο στη διαδικασία ανάλυσης (Howarth and Codd, 1985; Ainas et al., 2017). Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης ήταν 10 ppm. Ο αέριος χρωματογράφος βαθμονομήθηκε υπό κενό για H_2 , N_2 , O_2 , CO , CO_2 , CH_4 και $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-$ σε μερικές πιέσεις για κάθε αέριο από 0.01 έως 4 mbar, χρησιμοποιώντας μια πρότυπη φιάλη που περιείχε όλα αυτά τα αέρια σε συγκέντρωση 1%

v/v. Για την εισαγωγή του δείγματος στον αέριο χρωματογράφο, ο βρόχος δειγματοληψίας της βαλβίδας 6 θυρών εκκενώθηκε μέχρι 3-10-3 mbar και η συνολική πίεση του εισαγόμενου αερίου μετρήθηκε μέσω ενός ευαίσθητου πομπού πίεσης με εύρος μέτρησης 0-100 mbar (WIKA, μοντέλο A-10, ακρίβεια $\leq 0,5\%$ του εύρους). Οι πιέσεις που επιτεύχθηκαν με το άνοιγμα των απαερωμένων δοχείων (μετά την επώαση) στον κλειστό αέριο βρόχο κυμαίνονταν μεταξύ 40 και 85 mbar, ανάλογα με την ποσότητα του παραγόμενου αερίου και τη θερμοκρασία του χώρου. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

6. Ακεραιότητα των φυκοβιλισωμάτων

Η δομική ακεραιότητα των φυκοβιλισωμάτων στα κύτταρα PAMCOD κατά τη διάρκεια της σκοτεινής ζύμωσης, ελέγχθηκε μέσω των φασμάτων απορρόφησης των κυτταρικών αιωρημάτων σε φασματόμετρο υπεριώδους-ορατού PerkinElmer Lambda 20 (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA), σε θερμοκρασία δωματίου. Το κοινό χαρακτηριστικό αυτών των φασμάτων είναι η παρουσία τριών κορυφών απορρόφησης, στα 436 nm (Chla), στα 620 nm (φυκοκυανίνη) και στα 678 nm (Chla) (Gao et al., 2009). Τα φάσματα απορρόφησης μετρήθηκαν σε κύτταρα PAMCOD κατά τη σκοτεινή ζύμωση παρουσία NaNO_3 και απουσία NaNO_3 και κανονικοποιήθηκαν στα 678 nm, όπου τα μόρια Chla εμφανίζουν τη μέγιστη απορρόφηση. Η κανονικοποιημένη απορρόφηση στα 620 nm ($\text{Abs } 620\text{nm}/\text{Abs } 678\text{nm}$), χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο της ακεραιότητας των φυκοβιλισωμάτων. Τα σχετικά δεδομένα συλλέχθηκαν τις ημέρες 0, 7 και 15 της σκοτεινής ζύμωσης και είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

7. Αναγέννηση της κυανοβακτηριακής βιομάζας

Μετά τη σκοτεινή ζύμωση, τα εναιωρήματα των κυττάρων PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714 μεταφέρθηκαν εκ νέου σε συγκέντρωση 2.3×10^7 cfu/ml, σε φρέσκο απλό μέσο BG-11, μέσο BG-11 διπλάσιας συγκέντρωσης θρεπτικών συστατικών και μέσο BG-11 διπλάσιας συγκέντρωσης NaNO_3 . Τα κύτταρα PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714, μετά τη σκοτεινή ζύμωση παρουσία NaNO_3 , καλλιεργήθηκαν φωτοαυτοτροφικά για 10 ημέρες, ενώ τα κύτταρα PAMCOD μετά τη σκοτεινή ζύμωση απουσία NaNO_3 , καλλιεργήθηκαν φωτοαυτοτροφικά για 14 ημέρες. Και στις δύο περιπτώσεις, οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν στους 31°C , με ένταση φωτισμού $100\mu\text{mol φωτόνια m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ και 5.0% v/v CO_2 . Οι καμπύλες ανάπτυξης των

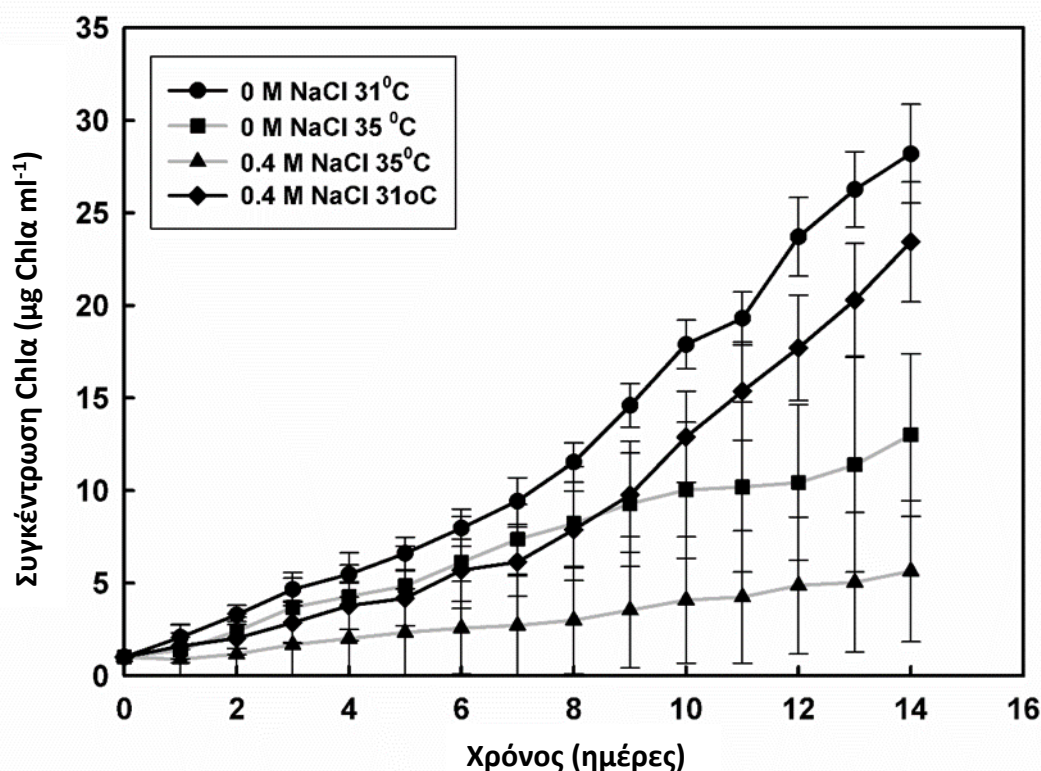
καλλιιεργειών καταγράφηκαν σε όρους $\mu\text{g Chl}a/\text{ml}$ καλλιέργειας ανά ημέρα. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

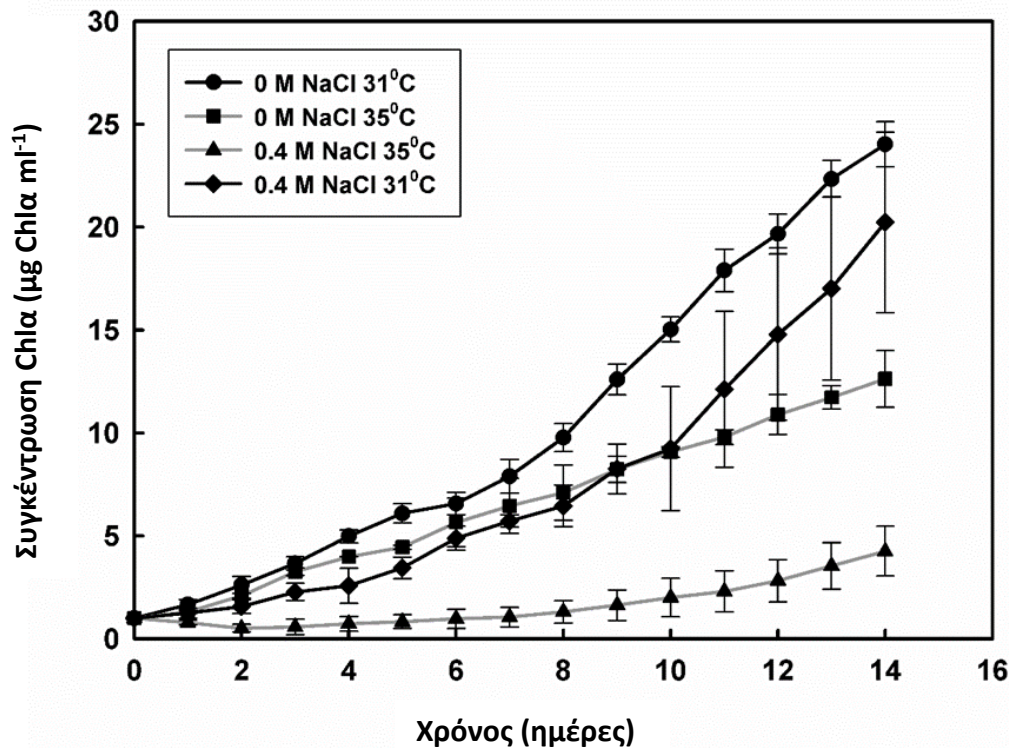
1. Καταπόνηση αλατότητας και υψηλής θερμοκρασίας σε κύτταρα PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714

Ο συνδυασμός των καταπονήσεων αλατότητας και υψηλής θερμοκρασίας στις καλλιέργειες PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714, επιδρά στον πολλαπλασιασμό, στη φωτοσυνθετική δραστηριότητα και στη συσσώρευση σακχαρόζης των κυττάρων.

Στα **Γραφήματα 1 και 2** παρουσιάζεται η συγκέντρωση Chl_a συναρτήσει του χρόνου επώασης για τα στελέχη PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714 στους 31°C (τυπική θερμοκρασία ανάπτυξης) και στους 35°C (καταπόνηση υψηλής θερμοκρασίας), τόσο παρουσία όσο και απουσία NaCl. Η μεταβολή της συγκέντρωσης Chl_a των καλλιεργειών με την πάροδο του χρόνου αποτελεί ένα δείκτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.



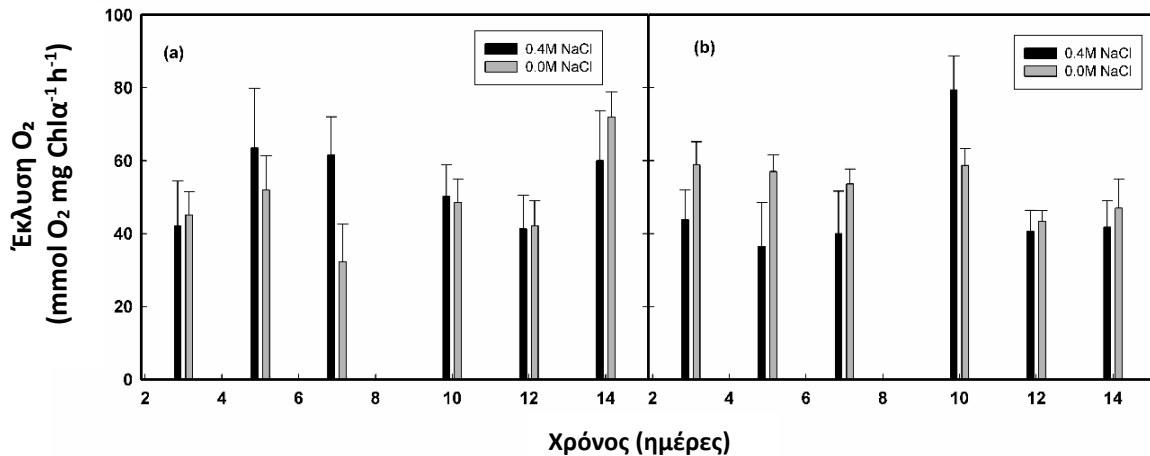
Γράφημα 1. Συγκέντρωση Chl_a συναρτήσει του χρόνου επώασης των κυττάρων PAMCOD, σε καταπόνηση αλατότητας και υψηλής θερμοκρασίας. (-●-) Κύτταρα PAMCOD στους 31°C απουσία NaCl, (-◆-) Κύτταρα PAMCOD στους 31°C παρουσία 0.4 M NaCl, (-■-) Κύτταρα PAMCOD στους 35°C απουσία NaCl (-▲-) Κύτταρα PAMCOD στους 35°C παρουσία 0.4 M NaCl. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.



Γράφημα 2. Συγκέντρωση Chl a συναρτήσει του χρόνου επώασης των κυττάρων *Synechocystis* sp. PCC6714, σε καταπόνηση αλατότητας και υψηλής θερμοκρασίας. (-●-) Κύτταρα *Synechocystis* sp. PCC6714 στους 31°C απουσία NaCl, (-◆-) Κύτταρα *Synechocystis* sp. PCC6714 στους 31°C παρουσία 0.4 M NaCl, (-■-) Κύτταρα *Synechocystis* sp. PCC6714 στους 35°C απουσία NaCl, (-▲-) Κύτταρα *Synechocystis* sp. PCC6714 στους 35°C παρουσία 0.4 M NaCl. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

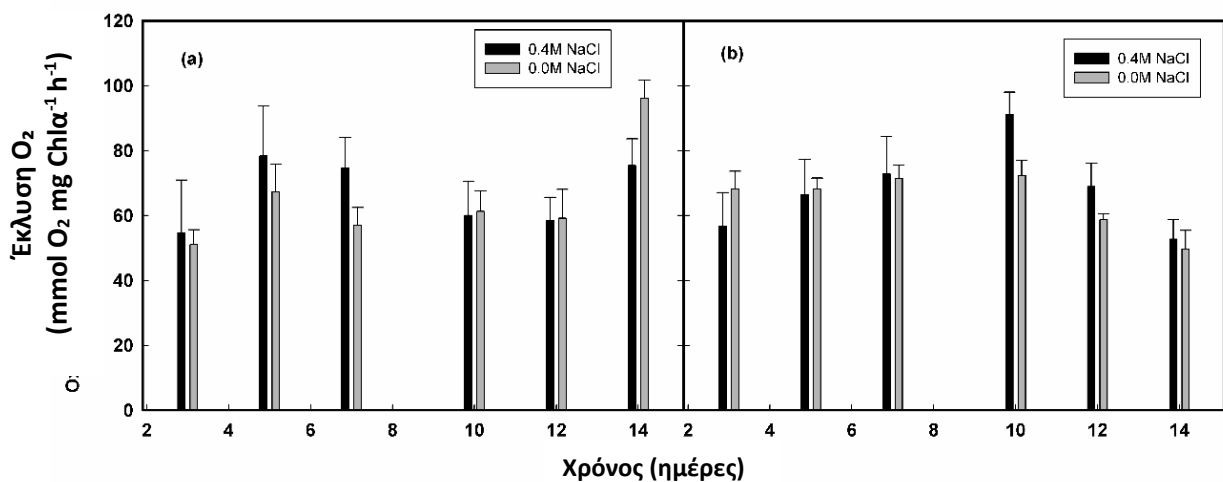
Η καταπόνηση υψηλής θερμοκρασίας (35°C) προκάλεσε μείωση στους ρυθμούς πολλαπλασιασμού των κυττάρων PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714 σε μέσο BG-11 παρουσία NaCl (**Γράφημα 1, Γράφημα 2**). Με αυτό τον τρόπο υποδηλώνεται πως οι δύο καταπονήσεις δρουν συνεργιστικά, οπότε οι αρνητικές επιδράσεις εντείνονται.

Η επίδραση των καταπονήσεων αλατότητας και υψηλής θερμοκρασίας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διερευνήθηκε περαιτέρω με τη μέτρηση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας μέσω του ρυθμού έκλυσης του O₂ (H₂O → CO₂) των κυττάρων PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714. Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 3**, παρόλο που οι δύο καταπονήσεις παρεμποδίζουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων και των δύο στελεχών με παρόμοιο τρόπο (**Γράφημα 1 και Γράφημα 2**), η καταπόνηση αλατότητας ενισχύει τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα στα κύτταρα PAMCOD για περισσότερες από 10 ημέρες ανάπτυξης. Αντίθετα, στα κύτταρα *Synechocystis* sp. PCC6714, η συνολική φωτοσυνθετική δραστηριότητα μειώνεται με την καταπόνηση αλατότητας. Αυτό το παράδοξο ερευνήθηκε περαιτέρω με τη μέτρηση της δραστηριότητας του φωτοσυστήματος II (PSII) στα δύο στελέχη.



Γράφημα 3. Φωτοσυνθετική δραστηριότητα των κυττάρων PAMCOD (a) και *Synechocystis* sp. PCC6714 (b), (ως έκλυση O₂) κατά τη διάρκεια 14 ημερών συνεχούς έκθεσης σε λευκό φως στους 35°C, παρουσία και απουσία 0.4 M NaCl. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Στο **Γράφημα 4**, απεικονίζεται η δραστηριότητα του PSII (H₂O → PBQ) κατά τη διάρκεια της συνεχούς έκθεσης των κυττάρων PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714 στις καταπονήσεις αλατότητας και υψηλής θερμοκρασίας.



Γράφημα 4. Δραστηριότητα του PSII των κυττάρων PAMCOD (a) και *Synechocystis* sp. PCC6714 (b), ως φωτοσυνθετική έκλυση O₂, παρουσία του δέκτη ηλεκτρονίων PBQ (H₂O → PBQ), κατά τη διάρκεια 14 ημερών συνεχούς έκθεσης σε λευκό φως, στους 35°C, παρουσία και απουσία 0.4 M NaCl. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Οι μετρήσεις της δραστηριότητας του PSII είναι παρόμοιες με τις μετρήσεις της συνολικής φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και στα δύο στελέχη. Η επίδραση της αλατότητας που παρατηρείται στα κύτταρα PAMCOD συμφωνεί με προηγούμενα δεδομένα (Vayenos et al., 2020), ενώ στα κύτταρα *Synechocystis* sp. PCC6714 κατά τις πρώτες 7 ημέρες ανάπτυξης, η αλατότητα επιδρά αρνητικά στη συνολική φωτοσυνθετική δραστηριότητα. Ωστόσο, μετά την

10η ημέρα, το πρότυπο της επίδρασης των καταπονήσεων στη συνολική φωτοσύνθεση και στη δραστηριότητα του PSII είναι παρόμοιο και για τα δύο στελέχη. Η αυξημένη φωτοσυνθετική δραστηριότητα στα κύτταρα PAMCOD μπορεί να εξηγηθεί από τις υψηλότερες ενεργειακές τους απαιτήσεις για τη βιοσύνθεση της σακχαρόζης, ως απάντηση στην καταπόνηση αλατότητας, όπως και για τη μετατροπή της χολίνης σε βεταΐνη της γλυκίνης (Parageorgiou and Murata, 1995; Ladas and Parageorgiou, 2000). Αυτοί οι δύο μηχανισμοί είναι κρίσιμοι για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων κατά την καταπόνηση στα κύτταρα PAMCOD, και απαιτούν ATP, που εξασφαλίζεται με την αύξηση της φωτοσύνθεσης.

Δεδομένης της ικανότητας πολλαπλασιασμού των κυττάρων PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714 κατά τη συνδυασμένη καταπόνηση αλατότητας και υψηλής θερμοκρασίας, μελετήθηκε η επίδραση των δύο καταπονήσεων στην ενδοκυτταρική συσσώρευση σακχαρόζης. Στον **Πίνακα 1** φαίνεται ότι τόσο στα κύτταρα PAMCOD όσο και στα κύτταρα *Synechocystis* sp. PCC6714, η περιεκτικότητα σε σακχαρόζη φτάνει στα μέγιστα επίπεδά της τη 14η ημέρα ανάπτυξης σε συνθήκες συνδυαστικής καταπόνησης. Ειδικότερα, η σακχαρόζη συσσωρεύεται σε μεγάλες ποσότητες μέχρι την 7η ημέρα ανάπτυξης στα κύτταρα PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714, στη συνέχεια αυξάνεται ελάχιστα έως την 14η ημέρα, και κατόπιν παραμένει σταθερή.

Πίνακας 1. Περιεκτικότητα σε σακχαρόζη στα κύτταρα PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714 κατά τη σταθερή έκθεση σε συνδυασμένη καταπόνηση αλατότητας (0.4M NaCl) και υψηλής θερμοκρασίας (35°C). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Στέλεχος	Περιεκτικότητα σε σακχαρόζη (mol σακχαρόζης mol Chl _a ⁻¹)			
	1 ^η ημέρα	7 ^η ημέρα	12 ^η ημέρα	14 ^η ημέρα
PAMCOD	0.4 ± 0.05	16.3 ± 4.34	17.5 ± 2.69	18.33 ± 1.86
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6714	1.2 ± 0.28	19.1 ± 3.55	22 ± 4.08	22.38 ± 3.63

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η μεμονωμένη επίδραση της καταπόνησης υψηλής θερμοκρασίας στην ενδοκυτταρική συσσώρευση σακχαρόζης στα δύο στελέχη. Στον **Πίνακα 2** παρουσιάζεται η μέγιστη περιεκτικότητα σακχαρόζης των κυττάρων PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714, όταν καταπονούνται στην ίδια αλατότητα (0.4M NaCl) στη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης (31°C) και σε υψηλή θερμοκρασία (35°C).

Πίνακας 2. Μέγιστη περιεκτικότητα σε σακχαρόζη των κυττάρων PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714 μετά την ανάπτυξη για 14 ημέρες στους 31°C (τυπική θερμοκρασία ανάπτυξης) και στους 35°C (υψηλή θερμοκρασία), παρουσία 0.4 M NaCl. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Στέλεχος	Περιεκτικότητα σε σακχαρόζη (mol σακχαρόζης mol Chl α ⁻¹)	
	31°C	35°C
PAMCOD	12.22 ± 1.37	18.33 ± 1.86
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6714	11.19 ± 0.85	22.38 ± 3.63

Και στα δύο στελέχη, η περιεκτικότητα σε σακχαρόζη αυξάνεται σταδιακά με την αύξηση της θερμοκρασίας. Στους 31°C, η συγκέντρωση σακχαρόζης στα κύτταρα PAMCOD ήταν 12.22 mol σακχαρόζης mol Chl α ⁻¹ και στα κύτταρα *Synechocystis* sp. PCC6714 ήταν 11.19 mol σακχαρόζης mol Chl α ⁻¹. Με την καταπόνηση υψηλής θερμοκρασίας στους 35°C, η συγκέντρωση σακχαρόζης στα κύτταρα PAMCOD ήταν 18.33 mol σακχαρόζης mol Chl α ⁻¹ και στα κύτταρα *Synechocystis* sp. PCC6714 ήταν 22.38 mol σακχαρόζης mol Chl α ⁻¹.

Συμπερασματικά, η προσθήκη της καταπόνησης υψηλής θερμοκρασίας (35°C) κατά τη φωτοτροφική ανάπτυξη σε καταπόνηση αλατότητας, προκάλεσε ραγδαία αύξηση στην ενδοκυτταρική περιεκτικότητα σακχαρόζης του *Synechocystis* sp. PCC6714 (κατά 108%), όπως και του PAMCOD (κατά 50%). Η συνεργιστική δράση των δύο καταπονήσεων οδηγεί στη αύξηση της συσσώρευσης της σακχαρόζης ως κύριας διαλυτής ουσίας για τη ρύθμιση της ωσμωτικής πίεσης και την αποφυγή της αφυδάτωσης στα δύο στελέχη.

2. Παραγωγή H₂ από το PAMCOD και το *Synechocystis* sp. PCC6714 με σκοτεινή ζύμωση της σακχαρόζης

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η ικανότητα του στελέχους *Synechocystis* sp. PCC6714 να χρησιμοποιεί την ενδοκυτταρική του σακχαρόζη για να παράγει H₂ σε συνθήκες σκοτεινής ζύμωσης. Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση του pH στην παραγωγικότητα H₂ των καλλιεργειών PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714 στη σκοτεινή ζύμωση (**Πίνακας 3**). Η έκλυση του H₂ ξεκινά την 7^η ημέρα και σταματά τη 15^η ημέρα της σκοτεινής αναερόβιας ζύμωσης του PAMCOD (Vayenos et al., 2020), όπως και του *Synechocystis* sp. PCC6714, διαρκώντας συνολικά 192 ώρες.

Πίνακας 3. Η επίδραση του pH στην παραγωγή H₂ από τις καλλιέργειες PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Στέλεχος	Παραγωγή H ₂ (nmol H ₂ · mg Chl _a ⁻¹ · h ⁻¹)			
	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5	pH 8.0
PAMCOD	7.42 ± 3.1	22.37 ± 9.65	23.09 ± 9.1	11.22 ± 3.42
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6714	3.46 ± 1.64	6.07 ± 2.0	16.4 ± 5.49	22.86 ± 4.85

Το pH επηρεάζει άμεσα τη δραστικότητα τόσο των ενδογενών (A/N) ιμβερτασών όσο και των ενδογενών [NiFe]-υδρογενασών. Η σακχαρόζη καταβολίστηκε πλήρως από την ιμβερτάση του PAMCOD σε pH 7.5 και από την ιμβερτάση του *Synechocystis* sp. PCC6714 σε pH 8, καθώς δεν ανιχνεύθηκαν αποθέματα σακχαρόζης μετά τη σκοτεινή ζύμωση των δύο στελεχών σε αυτές τις τιμές pH. Ο πλήρης καταβολισμός της ενδοκυτταρικής σακχαρόζης οδήγησε στη μέγιστη απόδοση παραγωγής H₂, 23.09 nmoles H₂ · mg Chl_a⁻¹ · h⁻¹ από τα κύτταρα PAMCOD και 22.86 nmoles H₂ · mg Chl_a⁻¹ · h⁻¹ από τα κύτταρα *Synechocystis* sp. PCC6714. Σε όρους H₂ ανά σακχαρόζη, τα κύτταρα *Synechocystis* sp. PCC6714 απέδωσαν 0.21 mol H₂ mol σακχαρόζης⁻¹, ενώ τα κύτταρα PAMCOD απέδωσαν 0.52 mol H₂ mol σακχαρόζης⁻¹.

3. Παραγωγή H₂ από το PAMCOD με σκοτεινή ζύμωση σακχαρόζης και γλυκογόνου

Κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης, τα κυανοβακτήρια αποθηκεύουν άνθρακα και ενέργεια κυρίως με τη μορφή γλυκογόνου (Suzuki et al., 2007). Γι' αυτό το λόγο, εκτός από την περιεκτικότητα σακχαρόζης, προσδιορίστηκε και η περιεκτικότητα γλυκογόνου στα κύτταρα PAMCOD, ως ο λόγος γλυκόζης Chl_a⁻¹ (**Πίνακας 4**). Σε κύτταρα PAMCOD που καλλιεργήθηκαν φωτοαυτοτροφικά για 4 ημέρες στους 31°C σε θρεπτικό μέσο BG-11 απουσία NaCl (καλλιέργεια ελέγχου), η σακχαρόζη δεν ήταν ανιχνεύσιμη και η περιεκτικότητα σε γλυκογόνο ήταν 147.4±28.1 mol γλυκόζης mol Chl_a⁻¹. Σε κύτταρα PAMCOD που καλλιεργήθηκαν σε καταπόνηση αλατότητας (0.4M NaCl), η συγκέντρωση σακχαρόζης ήταν 10.3±3.0 mol σακχαρόζης mol Chl_a⁻¹ (σύμφωνα με τους Vayenos et al, 2020), ενώ η συγκέντρωση γλυκογόνου ήταν 126.3±26.4 mol γλυκόζης mol Chl_a⁻¹.

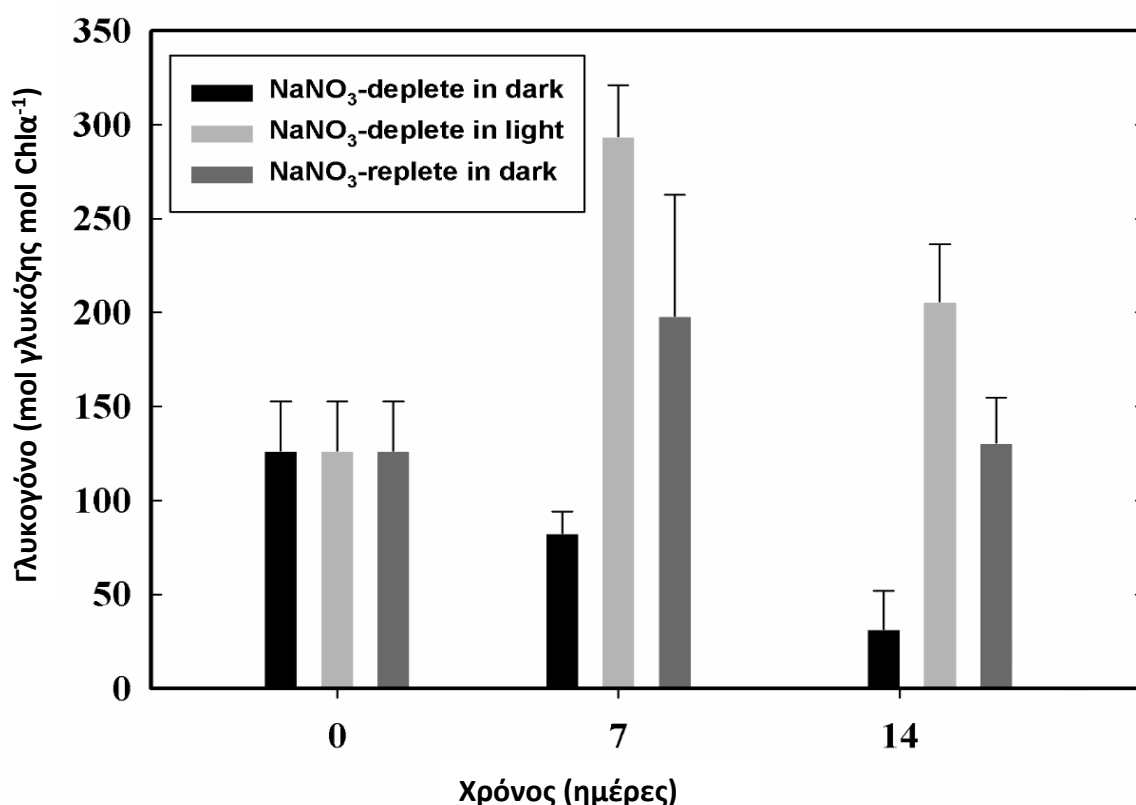
Πίνακας 4. Συγκέντρωση σακχαρόζης και γλυκογόνου στα κύτταρα PAMCOD την 4η ημέρα καλλιέργειας, παρουσία και απουσία 0.4M NaCl. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

	Συγκέντρωση σακχαρόζης (mol σακχαρόζης mol Chl ^a ⁻¹)	Συγκέντρωση γλυκογόνου (mol γλυκόζης mol Chl ^a ⁻¹)
Ανάπτυξη 4 ημερών (31°C, 0.0M NaCl)	0	147.4 ± 28.1
Ανάπτυξη 4 ημερών (31°C, 0.4M NaCl)	10.3 ± 3.0	126.3 ± 26.4

Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 4**, τα κύτταρα PAMCOD συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες γλυκογόνου κατά τη φωτοτροφική ανάπτυξη παρουσία και απουσία NaCl. Όπως έχει διαπιστωθεί και από τους Stal and Moezelaar (1997) για το *S. elongatus* PCC7942, δεδομένου ότι η συγκέντρωση του γλυκογόνου στο PAMCOD δεν επηρεάζεται σοβαρά από την παρουσία NaCl, σχεδόν όλος ο άνθρακας που απαιτείται για την παραγωγή υδατανθράκων προέρχεται από την de novo δέσμευση CO₂ μέσω του κύκλου Calvin-Benson. Έτσι, παρά το γεγονός ότι η βιοσύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου εμπλέκουν μια ενεργοποιημένη μορφή γλυκόζης (UDP-γλυκόζη) στο *S. elongatus*, το γλυκογόνο χρησιμεύει ως δεξαμενή άνθρακα για τη σύνθεση σακχαρόζης και όχι ως ανταγωνιστικό μόριο (**Πίνακας 4**; Luan et al., 2019).

Κατά τη φωτοσύνθεση σε συνθήκες έλλειψης αζώτου, τα κύτταρα *S. elongatus* PCC7942 είναι ικανά να συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες γλυκογόνου (Suzuki et al., 2007). Η απουσία αζώτου (απουσία NaNO₃ από το θρεπτικό μέσο) προκαλεί την έντονη συσσώρευση γλυκογόνου και στα κύτταρα PAMCOD, τόσο σε φωτεινή ζύμωση όσο και σε σκοτεινή ζύμωση, όπως φαίνεται στο **Γράφημα 5**. Μετά από 4 ημέρες φωτοτροφικής καλλιέργειας σε καταπόνηση αλατότητας, ακολούθησε η ζύμωση των καλλιεργειών PAMCOD για 15 ημέρες, στο σκοτάδι παρουσία ή απουσία NaNO₃, και στο φως απουσία NaNO₃. Η μέση αποθήκευση γλυκογόνου πριν τη ζύμωση ήταν 126.3±26.4 mol γλυκόζης mol Chl^a⁻¹. Την 7η ημέρα σε σκοτεινή ζύμωση παρουσία NaNO₃, το ενδοκυτταρικό γλυκογόνο αυξήθηκε σε 198±64.8 mol γλυκόζης mol Chl^a⁻¹, ενώ σε φωτεινή ζύμωση απουσία NaNO₃, το ενδοκυτταρικό γλυκογόνο αυξήθηκε σε 293.7±27.1 mol γλυκόζης mol Chl^a⁻¹. Αντίθετα, σε σκοτεινή ζύμωση απουσία NaNO₃, το ενδοκυτταρικό γλυκογόνο μειώθηκε σε 82.4±11.7 mol γλυκόζης mol Chl^a⁻¹. Τη 15η

ημέρα σε σκοτεινή ζύμωση παρουσία NaNO_3 , το ενδοκυτταρικό γλυκογόνο μειώθηκε σε σύγκριση με την 7^η ημέρα σε 130.5 ± 51.8 mol γλυκόζης mol $\text{Chl}a^{-1}$, ενώ σε φωτεινή ζύμωση απουσία NaNO_3 , το ενδοκυτταρικό γλυκογόνο μειώθηκε σε 205.6 ± 30.6 mol γλυκόζης mol $\text{Chl}a^{-1}$. Σε σκοτεινή ζύμωση απουσία NaNO_3 , το αποθηκευμένο γλυκογόνο επίσης μειώθηκε σε σύγκριση με την 7^η ημέρα, σε μόλις 36.5 ± 15.1 mol γλυκόζης mol $\text{Chl}a^{-1}$. Συνολικά, στη σκοτεινή ζύμωση απουσία NaNO_3 , η περιεκτικότητα σε γλυκογόνο στα κύτταρα PAMCOD μειώθηκε κατά 35% μέχρι την 7^η ημέρα και κατά 71% μέχρι τη 15^η ημέρα της περιόδου ζύμωσης.



Γράφημα 5. Συγκέντρωση γλυκογόνου στα κύτταρα PAMCOD σε αναερόβιες συνθήκες, παρουσία NaNO_3 στο σκοτάδι (μαύρες στήλες), απουσία NaNO_3 στο σκοτάδι (ανοιχτές γκριζες στήλες) και απουσία NaNO_3 στο φως (σκούρες γκριζες στήλες). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Όπως οι διαλυτοί (π.χ. σακχαρόζη), έτσι και οι πολυμερείς (π.χ. γλυκογόνο) υδατάνθρακες μπορούν να λειτουργήσουν ως υποστρώματα ζύμωσης, παράγοντας H_2 , αιθανόλη και διάφορα οργανικά οξέα ως προϊόντα (Stal and Moezelaar, 1997). Με αυτό το δεδομένο, επιχειρήσαμε να προκαλέσουμε την αποικοδόμηση του γλυκογόνου που συσσωρεύεται στα κύτταρα PAMCOD με την απουσία NaNO_3 σε σκοτεινή ζύμωση, ώστε η παραγόμενη γλυκόζη να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την παραγωγή H_2 . Τη φωτοσύνθεση των κυττάρων

PAMCOD σε καταπόνηση αλατότητας, ακολούθησε η σκοτεινή ζύμωση παρουσία NaNO_3 (ζύμωση ελέγχου) και απουσία NaNO_3 , και υπολογίστηκε η παραγωγικότητα H_2 . Η έκλυση του H_2 ξεκινά την 7^η ημέρα και σταματά τη 15^η ημέρα της σκοτεινής αναερόβιας ζύμωσης του PAMCOD (Vayenos et al., 2020). Στον **Πίνακα 5** παρουσιάζονται οι ρυθμοί παραγωγής H_2 κατά τη διάρκεια της σκοτεινής ζύμωσης παρουσία και απουσία NaNO_3 , για δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις κυττάρων της καλλιέργειας PAMCOD.

Πίνακας 5. Παραγωγή H_2 από διαφορετικές συγκεντρώσεις καλλιεργείων PAMCOD, σε σκοτεινή ζύμωση παρουσία και απουσία NaNO_3 . Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

	H_2 ($\mu\text{mol H}_2 \cdot \text{mg Chl}\alpha^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	
Συγκέντρωση καλλιέργειας PAMCOD (cfu/ml)	Παρουσία NaNO_3 (Σκοτεινή ζύμωση)	Απουσία NaNO_3 (Σκοτεινή ζύμωση)
2.3×10^7	0.0007 ± 0.00023	6.554 ± 0.43
4.6×10^7	0.0002 ± 0.00003	0.5178 ± 0.12

Εκτός από τη μεγάλη μείωση στην περιεκτικότητα γλυκογόνου, η απουσία NaNO_3 κατά τη σκοτεινή ζύμωση των κυττάρων PAMCOD προκάλεσε και τη ραγδαία αύξηση στην παραγωγή H_2 . Παρουσία NaNO_3 , ο ρυθμός έκλυσης H_2 για τις δύο συγκεντρώσεις ήταν $0.007 \mu\text{mol H}_2 \cdot \text{mg Chl}\alpha^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ και $0.002 \mu\text{mol H}_2 \cdot \text{mg Chl}\alpha^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ αντίστοιχα. Απουσία NaNO_3 , από τις αραιές καλλιέργειες PAMCOD (2.3×10^7 cfu/ml), παρατηρήθηκε ο μέγιστος ρυθμός έκλυσης H_2 ($6.55 \mu\text{mol H}_2 \cdot \text{mg Chl}\alpha^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), ενώ η απόδοση H_2 από τις πυκνές καλλιέργειες (4.6×10^7 cfu/ml) ήταν πολύ χαμηλότερη ($0.51 \mu\text{mol H}_2 \cdot \text{mg Chl}\alpha^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου πλέον της σακχαρόζης του PAMCOD σε σκοτεινή ζύμωση απουσία NaNO_3 , αποδίδει 10.000 φορές περισσότερο H_2 σε σύγκριση με την αποικοδόμηση μόνο της σακχαρόζης σε σκοτεινή ζύμωση παρουσία NaNO_3 , σε καλλιέργειες *S. elongatus* PCC7942 (**Πίνακας 5**; Vayenos et al., 2020). Επιπλέον, διαπιστώνεται ότι η παραγωγή H_2 σχετίζεται με τη συγκέντρωση των κυττάρων PAMCOD, με τις πιο αραιές καλλιέργειες να παρουσιάζουν τη μέγιστη παραγωγικότητα H_2 , και τις πιο πυκνές καλλιέργειες να παρουσιάζουν μειωμένη παραγωγικότητα H_2 . Η μειωμένη παραγωγή H_2 στις πιο πυκνές καλλιέργειες μπορεί πιθανώς να αποδοθεί σε ανάστροφη παρεμπόδιση από κάποιο προϊόν της ζύμωσης που προκαλεί αλλαγή στο pH (Aoyama et al., 1997). Όπως έχει αποδειχθεί στην

περίπτωση του *G. alpicola* CALU743, η διάσπαση του γλυκογόνου συνοδεύεται από την παραγωγή οξικού οξέος (Troshina et al., 2002). Καθώς οι υδρογενάσες παρουσιάζουν βέλτιστη δραστηριότητα σε αλκαλικό pH, αυτό το παραπροϊόν της ζύμωσης μπορεί να δημιουργήσει όξινο περιβάλλον, μειώνοντας το pH σε επίπεδα ανασταλτικά για την παραγωγή H₂.

Πίνακας 6. Λόγος απορρόφησης A620nm/A678nm και μεταβολή του ενδοκυτταρικού γλυκογόνου (σε σύγκριση με την ημέρα 0) των κυττάρων PAMCOD κατά τη ζύμωση παρουσία και απουσία NaNO₃. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν τις ημέρες 0, 7 και 15 της ζύμωσης στο φως ή στο σκοτάδι και είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ημέρα Ζύμωσης	Συνθήκες	A620nm/A678nm	Μεταβολή ενδοκυτταρικού γλυκογόνου (%)
0		1.053 ± 0.086	
7	Φως, Απουσία NaNO ₃	1.051 ± 0.148	+133
	Σκοτάδι, Παρουσία NaNO ₃	0.974 ± 0.139	+57
	Σκοτάδι, Απουσία NaNO ₃	1.011 ± 0.104	-35
15	Φως, Απουσία NaNO ₃	1.045 ± 0.143	+63
	Σκοτάδι, Παρουσία NaNO ₃	0.953 ± 0.109	+3
	Σκοτάδι, Απουσία NaNO ₃	1.004 ± 0.115	-76

Σε συνθήκες έλλειψης αζώτου, η συσσώρευση γλυκογόνου για τη ζυμωτική παραγωγή H₂ στα κύτταρα *G. alpicola* και *A. halophytica*, προϋποθέτει την αποικοδόμηση φωτοσυνθετικών χρωστικών όπως είναι οι φυκοβιλίνες, και πιθανώς άλλων βιομορίων όπως πρωτεΐνες και ένζυμα που εμπλέκονται στην αναπνευστική και φωτοσυνθετική διαδικασία (Taikhae et al., 2015). Επίσης, είναι γνωστό πως και τα κύτταρα *Synechococcus elongatus* PCC7942 συσσωρεύουν γλυκογόνο κατά τη φωτοσύνθεση απουσία αζώτου με ταυτόχρονη αποικοδόμηση των φυκοβιλιωμάτων τους και επακόλουθη χλώρωση (Weyman et al., 2011). Γι' αυτό το λόγο, εξετάσαμε τη δομική ακεραιότητα των φυκοβιλιωμάτων στα κύτταρα PAMCOD κατά τη σκοτεινή ζύμωση παρουσία ή απουσία NaNO₃, όπως και κατά τη φωτεινή ζύμωση απουσία NaNO₃. Στον **Πίνακα 6** απεικονίζεται ο λόγος απορρόφησης A620nm/A678nm, παράλληλα με την ποσοστιαία μεταβολή του ενδοκυτταρικού γλυκογόνου του PAMCOD στις διάφορες συνθήκες ζύμωσης (σε σύγκριση με το γλυκογόνο πριν τη ζύμωση - **Γράφημα 5**). Ο λόγος αυτός είναι ένας δείκτης της ακεραιότητας των φυκοβιλιωμάτων, δεδομένου ότι τα φάσματα απορρόφησης των κυανοβακτηρίων

παρουσιάζουν τρεις κορυφές απορρόφησης των χρωστικών τους, στα 436 nm (Chl*a*), στα 620 nm (φυκοκυανίνη) και στα 678 nm (Chl*a*) (Gao et al., 2009).

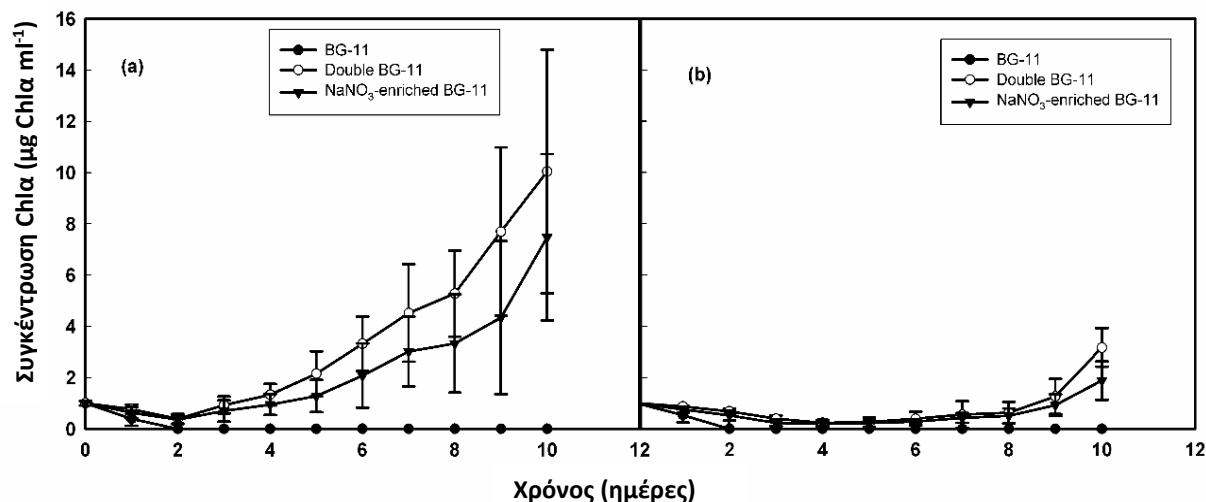
Αντίθετα με άλλα κυανοβακτηριακά στελέχη, στην περίπτωση του PAMCOD οι διακυμάνσεις του γλυκογόνου δεν επηρέασαν σημαντικά τη δομική ακεραιότητα των φωτοσυνθετικών χρωστικών καθ' όλη τη διάρκεια των ζυμώσεων, είτε στο φως είτε στο σκοτάδι. Παρά τις μεταβολές στην περιεκτικότητα γλυκογόνου παρουσία και απουσία NaNO₃ (που κυμαίνονται από -71% έως 132%), η δομική ακεραιότητα των φυκοβιλισωμάτων του PAMCOD δεν επηρεάστηκε ούτε την 7^η, ούτε τη 15^η ημέρα της ζύμωσης, όπως φαίνεται από τη σταθερότητα του λόγου απορρόφησης στα 620nm/678nm. Ακόμα και η υψηλή παραγωγικότητα H₂ που επιτυγχάνεται με την απουσία NaNO₃ σε σκοτεινή ζύμωση, δεν προκάλεσε αποικοδόμηση των φυκοβιλισωμάτων, παρόλο που αυτά αποτελούν σημαντικές δεξαμενές αζώτου (Taikhao et al., 2015). Είναι πιθανό η παρουσία της βεταΐνης της γλυκίνης σε ενδοκυτταρικά επίπεδα 60-80 mM στα κύτταρα PAMCOD (Papageorgiou and Murata, 1995; Deshniun et al., 1995; Ladas and Papageorgiou, 2000) να προστατεύει την ακεραιότητα της φωτοσυνθετικής συσκευής (Allakhverdiev et al 2003; Stamatakis and Papageorgiou, 1993).

4. Αναγέννηση της κυανοβακτηριακής βιομάζας

Τα κυανοβακτηριακά κύτταρα καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες των αζωτούχων αποθεμάτων τους για να ικανοποιήσουν τις ανάγκες συντήρησής τους, με αποτέλεσμα να απαιτούν μεγάλες ποσότητες νιτρικών και για τη φωτοσυνθετική τους λειτουργία (Forchhammer and Schwarz, 2019). Το κοινώς χρησιμοποιούμενο στις εργαστηριακές καλλιέργειες θρεπτικό μέσο ανάπτυξης BG-11, περιέχει NaNO₃ σε συγκέντρωση 17.6 mM ή 1.5 g L⁻¹ (Rippka et al., 1979).

Για την αναγέννηση των κυανοβακτηριακών καλλιεργειών PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714 μετά από 15ήμερη σκοτεινή ζύμωση παρουσία NaNO₃, εξετάστηκε η ικανότητα των δύο οργανισμών να αποκαθιστούν τη μεταβολική τους δραστηριότητα και να πολλαπλασιάζονται σε φρέσκο απλό θρεπτικό μέσο BG-11, μέσο BG-11 διπλάσιας συγκέντρωσης θρεπτικών συστατικών και μέσο BG-11 διπλάσιας συγκέντρωσης NaNO₃, με σταθερό φως και CO₂ για 10 ημέρες. Όπως απεικονίζεται στο **Γράφημα 6**, η αναγέννηση των καλλιεργειών PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714 μετά τη σκοτεινή ζύμωση, ήταν επιτυχής μόνο στα δύο θρεπτικά μέσα BG-11 που ήταν εμπλουτισμένα σε NaNO₃, και όχι στο

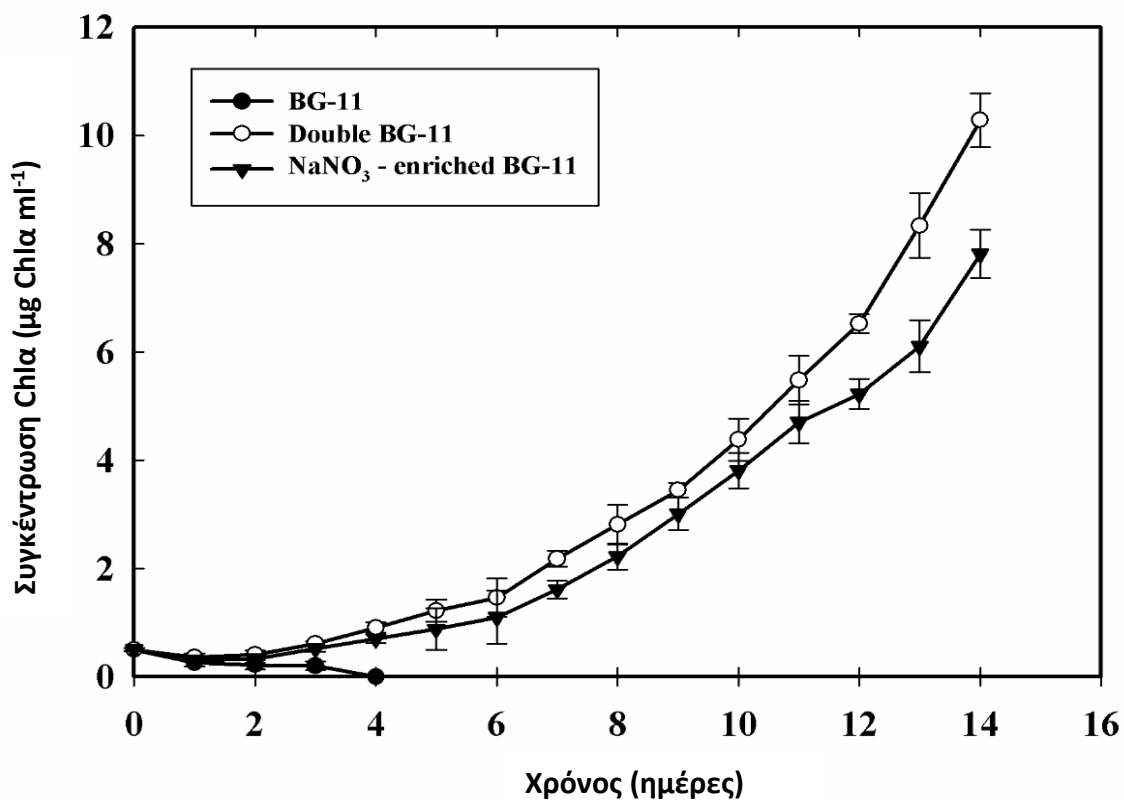
απλό μέσο BG-11. Κατά συνέπεια, τα κύτταρα PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714 χρειάζονται υψηλές ποσότητες NaNO_3 στα μέσα ανάπτυξής τους για την αποκατάσταση της φωτοσυνθετικής τους λειτουργίας.



Γράφημα 6. Ρυθμός πολλαπλασιασμού μετά τη σκοτεινή ζύμωση παρουσία N των καλλιεργειών PAMCOD (a) και *Synechocystis* sp. PCC6714 (b), σε απλό μέσο BG-11 (-●-), μέσο BG-11 διπλάσιας συγκέντρωσης θρεπτικών (-○-) και μέσο BG-11 εμπλουτισμένο με NaNO_3 (-▼-). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ακόμα, διαπιστώθηκε ότι η ανάκαμψη του πολλαπλασιασμού των κυττάρων *Synechocystis* sp. PCC6714 άρχισε μετά από 8 ημέρες, ενώ των κυττάρων PAMCOD μετά από 4 ημέρες, και ήταν ανεξάρτητη από τα μέσα καλλιέργειας και στις δύο περιπτώσεις (**Γράφημα 6**).

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η αναγέννηση των καλλιεργειών PAMCOD μετά τη σκοτεινή ζύμωση απουσία NaNO_3 . Το **Γράφημα 7** απεικονίζει την ικανότητα των κυττάρων PAMCOD να πολλαπλασιάζονται και να ανακτούν τον μεταβολισμό τους κατά τη διάρκεια 14 ημερών με σταθερό φως και CO_2 , όπως και στο **Γράφημα 6**, σε μέσα καλλιέργειας εμπλουτισμένα με NaNO_3 , αλλά όχι στο απλό μέσο BG-11.



Γράφημα 7. Ρυθμός πολλαπλασιασμού μετά από σκοτεινή ζύμωση απουσία N κυττάρων PAMCOD σε απλό μέσο BG-11 (-●-), μέσο BG-11 διπλάσιας συγκέντρωσης θρεπτικών συστατικών (-○-) και μέσο BG-11 διπλάσιας συγκέντρωσης NaNO₃ (-▼-). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Με αυτό τον τρόπο, αποδεικνύεται ότι η παρουσία επαρκών ποσοτήτων NaNO₃ είναι θεμελιώδης και για την ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυανοβακτηριακών στελεχών μετά τη σκοτεινή ζύμωση απουσία NaNO₃ (**Γράφημα 7**).

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το στέλεχος PAMCOD του *S. elongatus* PCC7942, συσσωρεύει σακχαρόζη κατά τη φωτοτροφική ανάπτυξη σε καταπόνηση αλατότητας (Ladas and Parageorgiou, 2001). Επιπλέον, αρκετά στελέχη *Synechocystis* sp., συμπεριλαμβανομένου του *Synechocystis* sp. PCC6714, έχουν την ικανότητα σύνθεσης σακχαρόζης όταν καλλιεργούνται σε αλατούχο μέσο και υψηλή θερμοκρασία (35°C), κατά προτίμηση κατά τα αρχικά στάδια εγκλιματισμού. Στα κύτταρα *Synechocystis* sp. PCC6714, η περιεκτικότητα σε σακχαρόζη αυξάνεται σταδιακά με την αύξηση της θερμοκρασίας, έως ότου μεγιστοποιηθεί στους 37°C σε συνθήκες χαμηλής αλατότητας (έως 0.7M NaCl) (Warr et al., 1985). Η ανάπτυξη σε συνδυασμένη καταπόνηση υψηλής θερμοκρασίας (35°C) και χαμηλής αλατότητας (0.4M NaCl), αποδείχθηκε ότι ενισχύει τη σύνθεση της σακχαρόζης στο *Synechocystis* sp. PCC6714 (**Πίνακας 2**), διατηρώντας τον πολλαπλασιασμό (**Γράφημα 2**) και τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα (**Γράφημα 4**) των κυττάρων. Οι ίδιες συνθήκες οδήγησαν σε αύξηση της συσσώρευσης σακχαρόζης και στα κύτταρα PAMCOD (**Πίνακας 2**), με καλύτερη διατήρηση του πολλαπλασιασμού (**Γράφημα 1**) και της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας (**Γράφημα 3**), πιθανώς λόγω της ενδοκυτταρικής παρουσίας της βεταΐνης της γλυκίνης (Parageorgiou and Murata, 1995; Ladas and Parageorgiou, 2000).

Κατά τη σκοτεινή ζύμωση και των δύο στελεχών, η γλυκόζη που προκύπτει από την υδρόλυση της σακχαρόζης με τη μεσολάβηση της ιμπερτάσης υφίσταται αποικοδόμηση μέσω της οδού Embden-Meyerhof-Parnas. Στη συνέχεια, εισέρχεται στην οδό που χαρακτηρίζεται από την εξαρτώμενη από το CoA αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού, τη φωσφοτρανσακετυλάση και τις αντιδράσεις οξικής κινάσης που αποδίδουν ενέργεια (Troshina et al. 2002). Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, η φερεδοξίνη μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο ένζυμο Ηοκ-υδρογενάση, οδηγώντας στην παραγωγή Η₂, οξικού οξέος και διοξειδίου του άνθρακα ως κύριων προϊόντων. Οι τιμές pH που έχουν προταθεί ως βέλτιστες για την παραγωγή Η₂ σε συνθήκες ζύμωσης στο σκοτάδι, κυμαίνονται από pH 4.5 έως pH 8.3, και σχετίζονται άμεσα με τη δραστηριότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του Η₂ (Ren et al, 1997; Fang et al., 2002a; Calli et al., 2008; Bolatkhan et al., 2019). Στην περίπτωση της σκοτεινής ζύμωσης των κυττάρων PAMCOD, η μέγιστη υδρόλυση της σακχαρόζης από την ενδογενή ιμπερτάση και παραγωγή Η₂ από την ενδογενή Ηοκ-υδρογενάση, επιτεύχθηκε στο pH 7.5. Αντίστοιχα, το pH 8 ήταν το βέλτιστο στη σκοτεινή ζύμωση των κυττάρων *Synechocystis* sp. PCC6714 (**Πίνακας 3**). Σε αυτές τις συνθήκες, οι

καλλιέργειες PAMCOD απέδωσαν $23.09 \text{ nmoles H}_2 \times \text{mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (αύξηση της απόδοσης κατά 10.5 φορές σε σχέση με Vayenos et al., 2020), και, ακολουθώντας το ίδιο ζυμωτικό μονοπάτι, το *Synechocystis* sp. PCC6714 απέδωσε $22.86 \text{ nmoles H}_2 \times \text{mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (**Πίνακας 3**).

Το γλυκογόνο, το κύριο υδατανθρακικό πολυμερές στα κυανοβακτήρια, λειτουργεί ως βασικό υπόστρωμα άνθρακα στον ημερήσιο μεταβολισμό, αλλά και ως ενεργειακό απόθεμα για τις κυτταρικές διεργασίες σε αντίξοες συνθήκες (Suzuki et al., 2007; Hickman et al., 2013). Το στέλεχος PAMCOD, είναι ικανό να συσσωρεύει και να αποικοδομεί το γλυκογόνο σε σκοτεινή ζύμωση απουσία NaNO_3 , χρησιμοποιώντας το ως εναλλακτικό υδατανθρακικό υποστρωμα για την παραγωγή H_2 (**Γράφημα 5**). Σε συνθήκες σκοτεινής αναερόβιας ζύμωσης απουσία NaNO_3 , η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GlgP) αποικοδομεί το γλυκογόνο σε γλυκόζη και υδρολύει άμεσα τους ακραίους α -1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς προς το σχηματισμό μονάδων 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση διευκολύνεται επίσης από το ένζυμο αποδιάταξης του γλυκογόνου (GlgX) που απελευθερώνει έτσι τα διακλαδισμένα υπολείμματα γλυκόζης. Η γλυκόζη που προκύπτει καταβολίζεται μέσω της οδού Embden-Meyerhof-Parnas (γλυκόλυση), της οδού Entner-Doudoroff και της οξειδωτικής οδού των φωσφορικών πεντοζών (OPP) και παράγει πυροσταφυλικό οξύ (Antal et al., 2011; Allakhverdiev et al., 2010). Η γλυκόλυση της γλυκόζης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή NADPH από την οξειδοαναγωγή της φερρεδοξίνης του πυροσταφυλικού. Οι αμφίδρομες [NiFe]-υδρογενάσες των κυανοβακτηρίων μπορούν να συνδέσουν το NADPH και το FNR με τη μεταβολική διαδικασία του H_2 , ανάγοντας το H^+ σε H_2 . Το γλυκογόνο είναι η πιο άφθονη πηγή άνθρακα κατά τη διάρκεια της σκοτεινής ζύμωσης των PAMCOD απουσία NaNO_3 , καθώς άλλα υποστρώματα για την παραγωγή H_2 (π.χ. σακχαρόζη) δεν ανιχνεύθηκαν σε σημαντικές ποσότητες πριν ή μετά τη ζύμωση ούτε χορηγήθηκαν τεχνητά.

Όπως σε άλλα κυανοβακτήρια του γλυκού νερού (*Arthrospira maxima*, *Gloeocapsa alpicola*, *Spirulina platensis*), έτσι και στο PAMCOD, υπό συνθήκες έλλειψης αζώτου επιτυγχάνεται η υψηλότερη παραγωγή H_2 με σκοτεινή ζύμωση ($6.55 \text{ } \mu\text{mol H}_2 \cdot \text{mg Chla}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; **Πίνακας 5**) (Troshina et al., 2002; Ainas et al., 2017; Aoyama et al., 1997; Ananyev et al., 2008; Serebryakova et al., 1999). Η απόδοση παραγωγής H_2 που επιτυγχάνεται με αυτή τη μεθοδολογία συμπεριλαμβάνεται στις υψηλότερες που έχουν παρατηρηθεί στα κυανοβακτήρια. Ωστόσο, αντίθετα με το PAMCOD, τα στελέχη *A. halophytica* και *G. alpicola* αποικοδομούν χρωστικές, πρωτεΐνες και ένζυμα που εμπλέκονται στην αναπνευστική και

φωτοσυνθετική διαδικασία, για να συσσωρεύσουν γλυκογόνο απουσία NaNO_3 . Με αυτό τον τρόπο απελευθερώνεται μεγάλη ποσότητα ενέργειας, καθώς και NAD(P)H και ηλεκτρόνια, για την παραγωγή H_2 (Taikhae et al., 2015). Επιπλέον, έχει προταθεί ότι επάγεται η αύξηση της γονιδιακής έκφρασης και της δραστηριότητας της αμφίδρομης υδρογενάσης, δεδομένου ότι η αναγωγή των νιτρικών είναι προτιμώμενη δεξαμενή ηλεκτρονίων σε σύγκριση με την υδρογενάση και ανταγωνίζεται για τα ηλεκτρόνια που διαφορετικά θα κατέληγαν στο ένζυμο (Taikhae et al., 2015). Ως εκ τούτου, η διαθεσιμότητα αζώτου υπό μορφή NaNO_3 στο θρεπτικό μέσο περιορίζει την παραγωγή H_2 (Taikhae et al., 2015). Επομένως, η αυξημένη παραγωγή H_2 από τα κύτταρα PAMCOD απουσία NaNO_3 , οφείλεται στην αύξηση του υποστρώματος ανηγμένου άνθρακα (γλυκογόνο), ελλείψει ανταγωνιστικού υποστρώματος για την κατανάλωση NADPH (NaNO_3), σε συνδυασμό με τη διέγερση της δραστηριότητας της αμφίδρομης Ηοκ-υδρογενάσης H1 κατά το σχηματισμό NAD(P)H , όπως παρατηρήθηκε στην περίπτωση των *Synechocystis* sp. PCC6803 και *G. alpicola* CALU734 (Sadvakasova et al., 2020; Troshina et al., 2002).

Οι μέθοδοι παραγωγής H_2 με τη χρήση των κυανοβακτηριακών στελεχών PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714 παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες προοπτικές ως βιώσιμες πηγές ενέργειας. Τα πλεονεκτήματα αυτών των προσεγγίσεων έγκεινται στην αξιοποίηση των φυσιολογικών ικανοτήτων των κυανοβακτηρίων, όπως η φωτοσύνθεση για τη δέσμευση άνθρακα και τη συσσώρευση υδατανθράκων και η δυνατότητα παραγωγής H_2 μέσω ενδογενών ενζύμων. Ο χρονικός διαχωρισμός μεταξύ της φωτοεξαρθώμενης συσσώρευσης σακχαρόζης και της ζυμωτικής παραγωγής H_2 στο σκοτάδι εξασφαλίζει τη βέλτιστη χρήση των ενδοκυτταρικών ανθρακικών πόρων. Επιπλέον, η ανεξαρτησία αυτών των διεργασιών από εξωγενή υποστρώματα άνθρακα ενισχύει την οικονομική τους βιωσιμότητα και ελαχιστοποιεί το συνολικό περιβαλλοντικό τους αποτύπωμα. Η δέσμευση μεγάλων ποσοτήτων άνθρακα με την αφομοίωση του CO_2 κατά τη φωτοσύνθεση, μπορεί να συμβάλλει στις προσπάθειες για τον περιορισμό των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου, ενώ η δυνατότητα καλλιέργειας εκτός των πεπερασμένων πόρων γλυκού νερού, είναι ένα καθοριστικό χαρακτηριστικό για την αειφορία τους. Επίσης, οι μέθοδοι που παρουσιάζονται σε αυτή την έρευνα δεν απαιτούν γενετικές τροποποιήσεις για την επαγωγή της παραγωγής H_2 και λειτουργούν χωρίς την ανάγκη φωτός, δαπανηρών υποστρωμάτων, θρεπτικών ουσιών ή αναστολέων κατά τη διαδικασία της ζύμωσης. Κυριότερα, η αναγέννηση της κυανοβακτηριακής βιομάζας μετά τη σκοτεινή ζύμωση σε περίσσεια νιτρικών, εξασφαλίζει

την ανανεωσιμότητα της διαδικασίας. Προμηθεύοντας νιτρικά άλατα από μίγματα υγρών αποβλήτων, αυτές οι μεθοδολογίες μπορούν να συνεισφέρουν στην ανακύκλωση των φυσικών πόρων, βελτιώνοντας ακόμη περισσότερο τη βιωσιμότητά τους.

VI. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα μονοκύτταρα κυανοβακτήρια *Synechococcus elongatus* PCC7942 (στέλεχος PAMCOD) και *Synechocystis* sp. PCC6714, παράγουν αέριο υδρογόνο σε συνθήκες σκοτεινής ζύμωσης, βασιζόμενα εξ' ολοκλήρου στα αποθέματα άνθρακα που συσσωρεύουν κατά τη φωτοσύνθεση και στην καταλυτική δραστικότητα των ενδογενών ενζύμων. Η ενίσχυση της συσσώρευσης της σακχαρόζης με τη συνεργιστική δράση αλατότητας και υψηλής θερμοκρασίας κατά τη φωτεινή φάση σε συνδυασμό με τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της ζύμωσης, προκαλεί την αυξημένη απελευθέρωση H_2 από τα κύτταρα PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714. Επιπλέον, οι καλλιέργειες PAMCOD που υφίστανται σκοτεινή ζύμωση σε συνθήκες απουσίας αζώτου, αποικοδομούν το ενδοκυτταρικό τους συσσωρευμένο γλυκογόνο με αποτέλεσμα την πολύ αυξημένη παραγωγή H_2 , έως και 10.000 φορές υψηλότερη από την αντίστοιχη παραγωγή από το στέλεχος αγρίου τύπου σε συνθήκες επάρκειας αζώτου (Vayenos et al., 2020). Η παραγωγικότητα αυτή επιτυγχάνεται με τη χαμηλότερη δυνατή πυκνότητα κυττάρων στις καλλιέργειες PAMCOD. Το γλυκογόνο που συσσωρεύεται απουσία αζώτου και η σακχαρόζη που συσσωρεύεται σε συνθήκες αλατότητας, αποτελούν τα ανηγμένα υποστρώματα της σκοτεινής ζύμωσης μέσω των οποίων παράγεται τελικά H_2 από την Ηοκ-υδρογενάση. Ο ρυθμός έκλυσης H_2 που επιτυγχάνεται με αυτή τη μέθοδο είναι συγκρίσιμος με την παραγωγή H_2 από αζωτοδεσμευτικά κυανοβακτήρια και άλλα πολύπλοκα συστήματα παραγωγής H_2 . Η βιωσιμότητα των διαδικασιών παραγωγής H_2 που παρουσιάζονται, εξασφαλίζεται κυρίως από την αναγέννηση των κυτταροκαλλιεργειών PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714 μετά τη σκοτεινή ζύμωση παρουσία ή απουσία $NaNO_3$, σε θρεπτικά μέσα εμπλουτισμένα σε $NaNO_3$.

Η διατριβή αυτή φιλοδοξεί να συμβάλλει στην έρευνα για εξεύρεση αιεφόρων εναλλακτικών πηγών ενέργειας, μέσω της εφαρμογής δύο ολοκληρωμένων βιώσιμων μεθόδων που θα αντικαταστήσουν τις δαπανηρές συμβατικές διαδικασίες παραγωγής H_2 . Τα κυανοβακτήρια PAMCOD και *Synechocystis* sp. PCC6714 παρουσιάζουν μεγάλες δυνατότητες για την καθαρή και ανανεώσιμη παραγωγή H_2 , με την ταυτόχρονη δέσμευση διοξειδίου του άνθρακα και την αξιοποίηση αποβλήτων, έχοντας ελάχιστες απαιτήσεις σε φυσικούς πόρους.

VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abraham, S. (2002). US Department of Energy, Washington, DC.
- Ainas, M., Hasnaoui, S., Bouarab, R., Abdi, N., Drouiche, N., Mameri, N. (2017). "Hydrogen production by the cyanobacterium *Spirulina platensis*." *International Journal of Hydrogen Energy*, 42, 4902-4907. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.12.056>.
- Allakhverdiev, S. I. (2011). "Recent progress in studies of the structure and function of the photosystem II." *J Photochem Photobiol B*. 104(1-2): 1-8.
- Allakhverdiev, S. I. (2012). "Photosynthetic and biomimetic production of hydrogen." *Intl. J. Hydrogen Energy* 37: 8744-8752.
- Allakhverdiev, S. I., Hayashi, H., Nishiyama, Y., Ivanov, A. G., Aliev, J. A., Klimov, V. V., Murata, N., Carpentier, R. (2003) "Glycinebetaine protects the D1/D2/Cytb559 complex of photosystem II against photo-induced and heat-induced inactivation." *Journal of Plant Physiology*, 160, pp. 41-49. Available at: <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00845>
- Allakhverdiev, S. I., Kreslavski, V. D., Thavasi, V., Zharmukhamedov, S. K., Klimov, V. V., Nagata, T., Nishihara, H., Ramakrishna, S. (2009). "Hydrogen photoproduction using photosynthetic organisms and biomimetic systems." *Photochem. photobiol. sci.* 8: 148-156.
- Allakhverdiev, S. I., Kreslavski, V. D., Thavasi, V., Zharmukhamedov, S. K., Klimov, V. V., Nishihara, H., Ramakrishna, S., Mimuro, M., Carpentier, R., Nagata, T. (2010). "Photosynthetic energy conversion: photogeneration of hydrogen from natural and biomimetic systems." In *Biomimetics, Learning from Nature* (Ed. Amitava Mukherjee, IN-TECH, Vukovar, Croatia, pp. 49-76).
- Allakhverdiev, S. I., Kreslavski, V. D., Zharmukhamedov, S. K., Voloshin, R. A., Korol'Kova, D. V., Tomo, T., & Shen, J. R. (2016). Chlorophylls d and f and their role in primary photosynthetic processes of cyanobacteria. *Biochemistry (Moscow)*, 81, 201-212.
- Allakhverdiev, S. I., Murata, N. (2008) "Salt stress inhibits photosystems II and I in cyanobacteria", *Photosynthesis Research*, 98, pp. 529-539. DOI: 10.1007/s11120-008-9334-x
- Allakhverdiev, S. I., Thavasi, V., Kreslavski, V. D., Zharmukhamedov, S. K., Klimov, V. V., Ramakrishna, S., Los, D. A., Mimuro, M., Nishihara, H., Carpentier, R. (2010). "Photosynthetic hydrogen production." *J of Photochem and Photobiol C: Photochem Rev* 11: 87-99.
- Álvarez, C., Jiménez-Ríos, L., Iniesta-Pallarés, M., Jurado-Flores, A., Molina-Heredia, F. P., Ng, C. K. Y., & Mariscal, V. (2023) "Symbiosis between cyanobacteria and plants: from molecular studies to agronomic applications." *Journal of Experimental Botany*, 74(19), 6145–6157. [Online] Available at: <https://doi.org/10.1093/jxb/erad261>
- Anagnostidis, K., & Komárek, J. (1985). "Modern approach to the classification system of cyanophytes." 1. Introduction. *Arch. hydrobiol. suppl.* 71:291-302.
- Anagnostidis, K., & Komárek, J. (1988). "Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3-Oscillatoriales." *arch. hydrobiol. suppl.* 80:327-472.
- Anagnostidis, K., & Komárek, J. (1990). "Modern approach to the classification system of cyanophytes. 5-Stigonematales." *arch. hydrobiol. suppl.* 86:1-73.
- Ananyev, G., Carrieri, D., Dismukes, G. C. (2008). "Optimization of metabolic capacity and flux through environmental cues to maximize hydrogen production by the cyanobacterium "*Arthrospira (Spirulina) maxima*". *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 6102-6113. <https://doi.org/10.1128/AEM.01078-08>
- Angermayr, S. A., Van Alphen, P., Hasdemir, D., Kramer, G., Iqbal, M., van Grondelle, W., Hoefsloot, H. C., Choi, Y. H., Hellingwerf, K. J. (2016). "Culturing *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 with N₂ and CO₂

in a Diel Regime Reveals Multiphase Glycogen Dynamics with Low Maintenance Costs." *Appl Environ Microbiol.* 82:4180-4189.

Antal, T. K., & Lindblad, P. (2005). "H₂ production by sulfur-containing cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp PCC 6803 during dark incubation with methane or at different extracellular pH." *Journal of Applied Microbiology* 98:114-120.

Aoyama, K., Uemura, I., Miyake, J., Asada, Y. (1997). "Fermentative metabolism for the production of hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium, *Spirulina platensis*." *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83, 17-20. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)87320-5](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)87320-5)

Appel, J., Phunpruch, S., Steinmuller, K., & Schulz, R. (2000). "The bi-directional hydrogenase of *Synechocystis* sp PCC 6803 functions as an electron valve during photosynthesis." *Archives of Microbiology* 173: 333-338.

Argun, H., & Kargi, F. (2011). "Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: an overview." *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(13), 7443-7459.

Baebprasert, W., Lindblad, P., Incharoensakdi, A. (2010). "Response of H₂ production and Hox-hydrogenase activity to external factors in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." *Int J Hydrogen Energy* 35: 6611-6616.

Babu, V. J., Kumar, M. K., Nair, A. S., Kheng, T. L., Allakhverdiev, S. I., Ramakrishna, S. (2012). "Visible light photocatalytic water decomposition for hydrogen production from N-TiO₂ rice grain shaped nanostructures in electrospun electrospun form." *Intl. J. Hydrogen Energy* 37: 8897-8904.

Baymann, F., Lebrun, E., Brugna, M., Schoepp-Cothenet, B., Giudici-Orticoni, M. T., & Nitschke, W. (2003). "The redox protein construction kit: evolution of energy-maintaining enzymes before the last global common ancestors." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 358:267-274.

Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T., McClain, C. R., Feldman, G. C., Los, S. O., Tucker, C. J., Falkowski, P. G., Field, C. B., Frouin, R., Esaias, W. E., Kolber, D. D., & Pollack N. H. (2001). "Biospheric primary production during an ENSO transition." *Science* 291: 2594-2597.

Billi, D., Friedmann, E. I., Hofer, K. G., Grilli Caiola, M., Ocampo-Friedmann, R. (2000) "Ionizing-radiation resistance in the desiccation-tolerant cyanobacterium *Chroococcidiopsis*." *Appl Environ Microbiol*, 66, 1489-1492. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1489-1492.2000>.

Billini, M., Stamatakis, K., and Sophianopoulou, V. (2008) "Two members of a network of putative Na⁺/H⁺ antiporters are involved in salt and pH tolerance of the freshwater cyanobacterium *Synechococcus elongatus*", *Journal of Bacteriology*, 190(19), pp. 6318-6329.

Blumwald, E., Mehlhorn, R. J., Packer, L. (1983) "Ionic Osmoregulation during Salt Adaptation of the Cyanobacterium *Synechococcus* 6311", *Plant Physiology*, 73, pp. 377-380. DOI: 10.1104/pp.73.2.377

Bolatkhan, K., Kossalbayev, B. D., Zayadan, B. K., Tomo, T., Veziroglu, T. N., & Allakhverdiev, S. I. (2019). "Hydrogen production from phototrophic microorganisms: reality and perspectives." *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(12), 5799-5811.

Brentner, L. B., Holladay, J. E., & Saeidi, S. (2010). "Biological hydrogen production and delivery for renewable fuels." *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(21), 11521-11528.

Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). "*Brock biology of microorganisms*." Upper Saddle River (NJ): Prentice-Hall, 2003. Buick, R. (2008). "When did oxygenic photosynthesis evolve?" *Phil. Trans. R. Soc. B*, 363, 2731-2743. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.004>

Burrows, E. H., Chaplen, F. W. R., Ely, R. L. (2008) "Optimization of media nutrient composition for increased photofermentative hydrogen production by *Synechocystis* sp. PCC 6803", *Int J Hydrogen Energy*, 33, 6092-6099. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.114>.

Calli, B., Schoenmaekers, K., Vanbroekhoven, K., Diels, L. (2008) "Dark fermentative production of H₂ from xylose and lactose. Effects of on-line pH control", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, pp. 522-530. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2007.10.012

Catone, C. M., Ripa, M., Geremia, E., Ulgiati, S. (2021) "Bio-products from algae-based biorefinery on wastewater", *Journal of environmental management*, 293, article 112792. DOI: 10.1016/j.jenvman.2021.112792.

Chaubey, R., Sahu, S., James, O. O., & Maity, S. (2013). "A review on development of industrial processes and emerging techniques for production of hydrogen from renewable and sustainable sources." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 23, 443-462.

Cournac, L., Guedeney, G., Peltier, G., & Vignais, P. M. (2004). "Sustained photoevolution of molecular hydrogen in a mutant of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 deficient in the type I NADPH-dehydrogenase complex." *Journal of bacteriology*, 186(6), 1737-1746.

Dabrock, B., Bahl, H., & Gottschalk, G. (1992). "Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*." *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1233 - 1239.

Dagan, T., Artzy-Randrup, Y., & Martin, W. (2008). "Modular networks and cumulative impact of lateral transfer in prokaryote genome evolution." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:10039-10044.

Das, D., Nejat Veziroglu, T. (2001) "Hydrogen production by biological processes: a survey of literature", *International Journal of Hydrogen Energy*, 26, pp. 13-28.

De Porcellinis, A., Frigaard, N. U., Sakuragi, Y. (2017). "Determination of glycogen content in cyanobacteria." *JoVE* 125: 56068.

Demoulin, C.F., Lara, Y.J., Cornet, L., François, C., Baurain, D., Wilmotte, A., & Javaux, E.J. (2019) "Cyanobacteria evolution: Insight from the fossil record", *Free Radical Biology and Medicine*, 140, pp. 206-223.

Deshnium, P., Los, D. A., Hayashi, H., Mustardy, L., Murata, N. (1995) "Transformation of *Synechococcus* with a gene for choline oxidase enhances tolerance to salt stress", *Plant Molecular Biology*, 29, pp. 897-907. DOI: 10.1007/BF00014964

Du, W., Liang, F., Duan, Y., Tan, X., Lu, X. (2013) "Exploring the photosynthetic production capacity of sucrose by cyanobacteria", *Metabolic Engineering*, 19, pp. 17-25. DOI: 10.1016/j.ymben.2013.05.001.

Duan, Y., Luo, Q., Liang, F., Lu, X. (2016) "Sucrose secreted by the engineered cyanobacterium and its fermentability", *Journal of Ocean University of China*, 15, pp. 890-896.

Ducat, D. C., Avelar-Rivas, J. A., Way, J. C., Silver, P. A. (2012) "Rerouting carbon flux to enhance photosynthetic productivity", *Applied and Environmental Microbiology*, 78, pp. 2660-2668.

Ducat, D. C., Silver, P. A. (2012) "Improving carbon fixation pathways", *Current Opinion in Chemical Biology*, 16(3-4), pp. 337-344. DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.05.002

Ellinas, K., Kefallinou, D., Stamatakis, K., Gogolides, E., Tserepi, A. (2017). "Is there a threshold in the antibacterial activity of superhydrophobic surfaces?" *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9, 39781-39789. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b11402>.

El-Seedi, H. R., El-Mallah, M. F., Yosri, N., Alajlani, M., Zhao, C., Mehmood, M. A., Du, M., Ullah, H., Daglia, M., Guo, Z., et al. (2023). "A review of marine cyanobacteria and aspects related to their roles: Chemical, biological properties, nitrogen fixation and climate change." *Marine Drugs*, 21(8), 439. <https://doi.org/10.3390/md21080439>.

Erdmann, N., Hagemann, M. (2001) "Salt Acclimation of Algae and Cyanobacteria: A Comparison", in Rai, L. C., Gaur, J. P. (eds) *Algal Adaptation to Environmental Stresses*. Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-642-59491-5_11

- Eroglu, E., Melis, A. (2016). "Research on hydrogen production from microalgae." *Int J Hydrogen Energy* 41: 12772-12798.
- Fang, H. H. P., Liu, H. (2002) "Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture", *Bioresource Technology*, 82, pp. 87-93. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00110-9.
- Fedorov, A. S., Tsygankov, A. A., Rao, K. K., Hall, D. O. (2001) "Production of hydrogen by an *Anabaena variabilis* mutant in photobioreactor under aerobic outdoor conditions" In: Miyake J, Matsunaga T, San P. A. (eds) *BioHydrogen II*. Oxford, UK: Elsevier, pp. 223-228.
- Flores, E. & Herrero, A. (2005). "Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria." *Biochemical Society Transactions*, 33(Pt 1), 164-167. doi: 10.1042/BST0330164.
- Forchhammer, K. & Schwarz, R. (2019). "Nitrogen chlorosis in unicellular cyanobacteria - a developmental program for survival from nitrogen deprivation." *Environmental Microbiology*, 21, 1173-1184. doi: 10.1111/1462-2920.14447.
- Formighieri, C., & Melis, A. (2016). "Sustainable heterologous production of terpene hydrocarbons in cyanobacteria." *Photosynthesis research*, 130, 123-135.
- Forzi, L., & Sawers, R. G. (2007). "Maturation of [[NiFe]]-hydrogenases in *Escherichia coli*." *Biometals* 20:565-578.
- Frenkel, A., Gafron, H., Battley, H. E. (1950). "Photosynthesis and photoreduction by the blue-green alga, *Synechococcus elongatus*." *Näg Biol Bull* 99:157-162.
- Gantt, E. (1980). "Structure and Function of Phycobilisomes: Light Harvesting Pigment Complexes in Red and Blue-Green Algae." In: Bourne, G.H., Danielli, J.F., Jeon, K.W. (Eds.), *International Review of Cytology*, Volume 66, pp. 45-80. Academic Press. ISSN: 0074-7696. ISBN: 9780123644664. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61971-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61971-3).
- Galinski, E.A. (1993). "Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection." *Experientia*, 49, 487-496.
- Gao, Y., Xiong, W., He, M. J., Tang, L., Xiang, J. Y., Wu, Q. Y. (2009). "Action spectra of Chlorophyll α biosynthesis in cyanobacteria: Dark-Operative Protochlorophyllide Oxidoreductase-Deficient Mutants." *Zeitschrift für Naturforschung C*, 64, 117-124. <https://doi.org/10.1515/znc-2009-1-219>
- Gao, Z., Zhao, H., Li, Z., Tan, X., Lu, X. (2012) "Photosynthetic production of ethanol from carbon dioxide in genetically engineered cyanobacteria", *Energy & Environmental Science*, 5, pp. 9857-9865.
- Ghianian, M. (2019). "Biophotolysis-based hydrogen production by cyanobacteria. Prospects of renewable bioprocessing in future energy systems," pp. 161-184.
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N., & Esposito, G. (2015). "A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: process parameters and use of by-products." *Applied Energy*, 144, 73-95.
- Ghirardi, M. L. (2015). "Hydrogenase: The key to hydrogen fuel production." *American Scientist*, 103(5), 304-311.
- Golecki, J.R. (1988). "Analysis of the Structure and Development of Bacterial Membranes (Outer, Cytoplasmic and Intracytoplasmic Membranes)." In: Mayer, F. (Ed.), *Methods in Microbiology*, Volume 20, pp. 61-77. Academic Press. ISSN: 0580-9517. ISBN: 9780125215206. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70047-3](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70047-3).
- Govindjee, G. (2004). *Chlorophyll α fluorescence: a signature of photosynthesis* (Vol. 19, pp. 1-42). G. C. Papageorgiou (Ed.). Dordrecht: Springer.
- Guerra, L. T., Xu, Y., Bennette, N., McNeely, K., Bryant, D. A., Dismukes, G. C. (2013). "Natural osmolytes are much less efficient substrates than glycogen for catabolic energy production in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002." *Journal of Biotechnology*, 166, 65-75. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.04.005>

Guiry, M.D. and Guiry, G.M., 2022. AlgaeBase. World-Wide Electronic Publication, National University of Ireland, Galway. [Online] Available at:

<https://www.algaebase.org/browse/taxonomy/#4351>

Guyet, U., Nguyen, N.A., Doré, H., Haguait, J., Pittera, J., Conan, M., Ratin, M., Corre, E., Le Corguillé, G., Brillet-Guéguen, L., Hoebeke, M., Six, C., Steglich, C., Siegel, A., Eveillard, D., Partensky, F., & Garczarek, L. (2020). "Synergic Effects of Temperature and Irradiance on the Physiology of the Marine *Synechococcus* Strain WH7803." *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01707>.

Haeder, D. P. (2022). "Photosynthesis in plants and algae." *Anticancer Research*, 42(10), 5035-5041.

Hagemann, M. (2011) "Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation", *FEMS Microbiology Reviews*, 35, pp. 87-123.

Hallenbeck, P., Benemann, J. R. (2002) "Biological hydrogen production: fundamentals and limiting processes", *International Journal of Hydrogen Energy*, 7, pp. 1185-94.

Heyer, H., & Krumbein, W. E. (1991) "Excretion of fermentation products in dark and anaerobically incubated cyanobacteria." *Archives of microbiology*, 155, 284-287.

Hentschke, G. S., & Junior, W. A. G. (2022) "Trends in Cyanobacteria: a contribution to systematics and biodiversity studies", in *The Pharmacological Potential of Cyanobacteria*, pp. 1-20. Academic Press.

Heyer, H., Stal, L., Krumbein, W. E. (1989) "Simultaneous heterolactic and acetate fermentation in the marine cyanobacterium *Oscillatoria limosa* incubated anaerobically in the dark", *Arch Microbiol*, 151, 558-564. <https://doi.org/10.1007/BF00411557>

Hewelt-Belka, W., Kot-Wasik, Á., Tamagnini, P., & Oliveira, P. (2020). "Untargeted lipidomics analysis of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: lipid composition variation in response to alternative cultivation setups and to gene deletion." *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 8883.

Hickman, J. W., Kotovic, K. M., Miller, C., Warrenner, P., Kaiser, B., Jurista, T., Budde, M., Cross, F., Roberts, J. M., Carleton, M. (2013). "Glycogen synthesis is an essential component of the nitrogen stress response in *Synechococcus elongatus* PCC 7942." *Algal Research*, 2, 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.01.008>

Higo, A., Katoh, H., Ohmori, K., Ikeuchi, M., Ohmori, M. (2006) "The role of a gene cluster for trehalose metabolism in dehydration tolerance of the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120", *Microbiology*, 152, pp. 979-987. DOI: 10.1099/mic.0.28583-0.

Holladay, J. D., Hu, J., King, D. L., & Wang, Y. (2009) "An overview of hydrogen production technologies." *Catalysis today*, 139(4), 244-260.

Houchins, J. P., & Burris, R. H. (1981). "Occurrence and localization of two different hydrogenases in the heterocystic cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 7120." *Journal of Bacteriology* 146:209-214.

Howarth, D. C., Codd, G. A. (1985). "The uptake and production of molecular hydrogen by unicellular cyanobacteria." *Journal of General Microbiology*, 131, 1561-1569. <https://doi.org/10.1099/00221287-131-7-1561>

IPCC (2007). Intergovernmental Panel on Climate Change: Fourth Assessment Report (AR4), <http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/syr/ar4syr.pdf>.

Jeffries, T. W., Timourien, H., Ward, R. L. (1978) "Hydrogen production by *Anabaena cylindrica*: Effect of varying ammonium and ferric ions, pH and light", *Appl Env Microbiol*, 35, 704-710.

Jones, M. R., Pinto, E., Torres, M. A., Dörr, F., Mazur-Marzec, H., Szubert, K., ... & Janssen, E. M. L. (2021). "CyanoMetDB, a comprehensive public database of secondary metabolites from cyanobacteria." *Water Research*, 196, 117017.

Jürgens, U.J., & Weckesser, J. (1985, January). "The fine structure and chemical composition of the cell wall and sheath layers of cyanobacteria." *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie*, 136(1), 41-44. Elsevier Masson.

Kamshybayeva, G. K., Kossalbayev, B. D., Sadvakasova, A. K., Zayadan, B. K., Ayshat, M., Bozieva, A. M., Dmitry, D., Alwasel, S., Allakhverdiev, S. I. (2022). "Strategic and economic opportunities in hydrogen production from cyanobacteria." *Int J Hydrogen Energy* 47: 29661-29684.

Kayfeci, M., Keçebaş, A., Bayat, M. (2019) "Hydrogen Production", in *Solar Hydrogen Production Processes, Systems and Technologies*, 3, pp. 45-83.

Khanna, N., Lindblad, P. (2015) "Cyanobacterial Hydrogenases and Hydrogen Metabolism Revisited: Recent progress and future perspectives." *Inter J Mol Scien* 16: 10537-1061.

Khetkorn, W., Baebprasert, W., Lindblad, P., Incharoensakdi, A. (2012). "Redirection of electron flow towards nitrogenase and bidirectional Hox-hydrogenase using specific inhibitors leads to enhanced H₂ production in the cyanobacterium *Anabaena siamensis* TISTR 8012." *Bioresour Technol* 118: 265-271.

Khetkorn, W., Khanna, N., Incharoensakdi, A., Lindblad, P. (2013). "Metabolic and genetic engineering of cyanobacteria for enhanced hydrogen production." *Biofuels* 4: 535-561.

Khetkorn, W., Lindblad, P., Incharoensakdi, A. (2010). "Enhanced biohydrogen production by the cyanobacterium *Anabaena siamensis* strain TISTR 8012 binding N₂." *Int J Hydrogen Energy* 35: 12767-12776.

Kim Tiam, S., Gugger, M., Demay, J., Le Manach, S., Duval, C., Bernard, C., & Marie, B. (2019). "Insights into the Diversity of Secondary Metabolites of *Planktothrix* Using a Biphasic Approach Combining Global Genomics and Metabolomics." *Toxins*, 11(9), 498. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins11090498>

Klotz, A., Reinhold, E., Doello, S., Forchhammer, K. (2015). "Nitrogen starvation acclimation in *Synechococcus elongatus*: redox control and the role of nitrate reduction as an electron acceptor." *Life* 5: 888-904.

Knoot, C. J., Ungerer, J. L., Wangikar, P. P., & Pakrasi, H. B. (2018). "Cyanobacteria: promising biocatalysts for sustainable chemical production." *Journal of Biological Chemistry*, 293(14), 5044-5052. Kolman, M. A., Nishi, C. N., Perez-Cenci, M., Salerno, G. L. (2015) "Sucrose in Cyanobacteria: Life, 5, pp. 102-126. DOI: 10.3390/life5010102

Kolman, M. A., Nishi, C. N., Perez-Cenci, M., & Salerno, G. L. (2015). "Sucrose in cyanobacteria: from a salt-response molecule to play a key role in nitrogen fixation." *Life*, 5(1), 102-126.

Kopf, M., Klähn, S., Pade, N., Weingärtner, C., Hagemann, M., Voss, B., Hess, W. R. (2014) "Comparative Genome Analysis of the Closely Related *Synechocystis* Strains PCC 6714 and PCC 6803", *DNA Research*, 21, pp. 255-266. DOI: 10.1093/dnares/dst055

Kreslavski, V. D., Zharmukhamedov, S. K., Bedbenov, V. S., Ramakrishna, S., Allakhverdiev, S. I. (2015). "Photoelectrochemical cells based on photosynthetic systems." *Biofuel Research Journal* 6: 227-235.

Kufryk, G. (2013) "Advances in utilizing cyanobacteria for hydrogen production", *Adv Microbiol*, 3, 60-68.

Ladas, N. P., Papageorgiou, G. C. (2000) "Cell turgor: A critical factor for the proliferation of cyanobacteria at unfavorable salinity." *Photosynthesis Research*, 65, pp. 155-164. DOI: 10.1023/A:1006423221150

Ladas, N. P., & Papageorgiou, G. C. (2000). "The salinity tolerance of freshwater cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 is determined by its ability for osmotic adjustment and presence of osmolyte sucrose." *Photosynthetica*, 38(3), 343-348.

Ladas, N. (2002) "A study of the synergistic action of compatible cytoplasmic osmolytes in the protection of photosynthetic machinery against environmental salinity and drought stress" (Doctoral dissertation, National and Kapodistrian University of Athens (NKUA). Department of Biology. Department of Cell Biology and Biophysics).

Lazarus, O., Woolerton, T.W., Parkin, A., Lukey, M.J., Reisner, E., Seravalli, J., Pierce, E., Ragsdale, S.W., Sargent, F., Armstrong, F.A. (2009) "Water-gas shift reaction catalyzed by redox enzymes on conducting graphite platelets". *J Am Chem Soc* 131:14154-14155

Lee, D. J., Show, K. Y., Su, A. (2011) "Dark fermentation on biohydrogen production: pure culture", *Bioresource Technology*, 102(18), pp. 8393-8402.

Levin, D. (2004) "Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application", *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, pp. 173-185. DOI: 10.1016/s0360-3199(03)00094-6.

Luan, G., Zhang, S., Wang, M., Lu, X. (2019). "Progress and perspective on the mechanics of cyanobacterial glycogen metabolism." *Biotech Adv* 37: 771-786.

Luque, I. & Forchhammer, K. (2008). "Assimilation and nitrogen regulation in cyanobacteria." In Herrero, A. & Flores, E. (Eds.), *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics, and Evolution*. Caister Academic Press.

Manish, S., Rangan Banerjee (2008) "Comparison of biohydrogen production processes", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, pp. 279-286. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2007.07.026

Margulis, L., & BERMUDEZ, D. (1985). Symbiosis as a mechanism of evolution: status of cell symbiosis theory. *Symbiosis*.

Martínez-Merino, V., Gil, M. J., Cornejo, A. (2013) "Biomass Sources for Hydrogen Production", *Biomass Sources for Hydrogen Production*, 5, pp. 87-110. DOI: 10.1016/B978-0-444-56352-1.00005-2

McCay, M. H. and Shafiee, S., (2020) "Hydrogen: An energy carrier", in *Future energy*, Elsevier, pp. 475-493.

McCormick, A. J., Bombelli, P., Lea-Smith, D. J., Bradley, R. W., Scott, A. M., Fisher, A. C., ... & Howe, C. J. (2013). "Hydrogen production through oxygenic photosynthesis using the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 in a bio-photoelectrolysis cell (BPE) system." *Energy & Environmental Science*, 6(9), 2682-2690.

McIntosh, C. L., Germer, F., Schulz, R., Appel, J., & Jones, A. K. (2011) "The [NiFe]-hydrogenase of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 works bidirectionally with a bias to H₂ production". *Journal of the American Chemical Society*, 133(29), 11308-11319.

McNeely, K., Kumaraswamy, G. K., Guerra, T., Bennette, N., Ananyev, G., & Dismukes, G. C. (2014) "Metabolic switching of central carbon metabolism in response to nitrate: application to autofermentative hydrogen production in cyanobacteria." *Journal of Biotechnology*, 182, 83-91.

Mehdizadeh Allaf, M., & Peerhossaini, H. (2022) "Cyanobacteria: Model microorganisms and beyond", *Microorganisms*, 10(4), 696.

Miller, G. L. (1959). "Use of a dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars." *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.

Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., Noike, T. (2000) "Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging", *Bioresource Technology*, 73, pp. 59-65. DOI: 10.1016/S0960-8524(99)00130-3

Moran, P. (1982). "Formulas for the determination of chlorophyll pigments extracted with N,N-dimethylformamide." *Plant Physiology*, 69, 1376-1381. <https://doi.org/10.1104/pp.69.6.1376>

Morimoto, K., Nishio, K., Nakai, M. (2002) "Identification of a novel prokaryotic HEAT-repeats-containing protein which interacts with a cyanobacterial IscA homolog", *FEBS Letters*, 519, pp. 123-127. DOI: 10.1016/S0014-5793(02)02736-9

Morton, O. (2006). "Solar energy: A new day dawning?: Silicon Valley sunrise." *Nature*, 443(7107), 19-23.

Murata, N. (1989). "Low-temperature effects on cyanobacterial membranes." *J Bioenerg Biomembr*, 21, 61–75. <https://doi.org/10.1007/BF00762212>.

Nandi, R., Sengupta, S. (1998) "Microbial production of hydrogen: an overview", *Critical Reviews in Microbiology*, 24, pp. 61-84.

Nevo, R., Charuvi, D., Shimoni, E., Schwarz, R., Kaplan, A., Ohad, I., & Reich, Z. (2007). "Thylakoid membrane perforations and connectivity enable intracellular traffic in cyanobacteria." *The EMBO Journal*, 26(5), 1467-1473. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601594>.

Nikolaidis, P., & Poullikkas, A. (2017). "A comparative overview of hydrogen production processes." *Renewable and sustainable energy reviews*, 67, 597-611.

Nitschmann, W. H., & Packer, L. (1992) "NMR studies on Na⁺ transport in *Synechococcus* PCC 6311", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 294, Issue 2, Pages 347-352. ISSN 0003-9861. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90694-R](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90694-R).

Osanai, T., Azuma, M., & Tanaka, K. (2007). "Light- and nitrogen-state-regulated sugar catabolism in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." *Photochemical & Photobiological Sciences* 6:508-514.

Pade, N., Michalik, D., Ruth, W., Belkin, N., Hess, W. R., Berman-Frank, I., Hagemann, M. (2016) "Trimethylated homoserine functions as the major compatible solute in the globally significant oceanic cyanobacterium *Trichodesmium*", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, pp. 13191-13196.

Papageorgiou, G. C., & Murata, N. (1995). "The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex." *Photosynthesis Research*, 44, 243-252.

Patterson, G.M.L. (1996). "Biotechnological applications of cyanobacteria." *J. Scientific & Industrial Research*.

Pesчек, G. A. (1979) "Evidence for two functionally distinct hydrogenases in *Anacystis nidulans*." *Arch Microbiol* 123:81-92.

Phlips, E. J., Mitsui, A. (1983) "Role of light intensity and temperature in the regulation of hydrogen photoproduction by the marine cyanobacterium *Oscillatoria* sp. strain Miami BG7", *Appl Environ Microbiol*, 45, 1212-1220.

Pimentel, D., Patzek, T. W. (2008) "Ethanol production: energy and economic issues related to U.S. and Brazilian sugarcane biofuels", Springer, Amsterdam, The Netherlands.

Preiss, J. (1984). "Bacterial glycogen synthesis and its regulation." *Annu Rev Microbiol* 38: 419-458.

Qiao, C., Duan, Y., Zhang, M., Hagemann, M., Luo, Q., Lu, X. (2018) "Effects of Reduced and Enhanced Glycogen Pools on Salt-Induced Sucrose Production in a Sucrose-Secreting Strain of *Synechococcus elongatus* PCC 7942", *Applied and Environmental Microbiology*, 84(2). DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02023-17> (ASM Journals)

Rastogi, R. P., Sinha, R. P., & Incharoensakdi, A. (2014). "The cyanotoxin microcystins: current overview." *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 13(2), 215-249.

Reed, R. H., Borowitzka, L. J., Mackay, M. A., Chudek, J. A., Foster, R., Warr, S. R. C., Moore, D. J., Stewart, W. D. P. (1986). "Accumulation of organic solutes in osmotically stressed cyanobacteria." *FEMS Microbiology Reviews*, 39, 51-56. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01842.x>

Reed, R. H., Chudek, J. A., Foster, R. et al. (1984) "Osmotic adjustment in cyanobacteria from hypersaline environments", *Archives of Microbiology*, 138, pp. 333-337. DOI: 10.1007/BF00410900.

Reed, R. H., Richardson, D. L., Stewart, W. D. P. (1985) "Na⁺ uptake and extrusion in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6714 in response to hypersaline treatment. Evidence for transient changes in plasmalemma Na⁺ permeability", *Biochim Biophys Acta (BBA) - Biomembranes*, 814, 347-355. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(85\)90455-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(85)90455-9)

Reed, R. H., Stewart, W. D. P. (1985) "Osmotic adjustment and organic solute accumulation in unicellular cyanobacteria from freshwater and marine habitats", *Marine Biology*, 88, pp. 1-9.

Reed, R. H., Richardson, D. L., Stewart, W. D. P. (1985) "Na⁺ uptake and extrusion in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6714 in response to hypersaline treatment. Evidence for transient changes in plasmalemma Na⁺ permeability", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 814, Issue 2, Pages 347-355. ISSN 0005-2736. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(85\)90455-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(85)90455-9)

Ren, N., Wang, B., Huang, J.-C. (1997) "Ethanol-type fermentation from carbohydrate in high rate acidogenic reactor", *Biotechnology and Bioengineering*, 54, pp. 428-433. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19970605)54:5<428::AID-BIT3>3.0.CO;2-G.

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., Stanier, R. T. (1979). "General correspondences, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria." *Journal of General Microbiology*, 111, 1-61. <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>

Rippka, R., & Herdman, M. (1992). "Collection of cyanobacterial strains in axial culture." *Catalogue and taxonomic manual, volume 1. Catalogue of strains. Institut Pasteur, Paris, France.*

Ritchie, R.J. (1992) "The cyanobacterium *Synechococcus* R-2 (*Anacystis nidulans*, *S. leopoliensis*) PCC 7942 has a sodium-dependent chloride transporter", *Plant, Cell & Environment*, 15: 163-177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1992.tb01470.x>

Rittmann, B.E. (2008) "Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms", *Biotechnol. Bioeng.*, 100: 203-212. <https://doi.org/10.1002/bit.21875>

Rodionova, M. V., Poudyal, R. S., Tiwari, I., Voloshin, R. A., Zharmukhamedov, S. K., Nam, H. G., Zayadan, B. K., Bruce, B. D., Hou, H. J. M., Allakhverdiev, S. I. (2017). "Biofuel production: challenges and opportunities." *Inter J Hydrogen Energy* (forthcoming).

Rodionova, M. V., Voloshin, R. A., Kreslavski, V. D., Zharmukhamedov, S. K., Veziroglu, T. N., Allakhverdiev, S. I. (2016). "Production of biofuels from algal and seaweed biomass." *Inter J Hydrogen Energy* 41(39): 17257-17274.

Sadvakasova, A. K., Kossalbayev, B. D., Zayadan, B. K., Bolatkhan, K., Alwasel, S., Najafpour, M. M., Tomo, T., Allakhverdiev, S. I. (2020). "Bioprocesses of hydrogen production by cyanobacterial cells and possible ways to increase their productivity." *Ren Sust En Reviews* 133:110054.

Santos-Merino, M., Singh, A. K., Ducat, D. C. (2019) "New Applications of Synthetic Biology Tools for Cyanobacterial Metabolic Engineering", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology Section Synthetic Biology*, 7. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00033

Santos-Merino, M., Yun, L., Ducat, D. C. (2023) "Cyanobacteria as cell factories for the photosynthetic production of sucrose", *Frontiers in Microbiology*, 14. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1126032

Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., ... & Hankamer, B. (2008). "Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production." *Bioenergy research*, 1, 20-43.

Schmitz, O., Boison, G., Hilscher, R., Hundeshagen, B., Zimmer, W., Lottspeich, F., Bothe, H. (1995). "Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria." *Eur J Biochem* 233:266-276.

Schulz, R. (1996) "Hydrogenases and hydrogen production in eukaryotic organisms and cyanobacteria", *Journal of Marine Biotechnology*, 4, pp. 16-22.

Serebryakova, L. T., Medina, M., Zorin, N. A., Gogotov, I. N., & Cammack, R. (1996). "Reversible hydrogenase of *Anabaena variabilis* ATCC 63 29413: Catalytic properties and characterization of redox centers." *FEBS Letters* 383:79-82.

Serebryakova, L. T., Sheremetieva, M., Lindblad, P. (1999). "Hydrogenase activity of the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 under nitrogen starvation conditions." *Microbiology (Moscow)*, 68, 249-253.

Show, K.-Y., Yan, Y.-G., Lee, D.-J. (2019) "Biohydrogen production from algae: Biomass, biofuels, biochemical", *Biofuels from algae*, 13, pp. 325-343. DOI: 10.1016/B978-0-444-64192-2.00013-5.

Sidler, W.A. (1994). "Phycobilisome and Phycobiliprotein Structures." In: Bryant, D.A. (Ed.), *The Molecular Biology of Cyanobacteria. Advances in Photosynthesis*, vol 1, Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0227-8_7.

Singh, V., & Das, D. (2019). "Potential of hydrogen production from biomass." In *Science and Engineering of Hydrogen-Based Energy Technologies*, 123-164.

Singh, N., & Sarma, S. (2022). "Biological routes of hydrogen production: A critical assessment." In *Handbook of Biofuels* (pp. 419-434). Academic Press. Skizim, N. J., Ananyev, G. M., Krishnan, A., Dismukes, G. C. (2011) "Metabolic pathways for photobiological hydrogen production by nitrogenase- and hydrogenase-containing unicellular cyanobacteria *Cyanothece*", *J Biol Chem*, 287, 2777-2786. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.282046>.

Smith, V. H., & Crews, T. (2014). "Applying ecological principles of crop cultivation in large-scale algal biomass production." *Algal Research*, 4, 23-34.

Srirangan, K., Pyne, M. E., & Chou, C. P. (2011). "Biochemical and genetic engineering strategies to enhance hydrogen production in photosynthetic algae and cyanobacteria." *Bioresource technology*, 102(18), 8589-8604.

Stal, L., Moezelaar, R. (1997). "Fermentation in cyanobacteria." *FEMS Microbiology Reviews*, 21, 179-211. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(97\)00056-9](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(97)00056-9)

Stamatakis, C., Papageorgiou, G. C. (1993) "Stabilization of Photosystem II particles isolated from the thermophilic cyanobacterium *Phormidium laminosum* with glycinebetaine and glycerol", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1183, pp. 333-338.

Stamatakis, K., Ladas, N., Papageorgiou, G. C. (2005) "Facilitated water transport in cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 studied by phycobilisome-sensitized Chlorophyll α fluorescence", *Photosynthesis Research*, 84, pp. 181-185.

Stamatakis, K., Papageorgiou, G. C. (2001) "The osmolality of the cell suspension regulates phycobilisome-to-photosystem I transfers in cyanobacteria", *Biochim Biophys Acta (Bioenergetics)*, 1506, pp. 172-181.

Stengel, A., Gügel, I. L., Hilger, D., Rengstl, B., Jung, H., & Nickelsen, J. (2012). "Initial Steps of Photosystem II de Novo Assembly and Preloading with Manganese Take Place in Biogenesis Centers in *Synechocystis*." *The Plant Cell*, 24(2), 660–675. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.093914>.

Stephens, E., Ross, I. L., King, Z., Mussgnug, J. H., Kruse, O., Posten, C. & Hankamer, B. (2010). "An economic and technical evaluation of microalgal biofuels." *Nature biotechnology*, 28(2), 126-128.

Stevens, S.E. Jr., & Nierzwicki-Bauer, S. (1991). "The cyanobacteria." In: Stolz, J.F. (Ed.), *Structure of Phototrophic Prokaryotes*, pp. 15-47. CRC Press, Inc, Boca Raton.

- Stirbet, A., Lazár, D., & Papageorgiou, G. C. (2019). "Chlorophyll α fluorescence in cyanobacteria: relation to photosynthesis." In *cyanobacteria* (pp. 79-130). Academic Press.
- Suzuki, E., Umeda, K., Nihei, S., Moriya, K., Ohkawa, H., Fujiwara, S., Tsuzuki, M., Nakamura, Y. (2007). "The role of GlgX protein in glycogen metabolism of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942." *Biochim Biophys Acta* 1770: 763-773.
- Suzuki, E., Ohkawa, H., Moriya, K., Matsubara, T., Nagaike, Y., Iwasaki, I., Fujiwara, S., Tsuzuki, M., Nakamura, Y. (2010). "Carbohydrate metabolism in mutants of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 with defective glycogen synthesis." *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 3153-3159. <https://doi.org/10.1128/AEM.00397-08>
- Suzuki, E., Umeda, K., Nihei, S., Moriya, K., Ohkawa, H., Fujiwara, S., Tsuzuki, M., Nakamura, Y. (2007). "The role of GlgX protein in glycogen metabolism of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1770, 763-773. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.01.006>
- Sveshnikov, D. A., Sveshnikova, N. V., Rao, K. K., Hall, D. O. (1997) "Hydrogen metabolism of mutant forms of *Anabaena variabilis* in continuous cultures and under nutritional stress", *FEMS Microbiol Lett*, 147, 297-301.
- Tandeau de Marsac, N., & Houmard, J. (1993). "Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms." *FEMS Microbiology Reviews*, 10(1-2), 119-189.
- Turner, S. (1997). "Molecular systematics of oxygenic photosynthetic bacteria" (pp. 13-52). Springer Vienna.
- Taikhao, S., Incharoensakdi, A., Phunpruch, S. (2015). "Dark fermentative hydrogen production by the unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* growing in seawater." *Journal of Applied Phycology*, 27, 187-196. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0292-8>
- Taikhao, S., Junyapoon, S., Incharoensakdi, A., Phunpruch, S. (2013). "Factors affecting the production of biohydrogen by the unicellular intolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*" *J Appl Phycol* 25: 575-585.
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wünschiers, R., & Lindblad, P. (2002). "Hydrogenases and Hydrogen Metabolism of Cyanobacteria." *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(1), 1-20. doi:10.1128/mmbr.66.1.1-20.2002.
- Tan, X., Yao, L., Gao, Q., Wang, W., Qi, F., Lu, X. (2011). "Photosynthesis driven conversion of carbon", *Metabolic Engineering*, 13, pp. 169-176.
- Thauer, R. K., Jungermann, K., & Decker, K. (1977). "Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria." *Bacteriological reviews*, 41(1), 100-180.
- Timasheff, S. N. (1993) "The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes?", *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 22, pp. 67-97.
- Touloupakis, E., Rontogiannis, G., Benavides, A. M. S., Cicchi, B., Ghanotakis, D. F., & Torzillo, G. (2016). "Hydrogen production by immobilized *Synechocystis* sp. PCC 6803." *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(34), 15181-15186.
- Troshina, O., Serebryakova, L., Sheremetieva, M., Lindblad, P. (2002). "Production of H₂ by the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 during fermentation." *Int J Hydrogen Energy* 27:1283-1289.
- Turner, J., Sverdrup, G., Mann, M. K., Maness, P. C., Kroposki, B., Ghirardi, M. & Blake, D. (2008). "Renewable hydrogen production." *International journal of energy research*, 32(5), 379-407.

Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M., et al. (2001) "Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, pp. 555-562. [Online]. Available from: <https://doi.org/10.1007/s002530100806>.

Ulhiza, T. A., Puad, N. I. M., Azmi, A. S. (2017) "Review on biohydrogen production by dark fermentative bacteria using starch-containing waste as a substrate", *Journal of Advanced Research in Material Science*, 38, pp. 21-31.

Van de Meene, A.M., Hohmann-Marriott, M.F., Vermaas, W.F., et al. (2006). "The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." *Arch Microbiol*, 184, 259–270. <https://doi.org/10.1007/s00203-005-0027-y>.

Vargas, W., Cumino, A., Salerno, G. L. (2003) "Cyanobacterial alkaline/neutral invertases. Origin of sucrose hydrolysis; Hydrolysis of sucrose in plant cytosol?", *Planta*, 216, pp. 951-960. [Online]. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0943-x>.

Vayenos, D., Romanos, G. E., Papageorgiou, G. C., Stamatakis, K. (2020). "*Synechococcus elongatus* PCC7942: a cyanobacterial cell factory for the production of useful chemicals and fuels under abiotic stress." *Photosynth Res* 146: 235-245.

Vignais, P. M., Billoud, B., & Meyer, J. (2001). Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiology Reviews* 25:455-501.

Voloshin, R. A., Rodionova, M. V., Zharmukhamedov, S. K., Veziroglu, T. N., Allakhverdiev, S. I. (2016). "Production of biofuels from algal and seaweed biomass." *Inter J Hydrogen Energy* 41(39): 17257-17274.

Voloshin, R. A., Kreslavski, V. D., Zharmukhamedov, S. K., Bedbenov, V. S., Ramakrishna, S., Allakhverdiev, S. I. (2015). "Photoelectrochemical cells based on photosynthetic systems." *Biofuel Research Journal* 6: 227-235.

Wada, H., & Murata, N. (1998). "Membrane lipids in cyanobacteria." In: *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Dordrecht: Springer Netherlands, 65-81.

Walter, M.R. (1983). "Archean stromatolites: Evidence of the Earth's earliest benthos." In: Schopf, J.W. (ed.), *Earth's Earliest Biosphere: Its Origin and Evolution*, pp. 187-213. Princeton University Press, Princeton.

Walsby, A. (1994). "Gas vesicles." *Microbiological Reviews*, 58(1), 94-144.

Wang, W., Liu, X., Lu, X. (2013) "Engineering cyanobacteria to improve photosynthetic production of alka(e)nes", *Biotechnology for Biofuels*, 6:69.

Wang, J., Wan, W. (2009) "Factors influencing fermentative hydrogen production: a review", *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, pp. 799-811.

Weaver, P. F., Lien, S., Seibert, M. (1980) "Photobiological production of hydrogen", *Solar Energy*, 24, pp. 3-45.

Welkie, D. G., Rubin, B. E., Diamond, S., Hood, R. D., Savage, D. F., & Golden, S. S. (2019). "A hard day's night: cyanobacteria in diel cycles." *Trends in microbiology* 27(3), 231-242.

Weyman, P. D., Vargas, W. A., Tong, Y., Yu, J., Maness, P. C., Smith, H. O., & Xu, Q. (2011). "Heterologous expression of *Alteromonas macleodii* and *Thiocapsa roseopersicina* [NiFe] hydrogenases in *Synechococcus elongatus*." *PloS one*, 6(5), e20126.

Whitton, B. A., & Potts, M. (2000). "Introduction to cyanobacteria", pp. 1-11. In B. A. Whitton, & M. Potts (Eds.), *The ecology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Wolfgang, H. N., Lester, P. (1992) "NMR studies on Na⁺ transport in *Synechococcus* PCC 6311", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 294, 347-352. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90694-R](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90694-R)

Wydrzynski, T. J., Satoh, K., Freeman, J. A. (Eds.). (2005). "Photosystem II: The Light-Driven Water: Plastoquinone Oxidoreductase" Vol. 22 in *Advances in Photosynthesis and Respiration* (Govindjee, Series Editor), Springer, Dordrecht.

Yadav, P., Singh, R.P., Rana, S., Joshi, D., Kumar, D., Bhardwaj, N., Gupta, R.K., Kumar, A. (2022) "Mechanisms of Stress Tolerance in Cyanobacteria under Extreme Conditions", *Stresses*, 2, pp. 531-549. <https://doi.org/10.3390/stresses2040036>.

Yamamoto, T., Chongsuksantikul, A., Asami, K., & Ohtaguchi, K. (2013). "Anaerobic Production of Hydrogen in the Dark by *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 supplemented with D-glucose." *Journal of Biochemical Technology*, 4(1), 464-468.

Yamamoto, T., Chongsuksantikul, A., Asami, K., & Ohtaguchi, K. (2013). "Improvement of anaerobic production of hydrogen in the dark by genetic mutation strains of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." *Journal of Biochemical Technology*, 4(2), 600-603.

Yang, C., Hua, Q., & Shimizu, K. (2002). "Integrating information from gene expression and metabolic fluxes to analyze regulatory mechanisms in *Synechocystis*." *Applied microbiology and biotechnology* 58, 813-822.

Zhu, T., Xie, X., Li, Z., Tan, X., Lu, X. (2015) "Enhancing photosynthetic production of ethylene in genetically engineered *Synechocystis* sp. PCC 6803", *Green Chem*, 17, pp. 421-434.