



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΟΡΓΑΝΙΚΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ ΑΠΟ
ΑΠΟΒΛΗΤΟ ΟΙΝΟΠΟΙΕΙΟΥ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΑΠΟ
ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ**

Διπλωματική εργασία

της

ΒΑΣΙΛΙΚΗΣ ΑΡΙΑΔΝΗΣ ΑΞΑΟΠΟΥΛΟΥ

Επιβλέπων καθηγητής: ΠΕΤΡΟΣ ΓΚΙΚΑΣ

Χανιά, Μάρτιος 2017

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της καλλιέργειας μικροφυκών του στελέχους *Stiphoecoccus* sp. με χρήση οργανικού άνθρακα από απόβλητο οينوποιείου για τη παραγωγή βιομάζας, εξαγωγής λιπιδίων και παραγωγή βιοκαυσίμων. Η ανάγκη των μικροφυκών για CO₂ (πηγής άνθρακα) στο στάδιο ανάπτυξης τους, μας ώθησε στην επιλογή αποβλήτου από οينوποιείο για μείωση του κόστους αλλά και ταυτόχρονης μελέτης ενός οικονομικότερου τρόπου διαχείρισης των αποβλήτων από εγκαταστάσεις παραγωγής οίνου. Πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση μεταξύ των συνδυασμών συνθηκών ανάπτυξης, ώστε να προσδιοριστεί ο πιο αποτελεσματικός. Η καλλιέργεια των μικροφυκών λαμβάνει χώρα σε φωτο-βιοαντιδραστήρες. Συγκεκριμένα ,μέσα στους φωτο-βιοαντιδραστήρες καλλιεργήθηκαν μικροφύκη σε θαλασσινό νερό με τους εξής συνδυασμούς: (i) με θρεπτικά άλατα ,(ii) με απόβλητο οينوποιείου, (iii) με θρεπτικά άλατα και απόβλητο οينوποιείου και (iv) μόνο με θαλασσινό νερό..

Τα μικροφύκη καλλιεργήθηκαν σε επίπεδη επιφάνεια από γυαλί αμμοβολής, τοποθετημένο μέσα σε φωτο-βιοαντιδραστήρες, με ταυτόχρονη παροχή 2 τύπων φωτός (3500 και 5500 K). Μετά το πέρας των 18 ημερών καλλιέργειας , και 2 επιπλέον μερών με πενία αζώτου, η παραγωγή της ξηρής βιομάζας κυμαίνονταν μεταξύ 0.9, 1.1 και 1.2 mg/cm². Επιπλέον, κατά την διάρκεια της καλλιέργειας, το BOD μειώθηκε από 385 mg/L σε 42 mg/L μετά από 18 μέρες καλλιέργειας, ενώ σημειώθηκε περαιτέρω μείωση στα 30 mg/L, μετά το πέρας 2 επιπλέον ημερών με πενία αζώτου. Συνεπώς, υποδεικνύεται ότι ο οργανικός άνθρακας χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξης των μικροφυκών. Στη συνέχεια έλαβε χώρα η συλλογή της βιομάζας, έπειτα η εκχύλιση και εξάτμιση αυτής με σκοπό την εξαγωγή λιπιδίων. Τα λιπίδια που παράχθηκαν είναι της τάξεως των 0.05-0.07 mg_{lipids}/mg_{dry biomass} για 20 μέρες ανάπτυξης – κύκλου πενίας αζώτου.

ABSTRACT

Microalgae have been extensively used for the production of lipids, which are subsequently used as prime material for the production of biodiesel. The growth of microalgae and the production and separation of lipids from the cultures pose a number of challenges, such as the maximization of biomass and lipids yield, the harvesting of microalgae from the culture and the extraction of lipids from the biomass. Microalgae can grow on carbon dioxide, however they may use organic carbon as an extra carbon source. Thus, the use of readily available and low cost carbon substrate for the maximization of microalgae production is an interesting alternative. Moreover, if wastewater can be used as substrate, then the process may serve a dual purpose: lipids production and wastewater bioremediation.

In our laboratory, we have developed a novel process for microalgae growth and harvesting, which involves the growth of immobilized microalgae on flat solid surfaces, in shallow waters. Under the above conditions most of biomass is growing immobilized and can be easily separated using a scraper. Experiments were carried out on *Stichococcus* sp. monoculture, while lipids production was maximized by the application of nutrient starvation after full growth and prior to harvesting. In the present experiments, the effect of the type of growth media on the growth of immobilized *Stichococcus* sp., for the production of lipids, was examined. Three types of wastewater were used: (A) seawater with the addition nutrient salts, (B) seawater with the addition of diluted winery wastewater (1:600 wastewater : seawater) and (C) seawater with the addition of similar type diluted winery wastewater plus nutrient salts. Microalgae were grown on flat sand-blasted glass, in a photo bioreactor with working area of 0.14 m², using simultaneously 2 types of fluorescent light sources (3500 and 5500 K). The level of culture media above the growth layer was 4 cm. Each microalgae cultivation in the photo-bioreactor was 18 days long (after inoculation), followed by 2 days of nutrient starvation. The average biomass growth at harvesting was measured as: 0.9, 1.1 and 1.2 mg/cm² (dry basis) for culture media A, B and C, respectively. BOD reduction in the media used was also investigated for medium type B. In this case,

the BOD was reduced from 385 mg/L to 42 mg/L after 18 days of cultivation, while it was further reduced to 30 mg/L, after the 2 days nutrient starvation period. The above indicates that organic carbon was utilized as substrate during all phases of cultivation. Following harvesting, the biomass underwent extraction process to separate and collect the lipids. A yield of 0.05-0.07 mg_{lipids}/mg_{dry biomass} was calculated per 20 days growth/starvation cycle.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

| | |
|--|----|
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 6 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ | 7 |
| 2.1 Χρήση Φυκών | 8 |
| 2.2 Μικροφύκη..... | 10 |
| 2.2.1 Χαρακτηριστικά των Μικροφυκών | 10 |
| 2.2.2. Ανάπτυξη Μικροφυκών | 11 |
| 2.2.3. Φάσεις Κυτταρικής Ανάπτυξης | 12 |
| 2.3 Καλλιέργεια Μικροφυκών | 13 |
| 2.3.1 Φυτικοχημικοί Παράγοντες | 14 |
| 2.3.1.1 Φως | 14 |
| 2.3.1.2 Θερμοκρασία | 15 |
| 2.3.1.3 Θρεπτικά | 15 |
| 2.3.1.4 CO ₂ | 16 |
| 2.3.1.5 pH..... | 17 |
| 2.3.1.6.Αλατότητα | 17 |
| 2.3.1.7 Θολρότητα | 17 |
| 2.3.2 Συστήματα καλλιέργειας..... | 18 |
| 2.4 Εφαρμογές | 21 |
| 2.5 Παραγωγή λιπιδίων και υδρογονανθράκων από τα φύκη..... | 22 |
| 2.5.1 Βιοκαύσιμα..... | 22 |
| 2.6 Χαρακτηριστικά των αποβλήτων των οиноποιείων | 24 |
| 2.7.Εξαγωγή Λιπιδίων με οργανικό διαλύτη | 26 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ | 28 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 30 |
| 4.1 Περιγραφή πειραμάτων καλλιέργειας μικροφυκών | 30 |
| 4.2 Υλικά και Μέθοδοι | 34 |
| 4.3 Μέθοδος Εξαγωγής Λιπιδίων | 36 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 39 |
| 5.1 Καλλιέργεια Μικροφυκών | 39 |
| 5.2.Αποτελέσματα από τη διαδικασία εξαγωγής λιπιδίων | 52 |
| 5.3. Υπολογισμός απαιτούμενης έκτασης της καλλιέργειας | 53 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... | 54 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 57 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι πρώτες έρευνες για τη φυσιολογία των μικροφυκών σημειώνονται στα τέλη του 19ου αιώνα, ενώ οι βιοτεχνολογικές εφαρμογές άρχισαν στα μέσα του 20ου αιώνα (Spolaore et al., 2006). Η πρώτη καλλιέργεια ενός είδους μικροφύκους, *Chlorella vulgaris*, χρονολογείται στο 1890 από τον Beijerinck ενώ η φυσιολογία των φυτών μελετήθηκε το 1919 στο Warburg της Γερμανίας. Το 1948 παρατηρείται μαζική καλλιέργειά τους στο πανεπιστήμιο Stanford των Ηνωμένων Πολιτειών, στο Essen της Γερμανίας και στο Τόκυο της Ιαπωνίας με τις αντίστοιχες μελέτες να συνοψίζονται στο βιβλίο του Burlew το 1953 (Aravantinou et al., 2013).

Στις αρχές της δεκαετίας του 1950, η διαπίστωση της υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες ήταν το έναυσμα για την έναρξη της χρήσης τους στο χώρο της φαρμακοβιομηχανίας. Την ίδια περίοδο άρχισαν και οι πρώτες μελέτες για τη χρήση τους ως αντιβιοτικά (Spolaore, 2006). Στην Ιαπωνία αναπτύχθηκε η πρώτη καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα στις αρχές της δεκαετίας του 1960 κατά την οποία ασχολήθηκαν με το είδος *Chlorella*. Η πρώτη πιλοτική μονάδα ανάπτυξης μικροφυκών πραγματοποιήθηκε στην οροφή κτιρίου του πανεπιστημίου MIT των Ηνωμένων Πολιτειών το 1951 από την εταιρία του Arthur D. Little (Arthur D. Little Inc.) με χρήση του στελέχους *Chlorella pyrenoidosa*. Στόχος ήταν η συνεχής ανάπτυξη των μικροφυκών, η μελέτη των συνθηκών ανάπτυξής τους, η αποτίμηση της οικονομικής βιωσιμότητας ενός παρόμοιου έργου και η χρήση των προϊόντων της καλλιέργειας (Borowitzka, 1999).

Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1970 αυξήθηκε το ενδιαφέρον της χρήσης των μικροφυκών ως εναλλακτική πηγή ενέργειας, λόγω της πρώτης πετρελαϊκής κρίσης (Mata et al., 2010). Δεδομένου, της επιτακτικής ανάγκης για τη μείωση των αέριων εκπομπών του θερμοκηπίου, της ασταθής τιμής του πετρελαίου και της τάσης για τη χρήση εναλλακτικών πηγών ενέργειας και καυσίμων οδεύουν στην όλο και αυξανόμενη εκδήλωση ενδιαφέροντος προς την επεξεργασία των μικροφυκών για την παραγωγή βιοντίζελ. Αρκετές εταιρίες έχουν ήδη κατασκευάσει αντιδραστήρες για την παραγωγή βιοντίζελ από μικροφύκη (PBRs). (Yusuf and Jinyue, 2011).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

Τα φύκη - (και όχι φύκια) -στα λατινικά *algae*, στον ενικό το φύκος (*alga*) - αποκαλούνται λανθασμένα και άλγες από τα λατινικά. Η ύπαρξη των φυκών στη Γη χρονολογείται πριν από 3,5 δισεκατομμύρια χρόνια και θεωρείται ως η πρώτη μορφή ζωής (Margulis, 1981). Η ανάπτυξή τους επιτυγχάνεται μέσω της φωτοσύνθεσης, η οποία πραγματοποιείται με τη συμβολή των χλωροπλαστών. Συγκεκριμένα δεσμεύουν CO₂ από την ατμόσφαιρα και παράγουν οξυγόνο όπως τα φυτά αλλά στερούνται φύλλων, στελεχών, ανθών, ριζών, δεν σχηματίζουν σπέρματα ή καρπούς όπως τα ανώτερα φυτά (Harlim and Darley, 1988). Χαρακτηριστικό τους είναι ο σχηματισμός σπόρων αντί σπερμάτων και έχουν πρωτόγονη οργάνωση.

Μπορούν να χαρακτηριστούν και ως μια μεγάλη πολυφυλετική κατηγορία μονοκύτταρων ή πολυκύτταρων οργανισμών με ποικιλότροπα μεγέθη και σχήματα. Η πλειοψηφία των φυκών είναι υδρόβια φυτά και ζουν σε γλυκά, υφάλμυρα ή θαλασσινά νερά. Επίσης διακρίνονται σε 2 μεγάλες μορφολογικές κατηγορίες: τα μακροφύκη και τα μικροφύκη.

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*). Αντιθέτως, τα μικροφύκη έχουν μήκος από μερικά μικρόμετρα (συνήθως 0.2-50 μm τα μονοκύτταρα μέχρι 100-200 μm στις περιπτώσεις των νηματωδών πολυκύτταρων *σχηματισμών* (Barsanti and Gualtieri, 2006))

Η Βιολογία, η φυσιολογία και η οικολογία των μικροφυκών διαφέρουν ανάλογα με την ταξινόμηση του μικροφύκου. Οι βασικότερες ομάδες μικροφυκών 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 Ραφιδόφυτα (*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). Επίσημα έχουν καταγραφεί πάνω από 120.000 είδη αλλά ο πραγματικός αριθμός τους μάλλον είναι κατά πολύ μεγαλύτερος (Metting, 1996).

2.1 Χρήση Φυκών

Τα φύκη, και κυρίως τα μικροφύκη, φαίνεται να αποτελούν μια νέα πηγή πρωτεϊνών με ποιότητα ίδια ή και ανώτερη σε σύγκριση με τις πρωτεΐνες των συμβατικών φυτών (Becker 2007). Εξάλλου, σύμφωνα με τον Fleurence (1999), τα μακροφύκη αποτελούν σημαντική πηγή ανόργανων ουσιών και παράλληλα περιέχουν πολυσακχαρίτες με «λειτουργικές ιδιότητες», οπότε θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην παρασκευή νέων τροφίμων κατάλληλων για τον άνθρωπο – κυρίως σε προϊόντα υγιεινής διατροφής. Επιπρόσθετα, ο Nonomura (1988) αναφέρει ότι οι κυτταρίνες των πράσινων φυκών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή χαρτιού ως μια εναλλακτική οικονομική λύση για χώρες με μεγάλη ακτογραμμή και περιορισμένο αριθμό δασών.

Επιπροσθέτως, τα μικροφύκη περιέχουν ω-3 λιπαρά οξέα πολύτιμα για τα ζώα και τον άνθρωπο, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή για παραγωγή βιοκαυσίμων φιλικών προς το περιβάλλον. Τα φύκη, σε σύγκριση με τα παραδοσιακά ελαιούχα σπέρματα, παράγουν πέντε φορές περισσότερη βιομάζα/ανά εκτάριο – όπως φαίνεται στον πίνακα 2.1- και περιέχουν 30-40% έλαιο που χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενέργειας (Bayer et al., 2007).

Πίνακας 2.1 : Σύγκριση ετήσιας παραγωγής ελαίων σε διάφορα φυτικά είδη
(Mata et al.,2010)

| ΕΙΔΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ | ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΑΙΩΝ (L/ha) |
|------------------------------------|---------------------------|
| Καλαμπόκι | 172 |
| Σόγια | 446 |
| Φιστίκι | 1059 |
| Canola | 1190 |
| Ελαιοράμβη | 1190 |
| Jatropha | 1892 |
| Karanj (<i>Pongamia pinnata</i>) | 2590 |
| Καρύδα | 2689 |
| Φοινικέλαιο | 5950 |
| Μικροφύκη (30% έλαιο κ.β.) | 58700 |
| Μικροφύκη (70% έλαιο κ.β.) | 136900 |

Από τα θαλάσσια μακροφύκη, *Phaeophyta* και *Rhodophyta*, λαμβάνονται διάφορα προϊόντα, που κατατάσσονται στις πρόσθετες ύλες διατροφής, όπως αλγινικό οξύ και τα άλατά του, αγάρ, καραγεννάνες. Τα παραπάνω προϊόντα χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία των τροφών ως γαλακτοματοποιητές, σταθεροποιητές, συνδετικές ή αντισυσσωματικές ύλες με πολλές εφαρμογές σε γαλακτοκομικά προϊόντα, ζαχαρωτά, χυμούς φρούτων, μαρμελάδες, κατεψυγμένα τρόφιμα.(Lewis et al., 1988).

Επίσης, στην κατηγορία των πρόσθετων υλών διατροφής, ανήκουν και οι χρωστικές των φυκών, οι οποίες σύμφωνα με τον Becker (1994), είναι φυσικές και μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά με τις συνθετικές χρωστικές. Όλα άλλωστε τα είδη φυκιών περιέχουν έναν ή περισσότερους τύπους χλωροφύλλης, η οποία είναι φωτοσυνθετική χρωστική.

Μια άλλη σπουδαία κατηγορία χρωστικών που βρίσκονται στα φύκη είναι τα καροτενοειδή, από τα οποία εμπορική αξία έχουν τα: β-καροτένιο, το λυκοπένιο, η ζεαξανθίνη, η ασταξανθίνη και η λουτεΐνη, που χρησιμοποιούνται στα διάφορα τρόφιμα. Η χρήση των μακροφυκών ως λίπασμα του εδάφους για την παραγωγή αγροτικών προϊόντων ήταν γνωστή από τους αρχαίους χρόνους (Stephenson, 1974).

Τα φύκη δίνουν οργανικό λίπασμα υψηλής απόδοσης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί, με μεγάλη αποτελεσματικότητα, στις καλλιέργειες λαχανικών, φρούτων και ανθέων, ενώ ταυτόχρονα προστατεύουν το περιβάλλον (McHugh, 2003). Διάφορα είδη φυκών εμφανίζουν και θεραπευτικές ιδιότητες, όπως π.χ. το είδος *Spirulina* στην ίαση τραυμάτων ή στον καταρράκτη (Jassby, 1988). Ακόμη, μερικά θαλάσσια φύκη παράγουν αντιβιοτικά, ενώ κάποια μακροφύκη ή και μικροφύκη περιέχουν φαινόλες που είναι γνωστές για τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες (Becker, 1994).

Τα φύκη βρίσκουν εφαρμογή και στην κοσμετολογία για την παρασκευή διάφορων κρεμών, αλάτων μπάνιου και άλλων καλλυντικών (McHugh, 2003). Τα τελευταία χρόνια, όπως αναφέρεται από τους Wharton et al. (1988), τα φύκη θα μπορούσαν να αποτελέσουν τροφή για τους αστροναύτες στο διάστημα, ενώ χρησιμοποιούνται ως μοντέλα οργανισμών για πειραματικές και θεωρητικές μελέτες εξαιτίας της δυνατότητάς τους να υποστηρίξουν τη ζωή σε συνθήκες εκτός της γήινης ατμόσφαιρας, όπως π.χ. σε άλλους πλανήτες

2.2 Μικροφύκη

2.2.1 Χαρακτηριστικά των Μικροφυκών

Τα μικροφύκη περιλαμβάνουν κοκκοειδείς, μαστιγωτές, ή παλμελοειδείς μορφές και τριχώματα αλλά και μεγάλους αποικιακούς σχηματισμούς με νήματα, μικροθαλλούς ή πιο περίπλοκες συσσωματώσεις

Υπάρχουν απλές μονοκύτταρες μορφές, αποικιακές, μικροσκοπικές, νηματοειδείς έως πολύπλοκες διακλαδισμένες ή όχι. Ορισμένα μοιάζουν με μικροσκοπικούς θάμνους, με τσαμπιά σταφυλιού, και άλλα με φύλλα, με δίκτυ, με σωλήνες. Υπάρχουν φύκη μικροσκοπικά, αόρατα με γυμνό μάτι, όπως για παράδειγμα αυτά που συμμετέχουν στο φυτοπλαγκτόν, και αποκαλούνται συλλογικά μικροφύκη. Άλλα είναι ορατά με γυμνό μάτι, αυτό που βλέπουμε το ονομάζουμε θαλλό, ή και μεγάλων διαστάσεων που φθάνουν αρκετά μέτρα μήκος όπως για παράδειγμα τα μεγάλα Φαιοφύκη, -συλλογικά τα αποκαλούμε μακροφύκη-. Μικροσκοπικά είναι τα Διάτομα, τα Πυρροφύκη (ή Δινοφύκη), αρκετά Χλωροφύκη, λίγα Ροδοφύκη και μερικές λιγότερο γνωστές ομάδες. Μια ιδιαίτερη ομάδα είναι τα προκαρυωτικά Κυανοφύκη (όλες οι υπόλοιπες ομάδες φυκών ανήκουν στους ευκαρυωτικούς

οργανισμούς), που σήμερα ταξινομούνται στα φωτοσυνθετικά βακτήρια και ονομάζονται Κυανοβακτήρια αλλά αναφέρονται και ως Κυανοφύκη, ιδιαίτερα όσα χρησιμοποιούνται στη διατροφή και στην κοσμετολογία (Ελληνική Φυκολογική Εταιρεία). Μαζί με τα μακροφύκη που διαβιούν στην παραλιακή ζώνη, το φυτοπλαγκτόν και τα βενθικά μικροφύκη του εύφωτου πυθμένα, αποτελούν τους κύριους (είτε μοναδικούς) πρωτογενείς παραγωγούς βιομάζας 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 (Jassby, 1988).

2.2.2. Ανάπτυξη Μικροφυκών

Τα μικροφύκη λειτουργούν ως φωτοσύνθετοι μικροοργανισμοί που παράγουν οξυγόνο. Ο ήλιος αποτελεί πηγή ενέργειας και το CO₂ πηγή άνθρακα για την ανάπτυξή τους.

Ο μεταβολισμός των μικροφυκών μπορεί να είναι αυτοτροφικός, ετεροτροφικός, μικτοτροφικός ή φωτοετεροτροφικός. Η ικανότητα αλλαγής του μεταβολικού μηχανισμού τους από ορισμένα μικροφύκη τους δίνει τη δυνατότητα να προσαρμόζονται στις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν..

- Φωτοαυτοτροφικά: χρησιμοποιούν το φως ως μοναδική πηγή ενέργειας, που με τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης μετατρέπεται σε χημική ενέργεια. Στην κατηγορία αυτή, τα μικροφύκη αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα το CO₂ ή άλλες ανόργανες μορφές.
- Χημειοετεροτροφικά (Ετεροτροφικά): όπου τα μικροφύκη χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας και πηγή οργανικού άνθρακα διάφορες οργανικές ουσίες όπως γλυκόζη, οξικό οξύ, γλυκερίνη, δεν φωτοσυνθέτουν.
- 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 ετεροχρονικά 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 τα μικροφύκη χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας τον ήλιο και σαν πηγή άνθρακα τις οργανικές ενώσεις (Chojnacka and Marquez-Rocha, 2004).

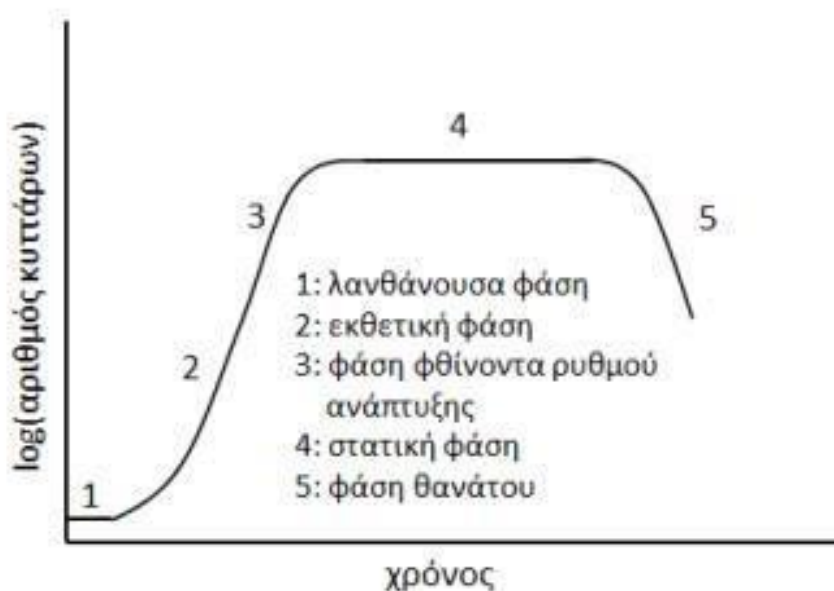
2.2.3. Φάσεις Κυτταρικής Ανάπτυξης

Η επαρκής ποσότητα και οι κατάλληλες συνθήκες συμβάλλουν στη γρήγορη και αποτελεσματική ανάπτυξή τους. 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 μικροφυκών περιλαμβάνει πέντε φάσεις, όπως απεικονίζεται και στο Διάγραμμα 2.1. Συγκεκριμένα έχουμε:

1. Λανθάνουσα φάση: Τα κύτταρα προσαρμόζονται στις συνθήκες περιβάλλοντος, χωρίς να πολλαπλασιάζονται. Στη φάση αυτή αυξάνονται τα ένζυμα και οι μεταβλητές 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 παραγόμενων μικροφυκών είναι αυξημένη (Lavens, 1996).



Διάγραμμα 2.1. Φάσεις κυτταρικής ανάπτυξης των μικροφυκών (Κόλλιας, 2013)

2.3 Καλλιέργεια Μικροφυκών

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 το φως, η θερμοκρασία, τα θρεπτικά, το CO₂, το pH, η αλατότητα καθώς και η θολερότητα. Στους βιοτικούς παράγοντες

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

2.3.1 Φυσικοχημικοί Παράγοντες

2.3.1.1 Φως

Η ανάπτυξη των μικροφυκών σε εσωτερικούς και εξωτερικούς χώρους εξαρτάται άμεσα από το είδος της ακτινοβολίας και την ένταση αυτής. Η φωτοσύνθεσή τους πραγματοποιείται σε μήκη κύματος μεταξύ 400 και 700 nm . Σε χαμηλά έως και μέτρια επίπεδα φωτός, η απόδοση της φωτοσύνθεσής τους κυμαίνεται από 4,5 % έως και 7% σε λίμνες και φωτοαντιδραστήρες (*Scragg et al.*, 2002), δηλαδή παράγουν $30 - 40 \text{ gr}_{\text{dry biomass}} \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. . Το άφθονο φως είναι απαραίτητο για την 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. Επίσης, 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). Τα περισσότερα εμπορικά συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών εξακολουθούν να διεξάγονται σε ανοικτές δεξαμενές με χρήση της ηλιακής ενέργειας ως μοναδική πηγή φωτός. Όμως θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη τα προβλήματα που ενδέχεται να δημιουργηθούν από την ανάπτυξη καλλιεργειών σε μεγάλο όγκο και μεγάλη συγκέντρωση μικροφυκών λόγω δυσκολίας διείσδυσης του φωτός. Ωστόσο, η απόδοση των εξωτερικών συστημάτων είναι συνήθως χαμηλή, και απαιτείται μεγάλη επιφάνεια (Ma and Hanna, 1999).

2.3.1.2 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 η λειτουργία σε θερμοκρασία μεγαλύτερη κατά 2 έως 4 °C από τη βέλτιστη θερμοκρασία, μπορεί να οδηγήσει στην πλήρη 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 μεταξύ 20 – 26 °C (Moheimani, 2005).

2.3.1.3 Θρεπτικά

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 ανάπτυξη της βιομάζας μικροφυκών και η περιεκτικότητά της σε λιπίδια είναι αντιστρόφως ανάλογα μεταξύ τους σε συνθήκες στρες. Για παράδειγμα, η στέρηση του αζώτου (ή φωσφορικών, σε μικρότερο βαθμό), περιορίζει την ανάπτυξη των κυττάρων, αυξάνοντας παράλληλα την περιεκτικότητα σε λιπίδια. Μελέτες έδειξαν (Liu et al, 2008) 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. Οι Illman et al. (2000) διαπίστωσαν ότι η μείωση του αζώτου στο θρεπτικό υπόστρωμα, αυξάνει την περιεκτικότητα των λιπιδίων. 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.

2.3.1.4 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 χρησιμοποιείται το CO₂ της ατμόσφαιρας. Όταν το ατμοσφαιρικό CO₂ δεν επαρκεί, ακολουθεί τεχνητή εισαγωγή. Στα κλειστά συστήματα η αξιοποίηση του ατμοσφαιρικού CO₂ δεν είναι δυνατή 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 βίο-σταθεροποίηση των εκπομπών CO₂ σε θερμοηλεκτρικές μονάδες

2.3.1.5 pH

Το pH είναι άλλος ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τον ρυθμό ανάπτυξης των μικροφυκών σε καλλιέργειες. Τα περισσότερα μικροφύκη αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με pH που κυμαίνεται μεταξύ 7 – 9 (Νικολάου, 2016).

2.3.1.6.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 ωσμωτικό στρες λόγω υψηλής συγκέντρωσης αλάτων,
- 2) προκαλώντας ιοντικό στρες λόγω υψηλής ιοντικής ισχύος,
- 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).

2.3.1.7 Θολερότητα

Η θολερότητα 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. Χαμηλές τιμές θολερότητας έχουν σαν αποτέλεσμα την γρήγορη ανάπτυξη της καλλιέργειας, λόγω αυξημένης διαπερατότητας του φωτός σε όλη τη στήλη του διαλύματος της καλλιέργειας. Σε αντίθεση, υψηλές τιμές θολερότητας προκαλούν την εμπόδιση της διαπερατότητας του φωτός με συνέπεια την μείωση της ανάπτυξης. 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).

2.3.2 Συστήματα καλλιέργειας

Τα συστήματα καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται για καλλιέργειες μικροφυκών είναι ανοιχτά, κλειστά και βιοαντιδραστήρες. Τα ανοιχτά συστήματα (Open Ponds) – όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.1- (ανοιχτές λίμνες – open ponds) είναι 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).



Εικόνα 2.1 : Ανοιχτό σύστημα καλλιέργειας μικροφυκών

(http://www.makebiofuel.co.uk/wp-content/uploads/2010/10/biofuel_algae.jpg)

Ορισμένα από τα μειονεκτήματα των ανοιχτών συστημάτων είναι τα εξής: 1) Επειδή είναι ανοικτά στον αέρα, συχνά υπάρχει απώλεια νερού λόγω εξάτμισης και η παραγωγή βιομάζας είναι περιορισμένη. 2) Η παραγωγή βιομάζας επηρεάζεται σημαντικά και από επιμόλυνση της καλλιέργειας και από διάφορα άλλα είδη μικροφυκών, καθώς και από άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς. 3) 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). Όμως, το κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας των ανοιχτών συστημάτων είναι χαμηλότερο συγκριτικά με αυτό των κλειστών συστημάτων.

Τα κλειστά συστήματα (Φωτο-βιοαντιδραστήρες - PBRs: photobioreactors) 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*).



Εικόνα 2.2 : Κλειστό σύστημα καλλιέργειας μικροφύκη.

http://www.nanovoltaics.com/sites/default/files/styles/large/public/column_reactor_0.png?itok=trKCFjJj

Το πλέον χρησιμοποιούμενο μοντέλο αντιδραστήρα αυτής της κατηγορίας είναι σωληνοειδούς μορφής-πως φαίνεται στην Εικόνα 2.2- 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. Συχνά απαιτείται και η χρήση τεχνικού φωτός, γεγονός που επιβαρύνει τα συνολικά έξοδα. Για την αποτροπή επικάθιση βιομάζας των μικροφυκών , χρησιμοποιείται αντλία για την επικράτηση τυρβώδους ροής στον αντιδραστήρα.(Zhiyou and Johnson, 2009).

Μερικά από τα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν οι φωτο-βιοαντιδραστήρες σε σχέση με τα ανοικτά συστήματα είναι οι εξής: Αρχικά, είναι δύσκολο να κατασκευαστούν σε μεγάλη κλίμακα.. Δεύτερον, σημειώνεται πρόβλημα με τον φωτισμό, μια που είναι δύσκολο το φως να διεισδύσει σε μεγάλο βάθος. Τρίτον, γενικά οι διεργασίες διαχωρισμού των μικροφυκών από το υγρό που αναπτύσσονται παρουσιάζουν δυσκολίες και έχουν σχετικά μικρή απόδοση. Στο Εργαστήριο Σχεδιασμού Περιβαλλοντικών Εγκαταστάσεων του Πολυτεχνείου Κρήτης ερευνάται η δυνατότητα ανάπτυξης των μικροφυκών ακινητοποιμένων σε επίπεδες επιφάνειες, για αύξηση της παραγωγικότητας ανά m^2 , μείωση του υπερκείμενου υγρού και συνεπώς αύξηση της διαπερατότητας φωτός και για ευκολία στο διαχωρισμό και τη συλλογή τους.

2.4 Εφαρμογές

Τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται σε αρκετές περιβαλλοντικές εφαρμογές.

- Χρησιμοποιούνται ως λίπασμα ή εδαφοβελτιωτικό.
- Λόγω των ακόρεστων λιπαρών οξέων και βιταμινών που περιέχουν, περιλαμβάνονται σ' αρκετά ιατρικά σκευάσματα.
- Η ύπαρξη πρωτεϊνών μετά την εξαγωγή ελαίου παρέχει την δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως ζωοτροφές.
- Η ικανότητα να δεσμεύουν άζωτο και φώσφορο για να αναπτυχθούν συμβάλει στο καθαρισμό λυμάτων.
- Η παραγωγή βιομάζας από αυτά μπορεί να παράγει θερμότητα και ηλεκτρισμό.
- Η ύπαρξη μεγάλης ποσότητας βιομάζας από αυτά συντελεί στην παραγωγή και εξαγωγή ελαίων.

2.5 Παραγωγή λιπιδίων και υδρογονανθράκων από τα φύκη

Τα λιπίδια και οι υδρογονάνθρακες βρίσκονται σε ολόκληρη την κυτταρική μάζα των μικροφυκών, αποθηκεύουν έγκλειστα προϊόντα στο κυτόπλασμα και αποτελούν λειτουργικά συστατικά διαφόρων μεμβρανών. Σε κάποιες περιπτώσεις εκκρίνονται εξωκυττάρια σαν αμιγή ελαιούχα σφαιρίδια. Η λιπιδική σύνθεση μπορεί να ρυθμιστεί με την προσθήκη ή τον περιορισμό συγκεκριμένων ουσιών στο διάλυμα της καλλιέργειας. Για παράδειγμα η έλλειψη αζώτου (πενία αζώτου) αυξάνουν τη συνολική παραγωγή λιπιδίων (Meng et al, 2011) Ο τύπος και το επίπεδο των υδρογονανθράκων που παράγονται συχνά δέχεται επιδράσεις από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως: το φως, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση των ιόντων και το pH.

2.5.1 Βιοκαύσιμα

Βιοκαύσιμα χαρακτηρίζονται τα καύσιμα τα οποία παράγονται από ανανεώσιμες ύλες και χρησιμοποιούνται είτε πρωτογενώς είτε κατόπιν επεξεργασίας. Τα βιοκαύσιμα λόγω του ότι είναι μη-τοξικά, βιοαποικοδομήσιμα, έχουν αμελητέες εκπομπές μονοξειδίου του άνθρακα, οξειδίων του θείου και μικροσωματιδίων. (Puhan et al., 2005; Ayhan Demirbas, 2007).

Στην κατηγορία των βιοκαυσίμων ανήκουν:

- Βιοντίζελ: Μεθυλεστέρας παραγόμενος από φυτικά έλαια και ζωικά λίπη.
- Βιοαιθανόλη: αιθανόλη παραγόμενη από σακχαρούχα και αμυλούχα φυτά.
- Βιοαέριο: Παράγεται από βιομάζα ή/και από το βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα αποβλήτων
- Βιομεθανόλη: μεθανόλη παραγόμενη από βιομάζα.
- Βιοδιμεθυλαιθέρας: Πρόκειται για διμεθυλαιθέρα που παράγεται από βιομάζα.
- Βιο-ETBE: Αιθυλοτριτοβουτυλαιθέρας που παράγεται από Βιοαιθανόλη.
- Βιο-MTBE: Μεθυλοτριτοβουτυλαιθέρας που παράγεται από Βιομεθανόλη.
- Συνθετικά βιοκαύσιμα: συνθετικοί υδρογονάνθρακες ή μίγμα αυτών που έχουν προέλθει από βιομάζα.
- Βιοαέριο: Δημιουργείται υπό αναερόβιες συνθήκες αποδόμησης της οργανικής

ύλη (Schamphelaire and Verstraete, 2009)

- Syngas: Προϊόν αεριοποίησης της οργανικής ύλης, που αποτελείται κυρίως από υδρογόνο και μονοξείδιο του άνθρακα.
- Καθαρά φυτικά έλαια: Έλαια φυτών παραγόμενα με μεθόδους όπως η συμπίεση, η έκθλιψη φυσικά ή εξευγενισμένα αλλά μη χημικώς τροποποιημένα.
- Βιουδρογόνο: Υδρογόνο που παράγεται από βιομάζα ή/και από βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα βιομηχανικών και αστικών αποβλήτων (Τουλούμης , 2010)

Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για παραγωγή βιοκαυσίμων είναι:

Φυτά πλούσια σε κυτταρίνη (π.χ. γλυκό σόργο, αγριαγκινάρα)

Γεωργικά παραπροϊόντα (π.χ. άχυρα, φύλλα και κελύφη καρπών)

Βιομηχανικά παραπροϊόντα (π.χ. πριονίδι, όξινα έλαια, λιπαρά οξέα και απόβλητα σφαγείων)

Τα κύρια μειονεκτήματα των βιοκαυσίμων που προέρχονται από τα παραπάνω είναι η διαθεσιμότητα των πρώτων υλών καθώς και των απαιτούμενων γεωργικών εκτάσεων αλλά και του ύδατος.

Το πλεονέκτημα των μικροφυκών να επιτυγχάνεται η μετατροπή τους σε καθαρή ενέργεια (βιοντίζελ) με τη λιγότερη απαίτηση σε ενέργεια τα καθιστά σημαντικά ανάμεσα στα βιοκαύσιμα. Απαραίτητη όμως προϋπόθεση είναι να επιλέγεται το κατάλληλο στέλεχος από μικροφύκη, το οποίο κατά τη διαδικασία της ανάπτυξής του έχει υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια, αφού από την περαιτέρω επεξεργασία των λιπιδίων θα προκύψει το βιοντίζελ. Επίσης, απαραίτητη είναι η γνώση των συνθηκών στις οποίες αναπτύσσονται στο φυσικό τους περιβάλλον, ώστε και στη μονάδα μαζικής παραγωγής αυτών να προσεγγίζουν τις φυσικές.

Ως βιοντίζελ ορίζεται ο μονοαλκυλοεστέρας φυτικών ελαίων ή ζωικών λιπών. Τα φυτικά έλαια και λίπη εμφανίζουν ιξώδες 10 -17 φορές μμεγαλύτερο από το ντίζελ πετρελαίου. Η χημική μετατροπή των ελαίων στον αντίστοιχο λιπαρό εστέρα (βιοντίζελ) ονομάζεται μετεστεροποίηση και έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του

ιξώδους του ελαίου. Η αντίδραση πραγματοποιείται με ή χωρίς παρουσία καταλύτη μέσω πρωτοταγούς ή δευτεροτούς μονουδροξυλικής αλειφατικής αλκοόλης με 1 έως 4 άτομα άνθρακα (Ayhan Demirbas, 2007).

Το βιοντίζελ που παράγεται από αγροτικές σοδειές ή λίπη ζώων και εξάγεται μέσω των υπάρχουσών μεθόδων δεν γίνεται να αντικαταστήσει τα συμβατικά καύσιμα μεταφοράς. Όμως, εναλλακτική λύση προτείνεται το βιοντίζελ από μικροφύκη. Τα έλαια των μικροφυκών μπορούν να αντικαταστήσουν τις δημοφιλέστερες τροφοδοσίες παραγωγής ελαίων όπως: soybean, canola, jathropa, palm, λίπη ζώων.

Το βιοντίζελ από μικροφύκη μπορεί να χρησιμοποιηθεί στους υπάρχοντες κινητήρες πετρελαίου χωρίς να απαιτούνται σημαντικές τροποποιήσεις και είναι συμβατό με την υπάρχουσα υποδομή διανομής πετρελαίου (Du et al. 2008).

Τα πλεονεκτήματα του βιοντίζελ από μικροφύκη σε σχέση με άλλα βιοκαύσιμα είναι τα εξής:

- Ο ταχύς ρυθμός ανάπτυξης τους.
- Η Υψηλή παραγωγή ανά στρέμμα.
- Κάποια είδη μπορούν να συλλέγονται καθημερινά.
- Μη τοξικά και μη περιεκτικότητα σε θείο.

Τα μειονεκτήματα παραγωγής βιοντίζελ από μικροφύκη σε

- Απαιτούνται ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας για την ανάπτυξή τους.
- Χρειάζονται μεγάλη ποσότητα νερού και έκτασης για καλλιέργεια.
- Χρειάζονται φώσφορο για την ανάπτυξή τους.

2.6 Χαρακτηριστικά των αποβλήτων των οινοποιείων

Τα απόβλητα από τα οινοποιεία είναι υγρά απόβλητα, με μεγάλη περιεκτικότητα σε αιωρούμενα και διαλυμένα στερεά, στα οποία περιλαμβάνονται συστατικά όπως σάκχαρα, αιθανόλη, οργανικά οξέα, αλδεΐδες και άλλα προϊόντα της αλκοολικής

ζύμωσης, όπως και σάπωνες και απορρυπαντικά που προέρχονται από διεργασίες καθαρισμού. Τα αιωρούμενα στερεά μεγαλύτερου μεγέθους προέρχονται από φλοιούς από ρόγες σταφυλιών, φύλλα, κοτσάνια και γίγαρτα (κουκούτσια). Ενώ σε αντίθεση, τα στερεά μικρού μεγέθους αποτελούνται από νεκρά κύτταρα ζύμης και κομμάτια κυττάρων.

Το χαμηλό pH των αποβλήτων ευθύνεται στα οργανικά οξέα και στα οξέα που δημιουργήθηκαν κατά τη διεργασία της ζύμωσης.. Σε σύγκριση με πολλά άλλα απόβλητα γεωργικής προέλευσης, τα απόνερα των οινοποιείων είναι συνήθως χαμηλής περιεκτικότητας σε άζωτο, έλαια και λίπη συγκριτικά με τα απόβλητα γεωργικής προέλευσης. (Δεμερτζή, 2014)

Το χαμηλό pH των αποβλήτων ευθύνεται στα οργανικά οξέα και στα οξέα που δημιουργήθηκαν κατά τη διεργασία της ζύμωσης.. Σε σύγκριση με πολλά άλλα απόβλητα γεωργικής προέλευσης, τα απόνερα των οινοποιείων είναι συνήθως χαμηλής περιεκτικότητας σε άζωτο, έλαια και λίπη συγκριτικά με τα απόβλητα γεωργικής προέλευσης. (Δεμερτζή, 2014)

Η χρήση χημικών ουσιών – φωσφορικό νάτριο, απορρυπαντικά- κατά τη διαδικασία της απολύμανσης των δοχείων είναι σε μικρές ποσότητες και η επιβάρυνση των αποβλήτων από αυτά είναι μικρή. Επιπλέον, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η ποικιλομορφία της σύστασης των αποβλήτων από οινοποιεία εξαρτάται από την εποχή τους έτους και τι είδους εργασίες λαμβάνουν χώρα τη δεδομένη στιγμή στο οινοποιείο... Για παράδειγμα, κατά την περίοδο της συγκομιδής και της έκθλιψης των σταφυλιών που είναι τέλος Αυγούστου μέχρι μέσα Οκτωβρίου σημειώνονται οι μεγαλύτερες τιμές σε οργανικό φορτίο). Στον Πίνακα 2.3 παρουσιάζονται τυπικές τιμές για τα απόβλητα οινοποιείων. Επιπροσθέτως, τα απόβλητα από τα οινοποιεία δεν περιέχουν παθογόνους μικροοργανισμούς επιβλαβείς για την ανθρώπινη υγεία, για αυτό μπορούν να αξιοποιηθούν περαιτέρω χωρίς να χρειάζονται απολύμανση, όταν δεν αναμειγνύονται με τα απόβλητα από τις τουαλέτες. Ο όγκος αποβλήτων που παράγεται ανά τόνο κρασιού κυμαίνεται από 0,379- 2,271 m³ (Δεμερτζή, 2014).

Πίνακας 2.3 : Τυπικά χαρακτηριστικά αποβλήτων οινοποιείων. (Vlyssides et al.2005)

| Παράμετροι | Άσπρο Κρασί | Κόκκινο Κρασί |
|-------------------------------------|-------------|---------------|
| pH | 6 | 6,2 |
| Ολικά στερεά mg/l | 3900 | 4100 |
| Πτητικά στερεά | 3400 | 3750 |
| Αιωρούμενα στερεά (mg/l) | 140 | 220 |
| Αιωρούμενα πτητικά στερεά (mg/l) | 128 | 200 |
| BOD ₅ στους 20° C (mg/l) | 1740 | 1970 |
| COD (mg/l) | 3112 | 3997 |

Είναι γεγονός ότι παρά την υπάρχουσα νομοθεσία, η πλειονότητα των οινοποιείων απορρίπτει τα απόβλητά στο δίκτυο αποχέτευσης, χωρίς να έχουν υποστεί προεπεξεργασία. Έτσι δημιουργούνται αρκετά προβλήματα στους βιολογικούς καθαρισμούς επεξεργασίας αστικών υγρών αποβλήτων.

2.7.Εξαγωγή Λιπιδίων με οργανικό διαλύτη

Στις μέρες μας, η παραγωγή βιοκαυσίμων από φύκη αποτελεί θέμα συζητήσεων λόγω του υψηλού κόστους και για τη βιωσιμότητα των φυκών.

Βασιζόμενοι στο νόμο της Χημείας ‘ Τα όμοια διαλύουν όμοια’ πραγματοποιείται η διεργασία εξαγωγής λιπιδίων από τη βιομάζα των μικροφυκών. Εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υδροφοβικών αλυσίδων των λιπαρών οξέων, τα ουδέτερα λιπίδια συνδέονται με ασθενείς δεσμούς van der Waals μεταξύ τους με αποτέλεσμα να σχηματίζονται σφαιρίδια στο κυττόπλασμα;(Medina et al., 1998). Όταν ένα κύτταρο μικροφυκών εκτεθεί σε μη πολικό οργανικό διαλύτη, όπως το εξάνιο ή το χλωροφόρμιο, ο διαλύτης εισχωρεί μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στο κυττόπλασμα όπου αλληλοεπιδρά με τα ουδέτερα λιπίδια μέσω δυνάμεων van der Waals προς σχηματισμό συμπλέγματος οργανικού διαλύτη-λιπιδίων. Το

σύμπλεγμα αυτό, λόγω της βαθμίδας συγκέντρωσης, διαχέεται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και το στατικό φιλμ του οργανικού διαλύτη περιβάλλει το κύτταρο. Επομένως, τα ουδέτερα λιπίδια εξάγονται από τα κύτταρα και παραμένουν αδιάλυτα στον μη πολικό οργανικό διαλύτη. Το στατικό φιλμ δημιουργείται λόγω της αλληλεπίδρασης του οργανικού διαλύτη και του κυτταρικού τοιχώματος. Το φιλμ αυτό περιβάλλει το κύτταρο και παραμένει αμετάβλητο από οποιοδήποτε ροή διαλύτη ή από διαταραχή (Halim R. et al., 2012).

Η χρήση μίγματος πολικού/μη πολικού οργανικού διαλύτη (όπως εξάνιο/ισοπροπανόλη ή χλωροφόρμιο/μεθανόλη) απαιτεί τη ταυτόχρονη προσθήκη όλων των διαλυτών στη βιομάζα με την απαιτούμενη ογκομετρική αναλογία. Επιπλέον, τα υπολείμματα των κυττάρων απομακρύνονται με μέθοδο διαχωρισμό υγρού-στερεού (όπως η φίλτρανση), ο διφασικός διαχωρισμός του αρχικά μονοφασικού οργανικού μίγματος προκαλείται με την απότομη ισοογκομετρική προσθήκη του μη πολικού οργανικού διαλύτη και του νερού. Κατά την ολοκλήρωση του διφασικού διαχωρισμού τα ουδέτερα και πολικά λιπίδια θα συνεχίσουν να αποτελούν μέρος της οργανικής φάσης (μίγμα μη πολικού οργανικού διαλύτη και πολικού οργανικού διαλύτη), ενώ η υδατική φάση (μίγμα νερού και πολικού οργανικού διαλύτη) θα περιέχει πρωτίστως ανταγωνιστικά των λιπιδίων μόρια (πρωτεΐνες και υδατάνθρακες) (Kates, 1986; Medina et al., 1998). Οπότε, μέσω του διφασικού διαχωρισμού επιτυγχάνεται και η απομάκρυνση του υπολείμματος του νερού αλλά και των ανταγωνιστών των λιπιδίων από το μίγμα οργανικού διαλύτη-λιπιδίων. Η οργανική φάση μεταγγίζεται και υφίσταται εξάτμιση ώστε να παραληφθούν ανεπεξέργαστα και χωρίς υγρασία λιπίδια, τα οποία θα κλασματοποιηθούν και θα υποστούν μετεστεροποίηση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η καλλιέργεια ακινητοποιημένων μικροφυκών επιλεγμένου στελέχους *Stichococcus* sp. με υπόστρωμα οργανικό άνθρακα, με σκοπό την παραγωγή λιπιδίων, ώστε με περαιτέρω επεξεργασία να γίνει παραγωγή βιοντίζελ. Επιλέχθηκε το συγκεκριμένο στέλεχος επειδή δημιουργεί συσσωματώματα, παρουσιάζει μεγάλη παραγωγικότητα σε λιπίδια και έχει την ικανότητα να δημιουργεί βιοφιλμ οπότε και να εξαγεται εύκολα η βιομάζα που δημιουργείται -με βάση αποτελεσμάτων από πειράματα που είχαν διεξαχθεί στη διπλωματική εργασία με τίτλο « Παραγωγή Βιοντίζελ από εργαστηριακή καλλιέργεια ακινητοποιημένων μικροφυκών» -. Ως πηγή οργανικού άνθρακα επιλέχθηκε να είναι απόβλητο οينوποιείου και συγκεκριμένα από το τελευταίο στάδιο επεξεργασίας μονάδα παραγωγής ροζέ κρασιού.

Πραγματοποιήθηκαν διάφορα πειράματα για την καλλιέργεια και ανάπτυξη της βιομάζας τους συγκεκριμένου στελέχους μικροφυκών με τις παρακάτω συνθέσεις:

- Θαλασσινό νερό
- Θαλασσινό νερό + θρεπτικά άλατα
- Θαλασσινό νερό + απόβλητο οينوποιείου
- Θαλασσινό νερό + θρεπτικά άλατα + απόβλητο οينوποιείου

Η καλλιέργεια μικροφυκών έγινε σε μικρής και μεγαλύτερης κλίμακας πειράματα και πραγματοποιήθηκε μέσα σε ποτήρια ζέσεως των 500ml καθώς και σε δύο ειδικά σχεδιασμένους φωτο-βιοαντιδραστήρες, ο ένας από Plexiglass και ο μεγαλύτερος ξύλινης κατασκευής με ειδική μόνωση. Σε κάθε περίπτωση η δημιουργία ακινητοποιημένης βιομάζας έγινε πάνω σε αφαιρούμενες επίπεδες επιφάνειες γυαλιού αμμοβολής.

Μέσα από τις διάφορες συνθήκες θα καταλήξουμε στο συμπέρασμα ποια σύσταση μίγματος ευνοεί την ανάπτυξη της βιομάζας και κατ' επέκταση την αύξηση των λιπιδίων. Για αυτό τον λόγο, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με και χωρίς πενία αζώτου, κάτι που επηρεάζει σημαντικά την παραγωγή λιπιδίων.(Pittman et al, 2011) Στα πειράματα χωρίς πενία άζωτο η καλλιέργεια είχε διάρκεια 18 μέρες ενώ

με την πενία αζώτου είχαμε επιπλέον 2 μέρες καλλιέργειας με την προσθήκη αντίστοιχου διαλύματος μετά τις 18 μέρες καλλιέργειας. Η επιλογή του να γίνουν πειράματα συμπεριλαμβάνοντας τη διαδικασία πενίας αζώτου είναι σημαντική, καθώς αυτή η διαδικασία αυξάνει το στρες στα κύτταρα των μικροφυκών και ταυτόχρονα περιορίζει την ανάπτυξη νέων κυττάρων αλλά όμως αυξάνει την περιεκτικότητά τους σε λιπίδια. Γεγονός που ευνοεί την έρευνα μας και το σκοπό αυτής.

Συνεπώς η παρούσα έρευνα εστιάζει στην αειφόρο ανάπτυξη επιλεγμένου στελέχους μικροφυκών, με χαρακτηριστικό του την εύκολη συγκομιδή του και ταυτόχρονα με την χρήση οργανικού άνθρακα από βιομηχανικό απόβλητο να προσδίδεται βελτιστοποιημένη ανάπτυξη και παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων.

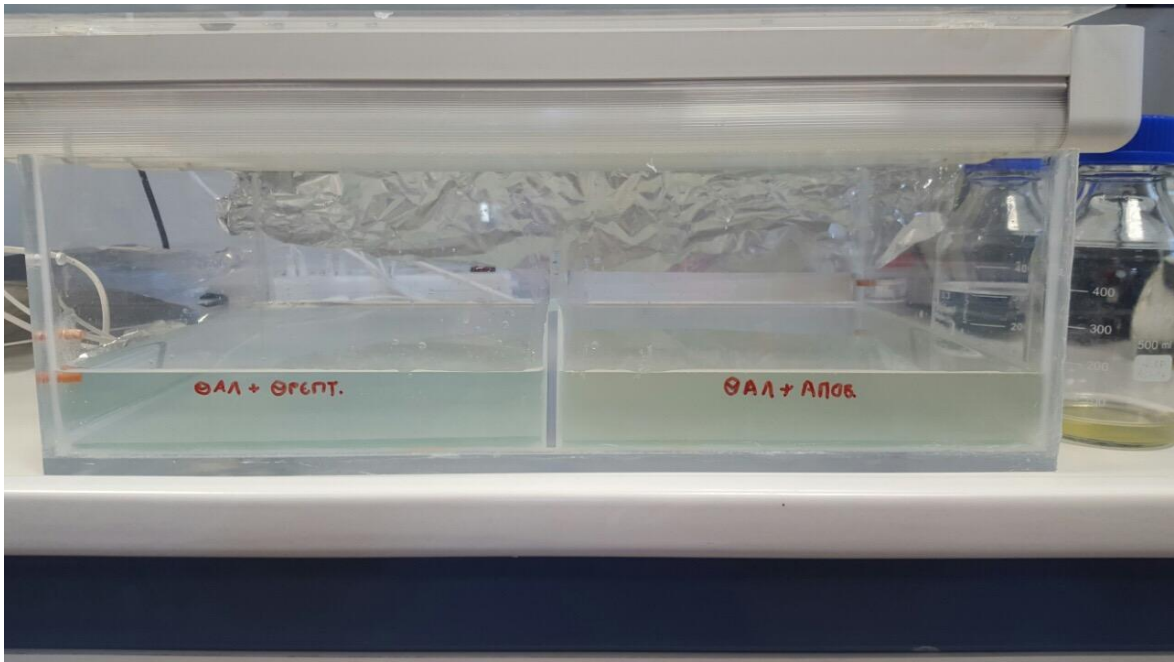
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 Περιγραφή πειραμάτων καλλιέργειας μικροφυκών

Η καλλιέργεια του στελέχους *Stichococcus* sp. έγινε σε φωτο-βιοαντιδραστήρες - χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά είδη - ειδικά σχεδιασμένους για τη βέλτιστη ανάπτυξη και παραγωγή ακινητοποιημένης βιομάζας του συγκεκριμένου στελέχους μικροφύκους με χρήση αποβλήτων οινοποιείου, ως πηγή οργανικού άνθρακα.

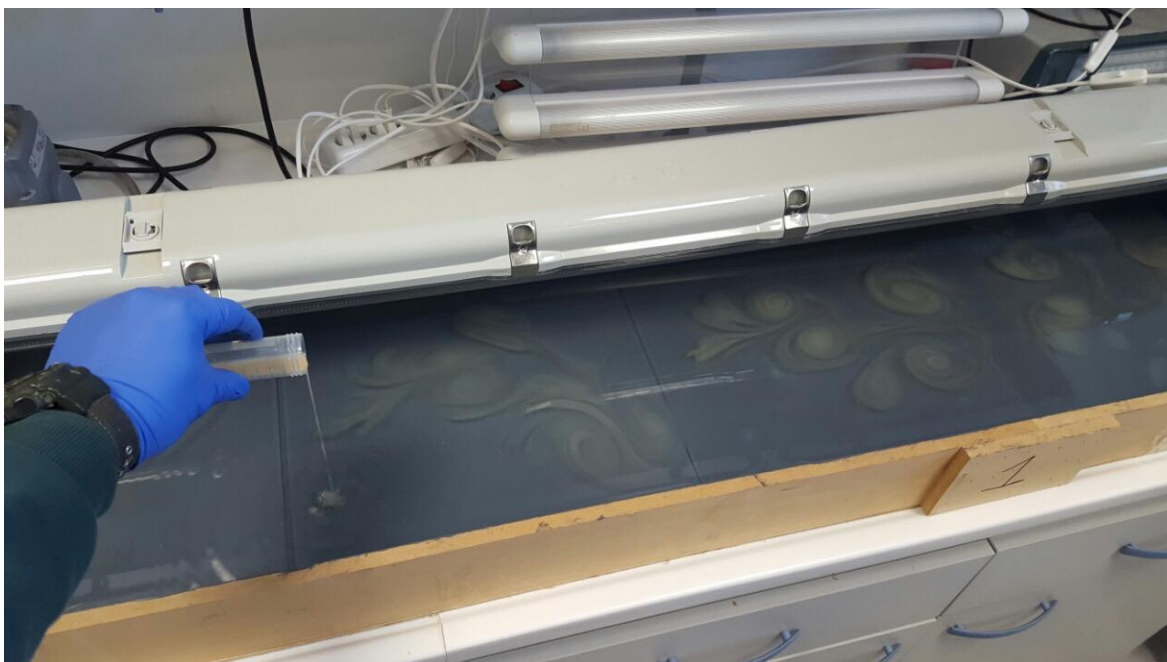
Το πρώτο είδος φωτο-βιοαντιδραστήρα που χρησιμοποιήθηκε ήταν κατασκευασμένος από Plexiglass, σχήματος ορθογωνίου παραλληλογράμμου με διαστάσεις 30cm x 50cm και συνολική επιφάνεια 1500cm², όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.1. Για καλύτερη υδατομόνωση όλα τα τμήματα του φωτοαντιδραστήρα περάστηκαν με μη τοξική σιλικόνη. Επίσης, στο πάτο του τοποθετήθηκαν 2 αφαιρούμενα τμήματα από γυαλί αμμοβολής, διαστάσεων 24cm x 29cm η κάθε μια, για την εύκολη συλλογή της βιομάζας αλλά και για την προσομοίωση με τις πραγματικές συνθήκες ανάπτυξης του συγκεκριμένου στελέχους, χρειάζεται μη λεία επιφάνεια.

Οι λάμπες ήταν τοποθετημένες κατά μήκος του φωτο-βιοαντιδραστήρα και ήταν 4 στο σύνολο των 18 Watt η καθεμία. Οι 2 ήταν στα 3.500 K, ώστε να προσομοιάζεται το θερμό φως σούρουπο – απόγευμα, ενώ οι άλλες 2 στα 6.500 K για να προσομοιάζεται το ψυχρό φως της έντονης ηλιοφάνειας με συννεφιά. Επιπλέον, για την αποφυγή επιρροής από το εξωτερικό περιβάλλον ο φωτο-βιοαντιδραστήρας ήταν καλυμμένος με αλουμινόχαρτο και ο κύκλος φωτισμού ήταν 12h/d, αν και η φωτοπερίοδος συμβάδιζε απόλυτα με τον φωτισμό του εξωτερικού περιβάλλοντος για μεγαλύτερη ακρίβεια του κύκλου φωτισμού.



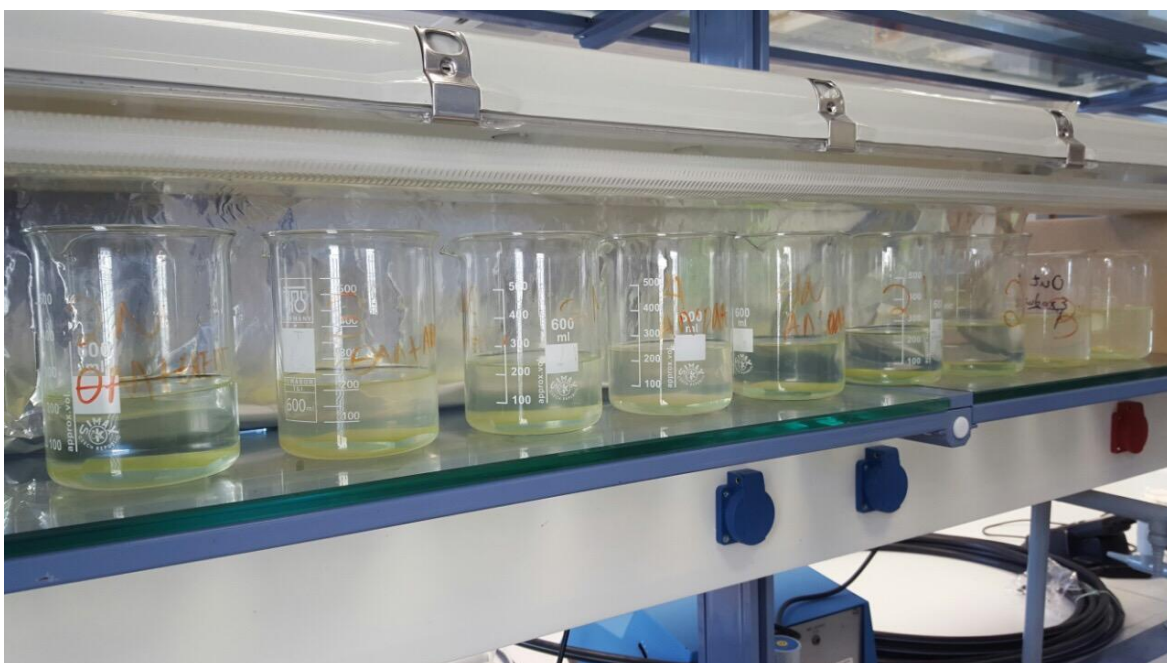
Εικόνα 4.1 : Φωτο-βιοαντιδραστήρας από Plexiglass

Ο δεύτερος φωτο-βιοαντιδραστήρας ήταν μεγαλύτερης κλίμακας, διαστάσεων 40cm x 150cm και επιφάνειας 6.000 cm² εικόνα 4.2. Ήταν κατασκευασμένος από ξύλο ποιότητας κόντρα πλακέ θαλάσσης και μονώθηκαν όλες οι επιφάνειες του με το μη τοξικό μονωτικό, με την εμπορική ονομασία Gomastic Aqua Protect Flex Liquid, για την αποφυγή επαφής του νερού με την ξύλινη επιφάνεια. Και εδώ χρησιμοποιήθηκαν 4 αφαιρούμενες επιφάνειες αμβροβόλης διαστάσεων 24cm x 29cm η κάθε μία. Οι λάμπες που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν κλειστού τύπου και τοποθετήθηκαν εναλλάξ μια λάμπα των 3.000K και μια των 6.000K



Εικόνα 4.2: Μεγάλο φωτο-βιοαντιδραστήρας

Ο τρίτος φωτο-βιοαντιδραστήρας ήταν ποτηράκια ζέσεως χωρητικότητας 500 ml, εικόνα 4.3. Και σ αυτόν το φωτο-βιοαντιδραστήρα χρησιμοποιήθηκαν λάμπες κλειστού τύπου, τοποθετημένες εναλλάξ μια λάμπα 3.000K και μια των 6.000K.



Εικόνα 4.3 : Φωτο-βιοαντιδραστήρας ποτηράκια ζέσεως

Μετά το πέρας των 18 ημερών πραγματοποιούταν η συλλογή της βιομάζας από τους φωτο-βιοαντιδραστήρες. Αρχικά, με τη βοήθεια μια αντλίας αφαιρούνταν προσεκτικά το υγρό μίγμα και έπειτα με μεγάλη προσοχή βγάζαμε σε οριζόντια θέση τις αφαιρούμενες παραλληλόγραμμες γυάλινες επιφάνειες.

Με τη βοήθεια μιας σπάτουλας από σιλικόνη αφαιρούσαμε τη βιομάζα και την εναποθέταμε μέσα σε κεσεδάκια όπου ύστερα τη μεταφέραμε σε φίλτρα διήθησης, τη τοποθετούσαμε στο φούρνο για 6 ώρες στους 90 °C, για να αφυδατωθεί, και μετά τη ζυγίζαμε.

Το υπόστρωμα ανάπτυξης αποτελούταν από αποστειρωμένο θαλασσινό νερό (το οποίο λαμβάναμε από το λιμανάκι του Αγίου Ονούφριου Χανίων) και κάποιο από τους παρακάτω συνδυασμούς :

Θαλασσινό νερό + Θρεπτικά άλατα+ Στέλεχος *Stichococcus* sp.

Θαλασσινό νερό + Θρεπτικά άλατα + Στέλεχος *Stichococcus* sp. + Απόβλητο οينوποιείου

Θαλασσινό νερό + Στέλεχος *Stichococcus* sp. + Απόβλητο οينوποιείου

Το απόβλητο οينوποιείου που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν από το τελευταίο στάδιο επεξεργασίας του κρασιού, ποικιλίας ροζέ. Η μορφή του μπορεί να χαρακτηριστεί ως παχύρρευστη και “θαμπή” – μη διαυγές υγρό-, με χρώμα από τόνους χρυσαφί με απαλό κόκκινο.

4.2 Υλικά και Μέθοδοι

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

- ο Απόβλητο οينوποιείου ποικιλίας Ροζέ με τα παρακάτω χαρακτηριστικά :
COD: 140.000mg/l
NO₃-N: 85,6mg/l
NH₃-N: 84mg/l
PO₄-P: 450mg/l
pH: 4,2
- ο Θαλασσινό νερό από τη περιοχή του Άγιου Ονούφριου Χανίων
- ο Παραλληλόγραμμα τμήματα από γυαλί αμμοβολής
- ο Φωτο-βιοαντιδραστήρας Plexiglass
- ο Ζυγαριά: Scaltec SPB42
- ο Whirlpool καταψύκτης
- ο Φούρνος Memmert UL50 Lab Oven
- ο ADTEC Chemicals LP αντλία
- ο Φίλτρα διήθησης: Whatman glass microfiber filters, Grade 934 0,45μm
- ο Σπάτουλα Σιλικόνης
- ο Πλαστικά δοχεία μεταφοράς νερού 10L
- ο Αλουμινόχαρτο
- ο Αναλογικός Χρονοδιακόπτης
- ο Ποτήρια ζέσεως των 250mL
- ο Τσιμπίδα
- ο Συσκευή διήθησης
- ο Χλωροφόρμιο
- ο Σφαιρικές φιάλες
- ο Μεθανόλη
- ο Φίλτρα διήθησης 0,45μm

- ο Εξατμιστήρας Heidolph VV2000
- ο Διαχωριστική χοάνη
- ο Κωνική φιάλη
- ο BOD Robotic Bottles
- ο WTW Oven BOD
- ο COD kit: LCK 314 & 514 της HAN

Περιγραφή της μεθόδου μέτρησης BOD

Η μέτρηση του BOD πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη Standard Methods, συγκεκριμένα Standard Method 5210 B (5-day BOD) και με χρήση οξυγονόμετρου. Χρησιμοποιήσαμε γυάλινα μπουκάλια Robbotic BOD Bottle, οι κάψουλες Polyseed BOD capsules της HACH και τα παρακάτω αντιδραστήρια BOD (όπου βάζαμε 1 ml /L δ/τος):

- Φωσφορικό δ/μα: Σε 1L νερού έχει: 8,5g KH_2PO_4 , 21,7g K_2HPO_4 , 1,7g NH_4Cl
- Δ/μα θειικού μαγνησίου: Σε 1L νερού έχει: 22,5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Δ/μα χλωριούχου ασβεστίου: Σε 1L νερού έχει: 27,5g CaCl_2

Στα 12 L θαλασσινού νερού L προσθέταμε τα παρακάτω άλατα:

760,8 mg NaNO_3

733,2 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

136,8 mg KH_2PO_4

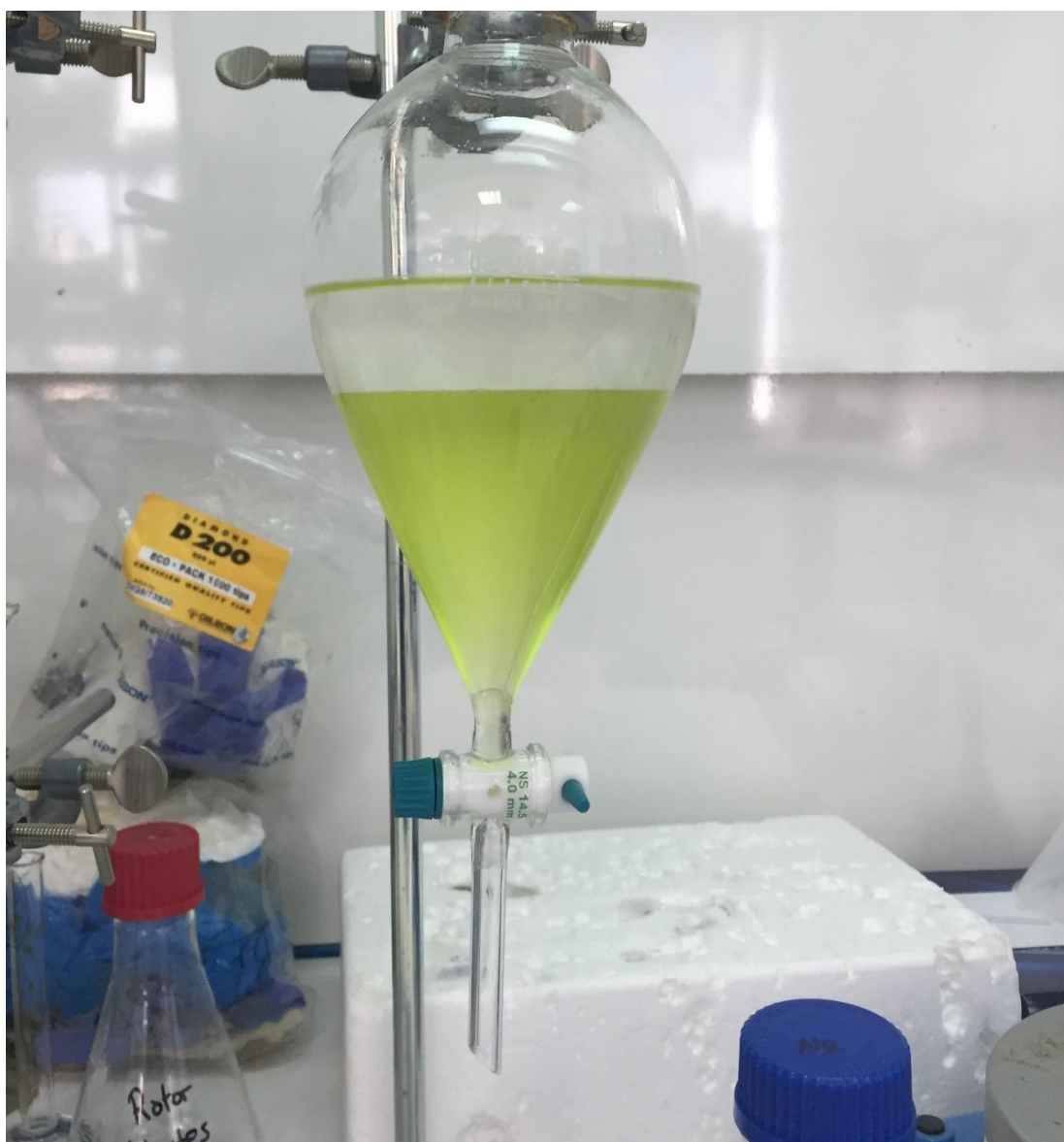
Το απόβλητο οينوποιείου προστέθηκε σε αραίωση 1:600.

Δηλαδή στα 12L βάζαμε 20ml.

Στα πειράματα που έγιναν στα ποτήρια ζέσεων 600ml, βάζαμε 220ml θαλασσινού νερού (συνθετικό απόβλητο ή στείρο θαλασσινό νερό) και προσθέταμε 0,37ml αποβλήτου.

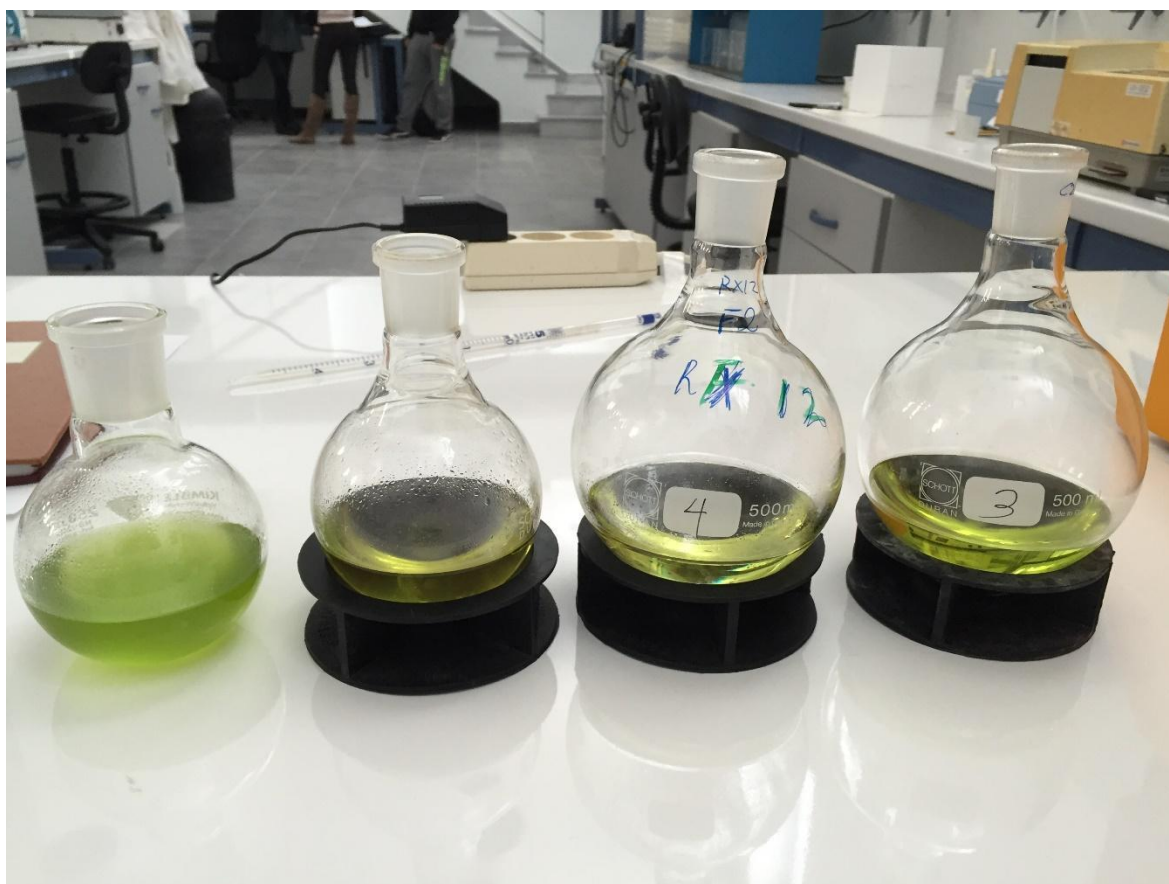
4.3 Μέθοδος Εξαγωγής Λιπιδίων

Για την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρειάστηκε να διεξαχθούν πειράματα για την εξαγωγή λιπιδίων. Αρχικά, έγινε διήθηση της βιομάζας για την απομάκρυνση της υγρασίας. Έπειτα, το φίλτρο με τη ξηρή βιομάζα τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη όπου προστέθηκε χλωροφόρμιο και μεθανόλη με αναλογία 2:1 (v/v). Έγινε χειροκίνητη ανάδευση για λίγα δευτερόλεπτα και έπειτα προστέθηκε NaCl με αναλογία 2:1:0,8.



Εικόνα 4.4. Διαχωριστική χοάνη

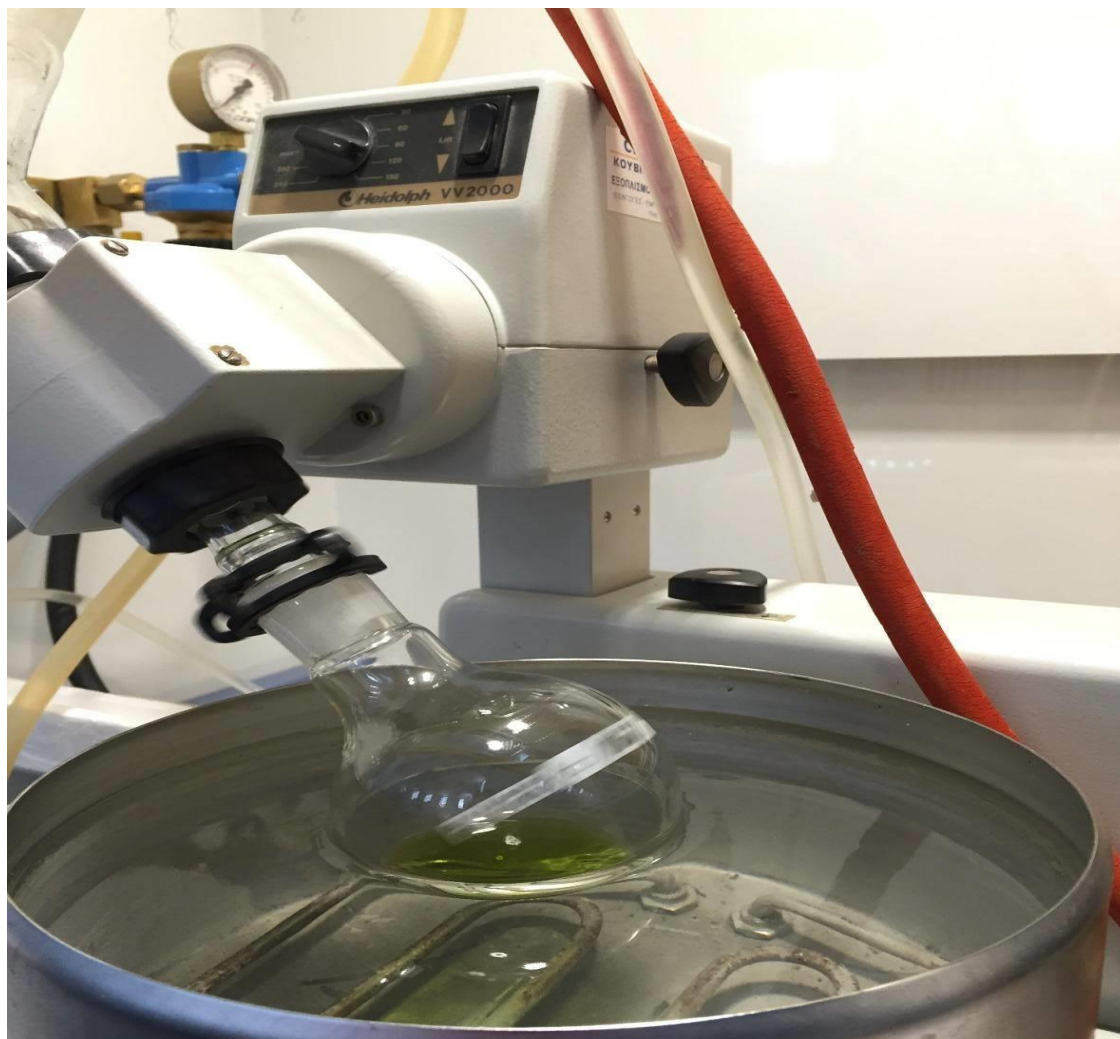
Αφού το αφήσαμε για 5 λεπτά να γίνει απομάκρυνση της βιομάζας από το φίλτρο-απομάκρυνση μη διαλυτών στοιχείων στο σύστημα χλωροφόρμιο + μεθανόλη + NaCl -, μεταγγίσαμε αυτό το διάλυμα σε διαχωριστική χοάνη, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.4, για να πραγματοποιηθεί εκχύλιση. Μετά το πέρας 15 λεπτών και με παρατήρηση ευδιάκριτης διαφοράς φάσης μέσα στη χοάνη, ανοίγοντας τη στρόφιγγα ο διαλύτης μαζί με τη βιομάζα τοποθετήθηκαν σε σφαιρικές φιάλες.



Εικόνα 4.5 . Σφαιρικές φιάλες πριν την εξάτμιση

Μετά το πέρας 15 λεπτών και με παρατήρηση ευδιάκριτης διαφοράς φάσης μέσα στη χοάνη, ανοίγοντας τη στρόφιγγα ο διαλύτης μαζί με τη βιομάζα τοποθετήθηκαν σε σφαιρικές φιάλες όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.5. Στη συνέχεια, οι σφαιρικές φιάλες μεταφέρθηκαν στον εξατμιστήρα για την απομάκρυνση του διαλύτη και η διαδικασία φαίνεται στην Εικόνα 4.6. Η ξηρή μάζα που παρέμεινε μετά την εξάτμιση αποτελεί τα λιπίδια. Αφού γνωρίζαμε το βάρος της κάθε σφαιρικής φιάλης

πριν και αφαιρώντας το βάρος της μετά την εξάτμιση γνωρίζουμε τη μάζα των λιπιδίων.

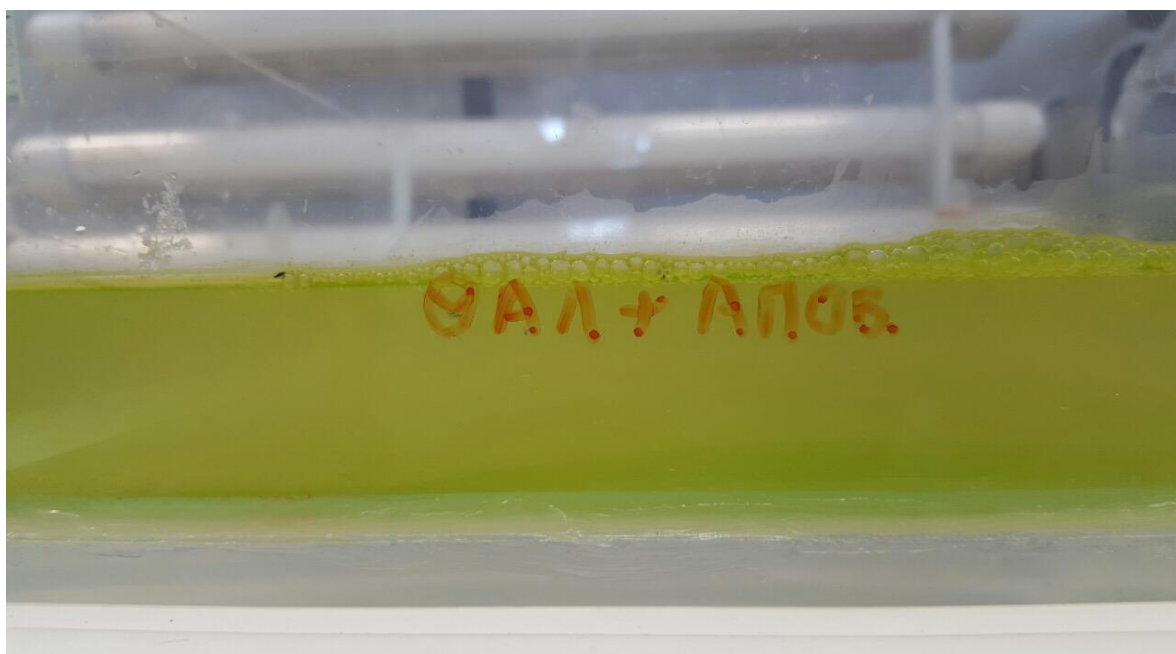


ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Καλλιέργεια Μικροφυκών

Στο διάγραμμα 5.1 παρουσιάζεται η ανάπτυξη της βιομάζας *Stichococcus sp.* σε επιφάνεια γυαλιού αμμοβολής σε φωτο-βιοαντιδραστήρα από plexiglass χωρισμένο στη μέση (Εικόνα 5.1) όπου παρέμεινε 18 μέρες χωρίς ανακυκλοφορία αυτού. Ο φωτο-βιοαντιδραστήρας ήταν χωρισμένος στη μέση. Στο πρώτο μισό διαμέρισμά του φωτο-βιοαντιδραστήρα, τοποθετήθηκαν 3L αποστειρωμένου θαλασσινού νερού, το στέλεχος *Stichococcus sp.* με αραιώση 1:1000 – δηλαδή 30mL – καθώς επίσης και τα παρακάτω άλατα με τις αντίστοιχες αραιώσεις [380, 4 mg NaNO_3 , 366,6 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και 68,4 KH_2PO_4] [. = Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος αντιστοιχούν στην πρώτη στήλη του διαγράμματος 5.1 και η ξηρή βιομάζα που παράχθηκε $1 \text{ mg}_{\text{dry biomass}} / \text{cm}^2$.

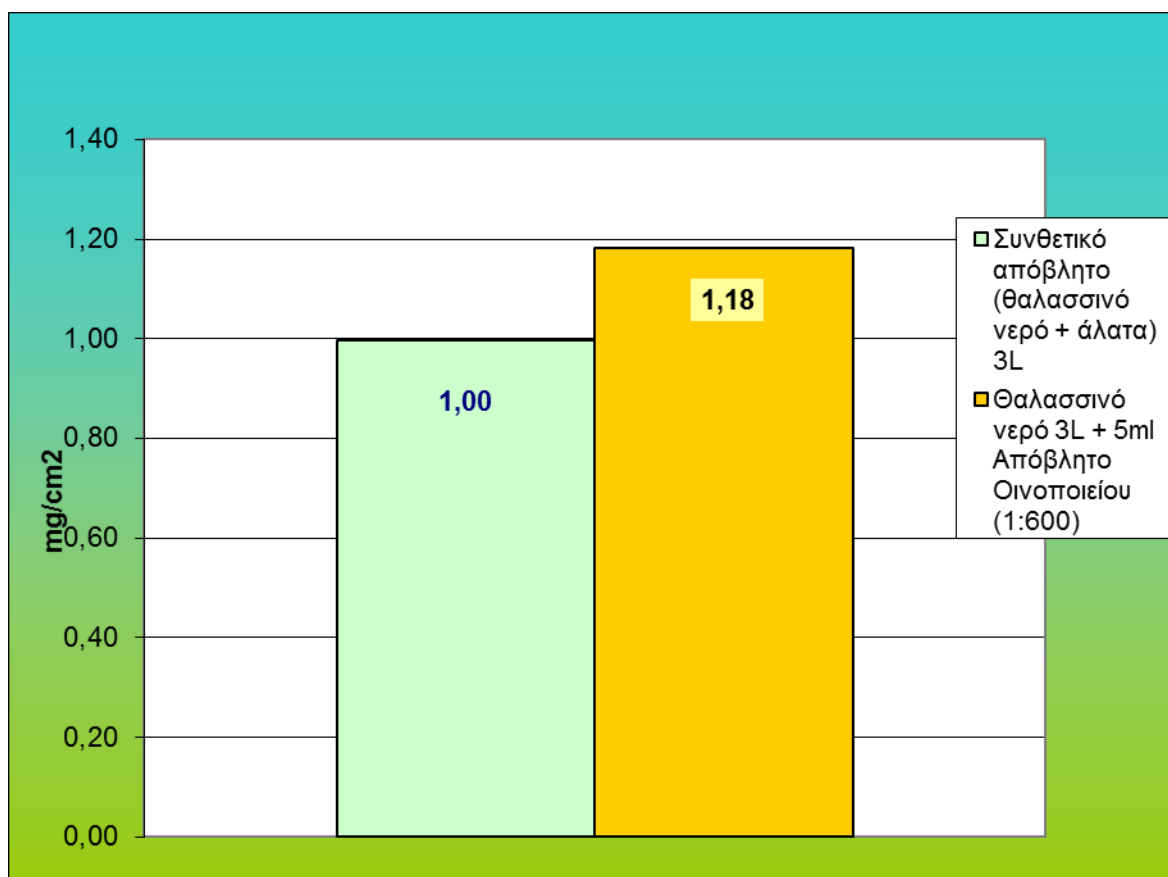
Ενώ η δεύτερη στήλη αναφέρεται στο δεύτερο μισό διαμέρισμα του φωτο-βιοαντιδραστήρα, στον οποίο τοποθετήθηκε αποστειρωμένο θαλασσινό νερό 3 L, το στέλεχος *Stichococcus sp.* με αραιώση 1:1000 – δηλαδή 30mL και τ 5mL απόβλητο οينوποιείου με $\text{pH}=4,2$ και $\text{COD}= 230\text{mg/L}$. Σ' αυτή την περίπτωση, η ξηρή βιομάζα που παράχθηκε ήταν $1,18 \text{ mg}_{\text{dry biomass}} / \text{cm}^2$



Εικόνα 5.1 : Ανάπτυξη αποικίας των μικροφυκών

| Υλικά – Επιφάνειες | Βιομάζα (mg) | Επιφάνεια (cm ²) | Βιομάζα/Επιφάνεια (mg _{dry biomass} /cm ²) |
|---|--------------|------------------------------|---|
| Γυαλί Αμμοβολής | 694 | 696 | 1,00 |
| Συνθετικό απόβλητο (θαλασσινό νερό + θρεπτικά άλατα) 3L | | | |
| Γυαλί Αμμοβολής | 822 | 696 | 1,18 |
| Θαλασσινό νερό 3L + 5ml Απόβλητο Οινοποιείου (1:600) | | | |

Πίνακας 5.1. Μέτρηση Βιομάζας *Stichococcus* SP πάνω σε επιφάνειες (μετά από 18 μέρες καλλιέργειας)

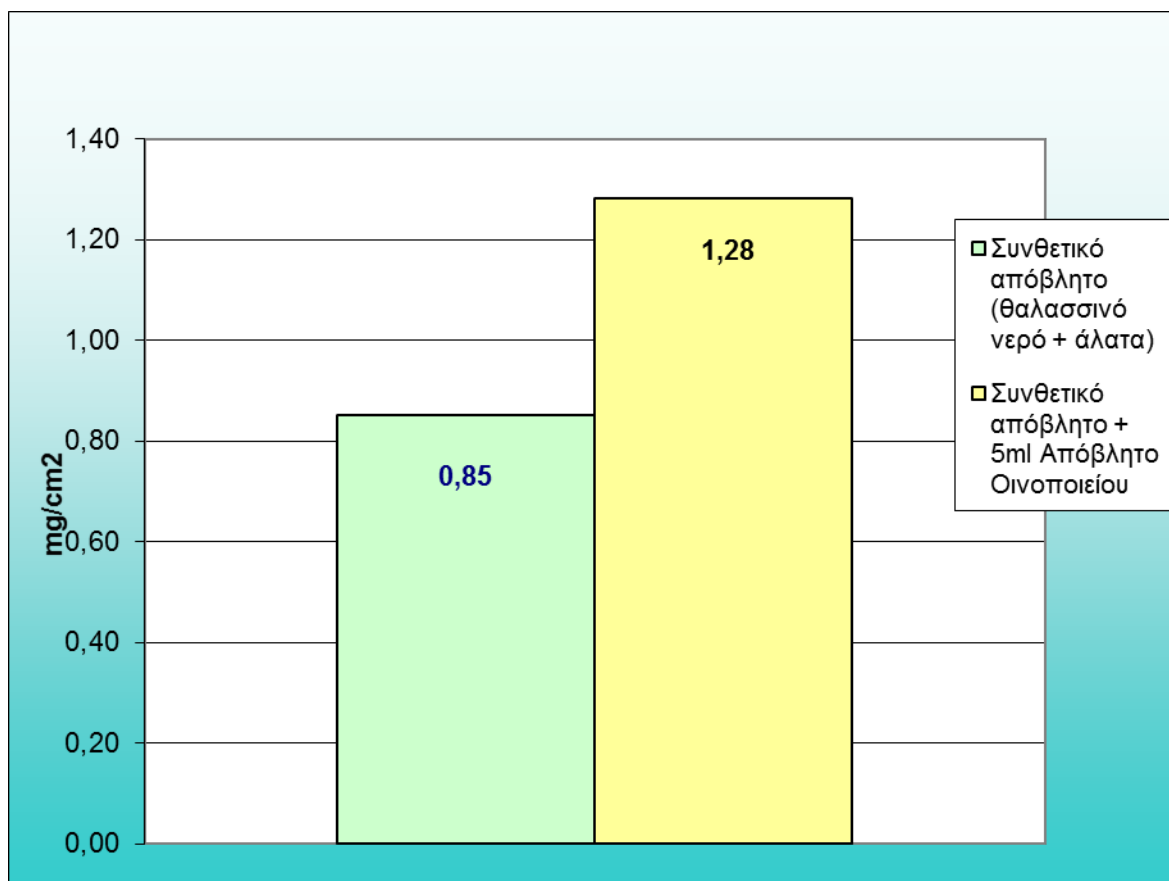


Διάγραμμα 5.1: Ανάπτυξη Βιομάζας (mg/cm³) *Stichococcus* SP σε επιφάνεια γυαλιού αμμοβολής μετά από 18 μέρες σε σταθερό όγκο 3L σε συνθετικό απόβλητο και σε πραγματικό (οινοποιείου 1:600)

Στο διάγραμμα 5.2 παρουσιάζεται η ανάπτυξη μικροφυκών σε φωτοαντιδραστήρα χωρισμένο στην μέση πάνω σε υπόστρωμα αποτελούμενο από θαλασσινό νερό + θρεπτικά άλατα και σε υπόστρωμα από θαλασσινό νερό + θρεπτικά άλατα + απόβλητο οиноποιείου. Στον πίνακα 5.2 παρουσιάζονται τα ποσοτικά αποτελέσματα από αυτό το πείραμα.

| Υλικά - Επιφάνειες | Βιομάζα (mg) | Επιφάνεια (cm ²) | Βιομάζα/ Επιφάνεια (mg/cm ²) |
|--|--------------|------------------------------|--|
| Γυαλί Αμμοβολής | 593 | 696 | 0,85 |
| Συνθετικό απόβλητο (θαλασσινό νερό + θρεπτικά άλατα) | | | |
| Γυαλί Αμμοβολής | 892 | 696 | 1,28 |
| Συνθετικό απόβλητο + 5ml Απόβλητο Οινοποιείου | | | |

Πίνακας 5.2. Μέτρηση Βιομάζας *Stichococcus* SP πάνω σε επιφάνειες (μετά από 18 d)
Χωρισμένος αντιδραστήρας με και χωρίς απόβλητο (1:600)



Διάγραμμα 5.2 Ανάπτυξη Βιομάζας *Stichococcus* SP σε επιφάνεια γυαλιού αμμοβολής μετά από 18 μέρες σε σταθερό όγκο 3L με και χωρίς προσθήκη αποβλήτου.

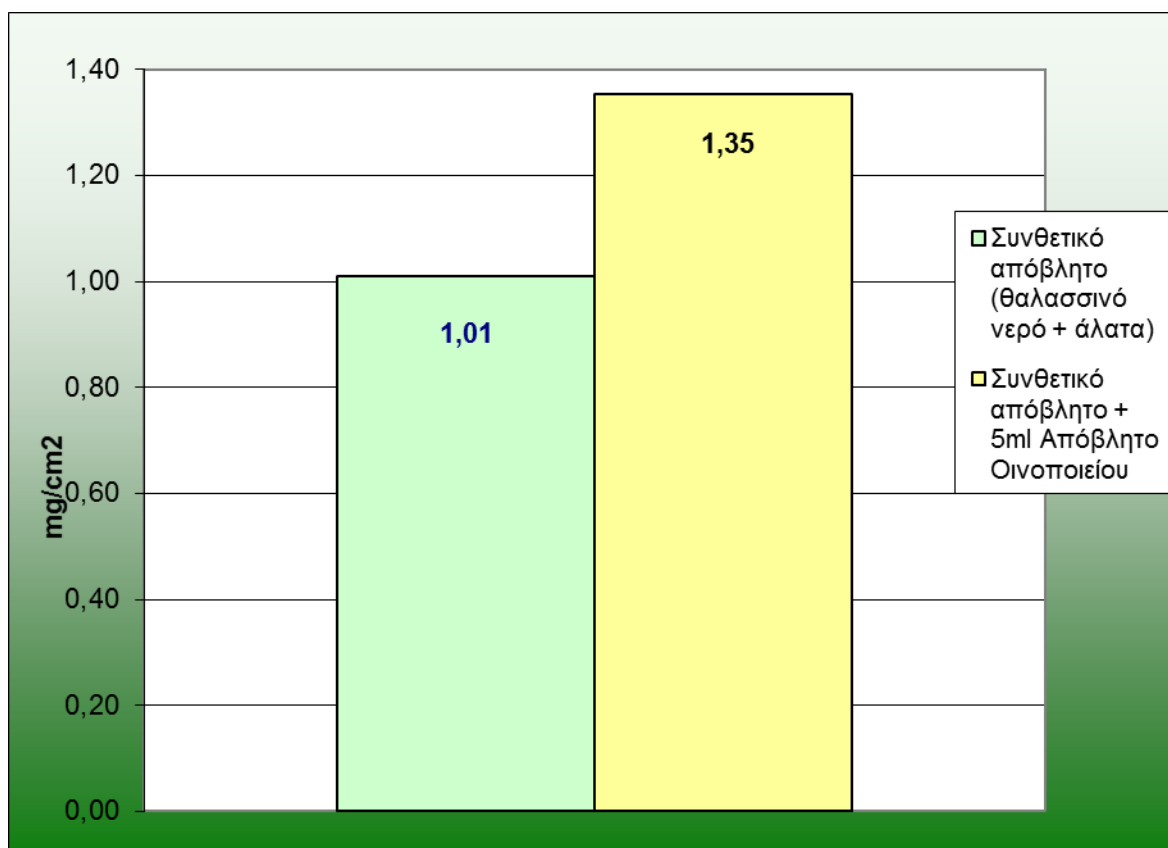
Πραγματοποιήθηκε και δεύτερο πείραμα για τη συνθήκη θαλασσινό νερό + θρεπτικά άλατα και για τη συνθήκη θαλασσινό νερό + θρεπτικά άλατα + απόβλητο οينوποιείου και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 5.3 και διαγραμματικά στο διάγραμμα 5.3. Συγκεκριμένα, στον μισό φωτο-βιοαντιδραστήρα (Εικόνα 5.2) προστέθηκαν θαλασσινό νερό + θρεπτικά άλατα + *Stichococcus* SP ενώ στον άλλο μισό θαλασσινό νερό + θρεπτικά άλατα + *Stichococcus* SP και απόβλητο οينوποιείου, όπου και η παραγόμενη βιομάζα έφτασε στα 1,35 mg/cm².



Εικόνα 5.2: Φωτο-βιοαντιδραστήρας Plexiglass κατά την φάση αδειάσματος του νερού του πρώτου τμήματος.

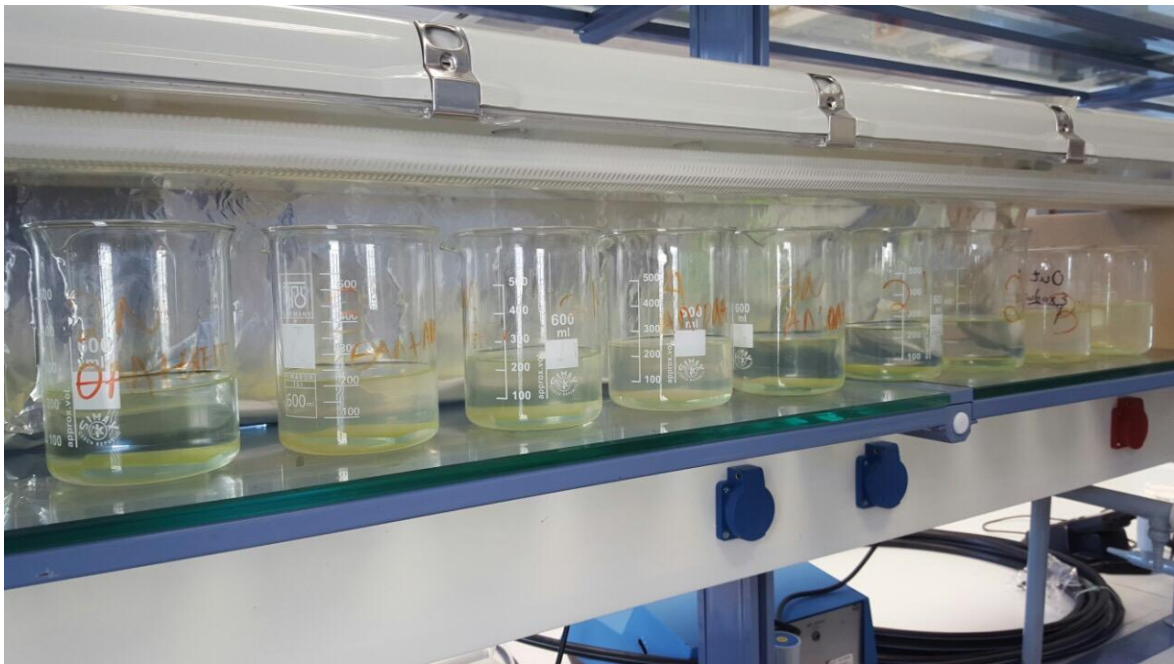
| Υλικά - Επιφάνειες | Βιομάζα (mg) | Επιφάνεια (cm ²) | Βιομάζα/Επιφάνεια (mg/cm ²) |
|--|--------------|------------------------------|---|
| Γυαλί Αμμοβολής | 703 | 696 | 1,01 |
| Συνθετικό απόβλητο (θαλασσινό νερό + θρεπτικά άλατα) | | | |
| Γυαλί Αμμοβολής | 942 | 696 | 1,35 |
| Συνθετικό απόβλητο + 5ml Απόβλητο Οινοποιείου | | | |

Πίνακας 5.3 Μέτρηση Βιομάζας *Stichococcus* SP πάνω σε επιφάνειες (μετά από 18 d). Χωρισμένος αντιδραστήρας με και χωρίς απόβλητο (1:600)



Διάγραμμα 5.3. Ανάπτυξη Βιομάζας (mg/cm³) *Stichococcus* SP σε επιφάνεια γυαλιού αμμοβολής μετά από 18 μέρες σε σταθερό όγκο 3L με και χωρίς προσθήκη αποβλήτου.

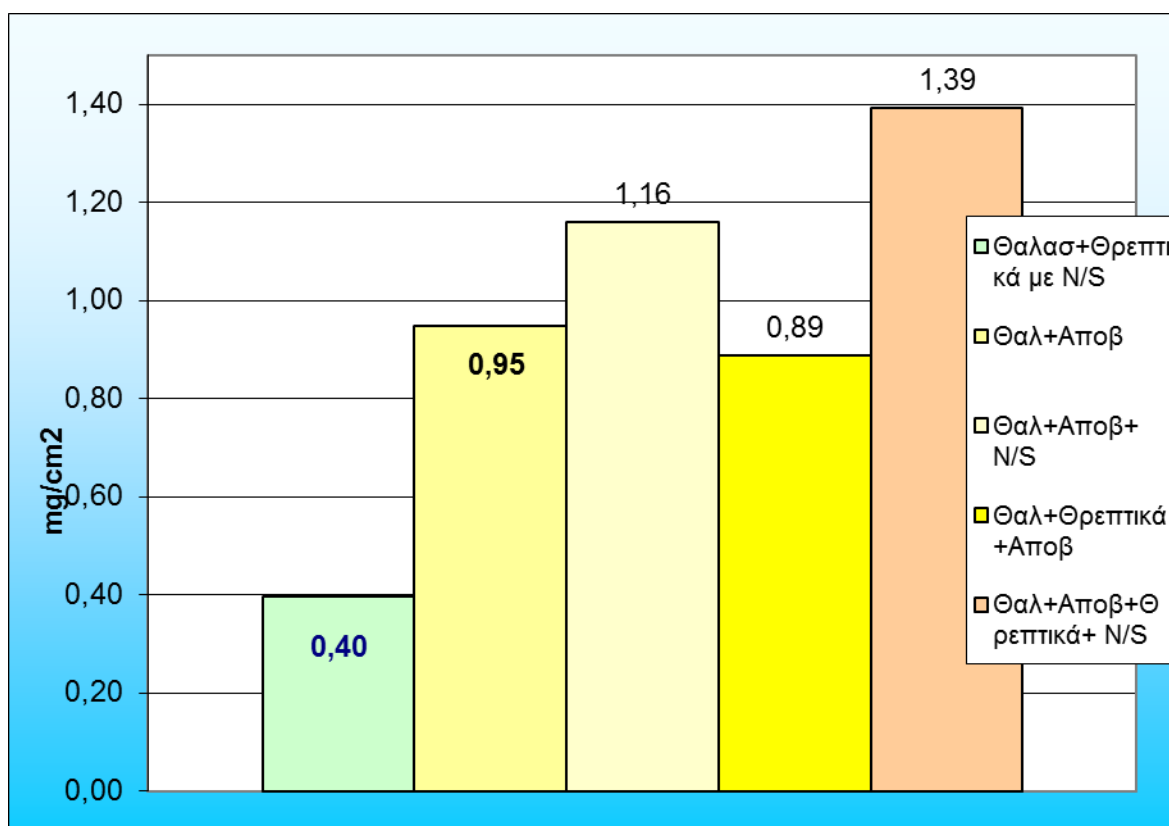
Στη συνέχεια, το επόμενο πείραμα πραγματοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της βιομάζας σε συνθήκες πενίας αζώτου. Έχοντας τις συνθήκες - (1) Θαλασσινό νερό + θρεπτικά άλατα, (2) θαλασσινό νερό + απόβλητο οينوποιείου, (3) θαλασσινό νερό + θρεπτικά άλατα + απόβλητο οينوποιείου 3 στο σύνολο – αλλά μετά από τις 18 ημέρες καλλιέργειας έγινε εφαρμογή διαλύματος nutrient starvation για 2 επιπλέον μέρες. Στη συνέχεια έγινε μέτρηση της βιομάζας που παράχθηκε αλλά αυτή τη φορά τα ποτηράκια ζέσεως όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.3 . Ο συνολικός όγκος διαλύματος σε κάθε ποτήρι ήταν 220ml.



Εικόνα 5.3: Ποτηράκια ζέσεως φωτο-βιοαντιδραστήρες

| Υλικά - Επιφάνειες | Βιομάζα (mg) | Επιφάνεια (cm ²) | Βιομάζα/Επιφάνεια (mg/cm ²) |
|--|--------------|------------------------------|---|
| Θαλασσινό νερό + Θρεπτικά άλατα με N/S | 9,9 | 25 | 0,40 |
| Θαλασσινό νερό +Απόβλητο οينوποιείου | 23,7 | 25 | 0,95 |
| Θαλασσινό νερό +Απόβλητο οينوποιείου+ N/S | 29 | 25 | 1,16 |
| Θαλασσινό νερό + Θρεπτικά άλατα +Απόβλητο οينوποιείου | 22,2 | 25 | 0,89 |
| Θαλασσινό νερό + Απόβλητο οينوποιείου+ Θρεπτικά άλατα+ N/S | 34,8 | 25 | 1,39 |

Πίνακας 5.4. Πειράματα καλλιέργειας *Stichococcus* sp σε ποτήρια ζέσεως με όγκο 220ml σε διάφορες συνθήκες καλλιέργειας (N/S = Nutrient Starvation - πενία αζώτου)



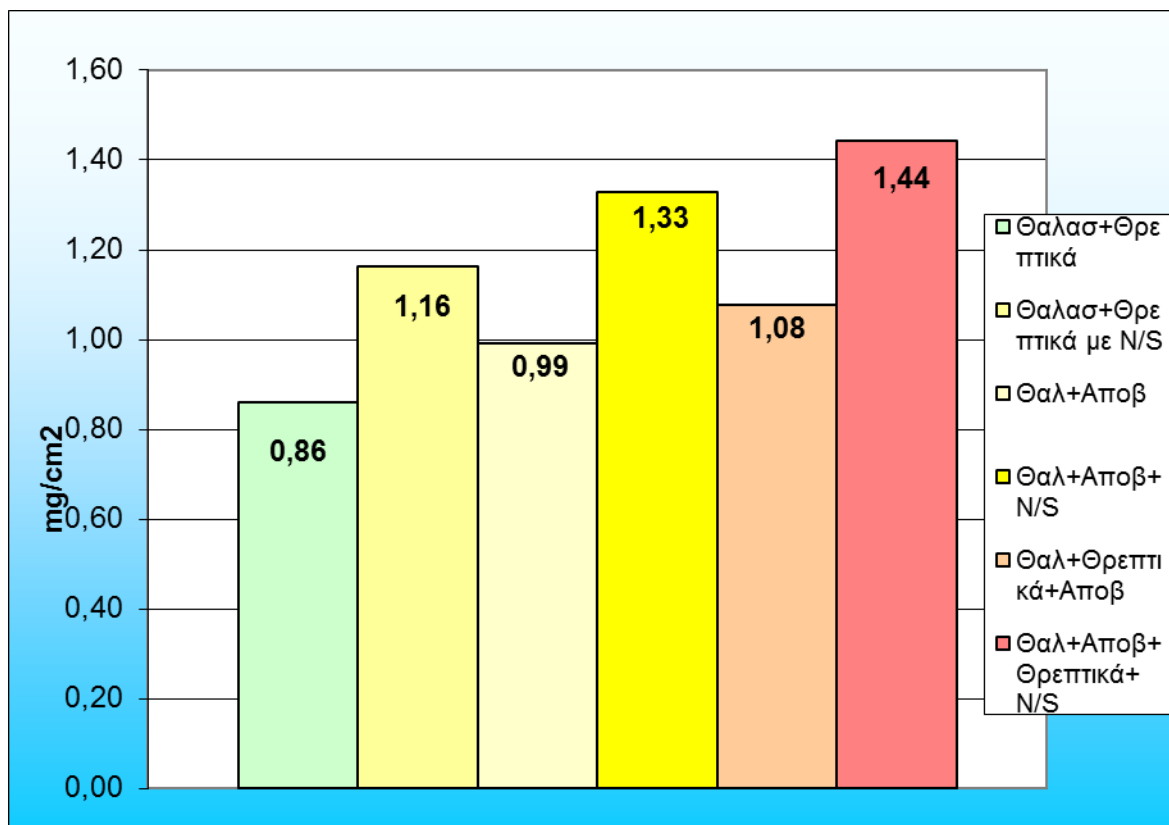
Διάγραμμα 5.4: Ανάπτυξη Βιομάζας (mg/cm³) *Stichococcus* SP σε επιφάνεια γυαλιού αμμοβολής μετά από 18 μέρες σε σταθερό όγκο 220 ml με και χωρίς προσθήκη

αποβλήτου

Σχετικά με το διάγραμμα 5.4 και τον πίνακα 5.4., παρατηρείται ότι η διαδικασία της πενίας αζώτου έδωσε καλύτερα αποτελέσματα στη παραγωγή βιομάζας.

Σε αυτό το πείραμα, παρατηρούμε ότι η προσθήκη αποβλήτου οينوποιείου ήταν καθοριστικής σημασίας στις διάφορες συνθήκες καλλιέργειας των μικροφυκών. Βλέπουμε ότι η προσθήκη θρεπτικών δεν επηρεάζει τόσο την παραγωγική διαδικασία, όσο η χρήση πενίας αζώτου μετά τις 18 μέρες καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, στο πείραμα με θαλασσινό νερό + απόβλητο οينوποιείου χωρίς πενία αζώτου η παραγόμενη βιομάζα ήταν 0,95 mg/cm² ενώ με πενία αζώτου ήταν 1,16 mg/cm². Επιπλέον, στην περίπτωση πενίας αζώτου με μείγμα θαλασσινού νερού + θρεπτικά άλατα + απόβλητο οينوποιείου σημειώνεται μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας συγκριτικά με αυτή χωρίς θρεπτικά άλατα, όπως ήταν λογικό. Όμως, η τελευταία διαδικασία κοστίζει περισσότερο σε εγκαταστάσεις μεγάλης κλίμακας λόγω της προσθήκης των θρεπτικών αλάτων. Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι προσθήκη αποβλήτου χωρίς την προσθήκη αλάτων με εφαρμογή πενίας αζώτου, έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Το διάγραμμα 5.5 αποτελεί επανάληψη των συνθηκών του προηγούμενου διαγράμματος και συμπεραίνονται ακριβώς τα ίδια αποτελέσματα, ότι η πενία αζώτου αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την αύξηση της βιομάζας στη καλλιέργεια μικροφυκών *Stichococcus SP.*



Διάγραμμα 5.5 : Ανάπτυξη Βιομάζας (mg/cm^3) *Stichococcus* SP σε επιφάνεια γυαλιού αμμοβολής μετά από 18 μέρες σε σταθερό όγκο 220 ml με και χωρίς προσθήκη αποβλήτου

| Υλικά – Επιφάνειες | Βιομάζα (mg) | Επιφάνεια (cm ²) | Βιομάζα/Επιφάνεια (mg/cm ²) |
|--|--------------|------------------------------|---|
| Θαλασσινό νερό + Θρεπτικά άλατα | 21,5 | 25 | 0,86 |
| Θαλασσινό νερό +Θρεπτικά άλατα με N/S | 29,1 | 25 | 1,16 |
| Θαλασσινό νερό +Απόβλητο οиноποιείου | 24,8 | 25 | 0,99 |
| Θαλασσινό νερό + Απόβλητο οиноποιείου + N/S | 33,2 | 25 | 1,33 |
| Θαλασσινό νερό + Θρεπτικά άλατα +Απόβλητο οиноποιείου | 26,9 | 25 | 1,08 |
| Θαλασσινό νερό +Απόβλητο οиноποιείου +Θρεπτικά άλατα+ N/S | 36,1 | 25 | 1,44 |

Πίνακας 5.5. Μέτρηση Βιομάζας *Stichococcus* SP πάνω σε επιφάνειες (μετά από 18 d +2 N/S)

Αξίζει να σημειωθεί ότι η προσθήκη απόβλητου οиноποιείου συμβάλει σημαντικά στην ανάπτυξη της βιομάζας. Συγκρίνοντας τις 4 πρώτες στήλες του διαγράμματος 5.5 διαπιστώνεται ότι αυξήθηκε η ποσότητα της βιομάζας και στη περίπτωση χωρίς πενία αζώτου(2 πρώτες στήλες, χωρίς προσθήκη απόβλητο οиноποιείου) αλλά και στην περίπτωση πενίας αζώτου (3 και 4 στήλη).

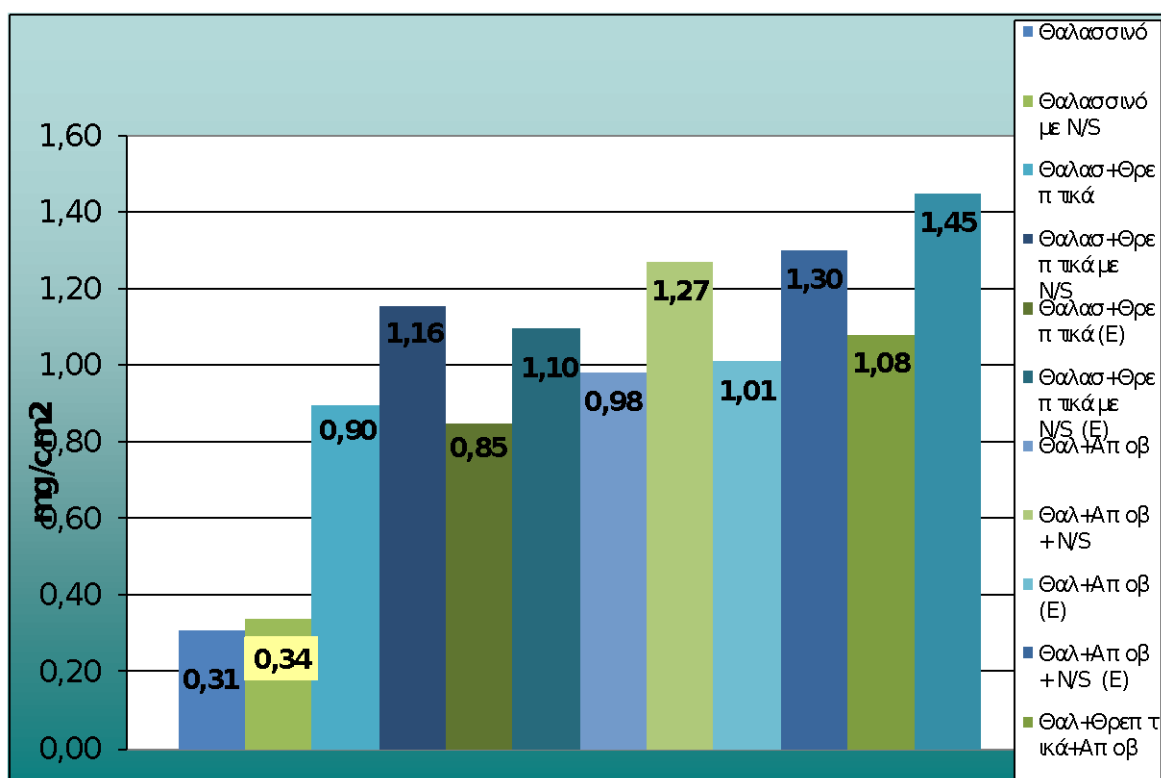
Στο τελευταίο πείραμα που πραγματοποιήθηκε για την καλλιέργεια και παραγωγή βιομάζας με βάση τα αποτελέσματα επιβεβαιώνεται ότι η προσθήκη αποβλήτου από οινόποιείο σε συνδυασμό με τη διαδικασία πενίας αζώτου έχουν την υψηλότερη παραγωγή βιομάζας με το χαμηλότερο κόστος. Εν αντιθέσει, η τελευταία στήλη του διαγράμματος 5.6 έχει ποσοτικά την μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας από μικροφύκη με τιμή $1,45 \text{ mg/cm}^2$ αλλά έχει μεγαλύτερο κόστος δεδομένου της προσθήκης θρεπτικών αλάτων. Σ αυτό το πείραμα, ο φωτοβιοαντιδραστήρας ήταν πάλι ποτηράκια ζέσεως και όλοι οι συνδυασμοί έλαβαν χώρα 2 φορές για πιο ακριβή αποτελέσματα. Παρακάτω παρουσιάζονται και ποσοτικά στον πίνακα 5.6 αλλά και με σχηματική απεικόνιση τα αποτελέσματα.

| Υλικά – Επιφάνειες | Βιομάζα (mg) | Επιφάνεια (cm ²) | Βιομάζα/ Επιφάνεια (mg/cm ²) |
|--|-----------------|---------------------------------|--|
| Θαλασσινό νερό | 7,8 | 25 | 0,31 |
| Θαλασσινό νερό με N/S | 8,5 | 25 | 0,34 |
| Θαλασσινό νερό + Θρεπτικά άλατα | 22,5 | 25 | 0,90 |
| Θαλασσινό νερό +Θρεπτικά άλατα με N/S | 28,9 | 25 | 1,16 |
| Θαλασσινό νερό + Θρεπτικά άλατα | 21,3 | 25 | 0,85 |
| Θαλασσινό νερό +Θρεπτικά άλατα με N/S | 27,4 | 25 | 1,10 |
| Θαλασσινό νερό + Απόβλητο οινοποιείου | 24,6 | 25 | 0,98 |
| Θαλασσινό νερό + Απόβλητο οινοποιείου + N/S | 31,8 | 25 | 1,27 |
| Θαλασσινό νερό +Απόβλητο οινοποιείου | 25,3 | 25 | 1,01 |
| Θαλασσινό νερό + Απόβλητο οινοποιείου + N/S | 32,6 | 25 | 1,30 |
| Θαλασσινό νερό + Θρεπτικά άλατα + Απόβλητο οινοποιείου | 27,1 | 25 | 1,08 |
| Θαλασσινό νερό + Απόβλητο οινοποιείου + Θρεπτικά άλατα + N/S | 36,3 | 25 | 1,45 |

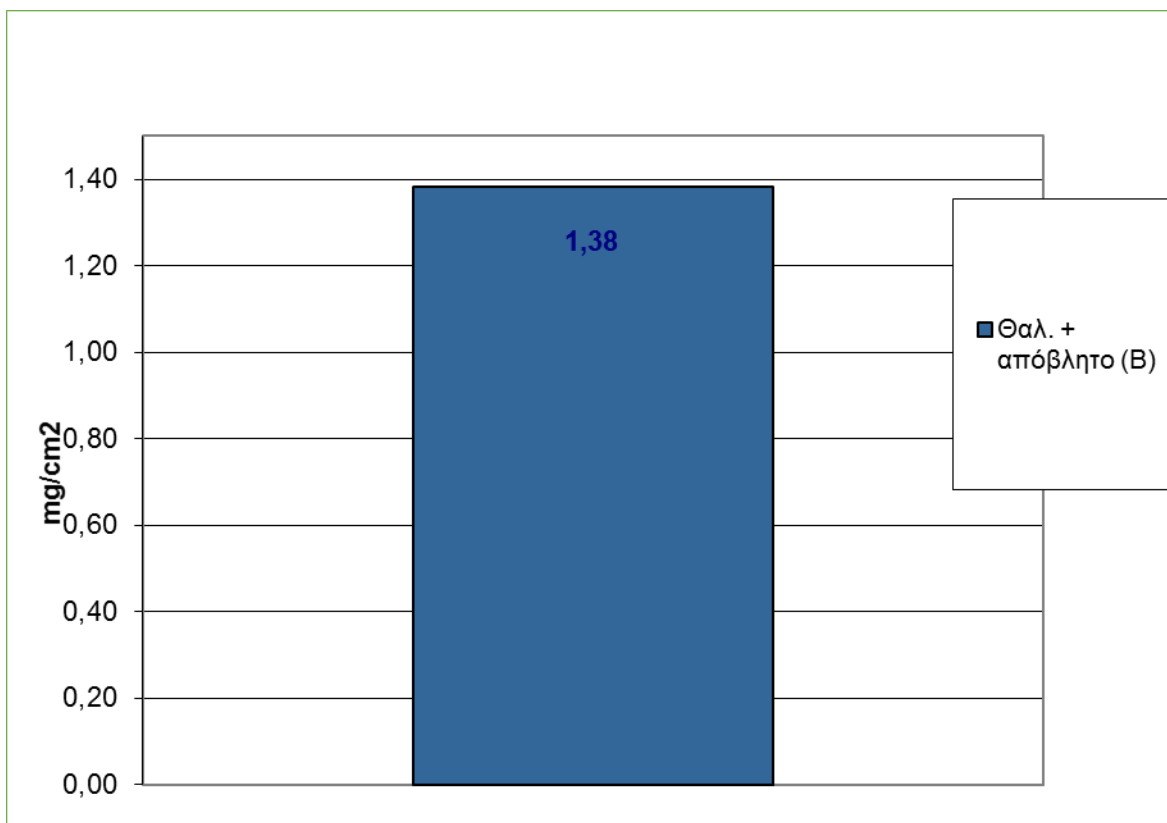
Πίνακας 5.6 Μέτρηση Βιομάζας *Stichococcus* SP πάνω σε επιφάνειες (μετά από 18 d +2 N/S)

| BOD (mg/L) | Έναρξη | Τέλος (18-20 μέρες) |
|---|--------|---------------------|
| Θαλασσινό νερό + Θρεπτικά άλατα | 17 | 38 |
| Θαλασσινό νερό + Θρεπτικά άλατα με N/S | 17 | 34 |
| Θαλασσινό νερό + Απόβλητο οиноποιείου | 385 | 42 |
| Θαλασσινό νερό + Απόβλητο οиноποιείου + N/S | 385 | 30 |
| Θαλασσινό νερό + Θρεπτικά άλατα +Απόβλητο οиноποιείου | 360 | 59 |
| Θαλασσινό νερό +Απόβλητο Θρεπτικά+ N/S | 360 | 34 |

Πίνακας 5.7 Ποιοτικά χαρακτηριστικά (BOD) του διαλύματος στην αρχή και στο τέλος της καλλιέργειας στα ποτήρια ζέσεως για κάθε συνθήκη καλλιέργειας



Διάγραμμα 5.6 : Ανάπτυξη βιομάζας με και χωρίς προσθήκη αποβλήτου οиноποιείου για καλλιέργεια που έλαβε χώρα σε ποτήρια ζέσεως (E = επαναληπτικό πείραμα).



Διάγραμμα 5.7 : Ανάπτυξη Βιομάζας (mg/cm²) *Stichococcus* sp. σε επιφάνεια γυαλιού αμμοβολής μετά από 20 μέρες με προσθήκη αποβλήτου και πενία αζώτου.

| Υλικά - Επιφάνειες | Βιομάζα (mg) | Επιφάνεια (cm ²) | Βιομάζα/ Επιφάνεια (mg/cm ²) |
|--|--------------|------------------------------|--|
| Γυαλί Αμμοβολής Θαλασσινό νερό 12 L + Απόβλητο Οινοποιείου με N/S | 2890 | 2.088 | 1,38 |

Πίνακας 5.8 Μέτρηση Βιομάζας *Stichococcus* sp. πάνω σε επιφάνειες (μετά από 18 d +2 N/S)

Στο διάγραμμα 5.7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη καλλιέργεια των μικροφυκών στο μεγάλο κλίμακας φωτο-βιοαντιδραστήρα. Σ' αυτό το πείραμα έγινε μέτρηση της βιομάζας μετά από 20 μέρες, η οποία αντιστοιχεί σε 1,38 mg/cm².

5.2.Αποτελέσματα από τη διαδικασία εξαγωγής λιπιδίων

| Πρόελευση | Μάζα λιπιδίων ($\frac{mg_{lipids}}{mg_{dry\ biomass}}$) |
|--|--|
| Θαλασσινό νερό + απόβλητο οиноποιείου | 0,029 |
| Θαλασσινό νερό + απόβλητο οиноποιείου με N/S | 0,050 |
| Θαλασσινό νερό + θρεπτικά άλατα | 0,019 |
| Θαλασσινό νερό + θρεπτικά άλατα + απόβλητο οиноποιείου | 0,042 |
| Θαλασσινό νερό + θρεπτικά άλατα + απόβλητο οиноποιείου με N/S | 0,070 |

Πίνακας 5.9. Μάζα των λιπιδίων μετά τον εξατμιστήρα.

Με βάση τα αποτελέσματα από τον πίνακα 5.9 παρατηρείται ότι η μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων ήταν στο πείραμα καλλιέργειας μικροφυκών όπου περιείχε θαλασσινό νερό + θρεπτικά άλατα + απόβλητο οиноποιείου. Όμως όπως έχει αναφερθεί νωρίτερα αυτή η σύνθεση κοστίζει πολύ περισσότερο σε μια εγκατάσταση μεγάλης κλίμακας καλλιέργειας και εξαγωγή λιπιδίων από μικροφύκη στελέχους *Stichococcus* sp.

Η επιλογή τοποθεσίας καθώς και η παροχή πρώτων υλών είναι οι κύριοι παράγοντες για την τεχνοοικονομική ανάλυση της μονάδας καλλιέργειας και επεξεργασίας μικροφυκών. Όσον αφορά για την επιλογή της τοποθεσίας της μονάδας, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη η ηλιοφάνεια, η θερμοκρασία και η διαθεσιμότητα χώρου για την εγκατάσταση. Καθώς επίσης και η διαθεσιμότητα νερού και θρεπτικών. Στη συνέχεια, το CO₂ αποτελεί την πιο σημαντική ροή τροφοδοσίας, διότι παρέχει τον απαιτούμενο άνθρακα για την ανάπτυξη των μικροφυκών.

5.3. Υπολογισμός απαιτούμενης έκτασης της καλλιέργειας

Με βάση τα αποτελέσματα από τα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, παρατίθενται στοιχεία για κατασκευή μεγάλου κλίμακας φωτο-βιοαντιδραστήρες καλλιέργειας μικροφυκών με πενία αζώτου σε εγκαταστάσεις παραγωγής οίνου.

Το οινοποιείο από όπου πήραμε το απόβλητο παράγει ετησίως 600 m^3 κρασί και 30 m^3 υγρά απόβλητα.

Οπότε $30 : 365 = 0,08 \text{ m}^3/\text{day}$. Επιπροσθέτως, λόγω της αραίωσης 1:600 του αποβλήτου, ($600 \times 0,08 = 48$) ο συνολικός όγκος αποβλήτων θα ανέρχεται στα $48 \text{ m}^3/\text{day}$. Όμως η καλλιέργεια θα πρέπει να παραμένει για 18 ημέρες + 2 μέρες με πενία αζώτου = 20 μέρες.

Οπότε η απαιτούμενη χωρητικότητα των δεξαμενών θα πρέπει να είναι $66 \text{ m}^3 \times 20 = 960 \text{ m}^3$

Άρα ο συνολικός χώρος που θα χρειαστεί αν το ύψος των δεξαμενών είναι 0,2 m θα είναι 4.8 στρέμματα.

Αξιολογώντας το αποτέλεσμα για την απαιτούμενη έκταση συμπεραίνετε ότι μια υποθετική υλοποίηση της εν λόγω εγκατάστασης είναι εφικτή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο βασικός σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της επίδραση της προσθήκης οργανικού άνθρακα – στη συγκεκριμένη περίπτωση απόβλητο από εγκατάσταση παραγωγής και εμφιάλωσης οίνου - στην παραγωγή λιπιδίων από μικροφύκη στελέχους *Stichococcous sp.* Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν τα διάφορα στάδια της παραγωγής βιομάζας από το επιλεγμένο στέλεχος *Stichococcous sp.* σε φωτο-βιοαντιδραστήρες μικρής και μεγαλύτερης κλίμακας που κατασκευάστηκαν κάτω από διαφορετικές συνθήκες λειτουργίας με στόχο την εύρεση των πιο αποδοτικών συνθηκών καλλιέργειας σε συνδυασμό με τη χρήση αποβλήτου οινοποιείου για εναλλακτική χρήση πηγής άνθρακα από την κοστοβόρα χρήση διοξειδίου του άνθρακα.

Εξετάστηκαν διαφορετικές συνθήκες στην ανάπτυξη μικροφυκών με στόχο τη μελλοντική βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάπτυξης σε εγκαταστάσεις πιλοτικής κλίμακας για μια περιβαλλοντικά συμφέρουσα καλλιέργεια με χρήση αποβλήτου και χωρίς το επιπλέον κόστος προσθήκης άνθρακα.

Η επιλογή της προέλευσης οργανικού άνθρακα από απόβλητο οινοποιείου έγινε για τους παρακάτω λόγους. Αρχικά, εξαιτίας της μεγάλης περιεκτικότητας του αποβλήτου σε φώσφορο και άζωτο ευνοείται η ανάπτυξη των μικροφυκών, γεγονός που επιδρά θετικά στην αυξημένη παραγωγή βιομάζας. Επιπροσθέτως, το πείραμα έλαβε χώρα στο Πολυτεχνείο Κρήτης το οποίο εδρεύει στο Νομό Χανίων, σ ένα νομό με έντονη καλλιέργεια αμπελιών και παραγωγή οίνου. Από τη σκοπιά του Μηχανικού Περιβάλλοντος, τα προβλήματα που δημιουργούνται κατά τους φθινοπωρινούς μήνες – μήνες επεξεργασίας σταφυλιών και παραγωγής κρασιού στις εγκαταστάσεις βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων είναι αρκετά. Μερικά οινοποιεία απορρίπτουν τα υπολείμματα από την παραγωγή κρασιού κατευθείαν στο δίκτυο αποχέτευσης, δίχως να έχουν υποστεί κάποια επεξεργασία, όπως παραδείγματος χάριν φίλτρανση. Ακόμη, η περιεκτικότητα των αποβλήτων σε στερεά είναι υψηλή ενώ επίσης παρουσιάζονται αυξημένες τιμές BOD, κάτι το οποίο έχει ιδιαίτερα αρνητικό αντίκτυπο στην οικονομική διαχείριση..

Έτσι λοιπόν, για τους παραπάνω λόγους και επηρεασμένοι από την σύγχρονη

τάση που αποδίδεται με το logo ‘waste to energy’” σκεφτήκαμε ότι θα μπορούσαμε να αξιοποιούμε αυτό το απόβλητο, αφού αποτελεί σημαντική πηγή οργανικού άνθρακα για την καλλιέργεια μικροφυκών. Με βάση τη βιβλιογραφία, τα πειράματα και τα αποτελέσματα αυτών συμπεραίνεται ότι είναι εφικτή η καλλιέργεια μικροφυκών σε φωτο-βιοαντιδραστήρες παρουσία οργανικού άνθρακα από απόβλητο οينوποιείου.

Συγκεκριμένα διαπιστώνεται ότι η καλλιέργειά τους για 18 μέρες σε αποστειρωμένο θαλασσινό νερό με προσθήκη αποβλήτου από οينوποιείο και χωρίς θρεπτικά άλατα και στη συνέχεια η πενία αζώτου για 2μέρες αποφέρει σημαντικά αποτελέσματα στη παραγωγή βιομάζας, με το εύρος τιμών να κυμαίνεται από 0,98 μέχρι 1,01 mg/cm²-. Καθώς η παραγωγή βιομάζας με χρήση αποβλήτου οينوποιείου είναι ικανοποιητική και με μικρή διαφορά μειωμένη σε σχέση με την προσθήκη επιπλέον αλάτων στο θαλασσινό διάλυμα, η συνολική διαδικασία καλλιέργειας μικροφυκών σε πιλοτικές μονάδες κρίνεται αειφόρα για την χρήση τέτοιου είδους αποβλήτου.

Το έντονο ενδιαφέρον για τη βιομάζα εξηγείται διότι η τάση της σύγχρονης βιομηχανίας είναι να στρέφεται σε εναλλακτικές πηγές ενέργειας, φιλικότερες προς το περιβάλλον και όπου η πρώτη ύλη είναι “απόβλητο” ή υπόλειμμα από μια άλλη βιομηχανική δραστηριότητα. Οπότε έχοντας βιομάζα και με τη διαδικασία της εκχύλισης και της εξάτμισης παράγονται λιπίδια τα οποία με μετέπειτα επεξεργασία μετατρέπονται σε βιοντίζελ. Δυστυχώς, στην παρούσα διπλωματική εργασία δεν ολοκληρώθηκε επιτυχώς η εξαγωγή βιοντίζελ από λιπίδια στελέχους *Stichococcus* sp. λόγω έλλειψης βιβλιογραφικών πηγών για το συγκεκριμένο στέλεχος μικροφυκών, και λόγω προβλημάτων που παρουσιάστηκαν κατά την εκχύλιση των λιπιδίων, λόγω πιθανότατα μη επιλογής κατάλληλου διαλύτη λόγω περιορισμένων αναφορών.

Σχετικά με την κατασκευή μονάδων καλλιέργειας μικροφυκών σε περιοχές με οينوποιητική δραστηριότητα απαιτούνται μεγάλες εκτάσεις γης. Λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα από τους υπολογισμούς για την απαιτούμενη έκταση στο κεφάλαιο 5 συμπεραίνεται ότι απαιτείται 4,8 στρέμματα έκταση για την κατασκευή εγκατάστασης φωτο-βιοαντιδραστήρων, κάτι το οποίο καθιστά αυτήν την διεργασία υλοποιήσιμη. Εντούτοις, συνυπολογίζοντας το γεγονός ότι τα αποτελέσματα προήρθαν από πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν

συγκεκριμένες ποσότητες αποβλήτου. Επιπλέον, δεν είναι δυνατόν να αγνοηθεί ότι η παραγωγή λιπιδίων βάσει των αποτελεσμάτων αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι αξιόλογη ως μέγεθος, αλλά η έλλειψη βιβλιογραφικών πηγών – προς το παρών- αποτρέπει την ολοκλήρωση της διεργασίας που είναι η παραγωγή βιοντίζελ. Συνεπώς, ίσως η περαιτέρω έρευνα και η ύπαρξη περισσότερων βιβλιογραφικών πηγών να οδηγήσει στην υλοποίηση αυτής της διεργασίας στο μέλλον.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ακριδά- Δεμερτζή Κ., (2014), “Οινολογία ΙΙ. Απόβλητα Οινοποιείων”, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Εκδ.1.

Anderson R.A., Melkonian M., Norton T., (1996), “Algal Biodiversity”, *Phycologia*, Vol. 35, no. 4, pp. 308-326.

Aravantinou A., Theodorakopoulos M., Manariotis I., (2013), “Selection of microalgae for wastewater treatment and potential lipids production”, *Bioresource Technology*, Vol. 147, pp. 130-134.

Axelsson M, Gentili F., (2014), “A Single-Step Method for Rapid Extraction of Total Lipids from Green Microalgae”, Vol. 9, Issue 2, pp. 1-3.

Badvipour S., Eustance E., Sommerfeld M. , (2016), “Process evaluation of energy requirements for feed production using dairy wastewater for algal cultivation: Theoretical approach”, *Alga Research*, Vol 19, pp. 207-214.

Barsanti L., Gualtieri P., (2006), "Algae: Anatomy, biochemistry and biotechnology", pp. 111- 119.

Becker E.W., (2007), “Micro-algae as a source of protein”, *Biotechnology Advances*, Vol. 25, Issue 2, pp. 207-210.

Borowitzka M., (1999), “Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters”, *Journal of Biotechnology*, Vol. 70, Issues 1-3, pp 313-321.

Brock T.D., (1967), “Relationship between standing crop and primary productivity along a hot spring thermal gradient”, *Journal of Ecology*, Vol. 48, Issue 4, pp. 566-571.

Bunt J. S., (1963), “Microbiology of Antarctic Sea -ice: Microalgae and Antarctic Sea -ice”, *Nature*, Vol. 199, Issue 4900, pp. 1254 - 1255

Carreira R. S., (2015) “Source and distribution of organic matter in sediments in the SE Brazilian continental shelf influenced by river discharges: An approach

using stable isotopes and molecular markers". *Journal of Marine Systems*, Vol 141, pp 80-89.

Chen M., Tang H., Ma H., Holland T.C., Salley S., (2011), "Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae", *Bioresource Technology*, Vol 102, Issue 2, pp. 1649- 1655.

Chiu S.Y., (2009), "The air-life photobioreactors with flow patterning for high-density cultures of microalgae and carbon dioxide removal", *Engineering in Life Science*, Vol. 9, Issue 3, pp. 254-260.

Chojnacka K., Marquez- Rocha F.J., (2004), "Kinetic and Stoichiometric Relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae", *Biotechnology*, Vol. 3, Issue 2, pp. 21-34.

Christi Y., (2007), "Biodiesel from microalgae", *Biotechnology Advances*, Vol. 25, Issue 3, pp. 294-306.

Converti A., Oliveira R.P.S., Lodi A., Zilli M., (2009), "Biogas production and valorization by means of a two-step biological process", *Bioresource Technology*, Vol. 100, Issue 23, pp. 5771-5776.

Darley W. M., Shimmel S., (1985), "Production and Density of Soil Algae in an Agricultural System", Vol. 66, Issue 5, pp. 1439- 1447.

Demirbas A., (2007), "Progress and recent trends in biofuels", *Progress in Energy and Combustion Science*, Vol. 33, Issue 1, pp. 1-18.

De Pauw N., Verlet H., De Leenheer L., (1980), "Heated and unheated outdoor cultures of marine algae with animal manure", *Algae Biomass*, Elsevier/North Holland Biomedical Press, pp. 315–341.

Falkowski P., Owens T., (1980), "Two strategies in marine phytoplankton", *Plant Physiology*, Vol. 66, no. 4, pp. 592-595.

Fleurence J., (1999), "Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses", *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 10, Issue 1, pp. 25-28.

Evangelista V., Frassantito A.M., Passarelli V., Barsanti L., Gualtieri P., (2006), "Microspectroscopy of the Photosynthetic Compartment of Algae", Vol. 82, Issue 4, pp. 1039- 1046.

Gouveia L., Oliveira A.C., (2009), "Microalgae as a raw material for biofuels production". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Vol 36, Issue 2, pp 269-274.

Hamelin S, Planas D., Amyot M., (2015), "Spatio – temporal variations in biomass and mercury concentrations of epiphytic and their host in a large river wetland", *Environmental Pollution*, Vol 197, pp. 221- 230.

Guedes A.C., Malcata F.X., (2012), "Nutritional Value and Uses of Microalgae in Aquaculture, *Aquaculture*, pp. 59- 76.

Halim R., Danquash M., Webley P., (2012), "Extraction of oil from microalgae for biodiesel production, *Biotechnology Advances*, Vol. 30, Issue 3, pp. 709-732.

Hammouda O. , Abdel-Raouf N., Shaaban M., Kamal M., (2015), "Treatment of Mixed Domestic- Industrial Wastewater Using Microalgae *Chlorella* sp", *Journal of American Science*, Vol 11, pp. 304- 315.

Hoh D., Watson S., Kan E.,(2016), "Algal biofilm reactors for integrated wastewater treatment and biofuel production: A review", *Chemical Engineering Journal*, Vol. 287, pp. 466-473.

Illman A.M., Scraggy A.H., Shales S.W., (2000)," Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium", *Enzyme and Microbial Technology*, Vol 27, Issue 8, pp. 631-635.

Johnson M., Zhiyou W., (2009)," Development of an attached microalgal growth system for biofuel production, *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 85, Issue 3, pp. 525-534.

Jassby A., (1988), "Some public health aspects of microalgal products, Cambridge University Press, pp. 182- 199.

Khoo C. , Lam M., Lee K., (2016), "Pilot-scale semi-continuous cultivation of microalgae *Chlorella vulgaris* in bubble column photobioreactor (BC -PBR): Hydrodynamics and gas-liquid mass transfer study", *Algal Research*, Vol 15, pp. 66-76.

Κόλλιας Λ.,(2013),"Παραγωγή Βιοντίζελ από Μικροφύκη", Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα

Kim Z., Park H., Hong S., Lim S., Lee C., (2016), "Development of a floating photobioreactor with internal partitions for efficient utilization of ocean wave into

improved mass transfer and algal culture mixing”, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, Vol 39, Issue 5, pp. 713-723

Kiple K., Ornelas K.C., (2001), "The Cambridge World History of Food", Cambridge University, Press. Vol. 2, pp. 231-233.

Leite G., Paranjape K., Abdelaziz A., Hallenbeck P. , (2015), "Utilization of biodiesel- derived glycerol or xylose for increased growth and lipid production by indigenous microalgae", *Bioresource Technology*, Vol 2015, pp. 123 -130.

Li Q., Du W., Liu D., (2008), "Perspectives of microbial oils for biodiesel production", *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 80, Issue 5, pp. 749-756.

Lin T., Wu J., (2015), "Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition", *Bioresource Technology*, Vol 184, pp. 100-107.

Lundquist T.J, Woertz I.C., Quinn N.W.T., Benemann J.R., (2010), "A realistic Technology and Engineering Assessment of Algae Biofuel Production", *Energy Bioscience Institute*, pp. 1-178.

Margulis L., Thorington G., (1981), "Hydra viridis :Transfer of metabolites between hydra and symbiotic algae", *The Biological Bulletin*, Vol. 160, n. 1, pp 438- 450.

Mata T., (2010), "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 14, Issue 1, pp. 217-232.

Mchugh D. J., (2003), "A guide to the seaweed industry", *FAO Fisheries Technical Paper* 441.

Medina R., Grima M., Giménez G.A, Gonzalez M. J. I., (1998), "Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids", *Biotechnology Advances*, Vol. 16, Issue 3, pp. 517-580.

Melis A., Happe T., (2001), "Hydrogen Production: Green Algae as a Source of Energy", *Plant Physiology*, Vol 127, issu 3 pp. 740-748.

Metting F. B. Jr, (1996), "Biodiversity and application of microalgae", *Journal of Industrial Microbiology*, Vol.17, Issue 5 pp.477 -489.

Moheimani N.R., (2005)," The culture of coccolithophorid algae for carbon dioxide bioremediation", *PhD Thesis*, Murdoch University.

Morais M.G, Costa J. A. V., (2007), "Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide", *Energy Conversion and Management*, Vol. 48, Issue 7, pp. 2169-2173.

Munoz R., Guieysse B., (2006), "Algal -bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants : A review", *Water Research*, Vol.40, Issue 15, pp. 2799-2815.

Muyllaert K., (2015), "Biomass and Biofuels from Microalgae", *Biofuel and Biorefinery Technologies*, Vol 2, pp. 75-94.

Νικολάου Χ., (2016), "Αξιοποίηση βιομάζας μικροφυκών από επεξεργασία αποβλήτων για παραγωγή βιοαιθανόλης", Μεταπτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Πατρών.

O'Neil G. W., Williams J. R., Wilson- Peltier J., Knothe G., Reddy C., (2016), "Experimental Protocol for Biodiesel Production with Isolation of Alkenones as Coproducts from Commercial Isochrysis Algal Biomass"., *Journal of Visualized Experiments*, Vol 112.

Perez-Garcia O., Escalante F. M.E, De -Bashan L.E., Bashan Y., (2011), "Heterotrophic cultures of microalga: Metabolism and potential products". *Water Research*, Vol. 45, Issue 1, pp. 11–36.

Pittman J.K., Dean A., Osundeko O., (2011), "The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources", *Bioresource Technology*, Vol. 102, Issue 1, pp. 17-25.

Puhan S., Vedaraman N., Ram B., Sankarnarayanan G., Jeychandran K., (2005), "methyl ester as biodiesel-preparation and emission characteristics, *Biomass and Bioenergy*, Vol. 28, Issue 1, pp. 87-93.

Reynolds C., (2006), "Ecology of phytoplankton", *Ecology, Biodiversity and Conservation*.

Ripszam M., Haglund P., (2015), "Automated method for determination of dissolved organic carbon- water distribution constants of structurally diverse pollutants using pre-equilibrium solid-phase microextraction", *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol 3, pp. 266-274.

Rothlisberger-Lewis K.L,(2015). "Soil Carbon and nitrogen dynamics as affect by lipid-extracted algae application", *Geodema*, Vol 262, pp. 140-146.

Ryan C., Green T.B., Hartley A., Green B. T., Browning B., Garvin C., (2009), "The promise of algae biofuels", *Cultivation Clean Energy*.

Raven J., Beardall J., (2016), "Dark Respiration and Organic Carbon Loss". *The Physiology of Microalgae*, Vol 6, pp. 129-140.

Ruffell S., Richard F., Woodworth A., Bragg L., Bauer A., Deeth L., Mueller K., Farwell A., (2016), "Assessing the bioremediation potential of algal species indigenous to oil sands process – affected waters on mixtures of oil sands acid extractable organics", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol 133, pp. 373 - 380.

Santillan- Jimenez E., Pace R., Marques S., Morgan T., McKelphin C., Mobley J., Crocker M., (2016), "Extraction, characterization, purification and catalytic upgrading of algae lipids to fuel- like hydrocarbons", *Fuel*, Vol 180, pp 668-678.

Schamphelaire L.S., Verstraete W., (2009),"Biotechnology and Bioengineering: Revival of Biological sunlight to biogas energy conversion system", *Biotechnol Bioengineering*, Vol 103, Issue 2,pp. 296-304.

Shukla S. K., Mishra P. K., (2015), "Bioremediation and Decolourisation of Biomethanated Distillery Spent Wash", *Algae and Environmental Sustainability*, Vol 7, pp. 107-117.

Spolaore P., Joannis- Cassan C., Duran E., Isambert A., (2006), "Commercial applications of microalgae", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 101, Issue 2, pp. 87-96.

Touloumis A.G., (2010), "Biofuels for transport, National Technical University of Athens, diploma thesis.

Vlyssides A.G., Barampouti E.M., Mai S., (2005)," Wastewater characteristics from Greek wineries and distilleries, IWA publishing, Vol. 51, Issue 1, pp. 53-60.

Waterbury J., (2006), "The Cyanobacteria—Isolation, Purification and Identification". *The Prokaryotes*, Vol 3, pp. 1053–1073.

Wen Z., Johnson M.B., (2009), "Microalgae as a feedstock for biofuel production", *Virginia Cooperative Extension*.

Wiessner W., Mende D., Kovacs L., Janda T., Demeter S., (1995), "Effects of in vivo CO₂ – depletion on electron transport and photoinhibition in the green algae,

Chlamydomonas reinhardtii, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, Vol. 1229, Issue 2, pp. 166-174.

Wharton R. A. Jr., Smernoff D. T., Avern M.M, (1988), "Algae in space", *Journal of Algae and human affairs*.

Wijffels R. H. and Barbosa M. J., (2010), "An outlook on microalgal biofuels", *Science*, Vol 329, Issue 5993, pp. 796-799.

Wiley P., Campbell J., Elliott J.C., Mckuin B., (2011)," Production of Biodiesel and Biogas from Algae: A review of process train options", *Water Environmental Research*, Vol. 83, n. 4, pp. 326-338.

Woertz I., Feffer A., Nelson Y., (2009), "Algae Grown on Dairy and Municipal Wastewater for Simultaneously Nutrient Removal and Lipid Production for Biofuel Feedstock", *Journal of Environmental Engineering*, Vol 135, Issues 11, pp.1115-1122.

Wuang S. C., Khin M., Chua P., Luo Y., (2016), "Use of *Spirulina* biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers", *Algal Research*, Vol 15, pp. 59-64.

Xin C., Addy M., Zhao J., Cheng Y., Cheng S., Mu D., Liu Y., Ding R., Chen P., Ruan R., (2016), "Comprehensive techno-economic analysis of wastewater-based algal biofuel production: A case study", *Bioresource Technology*, Vol 211, pp. 584-593.

Yusuf C., Jinyue Y., (2011), "Current status and future trends", *Applied Energy*, Issue 10, pp. 3548-3555.

Zhang H., Wang W., Li Y., Yang W. and Shen G., (2011), "Mixotrophic cultivation of *Botryococcus braunii*", *Biomass and Bioenergy*, Vol 35, Issue 5, pp. 1710-1715.