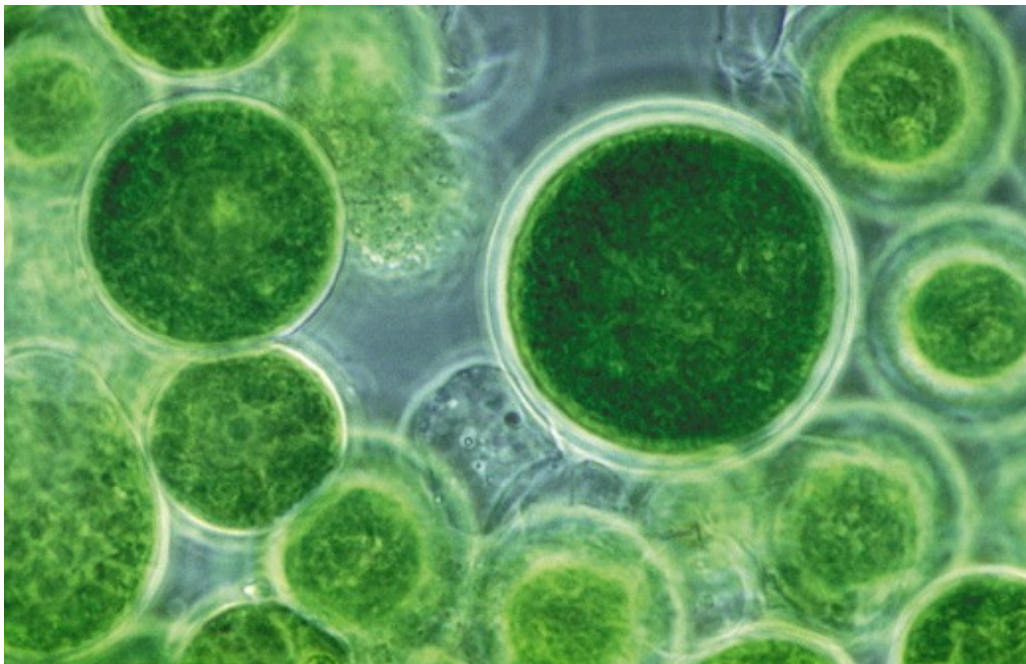


ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

**ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ ΑΠΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ
ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



ΚΟΥΜΗ ΙΝΩ

Επιβλέπων Καθηγητής: Γκίκας Πέτρος

Χανιά, Ιούλιος 2015

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Πέτρο Γκίκα για την επίβλεψη της διπλωματικής μου εργασίας, για την πολύτιμη βοήθεια και την γενικότερη υποστήριξή του.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον εργαστηριακό βοηθό Χαρίδημο Μάρακα, για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε στο πειραματικό μέρος της διπλωματικής εργασίας, για την προθυμία του και τη συνολική συμβολή του στην εκπόνησή της.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ελευθερία Αντωνίου και την Αριάδνη Παντίδου για την βοήθειά και την καθοδήγησή τους στην ολοκλήρωση των εργαστηριακών πειραμάτων της εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου και τους φίλους μου που με στηρίζουν σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η ανάπτυξη ακινητοποιημένης βιομάζας από επιλεγμένο στέλεχος μικροφυκών, το *Stichococcus* sp., πάνω σε 3 διαφορετικές επιφάνειες: γυαλί αμμοβολής, κεραμικό υλικό και πολυαιθυλένιο HD σε φωτο-βιοαντιδραστήρα, με σκοπό τη βελτιστοποίηση ανάπτυξής του κάτω από διαφορετικές συνθήκες και επίσης συλλογής της βιομάζας μικροφυκών για εξαγωγή λιπιδίων και παραγωγής βιοντίζελ.

Μελετήθηκε η ανάπτυξη καλλιέργειας του στελέχους *Stichococcus* sp. σε διαφορετικές συνθήκες όπως: με ή χωρίς ανακυκλοφορία, πενίας αζώτου, διαφορετικός όγκος νερού (ύψος νερού από επιφάνειες) και χρόνου επώασης – καλλιέργειας (18 και 24 μέρες), διερευνώντας την τάση του συγκεκριμένου στελέχους προς συσσωμάτωση καθώς και τη δυνατότητα παραγωγής ακινητοποιημένης βιομάζας που θα διευκολύνει τη συγκομιδή της.

Από τις επιλεγμένες επιφάνειες το γυαλί αμμοβολής έδειξε μεγαλύτερο βαθμό ανάπτυξης με παραγωγή της βιομάζας να κυμαίνεται από 1,4 – 2,5 mg/cm² επιφάνειας γυαλιού, ενώ για τα υπόλοιπα 2 υλικά η απόδοση ήταν της τάξης 0,7 – 1,8 mg/cm² επιφάνειας. Επίσης τα πειράματα έδειξαν καλύτερο ρυθμό ανάπτυξης ακινητοποιημένης βιομάζας (biofilm) του επιλεγμένου στελέχους σε συνθήκες χωρίς ανακυκλοφορία, σε μεγαλύτερο όγκου νερού (ύψος νερού 4cm από τις επιφάνειες) καθώς και στον μικρότερο χρόνο επώασης 18d σε σχέση με τις 24d. Τα λιπίδια που παράχθηκαν σε αυτό το στάδιο του πειράματος ήταν περισσότερα σε συνθήκες με πενία αζώτου σε σχέση με τις συνθήκες χωρίς, και συγκεκριμένα στην επιφάνεια γυαλιού αμμοβολής τα εξαγώμενα λιπίδια ήταν 0,03 mg/cm² σε κανονικές συνθήκες, ενώ σε πενία αζώτου ήταν περίπου 0,07 mg/cm².

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα και σε μεγαλύτερου μεγέθους αντιδραστήρες με σκοπό να εξεταστεί η παραγωγή βιομάζας σε λίγο μεγαλύτερη κλίμακα με μοναδικό υλικό επιφάνειας το γυαλί αμμοβολής. Η παραγόμενη βιομάζα σε σχέση με τα εξαγώμενα λιπίδια ήταν 0,18mg λιπιδίων/mg ξηρής βιομάζας μικροφυκών.

Από τα παραγώμενα λιπίδια έγινε προσπάθεια για την παραγωγή βιοντίζελ.

ABSTRACT

In the present study the immobilized growth of biomass from a selected strain of microalgae, *Stichococcus* sp., was studied on three different surfaces: sandblasted glass, ceramic and polyethylene HD on a photo-bioreactor, in order to optimize its growth under different conditions as well as the collection of microalgal biomass for extraction of lipids and biodiesel production.

The development of the culture of the strain *Stichococcus* SP was studied in different conditions in order to investigate the tendency of this strain to aggregation and the ability to produce immobilized biomass as a way to facilitate harvest.

From the selected surfaces the blasting glass showed a higher degree of development in the production of the biomass (that can vary from 1,4 - 2,5 mg / cm² on a glass surface), while the other two materials, the yield was about 0,7 - 1,8 mg / cm² surface. Also the experiments showed better growth rate of the selected strain in conditions without recirculation, a larger volume of water (water depth 4cm from the surfaces) and shorter incubation 18d relative to 24d. Lipids produced at this stage of the experiment were more under the conditions of poverty of nitrogen in relation to free conditions and more specifically the surface of the sandblasted glass lipid extracts was 0,03 mg / cm² in normal conditions, while in nitrogen absence they were about 0,07 mg / cm².

Experiments were performed in larger reactors in order to determine biomass production on a scale slightly larger of sole surface material sandblasted glass. The biomass produced in the lipid extracts was 0,18mg lipids / mg of dry biomass of the microalgae.

From the collected lipids there was an attempt to produce biodiesel.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ	8
2.1. ΦΥΚΗ.....	8
2.1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΦΥΚΩΝ.....	8
2.1.2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΚΩΝ.....	10
2.1.3. ΚΥΡΙΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΦΥΚΩΝ.....	11
2.2. ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ.....	13
2.2.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ.....	13
2.2.2. ΕΙΔΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ.....	15
2.2.3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ – ΕΙΔΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ.....	16
2.2.4. ΦΑΣΕΙΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	19
2.2.5. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ – ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΠΗΡΕΑΣΜΟΥ	20
2.2.6. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ ΣΕ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΛΙΜΑΚΑ	29
2.2.7. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΙ ΧΡΗΣΕΙΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ	37
2.3. ΛΙΠΙΔΙΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ.....	43
2.3.1. ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΣΕ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ	43
2.3.2. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΕΙΔΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	46
2.3.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ	47
2.3.4. ΠΡΟΦΙΛ ΛΙΠΙΔΙΩΝ	48
2.3.5. ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ BIODIESEL.....	49
2.3.6. ΕΞΑΓΩΓΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ	50
2.4. ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ.....	53
2.4.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ.....	55
2.4.3. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ – ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΝΤΙΖΕΛ ΟΡΥΚΤΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ	55
2.4.4. ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ.....	58
2.4.5. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ	60
3. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	62
3.1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	62
3.2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ.....	63

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	63
4.1. ΥΛΙΚΑ.....	63
4.2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	65
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	68
5.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ STICHOCOCCUS SP.	68
5.2. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΣΤΟΝ ΦΩΤΟ- ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ, ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ 1500 cm ²	72
5.3. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΣΕ ΦΩΤΟ-ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ 12000 cm ²	80
5.4. ΕΞΑΓΩΓΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ.....	86
5.5. ΠΡΟΣΠΑΘΕΙΑ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΣΕ ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ.....	86
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	90
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	93

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα μικροφύκη αποτελούν μία από τις πλέον υποσχόμενες εναλλακτικές πηγές για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Σε αυτό το συμπέρασμα οδηγούν το υψηλό περιεχόμενο τους σε λιπίδια καθώς και οι υψηλές τιμές παραγωγικότητας και παραγωγής βιοντίζελ οι οποίες είναι αρκετά υψηλότερες συγκριτικά με εναλλακτικές πρώτες ύλες, οι οποίες είναι φυσικές προς το περιβάλλον, όπως το φοινικέλαιο και το καλαμπόκι.(Chisti, 2007) Η παραγωγή βιοντίζελ από μικροφύκη βασίζεται στην εξαγωγή των ελαίων που αυτά περιέχουν (με τη μορφή λιπιδίων) και η μετέπειτα μετατροπή τους σε βιοκαύσιμο, στην περίπτωση αυτή βιοντίζελ, μέσω της διαδικασίας της μετεστεροποίησης. Ένας από τους μεγαλύτερους περιβαλλοντικά στόχους, είναι η αειφόρος παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων βιοντίζελ, οπότε και για αυτό το λόγο κρίνεται αναγκαία η ανάπτυξη μεγάλων ποσοτήτων μικροφυκών ώστε η ποσότητα των ελαίων που θα εξαχθούν από αυτά να ανταποκρίνεται σε βιομηχανική παραγωγή βιοκαυσίμου, με στόχο μια μονάδα παραγωγής να μπορεί να κριθεί βιώσιμη τόσο τεχνικά όσο και οικονομικά.

Τα μικροφύκη έχουν απασχολήσει αρκετά τα τελευταία χρόνια την επιστημονική κοινότητα με σκοπό την βελτιστοποίηση της παραγωγής τους, της συλλογής τους και της εξαγωγής των λιπιδίων και των παραγόμενων προϊόντων υψηλής θρεπτικής αξίας με τελικό σκοπό την αξιοποίησή τους και την παραγωγή βιοντίζελ. Ο διαχωρισμός των μικροφυκών από την καλλιέργεια, είναι ένα σημαντικό τμήμα της όλης παραγωγικής διαδικασίας για αυτό το σκοπό στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η συλλογή ακινητοποιημένης βιομάζας σε μορφή βιοφίλμ πάνω σε επιφάνειες που μπορεί πολύ εύκολα να συλλεχθεί. Αυτή η τεχνική μπορεί να εφαρμοστεί και αργότερα σε πιλοτικής κλίμακας μονάδες για μεγαλύτερη και πιο εύκολη συλλογή της παραγόμενης βιομάζας μικροφυκών.

Ο στόχος αυτής της εργασίας ήταν η βελτιστοποίηση ανάπτυξης και του διαχωρισμού μικροφυκών, καθώς και η μεγιστοποίηση της παραγωγής και του διαχωρισμού των λιπιδίων. Τέλος στα πλαίσια της εργασίας επιχειρήθηκε η

εργαστηριακή παραγωγή βιοντίζελ από λιπίδια που παρήχθησαν και απομονώθηκαν στο εργαστήριο.

2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

2.1. ΦΥΚΗ

2.1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΦΥΚΩΝ

Τα «φύκη» (ενικός: φύκος) / algae) είναι προκαρυωτικοί ή ευκαρυωτικοί, μονοκύτταρικοί ή πολυκύτταρικοί φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί, που μπορούν, με σχετικά υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης. Τα φύκη, αποτελούν ένα από τα παλαιότερα μέλη του φυτικού βασιλείου, που χρονολογούνται τρία δισεκατομμύρια χρόνια πριν και απαντώνται από πολικές μέχρι και τροπικές περιοχές και από πλούσια σε θρεπτικά συστατικά παράκτιες θάλασσες σε ολιγοτροφικά ανοιχτούς ωκεανούς. Συχνά αναπτύσσονται σε λίμνες, ποτάμια, βάλτους κτλ. Είναι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί, που δεν διαθέτουν ρίζες, φύλλα και άλλα όργανα που χαρακτηρίζουν τα κοινά φυτά, ενώ περιέχουν χλωροφύλλη. (Qin, 2012).

Ο όρος «alga,-ae» προέρχεται από τη λατινική λέξη που σημαίνει «θαλάσσιο γρασίδι», αλλά όπως χρησιμοποιείται σήμερα περιλαμβάνει πολλές πρόσθετες μορφές. Η ελληνική λέξη για τα άλγη είναι «φύκος», και ως εκ τούτου, η μελέτη τους λέγεται φυκολογία (Sharma, 2007). Εκτιμάται ότι ο αριθμός των διαφορετικών ειδών τους είναι περίπου 30.000 (από τα γνωστά είδη), αν και ο πραγματικός αριθμός τους πιθανότατα υπερβαίνει σημαντικά τον ήδη υπάρχον (Cannell, 1993).

Παρά το γεγονός ότι η πλειοψηφία των φυκών είναι υδρόβια, μερικά είδη έχει παρατηρηθεί ότι αναπτύσσονται και στο έδαφος (Aravantinou and Manariotis,

2014). Από το σύνολο των οργανισμών που υπάρχουν στους ωκεανούς, τα φύκη αντιπροσωπεύουν ένα πολύ μεγάλο ποσοστό του συνόλου αυτού. (Andersen, 2005) και επίσης είναι οργανισμοί οι οποίοι αναπτύσσονται σε υδατικό περιβάλλον και χρησιμοποιούν την ηλιακή ακτινοβολία και το διοξείδιο του άνθρακα για την ανάπτυξή τους.

Από πλευράς μορφολογίας υπάρχει εξαιρετική ποικιλία. Υπάρχουν απλές μονοκύτταρες μορφές, αποικιακές, μικροσκοπικές, νηματοειδείς έως πολύπλοκες διακλαδισμένες ή μη. Ορισμένα μοιάζουν με μικροσκοπικούς θάμνους, με τσαμπιά σταφυλιού, άλλα μοιάζουν με φύλλα, δίχτυ, σωλήνες, κ.ά. Τα περισσότερα φύκη είναι οργανισμοί με κύτταρα που περιέχουν έναν πυρήνα και άλλα οργανίδια που περιβάλλονται από μεμβράνες, δηλαδή είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, ικανοί να φωτοσυνθέσουν και συνεισφέρουν περίπου 40 έως 50% του οξυγόνου της ατμόσφαιρας (Andersen, 2005). Τα μονοκύτταρα φύκη έχουν μέγεθος 2 έως 40 μm και ζουν μεμονωμένα ή κατά ομάδες σε κάθε ελεύθερη υδάτινη επιφάνεια (Andersen, 2005). Τα φύκη δεν βγάζουν άνθη ή καρπούς όπως επίσης δεν έχουν πραγματικά φύλλα, βλαστούς και ρίζες, ενώ διαθέτουν σχετικά απλές αναπαραγωγικές δομές.

Κοινό χαρακτηριστικό των φυκών είναι η παρουσία ειδικών ενώσεων στο κύτταρό τους, που έχουν φωτοχημικές ιδιότητες, οι οποίες είναι διάφορες χρωστικές ουσίες που απορροφούν μια περιοχή του φάσματος του ηλιακού φωτός. Το χρώμα των φυκών οφείλεται στα διάφορα είδη χλωροφύλλης, *a*, *b* και *c* καθώς και στις καροτινοειδείς χρωστικές. Το σώμα των φυκών ονομάζεται θαλλός. Όλα τα τμήματα του θαλλού μπορούν να φωτοσυνθέσουν εάν έχουν χλωροφύλλη. (Van den Hoek et al., 2002).

2.1.2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΚΩΝ

Τα φύκη, κυρίως τα μικροσκοπικά, συναντώνται παντού. Ιδιαίτερα στα νερά, γλυκά και αλμυρά, θάλασσες, λίμνες, ποτάμια. Ορισμένα, μικροσκοπικά, έχουν προσαρμοστεί και ζουν στο έδαφος, σε βράχους, πέτρες, ξύλα, ακόμα και σε ψυχρές ή θερμές ερημικές περιοχές. Τα μεγάλων διαστάσεων φύκη βρίσκονται στη θάλασσα. Ορισμένα φαιοφύκη σχηματίζουν πραγματικά θαλάσσια δάση. Στη θάλασσα αναπτύσσονται κυρίως πάνω σε σταθερά υποστρώματα, δηλαδή σε βράχους, σε ύφαλα πλοίων κ.ά. όπου προσκολλώνται με ένα χαρακτηριστικό όργανο, το δίσκο προσκόλλησης, ή με αποφύσεις που θυμίζουν ρίζες.

Σε υδατικό περιβάλλον τα φύκη αναπτύσσονται ως βένθος, περίφυτο ή φυτοπλαγκτόν. Το βένθος απαρτίζουν φύκη τα οποία προσκολλώνται σε κάποιο υπόστρωμα και αναπτύσσονται στον πυθμένα ή τα τοιχώματα μιας υδατολεκάνης. Ως περίφυτα χαρακτηρίζονται τα φύκη τα οποία προσκολλώνται σε υδατική βλάστηση (επίφυτα στην περίπτωση που προσκολλώνται στο εξωτερικό του υδατικού φυτού και ενδόφυτο στην περίπτωση που ζουν στο εσωτερικό του). Το φυτοπλαγκτόν απαρτίζεται από φύκη τα οποία κινούνται παθητικά ή αιωρούνται στο υδάτινο μέσο. Το πλαγκτόν, ανάλογα με το μέγεθός του διακρίνεται σε macroplankton (>200 μm), microplankton (20-200 μm), nanoplankton (10-20 μm), ultaplankton (2-10 μm) picoplankton (0.2-2 μm) (Lee K and Lee CG, 2001).

Έχει αποδειχθεί ότι η ανάπτυξη μερικών φυκών επηρεάζεται από τις ποσότητες των θρεπτικών συστατικών που βρίσκονται διαλυμένες στο νερό (π.χ. άζωτο, φωσφόρος), τη θερμοκρασία ή ακόμη και από τη διάρκεια και διακύμανση της ακτινοβολίας του ηλιακού φωτός.

Τα φύκη χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια και ως δείκτης της ποιότητας των επιφανειακών υδάτων, γιατί ορισμένα είδη αναπτύσσονται μόνο σε εύτροφα νερά ενώ άλλα είναι πολύ ευαίσθητα σε οργανική ή χημική ρύπανση. Τα φύκη χρησιμοποιούνται και στη βιομηχανία τροφίμων. Κάποια είδη χρησιμοποιούνται ως εδώδιμα, από άλλα παράγονται χημικές ενώσεις που μοιάζουν με άμυλο, ενώ άλλα χρησιμοποιούνται ως γαλακτοματοποιητές στην παρασκευή γαλακτοκομικών

προϊόντων. Μια άλλη σημαντική χρήση των φυκών είναι στην φαρμακευτική και χημική βιομηχανία, για παράδειγμα κατά την παρασκευή σαμπουάν, πλαστικών, εντομοκτόνων, ελαστικών, χαρτιού, υφασμάτων, λιπασμάτων και άλλων (Castro & Huber, 1999; Mata et al., 2010). Τα φύκη είναι η αρχική πηγή των υδρογονανθράκων που βρίσκονται στα αποθέματα του αργού πετρελαίου (crude oil) και του φυσικού αερίου (Andersen, 2005). Επίσης, τα μικροφύκη έχουν υψηλό λιπιδιακό περιεχόμενο και μεγάλο ρυθμό ανάπτυξης. Λόγω αυτών των πλεονεκτημάτων τους, υπάρχει η δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν για την επεξεργασία λυμάτων και κατ' επέκταση την παρασκευή βιοκαυσίμων.

2.1.3. ΚΥΡΙΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΦΥΚΩΝ

Κυανοφύκη ή Κυανοβακτήρια (Cyanobacteria, Cyanophyceae, Blue green algae): Τα κυανοφύκη ή κυανοβακτήρια είναι μικροσκοπικοί φωτοσυνθετικοί οργανισμοί, προκαρυωτικοί που δεν φέρουν σχηματοποιημένους πυρήνες, χλωροπλάστες και άλλα οργανίδια. Το χρώμα τους είναι συνήθως κυανοπράσινο επειδή επικρατεί η χρωστική φυκοκυανίνη. Υπάρχουν μονοκύτταρες, αποικιακές, νηματοειδείς μορφές, ακίνητες ή κινητές αλλά χωρίς μαστίγια. Αποτελούν βασική ομάδα του φυκοπλαγκτού, ιδιαίτερα των γλυκών νερών. Ο ρόλος τους είναι σημαντικός καθώς εκτός από παραγωγοί οργανισμοί, ορισμένα έχουν και την ικανότητα να δεσμεύουν ατμοσφαιρικό άζωτο και να εμπλουτίζουν το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται με άζωτο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί από άλλους οργανισμούς. Απαντώνται όμως και στην χέρσο, ακόμα και σε ακραίες οικολογικές συνθήκες.

Διάτομα (Bacillariophyta ή Diatomeae): Ευκαρυωτικοί, μικροσκοπικοί, μονοκύτταροι οργανισμοί με χαρακτηριστικό πυριτικό κυτταρικό τύχωμα (θήκη) με ανάγλυφες διακοσμήσεις. Χαρακτηρίζονται είτε από ακτινωτή, είτε από αμφίπλευρη συμμετρία. Η συμμετρία και οι χαρακτηριστικές ποικίλσεις του κυτταρικού τοιχώματος αποτελούν συστηματικά γνωρίσματα για τον προσδιορισμό τους.

Δινοφύκη, Δινομαστιγωτά, Πυροφύκη (Dinophyceae, Dinoflagellates): Μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, κινητοί με τη βοήθεια μαστιγίων. Το κυτταρικό τους σώμα μπορεί να περικλείεται από θήκη από κυτταρίνη η οποία σχηματίζεται από σκληρές πλάκες που διαφέρουν στη μορφή και στις διακοσμήσεις. Είναι από τους πιο συνηθισμένους μικροσκοπικούς οργανισμούς του φυτοπλακτού. Συμβάλλουν στην πρωτογενή παραγωγή (παραγωγή οργανικής ύλης από αυτότροφους οργανισμούς). Ενδέχεται να προκαλέσουν προβλήματα, καθώς παράγουν τοξίνες όταν αναπτυχθούν μαζικά. Τα περισσότερα αναπτύσσονται σε θαλάσσια ύδατα και ένα μικρό ποσοστό αυτών σε γλυκά.

Χλωροφύκη (Chlorophyta, Chlorophyceae, Green algae): Τα χλωροφύκη είναι μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι οργανισμοί. Τα κύτταρά τους είναι ευκαρυωτικά, φέρουν σχηματοποιημένο πυρήνα, ένα ή περισσότερους χλωροπλάστες, πυρηνοειδή. Υπάρχουν διαφορετικοί μορφολογικοί τύποι, κινητοί με ένα έως πολλά μαστίγια, ή ακίνητοι, αποικιακοί, νηματοειδείς διακλαδιζόμενοι ή μη. Το χρώμα τους είναι συνήθως πράσινο λόγω της επικράτησης της χλωροφύλλης α. Έχουν όμως και άλλες χρωστικές (χλωροφύλλη β, καροτένιο α και β, ξανθοφύλλες), οι οποίες ενδέχεται να τροποποιούν το χρώμα. Αναπαράγονται με αγενή και εγγενή τρόπο.

Φαιοφύκη (Phaeophyta, Brown algae): Τα φαιοφύκοι είναι οργανισμοί που αναπτύσσονται σχεδόν αποκλειστικά σε θαλάσσια ύδατα. Το χαρακτηριστικό καστανό χρώμα τους οφείλεται στη χρωστική φουκοξανθίνη η οποία έχει μεγαλύτερη επίδραση από την χλωροφύλλη α. Είναι πολυκύτταροι οργανισμοί με μεγάλη ποικιλία στη μορφή και στη δομή τους. Υπάρχουν μικροσκοπικές νηματοειδείς μορφές που είναι και η πιο απλές, όπως και απλές μορφές σε σχήμα δίσκου, μέχρι φυλλόμορφες πολύπλοκες και μεγάλων διαστάσεων, γνωστές σαν Kelps, και μπορεί να σχηματίζουν υποθαλάσσια δάση. Ορισμένα διαθέτουν κύστες αέρα που τα βοηθούν να επιπλέουν στην επιφάνεια του νερού, εκμεταλλευόμενα καλύτερα το ηλιακό φως. Στην πλειοψηφία τους απαντώνται σε παράκτιες περιοχές ώντας στερεωμένα πάνω σε υποστρώματα. Παρόλο που μοιάζουν με ανώτερα φυτά, είναι πρωτόγονα. Τα κύτταρα των Φαιοφυκών περιβάλλονται από κυτταρικό

τοίχωμα, το οποίο περιέχει μεταξύ άλλων συστατικών και αλγινικά άλατα. Είναι μη τοξικές ουσίες με κολλοειδείς ιδιότητες που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία.

Ροδοφύκη (Rhodophyta, Rhodophyceae, Red algae): Είναι φύκη κυρίως θαλάσσια αλλά υπάρχουν και αρκετά που αναπτύσσονται σε γλυκά ύδατα. Υπάρχουν λίγα μονοκύτταρα αλλά τα περισσότερα είναι πολυκύτταρα, συχνά με πολύπλοκη δομή. Εκτός από τη χλωροφύλλη α που περιέχουν, έχουν και φυκοερυθρίνη και φυκοκυανίνη που απορροφούν την πράσινη και την μπλέ ακτινοβολία. Στη φυκοερυθρίνη οφείλεται το χαρακτηριστικό ρόδινο χρώμα που έχουν τα περισσότερα Ροδοφύκη. Λόγω αυτών των φωτοσυνθετικών χρωστικών μπορούν να αναπτύσσονται σε βάθος έως και 200 μέτρα, σε καθαρά νερά. Το κυτταρικό τοίχωμα των Ροδοφυκών αποτελείται από διάφορα συστατικά, μεταξύ των οποίων και από βλέννη.

2.2. ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ

2.2.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

Ο όρος «φύκη» περιλαμβάνει δύο μεγάλες κύριες μορφολογικές κατηγορίες: τα μακροφύκη (macroalgae ή κοινώς seaweeds), συνήθως θαλάσσια είδη, και τα μικροφύκη (microalgae). Το κριτήριο της διάκρισης μεταξύ των δύο αυτών κατηγοριών είναι μόνο το μέγεθος. Τα μακροφύκη έχουν μήκος μερικών εκατοστών, το οποίο σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να φτάσει και πολλά μέτρα (50-70) όπως στα γιγάντια Φαιοφύκη (καφέ φύκη, kelp). Αντίθετα, τα μικροφύκη έχουν μήκος από μερικά μικρόμετρα (συνήθως 0.2-50 μm τα μονοκύτταρα μέχρι 100-200 μm στις περιπτώσεις των νηματωδών πολυκύτταρων σχηματισμών όπως το κυανοβακτήριο *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*) έως και 1-2.000 μm σε ορισμένα διάτομα. (Barsanti and Gualtieri, 2006).

Τα μικροφύκη είναι προκαρυωτικοί ή ευκαριωτικοί φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί με μεγάλο ρυθμό ανάπτυξης που μπορούν να αναπτυχθούν σε δύσκολες συνθήκες χάρη στην δομή τους. Παραδείγματα προκαρυωτικών

μικροφυκών είναι τα κυανοφύκη (Cyanophyceae) και ευκαρυωτικών τα πράσινα φύκη (Chlorophyta) και τα διάτομα (Bacillariophyta). (Li Y et al 2008)

Τα μικροφύκη συναντώνται σε όλα τα οικοσυστήματα του πλανήτη, υδατικά και μη, αντιπροσωπεύοντας μια μεγάλη ποικιλία ειδών που ζουν σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντολογικών συνθηκών. (Richmond A 2004)

Ο μηχανισμός τον οποίο χρησιμοποιούν τα μικροφύκη για να πραγματοποιήσουν την φωτοσύνθεση είναι παρόμοιος με αυτόν που χρησιμοποιούν οι φυτικοί οργανισμοί του εδάφους. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι αποτελούν μέρος ενός υδατικού συστήματος, οπότε η χρήση του νερού, του CO₂ και των θρεπτικών συστατικών από αυτούς τους μικροοργανισμούς παρουσιάζει αυξημένη απόδοση, όπως και η μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε βιόμαζα. Η απουσία μη φωτοσυνθετικών υποστηρικτικών δομών (ρίζες, κοτσάνια) αποτελεί άλλο ένα πλεονέκτημα των μικροφυκών, τα οποία βρίσκονται, προφανώς, σε υδατικό περιβάλλον, σε σύγκριση με τους άλλους φυτικούς μικροοργανισμούς. (L. Gouveia, 2011).

Τα μικροφύκη αποτελούν μια μικρογραφία βιοχημικού εργοστασίου, ενώ φωτοσυνθετικά είναι περισσότερο αποτελεσματικά συγκριτικά με τα χερσαία φυτά (Muthukumar et al 2012). Μέσω της φωτοσύνθεσης που πραγματοποιούν, αποτελούν ένα σημαντικό κομμάτι της ζωής στον πλανήτη, καθώς παράγουν σχεδόν τη μισή ποσότητα ατμοσφαιρικού οξυγόνου και ταυτόχρονα χρησιμοποιούν διοξείδιο του άνθρακα για να αναπτυχθούν φωτο-αυτοτροφικά. (Tabatabaei, 2010).

Η βιοποικιλότητα των μικροφυκών είναι τεράστια και αντιπροσωπεύουν ένα σχεδόν ανεκμετάλλευτο πόρο. Τα περισσότερα είδη μικροφυκών παράγουν προϊόντα, όπως καροτενοειδή, αντιοξειδωτικά, λιπαρά οξέα, ένζυμα, πολυμερή, πεπτίδια, τοξίνες και στερόλες.

Η χημική σύσταση των μικροφυκών δεν είναι σταθερή, αλλά ποικίλλει ανάλογα με το είδος και τις συνθήκες καλλιέργειας. Ο έλεγχος παραγωγής των επιθυμητών προϊόντων στα μικροφύκη είναι δυνατός σε μεγάλο βαθμό μεταβάλλοντας τις

περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως τη θερμοκρασία, το φωτισμό, το pH, τη διαθεσιμότητα διοξειδίου του άνθρακα, των διαφόρων θρεπτικών συστατικών και της περιεκτικότητας του μέσου ανάπτυξης σε άλας.

Τα μικροφύκη προσαρμόζονται στο περιβάλλον με τέτοιο τρόπο ώστε να εκμεταλλεύονται στο έπακρον τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά, να τα αποθηκεύουν ή να βρίσκουν νέους τρόπους χρήσης τους. Γενικά για την ανάπτυξη τους (υγρή βιομάζα που αποτελείται από 40-50% άνθρακα) τα μικροφύκη έχουν την δυνατότητα να αναδιαμορφώσουν την εσωτερική τους δομή (π.χ. βιοχημικός και φυσιολογικός εγκλιματισμός) ή να εκκρίνουν στο περιβάλλον διάφορες ουσίες με σκοπό να απομυζήσουν κάθε διαθέσιμο θρεπτικό ή να μειώσουν την ανάπτυξη ανταγωνιστικών μικροοργανισμών.

2.2.2. ΕΙΔΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

Η βιολογία, η φυσιολογία και η οικολογία των μικροφυκών διαφέρουν ανάλογα με την ταξινόμηση του μικροφύκου. Οι βασικότερες ομάδες μικροφυκών (φύλα ή διαιρέσεις) είναι τα Χλωροφύκη (*Chlorophyta*), τα Πρασινοφύκη (*Prasinophytes*), τα Ετεροκοντόφυτα (*Heterokontophyta*) με κύριες υποδιαιρέσεις τα Χρυσοφύκη (*Chrysophyceae*), τα Διάτομα (*Bacillariophyceae* ή *Diatomeae*) τα Ευστιγματοφύκη (*Eustigmatophyceae*) και τα Ραφιδοφύκη (*Raphidophytes*), τα Απτόφυτα (*Haptophytes*, *Prymnesiophyceae*), τα Κρυπτοφύκη (*Cryptophyceae*), τα Δινομαστιγωτά (*Dinophyta*) και τα Κυανοβακτήρια (*Cyanobacteria – blue-green algae*) (Barsanti and Gualtieri, 2006, Darley, 1982, Metting, 1996, Waterbury, 2006).

Τα μικροφύκη περιλαμβάνουν κοκκοειδείς, μαστιγωτές, ή παλμελοειδείς μορφές και τριχώματα αλλά και μεγάλους αποικιακούς σχηματισμούς με νήματα, μικροθαλλούς ή πιο περίπλοκες συσσωματώσεις. Μαζί με τα μακροφύκη που διαβιούν στην παραλιακή ζώνη, το φυτοπλαγκτό και τα βενθικά μικροφύκη του εύφωτου πυθμένα, αποτελούν τους κύριους (είτε μοναδικούς) πρωτογενείς παραγωγούς στην θάλασσα ή στα εσωτερικά ύδατα (Falkowski, 1980, Reynolds, 2006) καθώς και σε ακραία περιβάλλοντα όπως οι θερμοπηγές (Brock, 1967) ή οι

παγετώνες (Bunt and Wood, 1963). Εν ολίγοις αποτελούν την βάση διατροφής για το 70 % της γήινης παραγωγής βιομάζας (Andersen, 1996) ενώ ευθύνονται περίπου για το 50 % της γήινης φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου (Wiessner, et al., 1995). Η χρήση τους στην ανθρώπινη διατροφή έχει καταγραφεί από αρχαιοτάτων χρόνων (γαλακτοκομικά προϊόντα, συμπληρώματα διατροφής κ.α.) (Jassby, 1988) και έχει ευρέως τεκμηριωθεί στην παραδοσιακή και την σύγχρονη υδατοκαλλιέργεια (De Pauw and Persoone, 1988, Guedes and Malcata, 2012).

2.2.3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ – ΕΙΔΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ

Η πλειοψηφία των μικροφυκών είναι φωτοσυνθέτοντες μικροοργανισμοί που παράγουν οξυγόνο που σημαίνει ότι η πηγή ενέργειας είναι ο ήλιος και η πηγή άνθρακα το CO₂. Παρόλα αυτά, ορισμένα μικροφύκη έχουν την ικανότητα να ακολουθούν διάφορους τύπους μεταβολισμού και να εναλλάσσουν τον μεταβολισμό τους ανάλογα της μορφής της διαθέσιμης ενέργειας και του διαθέσιμου άνθρακα.

Ο μεταβολισμός των μικροφυκών μπορεί να είναι αυτοτροφικός, ετεροτροφικός, μικτοτροφικός ή φωτοετεροτροφικός, δίνοντας τους έτσι τη δυνατότητα να αλλάζουν το μεταβολικό τους μηχανισμό ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν.

Για παράδειγμα κάποιοι μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν:

- Φωτοαυτοτροφικά χρησιμοποιώντας το φως ως μοναδική πηγή ενέργειας, που με τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης μετατρέπεται σε χημική ενέργεια.

Στον τύπο αυτό τα μικροφύκη αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα το CO₂ ή άλλες ανόργανες μορφές

- Χημειοετεροτροφικά (Ετεροτροφικά) όπου τα μικροφύκη χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας και πηγή άνθρακα διάφορες οργανικές ουσίες όπως γλυκόζη, οξικό οξύ, γλυκερίνη κλπ
- Μικτοτροφικά (Μιξοτροφικά) όπου η κύρια πηγή ενέργειας προέρχεται από τη φωτοσύνθεση αλλά μπορούν να χρησιμοποιούν και οργανικές ενώσεις. Σε αυτή τη κατηγορία βρίσκονται και οι αμφιτροφικοί μικροοργανισμοί όπου φωτοσυνθέτουν όταν υπάρχει διαθέσιμο φως, συμπεριφέρονται δηλαδή φωτοαυτοτροφικά ή συμπεριφέρονται ετεροτροφικά ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των οργανικών ουσιών που είναι διαθέσιμες. Αξιοποιούν, δηλαδή, είτε τον ήλιο ως πηγή ενέργειας είτε διάφορες οργανικές ουσίες και ως πηγή άνθρακα είτε το CO₂ είτε τις οργανικές ουσίες.
- Φωτοετεροτροφικά (Φωτο-οργανοτροφικά) όπου στον τύπο αυτό τα μικροφύκη χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας τον ήλιο και σαν πηγή άνθρακα τις οργανικές ενώσεις (Chojnacka and Marquez-Rocha, 2004).

Ο ετερότροφος και μιξότροφος μεταβολισμός μπορούν να αποτελέσουν ιδανική καλλιεργητική τεχνική για την παραγωγή μικροφυκών, γιατί έτσι αντιμετωπίζεται το πρόβλημα της αξιοποίησης του φωτός σε καλλιέργειες με μεγάλη πυκνότητα ή σε καλλιέργειες με φωτοπαρεμπόδιση (κατά τους καλοκαιρινούς μήνες). Στις ετερότροφες ή/και μιξότροφες καλλιέργειες η προσθήκη οργανικού άνθρακα στο υπόστρωμα καλλιέργειας δίνει μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας σε σχέση με τις φωτοαυτότροφες καλλιέργειες. Γενικά όμως ο μιξότροφος μεταβολισμός έχει μεγαλύτερους ρυθμούς ανάπτυξης και μεγαλύτερη τελική παραγωγή σε βιομάζα σε σχέση με τους άλλους τρεις μεταβολισμούς (Chojnacka and Marquez-Rocha, 2004). Η προσθήκη όμως οργανικού άνθρακα προϋποθέτει αξενικές συνθήκες καλλιέργειας λόγω του κινδύνου της υπέρμετρης ανάπτυξης βακτηρίων και την

τελική τους επικράτηση στις καλλιέργειες. Ειδικά για την παραγωγή μικροφυκών για ενεργειακούς σκοπούς, όπου το ζήτημα της μείωσης του κόστους των χρησιμοποιούμενων θρεπτικών υλικών είναι πολύ σημαντικό, για την πραγματοποίηση ετερότροφων ή μιξότροφων καλλιεργειών είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν οργανικά απόβλητα του παραγωγικού τομέα (Abreu, et al., 2012, Andrade and Costa, 2007, Chen, 1996, Chojnacka and Zielińska, 2011, Gao, et al., 2010, Zhang, et al., 2011).

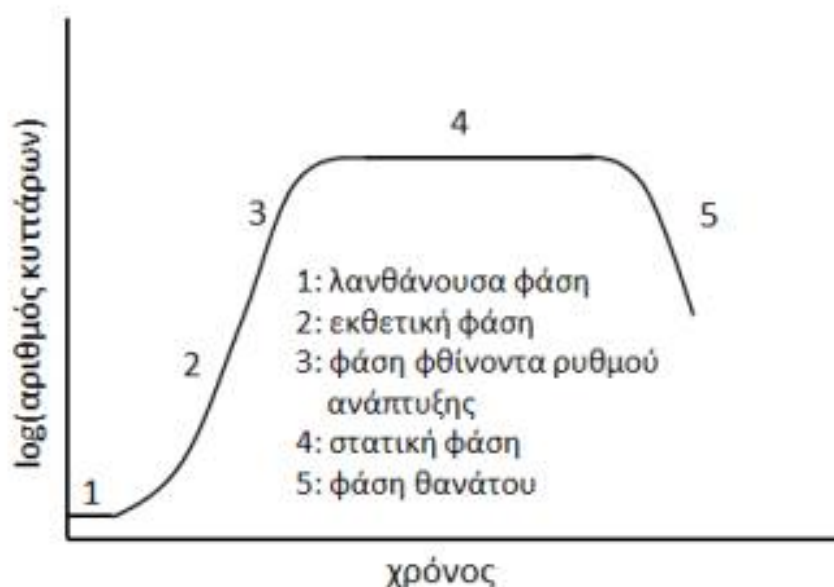
Η διαφορά στο μεταβολισμό μεταξύ των φωτοετεροτροφικών και των μικτοτροφικών μικροφυκών είναι λεπτή. Το βασικό σημείο διαφοροποίησης είναι κυρίως η πηγή ενέργειας που χρησιμοποιούν για την παραγωγή των μεταβολικών τους προϊόντων. Ο μεταβολικός μηχανισμός που χρησιμοποιείται μπορεί να διακριθεί και με τις αλλαγές στο pH, το οποίο αλλάζει ανάλογα με τη στοιχειομετρία ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

Πολλά είδη μικροφυκών μπορούν να στραφούν από φωτοαυτότροφη σε ετερότροφη ανάπτυξη. Η δέσμευση της φωτεινής ενέργειας κατά τη φωτοσύνθεση γίνεται από τη χλωροφύλλη και τις άλλες φωτοσυνθετικές χρωστικές. Με τη βοήθειά τους οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί συνθέτουν υδατάνθρακες (γλυκόζη), χρησιμοποιώντας απλές ανόργανες ενώσεις, όπως το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό, που βρίσκουν άφθονες στο περιβάλλον τους. Ως ετερότροφα, τα μικροφύκη βασίζονται στη γλυκόζη ή άλλες αξιοποιήσιμες πηγές άνθρακα για τον μεταβολισμό και την ενέργεια. Μερικά στελέχη μπορεί επίσης να αναπτυχθούν μιξοτροφικά (Carlsson et al. 2007).

Τα είδη *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Arthrospira (Spirulina) platensis* είναι παραδείγματα στελεχών που βρέθηκαν να αναπτύσσονται κάτω από φωτοαυτοτροφικές, ετεροτροφικές καθώς και μικτοτροφικές συνθήκες. Άλλα είδη όπως τα *Selenastrum capricornutum* και *Scenedesmus acutus* μπορούν να αναπτυχθούν είτε φωτοαυτοτροφικά, ή χημειοετεροτροφικά, ή φωτοετεροτροφικά.

2.2.4. ΦΑΣΕΙΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Η ανάπτυξη των μικροφυκών είναι γρήγορη αν υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες και επαρκής ποσότητα θρεπτικών συστατικών. Τυπικά τα μικροφύκη διπλασιάζουν τη βιομάζα τους μέσα σε 24 ώρες ή ακόμα μέσα σε 3.5 ώρες όταν βρίσκονται στην εκθετική φάση(Chojnacka K. et al., 2004). Στο διάγραμμα παρουσιάζεται μια τυπική καμπύλη ανάπτυξης μικροφυκών.



Διάγραμμα 2.1. Σχηματική αναπαράσταση φάσεων κυτταρικής ανάπτυξης μικροφυκών (Chojnacka K. et al., 2004)

Η γνώση των φάσεων της κυτταρικής ανάπτυξης των μικροφυκών είναι απαραίτητη για την κατανόηση της λειτουργίας τους κατά τη διάρκεια της καλλιέργειάς τους. Η κυτταρική ανάπτυξη περιλαμβάνει πέντε φάσεις:

1. Λανθάνουσα φάση: Τα κύτταρα προσαρμόζονται στις συνθήκες περιβάλλοντος, χωρίς να πολλαπλασιάζονται. Στη φάση αυτή αυξάνονται τα ένζυμα και οι μεταβολίτες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των κυττάρων και τη δέσμευση άνθρακα.

2. Εκθετική φάση: Η πυκνότητα των κυττάρων αυξάνεται εκθετικά συναρτήσει του χρόνου, με ρυθμό που εξαρτάται από διάφορες συνθήκες, όπως η ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας και η θερμοκρασία.
3. Φάση φθίνοντος ρυθμού ανάπτυξης: η ανάπτυξη των κυττάρων αναστέλλεται, λόγω εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών.
4. Στατική φάση: Οι παράγοντες ανάπτυξης εξαντλούνται και τοξικά μεταβολικά προϊόντα συσσωρεύονται. Στη φάση αυτή αναπτύσσεται ισορροπία μεταξύ του ρυθμού ανάπτυξης και του ρυθμού θανάτου με αποτέλεσμα η πυκνότητα των κυττάρων να παραμένει σταθερή.
5. Φάση θανάτου: Η ποιότητα του νερού υποβαθμίζεται, τα θρεπτικά συστατικά εξαντλούνται κι έτσι η πυκνότητα των κυττάρων μειώνεται. Άλλες παράμετροι που οδηγούν στο ίδιο αποτέλεσμα είναι η έλλειψη οξυγόνου, οι θερμοκρασιακές μεταβολές και οι μεταβολές στο pH.

Στόχος μιας καλλιέργειας μικροφυκών είναι η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη παραμονή των κυττάρων στην εκθετική φάση. Στη φάση αυτή η θρεπτική αξία καθώς και η ανθεκτικότητα των παραγομένων μικροφυκών είναι αυξημένη (Lavens, 1996). Σε γενικές γραμμές στην εκθετική φάση τα μικροφύκη έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, ενώ στην φάση στασιμότητας μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και γλυκογόνο. Στην περίπτωση, λοιπόν, όπου οι υδατάνθρακες και το γλυκογόνο είναι ο επιδιωκόμενος στόχος, προτιμάται η μεγαλύτερη παραμονή των κυττάρων στην φάση στασιμότητας.

2.2.5. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ – ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΠΗΡΕΑΣΜΟΥ

Στις καλλιέργειες ανάπτυξης μικροφυκών σε βιομηχανική κλίμακα υπάρχουν πολλοί παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την αύξηση της βιομάζας. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι αβιοτικοί και βιοτικοί. Αβιοτικοί παράγοντες θεωρούνται οι φυσικοχημικοί παράμετροι που μπορούν να επηρεάσουν την καλλιέργεια, όπως η θολερότητα. Στους βιοτικούς παράγοντες συμπεριλαμβάνονται

η επίδραση της παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών και η ανταγωνιστικότητα με άλλα είδη μικροφυκών (Mata et al., 2010).

Επίδραση φυσικοχημικών παραγόντων στην αύξηση μικροφυκών

- Ένταση και πηγή φωτός

Το φως, συγκεκριμένα, το είδος της ακτινοβολίας και η ένταση είναι κρίσιμοι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της ανάπτυξης των μικροφυκών, τόσο σε εσωτερικούς όσο και σε εξωτερικούς χώρους. (Ma and Hanna, 1999; Scragg et al, 2002) Η ποιότητα του φάσματος του φωτός και η έντασή του πρέπει να επιλέγονται με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτρέπουν την μέγιστη ανάπτυξη των μικροφυκών. Το φάσμα του φωτός που αξιοποιείται από τα μικροφύκη είναι μεταξύ 400- 700 nm (ενεργή φωτοσυνθετική ακτινοβολία). (Janssen, 2002, Suh and Lee, 2003). Κάτω από πραγματικές και ουσιαστικά ευνοϊκές συνθήκες (δηλαδή χαμηλά έως μέτρια επίπεδα φωτός), οι αποδόσεις φωτοσυνθετικής ικανότητας αναφέρονται σε ένα εύρος 4,5 έως 7% σε λίμνες και φωτοαντιδραστήρες (Ma and Hanna, 1999; Scragg et al, 2002). Αυτό μεταφράζεται σε μια απόδοση του $30\text{-}40\text{g}_{\text{dry biomass}}\text{m}^{-2}\text{d}^{-1}$. Τα διάφορα είδη μικροφυκών περιέχουν σε διαφορετικές αναλογίες τις διάφορες φωτοσυνθετικές χρωστικές ουσίες και ως εκ τούτου αξιοποιούν λιγότερο ή περισσότερο διαφορετικά μήκη κύματος. Το άφθονο φώς είναι απαραίτητο για την ανεμπόδιστη φωτοσύνθεση των μικροφυκών και την παραγωγή ενέργειας κατά την ανάπτυξή τους. Οι ανοιχτές τεχνητές λίμνες με μεγάλη επιφάνεια, ενδεχομένως να παρουσιάζουν μεγαλύτερη φωτοσυνθετική απόδοση, όμως, η απόδοσή τους επηρεάζεται από αρκετούς παράγοντες όπως η εποχή, το κλίμα, η διάρκεια της ημέρας και τυχόν κτίσματα που βρίσκονται κοντά, τα οποία μπορούν να δημιουργήσουν σκιά (Ryan, 2009). Στα κλειστά συστήματα η αξιοποίηση του φυσικού φωτός είναι ένα από τα βασικά οικονομικά εμπόδια στις καλλιέργειες αυτές, και για αυτό το λόγο γίνεται συχνά η ταυτόχρονη χρήση τεχνητού και φυσικού ηλιακού φωτός.

Αρκετές προσπάθειες έχουν πραγματοποιηθεί για την παραγωγή βιοκαυσίμων με χαμηλό κόστος, μειώνοντας την κατανάλωση ενέργειας. Εντούτοις, το υψηλό κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας με τεχνητές πηγές φωτός σε συμβατικούς φωτοαντιδραστήρες παραμένει ένα σημαντικό μειονέκτημα. Για την μείωση του κόστους έχουν προταθεί διαφορετικές στρατηγικές φωτισμού για την ενίσχυση του ρυθμού παραγωγής των μικροφυκών και την απόδοση των λιπιδίων τους που προορίζεται για τα βιοκαύσιμα (Melis et al, 1999). Σημειώνεται ότι οι φωτοαντιδραστήρες μπορούν να χρησιμοποιήσουν τεχνητό και ηλιακό φως, ή ακόμα και συνδυασμό αυτών. Οι μεγάλες αποδόσεις μικροφυκών σε λιπίδια με τη χρήση φωτοαντιδραστήρων οφείλεται κυρίως στη σταθερότητα καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξης των καλλιεργειών και της σταθερής έντασης του τεχνητού φωτός. Οι περισσότερες προσεγγίσεις εργαστηριακής κλίμακας για τη μελέτη παραγωγής μικροφυκών εκμεταλλεύονται λάμπες φθορισμού, οι οποίες έχουν σχετικά υψηλή κατανάλωση ενέργειας ανά μονάδα φωτοσυνθετικής ενεργής ακτινοβολίας (Photosynthetically active radiation, PAR) (Ma and Hanna, 1999). Νέες τεχνολογίες λαμπτήρων όπως τα LED (light emitting diode) τα οποία έχουν σχετικά μικρή κατανάλωση ενέργειας ή οι οπτικές ίνες ή και υβριδικά συστήματα φυσικού και τεχνητού φωτισμού θεωρούνται ότι θα συμβάλουν αρκετά στην βελτιστοποίηση της παραγωγής μικροφυκών (Chen, et al., 2011, Wang, et al., 2007).

Τα περισσότερα εμπορικά συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών εξακολουθούν να διεξάγονται σε ανοικτές δεξαμενές με χρήση της ηλιακής ενέργειας ως μοναδική πηγή φωτός. Ωστόσο, η απόδοση των εξωτερικών συστημάτων είναι συνήθως χαμηλή, και απαιτείται μεγάλη επιφάνεια (Ma and Hanna, 1999).

- Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία είναι ο σημαντικότερος περιοριστικός παράγοντας, μετά το φως, για την καλλιέργεια φυκών σε κλειστά και ανοιχτά συστήματα. Η επίδραση της θερμοκρασίας για πολλά είδη μικροφυκών στο εργαστήριο είναι καλά τεκμηριωμένη, αλλά το μέγεθος της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ετήσια παραγωγή βιομάζας σε εξωτερικούς χώρους δεν έχει ακόμα επαρκώς διερευνηθεί. Το εύρος της θερμοκρασίας στο οποίο η παραγωγικότητα των μικροφυκών αποκτά

τη μέγιστη δυνατή τιμή διαφέρει ανάλογα με το εξεταζόμενο στέλεχος. Πολλά μικροφύκη μπορούν να ανεχθούν εύκολα θερμοκρασίες έως και 15°C χαμηλότερα από τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, αλλά υπάρχει πιθανότητα με μια μεταβολή της τάξης των 2-4°C πάνω από το βέλτιστο σημείο να υπάρξει πλήρης απώλεια της καλλιέργειας. (Mata et al., 2009; Converti et al., 2009; Munoz and Guieysse, 2006). Προβλήματα υπερθέρμανσης μπορεί να προκύψουν σε κλειστά συστήματα καλλιέργειας κατά τη διάρκεια ζεστών περιόδων, όπου η θερμοκρασία στο εσωτερικό του αντιδραστήρα μπορεί να φθάσει στους 55°C. Σε αυτήν την περίπτωση, ένα σύστημα ψύξης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μείωση της θερμοκρασίας σε περίπου 20 έως 26°C. (Moheimani, 2005)

Η θερμοκρασία είναι επίσης σημαντικός παράγοντας γιατί έχει συνεργιστική δράση με τον φωτισμό. Σε χαμηλές θερμοκρασίες μειώνεται και το σημείο έντασης του φωτισμού που δημιουργεί ανασταλτικές συνθήκες ή φωτοοξείδωση. Με άλλα λόγια σε ψυχρές περιοχές ή περιόδους του έτους η φωτοοξείδωση είναι πιο έντονη και συχνότερο φαινόμενο (Carvalho, et al., 2009, Jensen and Knutsen, 1993, Richmond, 1999). Τα περισσότερα μικροφύκη αναπτύσσονται μεταξύ 20-30°C, αλλά υπάρχουν και θερμόφιλα στελέχη που μπορούν να αναπτυχθούν και σε θερμοκρασίες ως 40-42°C (Vonshak, 2002).

- Θρεπτικά

Τα μικροφύκη για να πολλαπλασιαστούν πέρα από την ενέργεια και τον άνθρακα χρειάζονται και διάφορα άλλα ανόργανα στοιχεία τα οποία είναι αναγκαία για τις διάφορες μεταβολικές κυτταρικές διεργασίες. Τα κυριότερα θρεπτικά στοιχεία (μακροστοιχεία) που είναι αναγκαία για την ανάπτυξη των μικροφυκών, πέρα από τον άνθρακα είναι το άζωτο (N), ο φώσφορος (P) και το κάλιο (K). Αναγκαία αλλά σε μικρότερες ποσότητες τα μικροστοιχεία όπως το θείο (S). ο σίδηρος (Fe), το μαγνήσιο (Mg), το ασβέστιο (Ca), όπως και διάφορα άλλα μέταλλα (πχ μόλυβδος, νικέλιο, κλπ) (Richmond, 2004).

Αρκετές μελέτες έχουν περιγράψει συγκεκριμένη σύνθεση θρεπτικού μέσου για ανάπτυξη μικροφυκών που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για βιομηχανική κλίμακα

παραγωγής λιπιδίων από μικροφύκη. Αυτά περιλαμβάνουν τόσο τον περιορισμό των θρεπτικών αζώτου και φωσφόρου, αλλά και της επιπλέον προσθήκης CO₂. Η συνολική απόδοση των μικροφυκών σε βιοκαύσιμα δεν εξαρτάται μόνο από τη συγκέντρωση της βιομάζας που επιτυγχάνεται, αλλά επίσης και από την περιεκτικότητα των μεμονωμένων κυττάρων σε λιπίδια. Σε γενικές γραμμές, η υψηλή ανάπτυξη της βιομάζας και το περιεχόμενο των λιπιδίων είναι αντιστρόφως ανάλογα μεταξύ τους σε συνθήκες στρες. Για παράδειγμα, η στέρηση του αζώτου (ή φωσφορικών, σε μικρότερο βαθμό), περιορίζει την ανάπτυξη των κυττάρων (Σχήμα 2.1 – φάση φθίνοντος ρυθμού ανάπτυξης), αυξάνοντας παράλληλα την περιεκτικότητα σε λιπίδια. Οι Liu et al. (2008) έδειξαν ότι η υψηλή συγκέντρωση σιδήρου θα μπορούσε επίσης να προκαλέσει σημαντική συσσώρευση λιπιδίων στο θαλάσσιο είδος *C. vulgaris*. Αυτό σημαίνει ότι ορισμένες μεταβολικές αντιδράσεις συσχετίζονται με τη συσσώρευση λιπιδίων στο *C. vulgaris* και είναι πιθανόν να τροποποιηθούν από το υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης του σιδήρου στο αρχικό μέσο. Ο Illman et al. (2000) διαπίστωσε ότι η μείωση του αζώτου στο θρεπτικό υπόστρωμα, αυξάνει την περιεκτικότητα των λιπιδίων και στα πέντε είδη *Chlorella*, μεταξύ των οποίων της *C. Emersonii* και του *C. Minutissima*.

Για την ανάπτυξη των μικροφυκών είναι αναγκαία η παρουσία θρεπτικών στοιχείων όπως το άζωτο, ο φώσφορος και το διοξείδιο του άνθρακα. Η χρήση υδάτων που είναι πλούσια σε αυτά τα θρεπτικά στοιχεία, όπως είναι τα ύδατα από γεωργικές επεξεργασίες ή και από εκροές βιομηχανικών λυμάτων, μειώνουν την ανάγκη για τεχνητή παροχή θρεπτικών στοιχείων.

- CO₂

Το CO₂ αποτελεί την κύρια πηγή άνθρακα, ο οποίος μαζί με το άζωτο, το φώσφορο και το κάλιο χρησιμοποιούνται ως θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη των φυκών. Στα ανοιχτά συστήματα η αξιοποίηση του ατμοσφαιρικού CO₂ δεν είναι επαρκής και έτσι προστίθεται με τεχνητά μέσα, ως διάλυμα ανόργανου άνθρακα, για την εξασφαλισμένη ανάπτυξη των φυκών (Lundquist et al., 2010). Η επίδραση του CO₂ στην ανάπτυξη φυκών έχει εξεταστεί από διάφορους ερευνητές. Ο Chiu et al. (2009) ανέφερε αύξηση της παραγωγής βιομάζας και της συσσώρευσης λιπιδίων

με την αύξηση της περιεκτικότητας του CO₂ σε καλλιέργειες *Nannochloropsis oculata*. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν από τους De Morais and Costa (2007) για καλλιέργειες *Scenedesmus obliquus* και *Chlorella kessleri*, οι οποίες απομονώθηκαν από μια λίμνη επεξεργασίας σε θερμοηλεκτρική μονάδα στη Βραζιλία, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι τα μικροφύκη αυτά έχουν τη δυνατότητα για βιο-σταθεροποίηση των εκπομπών CO₂ σε θερμοηλεκτρικές μονάδες.

- pH

Το pH είναι άλλος ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την αύξηση της βιομάζας των μικροφυκών στην καλλιέργεια. Τα περισσότερα μικροφύκη αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με pH που κυμαίνεται μεταξύ 7 και 9. Παρόλα αυτά υπάρχουν είδη που είναι οξύφιλα (όπως το *Chlamydomonas acidophila*) αλλά και αλκαλόφιλα (όπως το *Arthrospira*). Οι αντιδράσεις δέσμευσης του διοξειδίου του άνθρακα είναι ταχύτερες σε τιμές pH < 8,0 (Amaro et al., 2011). Ο Moheimani (2005) ανέφερε ότι για το *Pleurochrysis carterae* η μέγιστη παραγωγικότητα σε φωτο-βιοαντιδραστήρα επέρχεται σε pH 7,7 έως 8,0 και σε εξωτερική δεξαμενή με αύλακες σε pH 9,1 έως 9,6.

Απότομη αλλαγή στο pH μπορεί να έχει καταστροφικές επιπτώσεις στην καλλιέργεια. Όπως αναφέρθηκε και πριν, κατά την φωτοσύνθεση το pH της καλλιέργειας έχει την τάση να αυξάνεται. Αν το pH αυξηθεί πάνω από μια τιμή τότε επέρχεται κυτταρόλυση. Το αντίθετο συμβαίνει όταν χρησιμοποιείται αμμωνία ως πηγή αζώτου, όπου κατά την πρόσληψή της από τα μικροφύκη παράγονται ιόντα H⁺, ωθώντας το pH να μειωθεί. Μεγάλες τιμές του pH ευνοούν την στερεοποίηση και καθίζηση του φωσφόρου με ανάλογες επιπτώσεις στην καλή ανάπτυξη των μικροφυκών (Borowitzka, 1998, Richmond, 2004).

- Αλατότητα

Η αλατότητα σε ανοιχτά και κλειστά συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη και τη σύνθεση των κυττάρων των μικροφυκών. Κάθε

είδος μικροφύκους έχει διαφορετικό επιθυμητό εύρος αλατότητας. Η περιεκτικότητα αλάτων στις καλλιέργειες μπορεί να αυξηθεί κατά την περίοδο των θερινών μηνών λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας και κατ' επέκταση της εξάτμισης. Η αλατότητα επηρεάζει τα φύκη με τρεις τρόπους. 1) προκαλώντας οσμωτικό στρες, 2) ιοντικό στρες λόγω υψηλής περιεκτικότητας αλάτων, και 3) αλλάζοντας την εκλεκτική διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης ιόντων. Η πιο εύκολη λύση για τον έλεγχο της αλατότητας είναι η πρόσθεση φρέσκου νερού ή άλατος όταν απαιτείται (Mata et al., 2010).

Υπάρχουν ήδη μικροφυκών, όπως για παράδειγμα η *Dunaliella salina* που αναπτύσσονται καλύτερα σε αλμυρά ή υφάλμυρα νερά προϋποθέτοντας σχετικά μεγάλες συγκεντρώσεις αλάτων. Άλλα μικροφύκη όπως για παράδειγμα τα: *Chlorella*, *Arthrospira*, *Porphyridium* κλπ είναι απλώς ανεκτικά ως ανθεκτικά σε μεγάλες συγκεντρώσεις αλάτων, παρόλο που δεν τις προϋποθέτουν. Πολλά είδη δεν αναπτύσσονται σε υποστρώματα με αλατότητα περισσότερη από 4 g/l. Για τα είδη που έχουν ανθεκτικότητα στην αλατότητα, αυτή βρέθηκε ότι πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 20 και 24 g/l, αν και κάθε είδος έχει την δικιά του βέλτιστη τιμή. Η αυξημένη αλατότητα επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη των μικροφυκών επιδρώντας άμεσα στο σύστημα της φωτοσύνθεσης (φωτοσύνστημα II) (Barsanti and Gualtieri, 2006, Bilanovic, et al., 2009, Richmond, 2004).

- Θολερότητα

Η μέτρηση της θολερότητας είναι μια σημαντική παράμετρος για την εκτίμηση της ποιότητας των επιφανειακών υδάτων. Η θολερότητα ενός δείγματος οφείλεται σε κολλοειδή σωματίδια, ανόργανης ή οργανικής προέλευσης. Το μέγεθος, το σχήμα και η σύσταση των σωματιδίων επηρεάζουν το βαθμό σκέδασης του φωτός (Ζανάκη, 1996). Η θολερότητα είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην καλλιέργεια μικροφυκών καθώς επηρεάζει τη διάχυση του φωτός στην υδάτινη στήλη. Η ανάμιξη και η ομογενοποίηση της καλλιέργειας είναι υπεύθυνες για τη σωστή κατανομή των θρεπτικών, τη μεταφορά του διοξειδίου του άνθρακα στην καλλιέργεια αλλά και την κυκλοφορία των κυττάρων των μικροφυκών από το σκοτάδι στη ζώνη του φωτός. Μια χαμηλή τιμή θολερότητας έχει σαν αποτέλεσμα

τη γρήγορη ανάμιξη της καλλιέργειας, αλλά και τη διαπερατότητα του φωτός σε όλη τη στήλη του διαλύματος της καλλιέργειας. Σε αντίθεση, μια υψηλή τιμή θολερότητας μπορεί να προκαλέσει την εμπόδιση της διαπερατότητας του φωτός αλλά και τη καταστροφή των κυττάρων λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας της καλλιέργειας σε κύτταρα μικροφυκών. Η παρουσία μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μια καλλιέργεια έχει σαν αποτέλεσμα τη διάσπασή τους κατά την ανάμιξη η οποία προκαλείται μέσω μηχανικών δραστηριοτήτων. Η ιδανική τιμή της θολερότητας εξαρτάται από το είδος του μικροφύκου και πρέπει να ελέγχεται πριν την διεξαγωγή μιας τέτοιας καλλιέργειας σε βιομηχανική κλίμακα, έτσι ώστε να αποτραπεί η μείωση της παραγωγικότητας (Mata et al., 2010).

Επίδραση βιοτικών παραγόντων στη μικροβιακή αύξηση

Κατά την καλλιέργεια των μικροφυκών, εκτός από τους φυσικοχημικούς παράγοντες σημαντικό ρόλο παίζει και η επίδραση των βιοτικών παραγόντων, όπως το είδος του φύκου, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί καθώς και η ανταγωνιστικότητα αυτών.

- Είδος

Τα φύκη μπορεί να είναι αυτότροφα ή ετερότροφα. Η φωτοαυτότροφη καλλιέργεια αποτελεί τον πιο συνηθισμένο τύπο για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Ο μηχανισμός της φωτοσύνθεσής τους είναι παρόμοιος με αυτόν που χρησιμοποιείται και από τους φυτικούς οργανισμούς του εδάφους, κατά τον οποίο μετατρέπουν τα ανόργανα συστατικά και τη φωτεινή ενέργεια σε οργανική ύλη (Li et al., 2008). Η μόνη διαφορά είναι το ότι τα μικροφύκη αποτελούν μέρος του υδατικού συστήματος. Η χρήση του νερού, του CO₂ και των θρεπτικών συστατικών από αυτούς τους μικροοργανισμούς παρουσιάζει αυξημένη απόδοση, όπως και η μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε βιομάζα. Αυτό είναι και το πλεονέκτημα των μικροφυκών (Gouveia, 2011). Επίσης, εμπλουτίζουν το νερό με οξυγόνο. Στο υδάτινο περιβάλλον, γλυκών και αλμυρών νερών, τα φύκη αποτελούν τη βάση της τροφικής αλυσίδας (Ελληνική φυκολογική εταιρία, 2008).

Τα ετερότροφα φύκη αναπτύσσονται κάτω από συνθήκες έλλειψης φωτός, άρα δεν φωτοσυνθέτουν, και παραλαμβάνουν με την τροφή τους τις χημικές ουσίες που είναι απαραίτητες για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών τους (Castro et al., 1999). Οι ετερότροφες καλλιέργειες παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα παραγωγής βιομάζας σε σχέση με τις αυτότροφες. Επίσης, η χρήση συνθηκών ετερότροφης καλλιέργειας για την ανάπτυξη των μικροφυκών οδηγεί σε σχεδόν 20 φορές μεγαλύτερη παραγωγή σε λιπίδια σε σύγκριση με τις αυτότροφες συνθήκες. Όμως, κύρια μειονεκτήματα αυτού του τύπου καλλιέργειας αποτελούν τα συχνά προβλήματα μόλυνσης από βακτήρια, τα οποία χρησιμοποιούν σάκχαρα ως πηγή του άνθρακα που χρειάζονται για την ανάπτυξη τους (Chen et al., 2011).

- Παθογόνοι μικροοργανισμοί

Κίνδυνος μόλυνσης ανοιχτών συστημάτων καλλιέργειας μικροφυκών μπορεί να επέλθει από άλλους μικροοργανισμούς όπως είναι τα βακτήρια, οι μύκητες, τα πρωτόζωα και άλλα είδη μικροφυκών. Οι μικροοργανισμοί αυτοί αποσταθεροποιούν και διαταράσσουν την ανάπτυξη και την καλλιέργεια των μικροφυκών (Markou and Georgakakis, 2011).

- Ανταγωνιστικότητα

Η παραγωγή βιομάζας επηρεάζεται σημαντικά και από τη μόλυνση της καλλιέργειας, όχι μόνο από παθογόνους μικροοργανισμούς αλλά και από διάφορα άλλα είδη μικροφυκών. Σε αυτή την περίπτωση τα είδη μικροφυκών που αναπτύσσονται ανταγωνίζονται για τα θρεπτικά. Η ανταγωνιστικότητα αυτή μπορεί να εξαλειφθεί ή να μειωθεί με την επιλογή στελεχών που αναπτύσσονται σε ακραίες συνθήκες περιβάλλοντος. Μια τέτοια περίπτωση είναι η *Spirulina*, η οποία είναι πολύ ανταγωνιστική σε συνθήκες περιβάλλοντος με υψηλό pH και σχετικά υψηλών συγκεντρώσεων αμμωνίας. Μια άλλη λύση για την αποφυγή τέτοιων καταστάσεων ανταγωνιστικότητας είναι να πραγματοποιηθούν οι καλλιέργειες κάτω από τις ιδανικές συνθήκες για τα επιλεγμένα είδη όπως είναι η περίπτωση των ειδών που δεσμεύουν αέριο άζωτο και καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο απουσίας αζώτου. (Markou and Georgakakis, 2011).

2.2.6. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ ΣΕ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΛΙΜΑΚΑ

Η βιομηχανία αναπτύσσει συστήματα καλλιέργειας με σκοπό την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων βιομάζας μικροφυκών. Οι ποσότητες αυτές χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή λιπιδίων για την μετέπειτα παραγωγή βιοκαυσίμων. Η καλλιέργεια των μικροφυκών μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ανοικτά ή κλειστά συστήματα. Στα ανοικτά συστήματα, τα μικροφύκη καλλιεργούνται σε τεχνητούς ή φυσικούς περιέκτες, όπως δεξαμενές, λίμνες κλπ. Στα κλειστά συστήματα η καλλιέργεια γίνεται εντός διαφόρων σχημάτων κλειστών περιεκτών που ονομάζονται φωτοβιοαντιδραστήρες (photobioreactors). Οι φωτοβιοαντιδραστήρες αποτρέπουν την άμεση επαφή της καλλιέργειας με τις εξωτερικές συνθήκες και έτσι την προστατεύουν από τους διάφορους περιβαλλοντικούς κινδύνους. Στους φωτοβιοαντιδραστήρες είναι ευκολότερος ο έλεγχος των περιβαλλοντικών συνθηκών. (Pulz, 2001, Richmond, 1992).

Ανοικτά συστήματα καλλιέργειας (Open Ponds)

Τα ανοιχτά συστήματα (ανοιχτές λίμνες – open ponds) αποτελούν τα παλαιότερα και απλούστερα συστήματα για μαζική καλλιέργεια μικροφυκών. Τα συστήματα αυτά αποτελούνται από μια ή περισσότερες αβαθείς λίμνες, με βάθος που δεν ξεπερνά τα 30 cm. Οι λίμνες αυτές μπορεί να είναι και στεγασμένες σε θερμοκήπια. Στα ανοιχτά συστήματα οι συνθήκες ανάπτυξης των φυκών ταυτίζονται με τις φυσικές συνθήκες στις οποίες αυτά αναπτύσσονται (Wiley et al., 2011). Το σχήμα των ανοιχτών συστημάτων μπορεί να είναι κυκλικό, λιμνοθάλασσας ή τεχνητών καναλιών και το υλικό κατασκευής που χρησιμοποιείται είναι οπλισμένο σκυρόδεμα ή επικάλυψη με γεωύφασμα. (Zhiyou and Johnson, 2009; Ryan, 2009).

Το πλεονέκτημα των ανοικτών συστημάτων καλλιέργειας είναι ότι έχουν μικρότερο κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας σε σχέση με κλειστά συστήματα. Όμως, τα μικροφύκη είναι εκτεθειμένα σε ανεξέλεγκτες περιβαλλοντικές συνθήκες και μπορούν να επιμολυνθούν και από διάφορα άλλα είδη μικροοργανισμών. Ένα βασικό μειονέκτημα των ανοικτών συστημάτων είναι ότι επειδή είναι ανοικτά στον

αέρα μεγάλη ποσότητα του νερού εξατμίζεται με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης αλάτων που από ένα σημείο και μετά επιδρούν ανασταλτικά στην ανάπτυξη των μικροφυκών, δηλαδή η παραγωγή βιομάζας είναι περιορισμένη. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην ανάγκη αναπλήρωσης νερού άρα και χρήση μεγάλων ποσοτήτων του. Η παραγωγή βιομάζας επηρεάζεται σημαντικά και από τη μόλυνση της καλλιέργειας και από διάφορα άλλα είδη μικροφυκών, καθώς και από άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς. Οι επιμολύνσεις με άλλους μικροοργανισμούς αλλοιώνει την σύσταση των καλλιεργειών και δυσχεραίνει την εφαρμογή της μονοκαλλιέργειας. Έντονες επιμολύνσεις μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την μικρή παραγωγή ή και σε ορισμένες περιπτώσεις την κατάρρευση της καλλιέργειας είτε λόγω της επικράτησης άλλων μικροοργανισμών είτε λόγω της εμφάνισης παρασιτικών ασθενειών (Day, et al., 2011). Επιπλέον, σε ορισμένες περιοχές, οι περίοδοι καλλιέργειάς τους είναι περιορισμένες, λόγω έντονων εποχιακών περιβαλλοντικών διακυμάνσεων ή χαμηλών θερμοκρασιών και ηλιοφάνειας. Χώρες με μεγάλη διάρκεια ηλιοφάνειας, όπως η Ελλάδα, έχουν πλεονέκτημα στην εγκατάσταση καλλιέργειας μικροφυκών. Επίσης η παραγωγή ανά μονάδα επιφάνειας είναι μικρότερη σε σχέση με τις κλειστού τύπου καλλιέργειες με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της βιομάζας να είναι σχετικά μικρή ανεβάζοντας πολύ το κόστος συγκομιδής (Norsker, et al., 2011). Η δυσκολία που υπάρχει στο να διατηρηθούν οι ιδανικές συνθήκες καλλιέργειας καθώς και η δυσκολία ανάκτησης της βιομάζας που αυξάνει σημαντικά το κόστος (Zhiyou and Johnson, 2009; Ryan, 2009).

Σε γενικές γραμμές τα κυριότερα μειονεκτήματα των ανοικτών καλλιεργειών είναι: 1) απώλειες λόγω εξάτμισης, 2) θερμοκρασιακές μεταβολές, 3) μικρή αποτελεσματικότητα στην αξιοποίηση του CO₂, 4) αναποτελεσματική ανάδευση του υποστρώματος και 5) μικρή αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας (Brennan and Owende, 2010)

Τα μειονεκτήματα των ανοικτών συστημάτων καλλιεργειών μπορούν να αντιμετωπιστούν με τη χρήση κατάλληλων συνθηκών για το είδος των μικροφυκών. Αποτελεσματικές συνθήκες ανάπτυξης μιας συγκεκριμένης καλλιέργειας είναι

συνήθως οι ακραίες συνθήκες, οι οποίες είναι ευνοϊκές μόνο για συγκεκριμένα είδη μικροφυκών, ενώ είναι ακατάλληλες για τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Η *Dunaliella salina* αποτελεί ένα παράδειγμα μικροφυκών που καλλιεργούνται σε ακραίες συνθήκες, καθώς μπορεί να αναπτυχθεί σε πολύ αλμυρά νερά. Επίσης για μια αποτελεσματική καλλιέργεια μπορεί να χρησιμοποιηθούν είδη μικροφυκών με σχετικά υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης για την επικράτηση έναντι άλλων μικροοργανισμών όπως τα μικροφύκη των γενών *Chlorella*, *Scenedesmus* και *Phaeodactylum* (Borowitzka, 1999, Brennan and Owende, 2010, Chen, 1996, Ugwu, et al., 2008).

Μια σημαντική σχεδιαστική παράμετρος των ανοικτών δεξαμενών είναι το βάθος τους, το οποίο δε θα πρέπει να είναι πολύ μικρό για να μην μεταβάλλεται η συγκέντρωση ιόντων του υποστρώματος λόγω εξάτμισης του νερού, αλλά ούτε πολύ μεγάλο, έτσι ώστε να επιτρέπεται η διείσδυση του φωτός. Το βάθος της δεξαμενής θεωρείται βέλτιστο μεταξύ 20 και 30 cm. Παρόλα αυτά αναλόγως το είδος του μικροφύκου και τις κλιματικές συνθήκες της περιοχής το βάθος της δεξαμενής μπορεί να είναι μεγαλύτερο ή μικρότερο (Borowitzka, 1999).

Τέλος, η ανάδευση των καλλιεργειών είναι απαραίτητη, καθώς εμποδίζει τη συσσωμάτωση και καθίζηση των μικροφυκών, συμβάλλει στην αξιοποίηση του φωτός και ομογενοποιεί το υπόστρωμα καθιστώντας τα ανόργανα και οργανικά στοιχεία πιο προσπελάσιμα για την πρόσληψή τους από τα μικροφύκη. (Chaumont, 1993). Ο κυριότερος τύπος ανοικτών τεχνητών δεξαμενών είναι η επιμήκης λεκάνη (raceway) και η κυκλική λεκάνη. Οι αγωγοί (διάδρομοι) της επιμήκους λεκάνης μπορεί να έχουν διάφορα σχήματα (απλοί, οφειοειδής, με παράλληλους αγωγούς κλπ) και η ανάδευσή τους γίνεται συνήθως με πτερυγωτό τροχό (paddle wheel), ενώ η κυκλική λεκάνη αναδεύεται με κινούμενο βραχίονα (Richmond, 1992).



Εικόνα 2.1. Ανοικτά συστήματα καλλιέργειας (*Open Ponds*)



Εικόνα 2.2. Ανοικτά συστήματα καλλιέργειας (*Open Ponds*)

Κλειστά συστήματα καλλιέργειας (Φωτοβιοαντιδραστήρες - PBR)

Τα κλειστά συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών αναπτύσσονται σε κλειστούς περιέκτες, τους φωτοβιοαντιδραστήρες. Στους φωτοβιοαντιδραστήρες υπάρχει καλύτερος έλεγχος των συνθηκών καλλιέργειας, καλύτερος έλεγχος της

παροχέτευσης και της κίνησης των αερίων (πχ. CO₂, περιορισμός της εξάτμισης νερού από το υπόστρωμα, καλύτερη θερμική κατανομή στο υπόστρωμα, προστασία από επιμολύνσεις από διάφορους μικροοργανισμούς και σχετικά υψηλές αποδόσεις σε σχέση με τις ανοικτές δεξαμενές.) Ωστόσο, το κόστος των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι αυξημένο και η δυνατότητα κατασκευής εγκαταστάσεων μεγάλης κλίμακας είναι περιορισμένη.

Ο βασικός περιοριστικός παράγοντας για την κατασκευή εγκαταστάσεων μεγάλης κλίμακας είναι η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου στο υγρό υπόστρωμα ανάπτυξης. Κατά τη φωτοσύνθεση των μικροφυκών παράγεται μοριακό οξυγόνο το οποίο διαλύεται στο υγρό υπόστρωμα ανάπτυξης. Το διαλυμένο οξυγόνο θα πρέπει να απομακρύνεται γιατί μεγάλες συγκεντρώσεις του αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροφυκών. Λόγω αυτού του γεγονότος, περιορίζεται αρκετά το μήκος των αγωγών, το οποίο δεν θα πρέπει να ξεπερνά τα 80 μέτρα (Molina, et al., 2001). Βέβαια παράγοντες όπως η ηλιακή ένταση, η συγκέντρωση της βιομάζας, ο ρυθμός ροής του υγρού κλπ επηρεάζουν σημαντικά τις διαστάσεις των αγωγών (Chisti, 2007, Lehr and Posten, 2009, Molina, et al., 2001).

Τα κλειστά συστήματα έχουν σχεδιαστεί για να ξεπερνούν τα προβλήματα μόλυνσης και εξάτμισης που εμφανίζονται στα ανοιχτά συστήματα. Κατασκευάζονται από διάφανα υλικά έτσι ώστε να διεισδύουν οι ακτίνες του ήλιου στο εσωτερικό τους. Οι δεξαμενές όπου αναπτύσσεται η καλλιέργεια παρουσιάζουν έναν υψηλό λόγο επιφάνειας προς όγκο (Chisti, 2007). Τα υλικά κατασκευής και τα σχήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων ποικίλουν πολύ. Υπάρχουν φωτοβιοαντιδραστήρες επίπεδοι σαν ηλιακοί συλλέκτες κατακόρυφοι ή κεκλιμένοι, κυλινδρικοί με επιμήκης αγωγούς κατασκευασμένοι από διάφορα διάφανα υλικά (γυαλί ή πλαστικό), ή ελικοειδούς μορφής. Επίσης απλής κατασκευής φωτοβιοαντιδραστήρες θεωρούνται αυτοί του τύπου σακών πολυαιθυλενίου (Brennan and Owende, 2010, Carvalho, et al., 2006, Chisti, 2007, Pulz, 2001). Το πλέον χρησιμοποιούμενο μοντέλο αντιδραστήρα αυτής της κατηγορίας είναι σωληνοειδούς μορφής, με τους διάφανους σωλήνες να βρίσκονται ευθυγραμμισμένοι με τις ακτίνες του ήλιου. Το υγρό κινείται στους σωλήνες μέσω

αντλίας. Μέρος των μικροφυκών συλλέγεται αφού περάσει από τους ηλιακούς σωλήνες συλλογής, κάνοντας με αυτόν τον τρόπο δυνατή τη συνεχή καλλιέργεια των μικροφυκών. Σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να απαιτηθεί τεχνητός φωτισμός ο οποίος επιβαρύνει το τελικό κόστος καλλιέργειας. Επίσης, χρησιμοποιείται αντλία για την επικράτηση τυρβώδους ροής στον αντιδραστήρα, η οποία εμποδίζει την επικάθιση της βιομάζας των φυκών (Zhiyou and Johnson, 2009).

Η διεργασία της φωτοσύνθεσης παράγει οξυγόνο, το οποίο δεν αποτελεί πρόβλημα στα ανοικτά συστήματα, διότι επιστρέφει στην ατμόσφαιρα αντίθετα από ότι στα κλειστά συστήματα, στα οποία τα επίπεδα οξυγόνου όταν αυξάνοντα σημαντικά μπορεί να αναστέλουν τη δράση των μικροφυκών και να τα δηλητηριάσουν. Για αυτόν τον λόγο, τα μικροφύκη πρέπει να επιστρέφουν σε μία ζώνη απαερίωσης (degassing), όπου φυσαλίδες αέρα διαπερνούν το υγρό μίγμα ώστε να απομακρυνθεί το οξυγόνο από το σύστημα. (Zhiyou and Johnson, 2009). Στους φωτοβιοαντιδραστήρες πρέπει να ρυθμίζεται η θερμοκρασία για να αναπτυχθεί η καλλιέργεια αλλά και η παραγωγικότητα κατά τη διάρκεια της ημέρας (Chisti, 2007).

Στόχος της κατασκευής και της τοποθέτησης ενός φωτοβιοαντιδραστήρα δεν είναι η επίτευξη της μέγιστης δυνατής παραγωγικότητας κατ' όγκο, αλλά η αποδοτική χρήση της ενέργειας του φωτός και η μείωση της διάρκειας του σκοτεινού σταδίου, ώστε η συνολική παραγωγικότητα να βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα (Slegers et al., 2011).

Οι φωτοβιοαντιδραστήρες παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα σε σύγκριση με τα ανοικτά συστήματα. Πρώτον, καθίσταται δύσκολη η μεταφορά των αντιδραστήρων αυτών σε μεγάλη κλίμακα (scale up). Επίσης, η επικάθιση των κυττάρων στα τοιχώματα των σωλήνων του αντιδραστήρα μπορεί να περιορίσει σε μεγάλο βαθμό τη διείσδυση του φωτός. Μολονότι, στα κλειστά συστήματα η συγκέντρωση της βιομάζας βρίσκεται αυξημένη σε σύγκριση με τα ανοικτά, η ανάπτυξη των μικροφυκών δεν είναι η βέλτιστη λόγω συχνών μεταβολών της θερμοκρασίας και της έντασης του φωτός. Το κόστος τους είναι τουλάχιστον 10 φορές υψηλότερο από το κόστος των ανοικτών συστημάτων (Zhiyou and Johnson, 2009).

Παρά όλα αυτά, τα πλεονεκτήματα των βιοαντιδραστήρων είναι πολύ σημαντικά. Το κυριότερο πλεονέκτημα είναι η αποφυγή μόλυνσης της καλλιέργειας και εξάτμισης του νερού, τα οποία αποτελούν προβλήματα των ανοικτών συστημάτων. Επιπρόσθετα, η παραγωγή στα κλειστά συστήματα είναι κατά μέσο όρο 13 φορές μεγαλύτερη αυτής των ανοικτών. Επίσης, η συλλογή των μικροφυκών είναι πιο εύκολη και χαμηλότερου κόστους σε σχέση με τα ανοικτά συστήματα, λόγω της μεγάλης αραιώσης που υπάρχει στα τελευταία. Η συγκέντρωση των μικροφυκών στα κλειστά συστήματα είναι κατά προσέγγιση 30 φορές μεγαλύτερη αυτής των ανοικτών (Zhiyou and Johnson, 2009).

Γενικά, τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι: 1) καλύτερος έλεγχος των συνθηκών καλλιέργειας, 2) μεγαλύτερος λόγος επιφάνειας/όγκου, 3) σε ορισμένους τύπους φωτοβιοαντιδραστήρων καλύτερος έλεγχος της παροχέτευσης και της κίνησης των αερίων (πχ ς της εξάτμισης νερού από το υπόστρωμα καλλιέργειας, 5) καλύτερη θερμική κατανομή στο υπόστρωμα καλλιέργειας, 6) σχετικά εύκολη εγκατάσταση σε ανοιχτό χώρο, 7) προστασία από επιμολύνσεις από διάφορους μικροοργανισμούς 8) σχετικά υψηλές αποδόσεις σε σχέση με τις ανοικτές δεξαμενές και 9) η δυνατότητα καλλιέργειας σε τύπο μιξοτροφίας ή ετεροτροφίας χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα επιμόλυνσης (Chen, 1996, Chisti, 2007).



Εικόνα 2.3. Διάφοροι τύποι συστημάτων καλλιέργειας μικροφυκών. (1) Πλαστικοί σάκοι 300 λίτρων, (2) επίπεδοι φωτοαντιδραστήρες, (3) οριζόντιοι σωληνωτοί φωτοαντιδραστήρες και (4) ανοικτή δεξαμενή τύπου *raceway*

Ο σχεδιασμός των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι μια πολύπλοκη υπόθεση και προϋποθέτει την καλή γνώση διαφόρων φυσικών και βιολογικών φαινομένων για τον επιτυχή σχεδιασμό των διαφόρων υποσυστημάτων. Τα κυριότερα υποσυστήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι: 1) το σύστημα φωτισμού, 2) το σύστημα εμπλουτισμού με CO_2 , 3) το σύστημα ανάδευσης, 4) το σύστημα απομάκρυνση O_2 και διαχωρισμό αερίων, 5) το σύστημα θέρμανσης/ψύξης και 6) το σύστημα θρέψης (Chisti and Moo-Young, 2002, Eriksen, 2008, Molina, et al., 2001)

Μέθοδοι συλλογής μικροφυκών

Η μέθοδος συλλογής των μικροφυκών από την καλλιέργεια έχει σημαντική επιρροή τόσο στο τελικό κόστος που εκτιμάται ότι αντιστοιχεί στο 20 εως 30% του συνολικού κόστους παραγωγής, όσο και στην συνολική παραγωγικότητα της μονάδας. Υπάρχει πληθώρα διαθέσιμων επιλογών συλλογής και συμπύκνωσης μιας καλλιέργειας. Οι

κυριότερες μέθοδοι αποτελούνται από τη φυγοκέντρωση, την κροκίδωση, τη διήθηση, την επίπλευση, ειδικότερα την επίπλευση με διαλυμένο αέρα (Dissolved Air Flotation - DAF), την καθίζηση και την ηλεκτροφόρηση. Μία ακόμη μέθοδος είναι αυτή της συλλογής της βιομάζας που έχει αναπτυχθεί σε μορφή βιοφίλμ. Από τις τεχνικές αυτές, η φυγοκέντρωση και η κροκίδωση προτιμούνται για τη συλλογή των μικροφυκών σε βιομηχανική κλίμακα, ενώ εναλλακτικές τεχνικές αποτελούν η επίπλευση με διαλυμένο αέρα (DAF) και η διήθηση (Chen et al., 2011).

2.2.7. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΙ ΧΡΗΣΕΙΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

Παραγωγή διαφόρων προϊόντων

Τα μικροφύκη καλλιεργούνται σε παγκόσμιο επίπεδο κυρίως ως ζωντανή τροφή στις υδατοκαλλιέργειες αλλά και για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων, κατά το πλείστον υψηλής αξίας και αφορούν προϊόντα τροφής, κοσμετολογίας, φαρμακευτικής χρήσης, και γενικά βιομηχανική χρήση. Αρκετά είδη χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιομάζας ως τροφής και συμπληρωμάτων διατροφής παραγωγή με υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης, λιπαρών οξέων (εικοσαπενταενοϊκού οξέος-EPA, δοκοσαεξαενοϊκού οξέως-DHA, γ- λινολενικού οξέος-GLA κλπ), βιταμινών, ανόργανων στοιχείων κλπ. Η παραγωγή αυτών των προϊόντων ενδεχομένως να έχουν εφαρμογή στην ανθρώπινη διατροφή, στην διατροφή ζώων, ψαριών κλπ.. Πολλοί από τους μεταβολίτες των φυκών έχουν φαρμακευτική αξία, είτε επειδή είναι αντιοξειδωτικά, είτε επειδή ενισχύουν το ανοσοποιητικό και το νευρικό σύστημα του ανθρώπου και των ζώων, είτε επειδή έχουν ιοστατική δράση. Τα κυριότερα στελέχη που καλλιεργούνται ανήκουν στα γένη *Chlorella*, *Dunaliella*, *Arthrospira Nannochloropsis*, *Isochrysis*, *Haematococcus* και *Schizochytrium* (Brennan and Owende, 2010, Harun, et al., 2010, Pulz and Gross, 2004).

Τα μικροφύκη επίσης καλλιεργούνται για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων για γενική βιομηχανική χρήση. Τα σημαντικότερα προϊόντα είναι διάφορες χρωστικές ουσίες όπως η χλωροφύλλη, φυκοκυανίνη, καροτενοειδή (π.χ. ασταξανθίνη, β-

καροτένιο) κλπ. Επίσης μια σημαντική εφαρμογή των φυκών είναι η παραγωγή λιπασμάτων και εδαφοβελτιωτικών προϊόντων. Η χρήση μικροφυκών ως εδαφοβελτιωτικού παράγοντα είναι μια πρακτική που εφαρμόζοταν σε παλαιότερες εποχές. Η εδαφοβελτιωτική δράση των φυκών οφείλεται στην ικανότητα της βιομάζας τους να κατακρατούν μεγάλες ποσότητες νερού και να βελτιώνουν τα δομικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά του εδάφους. Επίσης τα φύκη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως λίπασμα αργής αποδέσμευσης (slow release) και ειδικά τα αζωτοδεσμευτικά (nitrogen-fixing) είδη όπως τα *Anabaena* και *Nostoc*, τα οποία δεσμεύουν το άζωτο από την ατμόσφαιρα και την μετατρέπουν σε οργανική μορφή εντός της βιομάζας τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή λιπασμάτων με σαφώς πιο ήπιες περιβαλλοντικές επιπτώσεις σε σχέση με την τυπική διαδικασία παραγωγής αζωτούχων λιπασμάτων μέσω της διεργασίας Haber–Bosch (Grewe and Pulz, 2012, Metting, 1996, Pulz and Gross, 2004, Pulz, et al., 2008, Razon, 2012, Spolaore, et al., 2006).

Ανάλογα με τα είδη μικροφυκών, άλλες ενώσεις μπορούν επίσης να εξαχθούν, με πολύτιμες εφαρμογές σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς, που περιλαμβάνουν μια μεγάλη γκάμα χημικών προϊόντων, όπως λίπη, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, πετρέλαιο, φυσικές χρωστικές ουσίες, ζάχαρη, χρωστικές, αντιοξειδωτικά, υψηλής αξίας βιοδραστικές ενώσεις, και άλλα.

Παραγωγή βιοκαυσίμων

Προσφάτως, τα μικροφύκη έχουν προσελκύσει πολύ έντονα το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών για την παραγωγή βιοενέργειας ως μια από τις απαντήσεις στα περιβαλλοντικά προβλήματα που προκύπτουν από την αυξανόμενη χρήση ορυκτών καυσίμων για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών και από την συσσώρευση CO₂ στην ατμόσφαιρα. Η παραγωγή βιομάζας μικροφυκών και κατ' επέκταση βιοενέργειας έχει όλα εκείνα τα πλεονεκτήματα της χρήσης ανανεώσιμων πηγών ενέργειας. Το πιο σημαντικό ίσως πλεονέκτημα της παραγωγής βιομάζας μικροφυκών είναι ότι το CO₂ μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας από την πηγή

έκλυσής του παροχετεύοντάς το κατευθείαν στο υγρό υπόστρωμα ανάπτυξής τους (Ferreira, et al., 2012, Rosa, et al., 2011). Κατά αυτόν τον τρόπο το CO₂ επαναχρησιμοποιείται από τα μικροφύκη τα οποία το μετατρέπουν πάλι σε οργανική ύλη (βιομάζα) μέσω της φωτοσύνθεσης δημιουργώντας έναν κλειστό κύκλο στις μεταμορφώσεις του άνθρακα.

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της καλλιέργειας μικροφυκών για παραγωγή ενέργειας είναι τα εξής: 1) είναι αποδοτικά βιολογικά συστήματα για την αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας, έχοντας συγκρίσιμο ή και μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης σε σύγκριση με τα επίγεια φυτά 2) είναι απλοί οργανισμοί χωρίς πολύπλοκα αναπαραγωγικά όργανα των οποίων μπορεί να αξιοποιηθεί ολόκληρη η βιομάζα τους 3) είναι μικροοργανισμοί που ακολουθούν υπό ευνοϊκές συνθήκες έναν απλό κύκλο κυτταρικής διαίρεσης, 4) η καλλιέργειά τους μπορεί να γίνει σε αλμυρό ή υφάλμυρο νερό, 5) η καλλιέργειά τους μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας ως λιπάσματα απόβλητα και απόνερα από διάφορους παραγωγικούς τομείς, 6) η στρεμματική απόδοση σε βιομάζα είναι συγκρίσιμη ή και μεγαλύτερη σε σχέση με εκείνη των επίγειων φυτών και η παραγωγή τους μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μη καλλιεργήσιμες εκτάσεις Παρόλα αυτά, η καλλιέργεια μικροφυκών παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα, με τα βασικότερα να είναι το μεγάλο κόστος εγκατάστασης των καλλιεργητικών μονάδων και λειτουργίας τους και κατ' επέκταση το αυξημένο κόστος παραγωγής βιομάζας (Amin, 2009, Brennan and Owende, 2010, Chisti, 2007, Singh, et al., 2011).

Για την παραγωγή βιοενέργειας από μικροφύκη, το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί σχεδόν αποκλειστικά σε εκείνα μόνο τα είδη που η βιομάζα τους περιέχουν αυξημένη ποσότητα σε λιπίδια. Τα λιπίδια ενδιαφέρουν γιατί αποτελούν την πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντίζελ μετά την μετεστεροποίησή τους σε μεθυλεστέρες (Chisti, 2007). Τα μικροφύκη, πέρα από τα λιπίδια, περιέχουν μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών και υδατανθράκων σε επίπεδα σχεδόν ίσα με τα λιπίδια (Becker, 1994). Τα μικροφύκη αποτελούν πρώτη ύλη για την παραγωγή ενέργειας ή βιοκαυσίμων μέσω διαφόρων ενεργειακών τεχνολογιών μετατροπής της βιομάζας σε ενέργεια, όπως για παράδειγμα μέσω της αναερόβιας χώνευσης για την παραγωγή

βιοαερίου, πυρολυτικών ελαίων μέσω της πυρόλυσης, αερίων σύνθεσης (syngas) μέσω της αεριοποίησης, βιοαιθανόλης μέσω της αναερόβιας ζύμωσης και διαφόρων άλλων βιοκαυσίμων (Demirbas, 2010, Harun, et al., 2010, Kruse and Hankamer, 2010, Lam and Lee, 2012).

Διαχείριση αποβλήτων και λιμάτων

Ήδη από τη δεκαετία του 1960 είχε προταθεί η καλλιέργεια μικροφυκών σε απόβλητα και λίματα του βιομηχανικού, αστικού, γεωργο-κτηνοτροφικού και του τομέα της βιομηχανίας τροφίμων (Oswald, 2003). Η καλλιέργεια φυκών στα απόβλητα έχει ένα διττό σκοπό: από την μία να παραχθεί χρήσιμη βιομάζα (η οποία να μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατάλληλα πχ ως εδαφοβελτιωτικό ή για βιοενέργεια) και από την άλλη να επιτευχθεί απορρύπανση των αποβλήτων και των απόνερων με την μείωση της συγκέντρωσης των οργανικών και ανόργανων ρύπων (κατά κύριο λόγο νιτρικά/αμμωνιακά και φωσφορικά στοιχεία). Η απορρύπανση των αποβλήτων είναι στην ουσία μια ανάκτηση των θρεπτικών στοιχείων που περιέχονται στα απόβλητα και με αυτό τον τρόπο μειώνεται η επίδρασή τους στα φαινόμενα του ευτροφισμού, της ρύπανσης υπόγειων νερών κλπ. Στον τομέα της παραγωγής βιοενέργειας η καλλιέργεια των μικροφυκών χρησιμοποιώντας απόβλητα και απόνερα κερδίζει όλα και πιο πολύ έδαφος γιατί βελτιώνει την βιωσιμότητα του εγχειρήματος (δες παρακάτω) (Pittman, et al., 2011).

Τα μικροφύκη για να μπορέσουν να αυξηθούν/πολλαπλασιαστούν θα πρέπει να προσλάβουν με τον ένα ή άλλο τρόπο κάποια συγκεκριμένα ανόργανα στοιχεία (C, N, P, K, S κλπ). Ειδικά ορισμένα μικροφύκη που περιέχουν υψηλές ποσότητες πρωτεϊνών, η καλλιέργειά τους προϋποθέτει την εφαρμογή σημαντικών ποσοτήτων ανόργανων αζωτούχων λιπασμάτων. Από την σκοπιά της περιβαλλοντικής προστασίας, αλλά και της οικονομικότητας, η χρήση συνθετικών αζωτούχων (αλλά και φωσφορικών) λιπασμάτων δεν αποτελούν λύση αειφορίας. Για την κάλυψη των αναγκών των καλλιεργειών σε θρεπτικά στοιχεία αλλά και για την αποφυγή χρήσης συνθετικών λιπασμάτων, η καλλιέργεια των μικροφυκών μπορεί να γίνει σε

υποστρώματα τα οποία περιέχουν απόβλητα. Ειδικά τα απόβλητα του κτηνοτροφικού τομέα, που έχουν αυξημένες συγκέντρωση αζώτου, προσιδιάζουν για την χρήση τους για την καλλιέργεια μικροφυκών (Abeliovich, 2007, Markou and Georgakakis, 2011, Posten and Schaub, 2009, Rawat, et al., 2011). Ορισμένα απόβλητα του γεωργο-κτηνοτροφικού τομέα που έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την καλλιέργεια μικροφυκών είναι του χοιροστασίου (Cañizares and Domínguez, 1993), βουστασίου (Lincoln, et al., 1996), πτηνοτροφικά απόβλητα (Mahadevaswamy and Venkataraman, 1986), ελαιοτριβείου (Hodaifa, et al., 2008) και τυροκομείου (Bluer, et al., 1995). Η χρήση των αποβλήτων για καλλιέργεια μικροφυκών γίνεται είτε σε πρωτογενές (αδιαχείριστα απόβλητα) είτε σε τριτογενές στάδιο. Το τριτογενές στάδιο αναφέρεται στην χρήση αποβλήτων που έχουν υποστεί ήδη διαχείριση είτε με αερόβια σταθεροποίησή τους είτε με αναερόβια χώνευσή τους (Cañizares, et al., 1994, de la Noüe and Bassères, 1989, Martin, et al., 1985).

Η παραγωγή βιομάζας με τη χρήση αποβλήτων κυμαίνεται έντονα ανάλογα με το είδος του μικροφύκου και το είδος του αποβλήτου. Σε πειραματικές έρευνες έχει αναφερθεί παραγωγή από $5 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (ξηρή ουσία) (Mulbry and Wilkie, 2001) μέχρι και $70,0 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (ξηρή ουσία) (Lincoln, et al., 1996). Η μείωση των ανόργανων ρυπαντών (N και P) στα απόβλητα μετά την διαχείρισή τους με μικροφύκη μπορεί να ανέλθει στο 70-90% (Mulbry, et al., 2008) και η μείωση των οργανικών ρυπαντών μέχρι και 70% (COD) (González, et al., 2008).

Αρκετά είδη μικροφυκών έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται μιξοτροφικά, που σημαίνει ότι μπορούν να αξιοποιήσουν οργανικές ουσίες ως πηγή ενέργειας ή/και άνθρακα (δες παρακάτω). Η μιξοτροφική ανάπτυξη έχει το πλεονέκτημα ότι είναι πιο ταχεία από την αυτοτροφική ή την ετεροτροφική. Αυτό το γεγονός είναι σημαντικό γιατί σε απόβλητα με οργανικό φορτίο η ανάπτυξη τέτοιων ειδών μπορεί να είναι πιο ταχεία αυξάνοντας την παραγωγικότητα σε βιομάζα (Abreu, et al., 2012, Chojnacka and Zielińska, 2011, Heredia-Arroyo, et al., 2011) και ταυτοχρόνως μειώνοντας η εξουδετερώνοντας την ανάγκη χρήσης ανόργανου άνθρακα (Markou, et al., 2012).

Άλλες χρήσεις μικροφυκών

- Απομάκρυνση του CO₂ από τα απαέρια βιομηχανιών, μειώνοντας τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου από μια επιχείρηση ή μια μέθοδο διαδικασία παραγωγής βιοντίζελ.
- Επεξεργασία λυμάτων με απομάκρυνση των NH₄⁺, NO₃⁻, PO₄³⁻, κάνοντας τα φύκη να μεγαλώσουν με τη χρήση αυτών των ρύπων ως θρεπτικά συστατικά.
- Μετά την εξόρυξη πετρελαίου και την επακόλουθη παραγωγή ποσοτήτων CO₂, το οποίο δεσμεύεται από τα φύκη για την ανάπτυξή τους, η βιομάζα φυκών που προκύπτει μπορεί να μεταποιηθεί σε αιθανόλη, μεθάνιο, ζωοτροφές, ή και να χρησιμοποιηθεί ως οργανικό λίπασμα λόγω της υψηλής του αναλογίας σε N:P. Μπορεί επίσης απλά να καεί για τη παραγωγή ενέργειας (ηλεκτρισμού και θερμότητας).
- Ο συνδυασμός της ικανότητάς τους να αναπτύσσονται κάτω από αντίξοες συνθήκες, και τις μειωμένες τους ανάγκες για θρεπτικά συστατικά, μπορούν να καλλιεργηθούν σε περιοχές ακατάλληλες για γεωργική χρήση, ανεξάρτητα από τις εποχιακές αλλαγές του καιρού, έτσι ώστε να μην ανταγωνίζονται για την αρόσιμη χρήση της γης, και μπορεί να χρησιμοποιήσει υγρά απόβλητα, ως υπόστρωμα για την καλλιέργειά του, δηλαδή να μην απαιτούν τη χρήση γλυκού νερού.
- Λόγω της ποικιλίας των βιολογικών παράγωγων υψηλής αξίας με πολλές πιθανές εμπορικές εφαρμογές, τα μικροφύκη μπορούν να φέρουν επανάσταση σε ένα μεγάλο αριθμό τομέων της βιοτεχνολογίας, συμπεριλαμβανομένων των βιοκαυσίμων, καλλυντικών, φαρμάκων, διατροφής και στα πρόσθετα τροφίμων, της υδατοκαλλιέργειας, καθώς και την πρόληψη της ρύπανσης.

2.3. ΛΙΠΙΔΙΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

2.3.1. ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΣΕ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ

Μία μεγάλη ποικιλία μικροφυκών είναι ικανά να συσσωρεύσουν σημαντικές ποσότητες λιπιδίων στο κύτταρό τους, κάνοντάς τα όλο και πιο προσιτά για την παραγωγή βιοντίζελ. Σε γενικές γραμμές, η μέση περιεκτικότητα λιπαρών των μικροφυκών κυμαίνεται μεταξύ 20-50% επί του ξηρού βάρους ενώ ορισμένα είδη δύνονται να φτάσουν και το 90% της περιεκτικότητάς τους, κάτω από ορισμένες συνθήκες (Spolaore et al. 2006). Κάτω από δυσμενείς και στρεσογόνες περιβαλλοντικές συνθήκες ανάπτυξης, πολλά μικροφύκη, τροποποιούν τα βιοσυνθετικά τους μονοπάτια με κατεύθυνση τη δημιουργία και συσσώρευση κυρίως τριγλυκεριδίων (TAG) (Hu et al. 2008). Παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η ένταση της ακτινοβολίας καθώς και η διαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών, δείχνουν να επηρεάζουν τόσο τη λιπιδική σύνθεση των μικροφυκών, όσο και το περιεχόμενο των λιπιδίων τους. (Mata et al. 2010; Rodolfi et al. 2008).

Η περιεκτικότητα σε λιπίδια μπορεί να φτάσει ακόμα και το 75% επί της ξηρής βιομάζας συνοδευόμενη όμως από χαμηλή παραγωγικότητα (*Botryococcus braunii*). Όσον αφορά τα πιο κοινά είδη μικροαλγών (*Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Cylindrotheca*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis*) είναι σε θέση να παράγουν λιπίδια σε ποσοστό μεταξύ 20 και 50% έχοντας τη δυνατότητα να πετύχουν υψηλότερα επίπεδα παραγωγικότητας (Mata et al. 2010).

Το είδος *Chlorella* αποτελεί μία πολύ καλή επιλογή για την καλλιέργεια του με σκοπό την παραγωγή βιοντίζελ. Αυτό συμβαίνει διότι, αν και αρκετά είδη έχουν ανάλογες τιμές περιεχόμενου σε λιπίδια και παραγωγικότητας σε λιπίδια και βιομάζα, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες οι οποίοι λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή του κατάλληλο είδους μικροφύκους για την παραγωγή βιοντίζελ. Για παράδειγμα, η ικανότητα του μικροφύκους να αναπτύσσεται χρησιμοποιώντας τα παρεχόμενα θρεπτικά συστατικά και υπό πληθώρα διαφορετικών συνθηκών, οι οποίες δεν ευνοούν την ανάπτυξη άλλων ειδών μικροφυκών με ικανά ποσά

περιεχόμενου σε λιπίδια και παραγωγικότητας σε λιπίδια και βιόμαζα για την παραγωγή βιοντίζελ. (Mata et al. 2010)

Άλλη μία σημαντική παράμετρος, για την επιλογή του κατάλληλου είδους, είναι η σύσταση του μικροφύκους σε λιπαρά οξέα, επειδή τα τελευταία συνδέονται άμεσα με τα χαρακτηριστικά του παραγόμενου βιοντίζελ. Αυτά αποτελούνται από κορεσμένα και μη κορεσμένα λιπαρά οξέα, τα οποία περιέχουν από 12 έως 22 άτομα άνθρακα, με ορισμένα να ανήκουν στις οικογένειες των ω -3 και ω -6 λιπαρών οξέων. Αναλύσεις, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε επτά είδη μικροφυκών του γλυκού νερού, έδειξαν ότι αυτά συνθέτουν λιπαρά οξέα με αναλογίες αριθμού ατόμων άνθρακα προς αριθμό ακόρεστων δεσμών (C:D) ίσες με C14:0, C16:0, C18:1, C18:2, C18:3. Ακόμη, η «σχετική ένταση» (relative intensity) των υπολοίπων αλυσίδων λιπαρών οξέων εξαρτάται από το είδος του μικροφύκου που χρησιμοποιείται, για παράδειγμα οι αλυσίδες C16:4 και C18:4 εμφανίζονται εντονότερα στο *Ankistrodesmus* sp., οι C18:4 και C22:6 στο *Isochrysis* sp., οι C16:2, C16:3 και C20:5 στο *Nannochloris* sp. και οι C16:2, C16:3 και C20:5 στο *Nitzschia* sp. (Mata et al., 2010)

Επίσης, η σύσταση των λιπαρών οξέων επηρεάζεται και από διάφορους άλλους παράγοντες, όπως οι συνθήκες υπό τις οποίες αναπτύσσεται η καλλιέργεια, οι φάσεις τις οποίες ακολουθεί η ανάπτυξη των μικροφυκών, καθώς και διάφοροι παράγοντες οι οποίοι σχετίζονται με τα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη της καλλιέργειας και ορισμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες. Για παράδειγμα, η έλλειψη αζώτου και η ένταση των αλάτων (salt stress) προκάλεσαν τη συσσώρευση λιπαρών οξέων C18:1 σε όλα τα εξεταζόμενα είδη, ενώ στο είδος *Botryococcus braunii* υπήρχε ταυτόχρονα συσσώρευση C20:5 στο σύστημα. (Mata et al., 2010)

Παρά το γεγονός ότι τα παραγόμενα έλαια από την καλλιέργεια μικροφυκών εξαρτώνται από το στέλεχος το οποίο χρησιμοποιείται, η χρήση μικροφυκών προτιμάται από τις καλλιέργειες φυτικών ελαίων. Παρότι το περιεχόμενο σε έλαια δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο κατηγοριών, διακρίνονται μεγάλες διαφορές στις παραγωγικότητες σε έλαια και βιόμαζα, γεγονός το οποίο δίνει σαφές πλεονέκτημα στην καλλιέργεια μικροφυκών για την παραγωγή βιοντίζελ.

Ακόμη, λόγω της υψηλής παραγωγικότητας των μικροφυκών σε βιομάζα και έλαια, απαιτείται αρκετά μικρότερη έκταση για την καλλιέργεια τους, συγκριτικά με τα φυτικά έλαια. (Mata et al., 2010)

Τα λιπίδια που παράγονται από τα μικροφύκη, μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες, τα λιπίδια αποθήκευσης (μη-πολικά λιπίδια) και τα δομικά λιπίδια (πολικά λιπίδια). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα τριγλυκερίδια τα οποία μπορούν εύκολα να μετεστεροποιηθούν για την παραγωγή βιοντίζελ. Όσον αφορά τα δομικά λιπίδια, έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία αποτελούν απαραίτητα θρεπτικά συστατικά (Sharma et al 2012). Μεταξύ άλλων, διάφοροι τύποι λιπιδίων όπως φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, μονο-, δι- και τριγλυκερίδια αποτελούν μερικά μόνο από τα παράγωγα των μικροφυκών που εξαρτώνται από το είδος τους αλλά και τις συνθήκες καλλιέργειας που εφαρμόζονται. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα καταλαμβάνουν μόνο ένα ποσοστό (περίπου 1-2%) των λιπιδίων των μικροφυκών σε σχέση με τα μόρια γλυκερόλης που αποτελούν τις ακυγλυκερόλες. Σύμφωνα με το λιπιδικό προφίλ των μικροαλγών, το παλμιτικό οξύ (C16:0) είναι το κυρίαρχο λιπαρό οξύ στα περισσότερα από τα εκχυλίσματα λιπαρών τους (Nascimento et al., 2012).

Η παραγωγή λιπιδίων (% περιεκτικότητα ανά ξηρή βιομάζα) σε συνδυασμό με τον ρυθμό ανάπτυξης των μικροφυκών, αποτελούν δύο από τις πιο σημαντικές παραμέτρους στον τομέα των βιοκαυσίμων. Σε γενικές γραμμές, ο υψηλός ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των στελεχών εξαρτάται από τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ενώ δεν συνδέεται με την ικανότητα τους για παραγωγή και αποθήκευση λιπιδίων. Η παραγωγή των λιπιδίων παρατηρείται συνήθως κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης, όταν δηλαδή τα κύτταρα αναπτύσσουν περισσότερο τις βιοσυνθετικές τους ικανότητες προς την παραγωγή των τριγλυκεριδίων ή των υδρογονανθρακικών λιπιδίων (Nascimento et al., 2012)

2.3.2. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΕΙΔΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Παρότι, η παραγωγή ελαίων από μικροφύκη εξαρτάται σημαντικά από το είδος αυτών, βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι η ανάπτυξη μικροφυκών υπό συνθήκες ετερότροφης καλλιέργειας έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ελαίων σε σύγκριση με τους υπόλοιπους τύπους συνθηκών. Όμως, ένα μειονέκτημα της ετερότροφης καλλιέργειας αποτελεί η ευκολία με την οποία η πρώτη μπορεί να μολυνθεί, ειδικότερα στην περίπτωση της ανάπτυξης σε ανοικτά συστήματα, δημιουργώντας προβλήματα στην παραγωγή. Ακόμη, το κόστος χρήσης οργανικών ενώσεων ως πηγή άνθρακα, αυξάνει σημαντικά το συνολικό κόστος παραγωγής. (Chen et al., 2011)

Ο πλέον συνήθης τύπος συνθηκών καλλιέργειας για την παραγωγή ελαίων από μικροφύκη είναι η φωτοαυτότροφη καλλιέργεια, διότι η τελευταία είναι εύκολο να μεταφερθεί σε μεγάλη κλίμακα, όπως στην περίπτωση των ανοικτών λιμνών και ταυτόχρονα παρέχει μία υπηρεσία, η οποία αποτελεί λύση για τις βιομηχανίες που εκπέμπουν CO₂ στην ατμόσφαιρα, επειδή το τελευταίο δεσμεύεται για να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα της καλλιέργειας, και τελικά να μετατραπεί σε έλαια. Όμως, η παραγωγή ελαίων στην περίπτωση αυτή είναι αρκετά χαμηλότερη συγκριτικά με αυτή της ετερότροφης καλλιέργειας, επειδή στη φωτοαυτότροφη καλλιέργεια παρατηρείται αργή ανάπτυξη κυττάρων και μικρή παραγωγικότητα σε βιομάζα. Παρόλα αυτά, το χαμηλό κόστος μεταφοράς στη μεγάλη κλίμακα κάνει τη μέθοδο ανταγωνιστική. (Chen et al., 2011)

Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν αρκετά βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την παραγωγή ελαίων από μικροφύκη υπό συνθήκες μικτότροφης ή φωτοετερότροφης καλλιέργειας. Γενικότερα, μειονέκτημα των μεθόδων αποτελεί ο κίνδυνος μόλυνσης και οι απαιτήσεις φωτισμού των καλλιεργειών αυτών, τα οποία οδηγούν στο συμπέρασμα ότι πιθανώς χρειάζεται η κατασκευή ειδικού εξοπλισμού κατά τη μεταφορά τους στη μεγάλη κλίμακα, γεγονός το οποίο αυξάνει το κόστος παραγωγής. (Chen et al., 2011)

2.3.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια, τα μικροφύκη έχουν προσελκύσει σε ουσιαστικό βαθμό την ερευνητική προσοχή για την παραγωγή βιοντίζελ, καθώς δύνανται να υποκαταστήσουν τις συμβατικές πρώτες ύλες για την παραγωγή του. Η αξιολόγηση των στελεχών των μικροφυκών τα οποία συλλέγονται από διαφορετικά υδρόβια περιβάλλοντα, γίνεται βάσει διαφόρων σημαντικών παραμέτρων όπως η περιεκτικότητα σε λιπίδια, η σύνθεση λιπιδίων, ο ρυθμός ανάπτυξης, και η μεταβολική αποδοτικότητα κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Μία από αυτές τις παραμέτρους μπορεί να συμβάλλει στο να αποφασιστεί εάν το επιλεγμένο στέλεχος μικροφυκών είναι κατάλληλο ή ακατάλληλο για την παραγωγή βιοντίζελ, με βάση την προκαταρκτική ανάλυση λιπιδίων (τόσο για την παραγωγή λιπιδίων όσο και για την σύνθεσή τους). (Bux, 2013)

Τα γένη των μικροφυκών έχουν τη δυνατότητα να παραγάγουν λιπίδια μέχρι 50% του ξηρού βάρους των κυττάρων, ανάλογα με τα είδη και τις συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης. Τα ουδέτερα λιπίδια που υπάρχουν στα μικροφύκη είναι αρχικά υπό μορφή τριγλυκεριδίων (TAGs). Τα TAGs μπορούν να μετατραπούν σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAMES) μέσω μετεστεροποίησης. Η αποκατάσταση των συσσωρευμένων λιπιδίων άλγης από πάστα φυκών πραγματοποιείται γενικά μετά από την διάσπαση των κυττάρων για να ελευθερωθούν τα λιπίδια. Οι διαφορετικές τεχνικές διάσπασης κυττάρων χρησιμοποιούνται για ρήξη των κυττάρων άλγης, οι οποίες συμπεριλαμβάνουν την αποστείρωση, κατεργασία με υπερήχους ή μικροκύματα και το ωσμωτικό στρες Αξιολογώντας πέντε διαφορετικές τεχνικές διάσπασης κυττάρων για την αποδοτικότητα της εξαγωγής των λιπιδίων, έχει καταγραφεί ότι η μέθοδος κατεργασίας με μικροκύματα είναι μία αποδοτική μέθοδος για τα λιπίδια από μικροφύκη. (Bux, 2013)

Λόγω της απλότητάς της και της αποτελεσματικότητας όσον αφορά στις δαπάνες της, η μέθοδος υγρής εκχύλισης χρησιμοποιείται ευρέως από τους ερευνητές. Για τις μελέτες σε εργαστηριακή κλίμακα, η περιεκτικότητα σε λιπίδια και η σύνθεση τους μπορούν να καθοριστούν χρησιμοποιώντας καθιερωμένες τεχνικές. Διαθέσιμες είναι επίσης οι μέθοδοι που έχουν ως σκοπό την ταυτόχρονη εξαγωγή

και μετεστερεοποίηση της βιομάζας των αλγών με σκοπό να εξαχθούν τα λιπίδια που περιέχονται σε αυτήν. (Bux F 2013)

2.3.4. ΠΡΟΦΙΛ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

Προσδιορισμός των προφίλ των λιπιδίων από άλγη

Τα βήματα που περιλαμβάνονται στην περαιτέρω διαδικασία για την παραγωγή βιοντίζελ που είναι βασισμένη στα λιπίδια των αλγών, περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό του γένους, τη βελτιστοποίηση με σκοπό την μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων, και τη μαζική παραγωγή. Για την ποσοτικοποίηση των λιπιδίων που είναι διαθέσιμα στα μικροφύκη, μπορεί να ακολουθηθεί οποιαδήποτε από τις ακόλουθες τεχνικές χρωματογραφίας: υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC), υγρή ή αέρια χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματοσκοπία μάζας (LC/GC-MS). Συνήθως, η αέρια χρωματογραφία υιοθετείται για την ανάλυση του προφίλ των λιπιδίων από άλγη μετά από την μετατροπή τους σε FAMES. Η GC-FID (ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας) ή η GC-MS μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό του προφίλ των λιπαρών οξέων των λιπιδίων από άλγη. Στην περίπτωση της GC-FID, ο χρόνος διατήρησης για τα επιμέρους συστατικά των FAMES συγκρίνεται με γνωστά πρότυπα. Το προφίλ των λιπιδίων από άλγη μπορεί να αναλυθεί μέσω της GC-FID χρησιμοποιώντας τις τυποποιημένες μεθόδους ASTM D6584 και EN 14105. Τα μεθυλιωμένα λιπίδια/FAMES των αλγών μπορεί να περιέχουν ίχνη ρυπαντών όπως χλωροφύλλες, καταλύτων ή νερού, και τα δείγματα που εγχέονται στην αέρια χρωματογραφία πρέπει να είναι απαλλαγμένα από αυτούς τους μολυσματικούς παράγοντες για να αποτρέψουν τη ζημία των στηλών της αέριας χρωματογραφίας. (Bux, 2013)

2.3.5. ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ BIODIESEL

Γενικά, τα λιπίδια των μικροφυκών περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) (δηλ., περισσότεροι από τέσσερις διπλοί δεσμοί) σε υψηλότερο βαθμό από τα φυτικά λιπίδια και έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε ελεύθερο λιπαρό οξύ (>2%). Το ASTM D6751 (Ηνωμένες Πολιτείες) και το EN 14214 (Ευρωπαϊκή Ένωση) παρέχουν τις προδιαγραφές για το καθαρό βιοντίζελ και χρησιμοποιούνται σε πολλά μέρη του κόσμου για τη σύγκριση των ιδιοτήτων του βιοντίζελ ως καύσιμο. Τα πρότυπα του βιοντίζελ που αναπτύσσονται σε πολλές χώρες είναι βασισμένα στη διαθεσιμότητα των πρώτων υλών για βιοντίζελ που είναι συγκεκριμένες για την κάθε περιοχή (region-specific biodiesel feedstocks). Οι προδιαγραφές που αναπτύσσονται για την εξασφάλιση ποιότητας του καυσίμου βιοντίζελ υποβάλλονται συχνά σε τροποποιήσεις, και οι χώρες που παράγουν βιοντίζελ είναι υποχρεωμένες να ενημερώνουν τις προδιαγραφές τους με βάση τις αλλαγές στα πρότυπα ASTM ή EN για το βιοντίζελ. (Bux F 2013)

Η σύνθεση λιπιδίων του λαδιού από μικροφύκη είναι διαφορετική από τα έλαια των φυτών ή τα ζωικά λίπη, και ποικίλλει ανάλογα με τα είδη και τις συνθήκες ανάπτυξης. Σημαντικά καύσιμα και οι χημικές ιδιότητες που εξετάζονται για την επιλογή εναλλακτικών καυσίμων ντίζελ είναι το κινηματικό ιξώδες (KV), η υψηλότερη θερμική αξία (HHV), ο αριθμός κετανίου (A.K.), η πυκνότητα, το σημείο ανάφλεξης, ιδιότητες ψυχρής ροής (σημείο θόλωσης και σημείο ροής), το υπόλειμμα άνθρακα, η σταθερότητα οξείδωσης, η περιεκτικότητα σε τέφρα, η ποιότητα ανάφλεξης, η όξινη αξία (AV), αριθμός σαπωνοποίησης (A.Σ.), και αριθμός ιωδίου (A.I.). Αυτές οι ιδιότητες μπορούν να συγκριθούν με τα καθιερωμένα διεθνή πρότυπα καυσίμων με σκοπό την εξασφάλιση της ποιότητας των καυσίμων για τις εφαρμογές μηχανών ντίζελ. (Bux, 2013)

Οι ιδιότητες όπως οι A.Σ., A.I., και A.K. θεωρούνται σημαντικότερες για την αξιολόγηση των εναλλακτικών καυσίμων ντίζελ επειδή δίνουν τις βασικές πληροφορίες για την ποιότητα ανάφλεξης των καυσίμων, την παρουσία ακόρεστων λιπαρών οξέων (UFAs), και τις ιδιότητες ανάφλεξης των FAMES αντίστοιχα. Οι

υψηλότερες τιμές ιωδίου του λαδιού από άλγη δείχνουν την παρουσία υψηλότερου UFAs, και η θέρμανση του UFAs μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό deposits λόγω του πολυμερισμού των γλυκεριδίων σε υψηλές θερμοκρασίες. Τα έλαια από άλγη που περιέχουν τους υψηλότερους βαθμούς ακορεσμού δεν ενδείκνυνται για την παραγωγή βιοντίζελ. (Bux, 2013)

2.3.6. ΕΞΑΓΩΓΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

Η δυνατότητα πραγματοποίησης της παραγωγής βιοντίζελ από μικροφύκη εξαρτάται συνολικά από τις τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται στην περαιτέρω επεξεργασία των μικροφυκών. Η περαιτέρω επεξεργασία των μικροφυκών περιλαμβάνει την απομάκρυνση νερού, την ξήρανση, την εξαγωγή λαδιού, την παραγωγή βιολογικών καυσίμων, και τη χρησιμοποίηση παραπροϊόντων. Η απομάκρυνση νερού από τα μικροφύκη είναι μια ενεργοβόρα διαδικασία που απαιτεί υψηλές επενδύσεις κεφαλαίου για τον εξοπλισμό. Η ξήρανση είναι μια σημαντική διαδικασία στην περαιτέρω διαδικασία η οποία ενισχύει τη βιομάζα και την διαδικασία εξαγωγής των λιπιδίων. Η διαδικασία που υιοθετείται για την εξαγωγή λαδιού από τα ξηρά μικροφύκη είναι παρόμοια με αυτήν της εξαγωγής λαδιού από τους λινόσπορους. Προκειμένου να επιτευχθεί η οικονομικά βιώσιμη παραγωγή βιοντίζελ βασισμένη σε λάδι από μικροφύκη, η τεχνική για την δυνατότητα πραγματοποίησης πρέπει να μελετηθεί λεπτομερώς. (Bux, 2013)

Η περιεκτικότητα σε λάδι της ξηρής βιομάζας από άλγη ποικίλλει από 20% ως 50% λαδι επί του βάρους και μπορεί να αυξηθεί με τη βελτιστοποίηση των παραμέτρων ανάπτυξης. Πρίν την εξαγωγή λαδιού από τα μικροφύκη, πρέπει να απομακρυνθεί το νερό και να γίνει ξήρανση για να αφαιρεθεί η υγρασία. Οι παρούσες τεχνικές εξαγωγής λαδιού που είναι εφαρμόσιμες για την υγρή ή την ξηρή βιομάζα αλγών, έχουν περιορισμούς λόγω τεχνικών εμποδίων, δυσκολία στην αναγωγή σε μεγαλύτερη κλίμακα, υψηλή επένδυση δαπανών, και αποδοτικότητα εξαγωγής. Η επιλογή της τεχνολογίας εξαγωγής λαδιού εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε υγρασία, την ποσότητα που πρέπει να αντιμετωπιστεί, την ποιότητα του τελικού

προϊόντος, την αποτελεσματικότητα εξαγωγής, τις πτυχές ασφάλειας, και το κόστος των δαπανών. Το υλικό που υπέστη εξαγωγή χρησιμοποιείται για την παραγωγή βιοντίζελ με ή χωρίς προεπεξεργασία, ανάλογα με την ποιότητα του λαδιού. Οι ενέργειες που περιλαμβάνονται στη διαδικασία εξαγωγής λιπιδίων (1) σπάζουν το κυτταρικό τοίχωμα των μικροφυκών, (2) ελευθερώνουν το λάδι, και (3) διαχωρίζουν το λάδι και τον ελαιοπυρήνα (oil cake). Οι πιο κοινές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό των ελαίων από τη βιομάζα αλγών είναι η Μηχανική εξαγωγή, η Διαλυτική Εξαγωγή, και η Εξαιρετικά Κρίσιμη Ρευστή Εξαγωγή. (Bux, 2013)

Μηχανική εξαγωγή

Στην περίπτωση της μηχανικής εξαγωγής, η βιομάζα υποβάλλεται σε υψηλή πίεση για τη ρήξη και απελευθέρωση του λαδιού. Τα πλεονεκτήματα της Μηχανικής Εξαγωγής είναι ότι (1) καμία χημική ουσία δεν χρησιμοποιείται για την εξαγωγή, (2) η διαδικασία είναι χωρίς χημικές ουσίες στα προϊόντα, και (3) το προϊόν είναι ασφαλές για την αποθήκευση. Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της Μηχανικής Εξαγωγής είναι η ανεπάρκεια στην πλήρη αποκατάσταση λιπιδίων από την πρώτη ύλη, και οι εισαγωγές υψηλής ενέργειας. (Bux, 2013)

Χημική εξαγωγή - Διαλυτική εξαγωγή

Η διαδικασία της εξαγωγής λαδιού από τα υλικά που περιέχουν λάδι που χρησιμοποιούν έναν κατάλληλο διαλύτη καλείται διαλυτική εξαγωγή. Είναι κατάλληλο για την αποκατάσταση λιπιδίων από υλικά με χαμηλή περιεκτικότητα σε λάδι, και παράγει τον ελαιοπυρήνα με χαμηλή υπόλοιπη περιεκτικότητα σε λάδι (<1% κατά βάρος). Τα κυτταρικά τοιχώματα των κυττάρων των αλγών αποτελούνται από πολλαπλάσια στρώματα και είναι πιο απειθείς από εκείνα των άλλων μικροοργανισμών. (Bux, 2013)

Η διαδικασία διαλυτικής εξαγωγής εφαρμόζεται όταν ένας διαλύτης έρχεται σε επαφή με μικροφύκη για να απελευθερώσει τα λιπίδια, διάλυση των λιπιδίων στο διαλύτη, και να χωρίσει το λάδι από τα διάφορα συστατικά με απόσταξη του διαλύτη. Τα μειονεκτήματα της διαλυτικής εξαγωγής λαδιού είναι ότι (1) ο διαλύτης είναι ιδιαίτερα εύφλεκτος, (2) οι ανάγκες σε ενέργεια είναι υψηλές, και (3) η διαδικασία απαιτεί υψηλές επενδύσεις κεφαλαίου. (Bux, 2013)

Εξαιρετικά κρίσιμη ρευστή εξαγωγή (SFE)

Όταν ένα ρευστό υποβάλλεται σε θερμοκρασίες και πιέσεις πάνω από την κρίσιμη θερμοκρασία και πίεσή του, γίνεται ένα εξαιρετικά κρίσιμο ρευστό. Η εξαιρετικά κρίσιμη ρευστή εξαγωγή (SFE) είναι η διαδικασία για την εξαγωγή του λαδιού από τα υλικά που περιέχουν λάδι και κατά την οποία χρησιμοποιείται ένα εξαιρετικά κρίσιμο ρευστό ως διαλύτης εξαγωγής. Το πλεονέκτημα των εξαιρετικά κρίσιμων ρευστών που χρησιμοποιούνται στην εξαγωγή λαδιού είναι η αυξανόμενη διαλυτική τους ικανότητα. Οι παράγοντες για να εξεταστεί η επιλογή ενός διαλύτη SFE εξετάζουν εάν ο διαλύτης είναι άφλεκτος, μη τοξικός, έχει χαμηλές κρίσιμες ιδιότητες, καλές solvating ιδιότητες, είναι εύκολο να διαχωριστούν από το προϊόν, και είναι φιλικό προς το περιβάλλον και ανέξοδοι. Τα επιπλέον πλεονεκτήματα SFE πέρα από τη συμβατική διαλυτική εξαγωγή είναι ότι παρέχει απλό και ευέλικτο έλεγχο της θερμοκρασίας, των συντομότερων χρόνων εξαγωγής, του χαμηλότερου κόστους, και του απαλλαγμένου από τον διαλύτη προϊόντος. (Bux, 2013)

2.4. BIONTIZEΛ

2.4.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟ BIONTIZEΛ

Τα τελευταία χρόνια γίνονται σοβαρές προσπάθειες να βρεθούν εναλλακτικά καύσιμα από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, που θα μπορέσουν να αντικαταστήσουν με επιτυχία τα ορυκτά καύσιμα. Οι σοβαρότερες προσπάθειες αφορούν τους μεθυλεστέρες φυτικών ελαίων, ως υποκατάστατο του ντίζελ καθώς και τις αλκοόλες, μεθανόλη και αιθανόλη για την βενζίνη.

Τα φυτικά έλαια είναι ανανεώσιμα καύσιμα. Πρόσφατα έχουν γίνει ελκυστικότερα λόγω των περιβαλλοντικών οφελών τους και του γεγονότος ότι προέρχονται από ανανεώσιμους πόρους. Είναι μια ανανεώσιμη και ενδεχομένως ανεξάντλητη πηγή ενέργειας, με ενεργειακό περιεχόμενο όμοιο με αυτό του συμβατικού ντίζελ, ορυκτής προέλευσης.

Το βιοντίζελ, το οποίο προέρχεται από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας (βιομάζα), όπως είναι τα φυτικά έλαια και τα ζωικά λίπη, χρησιμοποιείται ευρύτατα σε όλη την Ευρώπη, ενώ στις ΗΠΑ η χρήση του είναι συνεχώς αυξανόμενη. Μάλιστα, θεωρείται ως το πλέον διαδεδομένο βιοκαύσιμο, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο αυτούσιο όσο και σε διάφορες αναλογίες σε μείγματα με το συμβατικό ντίζελ.

Το βιοντίζελ αποτελεί τον μονοαλκυλικό εστέρα μίας μακράς αλυσίδας λιπαρών οξέων τα οποία προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές όπως έλαια φυτικών και ζωικών οργανισμών. Για την παραγωγή βιοντίζελ μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι ελαιούχοι σπόροι, χρησιμοποιημένα φυτικά έλαια και ζωικά λίπη. Σήμερα το βιοντίζελ πρώτης γενιάς παράγεται κυρίως από ελαιούχους σπόρους καλλιεργειών όπως η ελαιοκράμβη, η σόγια και ο ηλίανθος, από δένδρα όπως ο φοίνικας και η καρύδα και από θάμνους όπως η *Jatropha curcas*. Η εξαγωγή του ελαίου από τους σπόρους γίνεται μηχανικά ή χημικά. Το εν λόγω βιοκαύσιμο συντίθεται από μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (Fatty Acid Methyl Esters – FAMES), οι οποίοι προέρχονται από την μετεστεροποίηση των τριγλυκεριδίων, που εξάγονται από τους φυτικούς οργανισμούς, με μεθανόλη, κυρίως, ή με ορισμένες άλλες

αλκοόλες. Το παραγόμενο καύσιμο έχει χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά του συμβατικού ντίζελ, πετρελαϊκής προέλευσης.

Τα κύρια πλεονεκτήματα του βιοντίζελ είναι η ανανεωσιμότητα του καυσίμου, η απουσία τοξικότητας και η βιοαποικοδομησιμότητα του. Οι συνήθεις πηγές για την παραγωγή βιοντίζελ αποτελούνται από φυτικούς οργανισμούς (σόγια, φοινικέλαιο, καλαμπόκι, ελαιοκράμβη κ.α.) και από μικροφύκη. Επίσης, μεγάλα πλεονεκτήματα του βιοντίζελ αποτελούν η δυνατότητα άμεσης χρήσης του στους υπάρχοντες κινητήρες, χωρίς περαιτέρω μετατροπές και η δυνατότητα ανάμιξης του με το πετρελαϊκό ντίζελ σε οποιαδήποτε αναλογία. Ακόμη, η λειτουργία των εν λόγω κινητήρων με βιοντίζελ έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή μικρότερων ποσοτήτων μονοξειδίου του άνθρακα (CO) και άκαυστων υδρογονανθράκων, λόγω ατελούς καύσης, καθώς και σωματιδίων και τοξικών αερίων στην ατμόσφαιρα. (Singh J and Gu S, 2010., Meher L, 2006., Gerpen J, 2005)

Το βιοντίζελ (μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων) είναι το πρώτο ανανεώσιμο καύσιμο, πλήρως συμβατό με το συμβατικό ντίζελ, παραγόμενο από τις εγχώριες ανανεώσιμες πηγές ενέργειας. Δεν περιέχει πετρέλαιο, αλλά μπορεί να αναμιχθεί με ντίζελ πετρελαϊκής προέλευσης, για να δημιουργήσει ένα μείγμα βιοντίζελ. Τα μείγματα βιοντίζελ συμβολίζονται ως, "BXX" με το "XX" να αντιπροσωπεύει το ποσοστό του βιοντίζελ που περιέχεται στο μίγμα (π.χ.: το B20 αντιστοιχεί σε 20% βιοντίζελ και 80% ντίζελ πετρελαίου). Διαθέτει ένα διαυγές πορτοκαλοκίτρινο χρώμα με ιξώδες παρόμοιο με εκείνο του απλού πετρελαίου. Είναι απλό στη χρήση, βιοαποικοδομήσιμο, μη τοξικό και απαλλαγμένο από θείο και αρωματικές ενώσεις. Το βιοντίζελ δεν συμβάλλει στην αύξηση των επιπέδων του άνθρακα στην ατμόσφαιρα και έτσι ελαχιστοποιείται η ένταση του φαινομένου του θερμοκηπίου.

Επιπλέον, προσφέρεται για ασφαλή χρήση σε όλους τους συμβατικούς κινητήρες ντίζελ, αποδίδοντας το ίδιο καλά ενώ ταυτόχρονα συμβάλλει στην μείωση των εκπομπών καύσης, τον ορατό καπνό καθώς και τις επιβλαβείς αναθυμιάσεις και οσμές (Bozbas, 2005)

Το πιο διαδεδομένο βιοντίζελ στην Ευρώπη παράγεται από κραμβέλαιο και ονομάζεται RME (Rapeseed Methyl Ester) ντίζελ, ενώ στις Η.Π.Α. κυριαρχεί το βιοντίζελ που παράγεται από σογιέλαιο. Η ονομασία που χρησιμοποιείται για το βιοντίζελ ανεξάρτητα από την πηγή προέλευσης του είναι FAME (Fatty Acid Methyl Ester).

2.4.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ

Η παραγωγή βιοντίζελ πραγματοποιείται με τη διαδικασία της αλκοόλυσης (μετεστεροποίηση), σε μια διαδικασία όπου τα τριγλυκερίδια (TGs) αντιδρούν με μεθανόλη (αλκοόλη μικρού βάρους) προς σχηματισμό μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (δηλαδή βιοντίζελ και γλυκερόλη) αλλά και της εστεροποίησης των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFAs). Μεταξύ των αλκοολών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην διαδικασία της μετεστεροποίησης είναι η μεθανόλη, η αιθανόλη, η προπανόλη, η βουτανόλη και η αμυλική αλκοόλη. Η μεθανόλη και η αιθανόλη χρησιμοποιούνται πιο συχνά και ιδιαίτερα η μεθανόλη εξαιτίας του χαμηλού κόστους και των φυσικών και χημικών της πλεονεκτημάτων (είναι πολική και έχει μικρότερη αλκοολική αλυσίδα). Η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με τη χημική μέθοδο (κατάλυση από βάσεις-οξέα) είτε με την ενζυμική μέθοδο (κατάλυση με λιπάση) τόσο σε χαμηλές όσο και σε υψηλές θερμοκρασίες.

2.4.3. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ – ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΝΤΙΖΕΛ ΟΡΥΚΤΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

Οι φυσικές και οι χημικές ιδιότητες του βιοντίζελ καθορίζονται από τη σύνθεση του και μπορούν να ποικίλουν σημαντικά ανάλογα με τις πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή του. Είναι υγρό, το οποίο είναι αρκετά παρόμοιο με το ορυκτό ντίζελ στα κύρια χαρακτηριστικά του, όπως στον αριθμό κετανίου, στο ενεργειακό περιεχόμενο, στο ιξώδες και στις αλλαγές φάσης.

Βασικά χαρακτηριστικά του βιοντίζελ σε σύγκριση με το ντίζελ:

- Τα περισσότερα καύσιμα βιοντίζελ έχουν εξαιρετικό αριθμό κετανίου, καθώς αποτελούνται κυρίως από ευθείες αλυσίδες εστέρων.
- Το βιοντίζελ είναι μη εύφλεκτο σε αντίθεση με το ντίζελ, καθώς και μη εκρηκτικό αφού παρουσιάζει σημείο ανάφλεξης στους 423K σε σύγκριση με τους 337K για το ντίζελ. Το σημείο ανάφλεξης είναι η χαμηλότερη θερμοκρασία στην οποία αναφλέγονται οι ατμοί του καυσίμου με προσαγωγή, όταν αυτό θερμαίνεται κάτω από πρότυπες συνθήκες, αποτελεί μία προδιαγραφή ασφάλειας για τις συνθήκες αποθήκευσης και μεταφοράς, καθώς και την πρώτη ένδειξη μόλυνσης με ελαφρύτερα συστατικά.
- Το ιξώδες του είναι παρόμοιο με αυτό του ορικτού ντίζελ.
- Σε αντίθεση με το ορυκτό ντίζελ είναι βιοδιασπώμενο, μη τοξικό και μειώνει σημαντικά τις τοξικές και άλλες εκπομπές όταν καίγεται σαν καύσιμο.
- Η ανώτερη θερμογόνο δύναμη του βιοντίζελ (39-41MJ/Kg) είναι ελαφρώς χαμηλότερη από εκείνη της βενζίνης (46MJ/Kg) ή του πετρελαίου (42MJ/Kg), αλλά υψηλότερη από εκείνη του άνθρακα (32-37MJ/Kg).
- Οι μεθυλεστέρες του βιοντίζελ βελτιώνουν τις ιδιότητες λίπανσης του καυσίμου μίγματος ντίζελ. Το βιοντίζελ είναι ένα καλό λιπαντικό (περίπου 66% καλύτερο από το ντίζελ).
- Λόγω της σημαντικής περιεκτικότητάς του σε οξυγόνο (τυπικά 11%) το βιοντίζελ έχει χαμηλότερο περιεχόμενο σε άνθρακα και υδρογόνο σε σύγκριση με το ντίζελ, με αποτέλεσμα περίπου 10% χαμηλότερη ενεργειακή περιεκτικότητα ανά μονάδα μάζας. Ωστόσο λόγω της υψηλότερης πυκνότητας του βιοντίζελ, το ογκομετρικό του ενεργειακό περιεχόμενο είναι μόνο 5-6% περίπου χαμηλότερο από το πετρέλαιο ντίζελ.
- Τυπικά το βιοντίζελ έχει κάπως υψηλότερο μοριακό βάρος το οποίο αντικατοπτρίζεται στις ελαφρώς υψηλότερες θερμοκρασίες απόσταξης.
- Ακόμη, αν και δεν περιέχει προϊόντα ορυκτών πόρων, είναι συμβατό με τα συμβατικά ντίζελ και μπορεί να αναμειχθεί σε οποιαδήποτε αναλογία με τα ορυκτά ντίζελ και να δημιουργήσουν ένα σταθερό μίγμα βιοντίζελ. Ως εκ

τούτου το βιοντίζελ έχει γίνει ένα από τα πιο κοινά βιοκαύσιμα στον κόσμο.
(Balat M et al 2010, Yusuf N.N.A.N et al 2011, Hoekmana K. Et al 2012)

Στον πίνακα 2.1 παρουσιάζονται οι ιδιότητες των καυσίμων Ντίζελ και Βιοντίζελ.

Ιδιότητες Καυσίμου	Ντίζελ	Βιοντίζελ
Στάνταρ	ASTM D975	ASTM PS 121
Σύνθεση Καυσίμου	C10-C21 MC	C12-C22 FAME
Ελάχιστη Θερμαντική Αξία(Btu/gal)	131,295	117,093
Κινηματικό Ιξώδες σε 40°C	1,3-4,1	1,9-6,0
Ειδικό Βάρος σε 60°F(Kg/L)	0,85	0,88
Πυκνότητα σε 15°C(lb/gal)	7,079	7,328
Νερό(ppm .β.)	161	0,5% max
Άνθρακας % κ.β.	87	77
Υδρογόνο % κ.β.	13	12
Οξυγόνο % κ.β.	0	11
Θείο % κ.β.	0,05 max	0,0-0,00024
Σημείο ζέσης (°C)	188-343	182-338
Σημείο ανάφλεξης (°C)	60-80	100-170
Σημείο θόλωσης (°C)	-15 έως 5	-3 έως 12
Αριθμός Κετανίου	40 - 55	48 - 65
Στοιχειομετρική αναλογία αέρα/καυσίμου κ.β.	15	13,8

Πίνακας 2.1. Επιλεγμένες ιδιότητες για το ντίζελ και το βιοντίζελ (*Biodiesel Handling and Use Guidelines*, K. Shaine Tyson, National Renewable Laboratory, September 2001)

Πλεονεκτήματα

Το βιοντίζελ είναι ένα καύσιμο που χαρακτηρίζεται από την μικρή του περιεκτικότητα σε θείο και αρωματικά αλλά και το μικρό σημείο ανάφλεξης (423K) συγκρινόμενο με αυτό του απλού πετρελαίου (337K). Είναι επίσης μη τοξικό και εκρηκτικό και διαθέτει μεγάλο αριθμό κετανίου (CN) με αποτέλεσμα να έχει μικρή καθυστέρηση ανάφλεξης. Το βιοντίζελ είναι ένα προϊόν προερχόμενο κυρίως από καλλιέργειες φυτών και περιέχει οξυγόνο στα μόριά του (11% κατά βάρος) με

αποτέλεσμα να βελτιώνει τη διαδικασία καύσης και να μειώνει το δυναμικό οξειδωσής του. Η χρήση του σαν καύσιμο μειώνει αισθητά την εκπομπή καυσαερίων CO₂, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να αυξήσει κάποια άλλα. Είναι γενικά ασφαλές στη χρήση του και στους κινητήρες πετρελαίου και δίνει ίδια απόδοση και αντοχή στον κινητήρα. Οι ιδιότητες λίπανσης του είναι τις περισσότερες φορές καλύτερες αν όχι ίδιες με εκείνων των ορυκτών πετρελαίων. Τέλος, είναι ικανό να παρατείνει τη διάρκεια ζωής του κινητήρα ενώ παράλληλα μειώνει την ανάγκη του για συντήρηση (Demirbas 2008; Bozbas 2005).

Μειονεκτήματα

Η άμεση χρήση φυτικών ελαίων ή και μιγμάτων ελαίων θεωρείται μη ικανοποιητική και πρακτική. Εκτός αυτού, το βιοντίζελ είναι πιο ακριβό κατά την διάρκεια της παραγωγής του σε σχέση με το απλό πετρέλαιο. Το υψηλό του ιξώδες, η όξινη σύνθεσή του, η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFAs) καθώς και ο σχηματισμός κομμιωδών ουσιών που οφείλονται στην οξείδωση και τον πολυμερισμό κατά την αποθήκευση και την καύση, αλλά και οι αποθέσεις άνθρακα είναι προφανή προβλήματα. Διαθέτει επίσης υψηλό σημείο νέφους (CP), σημείο ροής (PP) καθώς και οξείδια αζώτου (NO_x). Μερικά ακόμη από τα βασικά μειονεκτήματα είναι ότι μπορεί εύκολα να ψυχθεί σε κρύο καιρό, έχει μειωμένη ενεργειακή πυκνότητα και προκαλείται υποβάθμιση του καυσίμου εάν αποθηκευτεί για παρατεταμένη περίοδο. Τέλος η τιμή του παραμένει υψηλότερη σε σχέση με αυτή των ορυκτών καυσίμων (Demirbas 2008; Bozbas 2005).

2.4.4. ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ

Οι προδιαγραφές για το βιοντίζελ έχουν ως στόχο την ομαλή λειτουργία του κινητήρα, δηλαδή την αποφυγή της φθοράς αυτού από το καύσιμο, καθώς και την απαιτούμενη απόδοση του καυσίμου. (Meher L 2006)

Πρώτον, πρέπει να ελέγχεται το ιξώδες του τελικού προϊόντος, αφού των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (FAMES) μπορεί να φτάσει σε υψηλά επίπεδα. Οπότε το ιξώδες του βιοντίζελ πρέπει να βρίσκεται στην περιοχή των προδιαγραφών για το πετρελαϊκό ντίζελ. Δεύτερον, η θερμοκρασία έναρξης καύσης του βιοντίζελ πρέπει να είναι υψηλότερη εκείνης του συμβατικού ντίζελ για την διασφάλιση της ασφαλούς μεταφοράς του πρώτου. Η τρίτη προδιαγραφή αναφέρεται στο Cold Filter Plugging Point (CFPP), το οποίο αποτελεί έναν δείκτη συμπεριφοράς του καυσίμου σε χαμηλές θερμοκρασίες λειτουργίας και χρησιμοποιείται για την διασφάλιση της ομαλής ροής του καυσίμου υπό αυτές τις συνθήκες. Η επόμενη προδιαγραφή αφορά στον αριθμό κετανίου, ο οποίος συνδέεται με τα χαρακτηριστικά ανάφλεξης του καυσίμου και είναι ανάλογος της ποιότητας των χαρακτηριστικών αυτών. Το βιοντίζελ έχει μεγαλύτερο αριθμό κετανίου από το πετρελαϊκό ντίζελ, οπότε και καλύτερη απόδοση στην καύση. Ο αριθμός εξουδετέρωσης (neutralization number) του καυσίμου αποτελεί άλλη μία προδιαγραφή με την οποία οφείλει να συμμορφώνεται το παραγόμενο βιοντίζελ. Η ύπαρξη αυτής της προδιαγραφής διασφαλίζει την ομαλή γήρανση ή/και την ποιότητα της παραγωγικής διαδικασίας αυτού, διότι αντικατοπτρίζει την παρουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων (Free Fatty Acids – FFA) ή των οξέων που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή του βιοντίζελ και την αποδόμηση αυτού λόγω θερμικών φαινομένων. Άλλη μία προδιαγραφή αναφέρεται στο υπόλειμμα άνθρακα του καυσίμου που υποδεικνύει την τάση εναπόθεσης άνθρακα αυτού. Αυτή η προδιαγραφή είναι πιο σημαντική στο βιοντίζελ, συγκριτικά με το συμβατικό ντίζελ, διότι σχετίζεται άμεσα με την παρουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων, γλυκεριδίων, σαπώνων, πολυμερών, ακόρεστων λιπαρών οξέων και ανόργανων συστατικών. Τέλος, ο έλεγχος της παρουσίας των αλκοολών και των μονο-, δι- και τριγλυκεριδίων στο βιοντίζελ είναι απαραίτητος διότι υψηλά επίπεδα αυτών προκαλούν βλάβες στα μηχανικά μέρη του κινητήρα. (Meher L 2006)

Οι προδιαγραφές αυτές παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 2.2.

Φυσική Ιδιότητα	Βιοντίζελ
Χημική Ονομασία	Μεθυλεστέρας (ή Αιθυλεστέρας) Λιπαρών Οξέων
Εύρος Χημικών Τύπων	$C_{14}-C_{24}$ Μεθυλεστέρες ή $C_{15-25}H_{28-48}O_2$
Εύρος Κινηματικών Ιξώδων	3,3-5,2
Εύρος Σημείων Ζέσεως (K)	860-894
Εύρος Σημείου Ανάφλεξης (K)	>457
Εύρος Θερμοκρασιών Απόσταξης (K)	420-600
Τάση Ατμών	470-600
Διαλυτότητα σε νερό	<5
Φυσική Εμφάνιση	Κίτρινο Καθαρό Υγρό
Βιοαποικοδομησιμότητα	Μεγαλύτερη του Πετρελαϊκού Ντίζελ
Δραστικότητα	Σταθερή

Πίνακας 2.2. Φυσικές ιδιότητες του βιοντίζελ Πηγή: Yusuif. 2011.

2.4.5. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ

Παρότι, με μία πρώτη ματιά, τα μικροφύκη δεν παρουσιάζουν ουσιαστικές διαφορές από άλλες κατηγορίες πρώτων υλών για την παραγωγή βιοντίζελ, αποτελούν μικροοργανισμούς που ζουν, κυρίως, σε υδατικά περιβάλλοντα και με κατάλληλη καλλιέργεια, συλλογή και επεξεργασία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποδοτική παραγωγή βιοντίζελ. Οι υπάρχουσες διεργασίες για την παραγωγή βιοντίζελ από μικροφύκη περιλαμβάνουν μία μονάδα παραγωγής στην οποία αναπτύσσονται τα κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια συλλέγονται από το μέσο της ανάπτυξης και τέλος εξάγονται τα λιπίδια από τα κύτταρα αυτά και με μία συγκεκριμένη διαδικασία παράγεται το βιοντίζελ. (Mata T.M. et al 2010)

Πλεονεκτήματα της χρήσης μικροφυκών για την παραγωγή βιοντίζελ

Πληθώρα αναφορών και ερευνών προτείνουν τη χρήση μικροφυκών για την παραγωγή βιοντίζελ. Αυτό συμβαίνει διότι κατά τη χρήση τους παρουσιάζονται

ορισμένα πλεονεκτήματα. Από μία πρακτική σκοπιά, είναι εύκολο να καλλιεργηθούν σε μεγάλες εκτάσεις, χωρίς την ανάγκη συνεχούς παρακολούθησης, χρησιμοποιώντας νερό το οποίο κρίνεται ακατάλληλο για κατανάλωση από τον άνθρωπο καθώς επίσης και χρήσης θρεπτικών συστατικών από βιομηχανική δραστηριότητα (CO₂) (Mata T.M. et al 2010, Douskova I et al 2009)

Η βιόμαζα των μικροφυκών μπορεί να χρησιμοποιηθεί ολόκληρη για την παραγωγή προϊόντων, επειδή δεν δημιουργούνται παραπροϊόντα κατά την ανάπτυξη τους τα οποία πρέπει να απομακρυνθούν για την περαιτέρω επεξεργασία των μικροφυκών, όπως κοτσάνια και φλοιοί. Άλλο ένα πλεονέκτημα της καλλιέργειας μικροφυκών είναι ότι αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί σε εκτάσεις εδάφους οι οποίες είναι άγονες οπότε δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αγροτικές καλλιέργειες και παραγωγή τροφίμων. Οπότε, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες ανταγωνιστικές πηγές για την παραγωγή βιοντίζελ, τα μικροφύκη, δεν αποτελούν ανταγωνιστές των εκτάσεων καλλιέργειας των τροφίμων, αποφεύγοντας με αυτόν τον τρόπο το δίλημμα: τρόφιμα ή καύσιμα. (Douskova I et al 2009, Chen Y.-H. et al 2012)

3. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

3.1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο στόχος αυτής της εργασίας ήταν η βελτιστοποίηση ανάπτυξης και του διαχωρισμού μικροφυκών από το επιλεγμένο στέλεχος *Stichococcus* *sp.* στον φωτο-βιοαντιδραστήρα που κατασκευάστηκε κάτω από διαφορετικές συνθήκες λειτουργίας με στόχο την εύρεση των καλύτερων συνθηκών και υλικών για την μεγιστοποίηση ανάπτυξης των μικροφυκών και τη εύκολη συλλογή – εξαγωγή τους σε μορφή βιοφίλμ. Επιπλέον, στόχο αποτέλεσε η μεγιστοποίηση της παραγωγής και του διαχωρισμού των λιπιδίων. Τέλος στα πλαίσια της εργασίας επιχειρήθηκε η εργαστηριακή παραγωγή βιοντίζελ από λιπίδια που παρήχθησαν και απομονώθηκαν στο εργαστήριο.

Με την εξέταση αυτών των συνθηκών εκτιμάται ότι θα εξασφαλιστεί αποτελεσματικότερος έλεγχος και επίτευξη των στόχων του έργου για παραγωγή βιοκαυσίμων αλλά και βιοχημικών προϊόντων υψηλής αξίας (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, χρωστικές, κλπ.).

Ο στόχος του πειράματος ήταν να αναπτυχθούν τα επιλεγμένα στελέχη σε διαφορετικές συνθήκες σε βιοαντιδραστήρες μεγαλύτερης κλίμας, με στόχο την μελέτη κυρίως της παραγωγής βιομάζας μικροφυκών, και της μετέπειτα εξέτασης των λιπιδίων και πιθανής παραγωγής βιοντίζελ και τον εντοπισμό πιθανών συνθηκών για τη μελλοντική βελτιστοποίηση τους σε πιλοτικής κλίμακας εγκαταστάσεις.

3.2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Στα πλαίσια της εργασίας πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω αυτοτελή πειράματα:

α) Ανάπτυξη του στελέχους *Stichococcus* sp. υπό την παρουσία 3 διαφορετικών τύπων σταθερών επιφανειών για την εξέταση της παραγωγής ακινητοποιημένης βιομάζας (σε μορφή βιοφίλμ) με χημικά καθορισμένο θρεπτικό μέσο (συνθετικό απόβλητο), εφαρμογή επανακυκλοφορίας ή όχι του συνθετικού αποβλήτου στον φωτο-βιοαντιδραστήρα, εξέταση επιρροής πενίας αζώτου (nutrient starvation), διαφοροποίηση του όγκου εντός του φωτο-βιοαντιδραστήρα σε στατικές συνθήκες και με επανακυκλοφορία.

β) Σύγκριση και επιλογή βέλτιστων συνθηκών λειτουργίας από όλα τα πειράματα για παραγωγή βιομάζας από το στέλεχος *Stichococcus* sp. στον φωτο-βιοαντιδραστήρα και εξαγωγή λιπιδίων με σκοπό την παραγωγή βιοντίζελ.

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. ΥΛΙΚΑ

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων για την παραγωγή βιομάζας ήταν:

- Θαλασσινό δείγμα από Παραλία Αγίου Ονούφριου και στη συνέχεια αποστείρωσή του
- Υλικά επιφανειών:
 - Γυαλί με αμμοβολή
 - Κεραμικό πλακάκι επίπεδης –σαγρέ επιφάνειας
 - Πλαστικό Πολυαιθυλένιο HD (χαραγμένο σε σαγρέ επιφάνεια)
- Πλέξιγκλας
- Ξύλο (κόντρα πλακέ θαλάσσης)

- Ζυγαριά: Scaltec SPB42
- Falcon tubes (για τα δείγματα και για την φυγοκέντρωση)
- Φυγοκέντρωση: Heraeus 'Megafuge 1.0' Centrifuge
- Καταψύκτης: whirlpool
- Φούρνος: Memmert 'UL50' Lab Oven
- Αντλία: ADTEC Chemicals LP
- Φιλτράκια: Whatman glass microfiber filters, Grade 934 0,45μm - 47mm
- Σπάτουλα Σιλικόνης
- Χρονοδιακόπτης: Αναλογικός 24h TG-14
- Πλαστικά Μπιτόνια 20L
- Αλουμινόχαρτο
- Καροτσάκι για μεταφορά των δειγμάτων θαλασσινού νερού

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων για την εξαγωγή λιπιδίων ήταν:

- Χλωροφόρμιο
- Μεθανόλη
- Φίλτρα διήθησης 0,45 μm
- Σφαιρικές φυάλες

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων για την παραγωγή βιοντίζελ ήταν:

- Θερμενόμενος αναδευτήρας VELP, μοντέλο AREX
- Γυάλινος ψυκτήρας συνδεδεμένος σε παροχή νερού
- Διαχωριστική χοάνη
- Εξατμιστήρας (evaporator) Heidolph, μοντέλο Laborota 4011 Digital

4.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

Ανάπτυξη και συνθήκες επώασης του στελέχους

Τα πειράματα έλαβαν χώρα σε φωτο-βιοαντιδραστήρα ο οποίος σχεδιάστηκε και κατασκευάστηκε στο εργαστήριο στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος Microalgae-Bioproductions 2013-2015, από τους ερευνητές Στέλιο Φοδελιανάκη και Χαρίδημο Μάρακα για το στέλεχος μικροφυκών *Stichococcus* sp. που έχει την ικανότητα να δημιουργεί συσσωματώματα, για την βελτιστοποίηση παραγωγής βιομάζας και λιπιδίων από το επιλεγμένο στέλεχος *Stichococcus* sp.

Ο φωτο-βιοαντιδραστήρας έχει διαστάσεις 30x50cm με συνολική επιφάνεια 1500cm² κατασκευασμένος από Plexiglas και τα τμήματα κολλήθηκαν με κυανοακρυλική κόλλα υψηλής αντοχής και μονώθηκε σε όλα τα τμήματα με μη τοξική σιλικόνη για αποφυγή επαφής του συνθετικού μέσου με την επιφάνεια της κόλλας και για καλύτερη υδατομόνωση.

Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν αποστειρωμένο θαλασσινό νερό με προσθήκη θρεπτικών αλάτων. Το θαλασσινό νερό τοποθετήθηκε σε κλειστά γυάλινα δοχεία και η αποστήρωσή του πραγματοποιήθηκε μετά την τοποθέτησή τους σε κλίβανο αποστήρωσης. Συγκεκριμένα σε 12 λίτρα θαλασσινού νερού προστέθηκε 760,8mg NaNO₃, 733,2mg (NH₄)₂SO₄ και 136,8mg KH₂PO₄ και κάθε φορά προσθέταμε σταθερή συγκέντρωση από το στέλεχος *Stichococcus* sp. 1:100 (από το την καλλιέργεια Rich Medium) στους διάφορους όγκους που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα. Στα 12 λίτρα δηλαδή προσθέταμε 120ml από την καλλιέργεια του στελέχους μικροφυκών καθαρής ξηρής βιομάζας 7mg.

Αρχικά εξετάστηκε η παραγωγή βιομάζας μετά από 24 μέρες μέσα στον φωτο-βιοαντιδραστήρα με χρήση ανακυκλοφορίας 0,5L/h ή 12L/d που γινόταν από ρυθμιζόμενη περισταλτική αντλία και συνολικό όγκο νερού ανακυκλοφορίας 12 L, ενώ ο όγκος οποίος παρέμενε εντός του φωτο-βιοαντιδραστήρα ήταν σταθερός στα 6 L. Οι επιφάνειες που εξετάστηκαν ήταν γυαλί αμβροβολής, κεραμικό πλακάκι με επίπεδη σαγρέ επιφάνεια και πλαστικό πολυαιθυλένιο HD, το οποίο χαράχθηκε στο εργαστήριο με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε η αρχικά λεία επιφάνειά του να μετατραπεί σε σαγρέ επιφάνεια. Επίσης έγινε πείραμα με τις ίδιες συνθήκες και εφαρμογή

πενίας αζώτου (Nutrien Starvation) για 2 μέρες μετά το πέρας των πρώτων 24 μερών του πειράματος.

Εξετάστηκε η παραγωγή βιομάζας σε πειράματα χωρίς ανακυκλοφορία με σταθερό όγκο εντός του φωτο-βιοαντιδραστήρα σε 6 και 3 L (με ύψος νερού από τις επιφάνειες (4 και 2 cm αντίστοιχα) και σε λιγότερες μέρες εφαρμογής (18 αντί για 24). Επίσης εξετάστηκε η παραγωγή βιομάζας με ανακυκλοφορία στην ίδια παροχή (12L/d) αλλά μικρότερο όγκο εντός του φωτο-βιοαντιδραστήρα (3 L αντί για 6L), καθώς και ανακυκλοφορία σε λιγότερες μέρες (18 αντί για 24). Τα πειράματα που έλαβαν χώρα με διαφορετικές συνθήκες παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 4.1.

Συνθήκες	1 ^ο πείραμα	2 ^ο πείραμα	3 ^ο πείραμα	4 ^ο πείραμα	5 ^ο πείραμα	6 ^ο πείραμα
Νερό εντός Φωτοαντ/ρα (L)	6	6	3	6	6	6
Ανακυκλοφορία	Ναι	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι	Ναι
Ύψος Νερού από τις επιφάνειες (cm)	4	4	2	4	4	4
Ημέρες εφαρμογής(d)	24	24	24	24	18	18
Πενία Αζώτου	Όχι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι

Πίνακας 4.1. Συνθήκες Πειραμάτων εντός του Φωτο-αντιδραστήρα 1500 cm²

Στον φωτο-βιοαντιδραστήρα χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 4 λάμπες 18 Watt η καθεμία, με 2 εξ αυτών να είναι στα 3.500K (προσομοίωση θερμού φωτός - σούρουπο-απόγευμα) και οι άλλες 2 στα 6.500 (προσομοίωση ψυχρού φωτός - έντονης ηλιοφάνειας με συννεφιά) και τοποθετήθηκαν εναλλάξ και κατά μήκος του αντιδραστήρα. Ο κύκλος εφαρμογή φωτισμού ήταν 12h/d και συμβάδιζε με αυτόν του εξωτερικού φωτός ημέρας ώστε να μην υπάρχει κάποια επιρροή από το

εξωτερικό περιβάλλον αν και ο αντιδραστήρας ήταν καλυμμένος και με αλουμινόχαρτο.

Η συλλογή βιομάζα από τις επιφάνειες ήταν εύκολα συλλέξιμη με ειδική ελαστική σπάτουλα μετά το τέλος των πειραμάτων και αφού απομακρυνόταν το νερό από τον φωτο-βιοαντιδραστήρα και γινόταν αφαίρεση των 3 επιφανειών. Η βιομάζα από την κάθε επιφάνεια συλλεγόταν σε σκεύη από αλουμίνιο και έπειτα μεταφερόταν σε φίλτρα διήθησης, στέγνωνε και ζυγιζόταν.

Από το νερό που απομακρυνόταν από τον φωτο-αντιδραστήρα, συλλεγόταν ένα μικρό δείγμα (περίπου 50ml), το οποίο διηθούταν και γινόταν μέτρηση της βιομάζας που περιείχε. Με αυτό τον τρόπο ήταν γνωστή η αιωρούμενη βιομάζα του δείγματος αυτού. Έπειτα υπολογιζόταν αναλογικά η συνολική αιωρούμενη βιομάζα του φωτο-αντιδραστήρα, εφόσον ήταν γνωστος ο όγκος του συνολικού διαλύματος (12 L ή 6 L) (με μέθοδο των τριών).

Το δεύτερο μέρος του πειράματος περιελάμβανε την διαδικασία εξαγωγής των λιπιδίων από την συλλεγμένη βιομάζα μικροφυκών. Αρχικά πραγματοποιήθηκε διήθηση της βιομάζας με σκοπό την ξήρανσή της, απομακρύνοντας το νερό. Στη συνέχεια, η ξηρή βιομάζα μαζί με το φίλτρο τοποθετήθηκε σε κωνική φυάλη σε αναλογία 2:1, χλωροφόρμιο:μεθανόλη (v/v) και με χειρονακτική σθεναρή ανακίνηση της φυάλης για μερικά δευτερόλεπτα, η βιομάζα διασκορπίστηκε στο σύστημα που περιείχε τον διαλύτη (διαδικασία Single-Step).

Το διάλυμα διηθήθηκε για να γίνει απομάκρυνση των μη διαλυτών στοιχείων στο σύστημα χλωροφορμίου-μεθανόλης (όπως της κυτταρικής μεμβράνης, της κυτταρίνης από τα διαλυμένα φύλτρα κτλ).

Στη συνέχεια ο διαλύτης απομακρύνθηκε με την χρήση περιστροφικού εξατμηστήρα για να ανακτηθεί το ξερό υπόλειμμα από την διαδικασία εκχείλησης. (Το ξερό υπόλειμμα αποτελείται από χλωροφύλλη, λιπίδια, πρωτεΐνες κτλ).

Η μεταφορά του ξηρού υπολλείμματος της εκχείλησης από την σφαιρική φυάλη έγινε με την χρήση του ίδιου διαλύτη και ξήρανση κάτω από ρεύμα αζώτου πάνω σε θερμαντική πλάκα.

Επιπλέον σχεδιάστηκαν και κατασκευάστηκαν δύο ακόμα μεγαλύτερης κλίμακας φωτο-βιοαντιδραστήρας (40x150cm x 2) συνολικής επιφάνειας 12.000 cm² για την παραγωγή αυξημένης βιομάζας μικροφυκών. Οι αντιδραστήρες ήταν ξύλινοι από κόντρα πλακέ θαλάσσης και μονώθηκαν κατάλληλα (Χρησιμοποιώντας το μη τοξικό μονωτικό: Gomastic Aqua Protect Flex Liquid) ώστε να μην έρχεται σε επαφή το νερό με την ξύλινη επιφάνεια. Σαν επιφάνειες τοποθετήθηκαν αφαιρούμενα τμήματα από γυαλί αμμοβολής και συγκεκριμένα 4 παραλληλόγραμμα επιφάνειες γυαλιού διαστάσεων περίπου 40 x 37 cm. Για πηγή φωτός χρησιμοποιήθηκαν 4 φωτιστικά σώματα κλειστού τύπου με διπλές λάμπες το καθένα όπου η μία λάμπα ήταν 3000K και η άλλη 6000K συνδεδεμένα σε πολύπριζο με χρονοδιακόπτη για τη ρύθμιση της φωτο-περιόδου, σε λειτουργία χωρίς ανακυκλοφορία με συνολικό όγκο 30 L.

Τέλος έγινε μια προσπάθεια βασικής εστεροποίησης του δείγματος (ξηρής μάζας λιπιδίων). Στο συλλεγμένο δείγμα λιπιδίων προστέθηκε μεθανόλη 30:1 και KOH 1:100 στους 70° C και υποβλήθηκε σε ανάδευση. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε το δείγμα σε εξατμιστήρα (evaporator) με σκοπό την απομάκρυνση του διαλύτη, αλλά έμεινε μία ξηρή ποσότητα μάζας λιπιδίων και όχι λαδιού, η οποία δεν μπορεί να μετρηθεί στον αέριο χρωματογράφο (DC) έτσι ώστε να μετρηθεί το βιοντίζελ.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ *STICHOCOCCUS SP.*

Το πρώτο μέρος των πειράμάτων έλαβε χώρα στο φωτο-βιοαντιδραστήρα 1500cm² και πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών λειτουργίας για την παραγωγή ακινητοποιημένης βιομάζας σε μορφή biofilm από το στέλεχος *Stichococcus sp.* πάνω σε 3 διαφορετικές επιφάνειες (γυαλί με επιφάνεια αμμοβολής, επιφάνεια κεραμικού υλικού (πλακάκι με σαγρέ επίπεδη επιφάνεια

χωρίς σμάλτο), και πλαστική επιφάνεια (πολυαιθυλένιο high density) όπου ήταν σαγρέ και όχι λεία).

Σε όλα τα πειράματα που έγιναν, το γυαλί αμμοβολής παρουσίασε την καλύτερη απόδοση στη δημιουργία biofilm από το στέλεχος μικροφυκών, εκτός από το πρώτο πείραμα, όπου το κεραμικό υλικό είχε καλύτερη απόδοση. Για αυτό το λόγο κρίθηκε σκόπιμο το πείραμα να επαναληφθεί για την εξακρίβωση του αποτελέσματος και όπως θα φανεί παρακάτω, τελικά το γυαλί αμμοβολής είχε ελαφρά καλύτερη απόδοση στη δημιουργία biofilm. Το σφάλμα πιθανότατα οφείλεται σε αποκόλληση βιομάζας από το γυαλί κατά την αφαίρεση του πλακιδίου από τον αντιδραστήρα στο πρώτο μας πείραμα.

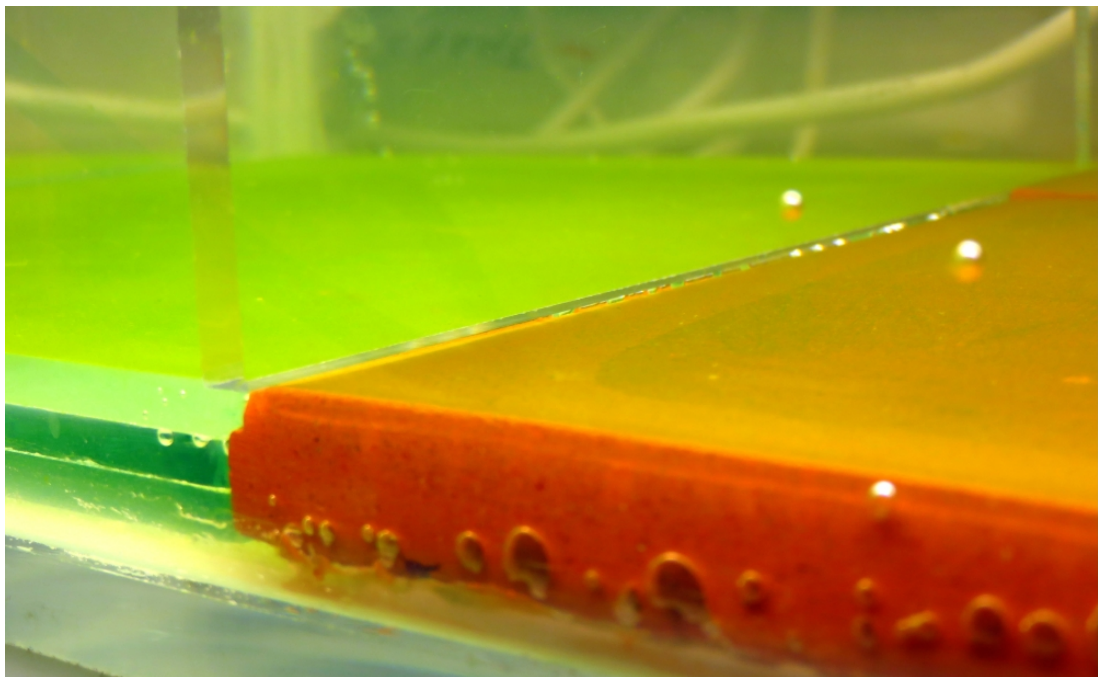
Στις εικόνες 5.1, 5.2 και 5.3 διακρίνεται η διαφορά στο χρώμα του συνθετικού αποβλήτου κατά την έναρξη των πειραμάτων και μετά από 20 μέρες όπου γίνεται ελαφρό πράσινο λόγω της αιωρούμενης βιομάζας του *Stichococcus* sp. αλλά και το βιοφίλμ που αναπτύχθηκε στις τρεις διαφορετικές επιφάνειες από την καλλιέργειας των μικροφυκών με χρήση ανακυκλοφορίας. Είναι και οπτικά εμφανές ότι στο γυαλί αμμοβολής η ακινητοποιημένη βιομάζα ήταν εντονότερη.



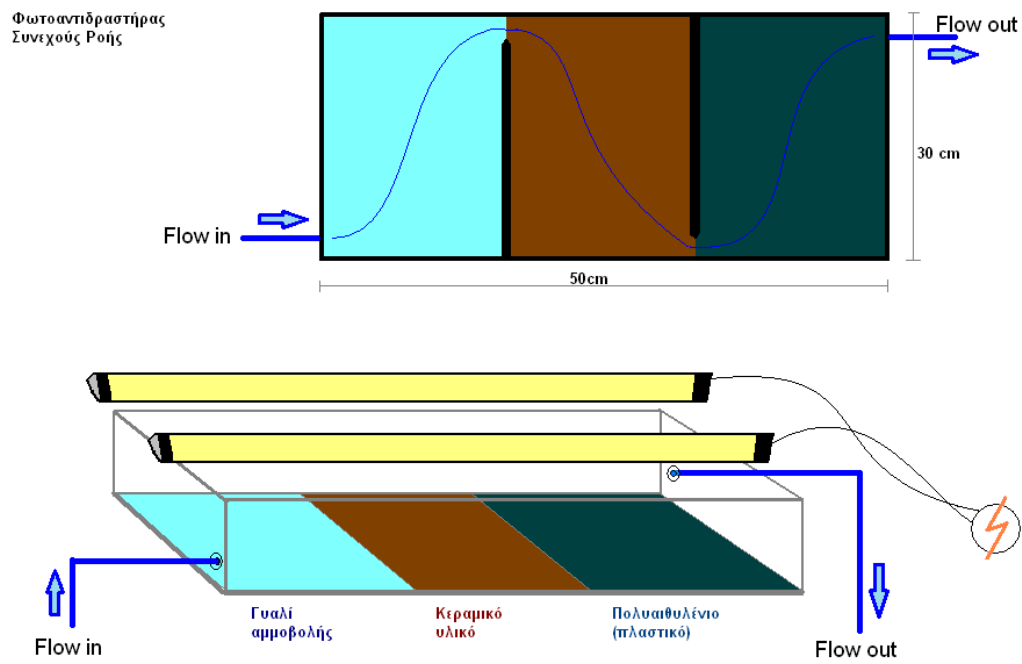
Εικόνα 5.1. Μπροστινή άποψη του Φωτο-βιοαντιδραστήρα κατά την έναρξη πειράματος καλλιέργειας μικροφυκών πάνω σε γυαλί αμμοβολής, κεραμικό υλικό και πολυαιθυλένιο



Εικόνα 5.2. Γενική άποψη του Φωτο-βιοαντιδραστήρα του πειράματος καλλιέργειας μικροφυκών με ανακυκλοφορία μετά το πέρας 20 ημερών



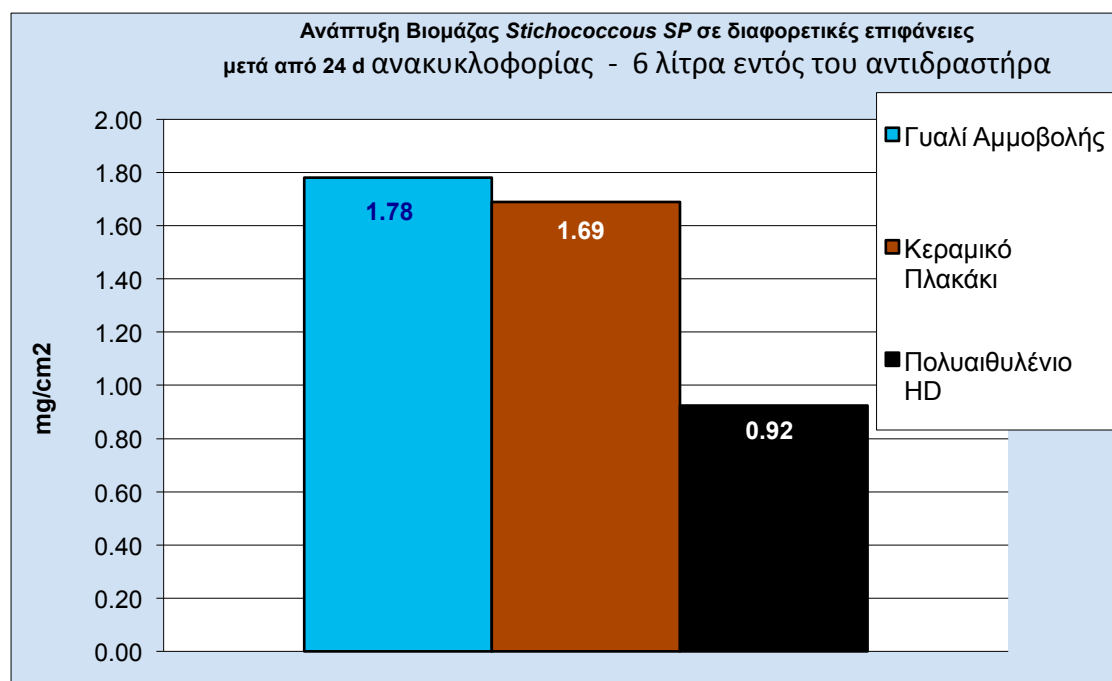
Εικόνα 5.3. Κοντινή άποψη από τις δύο επιφάνειες του Φωτο-βιοαντιδραστήρα που είχαν την καλύτερη απόδοση στην ανάπτυξη biofilm με λειτουργία ανακυκλοφορίας και μετά το πέρας 20 ημερών καλλιέργειας



Εικόνα 5.4. Σχεδιαστική διάταξη του φωτο-βιοαντιδραστήρα με λειτουργία συνεχούς ροής για την ανάπτυξη βιοομάζας μικροφυκών πάνω σε διαφορετικές επιφάνειες

5.2. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΣΤΟΝ ΦΩΤΟ-ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ ΑΚΙΝΗΤΟΠΙΗΜΕΝΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ, ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ 1500 cm²

Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η ανάπτυξη της ακινητοποιημένης βιομάζας από το στέλεχος *Stichococcus sp.* ανά τετραγωνικό εκατοστό επιφάνειας του κάθε υλικού (από το επαναληπτικό πείραμα που έγινε) έπειτα από 24 μέρες επώασης στον φωτο-βιοαντιδραστήρα με ανακυκλοφορία του συνθετικού αποβλήτου παροχής 12L/d και όγκου 6 λίτρα εντός του φωτο-βιοαντιδραστήρα. Η συνολική ακινητοποιημένη βιομάζα που εξάχθηκε ήταν 2,1 gr.

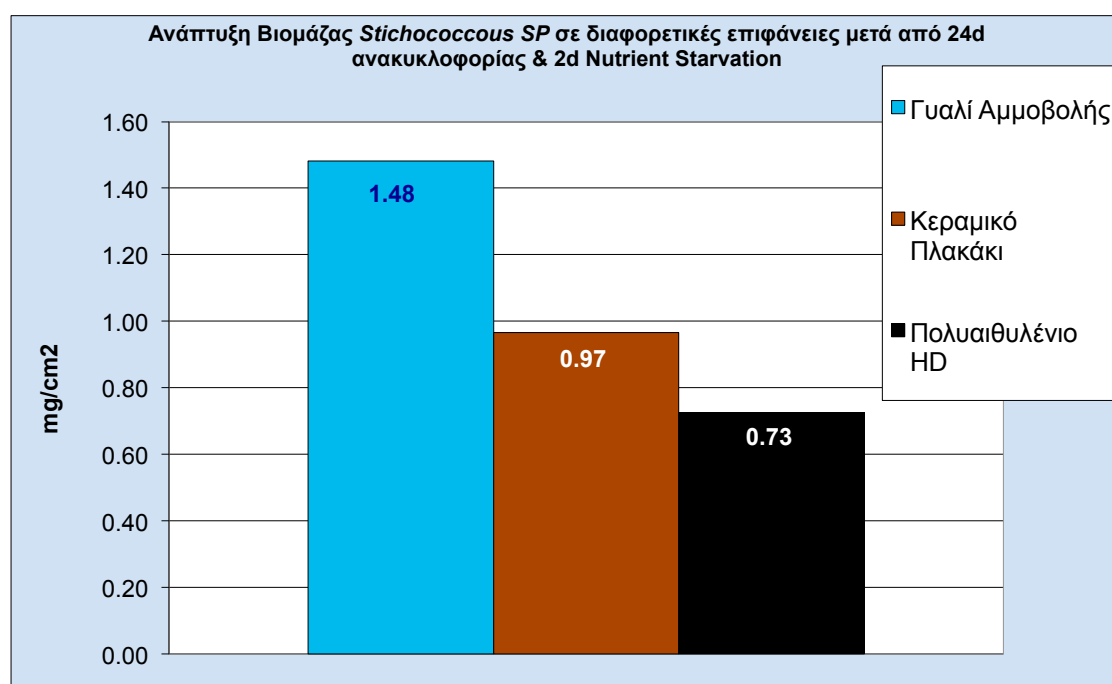


	Βιομάζα στην συνολική επιφάνεια του κάθε υλικού (mg)	Συνολική επιφάνεια ανάπτυξης (cm ²)
Γυαλί αμμοβολής	856,00	480,8
Κεραμικό πλακάκι	806,00	477,1
Πολυαιθυλένιο HD	453,00	490,4
Σύνολο	2115,00	
Αιωρούμενη Βιομάζα	430	Στα 12 L

Πίνακας 5.1. Αναλυτικά στοιχεία από τη συλλογή βιομάζας του 1ου πειράματος

Στο ακόλουθο πείραμα εξετάστηκε η επίδραση της πενίας αζώτου (nutrient starvation) στην παραγωγή biofilm, καθώς επίσης και η επίδραση στην παραγωγή λιπιδίων, όπου στις ίδιες ακριβώς συνθήκες πειράματος με πριν και έπειτα το πέρας των 24 μερών έγινε εφαρμογή διαλύματος nutrient starvation με ανακυκλοφορία για 2 επιπλέον μέρες και μέτρηση της βιομάζας. Το συγκεκριμένο πείραμα δεν είχε καλά αποτελέσματα όπως φαίνεται και στο ακόλουθο διάγραμμα, καθώς η αλλαγή των διαλυμάτων στον φωτο-βιοαντιδραστήρα προκάλεσε αυξημένη αιωρούμενη βιομάζα. Αρκετή ακινητοποιημένη βιομάζα (biofilm) και από τις 3 επιφάνειες αποκολλήθηκε και ήρθε στην επιφάνεια του διαλύματος σε μορφή συσσωματωμάτων και με την ανακυκλοφορία βρέθηκε στο δοχείο όπου γινόταν η τροφοδοσία όπου και παρέμεινε.

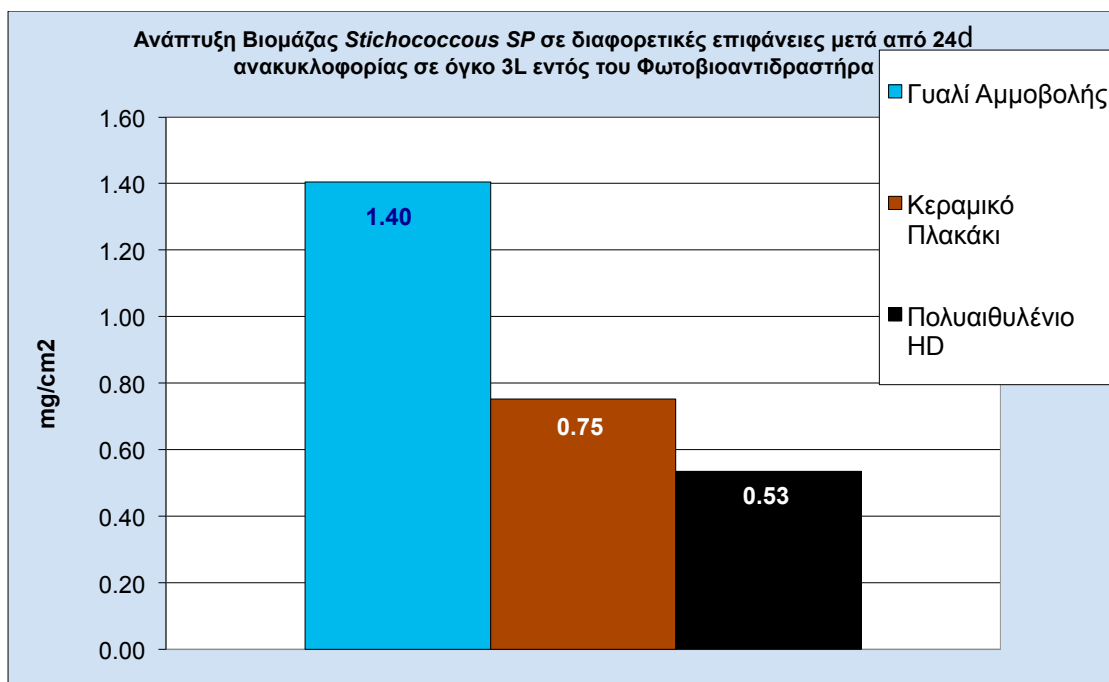
Αναλυτικά, ενώ στο πρώτο πείραμα η αιωρούμενη βιομάζα στο διάλυμα των 12 λίτρων ήταν κάτω από 500mg, στο πείραμα με την πενία αζώτου η αιωρούμενη βιομάζα έφτασε τα 1200mg. Το γυαλί αμμοβολής και εδώ είχε καλύτερα αποτελέσματα ($1,5\text{mg}/\text{cm}^2$) σε σχέση με τις άλλες 2 επιφάνειες που χρησιμοποιήθηκαν (1 και $0,7\text{ mg}/\text{cm}^2$ για το κεραμικό και το πολυαιθυλένιο αντίστοιχα). Η συνολική ακινητοποιημένη βιομάζα που εξάχθηκε ήταν 1,5gr σε αντίθεση με το πείραμα χωρίς nutrient starvation που ήταν αρκετά μεγαλύτερη, στα 2,1gr.



	Βιομάζα στην συνολική επιφάνεια του κάθε υλικού (mg)	Συνολική επιφάνεια ανάπτυξης (cm ²)
Γυαλί αμμοβολής	712,67	480,8
Κεραμικό πλακάκι	461,17	477,1
Πολυαιθυλένιο HD	356,00	490,4
Σύνολο	1529,84	
Αιωρούμενη Βιομάζα	1180	Στα 12 L

Πίνακας 5.2. Αναλυτικά στοιχεία από τη συλλογή βιομάζας του 2ου πειράματος

Στη συνέχεια εξετάστηκε αν ο μικρότερος όγκος εντός του φωτο-βιοαντιδραστήρα (3 L αντί για 6) παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη biofilm πάνω στις επιφάνειες και ποιά υπερτερεί. Αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκαν και πάλι 12 L συνθετικού αποβλήτου ίδιας σύνθεσης και συγκέντρωσης *Stichococcus sp.* με ανακυκλοφορία ίδιας παροχής με πριν με τη μόνη διαφορά μέσα στον αντιδραστήρα να βρίσκονται κάθε φορά 3 L από το διάλυμα. Το γυαλί αμμοβολής έδειξε την καλύτερη απόδοση (1,4mg/cm²) αν και χαμηλότερη σε σχέση με τα προηγούμενα πειράματα καθώς ήταν αναμενόμενο με τη συνολική ακινητοποιημένη βιομάζα που εξάχθηκε να είναι στα 1,3 gr



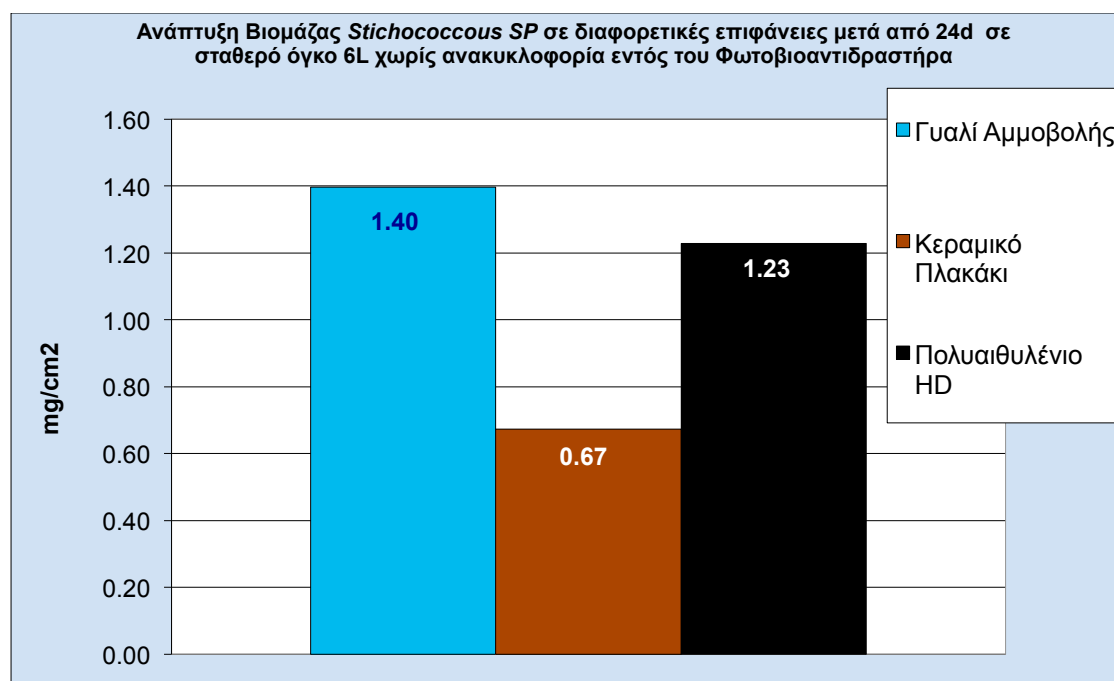
	Βιομάζα στην συνολική επιφάνεια του κάθε υλικού (mg)	Συνολική επιφάνεια ανάπτυξης (cm²)
Γυαλί αμμοβολής	675,30	480,8
Κεραμικό πλακάκι	358,70	477,1
Πολυαιθυλένιο HD	262,30	490,4
Σύνολο	1296,30	
Αιωρούμενη Βιομάζα	560	Στα 12 L

Πίνακας 5.3. Αναλυτικά στοιχεία από τη συλλογή βιομάζας του 3ου πειράματος

Στα επόμενα πειράματα εξετάστηκε η ανάπτυξη ακινητοποιημένης βιομάζας εντός του φωτο-βιοαντιδραστήρα στις 3 διαφορετικές επιφάνειες αλλά χωρίς επανακυκλοφορία. Συγκεκριμένα εξετάστηκε ο βαθμός ανάπτυξης biofilm σε σταθερό όγκο 6 L σε 24 και 18 μέρες. Στο πρώτο πείραμα χωρίς επανακυκλοφορία στις 24 μέρες παρατηρήθηκε τις τελευταίες μέρες του πειράματος αυξημένη αποκόλληση βιομάζας από τις 3 επιφάνειες και ειδικά στο κεραμικό πλακάκι. Για αυτό το λόγο το πείραμα έγινε ξανά στις ίδιες συνθήκες με καλλιέργεια για 18 μέρες όπου δεν παρατηρήθηκε αποκόλληση βιομάζας αλλά μόνο ελάχιστη στο κεραμικό

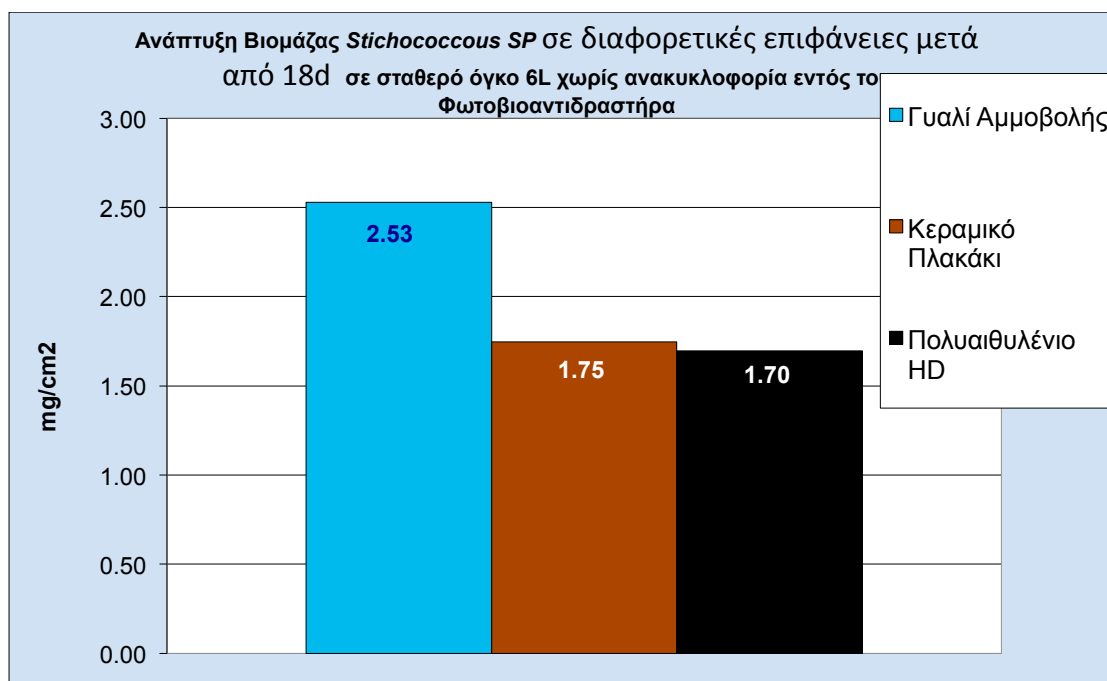
πλακάκι με την παραγωγή βιομάζας στο γυαλί αμμοβολής να έχει φτάσει στη μεγαλύτερη απόδοση σε σχέση με όλα τα πειράματα ($2,5 \text{ mg/cm}^2$). Η αιωρούμενη βιομάζα στο πείραμα καλλιέργειας 24 ημερών ήταν περίπου 400mg ενώ σε αυτό των 18 ημερών ήταν 140mg στα 6 L συνθετικού αποβλήτου, ενώ η συνολική ακινητοποιημένη βιομάζα που εξάχθηκε ήταν 1,6 και 2,9gr αντίστοιχα.

Η αισθητά μειωμένη παραγωγή biofilm του πρώτου πειράματος (κυρίως) στο κεραμικό υλικό οφείλεται όπως αναφέρθηκε στην βιομάζα που αποκολλήθηκε από το συγκεκριμένο πλακάκι μετά το πέρας των 20 ημερών και βρέθηκε στην επιφάνεια. Αυτός ήταν και ο λόγος που στο 2^ο πείραμα μειώθηκε ο χρόνος καλλιέργειας. Παρακάτω ακολουθούν τα διαγράμματα παραγωγής ακινητοποιημένης βιομάζας από τα πειράματα καλλιέργειας του στελέχους *Stichococcus sp.* χωρίς ανακυκλοφορία.



	Βιομάζα στην συνολική επιφάνεια του κάθε υλικού (mg)	Συνολική επιφάνεια ανάπτυξης (cm ²)
Γυαλί αμμοβολής	671,70	480,8
Κεραμικό πλακάκι	321,40	477,1
Πολυαιθυλένιο HD	602,10	490,4
Σύνολο	1595,20	
Αιωρούμενη Βιομάζα	390	Στα 6 L

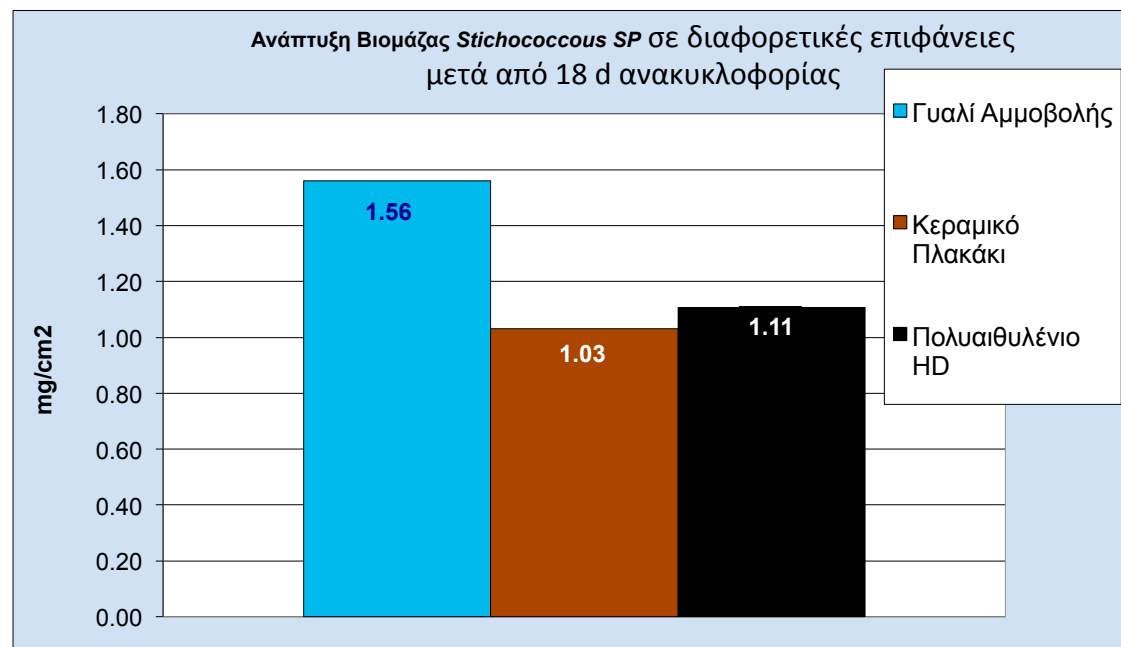
Πίνακας 5.4. Αναλυτικά στοιχεία από τη συλλογή βιομάζας του 4ου πειράματος



	Βιομάζα στην συνολική επιφάνεια του κάθε υλικού (mg)	Συνολική επιφάνεια ανάπτυξης (cm ²)
Γυαλί αμμοβολής	1216,10	480,8
Κεραμικό πλακάκι	833,8	477,1
Πολυαιθυλένιο HD	832,3	490,4
Σύνολο	2882,2	
Αιωρούμενη Βιομάζα	140	Στα 6 L

Πίνακας 5.5. Αναλυτικά στοιχεία από τη συλλογή βιομάζας του 5ου πειράματος

Επιπλέον με βάση τα προηγούμενα πειράματα χωρίς ανακυκλοφορία θεωρήσαμε απαραίτητο να εξεταστεί και η ανάπτυξη βιομάζας με ανακυκλοφορία στις 18 μέρες καλλιέργειας (αντί για 24 που είχαν όλα τα προηγούμενα πειράματα). Έτσι στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η ανάπτυξη της βιομάζας από το στέλεχος *Stichococcus sp.* ανά τετραγωνικό εκατοστό επιφάνειας του κάθε υλικού έπειτα από 18 μέρες επώασης στον φωτο-βιοαντιδραστήρα με ανακυκλοφορία του συνθετικού αποβλήτου παροχής 12L/d και όγκου εντός του αντιδραστήρα 6 L.



	Βιομάζα στην συνολική επιφάνεια του κάθε υλικού (mg)	Συνολική επιφάνεια ανάπτυξης (cm ²)
Γυαλί αμμοβολής	750,40	480,8
Κεραμικό πλακάκι	491,60	477,1
Πολυαιθυλένιο HD	543,10	490,4
Σύνολο	1785,10	
Αιωρούμενη Βιομάζα	240	Στα 12 L

Πίνακας 5.6. Αναλυτικά στοιχεία από τη συλλογή βιομάζας του 6ου πειράματος

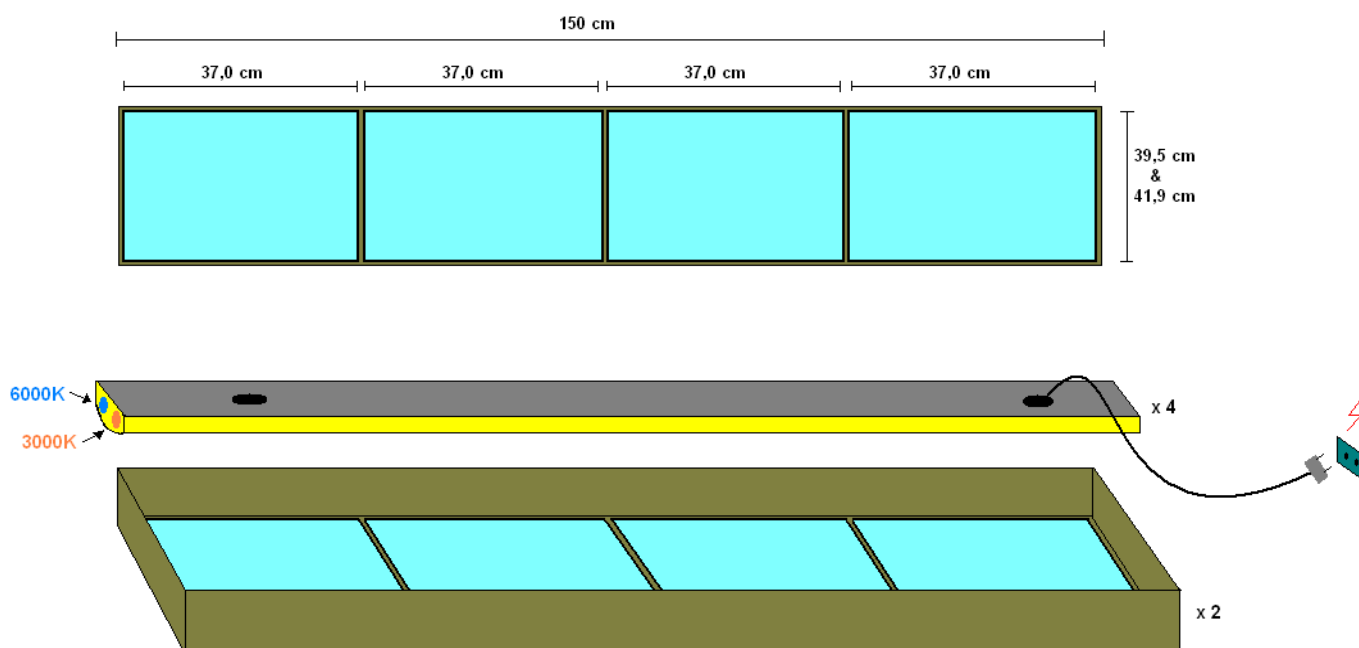
Στα δύο πρώτα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, μία ποσότητα από την ακινητοποιημένη βιομάζας της κάθε επιφάνειας συλλέχθηκε για να μετρηθεί ποσοτικά και μια άλλη ποσότητα χρησιμοποιήθηκε για εξαγωγή λιπιδίων. Αυτό πραγματοποιήθηκε χωρίζοντας σε δύο μέρη την βιομάζα που αναπτύχθηκε σε κάθε μία από τις επιφάνειες. Με αυτό τον τρόπο προσδιορίστηκε η ποσότητα της βιομάζας που παράχθηκε σε κάθε επιφάνεια και συνεπώς, αναλογικά πόσα είναι τα παραγόμενα λιπίδια από την συγκεκριμένη ποσότητα βιομάζας. Στον πίνακα 5.2 παρουσιάζεται η ποσότητα των παραγόμενων λιπιδίων στο πείραμα με και χωρίς πενία αζώτου.

Επιφάνεια		Lipid mg/ml C6	g Lipid extract/m ²	mg Lipid extract / cm ²
1	Γυαλί Αμμοβολής	7,62	0,317	0,032
2	Κεραμικό Πλακάκι	7,63	0,219	0,022
3	Πολυαιθυλένιο HD	7,35	0,300	0,030
1N	Γυαλί Αμμοβολής	10,22	0,688	0,069
2N	Κεραμικό Πλακάκι	13,09	0,376	0,038
3N	Πολυαιθυλένιο HD	11,93	0,482	0,048

Πίνακας 5.7 Εξαγωγή λιπιδίων από ποσότητα ακινητοποιημένης βιομάζας στις τρεις διαφορετικές επιφάνειες με ανακυκλοφορία και με χρήση *nutrient starvation* (N)

5.3. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΣΕ ΦΩΤΟ-ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ 12000 cm²

Έπειτα από τα πειράματα στο φωτο-βιοαντιδραστήρα, και καθώς το γυαλί αμμοβολής έδειξε να έχει την καλύτερη απόδοση σε σχέση με τις άλλες δύο επιφάνειες και σε όλες τις συνθήκες καλλιέργειας, κρίθηκε σκόπιμο να εξεταστεί η παραγωγή βιομάζας σε λίγο μεγαλύτερη κλίμακας φωτο-βιοαντιδραστήρα με μοναδικό υλικό επιφάνειας το γυαλί αμμοβολής. Έτσι κατασκευάστηκαν 2 φωτοβιοαντιδραστήρες διαστάσεων 40 x 150 cm ο καθένας με συνολική έκταση επιφάνειας τα 12.000 cm² με διάταξη που φαίνεται στην εικόνα 5.5.



MICROALGAE - BIOPRODUCTS 2nd Edition Photo-BioReactor

Εικόνα 5.5. Σχεδιαστική διάταξη του Φωτο-Βιοαντιδραστήρα μεγαλύτερης κλίμακας για παραγωγή βιομάζας μικροφυκών πάνω σε γυαλί αμμοβολής
(Διαστάσεις 1^{ου} Φωτο-αντιδραστήρα: 150cmx39,5cm, Διαστάσεις 2^{ου} Φωτο-αντιδραστήρα: 150cmx41,9cm)



Εικόνα 3.6. Άποψη των δύο Φωτο-Βιοαντιδραστήρων μετά από την στεγάνωσή τους

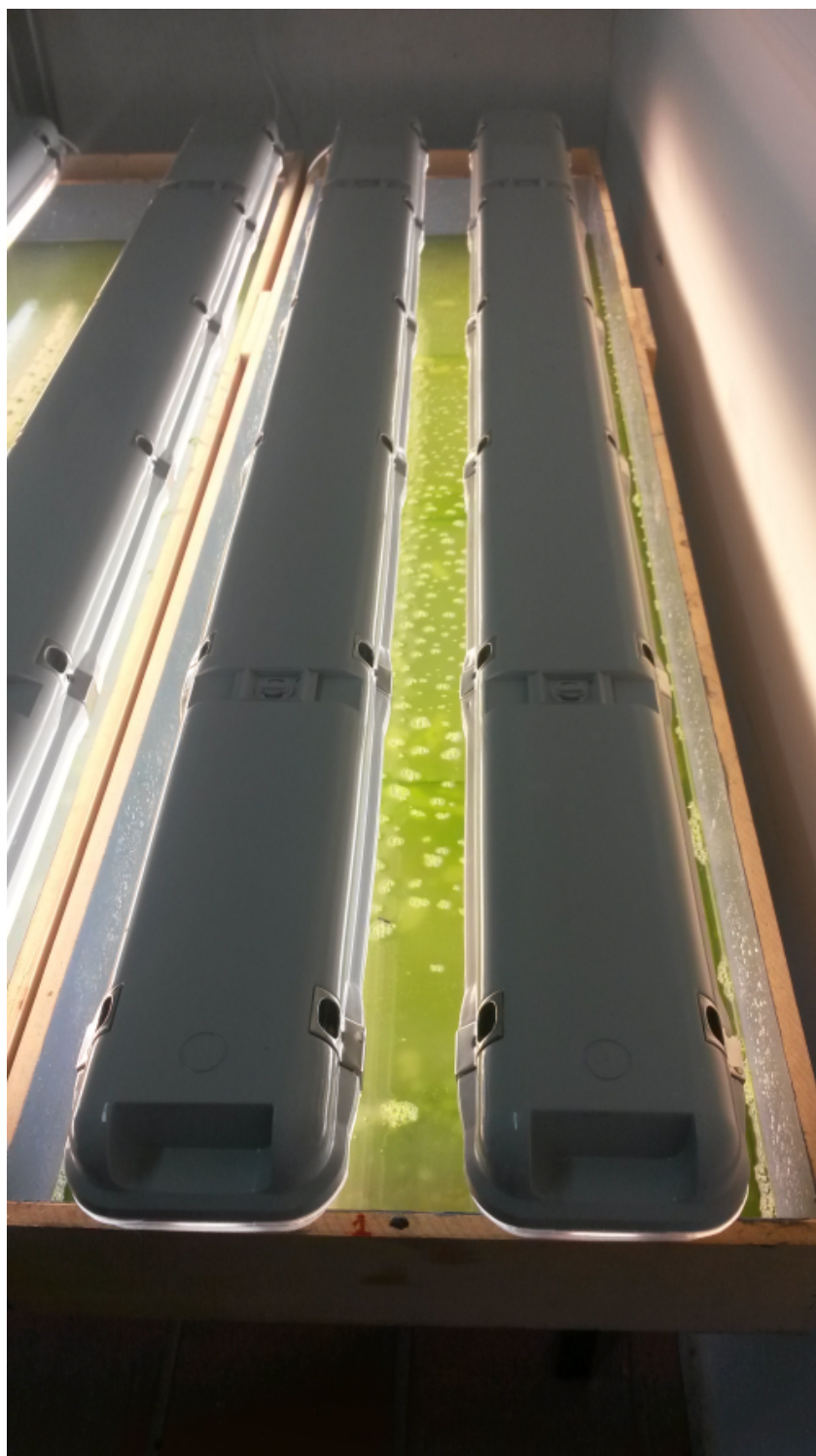


Εικόνα 3.7. Άποψη των δύο Φωτο-Βιοαντιδραστήρων κατά την έναρξη του πρώτου πειράματος καλλιέργειας χωρίς ανακυκλοφορία

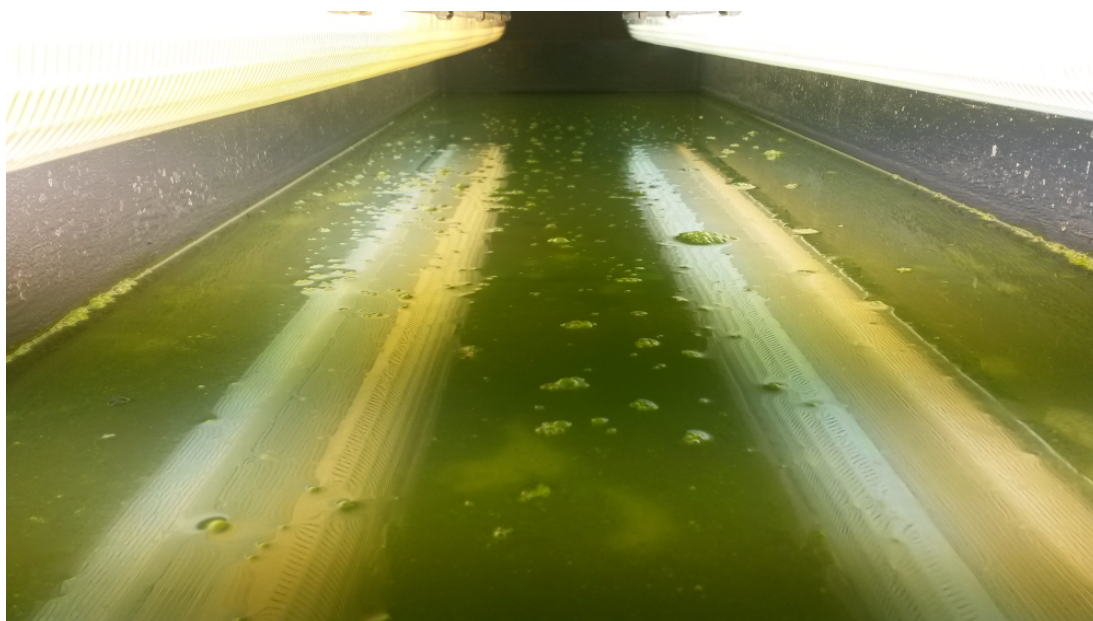
Συνολικά σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν σταθερός όγκος με 30 λίτρα τεχνητού αποβλήτου για λειτουργία χωρίς ανακυκλοφορία και αρχική συγκέντρωση από το στέλεχος του *Stichococcus sp.* 1:100 δηλαδή 300 mL από το Rich Solution της καλλιέργειας των μικροφυκών. Το ύψος του νερού ανερχόταν στους 2,5 cm σε αντίθεση με τα προηγούμενα πειράματα όπου για όγκο 6 L μέσα στον φωτο-βιοαντιδραστήρα, το ύψος νερού ανερχόταν στους 4 cm, ενώ για 3 L ήταν στους 2 cm αντίστοιχα.

Αρχικά εξετάστηκε η ανάπτυξη ακινητοποιημένης βιομάζας χωρίς ανακυκλοφορία και σε συνεχόμενο φωτισμό (24h/d) για 24 μέρες, όπου λόγω της μεγάλης εξάτμισης υπήρχε ανάγκη προσθήκης επιπλέον νερού (αποστειρωμένο απιονισμένο νερό) ανά τακτά χρονικά διαστήματα, λόγω σημαντικής μείωσης της στάθμης του ύδατος εντός των φωτο-βιοαντιδραστήρων με αρνητικά αποτελέσματα για την καλλιέργεια. Το πείραμα δυστυχώς δεν έδειξε κάποια ανάπτυξη βιομάζας καθώς πιθανότατα η έντονη εξάτμιση η οποία προκάλεσε αύξηση της αλατότητας στο συνθετικό απόβλητο και η σταδιακή προσθήκη νερού δεν βοήθησαν την δημιουργία biofilm στις επιφάνειες του γυαλιού, αλλά μόνο σε μικρά τμήματα πλευρικά των επιφανειών όσο και αν περνούσαν οι μέρες καλλιέργειας.

Κατά τη δεύτερη προσπάθεια έγινε εκ νέου προσπάθεια παραγωγής biofilm από το στέλεχός μας σε νέο πείραμα με φωτοπερίοδο αυτή τη φορά 12h/d όπως δηλαδή και σε όλα τα προηγούμενα πειράματα. Η εξάτμιση που παρατηρήθηκε ήταν σημαντικά μειωμένη σε σχέση με το πρώτο πείραμα και η ανάγκη προσθήκη νερού αρκετά μικρότερη. Το πείραμα είχε διάρκεια 18 μέρες και αφού αφαιρέθηκε το συνθετικό απόβλητο από τους φωτο-βιοαντιδραστήρες με χρήση περισταλτικής αντλίας αφαιρέθηκαν προσεκτικά οι 8 επιφάνειες και με λαστιχένια σπάτουλα αφαιρέθηκε η ακινητοποιημένη βιομάζα από το γυαλί.



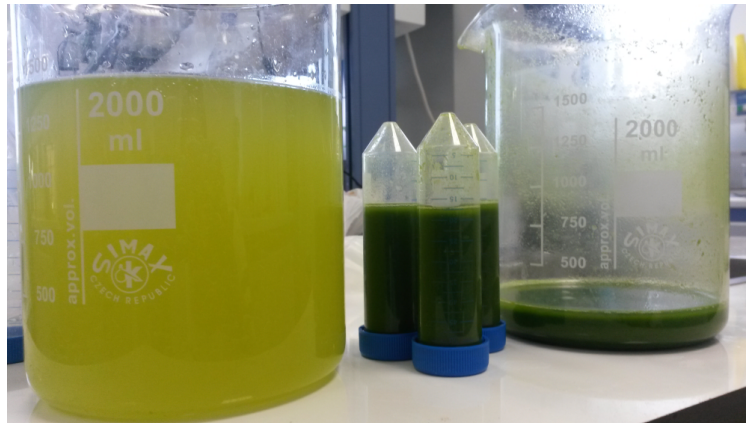
Εικόνα 3.8. Άποψη των Φωτο-Βιοαντιδραστήρων στις 18 μέρες καλλιέργειας



Εικόνα 3.9. Η επιφάνεια του Φωτο-Βιοαντιδραστήρα μετά από 18 μέρες καλλιέργειας

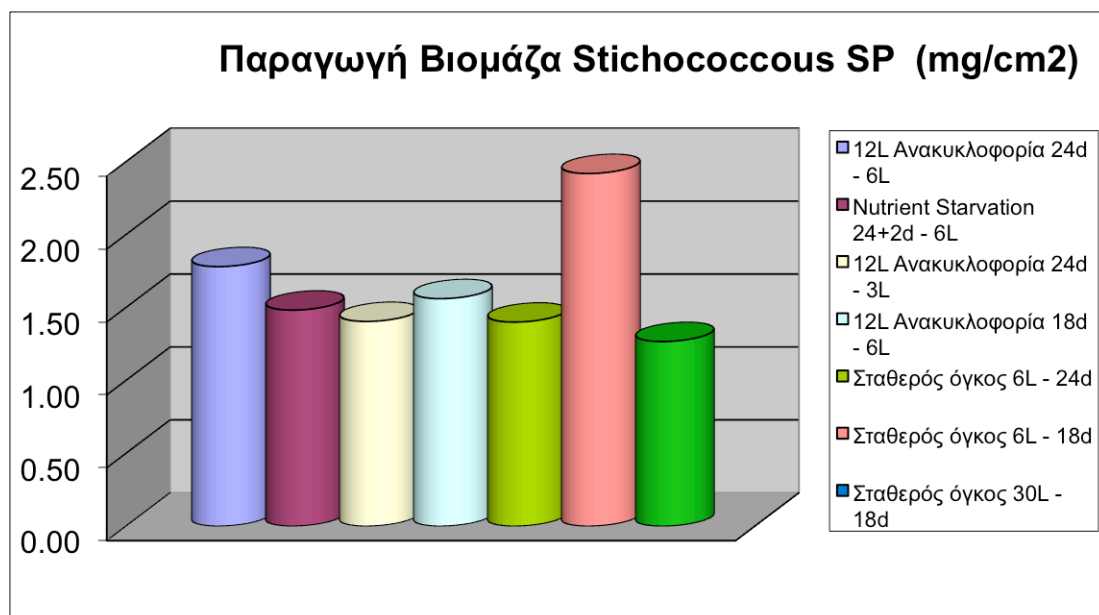
Η συνολικά αφαιρούμενη ξηρή βιομάζα ήταν περίπου 14,8 gr και συλλέχθηκε σκοπό την εξαγωγή λιπιδίων. Για αυτό το λόγο επαναλήφθηκε το πείραμα για περισυλλογή επιπλέον ποσότητας μικροφυκών για εξαγωγή λιπιδίων.

Στο επόμενο πείραμα που πραγματοποιήθηκε στις ίδιες ακριβώς συνθήκες με πριν η συνολική ποσότητα ξηρής βιομάζας μικροφυκών που συλλέχθηκε και μετρήθηκε ήταν 15,2 gr για την συνολική επιφάνεια των γυαλιών αμμοβολής και ανέρχεται στα 1,3 mg/cm². Οπότε συνολικά και από τα 2 πειράματα συλλέχθηκαν 30 gr βιομάζας *Stichococcus* sp. όπου με σπάτουλα σιλικόνης συλλέχθηκε η ακινητοποιημένη βιομάζα από τις αφαιρούμενες επιφάνειες του γυαλιού αμμοβολής και η οποία αποθηκεύτηκε σε δοχεία falcon tubes για εξαγωγή λιπιδίων, όπως φαίνεται στην εικόνα 5.10.



Εικόνα 5.10. Συλλογή βιομάζας μικροφυκών

Στο σχήμα 5.7 παρουσιάζεται ένα συνολικό διάγραμμα των διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης της βιομάζας στην επιφάνεια από γυαλί αμμοβολής, οι οποίες έλαβαν χώρα κατά την διάρκεια όλων των πειραμάτων:



Σχήμα 5.7. Ανάπτυξη βιομάζας του στελέχους *Stichococcus* sp (mg biofilm/cm²) σε επιφάνεια από γυαλί αμμοβολής εντός του φωτο-βιοαντιδραστήρα κάτω από διαφορετικές συνθήκες.

5.4. ΕΞΑΓΩΓΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

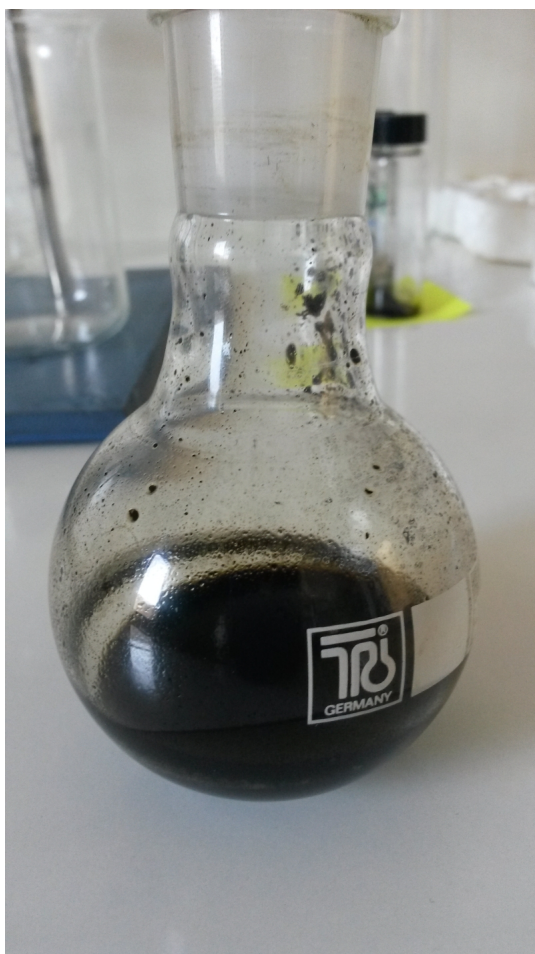
Το δεύτερο μέρος του πειράματος περιελάμβανε την διαδικασία εξαγωγής των λιπιδίων από την συλλεγμένη βιομάζα μικροφυκών που αναπτύχθηκαν στους φωτο-αντιδραστήρες συνολικής επιφάνειας 12.000m².

Το ξηρό υπόλειμμα που έμεινε ζύγιζε 1,76 g (από 10 g ξηρής βιομάζας μικροφυκών) το οποίο σημαίνει παραγωγή λιπιδίων της τάξης των 0,18mg/mg βιομάζας, στο πρώτο πείραμα και 1,17 g (από 10 g ξηρής βιομάζας μικροφυκών) στο δεύτερο.

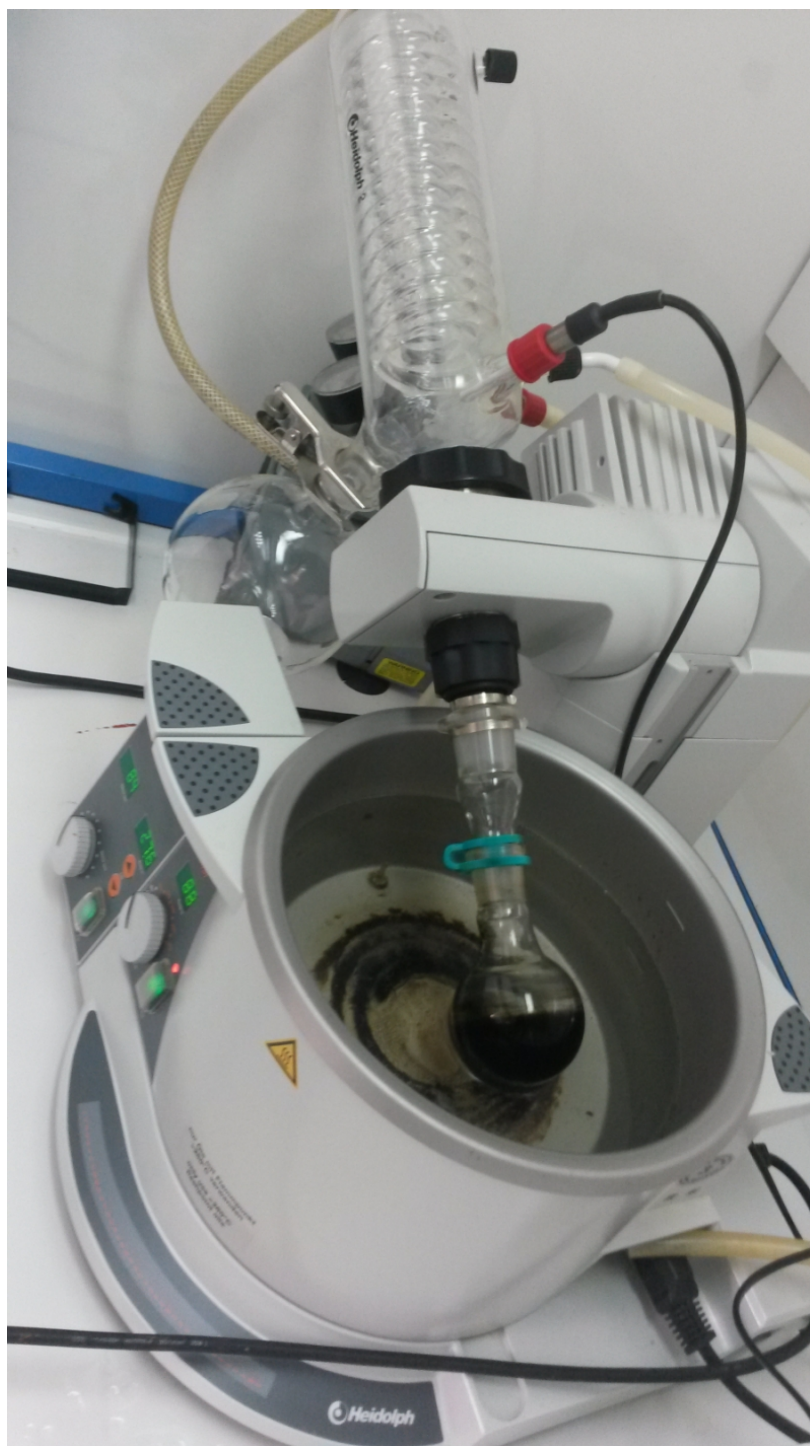
5.5. ΠΡΟΣΠΑΘΕΙΑ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΣΕ ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ

Μετά την εξαγωγή λιπιδίων από την παραγώμενη βιομάζα μικροφυκών στους μεγάλους φωτοβιοαντιδραστήρες, έγινε μια προσπάθεια βασικής εστεροποίησης του δείγματος (ξηρής μάζας λιπιδίων), στο οποίο επειδή πιθανότατα η εξαγωγή που έγινε δεν ήταν η κατάλληλη λόγω έλλειψης βιβλιογραφίας για το συγκεκριμένο στέλεχος μικροφυκών, υπήρχαν κάποια προβλήματα στον διαχωρισμό για μετατροπή σε βιοντίζελ. Στο συλλεγμένο δείγμα λιπιδίων προσθέθηκε μεθανόλη και υποβλήθηκε σε ανάδευση. Δεν παρατηρήθηκε δημιουργία ελαιαϊκής φάσης, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η εξαγωγή βιοντίζελ από το διάλυμα. (Εικόνα 5.11)

Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε το δείγμα σε εξατμιστήρα (evaporator) (Εικόνα 5.12) με σκοπό την απομάκρυνση του διαλύτη, αλλά και πάλι έμεινε μία ξηρή ποσότητα μάζας λιπιδίων (και όχι λαδιού όπως θα ήταν το αναμενόμενο) η οποία λόγω της φύσης της δεν είναι σε θέση να μετρηθεί στον αέριο χρωματογράφο (DC) έτσι ώστε να μετρηθεί το βιοντίζελ.



Εικόνα 5.11. Διάλυμα λιπιδίων με μεθανόλη και ΚΟΗ



Εικόνα 5.12. Το διάλυμα στον εξατμιστήρα



Εικόνα 5.13. Το διάλυμα μετά τον εξατμιστήρα σε χοάνη διαχωρισμού φάσης

Στην εικόνα 5.13 είναι εμφανές ότι ο διαχωρισμός φάσης δεν ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί, επομένως δεν γινόταν να ξεχωριστεί το λάδι από το διάλυμα με σκοπό την περεταίρω εξέτασή του στον αέριο χρωματογράφο.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνολικά, σε αυτήν την εργασία εξετάστηκε η ανάπτυξη ακινητοποιημένης βιομάζας μικροφυκών κάτω από διάφορες συνθήκες εντός των φωτοβιοαντιδραστήρων, πραγματοποιήθηκε εξαγωγή λιπιδίων από την βιομάζα που συλλέχθηκε και μελετήθηκε η παραγωγή βιοντίζελ από μικροφύκη. Πιο αναλυτικά, μελετήθηκαν τα διάφορα στάδια της παραγωγής βιομάζας από το επιλεγμένο στέλεχος *Stichococcus* sp. στον φωτο-βιοαντιδραστήρα που κατασκευάστηκε κάτω από διαφορετικές συνθήκες λειτουργίας με στόχο την εύρεση των καλύτερων συνθηκών και υλικών για την μεγιστοποίηση ανάπτυξης των μικροφυκών και τη εύκολη συλλογή – εξαγωγή τους σε μορφή βιοφίλμ. Εξετάστηκαν διαφορετικές συνθήκες στην ανάπτυξη μικροφυκών σε βιοαντιδραστήρες μεγαλύτερης κλίμας, με στόχο την μελέτη παραγωγής βιομάζας, λιπιδίων και πρωτεϊνών. Αυτό πραγματοποιήθηκε με στόχο τη μελλοντική βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάπτυξης σε εγκαταστάσεις πιλοτικής κλίμακας. Στα πλαίσια του πειράματος αναπτύχθηκε το στέλεχος *Stichococcus* sp. υπό την παρουσία 3 διαφορετικών τύπων σταθερών επιφανειών για την εξέταση της παραγωγής ακινητοποιημένης βιομάζας (σε μορφή βιοφίλμ) με χημικά καθορισμένο θρεπτικό μέσο (συνθετικό απόβλητο), με εφαρμογή επανακυκλοφορίας ή όχι του συνθετικού αποβλήτου στον φωτο-βιοαντιδραστήρα, καθώς και εξέταση της επιρροής πενίας αζώτου (nutrient starvation). Επιπλέον, έγινε διαφοροποίηση του όγκου εντός του φωτο-βιοαντιδραστήρα (6L ή 3L) με το ύψος νερού να ανέρχεται στα 4 ή 2 cm από τις επιφάνειες, σε σταθερές συνθήκες και σε επανακυκλοφορία. Στη συνέχεια έγινε σύγκριση και επιλογή βέλτιστων συνθηκών λειτουργίας από όλα τα πειράματα για παραγωγή βιομάζας από το στέλεχος *Stichococcus* sp. στον φωτο-βιοαντιδραστήρα.

Μετά το πέρας των δοκιμών με διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης της βιομάζας, παρατηρήθηκε ότι σε όλα τα πειράματα που έγιναν το γυαλί αμμοβολής παρουσίασε την καλύτερη απόδοση στη δημιουργία biofilm από το στέλεχος μικροφυκών. Το αποτέλεσμα αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι το γυαλί αμμοβολής παρουσιάζει ανακλαστική ιδιότητα και συμβάλλει στην ενίσχυση του φωτός, το

οποίο είναι προωθητικός παράγοντας στην ανάπτυξη των μικροφυκών. Επιπλέον, η επιφάνεια του γυαλιού αμμοβολής συνέβαλλε στην μεγαλύτερη απόδοση της ανάπτυξης της βιομάζας.

Παρατηρήθηκε, ακόμη, πως η παραγωγή της βιομάζας των μικροφυκών ήταν βέλτιστη σε συνθήκες μη ανακυκλοφορίας στα 6 L εντός του φωτο-αντιδραστήρα για παραμονή 18 ημερών. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι πιθανά η χρονική διάρκεια των 18 ημερών αποτελεί την φάση ανάπτυξης και πως μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος ξεκινάει η φάση φθίνοντος ρυθμού ανάπτυξης, δηλαδή η ανάπτυξη των κυττάρων αναστάλθηκε, λόγω εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών. Επίσης η ανάπτυξη της βιομάζας ήταν μεγαλύτερη σε συνθήκες μεγαλύτερου όγκου νερού εντός του αντιδραστήρα (6L νερού και ύψος νερού 4cm από τις επιφάνειες).

Το στάδιο που ακολούθησε της συλλογής ήταν αυτό της εξαγωγής των λιπιδίων από τα μικροφύκη. Πριν από αυτή, τα μικροφύκη χρειάστηκε να περάσουν από τα στάδια της αφαλάτωσης με διαδοχικές πλύσεις και φυγοκέντριση των δειγμάτων. Με χρήση καταλύτη μετά την διήθηση έγινε η διάσπαση των κυττάρων, τα οποία αποτελούν προπαρασκευαστικά στάδια της εξαγωγής των λιπιδίων από τα μικροφύκη. Αυτές οι δύο τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν με στόχο την αύξηση της απόδοσης της εξαγωγής των λιπιδίων. Η παραπάνω διαδικασία είχε ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση της βιομάζας με τον διαλύτη και τη μείωση της διαδρομής των μορίων του διαλύτη κατά τη διάχυση. Η κυτταρική διάσπαση είχε ως αποτέλεσμα των διαχωρισμό των λιπιδίων και της βιομάζας από την οποία αυτά προέρχονται, κάτι το οποίο αυξάνει την απόδοση της εξαγωγής των λιπιδίων αφού αυτά έρχονται σε άμεση επαφή με τον διαλύτη στον διακυτταρικό χώρο.

Στα δύο πρώτα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, μία ποσότητα από την ακινητοποιημένη βιομάζα της κάθε επιφάνειας συλλέχθηκε για να μετρηθεί ποσοτικά και μια άλλη ποσότητα χρησιμοποιήθηκε για εξαγωγή λιπιδίων. Η διαδικασία ανάπτυξης της βιομάζας έγινε με και χωρίς πενία αζώτου. Με βάση τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η ποσότητα των παραγόμενων λιπιδίων στο πείραμα με πενία αζώτου ήταν μεγαλύτερη από αυτήν χωρίς, και στις τρεις διαφορετικές

επιφάνειες. Συγκρίνοντας τις τρεις επιφάνειες ξεχωριστά σε συνθήκες πενίας αζώτου και μη, παρατηρήθηκε ότι η μεγαλύτερη ποσότητα αναπτύχθηκε στο κεραμικό πλακάκι. Παρόλα αυτά, το γυαλί αμμοβολής θεωρείται ότι ήταν αυτό που συνέβαλλε στην αποδοτικότερη ανάπτυξη της βιομάζας στο σύνολο των πειραμάτων.

Λόγω αδυναμίας παραγωγής βιοντίζελ από τα εξαγόμενα λιπίδια των μικροφυκών, η περεταίρω έρευνα μπορεί να συνεχιστεί με σκοπό την επιλογή καλύτερης μεθόδου της εξαγωγής των λιπιδίων για την αποφυγή παραπροϊόντων που δισχαιρένουν την ανάλυση.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abreu A. P., Fernandes B., Vicente A. A., Teixeira J. and Dragone G. (2012), "Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source", *Bioresource Technology*, 118: 61-66
- Amaro M.H., Guedes C.A. and Malcata X.F. (2011), "Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel", *Applied Energy*, 88(10): 3402–3410
- Andersen R. A. (1996) "Algae". In: J. C. Hunter-Cevera and C. A. Belt eds. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*, London, UK, 29-64
- Andrade M. R. and Costa J. A. V. (2007), "Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate", *Aquaculture*, 264(1-4): 130-134
- Aravantinou A.F. and Manariotis I.D. (2014), "Microalgae: From Sewage Treatment to Potential Biofuel Production", *IWA Regional Symposium on Water Wastewater and Environment Traditions and Culture*, Patras, 22-24 March 2014.
- Barsanti L. and Gualtieri P., (2006), "Algae: Anatomy, biochemistry and biotechnology"., New York, CRC Taylor & Francis
- Becker E. W. (2007), "Micro-algae as a source of protein", *Biotechnology Advances*, 25(2): 207–210
- Bilanovic D., Andargatchew A., Kroeger T. and Shelef G. (2009), "Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C and N concentrations – Response surface methodology analysis", *Energy Conversion and Management*, 50(2): 262-267
- Bozbas K. (2005), "Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union", *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 12: 542-552
- Brennan L. and Owende P. (2010) "Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co- products", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2): 557-577
- Brock T. D. (1967) "Life at high temperatures", *Science*, 158:1012-1019
- Bunt J. S. and Wood E. J. C. (1963) "Microbiology and Antarctic sea ice", *Nature*, 199: 1254-1255
- Bux F. (2013) "Biotechnological Applications of Microalgae: Biodiesel and value-added products", Taylor & Francis group, 89-96
- Cannell R. J. P. (1993), "Algae as a Source of Biologically Active Products", *Pestic Sci* 39:147-153
- Carvalho A., Monteiro C. and Malcata F. (2009), "Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova lutheri*", *Journal of Applied Phycology*, 21(5): 543-552
- Carvalho A., Silva S., Baptista J. and Malcata F. (2011), "Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5): 1275-1288

- Carvalho A. P., Meireles L. A. and Malcata F. X. (2006), "Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances", *Biotechnology Progress*, 22(6): 1490-1506
- Castro P. & Huber E. M. (1999), «Θαλάσσια Βιολογία», University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
- Carlsson Anders S, Beilen Jan B van , Möller Ralf, Clayton David (2007), "Micro- and Macro- Algae utility for industrial applications", Outputs from the EPOBIO project
- Chaumont D. (1993), "Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture", *Journal of Applied Phycology*, 5(6): 593-604
- Chen C.-Y., Yeh K.-L., Aisyah R., Lee D.-J. and Chang J.-S. (2011), "Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review". *Bioresource Technology*, 102(1): 71-81
- Chisti Y.,(2007), "Biodiesel from microalgae", *Biotechnology Advances*, 25: 294-306
- Chojnacka K. and Marquez-Rocha F. J. (2004) "Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae", *Biotechnology Advances*, 3: 21-34
- Chojnacka K. and Zielińska A. (2011), "Evaluation of growth yield of *Spirulina* (*Arthrospira*) sp. in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1-9
- Converti A., Casazza A. A., Ortiz E. Y., Perego P. and Del Borghi M., "Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production," *Chemical Engineering and Processing Process Intensification*, 48(6): 1146–1151
- Darley W. M. (1982) "Algal biology: A physical approach", J. F. Wilkinson eds. *Basic microbiology*, London, 30-52
- Day J. G., Slocombe S. P. and Stanley M. S. (2011), "Overcoming biological constraints to enable the exploitation of microalgae for biofuels", *Bioresource Technology*
- De Pauw N. and Persoone G. (1988), "Micro-algae for aquaculture"., M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka eds. *Micro-Algal Biotechnology*, Cambridge, 197-221
- De Morais M.G., Costa J.A.V. (2007), "Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors", *Biotechnology Letters*, 29:1349–1352
- Demirbas A. (2009), "Progress and recent trends in biodiesel fuels," *Energy Conversion and Management*, 50(1): 14–34
- Douskova I., Doucha J., Livansky K., Machat J., Novak P., Umysova D., Zachleder V. and Vitova M. (2009), "Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs," *Applied microbiology and biotechnology*, 82(1): 179–85
- Eriksen NT, Riisgard FK, Gunther WS, Lønsmann Iversen JJ. (2007), On-line estimation of O₂ production, CO₂ uptake, and growth kinetics of microalgal cultures in a gas-tight photobioreactor, *J Appl Phycol* 19: 161–174
- Falkowski P. G. (1980) "Primary Productivity in the Sea", New York, Plenum Press

- Gao C., Zhai Y., Ding Y. and Wu Q. (2010), "Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*", *Applied Energy*, 87(3): 756-761
- Gouveia L. (2011), "Microalgae as a feedstock for biofuels" Springer
- Grewe C. B. and Pulz O. (2012), "The Biotechnology of Cyanobacteria", B. A. Whitton eds. *Ecology of Cyanobacteria II*, 707-739
- Guedes A. C. and Malcata F. X. (2012), "Nutritional Value and Uses of Microalgae in Aquaculture", Z. Muchlisin eds. *Aquaculture*
- Harun R., Jason W. S. Y., Cherrington T. and Danquah M. K. (2010), "Microalgal biomass as a cellulosic fermentation feedstock for, bioethanol production", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, In Press, Uncorrected Proof
- Illman A.M., Scragg A.H. and Shales S.W. (2000), "Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium", *Enzyme and Microbial Technology*, 27:631–635
- Jassby A. (1988) "Spirulina: a model of microalgae as human food", C. Lembi and J. R. Waaland eds. *Algae and Human Affairs*, Cambridge, 149-179
- Jensen S. and Knutsen G. (1993), "Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis *Spirulina platensis*", *Journal of Applied Phycology*, 5(5): 495-504
- Lam M. K. and Lee K. T. (2012) "Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward", *Biotechnology Advances*, 30(3): 673–690
- Li Y., Zhou W., Hu B., Min M., Chen P., Ruan R.R. (2011), "Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: Strains screening and significance evaluation of environmental factors", *Bioresource technology*, 102:10861–10867.
- Liu Z.Y., Wang G.C. and Zhou B.C. (2008), "Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*", *Bioresource Technology*, 99: 4717 – 4722
- Lundquist J.T., Woertz C.I., Quinn T.N.W. and Benemann R.J. (2010), "A realistic technology and engineering assessment of algae biofuel production.", *Energy Biosciences Institute*, University of California
- Ma Yubin, Wang Zhiyao, Yu Changjiang, Yin Yehu, Zhou Gongke (2014), "Evaluation of the potential of 9 *Nannochloropsis* strains for biodiesel production", *Bioresource Technology* 167:503-509
- Markou G. and Georgakakis D. (2011), "Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review", *Applied Energy*, 88(10): 3389–3401
- Mata T.M., Martins A. A., Caetano N. S., (2010), "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*" 14: 217-232
- Meisam T., Masoud T., Salehi J. G., Mohammadreza S., Mohammad P. (2010), "Biodiesel production from genetically engineered microalgae: Future of bioenergy in Iran", *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15:1918-1927
- Melis A, Neidhardt J and Benemann J.R (1999), "Dunaliella salina (Chlorophyta) with small chlorophyll antenna sizes exhibit higher photosynthetic productivities and photon use efficiencies than normally pigmented cells", *Journal of Applied Phycology*, 10: 515–25.

- Meher L., Vidyasagar D. and Naik S. (2006), "Technical aspects of biodiesel production by transesterification — a review," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10(3): 248–268
- Metting F. B. (1996) "Biodiversity and application of microalgae", *Journal of Industrial Microbiology*, 17(5): 477-489
- Moheimani N.R. (2005), "The culture of Coccolithophorid Algae for carbon dioxide bioremediation", PhD thesis, Murdoch University.
- Molina E., Fernández J., Ación F. G. and Chisti Y. (2001), "Tubular photobioreactor design for algal cultures", *Journal of Biotechnology*, 92(2): 113-131
- Muthukumar A., Elayaraja S., Ajithkumar T. T., Kumaresan S. and Balasubramanian T. (2012), "Biodiesel production from marine microalgae *Chlorella marina* and *Nannochloropsis salina*", *Journal of Petroleum Technology and Alternative Fuels* 3(5):58-62
- Nascimento I., Marques S., Cabanelas I., Pereira S., Druzian I., de Souza C., Vich D., de Carvalho G. and Nascimento M. (2012), "Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria", *Bioenergy Research* 6: 1-13
- Norsker N. H., Barbosa M. J., Vermuë M. H. and Wijffels R. H. (2011), "Microalgal production — A close look at the economics", *Biotechnology Advances*, 29(1): 24-27
- Pulz O. P. (2001), "Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(3): 287-293
- Qin S., Lin H. and Jiang P. (2012), "Advances in genetic engineering of marine algae", *Biotechnology Advances*, 30: 1602-1613
- Rawat I., Kumar R. R., Mutanda T. and Bux F. (2013) "Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production", *Applied Energy*, 103: 444–467
- Razon L. F. (2012), "Life cycle energy and greenhouse gas profile of a process for the production of ammonium sulfate from nitrogen-fixing photosynthetic cyanobacteria", *Bioresource Technology*, 107: 339-346
- Reynolds C. S. (2006) "The ecology of phytoplankton", Cambridge University Press
- Richmond A. (1999), "Physiological principles and modes of cultivation in mass production of photoautotrophic microalgae", Z. Cohen eds. *Chemical from Microalgae*, Philadelphia, 353-386
- Rosa A. P. C. d., Carvalho L. F., Goldbeck L. and Costa J. A. V. (2011), "Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors", *Energy Conversion and Management*, 52(8–9): 3071-3073
- Ryan C. (2009), "Cultivating Clean Energy: The Promise of Algae Biofuels", Natural Resources Defense Council, Terrapin Bright Green, USA.
- Scragg A. H. (2009), "Biofuels: Production, Application and Development", Cabi, 237
- Sharma K. K., Schuhmann H. and Schenk P. M. (2012). , "High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production", *Energies* , 5: 1532-1534

- Singh J. and Gu S. (2010), "Commercialization potential of microalgae for biofuels production", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(9): 2596– 2610
- Slegers M.P., Wijffels H.R., Van Straten G. and Van Boxtel B. A. J. (2011), "Design scenarios for flat panel photobioreactors," *Applied Energy*, 88(10): 3342–3353
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E. and Isambert A. (2006), "Commercial applications of microalgae", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2): 87- 96
- Suh I. and Lee C.-G. (2003) "Photobioreactor engineering: Design and performance", *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8(6): 313-321
- Van den Hoek C., Mann D. G. and Jahns H. M. (1997) "Algae: An Introduction to Phycology". Cambridge, Cambridge University Press
- Van Gerpen J. (2005), "Biodiesel processing and production", *Fuel Processing Technology*, 86(10): 1097–1107
- Vonshak A. (2002), "Spirulina: Growth, physiology and biochemistry", A. Vonshak eds. *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and Biotechnology*, London, 43-65
- Waterbury J. B. (2006) "The Cyanobacteria—Isolation, Purification and Identification", M. Dworkin eds. *The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria*, 1053–1073
- Wiley E.P., Campbell E. J. and McKuin B. (2011), "Production of Biodiesel and Biogas from Algae: A Review of Process Train Options", *Water Environment Research*, 83(4): 326-338
- Yusuf N. N. A. N., Kamarudin S. K. and Yaakub Z. (2011), "Overview on the current trends in biodiesel production," *Energy Conversion and Management*, 52(7): 2741– 2751
- Zhang H., Wang W., Li Y., Yang W. and Shen G. (2011) "Mixotrophic cultivation of *Botryococcus braunii*", *Biomass and Bioenergy*, 35(5): 1710-1715
- Zhiyou W. and Johnson B.M. (2009), "*Microalgae as a feedstock for biofuel production*", Virginia Cooperative Extension, Virginia State University, 442-886