ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Διερεύνηση της δυνατότητας παραγωγής λιπιδίων κατάλληλων για βιοντίζελ από ενδογενή στελέχη κυανοβακτηρίων και μικροφυκών του Ελλαδικού χώρου

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΜΩΥΣΗ

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΑΜΑΛΙΑ Δ. ΚΑΡΑΓΚΟΥΝΗ

ΑΘΗΝΑ 2014

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης «Μικροβιακή Βιοτεχνολογία». Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συνεργάτες, φίλους και συγγενείς που με βοήθησαν και χωρίς αυτούς δε θα είχε ολοκληρωθεί αυτή η εργασία.

Αρχικά θέλω να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κα Καραγκούνη η οποία με καθοδήγησε σε όλη την πορεία της έρευνάς μου. Επίσης ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Χατζηνικολάου για την άριστη συνεργασία που είχαμε και για την πολύτιμη βοήθειά του στην πραγματοποίηση των πειραμάτων μου.

Ακόμη θέλω να ευχαριστήσω τους άμεσους συνεργάτες μου, Μαρία Κουταλιανού, Γιώργο Καπετανάκη, Στάθη Κατσίφα και Αλέξανδρο Σαββίδη, που ήταν δίπλα μου αυτά τα χρόνια και μου παρείχαν αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια. Ευχαριστώ επίσης όλη την ομάδα της Μικροβιολογίας. Τέλος θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που με στήριξε και με στηρίζει, για τη συμπαράσταση και την υπομονή τους.

Κωνσταντίνα Μωυσή

SUMMARY

The rease of the price of fossil fuels and of the emission of Greenhouse gasses has led to the need of biofuel production. First generation biofuels have the significant advantage that they can be used in the present internal combustion engines. But they have the basic disadvantage that they compet the food industry, as they are extracted from oil crops and vast lands are needed for their growth. Second generation biofuels were then developed. These biofuels are extracted from energy crops but the handling of these crops are still under development. One of the biofuels that is used in EU is biodiesel. The scientific community tried to find low cost sources for biofuel production and they discovered that microalgae and cyanobacteria are two prommising candidates. The purpose of this study was to isolate microalgae and cyanobacteria from Greek environments, grow them in open, closed and fed batch cultures and the selection of the most productive strains. &4 microalgae and 4 cyanobacteria were isolated from the monuments of Acropolis, lake Koroneia and the region of Aspropirgos and were phenotypically and molecularly identified. All strains were grown in closed liquid cultures and the strains with the highest biomass production were selected and grown in fed batch cultures.The lipid productivity was estimated by Flow Cytometry and Gas Chromatography. The strains *Chlorella* sp. AKA17 and ASP14 were selected as they presented the highest biomass and lipid productivity, the optimum nitrogen concentration and pH value for each strain was estimated and their cultures were scaled up to 15 l. Finally the strain *Chlorella* sp. AKA17 was selected as the most lipid productive.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αύξηση της τιμής των ορυκτών καυσίμων και των εκπομπών των αερίων του θερμοκηπίου οδήγησαν στην ανάγκη παραγωγής βιοκαυσίμων. Τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς εμφανίζουν το βασικό πλεονέκτημα ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν στους κινητήρες εσωτερικής καύσης χωρίς να χρειάζονται μετατροπές. Το βασικό τους μειονέκτημα είναι όμως ότι ανταγωνίζονται τη βιομηχανία τροφίμων, καθώς παράγονται από ελαιούχους καρπούς (αραβόσιτο, ελαιοκράμβη κ.ά.). Αναπτύχθηκαν έτσι τα βιοκαύσιμα β` γενιάς τα οποία παράγονται από ενεργειακά φυτά και κατάλοιπα γεωργικών διεργασιών. Η τεχνολογία όμως επεξεργασίας των α` αυτών υλών βρίσκεται

ακόμα υπό ανάπτυξη. Ένα από τα βιοκαύσιμα που χρησιμοποιούνται στην ΕΕ είναι το βιοντίζελ. Οι επιστήμονες στράφηκαν στην εύρεση φθηνών πρώτων υλών που δεν ανταγωνίζονται τη βιομηχανία τροφίμων και βρέθηκαν δύο πολλά υποσχόμενοι υποψήφιοι, τα μικροφύκη και τα κυανοβακτήρια. Σκοπός λοιπόν της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση μικροφυκών και κυανοβακτηρίων από ιδιαίτερα οικοσυστήματα, η μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης των απομονωμένων στελεχών σε ανοιχτά, κλειστά και ημιτροφοδοτούμενα συστήματα και η επιλογή στελεχών που παράγουν λιπίδια κατάλληλα για βιοντίζελ. Απομονώθηκαν έτσι 74 μικροφύκη και 4 κυανοβακτήρια από τα μνημεία της Ακρόπολης, τη λίμνη Κορώνεια και την περιοχή του Ασπρόπυργου (θάλασσα Ασπρόπυργου, λίμνη Κουμουνδούρου). Τα απομονωμένα στελέχη ταυτοποιήθηκαν φαινοτυπικά και μοριακά και αναπτύχθηκαν σε υγρές κλειστές καλλιέργειες. Επιλέχθηκαν τα στελέχη με τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας και αναπτύχθηκαν σε ημιτροφοδοτούμενο σύστημα. Η ικανότητα παραγωγής λιπιδίων των επιλεγμένων στελεχών έγινε ποιοτικά με χρήση Κυτταρομετρίας Ροής και ποσοτικά με Αέριο Χρωματογράφο. Επιλέχτηκαν τα στελέχη *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 και ΑΣΠ14 με τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων και αναπτύχθηκαν σε καλλιέργειες μεγαλύτερης κλίμακας (15 l) αφού βρέθηκε η κατάλληλη συγκέντρωση νιτρικών και η κατάλληλη τιμή pH για τη μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων. Τέλος επιλέχθηκε το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 ως το αποδοτικότερο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιοκαύσιμα……..1-3

1.1.1 Βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς……..4

1.1.2 Βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς…….....4-5

1.2 Μικροφύκη και κυανοβακτήρια – Πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντίζελ……6-17

1.2.1 Επιλογή στελέχους ……17-18

1.2.1.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση μικροφυκών και κυανοβακτηρίων……..19-20

1.2.1.2 Μέθοδοι προσδιορισμού των παραγόμενων λιπιδίων από στελέχη μικροφυκών και κυανοβακτηρίων……..20-26

1.2.2 Καλλιέργεια μικροφυκών και κυανοβακτηρίων…….27-28

1.2.2.1 Συνθήκες ανάπτυξης των μικροφυκών και των κυανοβακτηρίων που επηρεάζουν την παραγωγή λιπιδίων……..28-38

1.2.3 Τεχνικά χαρακτηριστικά συστημάτων καλλιέργειας μεγάλου όγκου για μικροφύκη και κυανοβακτήρια…….38-41

1.2.3.1 Μέθοδοι συλλογής βιομάζας μικροφυκών και κυανοβακτηρίων……41-42

1.2.3.2 Εξαγωγή λιπιδίων από τη βιομάζα των μικροφυκών……..42-45

1.3 Βασικά χαρακτηριστικά του παραγόμενου βιοντίζελ……..45

1.4 Πρόσθετες εφαρμογές της βιομάζας των μικροφυκών και κυανοβακτηρίων……45-46

1.4.1 Η βιομάζα μικροφυκών και κυανοβακτηρίων στην ανθρώπινη διατροφή …….....46

1.4.2 Η βιομάζα μικροφυκών και κυανοβακτηρίων σε ζωοτροφές και υδατοκαλλιέργειες…44-45

1.4.3 Η βιομάζα μικροφυκών και κυανοβακτηρίων ως βιο-λίπασμα……47

1.4.4 Παραγωγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και πρωτεϊνών από τη βιομάζα μικροφυκών και κυανοβακηρίων……..47-48

1.6 ΣΤΟΧΟΣ……48-49

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1Μικροοργανισμοί……50-51

2.2 Επεξεργασία δειγμάτων…….51-52

2.3 Μορφολογική ανάλυση μικροφυκών και κυανοβακτηρίων…….52

2.4 Γενετική ανάλυση μικροφυκών και κυανοβακτηρίων……..52

2.4.1 Εκχύλιση DNA μικροφυκών..……52-53
2.4.1.1 Αντίδραση PCR για την ενίσχυση του 18S rRNA γονιδίου των μικροφυκών……...53
2.4.1.2 Αντίδραση PCR για την ενίσχυση της ITS περιοχής του γονιδιώματος των μικροφυκών……..54-55
2.4.2 Εκχύλιση DNA κυανοβακτηρίων……55-56
2.4.2.1 Αντίδραση PCR για την ενίσχυση του 16 S rRNA γονιδίου των κυανοβακτηρίων…56
2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης……..56-57
2.6 Συστήματα ανάπτυξης μικροφυκών και κυανοβακτηρίων……..57-59
2.7 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση της παραγωγής λιπιδίων……....59
2.7.1 Χρώση μικροφυκών με τη χρωστική BODIPY 505/515 και φωτογράφηση σε φωτονικό μικροσκόπιο……...59-60
2.7.2 Εξαγωγή λιπιδίων από μικροφύκη, μετεστεροποίηση και ανάλυση με Αέριο Χρωματογράφο……...61-63
2.8 Ανάπτυξη μικροφυκών σε διάφορες συνθήκες καταπόνησης……...63-64
2.9 Ανοιχτές καλλιέργειες σε ημιπιλοτική κλίμακα……65-66

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ποικιλότητα μικροφυκών και κυανοβακτηρίων στις περιοχές της Ακρόπολης, της Κορώνειας και του Ασπρόπυργου……67-68
3.2 Μορφολογικά και γενετικά χαρακτηριστικά –Ταξινόμηση των απομονωμένων στελεχών……..……69
3.2.1 Μορφολογικά και γενετικά χαρακτηριστικά των απομονωμένων μικροφυκών……....69-78
3.2.2 Μορφολογικά και γενετικά χαρακτηριστικά των απομονωμένων κυανοβακτηρίων…..78-80
3.3. Μελέτη της αύξησης των μικροοργανισμών σε διαφορετικά συστήματα καλλιέργειας και ανίχνευση των παραγόμενων λιπιδίων……80-81
3.3.1 Μελέτη αύξησης των απομονωμένων μικροφυκών……81-98
3.3.1.1 Ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση των παραγόμενων λιπιδίων από τα απομονωμένα μικροφύκη……..98-110
3.3.2 Μελέτη αύξησης των απομονωμένων κυανοβακτηρίων……110-111

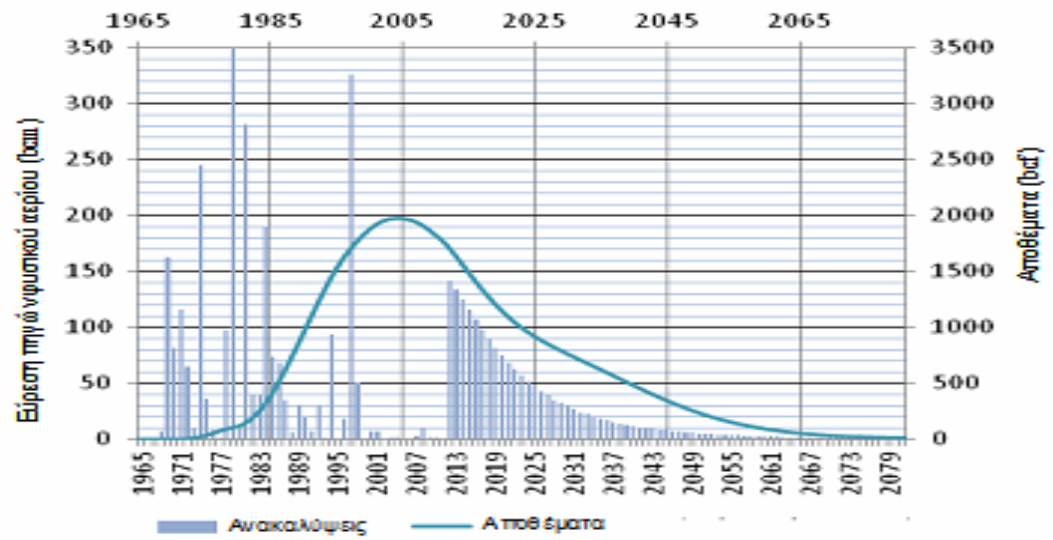
3.3.2.1 Ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση των παραγόμενων λιπιδίων από τα απομονωμένα κυανοβακτήρια……..112
3.4 Μελέτη επίδρασης διαφόρων συνθηκών στην ανάπτυξη των μικροφυκών και στην παραγωγή των λιπιδίων τους……..112
3.4.1 Επίδραση της συγκέντρωσης νιτρικών στην παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων των μικροφυκών……112-122
3.4.2 Επίδραση του pH στην παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων…….123-129
3.5 Αναβάθμιση σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια προσομοιώνοντας συνθήκες πεδίου.130-133
4.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ……124-135
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιοκαύσιμα

Την τελευταία δεκαετία η παγκόσμια ενεργειακή ζήτηση αυξάνεται με γρήγορους ρυθμούς. Σύμφωνα με τη Διεθνή Έκθεση Ενέργειας (International Energy Outlook – IEO) του 2013, η παγκόσμια ενεργειακή κατανάλωση θα αυξηθεί κατά 56% μέχρι το 2040 και θα φτάσει τα 820 τρισεκατομμύρια Btu κατανάλωσης ετησίως.

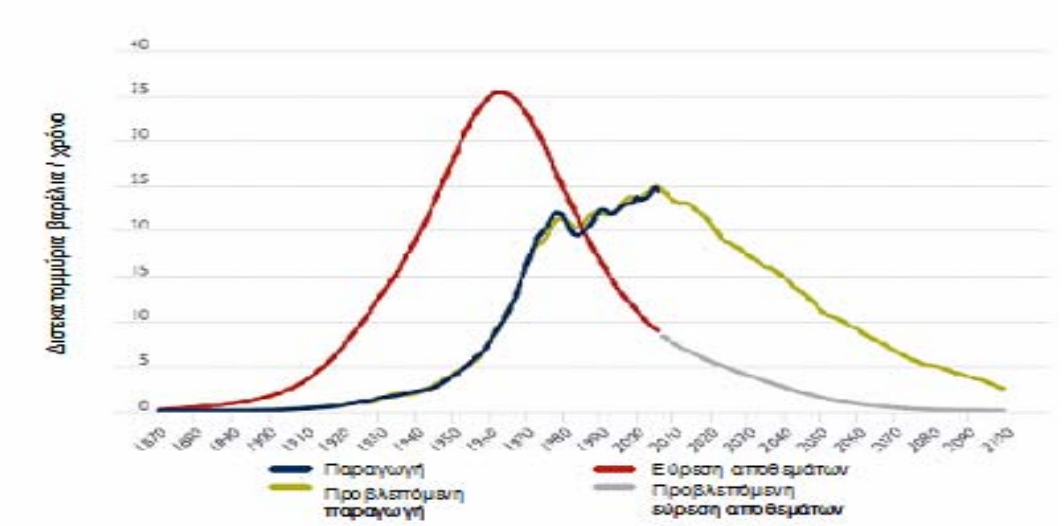
Τα ορυκτά καύσιμα αποτελούσαν το 88% της κατανάλωσης ενώ η πυρηνική και υδροηλεκτρική ενέργεια το 5% και 6% αντίστοιχα (Brennan and Owende, 2009). Με βάση την ανάπτυξη της τεχνολογίας, τα αποθέματα και την εύρεση νέων αποθεμάτων ορυκτών καυσίμων (π.χ. φυσικού αερίου) (Εικόνα 1.1) και αργού πετρελαίου (Εικόνα 1.2), είναι πολύ πιθανό τα ορυκτά καύσιμα να συνεχίσουν να είναι διαθέσιμα σε χαμηλές τιμές για ένα χρονικό διάστημα, εξαρτώμενα όμως πάντα από τις διαφοροποιήσεις στην ασφάλεια της προμήθειας που προκύπτουν από πολιτικές εξελίξεις και αναταραχές στα κράτη που αποτελούν τους βασικούς προμηθευτές ορυκτών καυσίμων (European Comission, 2007; Rogner, 2000).



Εικόνα 1.1. Διάγραμμα των αποθεμάτων φυσικού αερίου που βρέθηκαν, σε δισεκατομμύρια κυβικά μέτρα μέχρι το 2011 και οι προβλεπόμενες ανακαλύψεις αποθεμάτων μέχρι το 2080 στη Νορβηγία. Στο Διάγραμμα φαίνονται επίσης τα ήδη υπάρχοντα αποθέματα που βρίσκονται υπό επεξεργασία (www.theoildrum.com).

Παράλληλα, οι επιπτώσεις της παγκόσμιας κλιματικής αλλαγής έχουν αυξηθεί και κατά ένα μεγάλο ποσοστό οφείλονται στις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου από τη χρήση ορυκτών καυσίμων (Ugarte et al.,2003). Οι επιπτώσεις αυτές δημιουργούν μια

αβεβαιότητα όσον αφορά την αειφορία των υπαρχόντων ορυκτών καυσίμων, όχι μόνο σε σχέση με τη διαθεσιμότητά τους, αλλά και σε σχέση με τις εκπομπές CO_2.



Εικόνα 1.2. Ετήσια παγκόσμια εύρεση κοιτασμάτων και παραγωγή συμβατικού πετρελαίου. Στο Διάγραμμα φαίνεται η εύρεση κοιτασμάτων ορυκτού πετρελαίου και η παραγωγή συμβατικού πετρελαίου καθώς και η πρόβλεψη για μελλοντική εύρεση νέων κοιτασμάτων και εκμετάλλευσή τους μέχρι το 2100 (www.theoildrum.com).

Η χρήση μέσων μεταφοράς και η βιομηχανία είναι οι βασικές ανθρωπογενείς πηγές που είναι υπεύθυνες, στην Ευρωπαϊκή Ένωση, για πάνω από 20% και 60% των εκπομπών του αερίου του θερμοκηπίου αντίστοιχα. Η αγροτικές καλλιέργειες είναι η τρίτη πηγή και αντιστοιχεί στο 9% των εκπομπών (Mata et al., 2010). Με την αύξηση των ανθρωπογενών εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου, έχει καταστεί πολύ σημαντικό να αναπτυχθούν τεχνικές και να υιοθετηθούν πολιτικές ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι επιδράσεις της αύξησης της θερμοκρασίας παγκοσμίως. Το πρωτόκολλο του Κιότο του 1997 προβλέπει μείωση κατά 5,2% στις εκπομπές σε σχέση με τις τιμές του 1990 (Wang et al.,2008).

Η εύρεση «καθαρών» και ανανεώσιμων πηγών ενέργειας είναι ένα μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις που πρέπει να αντιμετωπιστούν βραχυπρόθεσμα και μακροπρόθεσμα. Τα σχετιζόμενα θέματα είναι συνδεδεμένα με την οικονομική ανάπτυξη και ευημερία, την ποιότητα ζωής και την παγκόσμια ενεργειακή σταθερότητα. Παραδείγματος χάριν, πολλές χώρες και περιοχές έχουν ήδη θέσει στόχους για μείωση του CO_2 ώστε να ανταποκριθούν στις απαιτήσεις του πρωτοκόλλου του Κιότο.

Στην παρούσα φάση πολλές επιλογές εξετάζονται και εφαρμόζονται στην πράξη, με διαφορετικά ποσοστά επιτυχίας. Παραδείγματα περιλαμβάνουν την ηλιακή ενέργεια, είτε ως θερμική ενέργεια είτε με χρήση φωτοβολταϊκών, την υδροηλεκτρική και γεωθερμική ενέργεια, τον άνεμο και τα βιοκαύσιμα (Mata et al., 2010). Ένας βασικός στόχος είναι να ληφθούν μέτρα για τη μείωση των εκπομπών από τις μετακινήσεις, όπως είναι η σταδιακή αντικατάσταση των ορυκτών καυσίμων με ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, όπου τα βιοκαύσιμα φαίνονται να συνεισφέρουν στο σκοπό αυτό βραχυπρόθεσμα.

Βιοκαύσιμα είναι υγρά ή αέρια καύσιμα κίνησης τα οποία παράγονται από βιομάζα, όπως ορίζει η Οδηγία 2009/28/ΕΚ. Ειδικότερα, όπως ορίζει ο Νόμος 3468/2006, Βιοκαύσιμα θεωρούνται και τα ακόλουθα καύσιμα:

- Βιοντίζελ (πετρέλαιο βιολογικής προέλευσης) είναι οι μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (ΜΛΟ – FAME) που παράγονται από φυτικά ή ζωικά έλαια και λίπη και είναι ποιότητας πετρελαίου ντίζελ.
- Βιοαιθανόλη είναι η αιθανόλη που παράγεται από Βιομάζα ή από βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα αποβλήτων.
- Βιοαέριο είναι το καύσιμο αέριο που παράγεται από Βιομάζα ή βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα βιομηχανικών και αστικών αποβλήτων, το οποίο μπορεί να καθαριστεί και να αναβαθμιστεί σε ποιότητα φυσικού αερίου. Βιομεθανόλη είναι η μεθανόλη που παράγεται από Βιομάζα.
- Βιο-ETBE είναι ο αιθυλο-τριτοταγής-βουτιλαιθέρας (ETBE) που παράγεται από βιοαιθανόλη, για χρήση ως Βιοκαύσιμο. Το κατ' όγκο ποσοστό Βιο-ETBE που υπολογίζεται ως Βιοκαύσιμο είναι 47% επί του συνόλου του. Βιο-MTBE είναι ο μεθυλο-τριτοταγής-βουτιλαιθέρας (MTBE) που παράγεται από μεθανόλη. Το κατ' όγκο ποσοστό Βιο-MTBE που υπολογίζεται ως Βιοκαύσιμο είναι 36% επί του συνόλου του. (www.ypeka.gr)

Η παραγωγή βιοκαυσίμων αναμένεται να προσφέρει νέες δυνατότητες στις πηγές προμήθειας καυσίμων, να προωθήσει την εύρεση εργασίας σε αγροτικές περιοχές, να οδηγήσει σε αντικατάσταση των ορυκτών καυσίμων και να συνεισφέρει στη μείωση των εκπομπών του αερίου του θερμοκηπίου ενισχύοντας την απεξάρτηση από τα ορυκτά καύσιμα.

1.1.1 Βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς

Η ανάγκη για απεξάρτηση από τα ορυκτά καύσιμα ως πηγή ενέργειας και για μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου, οδηγεί στην ανάγκη χρήσης εναλλακτικών πηγών ενέργειας (Williams and Laurens, 2010). Τα τελευταία χρόνια, η χρήση υγρών βιοκαυσίμων στον τομέα των μεταφορών έχει αναπτυχθεί σημαντικά παγκοσμίως, καθοδηγούμενη από πολιτικές που στοχεύουν στην αποκατάσταση της ενεργειακής ασφάλειας και στη μείωση των αέριων εκπομπών (Brennan and Owende, 2009).

Τα βιοκαύσιμα που παράγονται σήμερα σε βιομηχανικό επίπεδο είναι η βιοαιθανόλη και το βιοντίζελ, τα οποία μπορούν να αντικαταστήσουν τη βενζίνη και το ντίζελ αντίστοιχα, στα σύγχρονα αυτοκίνητα με λίγες ή και καθόλου μετατροπές στους κινητήρες χρησιμοποιώντας συμβατικές τεχνολογίες και μπορούν να διανεμηθούν μέσα από τα ήδη διαθέσιμα συστήματα (Mata et al., 2010, Brennan and Owende, 2009). Τα βιοκαύσιμα αυτά εξάγονται κυρίως από τρόφιμα και ελαιούχους καρπούς μεταξύ των οποίων ελαιοκράμβη, ζαχαροκάλαμο και αραβόσιτο, καθώς και από έλαια λαχανικών και ζωικό λίπος.

Προβλέπεται πως η παραγωγή και κατανάλωση των βιοκαυσίμων αυτών θα αυξηθεί, ωστόσο η ικανότητά τους να καλύψουν τις ενεργειακές ανάγκες θα παραμείνει περιορισμένη εξαιτίας του ότι: ανταγωνίζονται την παραγωγή τροφίμων όσον αφορά τη χρήση καλλιεργήσιμων εκτάσεων, υπάρχει έλλειψη σωστής αγροτικής πρακτικής στις αναπτυσσόμενες οικονομίες, απαιτούνται μεγάλες ποσότητες νερού και λιπασμάτων.

Σήμερα το 1% των καλλιεργήσιμων εκτάσεων παγκοσμίως (περίπου 14 εκατομμύρια εκτάρια) χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοκαυσίμων, παρέχοντας το 1% των καυσίμων κίνησης (Brennan and Owende, 2009). Το ενδεχόμενο αυτό το ποσοστό να αγγίξει το 100% είναι σχεδόν ανέφικτο καθώς θα υπάρξει σοβαρή επίπτωση στην παραγωγή τροφίμων και στην εκμετάλλευση των καλλιεργήσιμων εκτάσεων.

1.1.2 Βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς

Η έλευση των βιοκαυσίμων δεύτερης γενιάς προορίζεται να παράγει καύσιμα από φυτική ύλη ή αποκλειστικά ενεργειακούς καρπούς και αγροτικά υπολείμματα, κατάλοιπα υλοτομίας ή απορρίμματα επεξεργασίας ξύλου (Moore, 2008). Ωστόσο η

τεχνολογία για τη μετατροπή αυτών των πρώτων υλών βρίσκεται ακόμα υπό ανάπτυξη (Brennan and Owende, 2009).

Το βασικό εναλλακτικό καύσιμο για το ντίζελ στην Ευρωπαϊκή Ένωση είναι το βιοντίζελ, το οποίο αντιπροσωπεύει το 82% των συνολικά παραγόμενων βιοκαυσίμων (Bozbas, 2008) και η παραγωγή του αυξάνεται στην Ευρώπη, τη Βραζιλία και τις Ηνωμένες Πολιτείες.

Οι τρέχουσες πολιτικές σε εθνικό και τοπικό επίπεδο καθώς και το αναμενόμενο κόστος και οι δυσκολίες για εύρεση νέων κοιτασμάτων ορυκτών καυσίμων θα οδηγήσουν σίγουρα σε αύξηση της παραγωγής του βιοντίζελ και των άλλων εναλλακτικών πηγών ενέργειας. Η συνεχής ανάπτυξη παραγωγής του βιοντίζελ οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι χρησιμοποιείται στις μεταφορές, τον τομέα δηλαδή που καταναλώνει το μεγαλύτερο ποσοστό των καυσίμων.

Οι συνθήκες για τεχνικά και οικονομικά βιώσιμη παραγωγή βιοντίζελ και γενικά βιοκαυσίμων, είναι: το χαμηλό κόστος παραγωγής και η χαμηλή τιμήπώλησης σε σχέση με το πετρέλαιο, οι μειωμένες ή και καθόλου απαιτήσεις καλλιεργήσιμης γης για την παραγωγή τους, η προώθηση της βελτίωσης της ποιότητας του αέρα και οι χαμηλές απαιτήσεις σε νερό (Khosla, 2009, Brennan and Owende, 2009, Mata et al., 2010).

Το βασικό στοιχείο που καθορίζει το κόστος παραγωγής των βιοκαυσίμων είναι η τιμή των πρώτων υλών, η οποία αποτελεί το 60% - 75% το συνολικού κόστους του τελικού προϊόντος (Canakci and Sanli, 2008). Προκειμένου να μην υπάρχει ανταγωνισμός με βρώσιμα φυτικά έλαια, το χαμηλού κόστους και επικερδές βιοντίζελ, θα πρέπει να παράγεται από φθηνές πρώτες ύλες όπως τα μη βρώσιμα έλαια, τα χρησιμοποιημένα τηγανόλαδα, τα ζωικά λίπη και τα γράσα. Ωστόσο οι ποσότητες αυτού του είδους των πρώτων υλών δεν είναι αρκετές για να καλύψουν τη ζήτηση σε βιοντίζελ. Επιπρόσθετα, το βιοντίζελ θα πρέπει να έχει λιγότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις και να διασφαλίζει το επίπεδο απόδοσης των υπαρχόντων καυσίμων (Reinhardt et al., 2008).

Έχουν γίνει σημαντικές επενδύσεις για την έρευνα και την ανάπτυξη στρατηγικών για όλα τα στάδια παραγωγής βιοκαυσίμων, από τις πρώτες ύλες μέχρι την τελική διανομή και κατανάλωση. Ανάμεσα στις ποικίλες πιθανότητες που μελετώνται και εφαρμόζονται σε πιλοτική αλλά και βιομηχανική κλίμακα όσον αφορά τις πρώτες ύλες, το μεγαλύτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνουν τα μικροφύκη και τα κυανοβακτήρια (Roesler et al., 1994, Chisti, 2007, Rodolfi et al., 2008, Patil et al., 2008, Mata et al., 2009).

1.2 Μικροφύκη και κυανοβακτήρια – Πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντίζελ

Τα μικροφύκη και τα κυανοβακτήρια είναι μονοκύτταροι οργανισμοί που σχηματίζουν αποικίες ή υπάρχουν ως αυτόνομα κύτταρα. Είναι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί και μπορούν να βρεθούν σε διαφορετικά οικοσυστήματα, σε γλυκό και αλμυρό νερό αλλά και σε υπεράλμυρα οικοσυστήματα. Υπολογίζεται πως υπάρχουν περίπου 120.000 είδη μικροφυκών και κυανοβακτηρίων εκ των οποίων μόνο 30.000 περίπου έχουν μελετηθεί (Richmond, 2004). Οι μικροοργανισμοί αυτοί ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξής τους συσσωρεύουν στα κύτταρά τους λιπίδια που μπορούν να αποτελέσουν τη πρώτη ύλη για παραγωγή βιοκαυσίμων (Kalpesh et al., 2012).

Α. Μικροφύκη

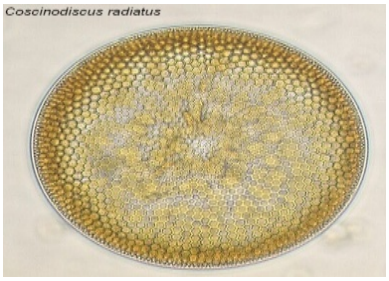
Τα μικροφύκη είναι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί και χωρίζονται σε 10 ομάδες με βάση την κυτταρική τους δομή, που περιλαμβάνουν τα Χλωροφύκη (Chlorophycaea), τα Διάτομα (Bacillariophycaea), τα Ξανθοφύκη (Xanthophyceae), τα Χρυσοφύκη (Chrysophyceae), τα Ροδοφύκη (Rhodophyceae), τα Φαιοφύκη (Phaephyceae), τα Δινοφύκη (Dinophtceae), τα Πρασινοφύκη (Prasinophyceae) και τα Εστιγματοφύκη (Estigmatophyceae) (van de Hoek, 1994).

Από τις κατηγορίες αυτές, σε μεγαλύτερη αφθονία βρίσκονται τα διάτομα, τα Χλωροφύκη και τα Ξανθοφύκη. Τα είδη αυτά συναντώνται σε διάφορα περιβάλλοντα και συσσωρεύουν στα κύτταρά τους συστατικά που μπορούν να αξιοποιηθούν (Πίνακας 1.1). Από μορφολογικής άποψης όλα τα μικροφύκη είναι απλοί οργανισμοί, που έχουν πυρήνα με οριακή μεμβράνη και αφομοιώνουν μέσω του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, ο οποίος διακρίνει όλα τα φυτά που περιέχουν χλωροφύλλη. Οι χλωροφύλλες και άλλες χρωστικές βρίσκονται σε πλαστίδια, χλωροπλάστες ή χρωμοφόρα. Η εξωτερική μορφολογία τους παρουσιάζει αξιόλογη διαβάθμιση από τις πολύ απλές μορφές (π.χ.*Chlorella*) και τις αποικιακές (*Volvox*) και νηματοειδείς (*Spirogyra*). Η εσωτερική μορφολογία των κυττάρων στα μικροφύκη είναι συνήθως πιο πολύπλοκη από εκείνη πολλών άλλων τύπων κυττάρων στα ανώτερα φυτά. Έτσι, ένα και μόνο κύτταρο *Chlamydomonas* έχει όλους τους μηχανισμούς διατροφής ενός κανονικού φυτού. Σε πολλές αποικιακές μορφές, όλα τα κύτταρα είναι εξίσου ικανά προς διατροφή, κίνηση και αναπαραγωγή, ενώ σε άλλες εμφανίζεται μια εξειδίκευση, που έχει σχέση με την αναπαραγωγική λειτουργία ορισμένων κυττάρων.

Πίνακας 1.1. Τρεις βασικές ομάδες μικροφυκών σε σχέση με την αφθονία τους και την ευκολία εύρεσής τους (Alcaine, 2010)

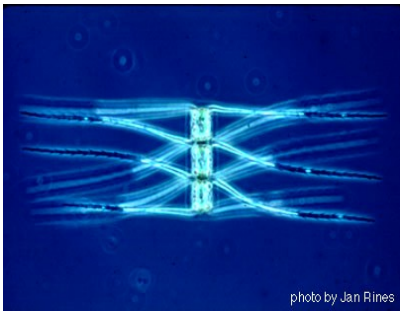
Μικροοργανισμοί	**Γνωστά είδη**	**Αποθηκευμένα συστατικά**	**Περιβάλλοντα εύρεσης**
Διάτομα	100.000	Υδρογονάνθρακες και TAGs	Ωκεανοί, καθαρά και μολυσμένα ύδατα
Χλωροφύκη	8.000	Άμυλο και TAGs	Καθαρά ύδατα
Ξανθοφύκη	2.000	Άμυλο και TAGs	Διάφορα περιβάλλοντα

- Διάτομα: Περίπου 100.000 είδη είναι γνωστά. Η ομάδα αυτή κυριαρχεί στο φυτοπλαγκτόν των ωκεανών αλλά εντοπίζεται επίσης και σε γλυκό και υφάλμυρο νερό. Είναι πολύ μικρά και αποτελούνται από μαλακά οργανικά υλικά τα οποία περιβάλλονται από ένα σκληρό τοίχωμα, η δομή του οποίου διαχωρίζει το ένα είδος από το άλλο. Τα εσωτερικά τμήματα των κυττάρων τους είναι παρόμοια με αυτά όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων εκτός από τους χλωροπλάστες που δίνουν το χαρακτηριστικό χρώμα σε κάθε είδος και τη φωτοσυνθετική τους ικανότητα.

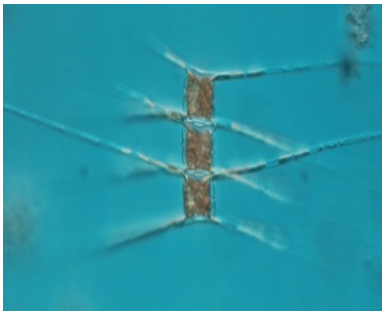


Coscinodiscus granii

Thalassiosira baltica



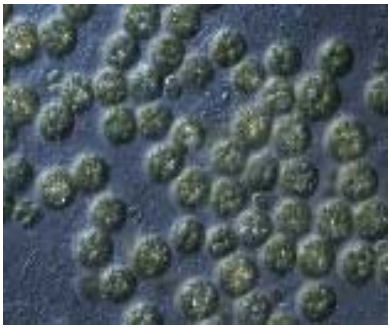
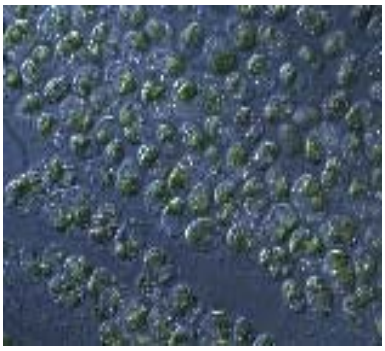
Chaetocerus impressus



Chaetoceros danicus

Εικόνα 1.3. Εικόνες διατόμων από μικροσκόπιο (Πηγή: διαδίκτυο)

- Χλωροφύκη: Τα μικροφύκη που ανήκουν στην κατηγορία αυτή εντοπίζονται σε αφθονία στο γλυκό νερό, αλλά ορισμένα είδη εντοπίζονται και σε χερσαίες εκτάσεις. Περίπου 8.000 είδη υπολογίζεται ότι υπάρχουν και από αυτά 1.000 είναι θαλάσσια και τα υπόλοιπα του γλυκού νερού. Διαθέτουν πυρήνα με μεμβράνη και ποικίλα εσωτερικά οργανίδια (πλαστίδια, χλωροπλάστες). Το βασικό συστατικό που συσσωρεύουν στα κύτταρά τους είναι το άμυλο αλλά παράγουν και λιπίδια.

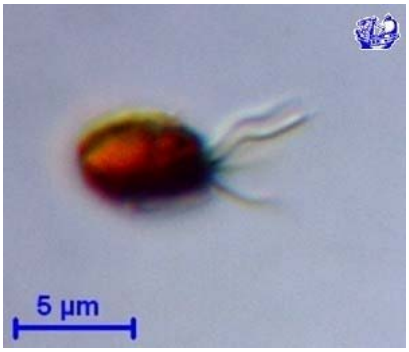
 Chlorosarkinopsis gelatinosa	 *Chlamydomonas heldeyi*
 Chlorococcum sp.	 *Chlorococcum sp.*

Εικόνα 1.4. Εικόνες χλωροφυκών στο μικροσκόπιο (x100) (Πηγή: Προσωπική συλλογή)

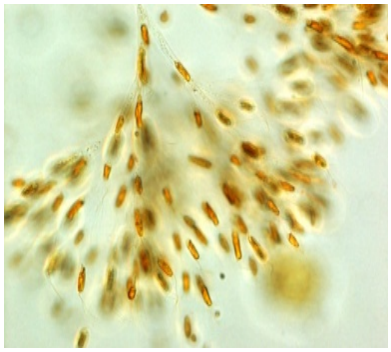
- Χρυσοφύκη: Η ομάδα αυτή μικροφυκών μοιάζει με τα διάτομα, με κάποιες διαφορές στα χρωμοφόρα σωματίδια και τη βιοχημική σύσταση. Περίπου 1.000 είδη είναι γνωστά και εντοπίζονται στα γλυκά νερά και στους ωκεανούς. Στα περισσότερα είδη τα κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από κυτταρίνη και πυρίτιο και κάποια έχουν μαστίγια.

Μερικά από τα μικροφύκη που έχουν μελετηθεί εκτενέστερα, εξαιτίας των χρήσιμων ουσιών που παράγουν, είναι τα γένη *Chlorella sp.*, *Dunaliella sp.*, *Haematococcus sp.* και *Nannochloropsis* sp.

Η *Chlorella* είναι ένα μονοκύτταρο είδος πράσινου φύκους το οποίο ανήκει στην οικογένεια των χλωροφυκών. Τα κύτταρά της είναι σφαιρικά, περίπου 2-10 μm σε διάμετρο και δεν διαθέτουν μαστίγια. Η *Chlorella* περιέχει την πράσινη φωτοσυνθετική χρωστική χλωροφύλλη-α και χλωροφύλλη-β και μέσω της φωτοσύνθεσης πολλαπλασιάζεται γρήγορα με μικρές απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά (Iyovo et al, 2010). Η *Chlorella* είναι γνωστή ως ένα από τα πιο γρήγορα αναπτυσσόμενα φύκη που περιέχει περίπου 14-22% σε τριγλυκερίδια που είναι χρήσιμα για την παραγωγή βιοντίζελ.

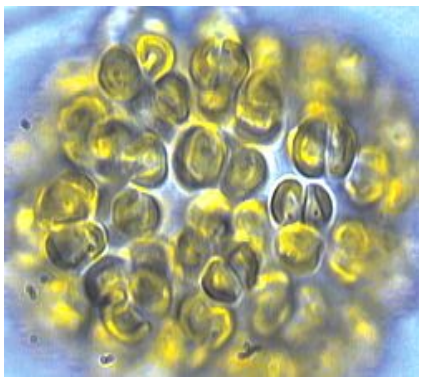


Isochrysis galbana



Dinobryon balticum

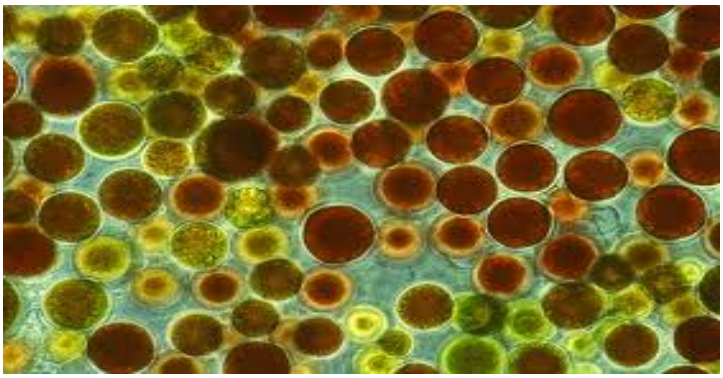
Uroglena americana



Chrysospaeara paludose

Εικόνα 1.5. Εικόνες χρυσοφυκών από μικροσκόπιο (Πηγή: διαδίκτυο)

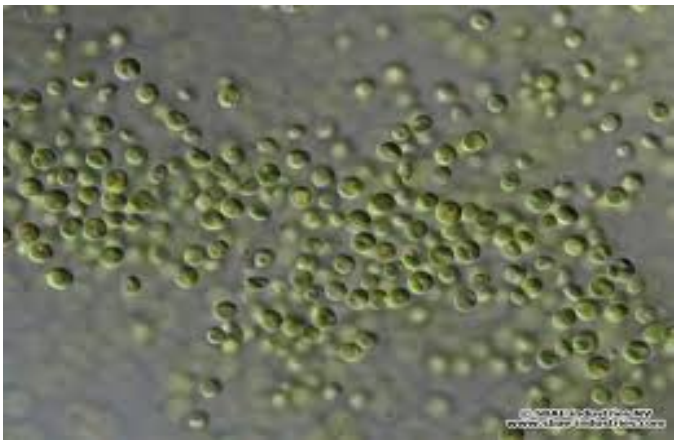
Το μικροφύκος *Haematococcus pluvialis* είναι είδος χλωροφύκους των γλυκών νερών και ανήκει στην οικογένεια *Haemacoccaceae*. Αυτό το είδος είναι πολύ γνωστό για το υψηλό του περιεχόμενο στο αντιοξειδωτικό ασταξανθίνη, η οποία είναι υπεύθυνη για το βαθύ κόκκινο χρώμα των κυττάρων του μικροφύκους και πιστεύεται ότι προστατεύει το κύτταρο από την υπεριώδη ακτινοβολία (Huntley et al., 2007).



Εικόνα 1.6. Το χλωροφύκος *Haematococcus pluvialis* (Πηγή: διαδίκτυο)

Το *Haematococcus pluvialis* παράγει λιπίδια κάτω από τις ίδιες συνθήκες που παράγει ασταξανθίνη. Σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης, η παραγωγή βιομάζας είναι υψηλή σε αντίθεση με την παραγωγή ασταξανθίνης και λιπιδίων που είναι περιορισμένη. Σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών η παραγωγή βιομάζας μειώνεται αρκετά αλλά αυξάνεται η παραγωγή των επιθυμητών ουσιών. Συγκεκριμένα, μετά από 2 μέρες ανάπτυξης σε συνθήκες στέρησης θρεπτικών, η παραγωγή ασταξανθίνης αυξάνεται και το περιεχόμενο σε λιπίδια φθάνει το 25% του ξηρού βάρους (Yanquin et al. 2008).

Το γένος *Nannochloropsis* αποτελείται από 6 είδη. Σχεδόν όλα τα είδη ζουν στο θαλάσσιο περιβάλλον. Σε όλα τα είδη τα κύτταρα είναι μικρά, σφαιρικά, με διάμετρο περίπου 2 μικρόμετρα χωρίς να παρουσιάζουν κάποιο ιδιαίτερο μορφολογικό γνώρισμα, με αποτέλεσμα να μην ξεχωρίζουν σε φωτονικό ή ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Τα μικροφύκη του γένους *Nannochloropsis* είναι ικανά να συνθέτουν ασταξανθίνη, ζεοξανθίνη και κανθαξανθίνη. Είναι ικανά να συσσωρεύουν υψηλές συγκεντρώσεις πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Sforza et al., 2010). Η συσσώρευση λιπιδίων στο συγκεκριμένο μικροφύκος φαίνετια να σχετίζεται με την φάση ανάπτυξης. Το *Nannochloropsis oculata* εμφανίζει μεγάλη συσσώρευση λιπιδίων κατά την φάση στασιμότητας σε συνδυασμό με έλλειψη αζώτου (Kalpesh et al., 2012).



Εικόνα 1.7. Το μικροφύκος *Nannochloropsis oculata* (Πηγή: διαδίκτυο).

Το χλωροφύκος *Dunaliella* είναι ένα κινητό, μονοκύτταρο ραβδοειδές (9-11μm) πράσινο φύκος που είναι κοινό στα αλμυρά νερά. Οι αντιπρόσωποι του γένους δε σχηματίζουν αλυσίδες, η ανάπτυξή τους είναι γρήγορη και είναι ευαίσθητα σε τοξικές ουσίες. Η *Dunaliella tertiolecta* έχει την ικανότητα να χρησιμοποιεί ανόργανα συστατικά που βρίσκονται σε νερά αποβλήτων και ηλιακή ενέργεια για να παράγει βιομάζα με πηγή άνθρακα το διοξείδιο του άνθρακα (Taiharo, 1998).

Β. Κυανοβακτήρια

Τα κυανοβακτήρια είναι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί και χωρίζονται σε δύο ομάδες, α) οι μονοκύτταρες και αποικιακές μορφές (γένη: *Cyanothece, Synechococcus, Merismopedia, Chrooococcus, Gloeocapsa, Aphanothece, Gloeothece, Chroococcidiopsis, Staniera, Cyanocystis, Pseudocapsa*) β) οι νηματοειδείς μορφές γένη: (των *Oscillatoriales) Oscillatoria, Spirulina, Lyngbya, Leptolyngbya, Microcoleus, Hydrocoleus, Pseudanabaena,* (των *Nostocales*) *Anabaena, Nodularia, Nostoc, Cylindrospermum, Calothrix, Rivularia, Tolypothrix, Scytonema* (των *Stigonematales*) *Stigonema*, *Mastigocladus.* Παρότι έχουν πραγματοποιηθεί και συνεχίζουν να πραγματοποιούνται πολλές μελέτες βιοποικιλότητας, ο συνολικός αριθμός των ειδών στις διάφορες ταξινομικές ομάδες παραμένει άγνωστος. Οι εκτιμήσεις του αριθμού των ειδών των κυανοβακτηρίων που έχουν μελετηθεί κυμαίνεται μεταξύ 2.000 – 8.000. Πλήρως χαρακτηρισμένα κυανοβακτήρια μέχρι σήμερα είναι 2.698 είδη (Kuhne et al., 2013).

Η κοινή τους ονομασία ήταν “blue-green algae” (μπλε-πράσινα φύκη) μέχρι τη δεκαετία του 1980. Αν και τα κυανοβακτήρια είναι φωτοσυνθετικά βακτήρια με μια

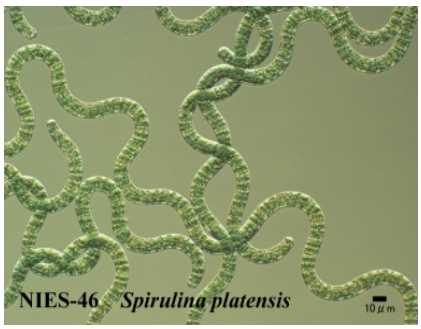
εμφάνιση παρόμοια των φυκών ωστόσο δεν έχουν ταξινομική σχέση με τα φύκη. Τα κυανοβακτήρια πήραν το όνομά τους από τη χρωστική φυκοκυανίνη, η οποία χρησιμοποιείται για να εγκλωβίσει την ηλιακή ακτινοβολία για τη φωτοσύνθεση. Τα κυανοβακτήρια επίσης περιέχουν χλωροφύλλη, την ίδια φωτοσυνθετική χρωστική που περιέχουν οι χλωροπλάστες των φυτών. Κάποιες μορφές κυανοβακτηρίων είναι κόκκινες ή ροζ γιατί έχουν τη χρωστική φυκοερυθρίνη. Αυτά τα βακτήρια θεωρούνται κατάλληλα για την παραγωγή βιοντίζελ (Taiharo, 1998).

Είναι κοσμοπολίτικοι μικροοργανισμοί με τη διευκρίνιση ότι αναπτύσσονται μεν σε όλη σχεδόν τη γη αλλά κατά κανόνα σε παρόμοιες οικολογικές συνθήκες. Το μόνο ίσως που περιορίζει την ανάπτυξή τους είναι το χαμηλό pH. Αναπτύσσονται σε στάσιμα και τρεχούμενα γλυκά και αλμυρά νερά, στο έδαφος, στους βράχους. Είναι οργανισμοί πρωτοπόροι σε νέα υποστρώματα και σε ενδιαιτήματα με ακραίες συνθήκες αποτελούν κατά κανόνα μαζί με τους Αρχαίους Προκαρυωτικούς Οργανισμούς και αρκετά από τα τυπικά βακτήρια τη μοναδική μορφή ζωής. Επίσης αποτελούν σημαντική ομάδα στο φυτοπλακτόν.

Η βασική διαφορά μεταξύ μικροφυκών και κυανοβακτηρίων, είναι το ότι τα κυανοβακτήρια δεν διαθέτουν οργανίδια που συνδέονται με μεμβράνες (πλαστίδια, μιτοχόνδρια, σύμπλεγμα Golgi). Το τοίχωμά τους είναι παρόμοιο με αυτό των Gram$^-$ βακτηρίων. Στο κυτταρόπλασμά τους υπάρχουν χαρακτηριστικές φωτοσυνθετικές μεμβράνες τα θυλακοειδή των κυανοβακτηρίων, τα οποία φέρουν στην επιφάνειά τους, τα φυκοβολισώματα. Τα οργανίδια περιβάλλονται από λιπιδικές μεμβράνες η δομή των οποίων απαιτεί ισχυρά πολικά μόρια.

Από όλα τα κυανοβακτήρια το *Synechocystis sp.* PCC 6803 είναι το καλύτερα χαρακτηρισμένο είδος. Το *Synechocystis* είναι ένα φωτοαυτότροφο μονοκύτταρο κυανοβακτήριο του πικοπλακτόν του γλυκού νερού και του θαλασσινού, και είναι χρήσιμο για την παραγωγή βιοντίζελ λόγω της υψηλής λιπιδικής του σύστασης (Marcus, 2010).

Το *Synechocystis* είναι ένα είδος το οποίο έχει υποστεί φυσικές μεταλλαγές, που έχει μελετηθεί γενετικά και έχει αλληλουχηθεί επίσης. Είναι ένα κυανοβακτήριο που μεγαλώνει γρήγορα, χωρίς να έχει συγκεκριμένες θρεπτικές απαιτήσεις. Έτσι μπορεί να μεγαλώνει εξολοκλήρου φωτοαυτοτροφικά, μιξοτροφικά και χημειοετεροτροφικά (με μικρής χρονικής περιόδου έκθεσης σε (μπλε) φως) (Angermayer et al, 2009).



Spirulina platensis

Synechococcus sp.

Anabaena sp.

Phormidium sp.

Εικόνα 1.9. Εικόνες κυανοβακτηρίων σε μικροσκόπιο (Πηγές: διαδίκτυο, προσωπική συλλογή)

Παρόλο που τα μικροφύκη ανήκουν στους ευκαρυωτικούς και τα κυανοβακτήρια στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, εμφανίζουν πολλές ομοιότητες όσον αφορά στο μεταβολισμό τους, στις συνθήκες ανάπτυξής τους και στα λιπίδια τα οποία παράγουν.

Ο μεταβολισμός των οργανισμών και συγκεκριμένα των μικροοργανισμών, επηρεάζεται από την αναλογία επιφάνειας – όγκου των κυττάρων τους. Οι απλοί μονοκύτταροι μικροοργανισμοί μπορούν να θεωρηθούν κατά προσέγγιση σφαίρες, με αποτέλεσμα ο μεταβολισμός τους να εξαρτάται από τη διάμετρο των κυττάρων τους. Οι ρυθμοί ανάπτυξης των μικροφυκών και των κυανοβακτηρίων είναι ιδιαίτερα υψηλοί, καθόσον κάποια μικροφύκη διπλασιάζονται κάθε 3-4 ώρες ενώ η πλειοψηφία τους κάθε 1-2 μέρες κάτω από κατάλληλες συνθήκες. Το γεγονός αυτό τα καθιστά καλούς υποψήφιους για παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων. Κατά κανόνα, η βιομάζα από

καλλιέργειες μικροφυκών και κυανοβακτηρίων μπορεί να συλλέγεται κάθε μέρα ή κάθε λίγες μέρες (Benemann and Ostwald, 1996, Huntley and Redalje, 2007).

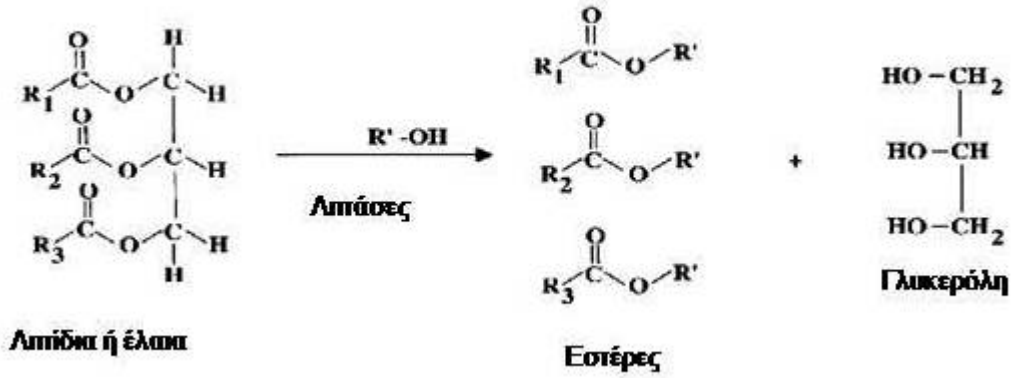
Λαμβάνοντας υπόψη την κυτταρική τους σύσταση, είναι αναμενόμενο τα λιπίδια των μικροφυκών και των κυανοβακτηρίων να διαθέτουν ιδιότητες που να τα καθιστούν κατάλληλα για χρήση ως καύσιμα. Τα λιπίδια των μικροφυκών και των κυανοβακτηρίων διαφέρουν από εκείνα των ανώτερων φυτών στις υψηλές συγκεντρώσεις φωσφολιπιδίων και γλυκολιπιδίων. Αυτές οι κατηγορίες λιπιδίων περιέχουν άζωτο, φώσφορο και θείο, συστατικά που μπορεί να καθιστούν το τελικό προϊόν προβληματικό για χρήση στους υπάρχοντες κινητήρες.

Η μετατροπή των λιπιδίων που παράγονται από τα μικροφύκη και τα κυανοβακτήρια σε βιοντίζελ μπορεί να πραγματοποιηθεί με μια απλή αντίδραση μετεστεροποίησης. Τα λιπίδια αυτά αποτελούνται κατά 90% - 98% (κατά βάρος) από τριγλυκερίδια και μικρά ποσοστά μονο- και διγλυκεριδίων, ελεύθερων λιπαρών οξέων (1-5%) και κατάλοιπα φωσφολιπιδίων, φωσφατιδών, καροτενίων και ίχνη νερού (Bozbas, 2008).

Η μετεστεροποίηση είναι μια αντίδραση, που περιλαμβάνει τρία ξεχωριστά στάδια, όπου τριγλυκερίδια μετατρέπονται σε διγλυκερίδια, στη συνέχεια τα διγλυκερίδια μετατρέπονται σε μονογλυκερίδια και τέλος μετατρέπονται σε εστέρες (βιοντίζελ) και γλυκερόλη (παραπροϊόν).

Η αντίδραση μετεστεροποίησης πραγματοποιείται όταν έλαια ή λιπίδια και μια μικρής αλυσίδας αλκοόλη, συνήθως μεθανόλη, χρησιμοποιούνται ως αντιδρώντα παρουσία καταλύτη (συνήθως NaOH). Παρότι η θεωρητική αναλογία αλκοόλης:λιπιδίων είναι 3:1, συνήθως χρησιμοποιείται η αναλογία 6:1 για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Σε πολλές περιπτώσεις χρησιμοποιούνται και αντιοξειδωτικές ουσίες όπως το τριφθοριούχο βόριο (BF_3), ώστε να αποφεύγεται η οξείδωση των λιπιδίων κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.

Σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες χρησιμοποιείται συνήθως η μεθανόλη ως αλκοόλη εκχύλισης, καθώς είναι αρκετά οικονομική και εύκολα διαθέσιμη. Επίσης, δεν χρησιμοποιούνται πάντα αντιοξειδωτικές ουσίες για οικονομικούς λόγους.



Εικόνα 1.10. Αντίδραση μετεστεροποίησης λιπαρών οξέων. Τα R1, R2, R3 συμβολίζουν μακράς αλυσίδας υδρογονάνθρακες.

Τα χαρακτηριστικά του καυσίμου επηρεάζονται σημαντικά από τη σύσταση των λιπαρών οξέων, συνεπώς θα ποικίλουν ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο στέλεχος και τις συνθήκες ανάπτυξής του. Επίσης αξιοσημείωτη είναι η ποικιλία των παραγόμενων λιπαρών οξέων από τα μικροφύκη και τα κυανοβακτήρια σε σχέση με τα λιπαρά οξέα των ανώτερων φυτών, γεγονός που καθιστά δυνατή την επιλεκτική καλλιέργεια στελεχών ανάλογα με το είδος του επιθυμητού παραγόμενου καυσίμου. Για παράδειγμα, στελέχη που συσσωρεύουν μικρής αλυσίδας (<C16) λιπαρά οξέα μπορεί να είναι πιο κατάλληλα για παραγωγή καυσίμων ανάλογων των καυσίμων τζετ (jet fuels), ενώ στελέχη που συσσωρεύουν λιπαρά οξέα μεγαλύτερης αλυσίδας (>C20) θα χρησιμοποιούνται στον τομέα των λιπαντικών (Williams et al., 2010).

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης βιοκαυσίμων παραγόμενων από μικροφύκη και κυανοβακτήρια είναι: (1) οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν τη δυνατότητα ανάπτυξης όλο το χρόνο, με αποτέλεσμα η παραγωγικότητά τους σε λιπίδια να ξεπερνά την παραγωγή των καλλιεργήσιμων καρπών. Για παράδειγμα μια ανοιχτή μονάδα παραγωγής μικροφυκών δίνει παραγωγή 12.000 l / ha σε σύγκριση με τα 1.190 l / ha της ελαιοκράμβης (Schenk et al., 2008), (2) αναπτύσσονται σε υδατικά μέσα, αλλά έχουν λιγότερες ανάγκες σε νερό από τα καλλιεργήσιμα φυτά (Dismukes et al., 2008) (3) μπορούν να καλλιεργηθούν σε υφάλμυρο νερό σε μη καλλιεργήσιμα εδάφη, ελαχιστοποιώντας τον περιβαλλοντικό αντίκτυπο (Searchinger et al., 2008) και τον ανταγωνισμό με την παραγωγή τροφίμων, (4) έχουν σχετικά γρήγορους ρυθμούς

ανάπτυξης και σε πολλά είδη το 20% -50% της ξηρής βιομάζας τους αντιστοιχεί σε λιπίδια (Chisti, 2007), (5) με σκοπό τη βελτίωση της ποιότητας του αέρα, η παραγωγή βιομάζας μικροφυκών μπορεί να επιδράσει ως βιορύθμιση του πλεονάζοντος CO_2 (1 kg βιομάζας χρησιμοποιεί 1,83 kg CO_2) (6) τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αυτών (ειδικά τα νιτρικά και ο φώσφορος) μπορούν να ληφθούν από τη χρήση λυμάτων, με διπλό όφελος καθώς, εκτός του ότι ελαχιστοποιείται το κόστος ανάπτυξης, πραγματοποιείται επεξεργασία με φυσικό τρόπο των υγρών αστικών λυμάτων (Cantrel et al., 2007), (7) η καλλιέργειά τους δεν απαιτεί τη χρήση λιπασμάτων και παρασιτοκτόνων και (8) παράγουν χρήσιμα παραπροϊόντα όπως πρωτεΐνες και υπολειπόμενη βιομάζα μετά την εξαγωγή των λιπιδίων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ζωοτροφή ή εδαφοβελτιωτικό (Spolaore, 2006).

Τα τελευταία 50 χρόνια, εκτεταμένες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί σε μικροφύκη και στον τρόπο με τον οποίο μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες διεργασίες ή να παράγουν χρήσιμα και οικονομικά σημαντικά προϊόντα. Η πρώτη μεγάλης κλίμακας παραγωγή μικροφυκών, ξεκίνησε στην Ιαπωνία στις αρχές του 1960 από την εταιρεία Nihon Chlorella με καλλιέργεια του στελέχους *Chlorella* (Sporaole et al., 2006). Το ενδιαφέρον για χρήση μικροφυκών ως ανανεώσιμη πηγή ενέργειας αυξήθηκε τη δεκαετία του 1970 με την πρώτη ενεργειακή κρίση (Sporaole et al., 2006). Το Εθνικό Εργαστήριο Ανανεώσιμης Ενέργειας (NREL) των Ηνωμένων Πολιτειών μέσω του προγράμματος Aquatic Species Program (ASP), ξεκίνησε ένα πρόγραμμα αφιερωμένο στα εναλλακτικά ανανεώσιμα καύσιμα, συμπεριλαμβανομένου του βιοντίζελ από μικροφύκη, το οποίο διήρκησε από το 1978 έως το 1996 (Sheehan et al., 1998). Τα αποτελέσματα αυτού του προγράμματος σε συνδυασμό με ένα ανοιχτό σύστημα καλλιέργειας μικροφυκών 1.000 m^2 στο Μεξικό, οδήγησαν στο συμπέρασμα πως η χρήση μικροφυκών για παραγωγή οικονομικού βιοντίζελ είναι εφικτή, ωστόσο απαιτείται επιπλέον έρευνα και ανάπτυξη για να επιτευχθούν υψηλές παραγωγικότητες.

Η πρόσφατη αύξηση της τιμής του αργού πετρελαίου και οι αναμενόμενες αυξήσεις στο μέλλον, σε συνδυασμό με την ανάγκη μείωσης των αέριων εκπομπών, έχουν δημιουργήσει νέο ενδιαφέρον γύρω από την παραγωγή βιοντίζελ από μικροφύκη και κυανοβακτήρια. Πολλές εταιρείες έχουν ήδη μπει στην αγορά αυτή, πουλώντας είτε ολοκληρωμένες κατασκευές είτε φωτοβιοαντιδραστήρες για την ανάπτυξη των μικροφυκών (Kanel and Guelcher, 1999, Barclay, 2005, Behrens et al., 2007).

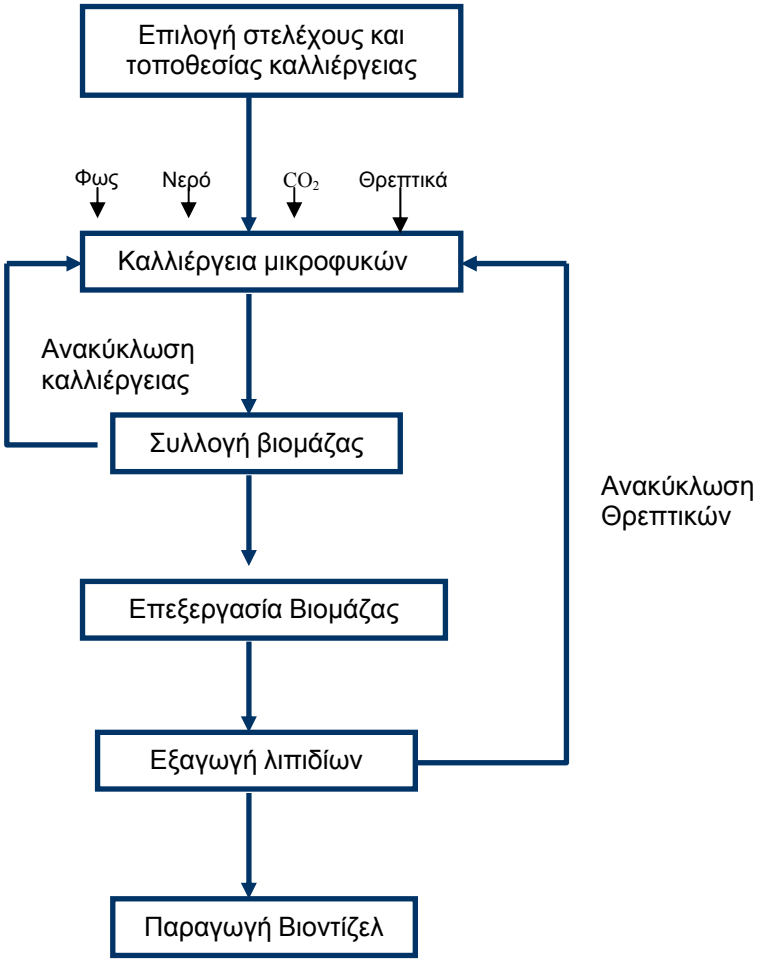
Στις μέρες μας, τα μικροφύκη και κυανοβακτήρια θεωρούνται εναλλακτικές πρώτες ύλες για παραγωγή βιοκαυσίμων. Πραγματοποιούνται έρευνες με κρατικές και ιδιωτικές επιδοτήσεις, με σκοπό την ανάπτυξη των πιο αποτελεσματικών και οικονομικών τεχνολογιών για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων λιπιδίων. Θεωρούνται δεύτερης γενιάς πρώτες ύλες, μαζί με άλλες πηγές βιομάζας, όπως τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά, τα αγροτικά κατάλοιπα και τα συνεχώς αναπτυσσόμενα ενεργειακά φυτά, με υψηλά αναμενόμενα ποσοστά παραγωγής βιοκαυσίμων που δε χρησιμοποιούνται ως πηγή τροφίμων (Barclay, 2005).

Στη συνέχεια παρουσιάζονται αναλυτικά όλα τα βήματα που ακολουθούνται για την παραγωγή βιοντίζελ, από την απομόνωση και την επιλογή του κατάλληλου στελέχους έως την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου για την εξαγωγή των λιπιδίων από τα κύτταρα των μικροοργανισμών (Εικόνα 1.11).

1.2.1 Επιλογή στελέχους

Η επιλογή του κατάλληλου στελέχους μικροφύκους ή κυανοβακτηρίου είναι ένας σημαντικός παράγοντας στη γενική επιτυχία παραγωγής βιοκαυσίμου (Sheehan et al., 1998, Rosenberg et al., 2008, Bruton et al., 2009). Το κατάλληλο στέλεχος για παραγωγή βιοκαυσίμων θα πρέπει: (1) να έχει υψηλή λιπιδική παραγωγικότητα, (2) να μπορεί να επιβιώνει και να αναπτύσσεται σε συνθήκες καταπόνησης που υπάρχουν συνήθως στους βιοαντιδραστήρες, (3) να μπορεί να υπερισχύει σε ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς στα ανοιχτά συστήματα καλλιέργειας, (4) να έχει χαμηλές απαιτήσεις σε θρεπτικά, (5) να είναι ανθεκτικά σε διάφορες θερμοκρασίες, (6) να παράγει χρήσιμα παραπροϊόντα, (7) να έχει γρήγορο αναπαραγωγικό κύκλο, (8) να έχει μεγάλη φωτοσυνθετική ικανότητα και (9) να έχει ικανότητα κροκίδωσης (Rodolfi et al., 2008, Brennan and Owende, 2009). Μέχρι στιγμής δεν έχουν βρεθεί μικροφύκη ή κυανοβακτήρια που να πληρούν ταυτόχρονα όλες αυτές τις απαιτήσεις.

Βασικό ρόλο στην εμπορική παραγωγή μικροφυκών και κυανοβακτηρίων παίζει η χρήση ενδογενών στελεχών που να είναι προσαρμοσμένα στις συνθήκες της περιοχής παραγωγής. Η απομόνωση ενδογενών στελεχών για την παραγωγή βιοκαυσίμων θα πρέπει να θεωρηθεί ως βασικό κομμάτι έρευνας, αλλά θα πρέπει να σημειωθεί πως τα επικρατέστερα στελέχη δεν είναι απαραίτητα αυτά που δίνουν τη μέγιστη παραγωγή λιπιδίων (Sheehan et al., 1998).



Εικόνα 1.11. Τα βήματα που ακολουθούνται για την παραγωγή βιοντίζελ από μικροφύκη και κυανοβακτήρια.

Η γενετική και μεταβολική μηχανική μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στην επίδοση των μικροφυκών και των κυανοβακτηρίων όσον αφορά την παραγωγή βιοκαυσίμων. Ωστόσο, μετά από έρευνες και τη συλλογή 300 στελεχών από το πρόγραμμα "Aquatic Species Program", τα οποία παράγουν υψηλά ποσοστά λιπιδίων χωρίς γενετική τροποποίηση, οι ερευνητές υποστηρίζουν πως είναι χρησιμότερο να επικεντρωθούν οι έρευνες στη βελτίωση των συνθηκών ανάπτυξης των φυσικών στελεχών παρά στην ανάπτυξη τεχνικών γενετικής τροποποίησης (Sheehan et al., 1998).

1.2.1.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση μικροφυκών και κυανοβακτηρίων

Η απομόνωση των μικροφυκών και κυανοβακτηρίων είναι μία απαραίτητη διαδικασία ώστε να υπάρξουν καλλιέργειες από ένα μόνο είδος, και αποτελεί το πρώτο βήμα για την επιλογή του κατάλληλου για παραγωγή βιοντίζελ στελέχους. Οι παραδοσιακές τεχνικές απομόνωσης περιλαμβάνουν τη χρήση μικροπιπέτας για την απομόνωση κάτω από μικροσκόπιο και τις διαδοχικές αραιώσεις των δειγμάτων ακολουθούμενες από καλλιέργεια σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα (Duong et al., 2012).

Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται από την Περιβαλλοντική Μικροβιολογία μια αυτοματοποιημένη μέθοδος διαχωρισμού κυττάρων, η κυτταρομετρία ροής η οποία χρησιμοποιείται και για τον προσδιορισμό του λιπιδικού περιεχομένου των κυττάρων. Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στη διαλογή κυττάρων μικροφυκών από δείγματα νερού που περιείχαν πολλά είδη μικροοργανισμών. Η τεχνική βασίζεται κυρίως στις ιδιότητες του αυτοφθορισμού της χλωροφύλλης και του πράσινου αυτοφθορισμού για διαχωρισμό ανάμεσα σε διάτομα, δινομαστιγωτά και προκαρυωτικό φυτοπλαγκτόν (Reckermann, 2000).

Παράλληλα χρησιμοποιούνται μοριακές τεχνικές, οι οποίες περιλαμβάνουν απομόνωση του γενετικού υλικού (DNA) των μικροφυκών και των κυανοβακτηρίων, αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση του DNA και αλληλούχιση των προϊόντων των αντιδράσεων αυτών με σκοπό την ταυτοποίηση του κάθε στελέχους. Η ταυτοποίηση των στελεχών επιτυγχάνεται μέσω σύγκρισης των αλληλουχιών των εξεταζόμενων στελεχών με αλληλουχίες κατατεθημένων στελεχών στις διάφορες Τράπεζες Στελεχών όπως είναι η Gene Bank (Godhe et al., 2002; Berard et al., 2004).

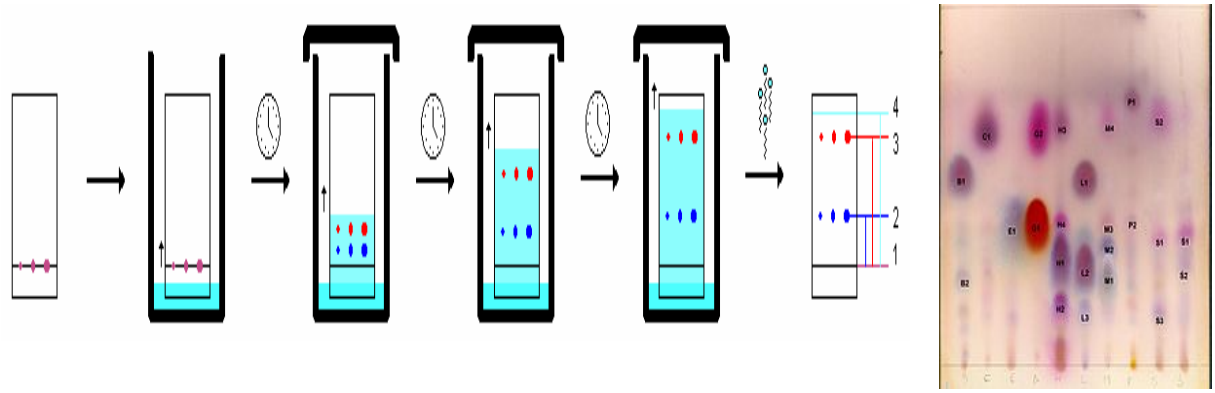
Η βιοπληροφορική μπορεί επίσης να φανεί χρήσιμη στην ανακάλυψη νέων στελεχών κατάλληλων για παραγωγή βιοντίζελ και η φυλογενετική τους κατάταξη μπορεί να υποδείξει πολλά ακόμη είδη με την ίδια ικανότητα. Το 2010, η μελέτη του γονιδιώματος εφτά μικροφυκών ολοκληρώθηκε και συνεχίζονται οι προσπάθειες για την ανάλυση αλληλουχιών του γονιδιώματος κι άλλων μικροφυκών και κυανοβακτηρίων, οι οποίες θα ενισχύσουν τις μελέτες για γονιδιακή αριστοποίηση της πρώτης ύλης για παραγωγή βιοκαυσίμων (μεταβολική μηχανική). Η συσσώρευση πρόδρομων λιπιδίων και η ανακάλυψη γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση και τον μεταβολισμό τους είναι ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο μελέτης (Duong et al., 2012).

Αποκτώντας καλύτερη αντίληψη για τους μηχανισμούς στήριξης των μεταβολικών διεργασιών, μπορεί να βρεθούν μοριακοί δείκτες για την επιλογή ή τη γενετική διαχείριση των μικροφυκών και κυανοβακτηρίων (Radakovits et al., 2012).

1.2.1.2 Μέθοδοι προσδιορισμού των παραγόμενων λιπιδίων από στελέχη μικροφυκών και κυανοβακτηρίων

Η παραγωγή λιπιδίων από τα διάφορα υποψήφια στελέχη μικροφυκών και κυανοβακτηρίων είναι απαραίτητο να καθορίζεται τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά για να βρεθεί τελικά το κατάλληλο για την παραγωγή βιοντίζελ. Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των λιπιδίων απαιτούν τεχνικές όπως Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (Thin Layer Chromatography-TLC), Αέρια Χρωματογραφία με Χρωματογραφία Μάζας (Gas Chromatography-Mass Spectroscopy- GC/MS) ή/και Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography- HPLC) (Duong et al., 2012).

Η Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μη πτητικών μιγμάτων. Τα διαφορετικά συστατικά που υπάρχουν στο μίγμα «ταξιδεύουν» σε διαφορετικούς χρόνους στην επιφάνεια του απορροφητικού υλικού λόγω διαφορετικής πολικότητας και διαφορετικής διαλυτότητας στο χρησιμοποιούμενο διαλύτη (Duong et al., 2012).

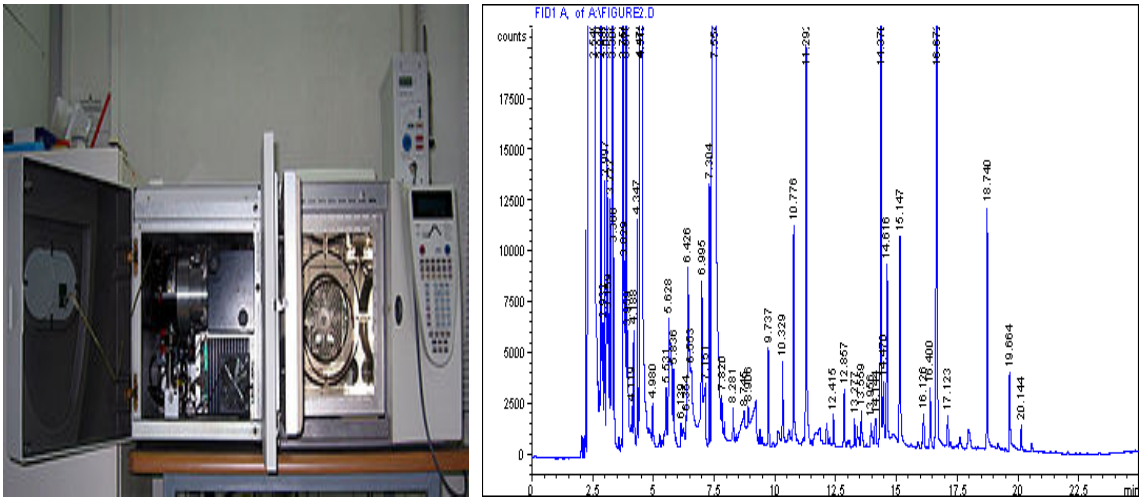


Εικόνα 1.12. Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC). Με την πάροδο του χρόνου τα διαφορετικά συστατικά του εξεταζόμενου μίγματος διαχωρίζονται με βάση την πολικότητά τους και δίνουν την τελική εικόνα όπως φαίνεται στο Χρωματογράφημα. (Πηγή: διαδίκτυο)

Η Αέρια Χρωματογραφία (GC) βασίζεται στους διαφορετικούς χρόνους που εκλούονται τα διαφορετικά συστατικά στη στατική φάση του χρωματογράφου (υγρό ή

πολυμερές ενσωματωμένο σε στερεό στήριγμα). Στη Φασματοσκοπία Μάζας (MS) το εξεταζόμενο δείγμα ιονίζεται, μέσω ενός ιονιστή φλόγας συνήθως, και τα ιόντα που προκύπτουν διαχωρίζονται με βάση την αναλογία μάζας/φορτίου και ανιχνεύονται από ένα μηχανισμό που ανιχνεύει φορτισμένα σωματίδια. Ο συνδυασμός των δύο αυτών μεθόδων χρησιμοποιείται πολύ συχνά για πιο έγκυρα αποτελέσματα (Duong et al., 2012).

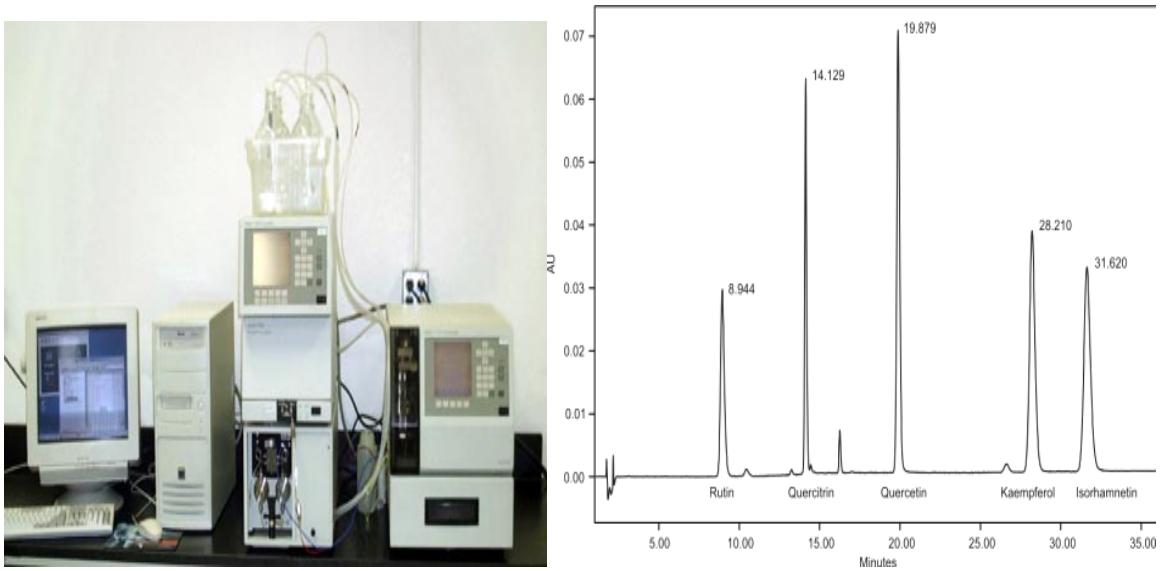
Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης, είναι μια χρωματογραφική τεχνική που χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει τα συστατικά ενός μίγματος, να τα ταυτοποιήσει μέσω σύγκρισης με πρότυπες ουσίες και να τα ποσοτικοποιήσει. Η μέθοδος περιλαμβάνει ένα υγρό δείγμα το οποίο περνά πάνω από ένα στερεό απορροφητικό υλικό που βρίσκεται πακεταρισμένο σε μια στήλη, χρησιμοποιώντας για ροή κάποιο διαλύτη. Κάθε εξεταζόμενο συστατικό αντιδρά διαφορετικά με το απορροφητικό υλικό στη στήλη και εξέρχεται από τη στήλη σε διαφορετικό χρόνο (Gerber et al., 2004).



Εικόνα 1.13. Συνδυασμός Αέριας Χρωματογραφίας με Φασματοσκοπία Μάζας. Στην Εικόνα φαίνονται ένα τυπικό μηχάνημα GC/MS και ένα τυπικό χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση δείγματος με την GC/MS.

Οι αναλυτικές αυτές μέθοδοι αυτές είναι χρονοβόρες και ειδικά για μεγάλο αριθμό δειγμάτων, ενώ είναι απαραίτητη η γρήγορη διαλογή μεταξύ των υποψήφιων μικροοργανισμών με βάση το λιπιδικό τους περιεχόμενο. Η ανάγκη αυτή για γρήγορη και έγκυρη ανάλυση του λιπιδικού προφίλ μικροφυκών και κυανοβακτηρίων, υποψήφιων για παραγωγή βιοντίζελ, οδήγησε στην υιοθέτηση τεχνικών που

συνδυάζουν χρώση των κυττάρων των μικροοργανισμών με εξειδικευμένες χρωστικές ουσίες και κυτταρομετρική ανάλυση.

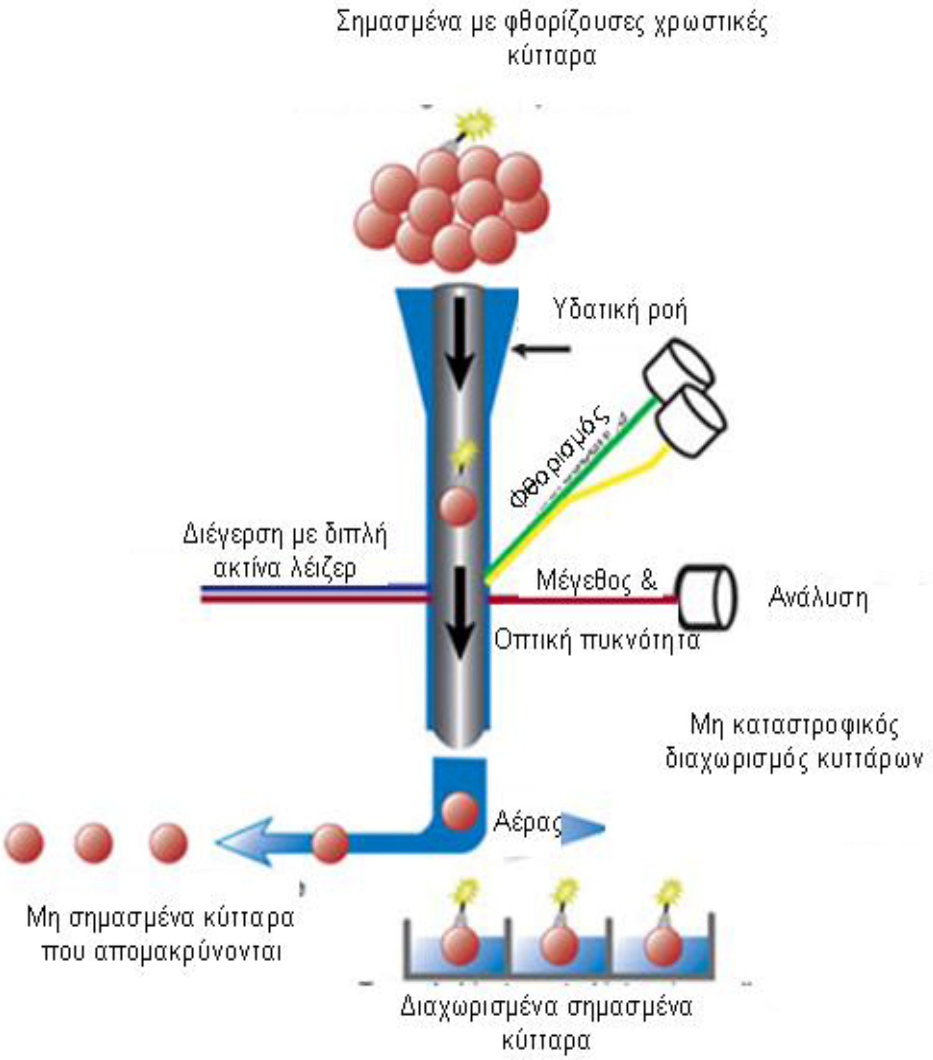


Εικόνα 1.14. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης. Στην Εικόνα φαίνεται ένας τυπικός Χρωματογράφος και η σχηματική αναπαράσταση των επιμέρους στοιχείων του, η αντλία κυκλοφορίας του διαλύτη, το σημείο εισαγωγής του δείγματος, η στήλη του χρωματογράφου, ο ανιχνευτής και ο υπολογιστής που αναλύει το σήμα του χρωματογράφου, και τέλος ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα μετά από ανάλυση δείγματος.

Ο συνδυασμός της κυτταρομετρίας ροής με φθορίζουσες χρωστικές δίνει τη δυνατότητα γρήγορων αναλύσεων και τον καθορισμό διάφορων κυτταρικών χαρακτηριστικών ταυτόχρονα. Η κυτταρομετρία ροής αναπτύχθηκε για ιατρική χρήση, ξεκίνησε να χρησιμοποιείται στην Περιβαλλοντική Μικροβιολογία τη δεκαετία του 1970 και σήμερα χρησιμοποιείται για τη μελέτη θαλάσσιων μικροοργανισμών (Burkill, 1987, Yentsch and Horan, 1989, Burkill et al., 1990). Τα πλεονεκτήματα της κυτταρομετρίας ροής περιλαμβάνουν την ανίχνευση μονών κυττάρων, την πολύ γρήγορη ανάλυση (5.000 κύτταρα το δευτερόλεπτο) και την ταυτόχρονη εξέταση πολλών παραμέτρων.

Ένα τυπικό κυτταρόμετρο αποτελείται από διάφορα επιμέρους κομμάτια (Εικόνα 1.15): την πηγή του φωτός, το κελί ροής, το υδραυλικό σύστημα ροής, οπτικά φίλτρα, φωτοδιόδια και φωτοπολλαπλασιαστές και μια μονάδα επεξεργασίας δεδομένων (Veal et al., 2000, Shapiro, 2004, Diaz et al., 2010). Κάποια κυτταρόμετρα έχουν τη δυνατότητα να διαχωρίζουν τους πληθυσμούς κυττάρων που παρουσιάζουν

ενδιαφέρον (cell sorting) ανάλογα με τα κυτταρομετρικά χαρακτηριστικά τους, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα ανάκτησης συγκεκριμένων κυττάρων από ένα μικτό πληθυσμό για περαιτέρω εφαρμογή (Bergquist et al., 2009, Davey, 2010).



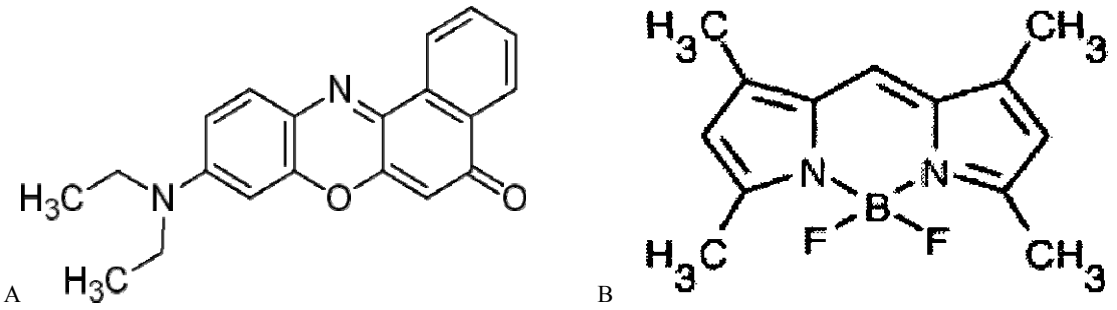
Εικόνα 1.15. Σχηματική αναπαράσταση κυτταρόμετρου ροής. Όπως φαίνεται στο σχήμα, τα κύτταρα ακολουθούν εστιασμένη πορεία ροής ώστε να εκτίθενται στην ακτίνα του lazer έτσι ώστε τα σήματα φθορισμού ή διασκορπισμού των κυττάρων να συλλέγονται και να διαχωρίζονται οπτικά από ειδικά φίλτρα και ανιχνευτές. Τα δεδομένα συλλέγονται και μετατρέπονται σε ψηφιακή πληροφορία μέσω του υπολογιστικού προγράμματος που χρησιμοποιείται κάθε φορά.

Το πλεονέκτημα χρήσης της κυτταρομετρίας ροής για την ανάλυση μικροφυκών είναι ο αυτοφθορισμός των ενδοκυτταρικών σωματιδίων (χλωροφύλλες, καροτενοειδή), ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό μεταξύ ειδών αλλά και μεταξύ μικροφυκών και άλλων μικροοργανισμών χωρίς τη χρήση χρωστικών (Hyka et al., 2012).

Για τη μελέτη όμως συγκεκριμένων χαρακτηριστικών των κυττάρων των μικροφυκών, όπως η σύσταση της βιομάζας τους (χλωροφύλλες, λιπίδια, περιεχόμενη κυτταρίνη) ή η δραστικότητα κάποιου ενζύμου, είναι απαραίτητη η χρήση συγκεκριμένων κάθε φορά χρωστικών ουσιών (Πίνακας 1.2.).

Ο προσδιορισμός του λιπιδικού περιεχομένου μικροφυκών και κυανοβακτηρίων με κυτταρομετρία ροής, επιτυγχάνεται μέχρι σήμερα με επιτυχία με τη χρήση δύο λιποφιλικών φθορίζουσων χρωστικών, τη Nile Red (NR) και την BODIPY 505/515 (4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene).

Η χρώση με Nile Red έχει χρησιμοποιηθεί πολλές φορές για τον εντοπισμό και τη μελέτη βελτιστοποίησης παραγωγής ουδέτερων και πολικών λιπιδίων σε μια μεγάλη ποικιλία μικροφυκών όπως, *Chlorella, Scendesmus, Cryptothecodinium* και *Neochloris.* Επιπρόσθετα, η χρώση αυτή έχει εφαρμοστεί για τον καθορισμό της αναλογίας πολικών/ουδέτερων λιπιδίων, η οποία θεωρείται ότι σχετίζεται με το περιεχόμενο των μικροφυκών *Tetraselmis suecicca* και *Crypthecodinium cohnii*.



Εικόνα 1.16. Φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση του λιπιδικού προφίλ μικροφυκών και κυανοβακτηρίων με κυτταρομετρία ροής, (A) Nile Red και (B) BODIPY 505/515 (Πηγή: διαδίκτυο).

Το μειονέκτημα αυτής της χρωστικής είναι η παρεμβολή του φθορισμού της Nile Red στο κόκκινο φάσμα με τον αυτοφθορισμό των φωτοσυνθετικών σωματιδίων των μικροφυκών και κυανοβακτηρίων. Για να δοθεί λύση στο πρόβλημα αυτό το DMSO χρησιμοποιήθηκε ως φορέας της χρωστικής, ωστόσο μεγάλες συγκεντρώσεις του DMSO ήταν απαραίτητες (20-25%) (Chen et al., 2009, Doan and Obbard, 2011) γεγονός που έθετε σε κίνδυνο τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Η διάλυση της χρωστικής

σε ακετόνη (1%) οδήγησε σε καλό διαχωρισμό του σήματος αυτοφθορισμού και των σημασμένων λιποσωμάτων του μικροφύκους *Chlorella vulgaris* με χρήση του φίλτρου φθορισμού FL2 (585/42 nm) (Εικόνα 1.17.).

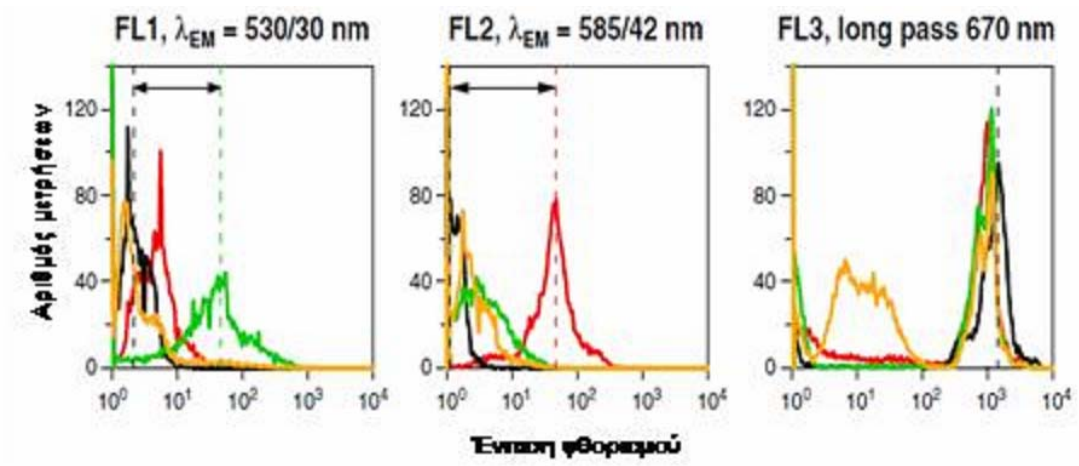
Πίνακας 1.2. Χρωστικές που χρησιμοποιούνται για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής μικροφυκών και κυανοβακτηρίων (Hyka et al., 2012).

	Χρωστική	**Χαρακτηριστικό στόχος**	**Μικροφύκη/ Κυανοβακτήρια**
Σύσταση βιομάζας	Αυτοφθορισμός	Χλωροφύλλη	Φυτοπλαγκτόν, *Haematococcus pluvialis*
	BODIPY 505/515	Λιπίδια	*Chrysochromulina sp., Mallomonas splendens, Ophycytium majus*
	CFW (Calcofluor White M2R)	Κυτταρίνη	*Crypthecodinium cohnii*
	Nile Red	Λιπίδια	*Chlorella sp., Chlorella protothecoides, Crypthecodinium cohnii, Dunaliella salina, Spirulina platensis*
Νουκλεϊκά οξέα, βιωσιμότητα	DAPI (4`,6-diamidino-2-phenylindole)	DNA , κυτταρικός κύκλος	*Chlorophyta, Rhodophyta, Acetabularia*
	Hoechst 33342	DNA , κυτταρικός κύκλος	*Gonyaulax polyedra*
	Propidium iodide	Νουκλεϊκά οξέα, βιωσιμότητα κυττάρου	*Chlamydomonas eugametos, Chlorella protothecoides, Chlorella pyrenoidosa, Chlorella vulgaris, Crypthecodinium cohnii*
Κυτταρική ενζυμική δραστικότητα	Calcein-AM	Μη εξειδικευμένη δράση εστερασών	*Micromonas pusilia*
	CFDA-SE (5(6)-carboxy-fluorescein diacetate N-succinimidyl ester)	Μη εξειδικευμένη δράση εστερασών, κυτταρική διαίρεση	*Chlorella vulgaris*

Η πρόσφατα χρησιμοποιούμενη λιποφιλική χρωστική BODIPY 505/515 έχει ένα στενό φάσμα εκπομπής στα 515 nm, γεγονός που αποτρέπει την παρεμβολή με τον

αυτοφθορισμό στο πράσινο φάσμα (Chen et al., 2009, Cooper et al., 2010). Η χρωστική αυτή βάφει επιλεκτικά λιπίδια μεταξύ των οποίων και λιπαρά οξέα εστέρες χοληστερόλης, φωσφολιπίδια και άλλα (Cooper et al., 2010). Σε αντίθεση με τη Nile Red, η BODIPY 505/515 (διαλυμένη σε 2% DMSO) δίνει ένα καλά διαχωρισμένο σήμα από τον αυτοφθορισμό όταν χρησιμοποιείται το φίλτρο (FL1) (Εικόνα 1.17.). Επίσης, η χρωστική αυτή στις μελέτες που χρησιμοποιήθηκε, έδειξε πολύ μεγαλύτερη ικανότητα διείσδυσης στα κύτταρα από τη Nile Red με χρήση μόλις 2% DMSO (Cooper et al.,2010).

Σε γενικές γραμμές, τα πολικά λιπίδια περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό πολυακόρεστων λιπαρών οξέων από τα άλλα λιπίδια, γεγονός που σημαίνει ότι η αναλογία πολικών/ουδέτερων λιπιδίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μελέτες ως ένας βασικός δείκτης του σχετικού περιεχόμενου σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στα μικροφύκη (de la Jara et al., 2003, Guzman et al., 2011).



Εικόνα 1.17. Ένταση φθορισμού λιποφιλικών χρωστικών σε κύτταρα *Chlorella vulgaris*. Στις εικόνες παρουσιάζονται τέσσερα ιστογράμματα που προέκυψαν από ανάλυση ενός δείγματος με χρήση 3 διαφορετικών οπτικών φίλτρων (FL1, FL2, FL3) και ο αυτοφθορισμός σε κοινό διάγραμμα. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη συσκευή FACSCalibur^{TM} (BD Bioscience) με μπλε λέιζερ και εκπομπή στα 488 nm. Τα διαγράμματα αυτά παρουσιάζουν τις παρεμβολές του σήματος αυτοφθορισμού όταν χρησιμοποιούνται φθορίζουσες χρωστικές για τη σήμανση ενδοκυτταρικών λιπιδίων (Nile Red ή BODIPY 505/515). Παρόλα αυτά, η BODIPY 505/515 διαλυμένη σε DMSO και η Nile Red σε ακετόνη έδωσαν ένα χαρακτηριστικό σήμα με τη χρήση των FL1 και FL2 φίλτρων αντίστοιχα. Μαύρη γραμμή: κύτταρα χωρίς χρώση, ο αυτοφθορισμός προέρχεται αποκλειστικά από τη χλωροφύλλη, Κόκκινη γραμμή: κύτταρα σημασμένα με Nile Red σε ακετόνη, Πορτοκαλί γραμμή: κύτταρα σημασμένα με Nile Red σε DMSO, Πράσινη γραμμή: κύτταρα σημασμένα με BODIPY 505/515 σε DMSO.

1.2.2 Καλλιέργεια μικροφυκών και κυανοβακτηρίων

Η ανάπτυξη της βιομάζας των μικροφυκών και των κυανοβακτηρίων εξαρτάται από την επαρκή παροχή πηγής άνθρακα και μια πηγή φωτός για να πραγματοποιηθεί η φωτοσύνθεση. Παρόλα αυτά μπορούν να προσαρμόσουν την εσωτερική τους δομή (βιολογική και φυσιολογική προσαρμογή), ενώ μπορούν να εκκρίνουν εξωτερικά ποικιλία συστατικών που να καθιστούν προσιτά τα θρεπτικά ή να περιορίζουν την ανάπτυξη ανταγωνιστών (Richmond, 2004).

Οι μικροοργανισμοί αυτοί διαθέτουν διάφορους τύπους μεταβολισμού (αυτότροφο, ετερότροφο, μιξότροφο και φωτοετερότροφο) και μπορούν να μεταβάλουν το μεταβολισμό τους σαν απόκριση στις μεταβολές των περιβαλλοντικών συνθηκών (Chojnacka and Marquez-Rocha, 2004).

Ο μεταβολισμός των μικροφυκών και των κυανοβακτηρίων μπορεί επίσης να διαφοροποιηθεί με βάση τις αλλαγές του pH. Τα *Chlorella vulgaris, Haematococcus pluvialis* και *Arthrospira platensis,* αποτελούν παραδείγματα στελεχών που μπορούν να αναπτυχθούν φωτοαυτότροφα, ετερότροφα και μιξότροφα. Άλλα στελέχη, όπως τα *Selenastrum capricornutum* και *Scendesmus acutus,* μπορούν να αναπτυχθούν φωτοαυτότροφα, ετερότροφα και φωτοετερότροφα (Chojnacka and Marquez-Rocha, 2004).

Όχι μόνο οργανικός άνθρακας, αλλά και οργανικές ενώσεις (σάκχαρα, πρωτεΐνες και λιπαρά), βιταμίνες, άλατα και άλλα θρεπτικά (νιτρικά και φώσφορος) είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροφυκών και των κυανοβακτηρίων, καθώς και η ισορροπία μεταξύ λειτουργικών παραμέτρων (οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα, pH, θερμοκρασία, ένταση φωτισμού και η διαδικασία απομάκρυνσης προϊόντων και παραπροϊόντων) (Williams, 2002).

Όταν η καλλιέργεια των μικροοργανισμών αυτών προορίζεται για παραγωγή βιοντίζελ, είναι σημαντικό να προσδιοριστεί ποσοτικά η επίδραση αυτών των παραγόντων ώστε να είναι δυνατός ο χειρισμός τους. Αυτός είναι ένας τρόπος ώστε να επιτυγχάνεται ένας σχετικός έλεγχος πάνω στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών ακόμα και σε μεγάλη κλίμακα.

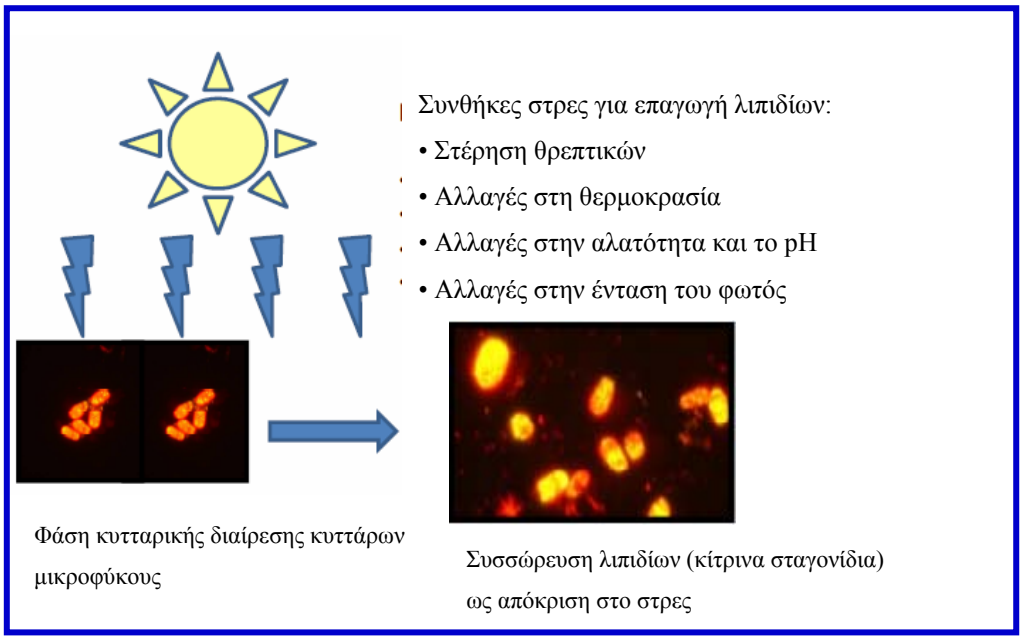
Η καλλιέργεια των μικροφυκών και κυανοβακτηρίων με σκοπό την παραγωγή βιοντίζελ, μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ανοικτά συστήματα και σε ελεγχόμενα κλειστά συστήματα γνωστά ως φωτοβιοαντιδραστήρες. Τα βασικά μοντέλα

καλλιέργειας είναι οι ανοιχτές λίμνες (Open Ponds), οι φωτοβιοαντιδραστήρες και συνδυασμοί αυτών των δύο.

1.2.2.1 Συνθήκες ανάπτυξης των μικροφυκών και των κυανοβακτηρίων που επηρεάζουν την παραγωγή λιπιδίων

Η ικανότητα των μικροφυκών να επιβιώνουν σε ποικίλες και ακραίες συνθήκες αντανακλάται στα ποικίλα και μερικές φορές ασυνήθιστα πρότυπα λιπιδίων που παράγονται από τους μικροοργανισμούς αυτούς (Sato et al.,2000, Kalpesh et al., 2012). Επιπρόσθετα, κάποια από τα μικροφύκη παρουσιάζουν την ικανότητα να διαφοροποιούν το μεταβολισμό των λιπιδίων τους ως απόκριση στις αλλαγές των περιβαλλοντικούς τους συνθηκών (Thomson, 1996, Guschina et al., 2006). Βάσει μιας πρόσφατης δημοσίευσης των Shuhmann και Lim (2011), κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης παράγονται μεγάλες ποσότητες βιομάζας μικροφυκών αλλά σχετικά μικρά ποσοστά λιπιδίων (5-20% επί της ξηρής βιομάζας). Κάτω από μη ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες ή συνθήκες καταπόνησης πολλά μικροφύκη μεταβάλλουν το μονοπάτι βιοσύνθεσης λιπιδίων προς την παραγωγή και αφομοίωση λιπιδίων σε ποσοστό 20-50% επί της ξηρής βιομάζας, κυρίως στη μορφή τριγλυκεριδίων (Εικόνα 1.18). Με τον τρόπο αυτό τα μικροφύκη κατορθώνουν να επιβιώνουν σε ποικίλα περιβάλλοντα.

Πολλά μικροφύκη παράγουν κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα κάτω από τις ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης, τα οποία έχουν υψηλή διατροφική αξία αλλά δεν είναι κατάλληλα για βιοκαύσιμα. Παρόλα αυτά, η σύνθεση λιπιδίων σε μορφή κατάλληλη για χρήση ως βιοκαύσιμα μπορεί να επαχθεί σε πολλά στελέχη με επιβολή συνθηκών στρες (Miao and Wu, 2006, Hu and Sommerfeld, 2008). Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες σχετικά με τις συνθήκες στρες που οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή λιπιδίων κατάλληλων για βιοκαύσιμα (Hu and Sommerfeld, 2008). Οι συνθήκες αυτές περιλαμβάνουν στέρηση νιτρικών και/ή φωσφορικών στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης του μικροφύκους, διαφοροποίηση στην ένταση του φωτός, αλλαγές στο pH και τη θερμοκρασία, προσθήκη βαρέων μετάλλων και άλλων χημικών στο θρεπτικό υπόστρωμα. Κάθε μία από τις συνθήκες ή και ο συνδυασμός διαφόρων από αυτές, έχει διαφορετικό αποτέλεσμα ως προς την παραγωγή των επιθυμητών λιπιδίων σε διαφορετικά στελέχη μικροφυκών (Kalpesh et al.,2012).



Εικόνα 1.18. Επαγωγή παραγωγής λιπιδίων σε μικροφύκη υπό συνθήκες στρες (Kalpesh et al., 2012)

Επίδραση της στέρησης θρεπτικών συστατικών στην παραγωγή λιπιδίων

Η διαθεσιμότητα θρεπτικών έχει έναν σημαντικό αντίκτυπο στην ανάπτυξη των μικροφυκών και σημαντική επίδραση στη σύνθεση των λιπιδίων και των λιπαρών οξέων τους. Οι συνθήκες περιβαλλοντικού στρες όταν υπάρχει έλλειψη θρεπτικών προκαλούν ένα σταθερό ρυθμό μείωσης της κυτταρικής διαίρεσης. Σε κάποια μικροφύκη όμως, κάτω από τέτοιου είδους συνθήκες, η βιοσύνθεση λιπιδίων παραμένει ενεργή, με την προϋπόθεση ότι υπάρχει επαρκής φωτισμός και CO_2 για τη φωτοσύνθεση (Thompson, 1996). Όταν η ανάπτυξη στο μικροφύκος μειώνεται και δεν υπάρχει ανάγκη για σύνθεση μεμβρανικών συστατικών, τα κύτταρα διαφοροποιούνται και ξεκινούν να αποθηκεύουν λιπαρά οξέα σε μορφή τριγλυκεριδίων.

Στις συνθήκες αυτές, η παραγωγή τριγλυκεριδίων μπορεί να εξυπηρετεί ως μηχανισμός προστασίας του κυττάρου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ATP και NADPH που παράγονται από τη φωτοσύνθεση καταναλώνονται για την παραγωγή βιομάζας, με τα ADP και $NADP^+$ να είναι ξανά διαθέσιμα ως δέκτες μορίων στη φωτοσύνθεση. Όταν η κυτταρική ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μειώνονται εξαιτίας της έλλειψης θρεπτικών, ο βασικός δέκτης ηλεκτρονίων για τη φωτοσύνθεση, το $NADP^+$ μπορεί να καταστραφεί. Από τη στιγμή που η φωτοσύνθεση ελέγχεται βασικά από το φως και δεν μπορεί να σταματήσει εντελώς, αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μια

επικίνδυνη κατάσταση για το κύτταρο, καταστρέφοντας κυτταρικά συστατικά. Το NADPH καταναλώνεται για τη βιοσύνθεση λιπιδίων, έτσι η αυξημένη παραγωγή λιπαρών οξέων αποκαθιστά τη διαθεσιμότητα σε $NADP^+$ υπό συνθήκες έλλειψης θρεπτικών (Thompson, 1996, Hu and Sommerfeld, 2008).

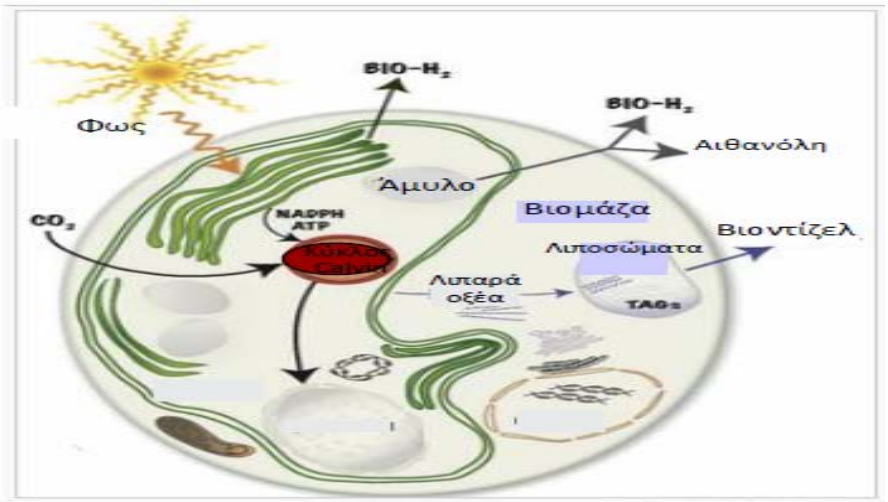
Η στέρηση νιτρικών είναι μία από τις πλέον χρησιμοποιούμενες τεχνικές για επαγωγή της αύξησης παραγωγής λιπιδίων από μικροφύκη (Πίνακας 1.4). Παραδείγματος χάριν, όταν το διάτομο *Stephanodiscus minutulus* αναπτύχθηκε με στέρηση πυριτίου, φωσφόρου και νιτρικών, σημειώθηκε αύξηση στη συσσώρευση τριγλυκεριδίων (TAGs) σε όλες τις καλλιέργειες με έλλειψη κάποιου από τα παραπάνω θρεπτικά (Lynn et al., 2000).

Το άζωτο (σε μορφή νιτρικών) είναι το πιο κρίσιμο συστατικό που επηρεάζει το μεταβολισμό των λιπιδίων στα μικροφύκη. Μια γενική τάση για συσσώρευση λιπιδίων, συγκεκριμένα τριγλυκεριδίων, σαν απόκριση στη μείωση της πηγής αζώτου, έχει παρατηρηθεί σε μεγάλο αριθμό στελεχών μικροφυκών (Hsieh et al., 2009, Yeh and Chang, 2011, Praveenkumar et al., 2012).

Ο Hu και οι συνεργάτες του (2008) πραγματοποίησαν μια μελέτη για την απόκριση σε συνθήκες στέρησης νιτρικών διαφόρων μικροφυκών, διατόμων και κυανοβακτηρίων και όλα τα είδη υπό μελέτη παρουσίασαν αξιοσημείωτη αύξηση στην παραγωγή λιπιδίων. Σε συνθήκες περιορισμένης παρουσίας πηγής αζώτου, τα λιπίδια των μικροφυκών αυξάνονται καθώς τα ένζυμα που σχετίζονται με τη σύνθεση λιπιδίων είναι λιγότερο επιρρεπή στην αποδιάταξη από ότι τα ένζυμα που σχετίζονται με την παραγωγή υδρογονανθράκων εξαιτίας της στέρησης αζώτου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το μεγαλύτερο μέρος του άνθρακα να δεσμεύεται σε λιπίδια (Shen et al., 2009).

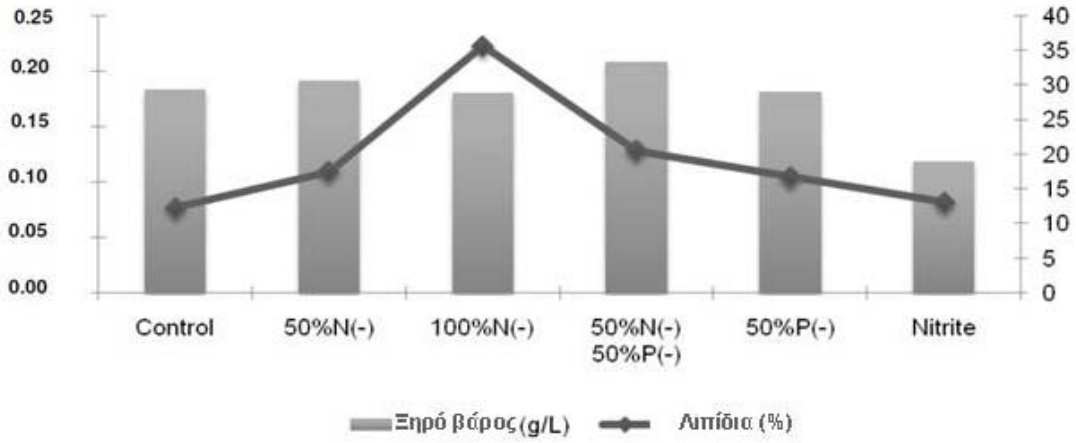
Η μείωση της συγκέντρωσης φωσφορικών στο θρεπτικό υπόστρωμα, έχει αποδειχτεί ότι επίσης επηρεάζει την παραγωγή λιπιδίων από μικροφύκη. Τα στελέχη *P.tricornutum, Chaetoceros sp., Isochrysis galbana* και *Pavlova lutheri,* παρουσίασαν αύξηση της παραγωγής λιπιδίων με μείωση των φωσφορικών αλλά η ίδια μείωση σε καλλιέργειες των στελεχών *Nannochloris atomus* και *Tetraselmis sp.* έφερε τα αντίθετα αποτελέσματα (Reitan et al., 1994). Λόγω της μείωσης των φωσφορικών, η παραγωγή C16:0 και C18:1 αυξήθηκε ενώ η παραγωγή των C18:4ω3, C20:5ω3 και C22:6ω3 μειώθηκε (Reitan et al., 1994). Το στέλεχος *Chlorella kessleri* παρουσίασε αυξημένα επίπεδα παραγωγής ακόρεστων λιπαρών οξέων σε συνθήκες στέρησης φωσφορικών (El-Sheek and Rady, 1995). Για το συγκεκριμένο στέλεχος παρατηρήθηκε επίσης αύξηση

των συνολικά παραγόμενων τριγλυκεριδίων από 6,6% σε 39,3% με σταδιακή μείωση μόνο της συγκέντρωσης του εικοσαπεντανοϊκού οξέος.



Εικόνα 1.19. (Α) Μεταβολικό μονοπάτι στα μικροφύκη που σχετίζεται με την παραγωγή βιοκαυσίμων. Η ολοκλήρωση των μεταβολικών μονοπατιών ρυθμίζεται μέσω πολύπλοκων μηχανισμών που καθορίζουν τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης για τη σύνθεση πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων, υδρογονανθράκων, λιπιδίων και H_2 (Beer et al., 2009).

Σε μία πρόσφατη έρευνα των Mutlu et al. (2011), σχετικά με την επίδραση της στέρησης νιτρικών στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης του μικροφύκους *Chlorella vulgaris*, τα αποτελέσματα έδειξαν πως η πλήρης έλλειψη νιτρικών οδήγησε στη μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων (Εικόνα 1.20).



Εικόνα 1.20. Ξηρό βάρος και ποσοστά παραγωγής λιπιδίων σε καλλιέργειες του μικροφύκους *Chlorella vulgaris* σε διαφορετικούς συνδυασμούς θρεπτικών συστατικών (Mutlu et al., 2011).

Μια μελέτη των Sato et al. (2000) σχετικά με τη στέρηση θειικών και φωσφορικών στο θρεπτικό υπόστρωμα του μικροφύκους *Chlamydomonas reinhardtii,* έδειξε ότι η μείωση του θείου οδηγεί σε μείωση συγκεκριμένων ομάδων γλυκεριδίων (sulfoquinovosyl diacylglycerols, SQDG), αλλά και σε αύξηση των φωσφογλυκερολών (phosphatidylglygerol, PG). Όταν το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* αναπτυσσόταν σε θρεπτικό υπόστρωμα με περιορισμένο φώσφορο παρουσίαζε 40% μείωση σε PG και παράλληλα αύξηση του περιεχομένου σε SQDG. Έτσι αποδεικνύεται πως υπάρχουν μηχανισμοί που κρατούν σταθερή τη συγκέντρωση φωσφο- και θειο-λιπιδίων (Sato et al., 2000). Άλλες μελέτες έδειξαν πως η μείωση του θείου στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης του μικροφύκους *Chlorella sp.,* οδήγησε σε αύξηση των συνολικών λιπιδίων (Matthew et al., 2009).

Πίνακας 1.3. Παραδείγματα από διάφορους τύπους στρες θρεπτικών που έχουν χρησιμοποιηθεί για αύξηση της παραγωγής λιπιδίων σε μικροφύκη (Kalpesh et al.,2012).

Μικροφύκη	**Συνθήκες στρες**	**Αλλαγές στο λιπιδικό προφίλ μετά την επαγωγή**
Chlamydomonas reinhardtii	Στέρηση νιτρικών	Αύξηση των συνολικών λιπιδίων
Scendesmus subspicatus	Στέρηση νιτρικών	Αύξηση των συνολικών λιπιδίων
Nannochloropsis oculata	Στέρηση νιτρικών	Αύξηση συνολικών λιπιδίων κατά 15,3%
Chlorella vulgaris	Στέρηση νιτρικών	Αύξηση συνολικών λιπιδίων κατά 16,41%
Chlorella sp.	Στέρηση νιτρικών	Παραγωγή λιπιδίων 78mg/l d
Chlorella vulgaris	Αλλαγή πηγής αζώτου	Αύξηση λιπιδίων κατά 40%
Scendesmus sp.	Στέρηση νιτρικών και φωσφορικών	Αύξηση παραγωγής τριγλυκεριδίων

Επίδραση της θερμοκρασίας στην παραγωγή λιπιδίων

Έχει βρεθεί πως η θερμοκρασία έχει σημαντικό αντίτυπο στη σύνθεση λιπιδίων στα μικροφύκη (Πίνακας 1.5) (Guschina and Harwood, 2006, Morgan et al., 2006). Σε πολλά μικροφύκη και κυανοβακτήρια, έχει παρατηρηθεί μια τάση για αύξηση των ακόρεστων λιπαρών οξέων με μείωση της θερμοκρασίας και μια τάση για αύξηση των κορεσμένων λιπαρών οξέων με αύξηση της θερμοκρασίας (Murata et al., 1975, Sato et al., 1980, Lynch et al., 1982, Renaud et al., 2002). Είναι κοινώς αποδεκτό ότι πολλές από τις αλλαγές του λιπιδικού προφίλ προκαλούν αλλαγές στις φυσικές ιδιότητες των μεμβρανών έτσι ώστε οι φυσιολογικές λειτουργίες (ιοντική διαπερατότητα, διαδικασίες φωτοσύνθεσης και αναπνοής) να συνεχίζονται ανεπηρέαστες (Somerville,1995). Η πιο

συνήθης αλλαγή που παρατηρείται στα λιπίδια των μεμβρανών μετά από αλλαγές στη θερμοκρασία είναι η αλλαγή της ακορεστότητας (Kalpesh et al., 2012). Εξαιτίας της γεωμετρίας τους, τα λιπαρά οξέα με διπλούς δεσμούς άνθρακα δεν μπορούν να «πακεταριστούν» τόσο πυκνά όσο τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, με αποτέλεσμα η ρευστότητα των μεμβρανών με ακόρεστα λιπαρά οξέα να αυξάνεται. Καθώς η ρευστότητα των μεμβρανών μειώνεται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, η αύξηση της ακορεστότητας των λιπαρών οξέων βοηθά την προσαρμογή στις αλλαγές του περιβάλλοντος.

Το μικροφύκος *Dunaliella salina,* έχει αναλυθεί εκτενώς για διαφοροποιήσεις της σύστασης των λιπιδίων του σε χαμηλές θερμοκρασίες (Thompson, 1996). Μία μείωση της θερμοκρασίας από τους 30 ^{o}C στους 12 ^{o}C οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων των ακόρεστων λιπαρών οξέων κατά 20% (Thompson, 1996). Η αύξηση της θερμοκρασίας, στα στελέχη *Chlorella vulgaris* και *Botryococcus braunii,* οδήγησε σε μείωση των ενδοκυτταρικών ακόρεστων λιπαρών οξέων (Kalpesh et al., 2012). Αύξηση στο ρυθμό ανάπτυξης και στη συνολική παραγωγή λιπιδίων παρατηρήθηκε για το μικροφύκος *Nannochloropsis salina* με αύξηση της θερμοκρασίας (Kalpesh et al., 2012). Σε καλλιέργεια του *Isochrysis galbana* στους 30 ^{o}C, τα συνολικά λιπίδια συσσωρεύτηκαν σε μεγαλύτερο βαθμό με μικρή μείωση στο ποσοστό των μη πολικών λιπιδίων (Zhu and Chao, 1997). Από την άλλη μεριά παρατηρήθηκαν υψηλότερα ποσοστά των λιπαρών οξέων α-λινολενικό και δεκαεξανικό με αντίστοιχη μείωση σε κορεσμένα και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα όταν η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε στους 15 ^{o}C. Επίσης, στο διάτομο *Phaeodactylum tricornutum,* η μεγαλύτερη απόδοση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ανά μονάδα ξηρής βιομάζας ήταν 4,9 και 2,6% αντίστοιχα, όταν η θερμοκρασία έπεφτε από τους 25 ^{o}C στους 10 ^{o}C για 12 ώρες (Jiang and Chao, 2004).

Στο θαλάσσιο μικροφύκος *Pavlova lutheri,* παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στη σύνθεση των όξινων λιπιδίων και των λιπαρών οξέων για καλλιέργειες στους 15 ^{o}C συγκριτικά με καλλιέργειες στους 25 ^{o}C (Kalpesh et al., 2012). Την επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη και την παραγωγή λιπιδίων μελέτησε επίσης ο Fork και οι συνεργάτες του (1979) για το θερμόφιλο κυανοβακτήριο *Synechococcus lividus* και παρατήρησαν πως όταν η θερμοκρασία της καλλιέργειας μειωνόταν από τους 55 ^{o}C

στους 38 °C, η ποσότητα του κορεσμένου λιπαρού οξέος C18:0 μειώθηκε, ενώ των ακόρεστων λιπαρών οξέων C18:1 και C16:1 αυξήθηκε (Fork et al., 1979).

Πρέπει να σημειωθεί πως οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με την επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη και την παραγωγή λιπιδίων είναι περιορισμένες και έχουν γίνει σε εργαστηριακή κλίμακα, όπου είναι πολύ εύκολο να διατηρηθεί σταθερή η θερμοκρασία της καλλιέργειας. Η διατήρηση, αύξηση ή μείωση της θερμοκρασίας, είναι εφικτά μόνο σε σύστημα κλειστού φωτοβιοαντιδραστήρα, η λειτουργία του οποίου κοστίζει περισσότερο από ότι τα ανοικτά συστήματα (Kalpesh et al., 2012).

Πίνακας 1.4. Επαγωγή παραγωγής λιπιδίων σε μικροφύκη σε διαφορετικές θερμοκρασίες (Kalpesh et al., 2012).

Μικροφύκη/ Κυανοβακτήρια	**Παράγοντας στρες**	**Αλλαγή λιπιδικού προφίλ**
Nannochloropsis oculata	Αύξηση από 20 °C σε 25 °C	Αύξηση παραγωγής λιπιδίων κατά 14.92%
Isochrysis galbana	Αύξηση από 15°C σε 30 °C	Αύξηση λιπιδίων
Chlorella ellipsoidea	Μείωση Θερμοκρασίας	Διπλασιασμός ακόρεστων λιπαρών οξέων
Dunaliella salina	Αλλαγή από 30 °C σε 12 °C	Αύξηση ακόρεστων Λιπιδίων
Phaeodactylum tricornutum	Αλλαγή από 25 ºC σε 10 ºC για 12 h	Μέγιστη απόδοση σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
Sprirulina platensis	Αύξηση Θερμοκρασίας	Αύξηση κορεσμένων λιπαρών οξέων

Επίδραση της αλατότητας στην παραγωγή λιπιδίων

Τα μικροφύκη του είδους *Dunaliella* αποτελούν το καλύτερο παράδειγμα μικροφυκών που μπορούν να επιβιώνουν σε συνθήκες πολύ υψηλής αλατότητας. Η ικανότητα των μικροφυκών αυτών τα καθιστά κατάλληλα για μελέτες επίδρασης αλατότητας σε μικροφύκη (Takagi and Yoshida, 2006). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε με το μικροφύκος *Dunaliella salina,* η καλλιέργεια του μικροφύκους μεταφέρθηκε από συγκέντρωση NaCl 0,5 M (29 g/l) σε συγκέντρωση 3,5 M (205 g/l) και τα αποτελέσματα έδειξαν πως υπήρχε σημαντική αύξηση στο ποσοστό των λιπαρών οξέων C18:0 στην καλλιέργεια με συγκέντρωση NaCl 3,5 M (Kalpesh et al., 2012).

Το διάτομο *Nitzschia laevis* είναι γνωστό ότι παράγει υψηλά ποσοστά εικοσαπεντανοϊκού οξέος (EPA) (Chen et al., 2008). Όταν τα κύτταρα αυτού του διατόμου υπόκεινται σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων, το ποσοστό των ακόρεστων λιπαρών οξέων αυξάνεται σημαντικά μέχρι μια συγκεκριμένη συγκέντρωση αλάτων (20 g/l) ενώ από 30 g/l αλάτων και πάνω η παραγωγή λιπαρών οξέων μειώνεται.

Μελέτες και σε άλλα είδη μικροφυκών και διατόμων αποδεικνύουν πως η αύξηση της αλατότητας οδηγεί σε αύξηση παραγωγής λιπαρών οξέων, ωστόσο για κάθε μικροοργανισμό υπάρχει ένα συγκεκριμένο όριο στη συγκέντρωση αλάτων μετά από το οποίο η παραγωγή λιπαρών οξέων μειώνεται (Kalpesh et al., 2012).

Επίδραση του pH και της παρουσίας βαρέων μετάλλων στην παραγωγή λιπιδίων

Οι αλλαγές του pH στο θρεπτικό υπόστρωμα έχει βρεθεί πως οδηγούν σε μεταβολή της σύνθεσης των λιπιδίων από πολλά μικροφύκη (Πίνακας 1.6). Για το στέλεχος *Chlorella* CHLOR1 η επιβολή αλκαλικού pH οδήγησε σε συσσώρευση τριγλυκεριδίων και μείωση των μεμβρανικών λιπιδίων, χωρίς να υπάρχει εξάρτηση από τα επίπεδα νιτρικών ή την πηγή άνθρακα (Kalpesh et al., 2012). Με βάση μορφολογικές παρατηρήσεις, το αλκαλικό pH παρεμπόδισε την ανάπτυξη των μικροφυκών με αποτέλεσμα η ενέργεια των κυττάρων τους να οδηγείται στην παραγωγή λιπιδίων. Έχει βρεθεί επίσης πως τα βαρέα μέταλλα, όπως κάδμιο, σίδηρος, ψευδάργυρος, αυξάνουν την παραγωγή λιπιδίων σε διάφορα μικροφύκη (Einicker-Lamas et al.,2002). Η επίδραση υψηλών συγκεντρώσεων καδμίου μελετήθηκε στο *Euglena gracilis* σε αυτότροφη, ετερότροφη (στο σκοτάδι) και μιξότροφη (στο φως με οργανική πηγή άνθρακα) καλλιέργεια (Einicker-Lamas et al., 2002). Η παρουσία καδμίου προκάλεσε αύξηση στο συνολικό περιεχόμενο λιπιδίων ανά κύτταρο και στις τρεις καλλιέργειες.

Η μελέτη της επίδρασης της παρουσίας σιδήρου στην ανάπτυξη και συσσώρευση λιπιδίων για το στέλεχος *Chlorella vulgaris,* έδειξε αύξηση των συνολικών λιπιδίων με προσθήκη Fe^{3+} στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης (Liu et al., 2008).

Επίδραση της έντασης φωτισμού στην παραγωγή λιπιδίων

Έχει παρατηρηθεί για τα μικροφύκη, πως αναπτύσσονται κάτω από διάφορες εντάσεις φωτός επιδεικνύοντας αξιοσημείωτες μεταβολές στη φωτοσυνθετική τους ικανότητα (Richardson et al., 1983) (Πίνακας 1.6). Επιπλέον διαφορετικές εντάσεις

φωτισμού και μήκη κύματος, έχει αναφερθεί πως μεταβάλουν το μεταβολισμό των λιπιδίων στα μικροφύκη αλλάζοντας το λιπιδικό τους προφίλ (Kalpesh et al., 2012). Υψηλή ένταση φωτισμού οδηγεί σε οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ενώ χαμηλή ένταση επάγει το σχηματισμό πολικών λιπιδίων, συγκεκριμένα μεμβρανικών λιπιδίων (Kalpesh et al., 2012).

Πίνακας 1.5. Επίδραση του pH, της αλατότητας και της παρουσίας βαρέων μετάλλων στην παραγωγή λιπιδίων από μικροφύκη (Kalpesh et al., 2012).

Μικροφύκη	Αλλαγή συνθηκών	Λιπιδικό προφίλ
Dunaliella salina	Μεταφορά από 29 σε 205 g/l NaCl	Αυξημένη συγκέντρωση C18:0 λιπαρών οξέων
Nitzschia laevis	Αύξηση συγκέντρωσης NaCl από 10 σε 20 g/l	Αύξηση ακόρεστων λιπαρών οξέων
Crythecodinium cohnii ATCC 30556	9 g/l NaCl	Αύξηση συνολικών λιπαρών οξέων
Chlorella sp.,	Αλκαλικό pH	Αύξηση τριγλυκεριδίων
Euglena gracilis	Προσθήκη καδμίου, ψευδάργυρου	Αύξηση συνολικών λιπιδίων

Η εναλλαγή φωτός με σκοτάδι στις διάφορες φάσεις ανάπτυξης παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη σύνθεση λιπιδίων από τα μικροφύκη, γεγονός που αποδείχτηκε στην εκτενή μελέτη του διατόμου *Thalassiosira pseudomona* (Kalpesh et al., 2012). Καλλιέργεια που έφτασε μέχρι τη φάση στασιμότητας κάτω από έντονο συνεχή φωτισμό ή κάτω από φωτοπερίοδο 12:12 ώρες με συνθήκες έντονου φωτισμού / σκότους, έδωσε μεγαλύτερη παραγωγή τριγλυκεριδίων από ότι καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν με χαμηλότερη ένταση φωτισμού. Κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης η παραγωγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ήταν μεγαλύτερη σε συνθήκες έντονου φωτισμού. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει πως η συσσώρευση λιπιδίων είναι διαφορετική σε κάθε φάση ανάπτυξης.

Παρότι όμως η ένταση του φωτισμού παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή και συσσώρευση λιπιδίων στα μικροφύκη, ο έλεγχός της είναι δυνατός μόνο σε κλειστούς βιοαντιδραστήρες ή σε μεγάλης κλίμακας εργαστηριακές καλλιέργειες. Επιπρόσθετα, τα λειτουργικά κόστη για ελεγχόμενες συνθήκες φωτισμού αυξάνουν το συνολικό κόστος παραγωγής βιοκαυσίμων από μικροφύκη (Kalpesh et al., 2012).

Μετά την ανάλυση των βασικών παραγόντων που επηρεάζουν την παραγωγή λιπιδίων από τα μικροφύκη, γίνεται σαφές, πως το κάθε μικροφύκος αντιδρά διαφορετικά στις συνθήκες καταπόνησης που του επιβάλλονται παράγοντες

διαφορετικά λιπαρά οξέα. Επίσης, το ποια τεχνική θα εφαρμοστεί για την αύξηση της παραγωγής λιπιδίων εξαρτάται σε ένα μεγάλο βαθμό από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τον τρόπο καλλιέργειας.

Πίνακας 1.6. Επαγωγή παραγωγής λιπιδίων υπό διάφορες συνθήκες φωτισμού στα μικροφύκη (Kalpesh et al., 2012).

Μικροφύκη	Συνθήκες φωτισμού	Λιπιδικό προφίλ
Tichocarpus crinitus	Χαμηλή ένταση φωτισμού	Αυξημένη παραγωγή TAG
Pavlova lutheri	Υψηλή ένταση φωτισμού	Αυξημένη συνολική παραγωγή λιπιδίων
Thalassiosira pseudonana	Φωτοπερίοδος με έντονο φωτισμό	Αυξημένη παραγωγή πολυακόρεστων
Selenastrum capricornutum	Ανάπτυξη στο σκοτάδι	Αύξηση παραγωγής λινολεϊκού οξέος
Isochrysis galbana	Φωτοπερίοδος με μικρή διάρκεια φωτισμού	Αύξηση παραγωγής πολυακόρεστων λιπαρών οξέων

Με βάση τη βιβλιογραφία, ανάμεσα σε όλος τους παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή λιπιδίων, ο βασικότερος και καλύτερα ελεγχόμενος είναι η στέρηση νιτρικών. Η πηγή αζώτου και η παρουσία της στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των μικροφυκών επηρεάζει σημαντικά τόσο την ανάπτυξή τους όσο και τη συσσώρευση λιπιδίων τους. Σχεδόν για όλα τα μικροφύκη που έχουν μελετηθεί, έχει παρατηρηθεί πως η στέρηση νιτρικών οδηγεί σε αύξηση παραγωγής λιπιδίων, γεγονός που την καθιστά ως την πιο επιτυχημένη τεχνική για επαγωγή παραγωγής λιπιδίων από μικροφύκη προς το παρόν. Το μειονέκτημα της στέρησης νιτρικών ως τεχνική για αυξημένη παραγωγή λιπιδίων είναι το γεγονός ότι η χρήση της συνεπάγεται χαμηλούς ρυθμούς αύξησης που οδηγούν σε μεγαλύτερους χρόνους καλλιέργειας (Widjaja et al., 2009).

Γρήγορη αύξηση της παραγωγής λιπιδίων μπορεί να επιτευχθεί μέσω υβριδικών συστημάτων, όπου υπάρχει μια καλλιέργεια στην εκθετική φάση με πλούσιο θρεπτικό υπόστρωμα που τροφοδοτεί συνέχεια το σύστημα με βιομάζα και συνδέεται με καλλιέργεια φτωχότερου θρεπτικού υποστρώματος, με επαρκή φωτισμό.

Καθώς η πυκνότητα της παραγόμενης βιομάζας είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επηρρεάζει την οικονομικότητα των βιοκαυσίμων από μικροφύκη και κυανοβακτήρια, έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες σε καλλιέργειες για μεγάλη παραγωγή βιομάζας με σκοπό να μειωθεί το κόστος της

διαδικασίας. Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν πως η χρήση ημιτροφοδοτούμενων συστημάτων καλλιέργειας οδηγεί σε μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας. Συγκεκριμένα ο Xiong και οι συνεργάτες του (2008) αναφέρουν παραγωγή βιομάζας 51,2 g/l και συγκέντρωση παραγόμενων λιπιδίων 25,8 g/l από ημιτροφοδοτούμενη καλλιέργεια του στελέχους *Chlorella protothecoides*, ενώ παραγωγή βιομάζας 100 g/l αναφέρεται για το στέλεχος *Schizochytrium sp.* από τους Chi και συνεργάτες (2009).

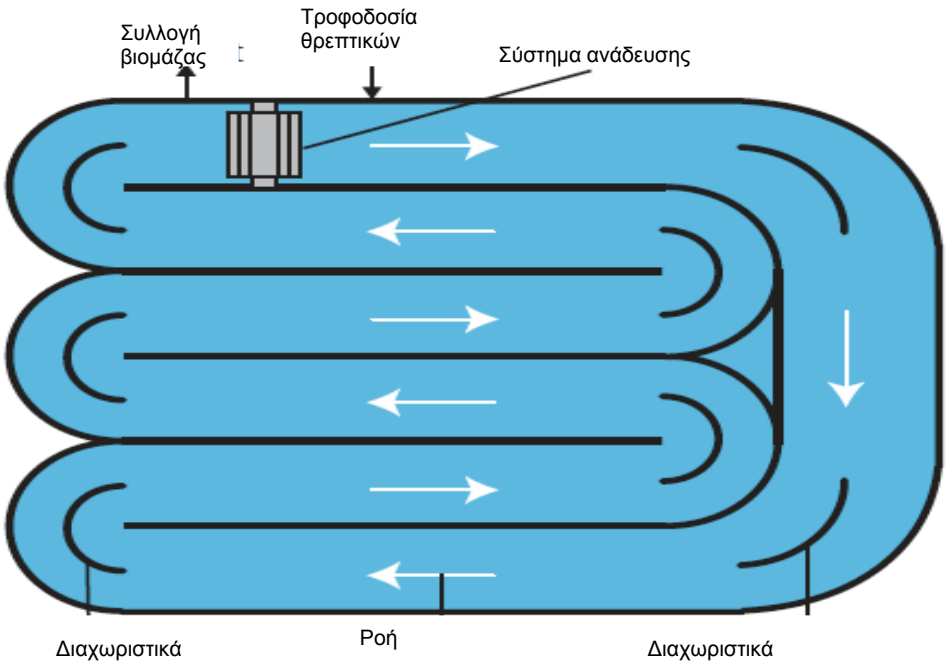
Ακόμη, η φάση συσσώρευσης λιπιδίων μπορεί να επιταχυνθεί με χρήση συνδυασμού τεχνικών επαγωγής λιπιδίων. Ο ακριβής όμως συνδυασμός τεχνικών που θα παρέχει τη βέλτιστη δυνατή παραγωγή λιπιδίων σε μεγάλης κλίμακας συστήματα καλλιέργειας για παραγωγή βιοντίζελ, διαφέρει για κάθε μικροφύκος και εξαρτάται από το θρεπτικό υπόστρωμα, τις περιβαλλοντικές και κλιματικές συνθήκες (Kalpesh et al., 2012).

1.2.3 Τεχνικά χαρακτηριστικά συστημάτων καλλιέργειας μεγάλου όγκου για μικροφύκη και κυανοβακτήρια

Μετά την επιλογή του κατάλληλου στελέχους και των κατάλληλων συνθηκών ανάπτυξης, σημαντικό ρόλο παίζει ο τύπος της καλλιέργειας που θα εφαρμοστεί. Μέχρι σήμερα χρησιμοποιούνται τρεις τύποι καλλιέργειας για τα μικροφύκη και τα κυανοβακτήρια: 1) Open Ponds (Ανοιχτές Λίμνες), 2) Φωτοβιοαντιδραστήρες και 3) Υβριδικά Συστήματα καλλιέργειας.

Οι Ανοιχτές Λίμνες, είναι συστήματα όπου καλλιεργούνται τα μικροφύκη. Τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά διοχετεύονται είτε μέσω σωληνώσεων από τα απόβλητα άλλων κοντινών εγκαταστάσεων είτε από δοχεία. Οι λίμνες πρέπει να είναι ρηχές ώστε να επιτρέπουν τη μέγιστη δυνατή έκθεση των μικροφυκών στον ήλιο κα έχουν βάθος συνήθως μεταξύ 0,25 – 1 m. Το νερό διατηρείται σε κίνηση με ειδικούς μηχανισμούς. Κατά τη διάρκεια της ημέρα, η καλλιέργεια τροφοδοτείται συνεχώς από την μπροστινή μεριά του τροχού όπου ξεκινάει η ροή και η βιομάζα συλλέγεται από την πίσω μεριά. Γενικά, οι «ανοιχτές λίμνες» είναι επιδεκτικές στις περιβαλλοντικές συνθήκες, μην επιτρέποντας τον έλεγχο της θερμοκρασίας του νερού, την εξάτμιση και την ένταση του φωτισμού. Η χρήση τους περιορίζεται για συγκεκριμένα είδη μικροφυκών που έχουν ήδη μελετηθεί. Παρόλα αυτά, μπορούν να δώσουν μεγάλη παραγωγή βιομάζας μικροφυκών, αλλά χρειάζονται μεγάλη έκταση γης και είναι

επιρρεπείς σε μολύνσεις από βακτήρια και μύκητες (Mata et al., 2010). Η παραγωγικότητα των «ανοιχτών λιμνών» μετράται σε όρους παραγωγής βιομάζας ανά ημέρα ανά μονάδα ή προς τη συνολική έκταση της χρησιμοποιούμενης έκτασης.



Εικόνα 1.21. Ανοιχτό σύστημα καλλιέργειας μικροφυκών (Open Pond) (Chisti, 2007).

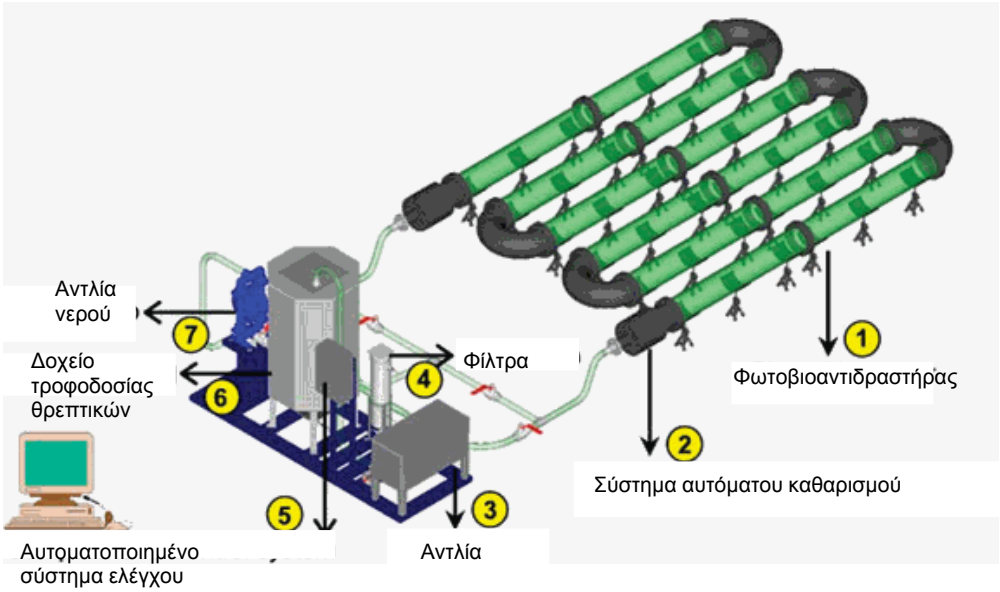
Σε αντίθεση με τα ανοιχτά συστήματα, οι φωτοβιοαντιδραστήρες επιτρέπουν την ιδανική ανάπτυξη μικροφυκών για παρατεταμένο χρονικό διάστημα. Φωτοβιοαντιδραστήρες έχουν χρησιμοποιηθεί με μεγάλη επιτυχία για μεγάλη παραγωγή βιομάζας μικροφυκών (Tredici, 1999; Pultz, 2004; Carvalho et al., 2006).

Η παραγωγή μικροφυκών που βασίζεται στην τεχνολογία των κλειστών φωτοβιοαντιδραστήρων έχει σχεδιαστεί για να υπερπηδηθούν κάποια από τα βασικά προβλήματα που σχετίζονται με τα ανοιχτά συστήματα. Για παράδειγμα, η μόλυνση από άλλους μικροοργανισμούς αποκλείεται. Επίσης, αποτρέπεται η εξάτμιση της υδατικής φάσης και έτσι μειώνεται η χρήση νερού, χάνεται λιγότερο CO_2 και επιτρέπεται η αυξημένη παραγωγή βιομάζας.

Τα κλειστά συστήματα περιλαμβάνουν σωληνοειδείς, επίπεδους και κάθετους φωτοβιοαντιδραστήρες. Τα συστήματα αυτά είναι κατάλληλα για πιο ευαίσθητα

στελέχη καθώς η δυνατότητα ελέγχου των συνθηκών καλλιέργειας διαφυλάσσει την καλλιέργεια από επιμολύνσεις. Ωστόσο, το κόστος ενός κλειστού συστήματος είναι σημαντικά μεγαλύτερο από αυτό των ανοιχτών συστημάτων (Carvahlo et al., 2006).

Ένας σωληνοειδής φωτοβιοαντιδραστήρας αποτελείται από μια σειρά φωτοδιαπερατούς σωλήνες από πλαστικό υλικό ή γυαλί. Αυτή η διάταξη τοποθετείται σε σημεία με τη μεγαλύτερη δυνατή ηλιοφάνεια. Οι ηλιακοί συλλέκτες έχουν συνήθως διάμετρο 0,1 m ή και λιγότερο. Η διάμετρος των σωλήνων είναι συνήθως μικρή καθώς το φως δεν μπορεί να διεισδύσει πολύ βαθιά μέσα στην καλλιέργεια ώστε να διασφαλίσει μεγάλη παραγωγικότητα (Chisti, 2007). Το δοχείο τροφοδοσίας θρεπτικών υλικών τροφοδοτει συνεχώς τις σωληνώσεις του φωτοαντιδραστήρα όπυ πραγματοποιείται η φωτοσύνθεση μέσω της απορρόφησης της ηλιακής ακτινοβολίας από τα κύτταρα των μικροφυκών ή των κυανοβακτηρίων που καλλιεργούνται. Αυτή η διαδικασία είναι συνεχής. Η καθίζηση της βιομάζας στους σωλήνες αποφεύγεται με τη διατήρηση σταθερής ροής. Η ροή δημιουργείται είτε με χρήση μηχανικής αντλίας είτε με αντλία αέρα. Οι μηχανικές αντλίες μπορεί να προκαλέσουν αλλοιώσεις στη βιομάζα (Chisti, 1999, Camacho et al., 2006), αλλά είναι εύκολο να σχεδιαστούν, να τοποθετηθούν και να λειτουργούν ελεγχόμενα. Οι αντλίες αέρα έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία (Grima et al., 1999).



Εικόνα 1.22. Σύστημα λειτουργίας σωληνοειδούς φωτοβιοαντιδραστήρα για ανάπτυξη μικροφυκών και κυανοβακτηρίων (Brennan and Owende, 2009).

Ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, οι φωτοβιοαντιδραστήρες πρέπει να καθαρίζονται και να αποστειρώνονται. Αυτό μπορεί να γίνει εύκολα με συστήματα αυτοκαθαρισμού (Chisti, 2007).

Η υβριδική καλλιέργεια δύο φάσεων είναι μία μέθοδος που συνδυάζει την ανάπτυξη αρχικά σε κλειστό και στη συνέχεια σε ανοιχτό σύστημα. Η πρώτη φάση πραγματοποιείται στο φωτοαντιδραστήρα όπου ελεγχόμενες συνθήκες ελαχιστοποιούν την πιθανότητα μόλυνσης από άλλους οργανισμούς και ευνοούν τη συνεχή κυτταρική διαίρεση. Η δεύτερη φάση παραγωγής έχει στόχο την έκθεση των κυττάρων σε συνθήκες στέρησης θρεπτικών, κάτι που ενισχύει την σύνθεση και συσσώρευση των επιθυμητών λιπιδίων (Huntley and Redalje, 2007, Rodolfi et al., 2008). Το στάδιο αυτό ταιριάζει ιδανικά στις ανοιχτές λίμνες, καθώς το περιβαλλοντικό στρες που διεγείρει την παραγωγή λιπιδίων μπορεί να υφίσταται φυσικά μέσω της μεταφοράς της καλλιέργειας από το κλειστό στο ανοιχτό σύστημα.

Οι Huntley και Redalje (2007) χρησιμοποίησαν ένα τέτοιο σύστημα για την παραγωγή λιπιδίων και ασταξανθίνη από το μικροφύκος *Haematococcus pluvialis* και πέτυχαν ετήσια παραγωγή λιπιδίων > 10 ton ha $^{-1}$.Παρόμοιο σύστημα χρησιμοποιήθηκε από τους Rodolfi και συνεργάτες (2008), όπου το 22% της παραγωγής στράφηκε στην παραγωγή βιομάζας με επαρκή παροχή νιτρικών και το 78% στράφηκε στην παραγωγή λιπιδίων με συνθήκες στέρησης νιτρικών. Αυτό οδήγησε σε παραγωγή 90 kg ha^{-1} τη μέρα. Οι ερευνητές αυτοί προσδιόρισαν πως ένα τέτοιο σύστημα θα μπορούσε να φτάσει σε ετήσια ποσοστά παραγωγής λιπιδίων 20 τόνους το εκτάριο (Huntley M. and Redalje D., 2007).

1.2.3.1 Μέθοδοι συλλογής βιομάζας μικροφυκών και κυανοβακτηρίων

Ο όρος συλλογή βιομάζας μικροφυκών και κυανοβακτηρίων αναφέρεται στη συμπύκνωση των εναιωρημάτων βιομάζας – θρεπτικού υποστρώματος ώσπου να δημιουργηθεί μια παχιά «πάστα» ή να ξηραθεί η βιομάζα ανάλογα με το επιθυμητό προϊόν. Οι βασικές μέθοδοι περιλαμβάνουν διήθηση, φυγοκέντρηση, καθίζηση και κροκκίδωση (Εικόνα 1.23) (Parmar et al., 2011).

Η διήθηση, μια σχετικά απλή διαδικασία, πραγματοποιείται συνήθως με μεμβράνες διαφόρων ειδών με τη βοήθεια αντλιών ρόφησης. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα είναι ότι με τη διαδικασία αυτή συλλέγονται και τα κύτταρα με χαμηλή

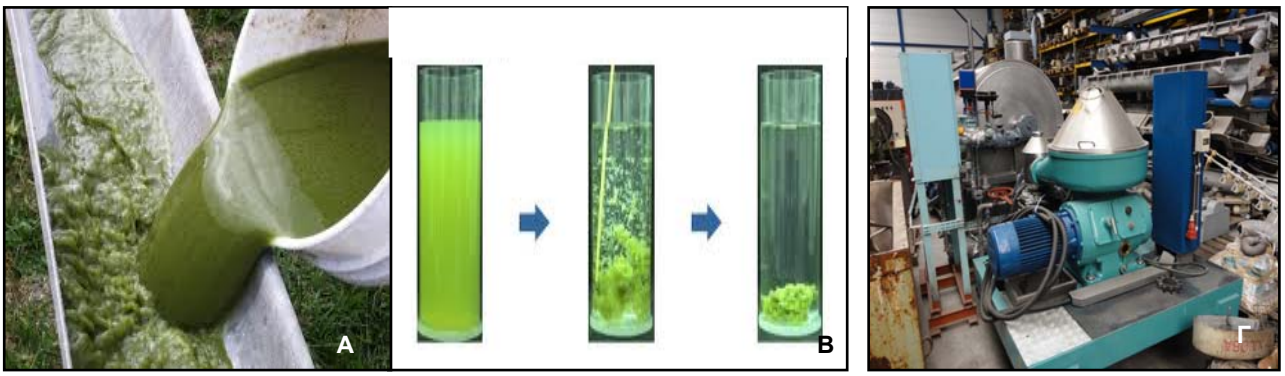
πυκνότητα. Ωστόσο, διάφορα προβλήματα, όπως η απόφραξη των ηθμών, η εύρεση κατάλληλου μεγέθους πόρων, η ικανότητα ανάκτησης της κυτταρικής μάζας και οι απαιτήσεις ξεπλυμάτων, αποτελούν τα βασικά μειονεκτήματα της μεθόδου μέχρι σήμερα.

Η φυγοκέντρηση είναι μία μέθοδος, κατά την οποία τα κύτταρα συσσωρεύονται στον πυθμένα. Το βασικότερο μειονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι το μεγάλο κόστος λειτουργίας των φυγοκέντρων καθώς μεγάλες ποσότητες νερού και καλλιεργειών θα πρέπει να φυγοκεντρούνται καθημερινά. Ωστόσο, σε μεγάλες βιομηχανικές εγκαταστάσεις μακροπρόθεσμα υπάρχει απόσβεση του κόστους.

Η κροκίδωση είναι μια τεχνική κατά την οποία στην καλλιέργεια προστίθενται ειδικές κροκιδωτικές ουσίες που αυξάνουν το μέγεθος των κυτταρικών συσσωματωμάτων. Η κροκίδωση ακολουθείται συνήθως από καθίζηση ή επίπλευση.

1.2.3.2 Εξαγωγή λιπιδίων από τη βιομάζα των μικροφυκών

Η επεξεργασία της βιομάζας για την εξαγωγή των επιθυμητών λιπιδίων είναι ένας βασικός οικονομικός περιορισμός στην παραγωγή χαμηλού κόστους βιοκαυσίμων αλλά και άλλων προϊόντων (β-καροτένιο, πολυσακχαρίτες). Η διαδικασία που εφαρμόζεται κάθε φορά για την επεξεργασία της βιομάζας εξαρτάται σχεδόν απόλυτα από το επιθυμητό προϊόν.



Εικόνα 1.23. Μέθοδοι συλλογής βιομάζας μικροφυκών και κυανοβακτηρίων (Α) Διήθηση: Η καλλιέργεια συλλέγεται σε δοχεία και στη συνέχεια διηθείται σε φίλτρα ορισμένων διαστάσεων πόρων ανάλογα με το είδος και το μέγεθος των κυττάρων του μικροφύκους που καλλιεργείται, (Β) Κροκκίδωση ακολουθούμενη από καθίζηση: Γίνεται χρήση ειδικών κροκκιδωτικών ουσιών οι οποίες αυξάνουν το μέγεθος των κυτταρικών συσσωματωμάτων με αποτέλεσμα να αυξάνεται το βάρος τους και να καθιζάνον στον πυθμένα και (Γ) Φυγοκέντρηση: Η καλλιέργεια συλλέγεται και τοποθετείται σε φυγοκεντρικούς σωλήνες κατάλληλους για τη φυγόκεντρο που χρησιμοποιείται .

Τις περισσότερες φορές εφαρμόζεται αφυδάτωση της βιομάζας που αυξάνει τη διάρκεια ζωής της αλλά και του τελικού προϊόντος. Πολλές μέθοδοι εφαρμόζονται για την ξήρανση μικροφυκών και κυανοβακτηρίων μεταξύ των οποίων ξήρανση με ψεκασμό, λυοφιλίωση και ξήρανση στον ήλιο (Richmond, 2004).

Μετά την ξήρανση ακολουθεί η διάρρηξη των κυττάρων για την απελευθέρωση των επιθυμητών ουσιών. Διαφορετικές μέθοδοι μπορούν να εφαρμοστούν και εδώ ανάλογα με τη μορφολογία του μικροοργανισμού, τη φύση του προϊόντος και περιλαμβάνουν μηχανική επίδραση (ομογενοποιητές, μύλους άλεσης, υπερήχους, ψεκαστήρες) και μη μηχανική επίδραση (ψύξη, οργανικοί διαλύτες, οσμωτική καταπόνηση, αντιδράσεις με ένζυμα) (Mata et al., 2010) (Πίνακας 1.7).

Η ομογενοποίηση περιλαμβάνει την εφαρμογή πίεσης για τη διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος, με σκοπό την ανάκτηση των λιπιδίων μέσα από τα κύτταρα. Η άλεση από την άλλη πλευρά χρησιμοποιεί μηχανισμούς άλεσης και έντονης ανάδευσης ώστε να σπάσουν τα κύτταρα. Αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούνται συνήθως συνδυαστικά με χρήση διαλυτών για την εκχύλιση των λιπιδίων.

Η παραγωγή βιοντίζελ επιτυγχάνεται με την εξαγωγή των λιπιδίων και των λιπαρών οξέων από τη βιομάζα. Όσον αφορά τα λιπίδια, η εξαγωγή με διαλύτες είναι η πιο συνηθισμένη και πραγματοποιείται κατευθείαν από την ξηρή βιομάζα, αποτελώντας μια γρήγορη και αποτελεσματική μέθοδο εξαγωγής. Διάφοροι διαλύτες χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτό , όπως εξάνιο (96%), μίγμα εξανίου-αιθανόλης (96%), με έως και 98% εξαγωγή καθαρών λιπαρών οξέων (Richmond, 2004). Παρότι η αιθανόλη είναι ένας καλός διαλύτης, μπορεί να οδηγήσει σε εξαγωγή ανεπιθύμητων ουσιών, όπως σάκχαρα, αμινοξέα, άλατα και υδροφοβικές πρωτεΐνες, κάτι που πρέπει να αποφεύγεται όταν ο σκοπός είναι η εξαγωγή λιπιδίων, και για τον λόγο αυτό έχει αντικατασταθεί από τη μεθανόλη.

Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ένζυμα για την υδρόλυση των κυτταρικών τοιχωμάτων και την απελευθέρωση των λιπιδίων σε κατάλληλο διαλύτη. Η χρήση ενζύμων είναι μια επιλογή συγχρόνως ασφαλής και φιλική προς το περιβάλλον. Ωστόσο, υπάρχει η πρόκληση πως για να σχεδιαστεί η κατάλληλη ενζυμική διεργασία για την υδρόλυση των κυττάρων, είναι απαραίτητο να καθοριστεί η σύσταση των κυττάρων που βρίσκονται υπό επεξεργασία κάθε φορά Παράλληλη χρήση ενζύμων με

μια φυσική μέθοδο όπως οι υπέρηχοι, δίνει τη δυνατότητα ταχύτερης εκχύλισης λιπιδίων και με υψηλότερες αποδόσεις (Mercer and Armenta, 2011).

Πίνακας 1.7. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των πιο γνωστών μεθόδων για εξαγωγή λιπιδίων από μικροφύκη (Mercer and Armenta, 2011).

Μέθοδος Εξαγωγής	Πλεονεκτήματα	Περιορισμοί
Πίεση	Ευκολία στη χρήση, απουσία διαλυτών	Απαιτείται μεγάλη ποσότητα δείγματος, αργή διαδικασία
Εκχύλιση με διαλύτες	Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι σχετικά φθηνοί	Οι περισσότεροι διαλύτες είναι άκρως εύφλεκτοι και/ή τοξικοί, απαιτείται μεγάλη ποσότητα διαλύτη
Εξαγωγή με υπερκρίσιμα ρευστά (CO_2)	Μη-τοξικά κατάλοιπα, μη-εύφλεκτα ρευστά και εύκολος χειρισμός	Υψηλή κατανάλωση ρεύματος, ακριβή διαδικασία και δύσκολα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανικό επίπεδο
Υπέρηχοι	Μείωση του χρόνου εξαγωγής των λιπιδίων, μείωση της κατανάλωσης διαλυτών, μεγαλύτερη διείσδυση των δ/των	Υψηλή κατανάλωση ρεύματος, ακριβή διαδικασία και δύσκολα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανικό επίπεδο

Η χρήση υπερήχων μπορεί να ενισχύσει την εκχύλιση μέσω μιας διαδικασίας που λέγεται σπηλαίωση. Τα κύματα των υπερήχων δημιουργούν φυσαλίδες στο διαλύτη, οι φυσαλίδες «σκάνε» πολύ κοντά στα κυτταρικά τοιχώματα των μικροφυκών ασκώντας πίεση με αποτέλεσμα τα συστατικά που βρίσκονται μέσα στο κύτταρο να διαχέονται στο διαλύτη (Cravotto et al., 2008, Wei et al., 2008).

Οι Cravotto και συνεργάτες (2008) δοκίμασαν την εξαγωγή λιπιδίων με υπερήχους και βρήκαν πως ο χρόνος εξαγωγής μειωνόταν και τα ποσοστά παραγωγής λιπιδίων αυξάνονταν κατά 50-500 % με χαμηλά κόστη και ελάχιστη αύξηση της τοξικότητας του τελικού προϊόντος. Ειδικά σε περιπτώσεις στελεχών με πολύ σκληρό κυτταρικό τοίχωμα, όπως το *Crypthecodinium cohnii,* η χρήση υπερήχων για σπάσιμο του κυτταρικού τοιχώματος δούλεψε πολύ καλύτερα και η παραγωγή λιπιδίων αυξήθηκε από το 4,8% (με χρήση διαλύτη) στο 25,9% (Mata et al., 2010).

Μια νέα τεχνολογία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην εξαγωγή λιπιδίων από τα κύτταρα μικροοργανισμών, είναι η χρήση Παλμικού Ηλεκτρικού Πεδίου (pulsed electric field, PEF), με την οποία τα κύτταρα εκτίθενται σε σύντομους παλμούς ενός ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου. Οι ηλεκτρικοί παλμοί διαπερνούν το κυτταρικό τοίχωμα ενισχύοντας τη μεταφορά μάζας μέσα από τις κυτταρικές μεμβράνες. Το γεγονός αυτό

καθιστά την τεχνολογία αυτή ως μια πολλά υποσχόμενη προεργασία πριν τη χρήση διαλυτών ή μηχανικών μεθόδων εξαγωγής λιπιδίων (Guderjan et al., 2005, Guderjan et al., 2007). Η διεργασία αυτή είναι μη θερμική και έχει χρησιμοποιηθεί στην εξαγωγή ελαίων από ελαιοκράμβη, ελιές, σόγια και άλλα φυτά (Guderjan et al., 2007).

1.3 Βασικά χαρακτηριστικά του παραγόμενου βιοντίζελ

Το παραγόμενο από μικροφύκη βιοντίζελ, για να είναι αποδεκτό από την αγορά πρέπει να ανταποκρίνεται σε συγκεκριμένες προδιαγραφές. Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής οι προδιαγραφές για το βιοντίζελ ορίζονται από το πρότυπο ASTM Biodiesel Standard D 6751 (Knothe, 2006). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, υπάρχουν ξεχωριστά πρότυπα για το βιοντίζελ που προορίζεται για αυτοκίνητα (Standard EN 14214) και για θέρμανση (Standard EN 14213).

Τα λιπίδια που προέρχονται από μικροφύκη διαφέρουν σε σχέση με αυτά από τα φυτικά έλαια στο ότι είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με τέσσερις ή και παραπάνω δεσμούς (Belarbi et al., 2000). Το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA, C20:5n-3, πέντε διπλούς δεσμούς) συμπεριλαμβάνεται στα πιο κοινά λιπίδια που παράγονται από μικροφύκη. Τα λιπαρά οξέα και οι μεθυλεστέρες με 4 ή και παραπάνω διπλούς δεσμούς είναι επιρρεπή στην οξείδωση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και αυτό μειώνει την καταλληλότητά τους για βιοντίζελ. Κάποια φυτικά έλαια παρουσιάζουν επίσης το ίδιο πρόβλημα. Φυτικά έλαια όπως το ολεϊκό έλαιο της κάνουλα, περιέχει μεγάλες ποσότητες λινολεϊκού και λινολενικού οξέος τα οποία έχουν 2 και 3 διπλούς δεσμούς αντίστοιχα. Παρόλο που τα λιπαρά αυτά οξέα έχουν μεγάλη οξειδωτική σταθερότητα σε σχέση με το εικοσαπεντανοϊκό οξύ, το Ευρωπαϊό πρότυπο Standard EN 14214 περιορίζει τη χρήση τους σε βιοντίζελ κίνησης στο 12% (mol). Τέτοιοι περιορισμοί δεν υφίστανται στη χρήση του βιοντίζελ που προορίζεται για θέρμανση. Επιπρόσθετα, τα Ευρωπαϊκά πρότυπα περιορίζουν την περιεκτικότητα σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων με 4 ή και περισσότερους διπλούς δεσμούς στο 1% (mol).

1.4 Πρόσθετες εφαρμογές της βιομάζας των μικροφυκών και κυανοβακτηρίων

Η εμπορική χρήση των μικροφυκών ανάγεται σε μια μεγάλη ποικιλία χρήσεων αλλά και αποθέματος πρώτων υλών. Υπολογίζεται πως υπάρχουν μερικά εκατομμύρια είδη μικροφυκών εν αντιθέσει τα περίπου 250.000 είδη φυτών (Norton et al., 1996). Η εμπορική μεγάλης κλίμακας παραγωγή μικροφυκών ξεκίνησε το 1960 στην Ιαπωνία με

την καλλιέργεια της *Chlorella* ως συμπλήρωμα διατροφής και συνεχίστηκε το 1970 και 1980 με εξαγωγές σε όλο τον κόσμο (Pultz and Scheinbenbogan, 1998, Spolaore et al., 2006). Το 2004 η βιομηχανία μικροφυκών αναπτύχθηκε με αποτέλεσμα να παράγονται 7.000 τόνοι ξηρής βιομάζας / έτος (Pulz et al., 2004).

1.4.1 Η βιομάζα μικροφυκών και κυανοβακτηρίων στην ανθρώπινη διατροφή

Η κατανάλωση μικροφυκών από ανθρώπους περιορίζεται σε λίγα είδη εξαιτίας των αυστηρών κανονισμών ασφάλειας (Pulz et al., 2004), των εμπορικών παραγόντων και την αγορά. Τα μικροφύκη *Chlorella, Spirulina Dunaliella* κυριαρχούν στην αγορά. Η βιομάζα των μικροφυκών πωλείται σε μορφή ταμπλέτας ή ως πρόσθετο. Το 2003, η καταγεγραμμένη παραγωγή *Chlorella,* η οποία διαθέτει υψηλή θρεπτική αξία, ήταν 2.000 τόνοι ετησίως. Το στέλεχος αυτό χρησιμοποιείται επίσης στη φαρμακοβιομηχανία καθώς εμφανίζει αντιφλεγμονώδεις δράσεις και προάγει την ανάπτυξη του γαστρεντερικού λακτοβάκιλλου (Yamaguchi, 1996).

1.4.2 Η βιομάζα μικροφυκών και κυανοβακτηρίων σε ζωοτροφές και στις υδατοκαλλιέργειες

Συγκεκριμένα στελέχη μικροφυκών είναι κατάλληλα για την παραγωγή συμπληρωμάτων ζωοτροφών. Στελέχη όπως, *Chlorella, Scendesmus* και *Spirulina,* έχουν ευεργετική επίδραση συμπεριλαμβανομένων της βελτιωμένης ανοσοποιητικής απόκρισης των ζώων, βελτιωμένη γονιμότητα, καλύτερο έλεγχο βάρους, πιο υγιές δέρμα και τρίχωμα (Pulz et al., 2004). Παρόλα αυτά, παρατεταμένη πρόσληψη αυτών των συμπληρωμάτων σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορεί να έχει αρνητικά αποτελέσματα ειδικά όσον αφορά τα κυανοβακτήρια (Spolaore et al., 2006).

Τα φύκη είναι η φυσική πηγή τροφής για πολλά είδη ιχθυοκαλλιεργειών. Οι βασικές εφαρμογές της βιομάζας των φυκών είναι παροχή βασικών θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξη των ψαριών, ο χρωματισμός των σολωμών που αναπτύσσονται σε υδατοκαλλιέργειες, η σταθεροποίηση και βελτίωση της ποιότητας του θρεπτικού υποστρώματος και η ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος των ψαριών (Brenann and Owende, 2009).

Πίνακας 1.8. Παραγωγή μικροφυκών παγκοσμίως. (τ.Ξ.Β= τόνοι ξηρής βιομάζας, DHA= δωδεκανοϊκό οξύ) (Brenann and Owende, 2009).

Μικροφύκη	Ετήσια παραγωγή	Χώρα παραγωγής	Εφαρμογή και προϊόν
Spirulina sp.	3.000 τ.Ξ.Β.	Κίνα, Ινδία, Ιαπωνία	Ανθρώπινη διατροφή Ζωοτροφές Καλλυντικά
Chlorella sp.	2.000 τ.Ξ.Β.	Ταϊβάν, Γερμανία, Ιαπωνία	Ανθρώπινη διατροφή Καλλυντικά Υδατοκαλλιέργειες
Dunaliella salina	1.200 τ.Ξ.Β.	ΗΠΑ	Καλλυντικά Ανθρώπινη διατροφή β- Καροτένια
Aphanizomenon flos-aquae	500 τ.Ξ.Β.	ΗΠΑ, Ινδία.	Ανθρώπινη διατροφή
Haematococcus pluvialis	300 τ.Ξ.Β.	ΗΠΑ	Υδατοκαλλιέργειες Ασταξανθίνη
Crypthecodinium cohnii	240 τ. DHA	ΗΠΑ	DHA

1.4.3 Η βιομάζα μικροφυκών και κυανοβακτηρίων σε βιο-λίπασμα

Κάποιες τεχνολογίες επεξεργασίας της βιομάζας των μικροφυκών και κυρίως η πυρόλυση, οδηγούν στο σχηματισμό ενός στερεού υπολοίπου που ονομάζεται «βιοστάχτη», και έχει τη δυνατότητα εφαρμογής στη γεωργία ως βιολίπασμα, (Lehmann et al., 2006, Lal, 2008). Έχουν πραγματοποιηθεί επιτυχημένες δοκιμές χρήσης κυανοβακτηρίων (*Nostoc spongiaeformae, Calothrix marchica, Stigonema)* ως αζωτούχο λίπασμα σε καλλιέργειες HYV ρυζιού στην Ινδία. Επίσης έχει πραγματοποιηθεί δοκιμή λίπανσης καλλιέργειας καλαμποκιού με βιομάζα μικροφυκών με πολύ καλά αποτελέσματα στην ανάπτυξη των φυτών.

1.4.4 Παραγωγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και πρωτεϊνών από τη βιομάζα μικροφυκών και κυανοβακτηρίων

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) είναι απαραίτητα για την ανθρώπινη ανάπτυξη και φυσιολογία (Hu et al., 2008). Μεταξύ άλλων, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα συμβάλλουν στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων (Ruxton et al., 2007). Η βασική πηγή των PUFA ήταν μέχρι πρόσφατα τα ψάρια και τα ιχθυέλαια, αλλά η εφαρμογή τους ως διατροφικό πρόσθετο είναι περιορισμένη εξαιτίας της πιθανής συσσώρευσης τοξινών, της οσμής, της δυσάρεστης γεύσης και της παρουσίας διάφορων λιπαρών οξέων.

Τα μικροφύκη είναι μια πρωταρχική πηγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και τροφοδοτούν ολόκληρες τροφικές αλυσίδες καθώς τα ανώτερα φυτά και τα ζώα δεν έχουν τα κατάλληλα ένζυμα για τη σύνθεση των PUFA. Αυτή τη στιγμή το δωδεκαεξαενικό οξύ είναι το μόνο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ που είναι εμπορικά διαθέσιμο καθώς τα εκχυλίσματα των μικροφυκών δεν αποτελούν ακόμα ανταγωνιστικές πηγές εικοσαπεντανοϊκού, λινολενικού και αραχιδικού οξέος (Spolaore et al., 2006).

Τα εκχυλίσματα της βιομάζας των μικροφυκών περιέχουν επίσης σημαντικές πρωτεΐνες όπως β-καροτένιο, ασταξανθίνη και φυκοκυανίνη. Το καροτένιο έχει ευρύ φάσμα εφαρμογών. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως χρωστική σε τρόφιμα, ως πηγή βιταμίνης Α και ως πρόσθετο σε καλλυντικά. Η ασταξανθίνη βρίσκει εφαρμογές στη φαρμακευτική, στα καλλυντικά και στη βιομηχανία τροφίμων και ζωοτροφών.

1.5 ΣΚΟΠΟΣ

Η αναζήτηση νέων πηγών ενέργειας, είναι ένα παγκόσμιο φαινόμενο που έχει τραβήξει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, καθώς η ενεργειακή ζήτηση αυξάνεται και τα αποθέματα ορυκτών καυσίμων είτε μειώνονται, είτε λόγω γεωπολιτικών αναταράξεων η τιμή τους αυξάνεται. Η παραγωγή του βιοντίζελ δεύτερης γενιάς, που έδωσε μια λύση στο ενεργειακό ζήτημα κυρίως στον τομέα των μεταφορών, γινόταν από ελαιώδους καρπούς και ερχόταν σε ανταγωνισμό με τη βιομηχανία τροφίμων.

Τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα μικροφύκη και κυανοβακτήρια ως πρώτη ύλη για παραγωγή βιοντίζελ, τα οποία βρίσκονται σε αφθονία σε όλα σχεδόν τα οικοσυστήματα, μπορούν να αναπτυχθούν σε οποιαδήποτε περιοχή και η ανάπτυξή τους δεν ανταγωνίζεται τη βιομηχανία τροφίμων. Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες για διάφορα στελέχη μικροφυκών και κυανοβακτηρίων ώστε να αναπτυχθούν οικονομικά συστήματα ανάπτυξής τους με σκοπό την εξαγωγή λιπιδίων που θα μετατραπούν σε βιοντίζελ.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η απομόνωση μικροφυκών και κυανοβακτηρίων από Ελληνικά οικοσυστήματα και η διερεύνηση της ικανότητάς τους να παράγουν λιπίδια κατάλληλα για παραγωγή βιοντίζελ. Για τον σκοπό αυτό απομονώθηκαν, με κλασσικές μικροβιολογικές τεχνικές, μικροφύκη και κυανοβακτήρια από τρία διαφορετικά ιδιάζοντα οικοσυστήματα: τα μνημεία της Ακρόπολης, την περιοχή του Ασπρόπυργου και τη λίμνη Κορώνεια.

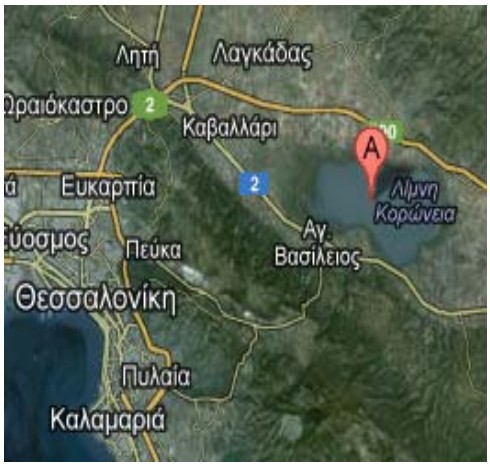
Αρχικά έγινε μελέτη της παραγωγής βιομάζας από όλα τα απομονωμένα στελέχη, με σκοπό να επιλεγούν τα μικροφύκη και κυανοβακτήρια με τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας από κάθε εξεταζόμενη περιοχή. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη της φυσιολογίας των επιλεγμένων στελεχών σε διάφορες συνθήκες ανάπτυξης και σε διαφορετικά συστήματα καλλιεργειών, κλειστά και ανοιχτά. Παράλληλα έγινε ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση των παραγόμενων λιπιδίων από τα μελετούμενα στελέχη.

Επιλέχθηκαν τελικά δύο στελέχη μικροφυκών τα οποία παρουσίασαν τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων. Τα στελέχη αυτά αναπτύχθηκαν σε καλλιέργειες ημι-πιλοτικής κλίμακας χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό υπόστρωμα θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με ιχνοστοιχεία. Οι καλλιέργειες αυτές είχαν διάρκεια τρεις μήνες και πραγματοποιήθηκαν με στόχο τη μέγιστη δυνατή παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων και τον προσδιορισμό της αντοχής των μικροοργανισμών σε καλλιέργειες μεγάλης διάρκειας σε ανοιχτό σύστημα καλλιέργειας.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

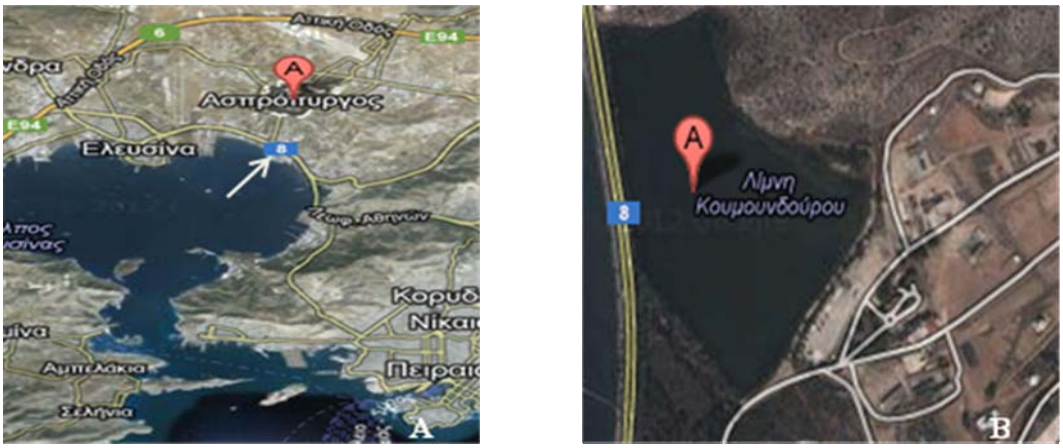
2.1 Μικροοργανισμοί

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μικροφύκη και κυανοβακτήρια που από την Τράπεζα Στελεχών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του ΕΚΠΑ, τα οποία είχαν απομονωθεί από τα μνημεία της Ακρόπολης στα πλαίσια προηγούμενης μελέτης (Lamprinou et al., 2013).

A B 

Εικόνα 2.1. Περιοχές προέλευσης των εργαστηριακών δειγμάτων από όπου απομονώθηκαν μικροφύκη και κυανοβακτήρια, (Α) Μνημεία της Ακρόπολης και (Β) Λίμνη Κορώνεια.

Επίσης πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες από την παράκτια περιοχή του Ασπρόπυργου και τη λίμνη Κουμουνδούρου τον Αύγουστο του 2012 με σκοπό να απομονωθούν μικροφύκη και κυανοβακτήρια. Επιλέχθηκαν τέσσερις θέσεις δειγματοληψίας από τη λίμνη Κουμουνδούρου, δύο σημεία στις εκβολές και δύο σημεία μέσα στη λίμνη με απόσταση περίπου 15 μέτρα το ένα από άλλο. Από κάθε επιλεγμένη θέση δειγματοληψίας συλλέχθηκε όγκος δείγματος ενός λίτρου σε ειδικά αποστειρωμένα δοχεία. Ακόμη συλλέχθηκαν δείγματα από βράχια και τη θάλασσα στην παράκτια περιοχή της θάλασσας του Ασπρόπυργου με απόξεση. Μικροφύκη και κυανοβακτήρια απομονώθηκαν και από δείγματα που προήλθαν από τη λίμνη Κορώνεια από τον αρμόδιο Φορέα Διαχείρισης, τα οποία ανέλαβε το Εργαστήριο Μικροβιολογίας για ανάλυση.



Εικόνα 2.2. Περιοχές δειγματοληψίας, (Α) Παράκτια περιοχή Ασπρόπυργου και (Β) Λίμνη Κουμουνδούρου.

Οι κωδικοί που χρησιμοποιήθηκαν για την ονομασία των μικροβιακών στελεχών προέκψαν από την ονομασία της περιοχής από την οποία απομονώθηκαν. Έτσι για τα στελέχη της Ακρόπολης χρησιμοποιήθηκαν οι κωδικοί ΑΚΑ και ΑΚΒ συνοδευόμενοι από τον αύξοντα αριθμό των απομονωμένων στελεχών, καθώς προήλθαν από δύο διαφορετικές δειγματοληψίες. Για τα μικροφύκη της Κορώνεια χρησιμοποιήθηκε ο κωδικός ΚΟΡΜ συνοδευόμενος από τον αύξοντα αριθμό των απομονωμένων στελεχών. Για τα μικροφύκη και κυανοβακτήρια που απομονώθηκαν από τη λίμνη Κουμουνδούρου χρησιμοποιήθηκαν οι κωδικοί ΑΣΠ και ΑΣΚ αντίστοιχα, ενώ για τα μικροφύκη από τη θάλασσα του Ασπρόπυργου οι κωδικοί ΑΟ και ΑΣΘ.

2.2 Επεξεργασία δειγμάτων

Τα δείγματα αρχικά διηθήθηκαν υπό κενό μέσω ηθμών Whatmann με διάμετρο πόρων 0,8 mm, 0,45 mm και 0,2 mm. Για την απομόνωση μικροφυκών και κυανοβακτηρίων από τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε ένα πρωτόκολλο διαδοχικών ξεπλυμάτων (Kumar et al., 2012). Από κάθε δείγμα 10 ml αναμίχθηκαν με απιονισμένο νερό, ακολούθησε έντονη ανάδευση για 1` σε vortex, φυγοκέντρηση στα 12.000 rpm και απόρριψη του υπερκείμενου. Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες τέσσερις φορές για απομάκρυνση όσο το δυνατόν περισσότερων βακτηρίων. Αφού ολοκληρώθηκαν τα ξεπλύματα, ακολούθησε επίστρωση των μικροφυκών σε τρυβλία με κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα με τη μέθοδο διαδοχικών αραιώσεων (αραιώσεις από 10^{-1} – 10^{-9}).

Τα τρυβλία επωάστηκαν σε θάλαμο με διαρκή φωτισμό, θερμοκρασία 25±1 ^{o}C μέχρι να αναπτυχθούν οι μικροοργανισμοί.

2.3 Μορφολογική ανάλυση μικροφυκών και κυανοβακτηρίων

Με χρήση της Οπτικής Μικροσκοπίας (Photomicroscope III Zeiss German), τα απομονωμένα μικροφύκη και κυανοβακτήρια φωτογραφήθηκαν και προσδιορίστηκαν οι διαστάσεις τους. Μέσω σύγκρισης των εικόνων αυτών με τη συλλογή φωτογραφιών της τράπεζας στελεχών (Culture Collection of the Center of Algology, CCALA) του Ινστιτούτου Βοτανικής της Ακαδημίας Επιστημών της Τσεχίας στο κέντρο Φυκολογίας, πραγματοποιήθηκε φαινοτυπική ταυτοποίηση όλων σχεδόν των απομονωμένων μικροοργανισμών. Η ταυτοποίηση των απομονωμένων μικροοργανισμών ήταν απαραίτητη για την επιλογή των μικροφυκών και κυανοβακτηρίων που θα μελετούνταν ως προς την ικανότητά τους να παράγουν λιπίδια κατάλληλα για βιοντίζελ, καθώς κάθε είδος μικροφύκους και κυανοβακτηρίου παρουσιάζει διαφορετικές ιδιότητες και χαρακτηριστικά.

2.4 Γενετική ανάλυση μικροφυκών και κυανοβακτηρίων

Τα στελέχη που παρουσίασαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και επιλέχτηκαν για εκτενέστερη μελέτη ταυτοποιήθηκαν και μοριακά. Πραγματοποιήθηκε αρχικά εξαγωγή του ολικού τους γενετικού υλικού (DNA) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR) αλληλούχησης των προϊόντων των αντιδράσεων αυτών.

2.4.1 Εκχύλιση DNA μικροφυκών

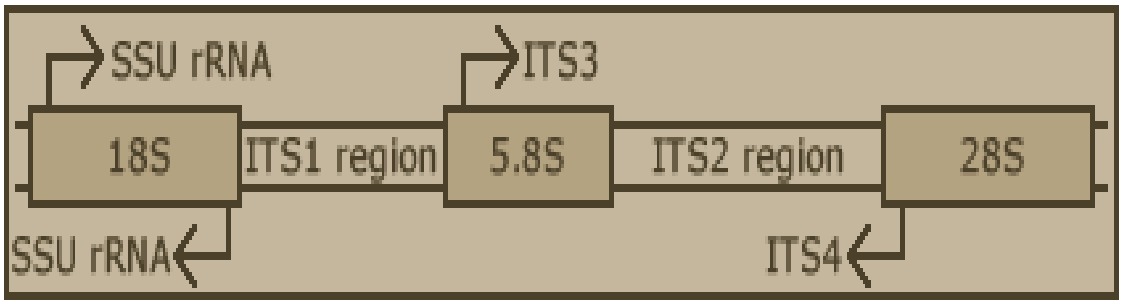
Η εκχύλιση του DNA των μικροφυκών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο CTAB (Lindstrom and Louis, 2005, Àlvarez, 2006). Για κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκε συλλογή βιομάζας σε φυγοκεντρικούς σωλήνες (eppendorf) με διάλυμα Ringer. Στη συνέχεια προστέθηκαν 500 ml CTAB extraction buffer και πραγματοποιήθηκε επώαση για μία ώρα στους 65 ^{o}C. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 10 min στις 13000 g και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα των 1,5 ml. Έπειτα προστέθηκαν 200 μl διάλυμα χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (1:4) και ακολούθησε ανάδευση για 30 sec. Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 12000 rpm και η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα.

Έπειτα προστέθηκαν δύο όγκοι CTAB precipitation solution, έγινε ανάμιξη και ακολούθησε επώαση για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 13000 rpm και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Ακολούθησε προσθήκη 350 μl NaCl (0,1 M) και επώαση 10 min στους 65 ^{o}C. Μετά την πάροδο των 10 min, προστέθηκαν 350 μl διαλύματος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (1:4) και ακολούθησε ανάδευση για 30 sec. Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 12000 rpm και η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα, όπου προστέθηκε όγκος ισοπροπανόλης 0,8 φορές του όγκου της υδατικής φάσης και πραγματοποίηθηκε επώαση για 15 min. Ακολούθησε ξανά φυγοκέντρηση για 10 min στις 12000 rpm και απόρριψη του υπερκείμενου. Έπειτα πραγματοποιήθηκε δύο φορές ξέπλυμα με αιθανόλη 70% και φυγοκέντρηση για 10 min στις 12 rpm. Τέλος το DNA επωάστηκε στους 45 ^{o}C για πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης και στο τέλος επαναδιαλύθηκε σε 100 μl δις-απιονισμένο νερό.

Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο πρωτόκολλο αυτό ήταν: CTAB extraction buffer solution (Lindstrom, 2005): CTAB (20 g/l), NaCl (1,4 mol/l), TRIS-base/HCL (0,1 mol/l), Na_2-EDTA (20 mmol/l) (Lindstrom and Hanic, 2005) και CTAB precipitation solution (Lindstrom, 2005): CTAB (5 g/l), NaCl (0,04 mol/l).

2.4.1.1 Αντίδραση PCR για την ενίσχυση του 18S rRNA γονιδίου των μικροφυκών

Οι αντιδράσεις PCR για την ενίσχυση του 18S rRNA των μικροφυκών πραγματοποιήθηκαν με τα εκκινητικά μόρια: EK82f(5`-GAAACTGCGAATGGCTC-3`) και Proto5r (5`-GACGGGCGGTGTGTAC-3`) (Auinger et al.,2008) και Taq πολυμεράση της εταιρείας Fermentas (dream Taq). Το πρόγραμμα PCR ήταν το ακόλουθο: 5 min στους 94 ^{o}C, 1 min στους 94 ^{o}C, 1 min 60 ^{o}C, 2 min στους 72 ^{o}C και 5 min στους 72 ^{o}C και περιλάμβανε 35 κύκλους. Τελικά, τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στα 80 mA για 20 λεπτά και ακολούθησε παρατήρηση και φωτογράφηση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

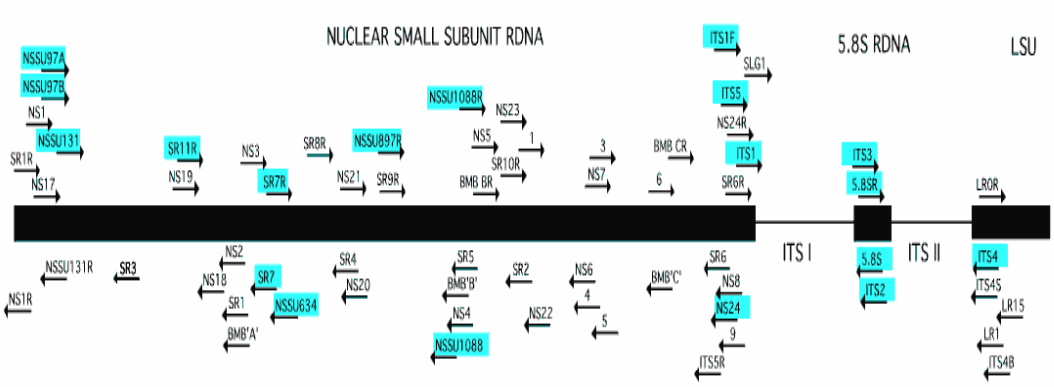


Εικόνα 2.4. Απεικόνιση της ριβοσωμικής περιοχής (18s small subunit (SSU) regions) των μικροφυκών και των περιοχών που ενισχύουν τα εκκινητικά μόρια EK82f και Proto5r.

2.4.1.2 Αντίδραση PCR για την ενίσχυση της ITS περιοχής του γονιδιώματος των μικροφυκών

Η ITS PCR ενισχύει περιοχές ανάμεσα στα γονίδια 18S rDNA και 28S rDNA (Hejazi et al., 2010). Οι αλληλουχίες των ITS περιοχών χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη γενετικής ομοιότητας και μελέτη φυλογένεσης των μικροφυκών (Coleman et al., 1994, Coleman and Mai, 1997, Gonzales et al., 1999). Ένα βασικό πλεονέκτημα της ITS PCR είναι πως τα προϊόντα της αντίδρασης που δίνουν τις ίδιες ζώνες στο πήκτωμα αγαρόζης ανήκουν σε στελέχη του ίδιου είδους. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να γίνει ένας εύκολος διαχωρισμός των διαφορετικών στελεχών.

Η ITS PCR πραγματοποιήθηκε με τα εκκινητικά μόρια ITS1 (5`- TCC GTA GGT GAA CT GCG G- 3`), ITS4 (5`- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC- 3`) και η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Biotools.



Εικόνα 2.5. Απεικόνιση της ριβοσωμικής περιοχής (18S Internal Transcribed Spaces (ITS) regions, 5,8s, 25-28s) των μικροφυκών και των περιοχών που ενισχύουν τα εκκινητικά μόρια ITS1, ITS4.

Το πρόγραμμα PCR για το ζεύγος εκκινητικών μορίων ITS1, ITS4 ήταν το ακόλουθο: 5 min στους 94 ^{o}C, 1 min στους 94 ^{o}C, 30 sec στους 60 ^{o}C, 1 min 72 ^{o}C, 5` στους 72 ^{o}C και περιλάμβανε 35 κύκλους. Τελικά, τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1 % στα 80 mA για 30 min και ακολούθησε παρατήρηση και φωτογράφηση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

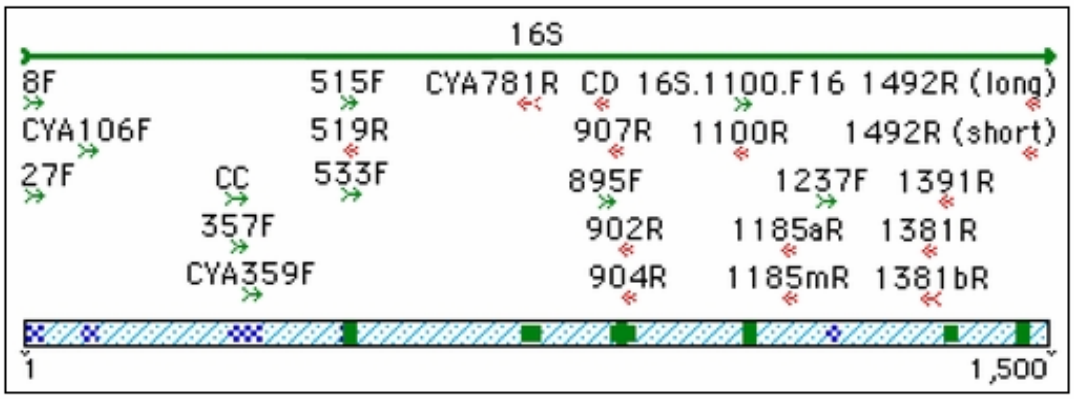
2.4.2 Εκχύλιση DNA κυανοβακτηρίων

Η εκχύλιση του ολικού DNA των κυανοβακτηρίων πραγματοποιήθηκε με το τροποποιημένο πρωτόκολλο φαινόλης – χλωροφορμίου κατάλληλο για κυανοβακτήρια. Για κάθε δείγμα συλλέχθηκαν αρχικά 2 ml, φυγοκεντρήθηκαν και παραλήφθηκε η βιομάζα. Στη συνέχεια προστέθηκαν 500 μl TES, έγινε ανάδευση σε vortex και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 min στις 12000 rpm. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και προστέθηκαν 100 μl TES και 20 μl διαλύματος λυσοζύμης και ακολούθησε επώαση για μία ώρα στους 37 ^{o}C. Μετά την πάροδο της μίας ώρας, προστέθηκαν 25 μl διαλύματος sarkosyl, έγινε ελαφρά ανάδευση με το χέρι και ακολούθησε επώαση για 30 min στους 55 ^{o}C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μl φαινόλης και έγινε έντονη ανάδευση με vortex μέχρι να σχηματιστεί γαλάκτωμα. Το γαλάκτωμα φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 12000 rpm και η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα όπου προστέθηκαν 200 μl χλωροφόρμιο και ακολούθησε ανάδευση για 5 min μέχρι το σχηματισμό γαλακτώματος. Το γαλάκτωμα φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 12000 rpm και η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα. Ακολούθησε επώαση για 30 min στους 37 ^{o}C. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη 1/10 του όγκου σε CH_3COONa και 0,6 του όγκου σε ισοπροπανόλη και το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 3 min στις 12000 rpm (x2). Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε προσεκτικά και ακολούθησαν 2 ξεπλύματα μα αιθανόλη που σθνοδεύονταν από φυγοκεντρήσεις 2 min στις 12000 rpm. Τέλος η αιθανόλη απομακρύνθηκε με θέρμανση στους 45 ^{o}C και το DNA επαναδιαλύθηκε σε 50 μl $T_{10}E_1$.

Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση DNA των κυανοβακτηρίων ήταν η ακόλουθη: Διάλυμα sarkosyl: 10% sarkosyl σε απιονισμένο νερό, Διάλυμα CH_3COONa: διάλυμα 3M CH_3COONa, Διάλυμα $T_{10}E_{15}$: 10 mM Tris, Διάλυμα TES: 10 mM Tris (pH 8), 25 mM EDTA pH=8, 500 mM NaCl

2.4.2.1 Αντίδραση PCR για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των κυανοβακτηρίων

Οι αντιδράσεις PCR των κυανοβακτηρίων πραγματοποιήθηκαν με τα εκκινητικά μόρια: cya 781R(5`- GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T- 3`), cya 359F(5`- GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG- 3`) και cya 106F (5`- CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCG G.... TGA-3`) για την ενίσχυση του 16S rDNA (Boutte et al., 2005) και πολυμεράση της εταιρείας Biotools. Το πρόγραμμα PCR ήταν το ακόλουθο: 5` στους 94 ^oC, 1min στους 94 ^oC, 30 sec στους 52 ^oC, 30 sec στους 72 ^oC και 10 min στους 72 ^oC και περιλάμβανε 40 κύκλους. Τελικά, τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1 % στα 80 mA για 30 min και ακολούθησε παρατήρηση και φωτογράφηση σε υπεριώδη ακτινοβολία.



Εικόνα 2.6. Περιοχές του 16S rDNA γονιδίου όπου προσδένονται τα εκκινητικά μόρια cya 359F, cya 106F και cya 781R

2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των μορίων DNA. Πραγματοποιήθηκε σε οριζόντια συσκευή και η συγκέντρωση του πηκτώματος ήταν 1% (w/v) αγαρόζη σε διάλυμα TAE 1x. Στο διάλυμα αγαρόζης είχε προστεθεί εξαρχής 0,6% διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Sigma) συγκέντρωσης 10 mg/ml. Τα δείγματα φορτώθηκαν στα ειδικά διαμορφωμένα πηγαδάκι του πηκτώματος

και ηλεκτροφορήθηκαν στα 80 mV για 30 περίπου λεπτά. Ακολούθησε παρατήρηση του πηκτώματος σε συσκευή με υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογράφησή του. Για τον υπολογισμό του μεγέθους των ζωνών στο πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε ως κλίμακα ο ladder 1kb της Fermentas.

2.6 Συστήματα ανάπτυξης μικροφυκών και κυανοβακτηρίων

Τα μικροφύκη και κυανοβακτήρια που απομονώθηκαν από τις τρεις εξεταζόμενες περιοχές αρχικά αναπτύχθηκαν σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα με σκοπό να βρεθεί το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη του κάθε απομονωμένου μικροοργανισμού. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα BG11, Walne medium και Euglena:Jaworski medium τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιβλιογραφία για την ανάπτυξη μικροφυκών και κυανοβακτηρίων. Η σύσταση των θρεπτικών αυτών υποστρωμάτων ήταν:

- **Θρεπτικό υπόστρωμα BG11** (www.ccap.ac.uk)

Περιέχει (g/l) 0,15 g $NaNO_3$, 0,0075 g $MgSO_4.7H_20$, 0,004 g K_2HPO_4, 0,0036 g $CaCl_2.2H_2O$, 0,002 g Na_2CO_3, 0,0006 g Citric acid, 0,0006 g Ferric Ammonium citrate, 0,0001 g EDTA, 1 ml Trace Metal mix, Trace Metal mix (1L): 2,86 g H_3BO_3, 1,81 g $MnCl_2.4H_2O$, 0,39 g $Na_2MoO_4.2H_2O$, 0,222 g $ZnSO_4.7H_2O$, 0,07 9g $CuSO_4.5H_2O$, 0,049 g $Co(NO_3)2.6H_2O$)

- **Θρεπτικό υπόστρωμα Walne medium** (www.ccap.ac.uk)

Περιέχει (g/l) Θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με 1,3 g $FeCl_3.6H_2O$, 0,36 g $MnCl_2.4H_2O$, 33,g H_3BO_3, 45,0 g EDTA (disodium salt), 20,0 g $NaH_2PO_4.2H_2O$, 100,0 g $NaNO_3$, 1 ml Trace Metal mix

- **Θρεπτικό υπόστρωμα Jaworski:Euglena Gracilis medium** (www.ccap.ac.uk)

Περιέχει (g/200 ml) Διάλυμα 1: 4 g $Ca(NO_3)2.4H_2O$, Διάλυμα 2: 2.48 g KH_2PO_4, Διάλυμα 3: 10 g $MgSO_4.7H_2O$, Διάλυμα 4: 3.18 g $NaHCO_3$, Διάλυμα 5:0.45 g EDTAFeNa, 0.45 g $EDTANa_2$, Διάλυμα 6: 0.496 g H_3BO_3, 0.278 g $MnCl_2.4H_2O$, 0.2 g $(NH_4)6Mo_7O2_4.4H_2O$, Διάλυμα 7: 0.008 g Cyanocobalamin, 0.008 g Thiamine HCl, 0.008 g Biotin, Διάλυμα 8: 16 g $NaNO_3$, Διάλυμα 9:

$Na2HPO_4.12H_2O$. Για 1 λίτρο θρεπτικό υπόστρωμα προσθήκη 1 ml από κάθε διάλυμα (διάλυμα 1 – 9) σε 1 λίτρο απιονισμένο νερό και 1 g Sodium acetate trihydrate, 1 g Lab – Lemco powder (Oxoid L29), 2 g Tryptone (Oxoid L21), 2 g yeast extract (Oxoid L21), 1 g $CaCl_2$

Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο επώασης σε σταθερή θερμοκρασία 25±1 ^{o}C, με διαρκή φωτισμό (200 μmol photons/ms). Το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα για κάθε στέλεχος καθορίστηκε με μακροσκοπική παρατήρηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Στο θρεπτικό εκείνο υπόστρωμα στο οποίο εμφάνιζε πιο γρήγορα αποικίες το κάθε στέλεχος θεωρήθηκε ως το πιο κατάλληλο για την ανάπτυξή του. Σημαντικό ρόλο στην επιλογή του θρεπτικού υποστρώματος έπαιξε αλλά και το κόστος παρασκευής του κάθε θρεπτικού υποστρώματος.

Από τις στερεές καλλιέργειες των μικροφυκών, εμβολιάστηκαν κωνικές φιάλες των 100 ml που περιείχαν 75 ml θρεπτικό υπόστρωμα (Walne medium για τα στελέχη της Ακρόπολης και της Κορώνειας και BG11 για τα στελέχη του Ασπρόπυργου). Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν για δέκα ημέρες (παρασκευή εμβολίου). Στη συνέχεια 4 ml από κάθε καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλιο για νέες καλλιέργειες των 75 ml. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο επώασης σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25±1 ^{o}C), με εφαρμογή φωτοπεριόδου 12:12 ώρες (ένταση φωτισμού 200 μmol photons/ms). Οι καλλιέργειες τερματίστηκαν στις 20 μέρες και υπολογίστηκε για την κάθε μία η παραγωγή βιομάζας με φυγοκέντρηση της καλλιέργειας (9.000 rpm), λυοφιλίωση και ζύγιση της συλλεγόμενης βιομάζας.

Πραγματοποιήθηκαν παράλληλα υγρές καλλιέργειες κλειστού τύπου σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25±1 °C) και φωτισμού (φωτοπερίοδος 12:12 ώρες και ένταση φωτισμού 200 μmol photons/ms) των τριών απομονωμένων από την περιοχή του Ασπροπύργου κυανοβακτηρίων σε θρεπτικό υπόστρωμα Walne medium σε κωνικές των 100 ml. Ο εμβολιασμός των καλλιεργειών έγινε από τις στερεές καλλιέργειες των κυανοβακτηρίων. Οι καλλιέργειες είχαν διάρκεια ένα μήνα και υπολογίστηκε για την κάθε μία η παραγωγή βιομάζας με φυγοκέντρηση της καλλιέργειας (9000 rpm), λυοφιλίωση και ζύγιση της συλλεγόμενης βιομάζας.

Τα στελέχη μικροφυκών που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας αναπτύχθηκαν στη συνέχεια σε ημιτροφοδοτούμενα συστήματα σε σταθερές συνθήκες

θερμοκρασίας (25±1 °C) και φωτισμού (φωτοπερίοδος 12:12 ώρες και ένταση φωτισμού 200 μmol photons/ms). Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε μεγάλες φιάλες των 20 λίτρων και σε κωνικές των 3 λίτρων. Το εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε στις καλλιέργειες αυτές ήταν καλλιέργεια του κάθε στελέχους σε θρεπτικό υπόστρωμα BG11 ανεπτυγμένη για μία εβδομάδα.

Οι καλλιέργειες αυτές πραγματοποιήθηκαν με σκοπό να επιτευχθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας η οποία θα οδηγούσε σε μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων. Η αύξηση της παραγωγής επιτεύχθηκε με σταδιακή προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος Walne medium ανάλογα με την ανάπτυξη του κάθε μικροοργανισμού. Συγκεκριμένα, καθημερινά πραγματοποιούνταν δειγματοληψίες και φωτομέτρηση της βιομάζας στα 680 nm (Widjaja, 2009) για να μελετηθεί η αύξηση των μικροοργανισμών. Στην περίπτωση που δεν υπήρχε αύξηση της οπτικής πυκνότητας (O.D.) της καλλιέργειας του μικροοργανισμού ή η αύξηση ήταν πολύ μικρή (κάτω από 0,1) μεταξύ δύο μετρήσεων γινόταν προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος και νέα φωτομέτρηση. Υπολογίστηκαν για κάθε στέλεχος οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης μετά από κάθε προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος.

2.7 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση της παραγωγής λιπιδίων

Πραγματοποιήθηκε ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των παραγόμενων λιπιδίων από τα στελέχη μικροφυκών και κυανοβακτηρίων που έδωσαν τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας. Η ποιοτική εκτίμηση των παραγόμενων λιπιδίων έγινε με τη χρήση της λιποφιλικής φθορίζουσας χρωστικής BODIPY 505/515 και της κυτταρομετρίας ροής. Η ποσοτική εκτίμηση πραγματοποιήθηκε μέσω εκχύλισης των παραγόμενων λιπιδίων, μετεστεροποίησή τους και ανάλυση με Αέριο Χρωματογράφο.

2.7.1 Χρώση μικροφυκών με τη χρωστική BODIPY 505/515 και φωτογράφηση σε φωτονικό μικροσκόπιο

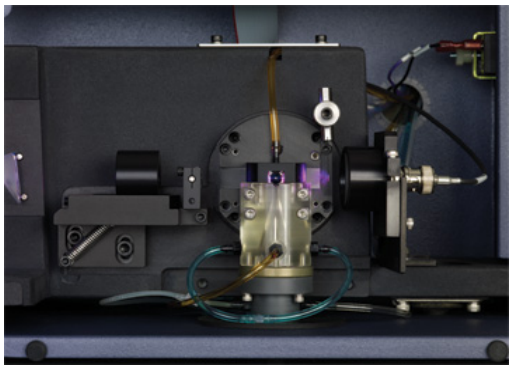
Πραγματοποιήθηκε χρώση με τη χρωστική BODIPY 505/515 για τα μικροφύκη και κυανοβακτήρια που έδωσαν τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας,. Η χρωστική αυτή είναι μια λιποφιλική φθορίζουσα χρωστική και χρησιμοποιείται για τη σηματοδότηση λιπαρών οξέων, φωσφολιπιδίων και άλλων λιπιδίων. Για τη χρώση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του Govender και των συνεργατών του (2012).

Αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα της χρωστικής σε DMSO συγκέντρωσης 100 mg/l το οποίο φυλάχτηκε στο σκοτάδι στους 8 °C. Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν

υγρές καλλιέργειες των 10 ml των επιλεγμένων στελεχών. Ακολούθησε δοκιμή διαφόρων συγκεντρώσεων χρωστικής σε 1ml δείγματος, για να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση χρωστικής που διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και χρωματίζει τα λιπίδια των μικροφυκών. Οι συγκεντρώσεις χρωστικής που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 0,67 μl/ml, 0,8 μl/ml και 1 μl/ml. Αμέσως μετά τη χρώση το δείγμα επωαζόταν για 10` στο σκοτάδι και ακολουθούσε φωτογράφιση στο μικροσκόπιο. Στη συνέχεια έγιναν δοκιμές χρώσης σε διάφορους χρόνους. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε επώαση για 5, 10 και 15 λεπτά στο σκοτάδι και ακολούθησε παρατήρηση και στη συνέχεια φωτογράφηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. Με τις δοκιμές αυτές βρέθηκε η κατάλληλη συγκέντρωση και ο κατάλληλος χρόνος χρώσης για κάθε στέλεχος. Στις συνθήκες αυτές πραγματοποιήθηκε φωτογράφηση των στελεχών και σύγκρισή τους.

2.7.2 Χρώση μικροφυκών με τη χρωστική BODIPY 505/515 και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής

Αφού βρέθηκε η κατάλληλη συγκέντρωση και ο κατάλληλος χρόνος χρώσης για κάθε στέλεχος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των επιλεγμένων στελεχών με το κυτταρόμετρο ροής BD FACSCanto II. Με τη βοήθεια του λογισμικού FACS Diva, υπολογίστηκε η μέση πυκνότητα φθορισμού για κάθε στέλεχος και το ποσοστό των κυττάρων που βάφτηκαν. Τα αποτελέσματα αυτά, έδωσαν μια αρκετά σαφή εικόνα για το ποιο στέλεχος παράγει περισσότερα λιπίδια. Σε συνδυασμό δε με τα αποτελέσματα από τη μικροσκοπική παρατήρηση των στελεχών, έγινε δυνατή η επιλογή των μικροφυκών εκείνων που δίνουν τη μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων.

A B 

Εικόνα 2.7. Κυτταρόμετρο ροής BD FACSCanto II (A), Εσωτερική διαρρύθμιση της συσκευής (B).

2.7.3 Εξαγωγή λιπιδίων από μικροφύκη και κυανοβακτήρια, μετεστεροποίηση και ανάλυση με Αέριο Χρωματογράφο

Η επιλογή του κατάλληλου πρωτοκόλλου εξαγωγής λιπιδίων βασίστηκε στην ικανότητα εκχύλισης των λιπιδίων και μεθυλίωσής τους, στην ποσότητα των εξαγόμενων λιπιδίων, στη χρονική διάρκεια και στο κόστος της κάθε διαδικασίας. Μετά από μελέτη τα βιβλιογραφίας επιλέχθηκε το απλοποιημένο πρωτόκολλο των Kang και Wang (2004).

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο αυτό, 15 mg λυοφιλιωμένης βιομάζας από κάθε δείγμα αναμίχθηκαν με 1 ml BF_3 12% MeOH και ακολούθησε θέρμανση για μία ώρα στους 100 °C. Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου και προσθήκη 2ml εξανίου και 1ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε ανάδευση σε vortex για 1 λεπτό έως ότου αναμιχθούν πλήρως όλα τα συστατικά του μίγματος. Το μίγμα αφέθηκε σε ηρεμία μέχρι να διαχωριστούν οι φάσεις πλήρως και η φάση του εξανίου που περιέχει τους μεθυλεστέρες συλλέχθηκε. Τέλος πραγματοποιήθηκε ανάλυση των μεθυλεστέρων με αέρια χρωματογραφία.

Η αέρια χρωματογραφία είναι μία τεχνική η οποία διαχωρίζει μίγματα. Ένα μίγμα χημικών συστατικών χωρίζεται στα διακεκριμένα συστατικά του καθώς το δείγμα κινείται διαμέσου της στήλης του αέριου χρωματογράφου. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται μέσω ενός συνδυασμού παραμέτρων περιλαμβάνοντας το σημείο βρασμού, την πολικότητα και τις διαφορές συγγένειας μεταξύ των διαφορετικών συστατικών στο δείγμα. Ο χρόνος που χρειάζεται ένα συστατικό για να εξέλθει από τη στήλη και να φτάσει στον ανιχνευτή ονομάζεται χρόνος συγκράτησης (retention time) και μπορεί να αναπαραχθεί. Ο χρόνος συγκράτησης είναι χαρακτηριστικός κάθε συστατικού κάτω από δοθείσες πειραματικές παραμέτρους και καθορισμένη στήλη. Καθώς τα χωρισμένα συστατικά εξέρχονται από τη στήλη οδηγούνται στον ανιχνευτή και ανιχνεύονται. Το σήμα του ανιχνευτή είναι ανάλογο της παρούσας ποσότητας της ένωσης (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001).

Οι ενώσεις ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή ιονισμού φλόγας, ο οποίος αποκρίνεται σχεδόν σε όλες τις ενώσεις οι οποίες καίγονται. Το άθροισμα όλων των αποκρίσεων σε ένα συγκεκριμένο εύρος εξισώνεται με συγκέντρωση ουσίας μέσω αναφοράς σε πρότυπα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης.

Ένας GC/FID ανιχνεύει οποιαδήποτε ένωση η οποία εξάγεται από τη στήλη και καίγεται. Το αναλογικό σήμα το ανιχνευτή ονομάζεται χρωματογράφημα. Συνήθως

δίνεται ως γραφική παράσταση της απόκρισης του ανιχνευτή ως προς το χρόνο. Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι εμφανίζει μεγάλη ευαισθησία και υψηλές αποδόσεις διαχωρισμού των συστατικών.

Η επεξεργασία των δειγμάτων στην παρούσα έρευνα, πραγματοποιήθηκε με αέριο χρωματογράφο με ιονιστή φλόγας, της εταιρείας Perkin Simer, με στήλη τύπου Supelcowax-10. Το φέρον αέριο της στήλης ήταν Ήλιο με πίεση 15psi και η εισαγωγή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με ένεση 'splitless'. Η αρχική θερμοκρασία στη στήλη ήταν 160 °C για 15 λεπτά και ακολουθούσε αύξηση θερμοκρασίας κατά 3 °C το λεπτό μέχρι τους 250 °C.

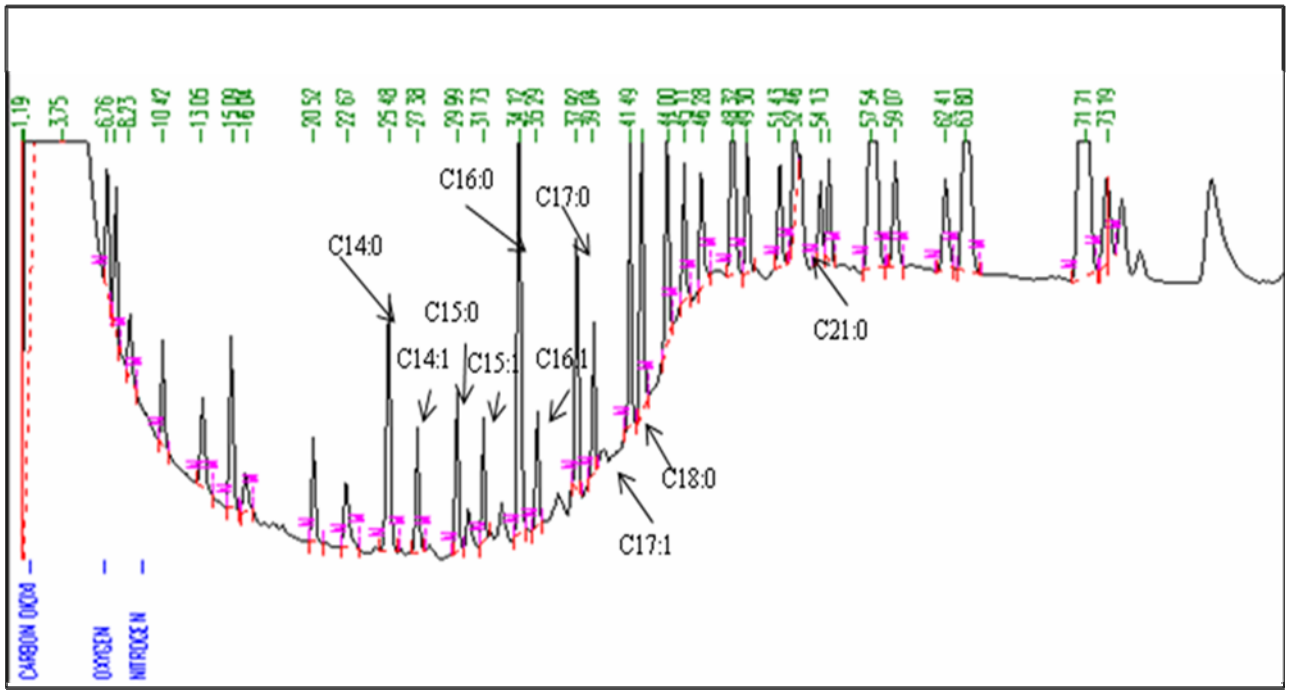
Εικόνα 2.10. Αέριος χρωματογράφος με ιονιστή φλόγας που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των δειγμάτων.

Από την ανάλυση με τον αέριο χρωματογράφο, προέκυψε το λιπιδικό προφίλ των επιλεγμένων στελεχών. Για να γίνει η ταυτοποίηση των μεθυλεστέρων και να υπολογιστεί η παραγόμενη ποσότητά τους, χρησιμοποιήθηκαν ένα πρότυπο μίγμα πολλών μεθυλεστέρων και ένα μίγμα παλμιτικού και στεαρικού οξέος, το οποίο υποβλήθηκε στη διαδικασία μετεστεροποίησης των Jing Kang και Wang (2004). Με βάση τα αποτελέσματα που έδωσαν τα πρότυπα αυτά έγιναν οι περαιτέρω υπολογισμοί και η ταυτοποίηση των μεθυλεστέρων που παράχθηκαν από κάθε στέλεχος.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των παραγόμενων μεθυλεστέρων έγινε με βάση την αντιστοιχία μεταξύ εμβαδού κορυφής του πρότυπου μίγματος μεθυλεστέρων και της συγκέντρωσης παραγόμενων μεθυλεστέρων. Η συγκέντρωση του πρότυπου μεθυλεστέρα λινολεϊκού οξέος ήταν 0,2 mg/ml, στο χρωματογράφο εμβολιάστηκαν 2

μl, και έδωσε κορυφή στο χρωματογράφημα εμβαδού 2.000. Συνεπώς εμβαδό κορυφής 1.000 αντιστοιχεί σε 0,2 mg μεθυλεστέρα.

Τα στελέχη που επιλέχθηκαν για τη μελέτη του λιπιδικού τους προφίλ ήταν αυτά που έδωσαν τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας (§2.9,2.10). Στη συνέχεια, μετά τη μελέτη του λιπιδικού προφίλ των στελεχών αυτών, επιλέχθηκαν τα στελέχη εκείνα που παρουσίαζαν τη μεγαλύτερη συνολική παραγωγή λιπιδίων αλλά και τη μεγαλύτερη ποικιλία λιπιδίων. Ακολούθως, για τα στελέχη αυτά έγινε προσπάθεια εύρεσης των κατάλληλων συνθηκών για τη μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων.



Εικόνα 2.8. Χρωματογράφημα πρότυπου μίγματος μεθυλεστέρων. Με βελάκια φαίνονται οι μεθυλεστέρες που αντιστοιχούν σε κάθε κορυφή

2.8 Ανάπτυξη μικροφυκών σε διάφορες συνθήκες καταπόνησης

Η ικανότητα των μικροφυκών να συσσωρεύουν λιπίδια στα κύτταρά τους εξαρτάται άμεσα από τις συνθήκες στις οποίες αναπτύσσονται, όπως έχει ήδη αναφερθεί και στην Εισαγωγή. Οι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή λιπιδίων και που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι η συγκέντρωση νιτρικών στο θρεπτικό υπόστρωμα και το pH. Συγκεκριμένα η στέρηση νιτρικών και η επιβολή

υψηλής τιμής pH στο θρεπτικό υπόστρωμα οδηγεί σε συσσώρευση λιπιδίων. Με βάση αυτά τα δεδομένα, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων για τα στελέχη που επιλέχτηκαν προηγουμένως (§ 2.7) με σκοπό αρχικά την εύρεση της κατάλληλης συγκέντρωσης νιτρικών στο θρεπτικό υπόστρωμα και κατά δεύτερον την ιδανική τιμή pH για τη μέγιστη παραγωγή λιπιδίων.

Πραγματοποιήθηκαν υγρές κλειστές καλλιέργειες των 200 ml σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25±1 °C) και φωτισμού (φωτοπερίοδος 12:12 ώρες και ένταση φωτισμού 200 μmol photons/ms) για τα μικροφύκη που έδωσαν τη μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων. Ως βασικό θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το BG0 με σύσταση: (g/l) 0,0075 g $MgSO_4.7H_20$, 0,004 g K_2HPO_4, 0,0036 g $CaCl_2.2H_2O$, 0,002 g Na_2CO_3, 0,0006 g Citric acid, 0,0006 g Ferric Ammonium citrate, 0,0001 g EDTA, 1 ml Trace Metal mix, Trace Metal mix (1L): 2,86 g H_3BO_3, 1,81 g $MnCl_2.4H_2O$, 0,39 g $Na_2MoO_4.2H_2O$, 0,222 g $ZnSO_4.7H_2O$, 0,079 g $CuSO_4.5H_2O$, 0,049 g $Co(NO_3)2.6H_2O$), με συγκεντρώσεις νιτρικών: 0,15 g, 0,1 g, 0,05 g και 0 g $NaNO_3$.

Οι καλλιέργειες παρακολουθούνταν καθημερινά και πραγματοποιούνταν τακτικές δειγματοληψίες και φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 680 nm για παρακολούθηση ανάπτυξης της βιομάζας. Όταν η βιομάζα έφτασε στην εκθετική φάση ανάπτυξης (22 ημέρες ανάπτυξης), οι καλλιέργειες τερματίστηκαν, συλλέχθηκε η βιομάζα και πραγματοποιήθηκε εξαγωγή λιπιδίων, μετεστεροποίησή τους και ανάλυση με αέρια χρωματογραφία.

Αφού προσδιορίστηκε η βέλτιστη τιμή συγκέντρωσης νιτρικών στο θρεπτικό υπόστρωμα για κάθε στέλεχος, πραγματοποιήθηκαν υγρές κλειστές καλλιέργειες 250 ml σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25±1 °C) και φωτισμού (φωτοπερίοδος και ένταση φωτισμού 200 μmol photons/ms) για τα μικροφύκη που έδωσαν τη μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων. Οι καλλιέργειες είχαν διάρκεια 20 ημέρες. Ως θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε για κάθε στέλεχος εκείνο το οποίο οδήγησε σε μέγιστη παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων και οι τιμές του pH που δοκιμάστηκαν ήταν pH 6 (τιμή pH του θρεπτικού υποστρώματος), pH 7, pH 8 και pH 9. Στις 20 ημέρες, η βιομάζα συλλέχτηκε ζυγίστηκε και λυοφιλιώθηκε για να ακολουθήσει εκχύλιση και ανάλυση λιπιδίων.

2.9 Ανοιχτές καλλιέργειες σε ημι-πικλοτική κλίμακα

Τα πειράματα που προηγήθηκαν οδήγησαν στην επιλογή των μικροφυκών εκείνων που έδωσαν τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων. Στη συνέχεια βρέθηκαν οι συνθήκες εκείνες (συγκέντρωση νιτρικών, pH) που οδηγούν σε αύξηση παραγωγής βιομάζας και λιπιδίων από τα στελέχη αυτά. Το επόμενο βήμα ήταν η πραγματοποίηση καλλιεργειών σε μεγαλύτερη κλίμακα προσομοιάζοντας συνθήκες πεδίου.

Οι καλλιέργειες αυτές πραγματοποιήθηκαν με χρήση ενυδρείων των 20 λίτρων τα οποία τοποθετήθηκαν στο θάλαμο επώασης στους 25 °C, με φωτοπερίοδο 12:12 ώρες. Ως θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με την κατάλληλη συγκέντρωση νιτρικών για κάθε στέλεχος και ρυθμίστηκε το pH στο επιθυμητό, όπως αυτά προσδιορίστηκαν για τη μέγιστη παραγωγή λιπιδίων (§ 2.8). Οι καλλιέργειες βρίσκονταν υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια κυκλοφορητών νερού, δύο σε κάθε ενυδρείο τοποθετημένους κατάλληλα ώστε να υπάρχει επαρκής ανάδευση (Εικόνα 2.10).

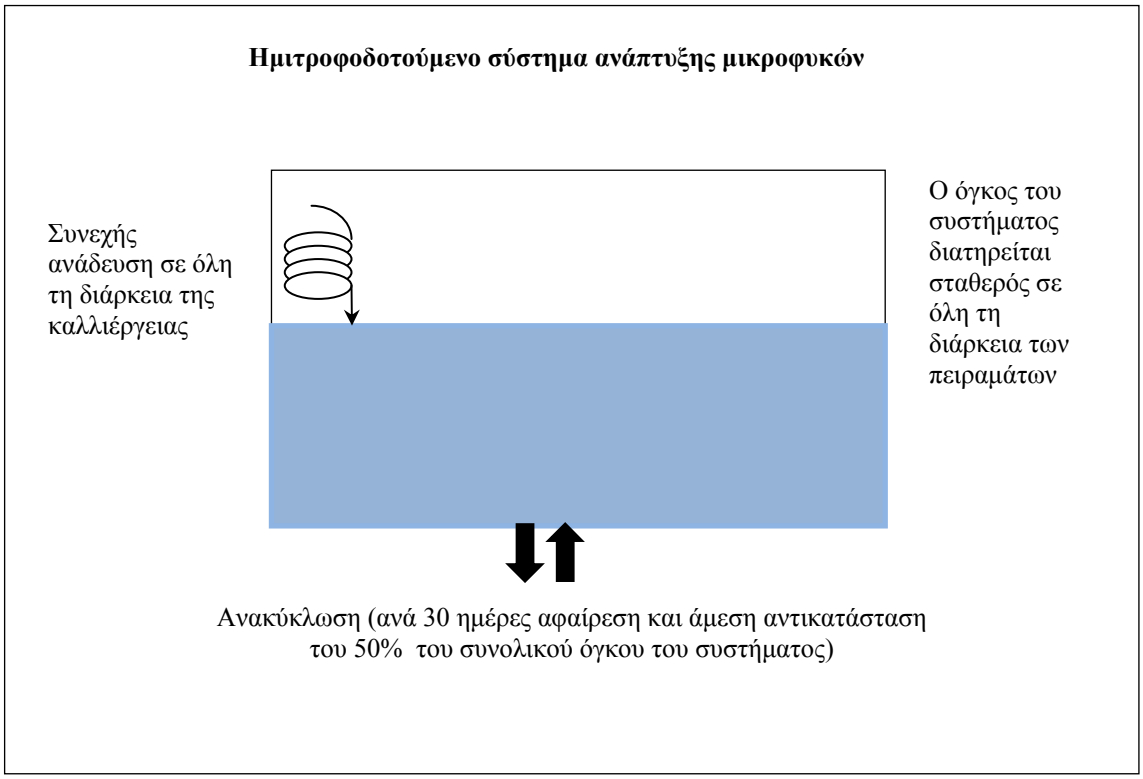
Το εμβόλιο για τις καλλιέργειες αυτές ήταν καλλιέργεια 3 λίτρων για το κάθε στέλεχος, στην οποία το θρεπτικό υπόστρωμα ήταν θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με Walne medium, η συγκέντρωση των νιτρικών ήταν 0,15 g/l $NaNO_3$ και το pH 6, ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη παραγωγή βιομάζας. Η συνολική διάρκεια των καλλιεργειών αυτών ήταν 3 μήνες.

Εικόνα 2.9. Ενυδρεία που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των μικροφυκών.

Κάθε 30 ημέρες πραγματοποιούταν συλλογή 10 λίτρων από τις καλλιέργειες και συλλογή της βιομάζας με φυγοκέντρηση. Η εναπομείνασα βιομάζα στο δοχείο

χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο για τη συνέχεια των καλλιεργειών, οι οποίες τροφοδοτούνταν με νέο αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα ώστε να διατηρηθεί σταθερός ο όγκος της καλλιέργειας (Εικόνα 2.10).

Μετά το τέλος των τριών μηνών, πραγματοποιήθηκε συλλογή όλης της καλλιέργειας, φυγοκέντρηση και συλλογή της συνολικής βιομάζας, λυοφιλίωσή της και εκχύλιση των παραγόμενων.



Εικόνα 2.10. Σχηματική αναπαράσταση του ημιτροφοδοτούμενου συστήματος που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των μικροφυκών.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ποικιλότητα μικροφυκών και κυανοβακτηρίων στις περιοχές της Ακρόπολης, της Κορώνειας και του Ασπρόπυργου

Με χρήση του πρωτοκόλλου των Parvin et al (2007) απομονώθηκαν 74 μικροφύκη και 4 κυανοβακτήρια από τις περιοχές της Ακρόπολης, της Κορώνειας και του Ασπρόπυργου όπως περιγράφεται στην §2.2. Συγκεκριμένα από τα μνημεία της Ακρόπολης απομονώθηκαν 30 μικροφύκη, από τη λίμνη Κορώνεια 11 μικροφύκη και από την περιοχή του Ασπρόπυργου (θάλασσα Ασπρόπυργου και λίμνη Κουμουνδούρου) απομονώθηκαν 33 μικροφύκη και 3 κυανοβακτήρια.

Η απομόνωση και ο διαχωρισμός των στελεχών έγινε με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους (χρώμα, υφή). Από τη μακροσκοπική παρατήρηση των απομονωμένων στελεχών προέκυψε πως υπάρχει μια ποικιλία διαφορετικών ειδών μικροφυκών και κυανοβακτηρίων τόσο ανάμεσα στις τρεις εξεταζόμενες περιοχές όσο και ανάμεσα στα στελέχη της ίδιας κάθε φορά περιοχής.

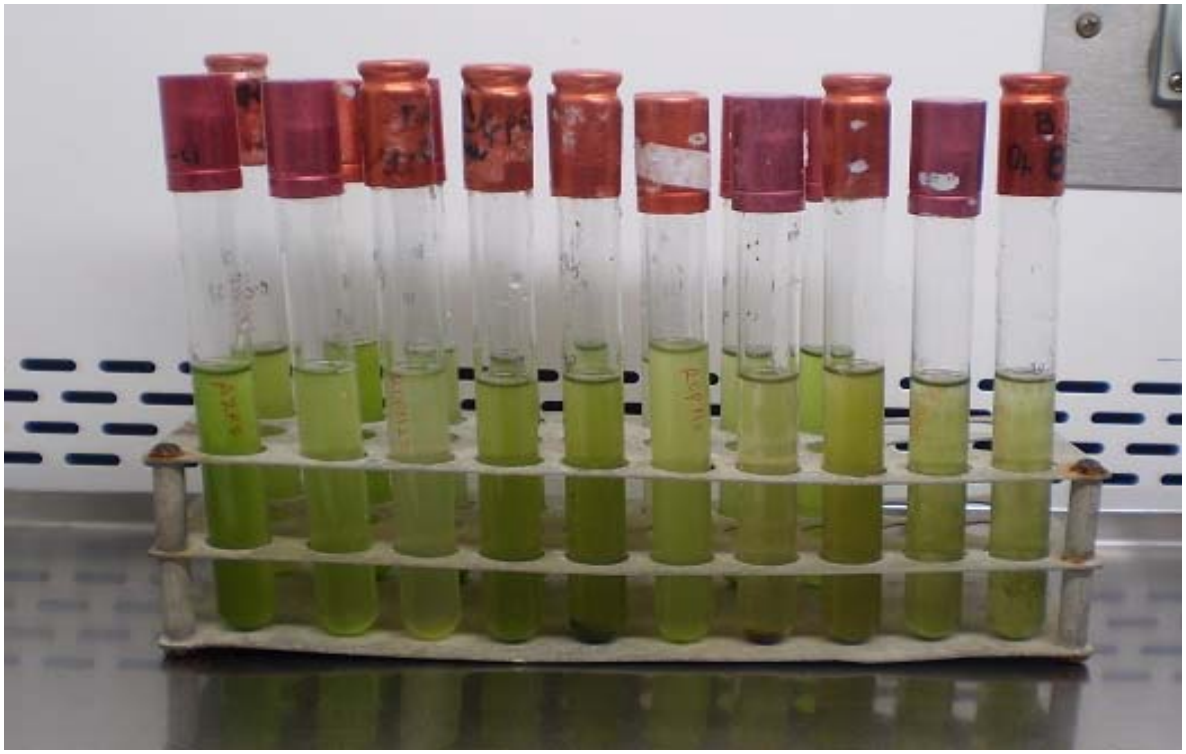
Η διαδικασία της απομόνωσης αποδείχτηκε αρκετά δύσκολη και χρονοβόρα, καθώς χρειάστηκαν από 20 έως και 35 ημέρες για να εμφανιστούν οι πρώτες αποικίες μικροφυκών και κυανοβακτηρίων στις στερεές καλλιέργειες. Ιδιαίτερα δύσκολη ήταν η απομάκρυνση των μυκήτων που υπήρχαν στα αρχικά δείγματα από όπου απομονώθηκαν τα μικροφύκη και τα κυανοβακτήρια αλλά και των βακτηρίων. Κάποια από τα βακτήρια δεν ήταν δυνατόν να απομακρυνθούν καθώς συμβιώνουν με ορισμένα στελέχη μικροφυκών και είναι απαραίτητα για την ανάπτυξή τους.

Τα απομονωμένα μικροφύκη αναπτύχθηκαν στα θρεπτικά υποστρώματα BG11, Walne medium και Jaworski:Euglena Gracilis medium (§2.6) και επιλέχθηκε για κάθε απομονωμένο στέλεχος το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξή του, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στα επόμενα πειράματα.

Τα μικροφύκη παρουσίασαν γρήγορη ανάπτυξη στα θρεπτικά υποστρώματα BG11 και Walne medium (εμφάνιση αποικιών μετά από 5 ημέρες καλλιέργειας). Στο θρεπτικό υπόστρωμα Jaworski:Euglena Gracilis medium η ανάπτυξη των μικροφυκών ήταν ακόμη πιο γρήγορη καθώς εμφάνισαν αποικίες μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας. Τα θρεπτικά υποστρώματα BG11 και Walne medium επιλέχθηκαν για χρήση στα

επόμενα πειράματα καθώς η ανάπτυξη των στελεχών ήταν γρήγορη ενώ παράλληλα τα υποστρώματα αυτά είναι οικονομικά στην παρασκευή τους ενώ το θρεπτικό υπόστρωμα Jaworski:Euglena Gracilis medium έχει σχεδόν το διπλάσιο κόστος παρασκευής. Τα κυανοβακτήρια που απομονώθηκαν από την περιοχή του Ασπρόπυργου καλλιεργήθηκαν σε στερεές καλλιέργειες BG11 και Walne medium και αναπτύχθηκαν μόνο στο θρεπτικό υπόστρωμα Walne medium.

Τα απομονωμένα στελέχη μικροφυκών εκτός από τις στερεές καλλιέργειες, διατηρήθηκαν και σε υγρές καλλιέργειες των 20 ml σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες με πώμα, οι οποίες χρησίμευσαν και ως εμβόλιο για τις καλλιέργειες που ακολούθησαν. Τα κυανοβακτήρια αναπτύχθηκαν και σε υγρές καλλιέργειες των 50 ml σε κωνικές φιάλες. Ανά 30 ημέρες πραγματοποιούνταν ανακαλλιέργειες των απομονωμένων στελεχών στην προσπάθεια διατήρησης της καλλιέργειας σε φάση ανάπτυξης.



Εικόνα 3.1. Υγρές καλλιέργειες των απομονωμένων μικροφυκών σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες των 20 ml με πώμα.

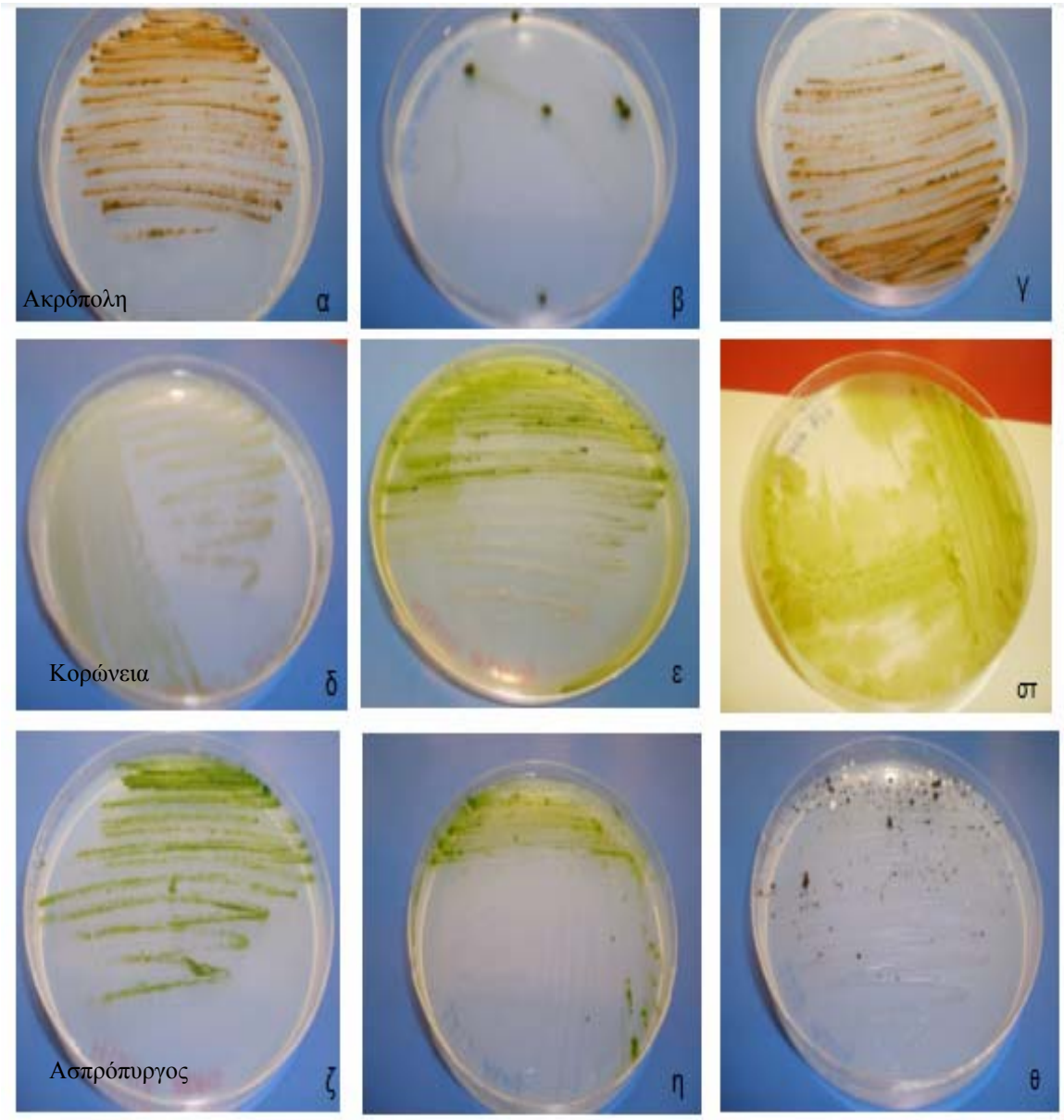
3.2 Μορφολογικά και γενετικά χαρακτηριστικά - Ταξινόμηση των απομονωμένων στελεχών

Τα απομονωμένα στελέχη μικροφυκών και κυανοβακτηρίων μελετήθηκαν μορφολογικά με τη βοήθεια της Οπτικής Μικροσκοπίας. Πραγματοποιήθηκε φαινοτυπική ταυτοποίηση των στελεχών μέσω σύγκρισης των απομονωμένων στελεχών με κατατεθειμένα στελέχη (§ 2.3) και μοριακή ταυτοποίηση (§ 2.4) στελεχών που δεν κατέστη δυνατόν να ταυτοποιηθούν φαινοτυπικά.

3.2.1 Μορφολογικά και γενετικά χαρακτηριστικά των απομονωμένων μικροφυκών

Μετά από τη μακροσκοπική παρατήρηση των απομονωμένων στελεχών προέκυψε πως τα απομονωμένα στελέχη εμφάνιζαν ιδιαίτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Οι αποικίες των μικροφυκών από τα μνημεία της Ακρόπολης και από την περιοχή του Ασπρόπυργου εμφάνιζαν χρωματική ποικιλία, όπως ανοιχτό έως σκούρο πράσινο, κίτρινο, καφέ και το χρώμα της σκουριάς. Επίσης κάποια στελέχη εμφάνιζαν μεγάλη ανύψωση στην επιφάνεια του στερεού θρεπτικού υποστρώματος ενώ τα περισσότερα απλώνονταν στην επιφάνεια του υποστρώματος. Τα μικροφύκη από τη λίμνη της Κορώνεια ήταν στην πλειοψηφία τους πράσινου χρώματος με δύο εξαιρέσεις που εμφάνιζαν καφέ αποικίες, χωρίς ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στην υφή τους.

Τα απομονωμένα μικροφύκη φωτογραφήθηκαν σε φωτονικό μικροσκόπιο, με σκοπό να γίνει και μικροσκοπική παρατήρησή τους και να ταυτοποιηθούν φαινοτυπικά. Με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος AxioVision, μετρήθηκε το μέγεθος των κυττάρων των μικροφυκών. Οι φωτογραφίες των μικροφυκών από το φωτονικό μικροσκόπιο συγκρίθηκαν με τη συλλογή φωτογραφιών της τράπεζας στελεχών CCALA, του Ινστιτούτου Βοτανικής της Ακαδημίας Επιστημών της Τσεχίας στο κέντρο Φυκολογίας και τα περισσότερα απομονωμένα στελέχη ταυτοποιήθηκαν φαινοτυπικά. Στις Εικόνες 3.3 και 3.4 φαίνονται σε μεγέθυνση 100x τα μικροφύκη και τα κυανοβακτήρια που απομονώθηκαν από τα οικοσυστήματα της Ακρόπολης, της λίμνης Κορώνεια και του Ασπρόπυργου. Σε κάθε φωτογραφία αναφέρεται ο κωδικός του στελέχους και το γένος στο οποίο ανήκει στην περίπτωση που ταυτοποιήθηκε φαινοτυπικά.



Εικόνα 3.2. Στερεές καλλιέργειες μικροφυκών απομονωμένων από (α,β,γ) τα μνημεία της Ακρόπολης, (δ,ε,στ) τη λίμνη Κορώνεια και (ζ,η,θ) την περιοχή του Ασπρόπυργου.

Μετά τη μικροσκοπική παρατήρηση και τη σύγκριση με τα κατατεθειμένα στελέχη, τα μικροφύκη από τις τρεις εξεταζόμενες περιοχές, ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο γένους. Κάποια στελέχη μικροφυκών δεν ταυτοποιήθηκαν καθώς δεν παρουσίαζαν ομοιότητα με κανένα από τα κατατεθειμένα στελέχη. Τα περισσότερα μικροφύκη από τις περιοχές της Ακρόπολης και της Κορώνεια ανήκουν στο γένος

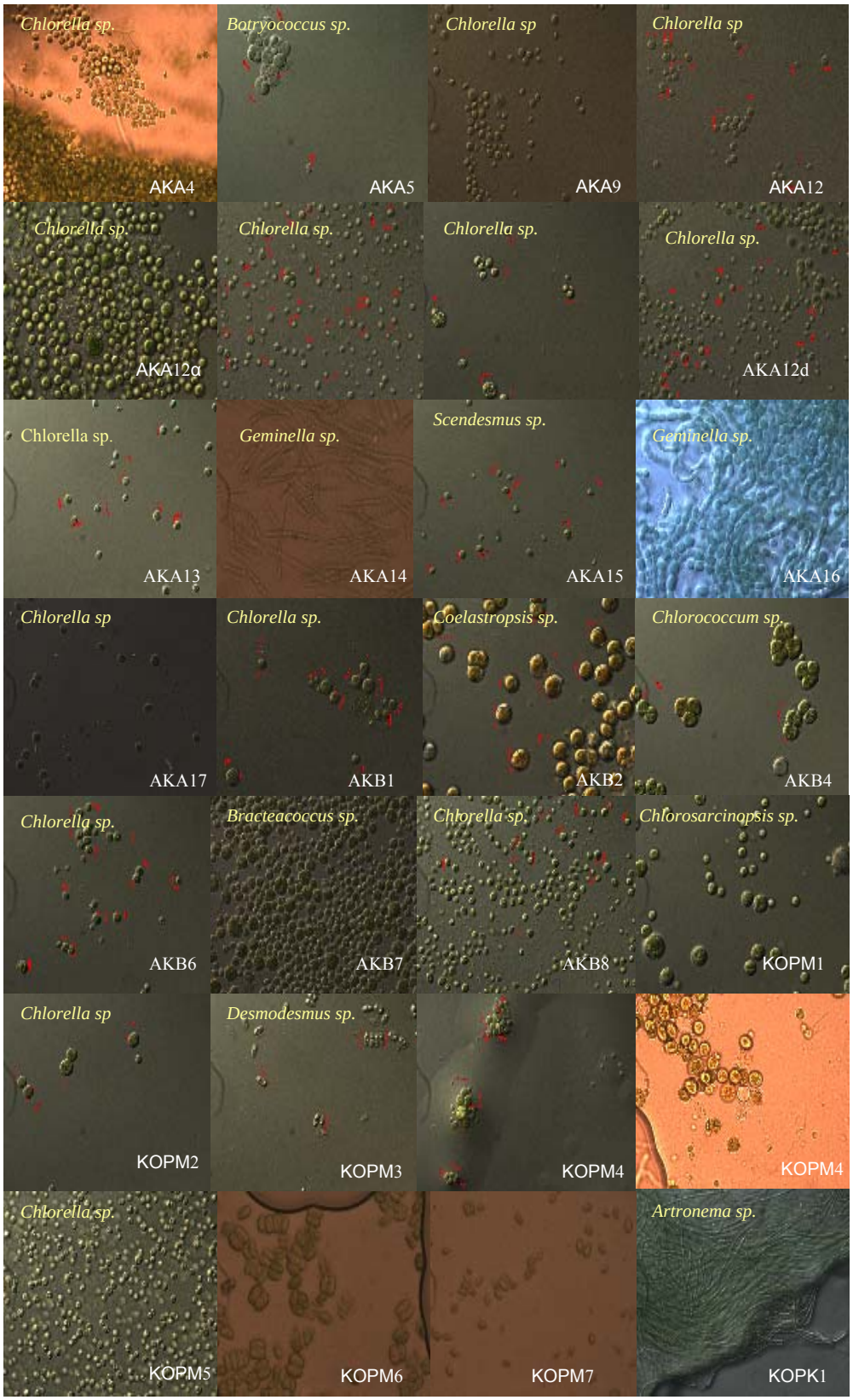
Chlorella, ενώ τα μικροφύκη από την περιοχή του Ασπρόπυργου εμφάνισαν μεγάλη ποικιλότητα, με αντιπροσώπους από διάφορα είδη μικροφυκών με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά.

Στον Πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3.1), παρουσιάζονται τα γένη στα οποία ανήκουν τα μικροφύκη που απομονώθηκαν από κάθε περιοχή. Συγκεκριμένα, τα στελέχη διαχωρίζονται με βάση το φύλο, την τάξη και το γένος στο οποίο ανήκουν. Για κάθε περιοχή σημειώνεται ο αριθμός των απομονωμένων στελεχών που ανήκουν σε κάθε γένος.

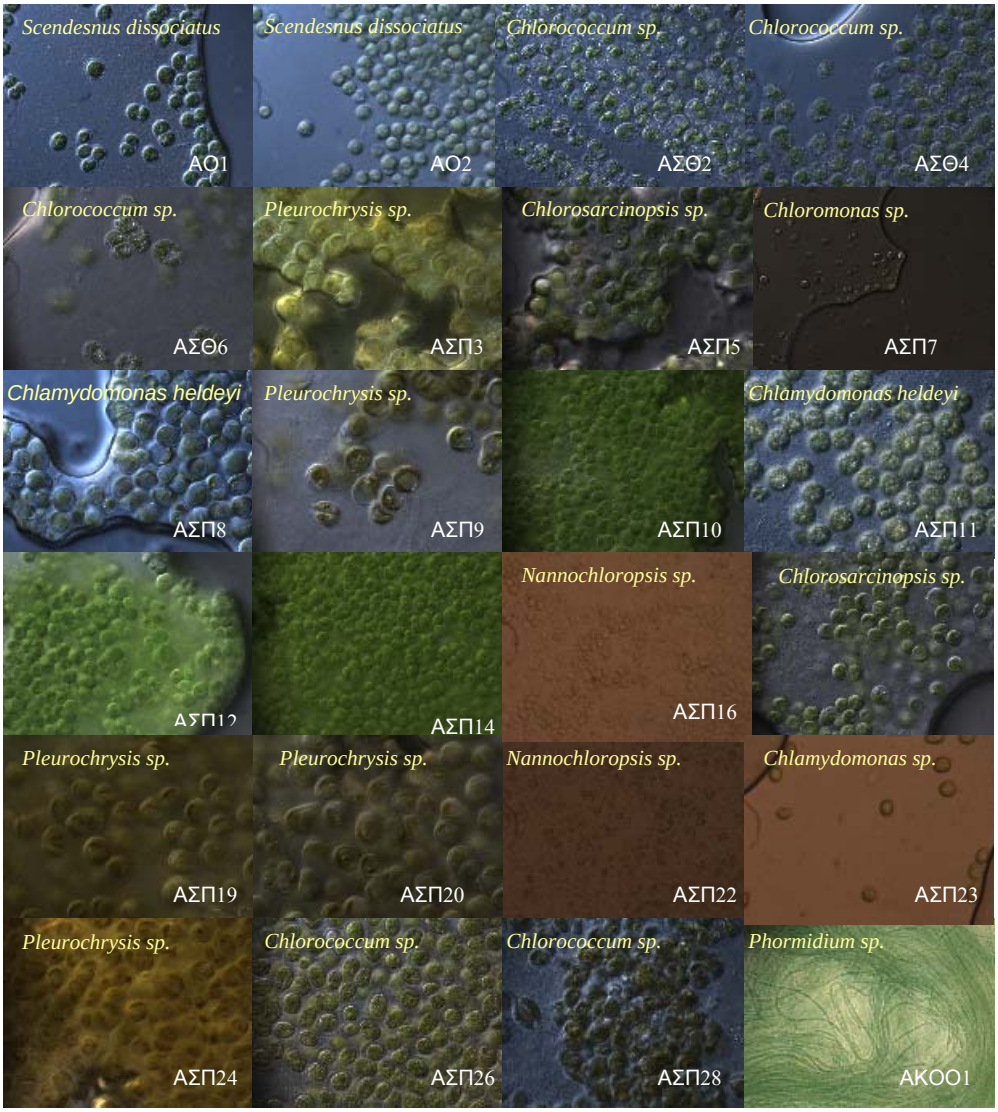
Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.1, τα 30 μικροφύκη που απομονώθηκαν από τα μνημεία της Ακρόπολης και ταυτοποιήθηκαν φαινοτυπικά, ανήκαν σε 6 διαφορετικά γένη, με τα 15 στελέχη να ανήκουν στο γένος *Chlorella.* Από τα απομονωμένα μικροφύκη από τη λίμνη Κορώνεια ταυτοποιήθηκαν φαινοτυπικά τα 9 και από αυτά τα 7 ανήκαν στο γένος *Chlorella.* Τα μικροφύκη που απομονώθηκαν από την περιοχή του Ασπρόπυργου εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία. Μετά από τη σύγκριση με τα στελέχη της Τράπεζας Στελεχών, ταυτοποιήθηκαν τα 22 με αντιπροσώπους από 7 διαφορετικά γένη.

Πίνακας 3.1. Διαχωρισμός των απομονωμένων στελεχών με βάση το φύλο και το γένος στις τρεις εξεταζόμενες περιοχές μετά από φαινοτυπική σύγκριση με κατατεθειμένα στελέχη στην Τράπεζα στελεχών CCALA, του Ινστιτούτου Βοτανικής της Ακαδημίας Επιστημών της Τσεχίας στο κέντρο Φυκολογίας

			Ακρόπολη	**Κορώνεια**	**Ασπρόπυργος**
Chlorophyta	*Trebouxiophyceae*	*Chlorella*	14	7	1
		Botryococcus	1		
		Scendesmus	1	1	3
		Coelastropsis	6		
		Chlorosarcinopsis	1		3
	Chlorophyceae	*Bracteacoccus*	1		
		Desmodesmus		2	
		Chloromonas			1
Haptophyta	*Prymnesiophyceae*	*Chlamydomonas*			1
		Chlorococcum			5
		Pleurochrysis			8



Εικόνα 3.3. Φωτογραφίες σε μεγέθυνση 100x μικροφυκών απομονωμένων από οικοσυστήματα της Ακρόπολης και της λίμνης Κορώνεια και ενός κυανοβακτηρίου που απομονώθηκε από τη λίμνη Κορώνεια σε φωτονικό μικροσκόπιο



Εικόνα 3.4. Φωτογραφίες σε μεγέθυνση 100x μικροφυκών και κυανοβακτηρίων απομονωμένων από οικοσυστήματα του Ασπρόπυργου (θάλασσα Ασπρόπυργου, λίμνη Κουμουνδούρου) σε φωτονικό μικροσκόπιο.

Στον Πίνακα 3.2, παρουσιάζονται τα στελέχη μικροφυκών από τις τρεις εξεταζόμενες περιοχές που ταυτοποιήθηκαν φαινοτυπικά μετά από σύγκριση με τα κατατεθημένα στελέχη της Τράπεζας Στελεχών της CCALA.

Πίνακας 3.2. Στελέχη μικροφυκών που απομονώθηκαν από τα μνημεία της Ακρόπολης, την περιοχή του Ασπρόπυργου και τη λίμνη Κορώνεια και ταυτοποιήθηκαν με βάση τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΟΝΟΜΑΣΙΑ
ΑΚΑ4	*Chlorella sp.*	ΚΟΡΜ9	*Chlorella* sp.
ΑΚΑ5	*Botryococcus* sp.	ΚΟΡΜ11	*Chlorella* sp.
ΑΚΑ7	*Chlorella* sp.	ΑΣΠ3	*Pleurochrysis sp.*
ΑΚΑ9	*Chlorella* sp.	ΑΣΠ5	*Chlorosarcinopsis* sp.
ΑΚΑ10	*Chlorella* sp.	ΑΣΠ6	*Pleurochrysis sp.*
ΑΚΑ12	*Chlorella* sp.	ΑΣΠ7	*Chloromonas* sp.
ΑΚΑ12b	*Chlorella* sp.	ΑΣΠ8	*Chlamydomonas heldeyi*
ΑΚΑ12c	*Chlorella* sp.	ΑΣΠ9	*Pleurochrysis sp.*
ΑΚΑ12d	*Chlorella* sp.	ΑΣΠ10	Μη ταυτοποιημένο
ΑΚΑ13	*Chlorella homosphera*	ΑΣΠ11	*Chlamydomonas heldeyi*
ΑΚΑ14	*Geminella sp.*	ΑΣΠ11/1	*Chlamydomonas heldeyi*
ΑΚΑ15	*Scendesmus sp.*	ΑΣΠ11/2	*Chlamydomonas heldeyi*
ΑΚΑ16	*Geminella sp.*	ΑΣΠ15	*Chlorella sp.*
ΑΚΑ17	*Chlorella sp.*	ΑΣΠ16	*Nannochloropsis sp.*
ΑΚΑ18	*Chlorella sp.*	ΑΣΠ16/1	*Nannochloropsis sp.*
ΑΚΒ1	*Chlorella sp.*	ΑΣΠ17	*Chlorella sp.*
ΑΚΒ2	*Coelastropsis sp.*	ΑΣΠ19	*Pleurochrysis sp.*
ΑΚΒ2/1	*Coelastropsis sp.*	ΑΣΠ21	*Pleurochrysis sp.*
ΑΚΒ2/2	*Coelastropsis sp.*	ΑΣΠ23	*Chlamydomonas sp.*
ΑΚΒ3/1	*Coelastropsis sp.*	ΑΣΠ24	*Pleurochrysis sp.*
ΑΚΒ3/2	*Coelastropsis sp.*	ΑΣΠ26	*Pleurochrysis sp.*
ΑΚΒ3/3	*Coelastropsis sp.*	ΑΣΠ28/1	*Pleurochrysis sp.*
ΑΚΒ4	*Chlorosarcinospis sp.*	ΑΣΠ29	*Pleurochrysis sp.*
ΑΚΒ6	*Chlorella sp.*	ΑΣΠ30	*Pleurochrysis sp.*
ΑΚΒ7	*Bracteacoccus sp.*	ΑΣΠ31	*Pleurochrysis sp.*
ΑΚΒ8	*Chlorella sp.*	ΑΣΠ35	*Pleurochrysis sp.*

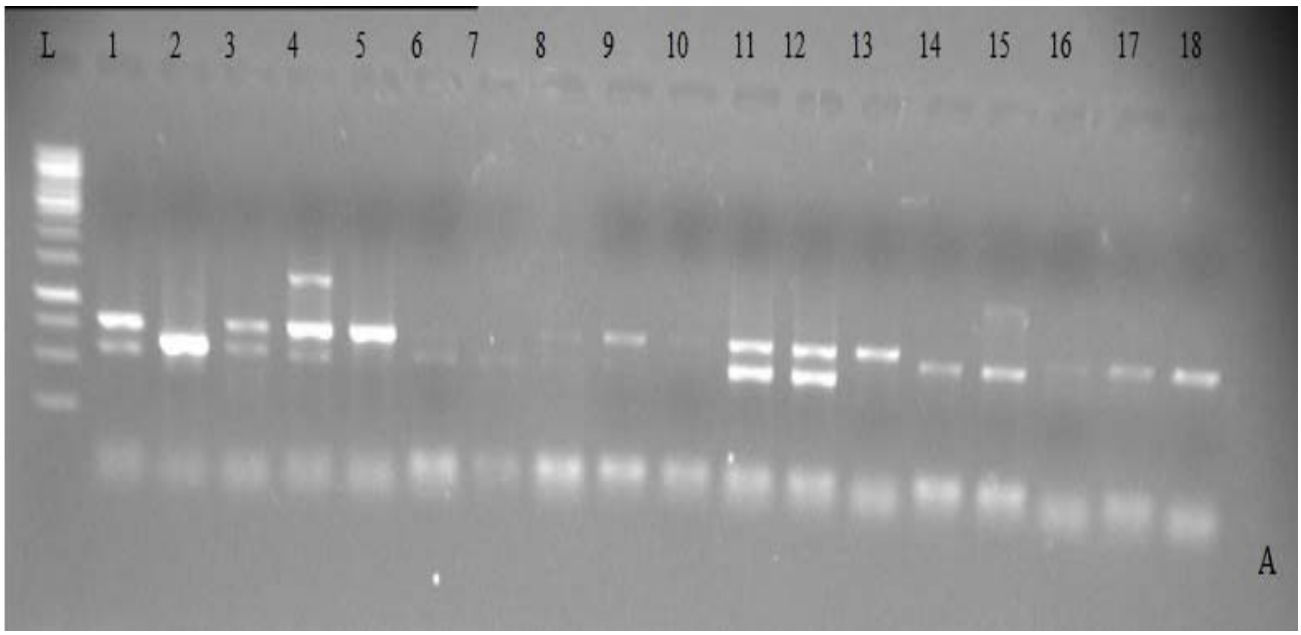
Συνέχεια Πίνακα 3.2

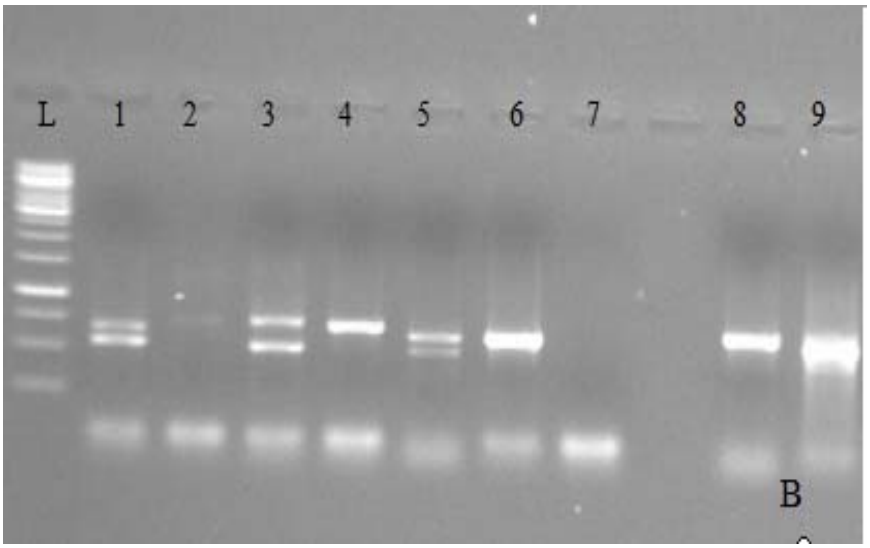
ΑΚΒ11	*Chlorella sp.*	ΑΣΘ2	*Chlorococcum sp.*
ΚΟΡΜ1	*Acutodesmus sp.*	ΑΣΘ4	*Chlorococcum sp.*
ΚΟΡΜ3	*Desmodesmus sp.*	ΑΟ2	*Scendesmus dissociatus*
ΚΟΡΜ4	*Scendesmus sp.*	ΑΣΚ1	*Phormidium sp.*
ΚΟΡΜ4/1	*Scendesmus sp.*		
ΚΟΡΜ5	*Chlorella sp.*		
ΚΟΡΜ5/1	*Chlorella sp.*		
ΚΟΡΜ6	*Desmodesmus* sp.		
ΚΟΡΜ7	*Desmodesmus* sp.		

Τα απομονωμένα μικροφύκη με τη βοήθεια της ITS PCR (§2.4.1.2) και με χρήση των εκκινητικών μορίων ITS1, ITS4 διαχωρίστηκαν σε επίπεδο γένους. Κάποια στελέχη μικροφυκών ταυτοποιήθηκαν επίσης μοριακά με αληλούχηση των προϊόντων της ITS PCR.

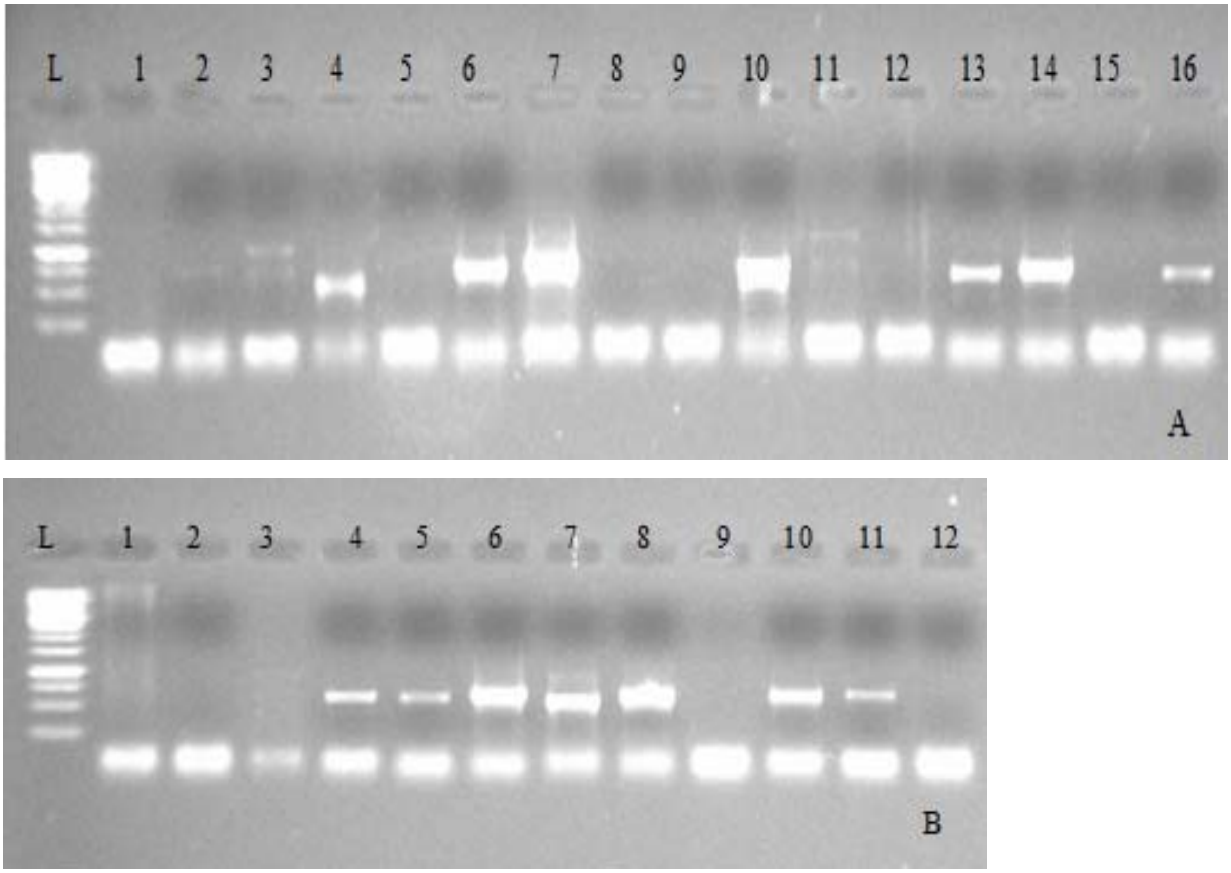
Η ITS PCR δίνει διαφορετικό πρότυπο για κάθε μικροοργανισμό. Μετά την παρατήρηση των ζωνών των προϊόντων της ITS PCR στα πηκτώματα αγαρόζης προσδιορίστηκε για κάθε περιοχή μελέτης ο αριθμός των διαφορετικών προτύπων, κάθε ένα από τα οποία αντιστοιχεί σε διαφορετικό γένος. Ανάμεσα στα στελέχη της Ακρόπολης βρέθηκαν 11 διαφορετικά πρότυπα (Εικόνα 3.5), ανάμεσα στα στελέχη του Ασπρόπυργου 10 (Εικόνα 3.6) διαφορετικά πρότυπα και ανάμεσα στα στελέχη της Κορώνεια 4 διαφορετικά πρότυπα (Εικόνα 3.7).

Όσον αφορά στα στελέχη που δεν ταυτοποιήθηκαν φαινοτυπικά, πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση των προϊόντων της ITS PCR και ταυτοποιήθηκαν μοριακά. Στον Πίνακα 3.3 παρουσιάζονται τα στελέχη για τα οποία πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση της περιοχής ITS του 18S rDNA γονιδίου, τα κατατεθειμένα στελέχη με τα οποία παρουσιάζουν ομοιότητα, το ποσοστό ομοιότητας και ο αριθμός καταχώρησης στην Τράπεζα Στελεχών.

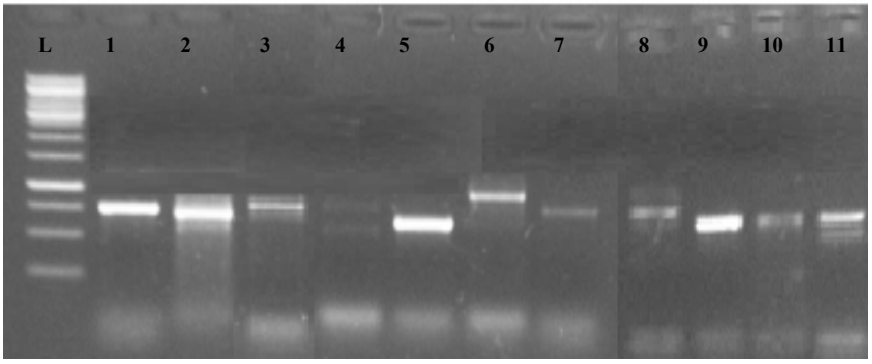




Εικόνα 3.5: Προϊόντα αντίδρασης PCR για την ενίσχυση της ITS περιοχής του γονιδίου 18S rDNA των μικροφυκών απομονωμένων από τα μνημεία της Ακρόπολης, με τα εκκινητικά μόρια ITS1, ITS4, σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. (A), ζώνες: L, μοριακός δείκτης. 1, AKA4. 2, AKA5. 3, AKA7. 4, AKA9. 5, AKA10. 6, AKA10. 7, AKA12. 8, AKA12γ. 9, AKA13. 10, AKA15. 11, AKA17. 12, AKA18. 13, AKB1. 14, AKB2. 15, AKB2/1. 16, AKB2/2. 17, AKB3/1. 18, AKB3/2. (B), ζώνες: L, μοριακός δείκτης . 1, AKB3/3. 2, AKB4. 3, AKB6. 4, AKB7. 5, AKB8. 6, AKB9. 7, AKB11. 8, AKB12. 9, AKB13



Εικόνα 3.6. Προϊόντα αντίδρασης PCR για την ενίσχυση της ITS περιοχής του γονιδίου 18S rDNA των μικροφυκών απομονωμένων από τον Ασπρόπυργο και τη λίμνη Κουμουνδούρου, με τα εκκινητικά μόρια ITS1, ITS4, σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. (A), ζώνες: L, μοριακός δείκτης. 1, ΑΣΠ3. 2, ΑΣΠ4/1. 3, ΑΣΠ6. 4. ΑΣΠ7. 5, ΑΣΠ9. 6, ΑΣΠ10. 7, ΑΣΠ11. 8, ΑΣΠ12. 9, ΑΣΠ14. 10, ΑΣΠ15. 11, ΑΣΠ16. 12, ΑΣΠ16/1. 13, ΑΣΠ17. 14, ΑΣΠ18. 15, ΑΣΠ20. 16, ΑΣΠ21. (B) ζώνες: L, μοριακός δείκτης. 1, ΑΣΠ21/1 2, ΑΣΠ22. 3, ΑΣΠ23. 4, ΑΣΠ24. 5, ΑΣΠ26. 6, ΑΣΠ29. 7, ΑΣΘ2. 8, ΑΣΘ4. 9, ΑΣΘ6. 10, ΑΟ2. 11, ΑΟ2/1. 12, ΑΟ1.



Εικόνα 3.7: Προϊόντα αντίδρασης PCR για την ενίσχυση της ITS περιοχής του γονιδίου 18S rDNA των μικροφυκών απομονωμένων από τη λίμνη Κορώνεια, με τα εκκινητικά μόρια ITS1, ITS4, σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στην εικόνα 3.9, ζώνες: L, μοριακός δείκτης. 1, ΚΟΡΜ1. 2, ΚΟΡΜ4. 3, ΚΟΡΜ4/1. 4, ΚΟΡΜ5. 5, ΚΟΡΜ5/2. 6, ΚΟΡΜ6. 7, ΚΟΡΜ9. 8, ΚΟΡΜ11. 9, ΚΟΡΜ3. 10, ΚΟΡΜ7. 11, ΚΟΡΜ5/1.

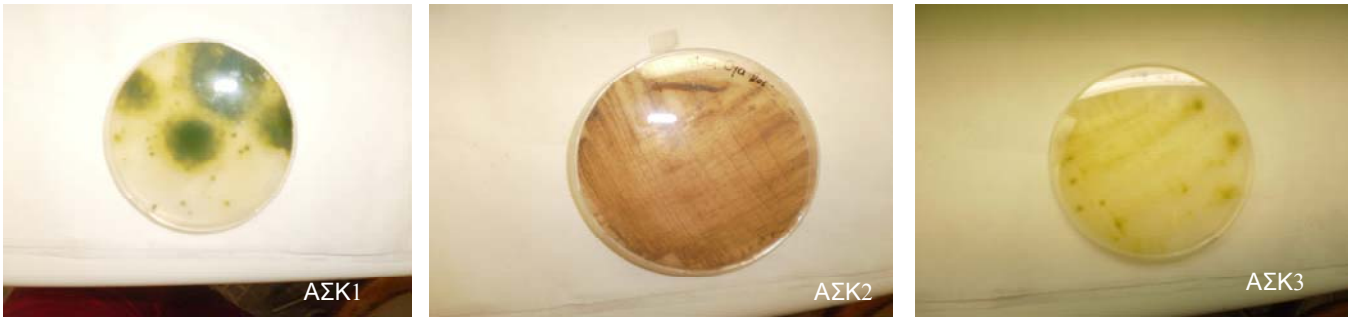
Πίνακας 3.3. Μοριακή ταυτοποίηση στελεχών με χρήση εκκινητικών μορίων ITS1, ITS4 για την ενίσχυση της ITS περιοχής του 18S rDNA γονιδίου.

Στέλεχος	Ονομασία	% Ομοιότητα με κατατεθειμένο στέλεχος	Gene Bank Number
ΑΚΑ4	*Chlorella sp.*	90%	JX683125.1
ΑΚΑ9	*Chlorella sp.*	90%	JX683125.1
ΑΚΑ17	*Chlorella sp.*	90%	JX683125.1
ΚΟΡΜ4	*Scendesmus dissociatus*	100%	AY510466.1
ΑΣΠ8	*Chlamydomonas heldeyi*	98%	AJ297797.1
ΑΣΠ11	*Chlamydomonas heldeyi*	98%	AJ297797.1
ΑΚΒ9	*Chlorella sp.*	99%	ZJU0209
ΑΣΠ22	*Nannochloropsis salina*	99%	KF040086.1
ΑΚΒ12	*Coelastrum sp.*	99%	JX413790.1

Τα στελέχη ΑΚΑ4, ΑΚΑ9 και ΑΚΑ17 εμφάνισαν χαμηλό ποσοστό ομοιότητας (90 %) με το γένος *Chlorella* sp.. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αμφίβολα καθώς τα ποσοστά ομοιότητας που δηλώνουν ότι το εξεταζόμενο στέλεχος ανήκει σε κάποιο είδος είναι πάνω από 97 %. Ωστόσο, τα συγκεκριμένα στελέχη μετά τη μελέτη των φαινοτυπικών τους χαρακτηριστικών και τη σύγκρισή τους με κατατεθειμένα στελέχη προέκυψε πως ανήκουν στα γένη *Chlorella* και *Scendesmus* αντίστοιχα, οπότε θεωρήθηκε ότι ανήκουν στα γένη αυτά.

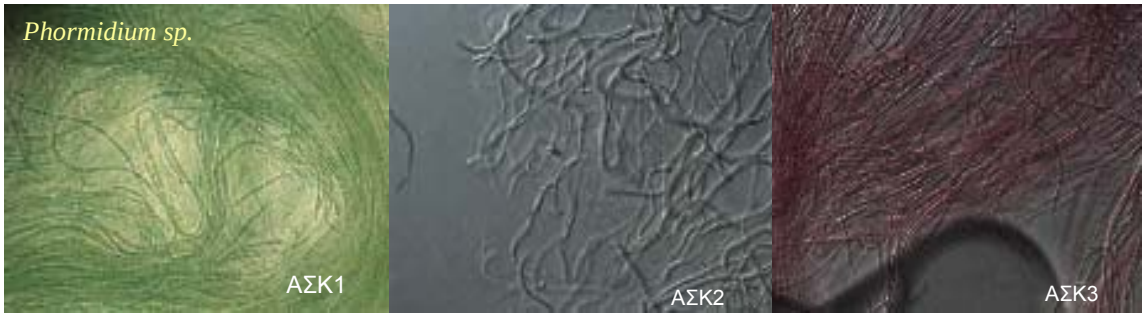
3.2.2 Μορφολογικά και γενετικά των απομονωμένων κυανοβακτηρίων

Τα κυανοβακτήρια που απομονώθηκαν από τη περιοχή του Ασπρόπυργου ήταν κίτρινου, πράσινου και κόκκινου χρώματος, ενώ εμφάνισαν νηματοειδή αναπτυξη στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Εικόνα 3.8).



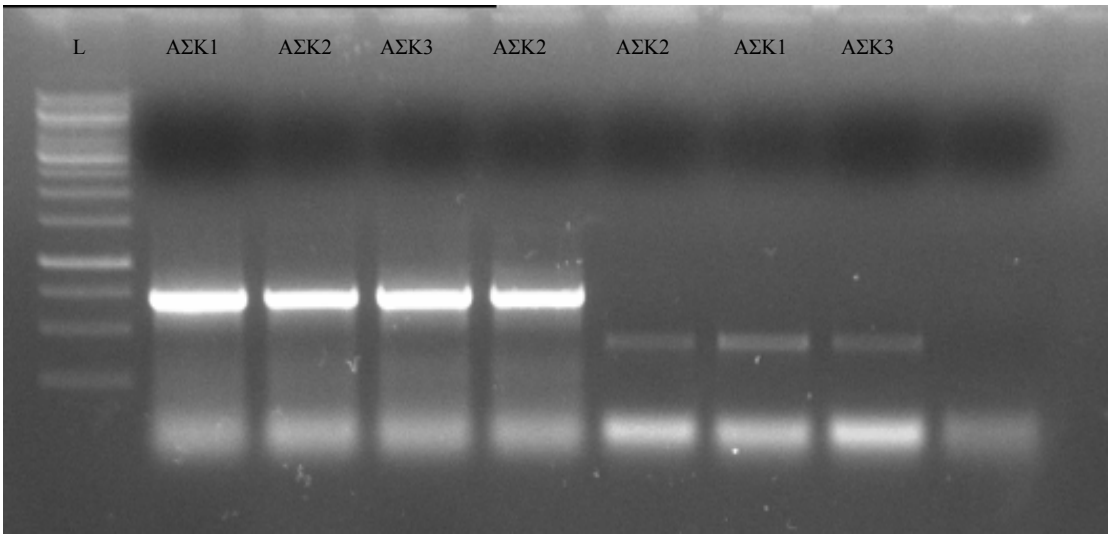
Εικόνα 3.8. Στερεές καλλιέργειες κυανοβακτηρίων που απομονώθηκαν από την περιοχή του Ασπρόπυργου.

Μετά τη φωτογράφιση των στελεχών στο μικροσκόπιο (Εικόνα 3.9) μόνο ένα από τα κυανοβακτήρια ταυτοποιήθηκε φαινοτυπικά. Το πράσινο κυανοβακτήριο με κωδικό ΑΣΚ1 εμφάνισε ομοιότητα με το κυανοβακτήριο *Phormidium* sp..



Εικόνα 3.9. Φωτογραφίες από φωτονικό μικροσκόπιο (x100) των κυανοβακτηρίων που απομονώθηκαν από την περιοχή του Ασπρόπυργου.

Εξαιτίας του ότι δεν ταυτοποιήθηκαν φαινοτυπικά όλα τα απομονωμένα κυανοβακτήρια από την περιοχή του Ασπρόπυργου, πραγματοποιήθηκε μοριακή ταυτοποίηση με την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου τους των με τα εκκινητικά μόρια: cya 781R, cya 359F και cya 106F (§2.4.2.1). Στην Εικόνα 3.10 φαίνεται το πήκτωμα αγαρόζης με τις ζώνες των προϊόντων της PCR.



Εικόνα 3.10. Προϊόν αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του 16S rDNA των κυανοβακτηρίων. Για την ενίσχυση του DNA των χρησιμοποιήθηκαν συνδυασμοί των εκκινητικών μορίων cya 781R, cya106F και cya 359F. Οι τρεις πρώτες ζώνες στο πήκτωμα αγαρόζης αντιστοιχούν σε προϊόντα PCR με συνδυασμό των εκκινητικών μορίων cya 781R και 106F και οι επόμενες τρεις ζώνες αντιστοιχούν σε προϊόντα PCR με συνδυασμό των εκκινητικών μορίων cya 781R και cya 359F.

Μετά από αλληλούχηση των προϊόντων της PCR με χρήση των εκκινητικών μορίων cya 781R και cya 106F, μόνο ένα από τα κυανοβακτήρια ταυτοποιήθηκε, το στέλεχος ΑΣΚ1. Στον Πίνακα 3.4, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αλληλούχησης των προϊόντων της PCR των κυανοβακτηρίων.

Πίνακας 3.4. Μοριακή ταυτοποίηση κυανοβακτηρίων με χρήση εκκινητικών μορίων cya 781R και cya 106F.

Στέλεχος	**Ονομασία**	**% Ταυτότητα με κατατεθειμένο στέλεχος**	**Gene Bank Number**
ΑΣΚ1	*Phormidium sp.*	98%	AB058219.1
ΑΣΚ2	Filamentous cyanobacterium	99%	EU196366.1
ΑΣΚ3	Filamentous cyanobacterium	95%	GQ243430.1

Το στέλεχος ΑΣΚ3 εμφάνισε χαμηλό ποσοστό ομοιότητας (95 %) με νηματοειδές κυανοβακτήριο. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αμφίβολα καθώς όπως έχει ήδη αναφερθεί τα ποσοστά ομοιότητας που δηλώνουν ότι το εξεταζόμενο στέλεχος ανήκει σε κάποιο είδος είναι πάνω από 97 %. Μετά την παρατήρηση όμως του κυανοβακτηρίου σε φωτονικό μικροσκόπιο, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.9, το κυανοβακτήριο είναι νηματοειδές.

3.3 Μελέτη της αύξησης των μικροοργανισμών σε διαφορετικά συστήματα καλλιέργειας και ανίχνευση των παραγόμενων λιπιδίων

Μετά την ταυτοποίηση των μικροφυκών και των κυανοβακτηρίων που απομονώθηκαν, επιλέχθηκαν τα στελέχη εκείνα που θεωρήθηκαν καλοί υποψήφιοι για παραγωγή λιπιδίων κατάλληλων για βιοντίζελ. Βασικό κριτήριο για την επιλογή κατάλληλων στελεχών, ήταν η μεγάλη παραγωγή βιομάζας.

Αρχικά, με σκοπό να εντοπιστούν τα στελέχη με τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας, πραγματοποιήθηκαν υγρές κλειστές καλλιέργειες όλων των απομονωμένων στελεχών στο κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα. Στη συνέχεια, για τα στελέχη που έδωσαν τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες μεγαλύτερου όγκου, οι οποίες ήταν υγρές κλειστές καλλιέργειες των 100 και 250 ml για τα κυανοβακτήρια και ημιτροφοδοτούμενες καλλιέργειες για τα μικροφύκη.

Μετά την επιλογή των στελεχών με τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας πραγματοποιήθηκε ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση των παραγόμεων λιπιδίων τους. Η ποιοτική εκτίμηση των παραγόμενων λιπιδίων έγινε με τη χρήση της λιποφιλικής φθορίζουσας χρωστικής BODIPY 505/515 και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Τα κύτταρα των επιλεγμένων μικροφυκών και κυανοβακτηρίων βάφτηκαν με τη συγκεκριμένη χρωστική και η ένταση του φθορισμού που προέκυψε οδήγησε σε συμπεράσματα σχετικά με την ικανότητα κάθε στελέχους να παράγει και να συσσωρεύει λιπίδια. Η ποσοτική εκτίμηση των παραγόμενων λιπιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω εκχύλισης των λιπιδίων από τα κύτταρα των μικροοργανισμών, μετεστεροποίησης των λιπιδίων και ανάλυση με Αέριο Χρωματογράφο (§ 2.7).

3.3.1 Μελέτη αύξησης των απομονωμένων μικροφυκών

Τα απομονωμένα μικροφύκη από την Ακρόπολη, την Κορώνεια και τον Ασπρόπυργο, αναπτύχθηκαν σε υγρές κλειστές καλλιέργειες των 100 ml (Εικόνα 3.11) σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25 °C ±1) και φωτισμού (φωτοπερίοδος 12:12 ώρες) (§2.6). Οι καλλιέργειες αυτές πραγματοποιήθηκαν με σκοπό να επιλεγούν από κάθε περιοχή τα μικροφύκη εκείνα που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας και θα αποτελέσουν την πρώτη ύλη για εξαγωγή λιπιδίων και παραγωγή μεθυλεστέρων κατάλληλων για βιοντίζελ.

Εικόνα 3.11: (α) Υγρές κλειστές καλλιέργειες των στελεχών του Ασπρόπυργου των 100 ml σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25 °C ±1) και φωτισμού (φωτοπερίοδος 12:12 ώρες) με διάρκεια 20 ημέρες και (β) Υγρές κλειστές καλλιέργειες των στελεχών της Ακρόπολης των 100 ml σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25 °C ±1) και φωτισμού (φωτοπερίοδος 12:12 ώρες) με διάρκεια 20 ημέρες

Στον Πίνακα 3.5 παρουσιάζεται η ποσότητα ξηρής βιομάζας που συλλέχθηκε από την καλλιέργεια κάθε στελέχους μετά από 20 ημέρες ανάπτυξης. Τα στελέχη που εμφάνισαν

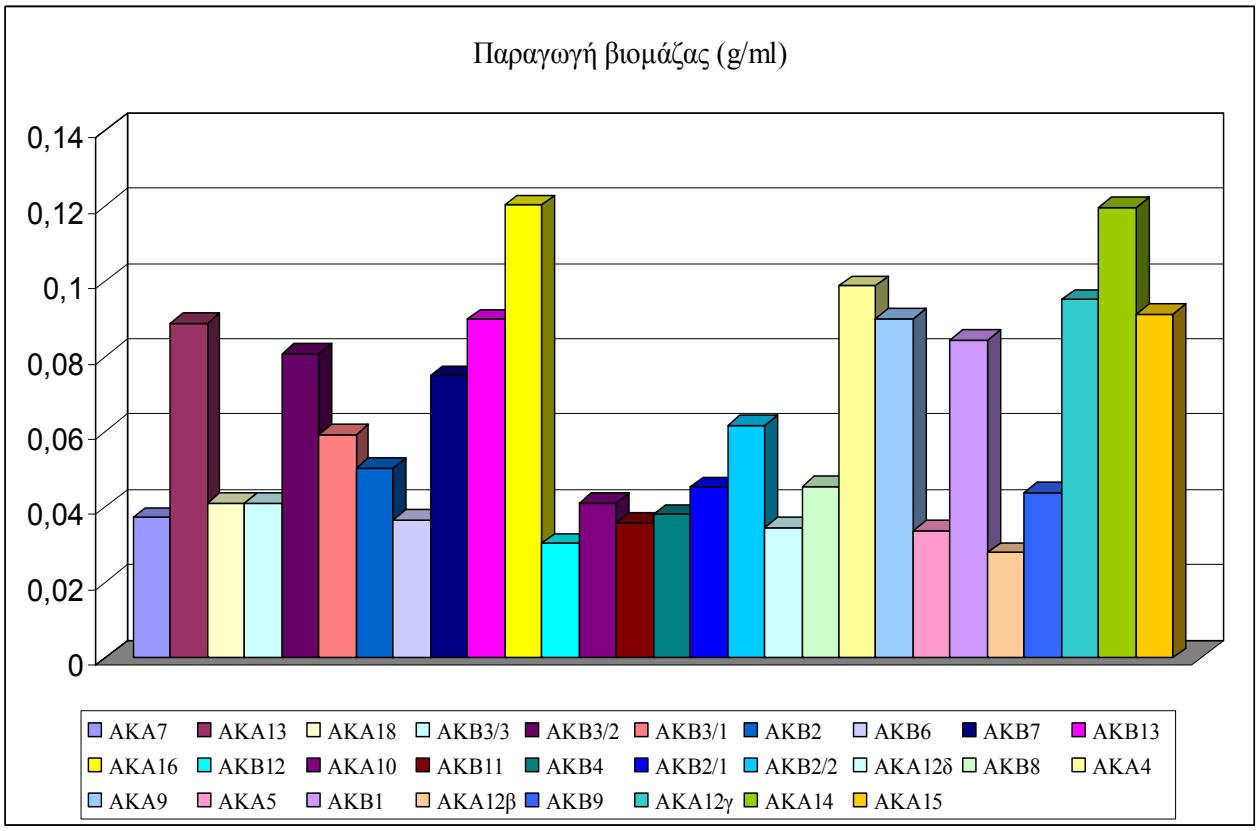
παραγωγή βιομάζας μεγαλύτερη από 0,08 g/ml υποστρώματος σε διάστημα 20 ημερών επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη. Τα επιλεγμένα στελέχη από κάθε περιοχή παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5 με έντονα γράμματα.

Πίνακας 3.5. Παραγωγή βιομάζας από τα μικροφύκη που απομονώθηκα από τις περιοχές της Ακρόπολης, του Ασπρόπυργου και της λίμνης Κορώνεια. Τα μικροφύκη καλλιεργήθηκαν σε υγρές κλειστές καλλιέργειες των 100 ml για 20 μέρες σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25 °C ±1) και φωτισμού (φωτοπερίοδος 12:12 ώρες) (με έντονα γράμματα φαίνονται τα στελέχη που έδωσαν τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας).

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΒΙΟΜΑΖΑ(g/ml)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΒΙΟΜΑΖΑ(g/ml)
*Chlorella sp.*ΑΚΑ4	0,070	*Desmodesmus sp.* ΚΟΡΜ7	0,002
Botryococcus sp.ΑΚΑ5	0,040	*Chlorella sp.* ΚΟΡΜ8	0,004
*Chlorella sp.*ΑΚΑ7	0,040	*Chlorella* sp.ΚΟΡΜ9	0,004
*Chlorella sp.***ΑΚΑ9**	**0,090**	*Chlorella sp.* ΚΟΡΜ11	0,002
*Chlorella sp.*ΑΚΑ10	0,040	*Pleurochrysis sp.* ΑΣΠ3	0,001
*Chlorella sp.*ΑΚΑ12	0,080	*Chlorosarkinopsis sp.* ΑΣΠ5	0,002
*Chlorella sp.*ΑΚΑ12Β	0,080	*Pleurochrysis sp.* ΑΣΠ6	0,002
*Chlorella sp.*ΑΚΑ12Γ	0,040	*Chloromonas sp.* ΑΣΠ7	0,002
*Chlorella sp.*ΑΚΑ12Δ	0,030	*Chlamydomonas heldeyi* ΑΣΠ8	0,003
Chlorella homosphera **ΑΚΑ13**	**0,090**	*Pleurochrysis sp.* ΑΣΠ9	0,004
Geminella sp. ΑΚΑ14	0,010	ΑΣΠ10	0,001
Scendesmus sp. ΑΚΑ15	0,070	*Chlamydomonas heldeyi* ΑΣΠ11	0,002
Geminella sp. **ΑΚΑ16**	**0,120**	*Chlamydomonas heldeyi* ΑΣΠ11/1	0,002
*Chlorella sp.***ΑΚΑ17**	**0,090**	ΑΣΠ11/2	0,002
Chlorella sp. ΑΚΑ18	0,040	ΑΣΠ12	0,002
*Chlorella sp.*ΑΚΒ1	0,030	ΑΣΠ12/1	0,002
Coelastropsis sp. ΑΚΒ2	0,050	**ΑΣΠ14**	**0,120**
Coelastropsis sp.ΑΚΒ2/1	0,040	ΑΣΠ14/1	0,007
Coelastropsis sp. ΑΚΒ2/2	0,060	*Chlorella sp.* ΑΣΠ15	0,003
Coelastropsis sp.ΑΚΒ3/1	0,060	*Nannochlorospis* sp. ΑΣΠ16	0,004
Coelastropsis sp. **ΑΚΒ2**	**0,080**	*Nannochlorospis sp.* ΑΣΠ16/1	0,004
Coelastropsis sp.ΑΚΒ3/3	0,040	*Chlorella sp.* ΑΣΠ17	0,010
Chlorosarkisnopsis sp. ΑΚΒ4	0,040	ΑΣΠ18	0,005
Chlorella sp. ΑΚΒ6	0,040	*Pleurochrysis sp.* ΑΣΠ19	0,060
Bracteacoccus sp. ΑΚΒ7	0,070	*Pleurochrysis sp.* ΑΣΠ21	0,040
Chlorella sp. ΑΚΒ8	0,050	ΑΣΠ22	0,010
Chlorellas sp. ΑΚΒ9	0,030	*Chlamydomonas sp.* ΑΣΠ23	0,040
Chlorella sp. ΑΚΒ11	0,070	*Pleurochrysis sp.* ΑΣΠ24	0,040
Chlorella sp. ΑΚΒ12	0,030	***Pleurochrysis sp.* ΑΣΠ28/1**	**0,090**
Chlorella sp. ΑΚΒ13	0,080	*Pleurochrysis sp.*ΑΣΠ29	0,050
Acutodesmus sp. ΚΟΡΜ1	0,080	*Pleurochrysis sp.*ΑΣΠ30	0,020
Desmodesmus sp. ΚΟΡΜ3	0,020	*Pleurochrysis sp.*ΑΣΠ31	0,010
***Scendesmus sp.* ΚΟΡΜ4**	**0,090**	*Pleurochrysis sp.*ΑΣΠ35	0,030
Scendesmus sp. ΚΟΡΜ4/1	0,040	*Chlorococcum sp.* ΑΣΘ2	0,020
Chlorella sp. ΚΟΡΜ5	0,040	*Chlorococcum sp.* ΑΣΘ4	0,020
Chlorella sp. ΚΟΡΜ5/1	0,060	*Scendesmus sp.* ΑΟ2	0,030
Desmodesmus sp. ΚΟΡΜ6	0,070	ΑΟ2/1	0,030

.

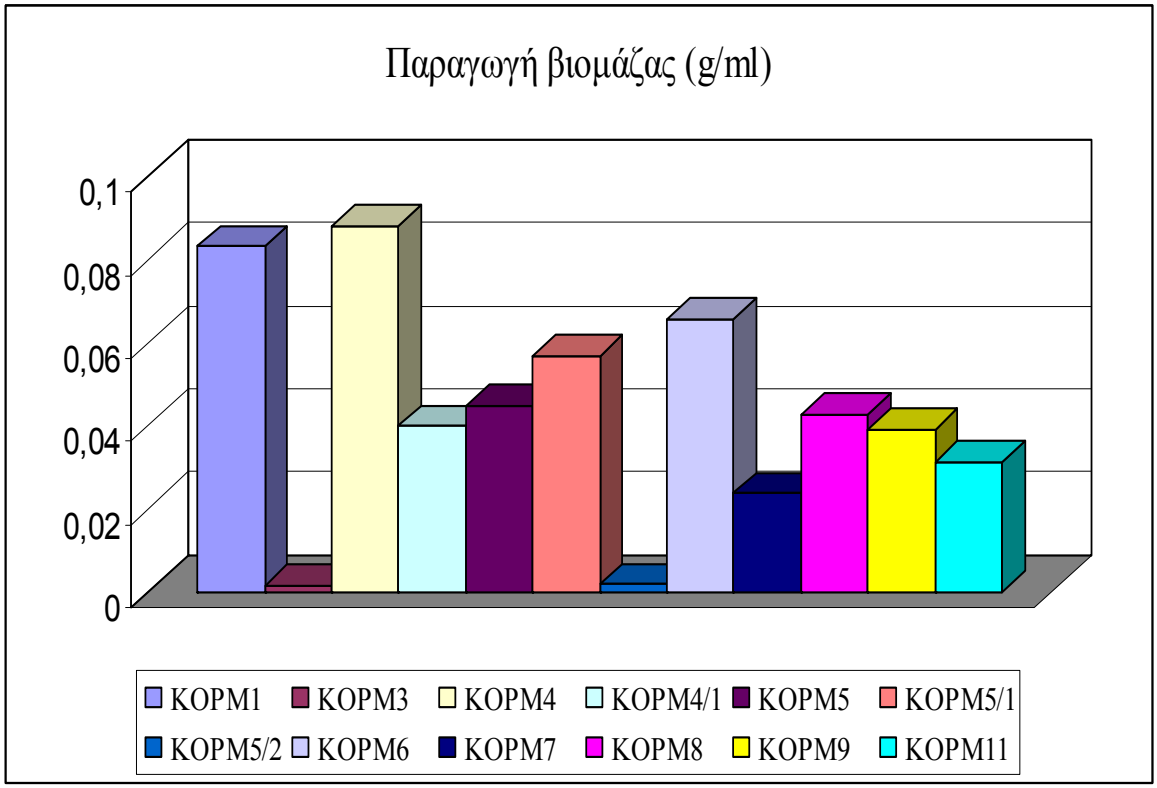
Από την περιοχή της Ακρόπολης (Πίνακας 3.5, Εικόνα 3.12) τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας είχαν τα στελέχη ***Chlorella* sp. AKA9** (0,09 g/ml), ***Chlorella* sp. AKA13** (0,09 g/ml**), *Coelastropsis sp.* AKB2** (0,08 g/ml), ***Bumilleriopsis* sp. AKA16** (0,12 g/ml), ***Chlorella* sp. AKA17** (0,095 g/ml). Τα στελέχη *Chlorella* sp. AKA7, AKB6, AKB12 και AKA12b έδωσαν τη μικρότερη παραγωγή βιομάζας (παραγωγή βιομάζας 0,037 g/ml, 0,0366 g/ml και 0,0303 g/ml αντίστοιχα).



Εικόνα 3.12. Παραγωγή βιομάζας από τα στελέχη μικροφυκών της Ακρόπολης. Τα μικροφύκη αναπτύχθηκαν σε υγρές κλειστές καλλιέργειες των 100 ml για 20 μέρες σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25 °C±1) και φωτισμού (φωτοπερίοδος 12:12 ώρες). Τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας είχαν τα στελέχη *Chlorella* sp. AKA9, *Chlorella* sp. AKA13, *Coelastropsis sp.* AKB3/2, *Bumilleriopsis* sp. AKA16, *Chlorella* sp. AKA4, *Chlorella* sp. AKA17.

Από τα στελέχη της λίμνης Κορώνεια (Πίνακας 3.5, Εικόνα 3.13) τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας είχαν τα στελέχη ***Scendesmus dissociatus* KOPM4** (0,093 g/ml) και ***Chlorella* sp. KOPM1** (0,083 g/ml**),** ωστόσο για περαιτέρω μελέτη επιλέχθηκε μόνο το στέλεχος *Scendesmus dissociatus* KOPM4 καθώς επιλέχθηκαν δύο στελέχη από το γένος *Chlorella* από

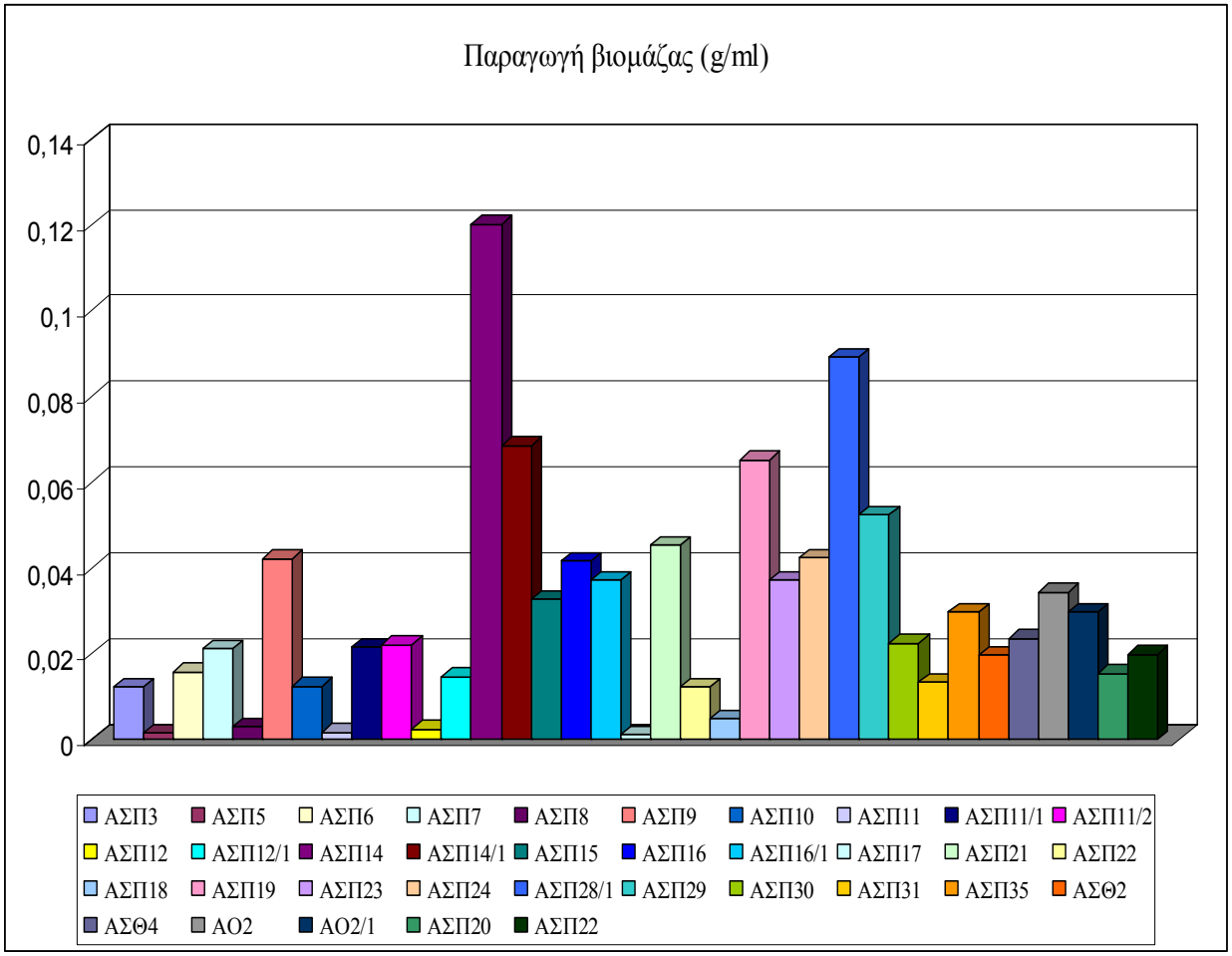
την περιοχή της Ακρόπολης. Τα στελέχη ΚΟΡΜ5/1 και ΚΟΡΜ6 με παραγωγή βιομάζας 0,057 και 0,067 g/ml αντίστοιχα, εμφάνισαν μεγάλη παραγωγή σε σχέση με τα ΚΟΡΜ5, ΚΟΡΜ7, ΚΟΡΜ8, ΚΟΡΜ9 και ΚΟΡΜ11 που έδωσαν τη μικρότερη παραγωγή βιομάζας, αλλά η παραγόμενη βιομάζα τους δεν ήταν αρκετά υψηλή ώστε τα μικροφύκη αυτά να επιλεγούν για περαιτέρω μελέτη.



Εικόνα 3.13. Παραγωγή βιομάζας από τα στελέχη μικροφυκών της λίμνης Κορώνεια. Τα μικροφύκη αναπτύχθηκαν σε υγρές κλειστές καλλιέργειες των 100 ml για 20 μέρες σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25 °C±1) και φωτισμού (φωτοπερίοδος 12:12 ώρες). Την υψηλότερη παραγωγή βιομάζας έδωσαν τα στελέχη ΚΟΡΜ1, ΚΟΡΜ4 και ΚΟΡΜ6.

Από την περιοχή του Απρόπυργου (Πίνακας 3.5, Εικόνα 3.14) τα στελέχη που έδωσαν τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας ήταν τα ΑΣΠ14 και *Pleurochrysis* sp. ΑΣΠ28/1 με παραγωγή βιομάζας 0,120 και 0,089 g/ml αντίστοιχα. Υψηλή παραγωγή βιομάζας έδωσαν επίσης τα στελέχη ΑΣΠ14/1 (0,07 g/ml), ΑΣΠ19 (0,06 g/ml) και ΑΣΠ29 (0,05 g/ml). Τη μικρότερη παραγωγή βιομάζας εμφάνισαν τα στελέχη ΑΣΠ5 (0,002 g/ml), ΑΣΠ11 (0,002 g/ml), ΑΣΠ12 (0,002 g/ml), ΑΣΠ17 (0,01 g/ml) και ΑΣΠ18 (0,005 g/ml). Το στέλεχος ΑΣΠ14 επιλέχθηκε για

περαιτέρω μελέτη καθώς τα μικροφύκη του γένους *Pleurochrysis,* βιβλιογραφικά δεν έχει βρεθεί πως παράγουν λιπίδια κατάλληλα για βιοντίζελ.



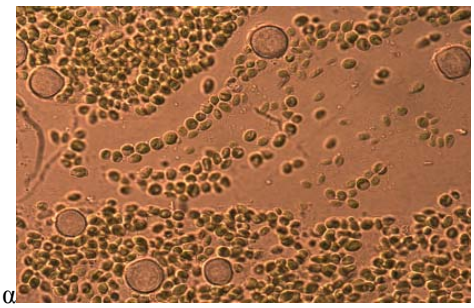
Εικόνα 3.14. Παραγωγή βιομάζας από τα στελέχη μικροφυκών του Ασπρόπυργου. Τα μικροφύκη αναπτύχθηκαν σε υγρές κλειστές καλλιέργειες των 100 ml σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25 °C±1) και φωτισμού (φωτοπερίοδος 12:12 ώρες). Τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας έδωσαν τα στελέχη ΑΣΠ14, ΑΣΠ14/1, ΑΣΠ19, ΑΣΠ28/1 και ΑΣΠ29.

Τα στελέχη που έδωσαν τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας επιλέχθηκαν και αναπτύχθηκαν σε ημιτροφοδοτούμενα συστήματα καλλιεργειών, σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25±1°C) και φωτισμού (φωτοπερίοδος 12:12h και ένταση φωτισμού 200μml/ms), όπως περιγράφονται στο Κεφάλαιο 2 (§ 2.6).

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν ημιτροφοδοτούμενες καλλιέργειες για τα στελέχη *Chlorella sp.* ΑΚΑ9, *Chlorella* sp. ΑΚΑ13, *Coelastropsis* sp. ΑΚΒ2, *Chlorella* sp. ΑΚΑ4, *Scendesmus dissociatus* ΚΟΡΜ4, *Chlorella sp.* ΑΚΑ17, *Bumilleriopsis* sp. ΑΚΑ16 και ΑΣΠ14.

***Chlorella sp.* ΑΚΑ9:**

Το στέλεχος *Chlorella sp.* ΑΚΑ9, καλλιέργήθηκε σε μεγάλο δοχείο καλλιέργειας (Εικόνα 3.15 β, γ) με τελικό όγκο καλλιέργειας τα 12 λίτρα. Η καλλιέργεια ξεκίνησε με 2 λίτρα θρεπτικού υποστρώματος Walne medium το οποίο εμβολιάστηκε με 2 λίτρα καλλιέργειας του στελέχους. Στο διάγραμμα που εμφανίζεται στην Εικόνα 3.16, παρουσιάζεται η ανάπτυξη του μικροφύκους κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (με βάση την Οπτική Πυκνότητα), οι μέρες στις οποίες πραγματοποιήθηκε προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος και η ποσότητα του θρεπτικού υποστρωματος που προστέθηκε κάθε φορά. Επίσης με βέλη υποδεικνύονται τα διαστήματα στα οποία υπολογίστηκαν οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης του μικροφύκους.

α  β γ

Εικόνα 3.15. (α) Φωτογραφία (100x) από φωτονικό μικροσκόπιο του μικροφύκους *Chlorella* sp. ΑΚΑ9, (β) Φωτογραφία της υγρής κλειστής καλλιέργειας του μικροφύκους *Chlorella* sp. ΑΚΑ9 10 μέρες μετά τον αρχικό εμβολιασμό, (γ) Φωτογραφία της υγρής κλειστής καλλιέργειας του μικροφύκους *Chlorella* sp. ΑΚΑ9 20 μέρες μετά τον αρχικό εμβολιασμό.

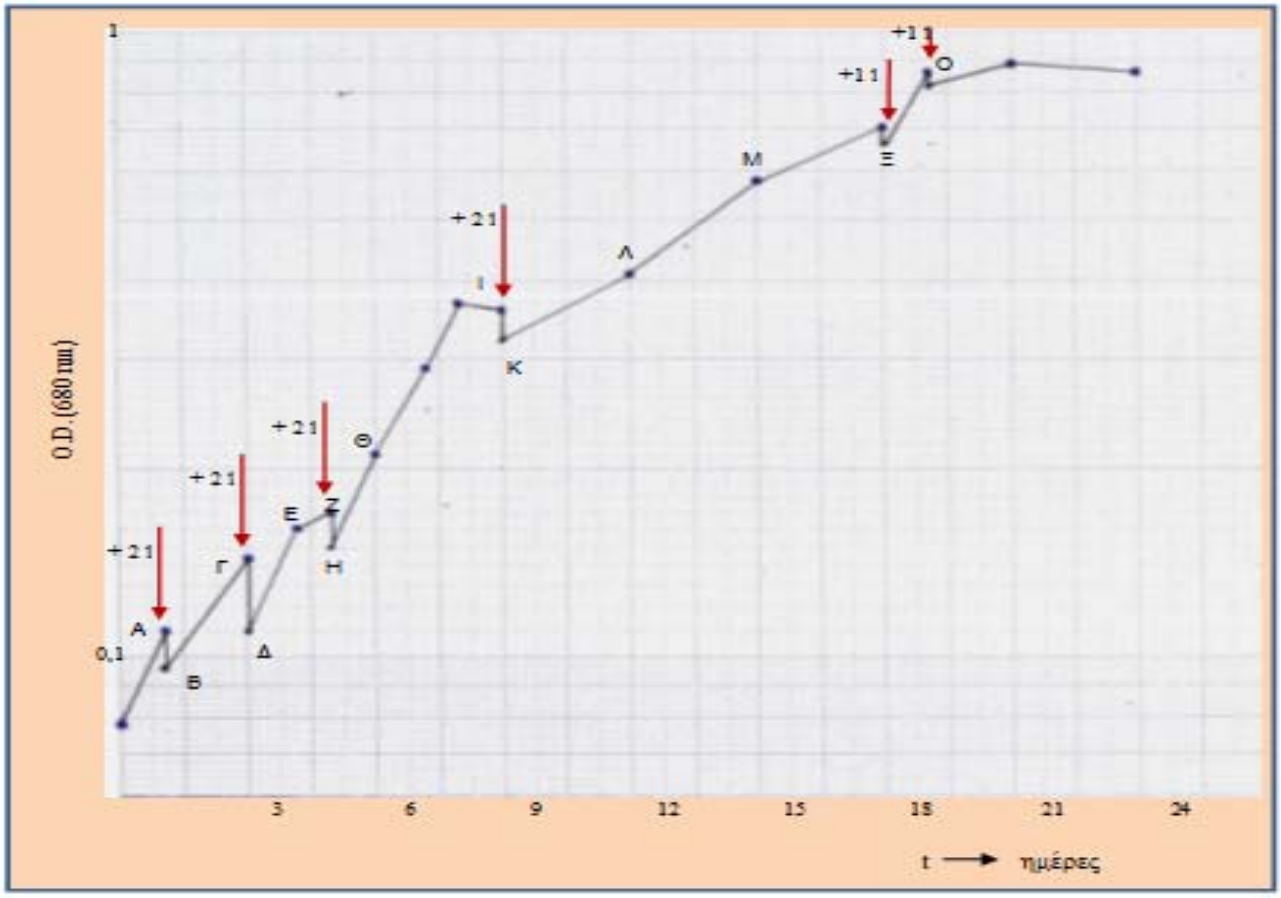
Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.16, στην καλλιέργεια του στελέχους *Chlorella sp.* ΑΚΑ9 έγινε προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος την $3^{η}$, $5^{η}$, $7^{η}$, $9^{η}$, $18^{η}$ και $19^{η}$ ημέρα καλλιέργειας. Στα χρονικά διαστήματα μεταξύ της προσθήκης θρεπτικού υποστρώματος και επόμενης μέτρησης οπτικής πυκνότητας υπολογίστηκαν οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης για το μικροφύκος. Στον Πίνακα 3.5 παρουσιάζονται οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης που υπολογίστηκαν για το στέλεχος *Chlorella sp.* ΑΚΑ9.

Από τους ειδικούς ρυθμούς αύξησης προκύπτει πως τη μέγιστη ανάπτυξη το μικροφύκος την εμφάνισε μετά την τέταρτη μέρα καλλιέργειας και έως την όγδοη, ωστόσο συνέχισε να παράγει βιομάζα μέχρι τη $19^{η}$ ημέρα. Ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης του στελέχους *Chlorella*

sp. AKA9 ήταν 0,3 h^{-1} και η παραγωγή βιομάζας μετά τις 20 ημέρες καλλιέργειας ήταν 1,65 g/l.

Πίνακας 3.5. Ειδικοί ρυθμοί αύξησης του στελέχους *Chlorella* sp. AKA9 σε ημιτροφοδοτούμενη καλλιέργεια στα χρονικά διαστήματα ανάμεσα στην προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος και επόμενης μέτρησης Οπτικής Πυκνότητας.

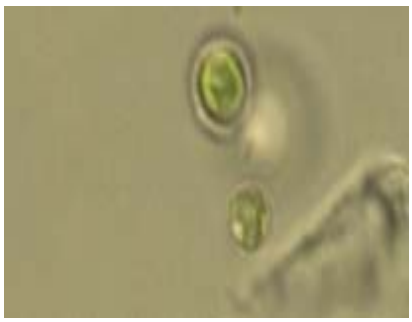
Χρονικά διαστήματα (ημέρες)	Ειδικοί ρυθμοί αύξησης (h^{-1})
1 - 3	$\mu_{max\ B\text{-}\Gamma} = 0,21$
3 - 4	$\mu_{max\ \Delta\text{-}E} = 0,24$
5 - 6	$\mu_{max\ H\text{-}I} = 0,32$
7 - 8	$\mu_{max\ K\text{-}\Lambda} = 0,39$



Εικόνα 3.16. Καμπύλη αύξησης του στελέχους *Chlorella* sp. AKA9 σε ημιτροφοδοτούμενη καλλιέργεια 12 l. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25±1°C) και φωτισμού (φωτοπερίοδος 12:12 h και ένταση φωτισμού 200 μml/ms). Στο Διάγραμμα παρουσιάζονται οι μέρες στις οποίες πραγματοποιήθηκε προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος με κόκκινα βέλη και η ποσότητα του θρεπτικού υποστρωματος που προστέθηκε κάθε φορά.

***Chlorella* sp. AKA13:**

Το στέλεχος *Chlorella sp.* AKA13, καλλιέργήθηκε σε μεγάλο δοχείο καλλιέργειας (Εικόνα 3.17 β, γ) με τελικό όγκο καλλιέργειας τα 12 λίτρα. Η καλλιέργεια ξεκίνησε με 1 λίτρο θρεπτικού υποστρώματος Walne medium το οποίο εμβολιάστηκε με μισό λίτρο καλλιέργειας του στελέχους. Στο διάγραμμα που εμφανίζεται στην Εικόνα 3.118, παρουσιάζεται η ανάπτυξη του μικροφύκους κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (με βάση την οπτική πυκνότητα), οι μέρες στις οποίες πραγματοποιήθηκε προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος και η ποσότητα του θρεπτικού υποστρωματος που προστέθηκε κάθε φορά. Επίσης με βέλη υποδεικνύονται τα διαστήματα στα οποία υπολογίστηκαν οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης του μικροφύκους.

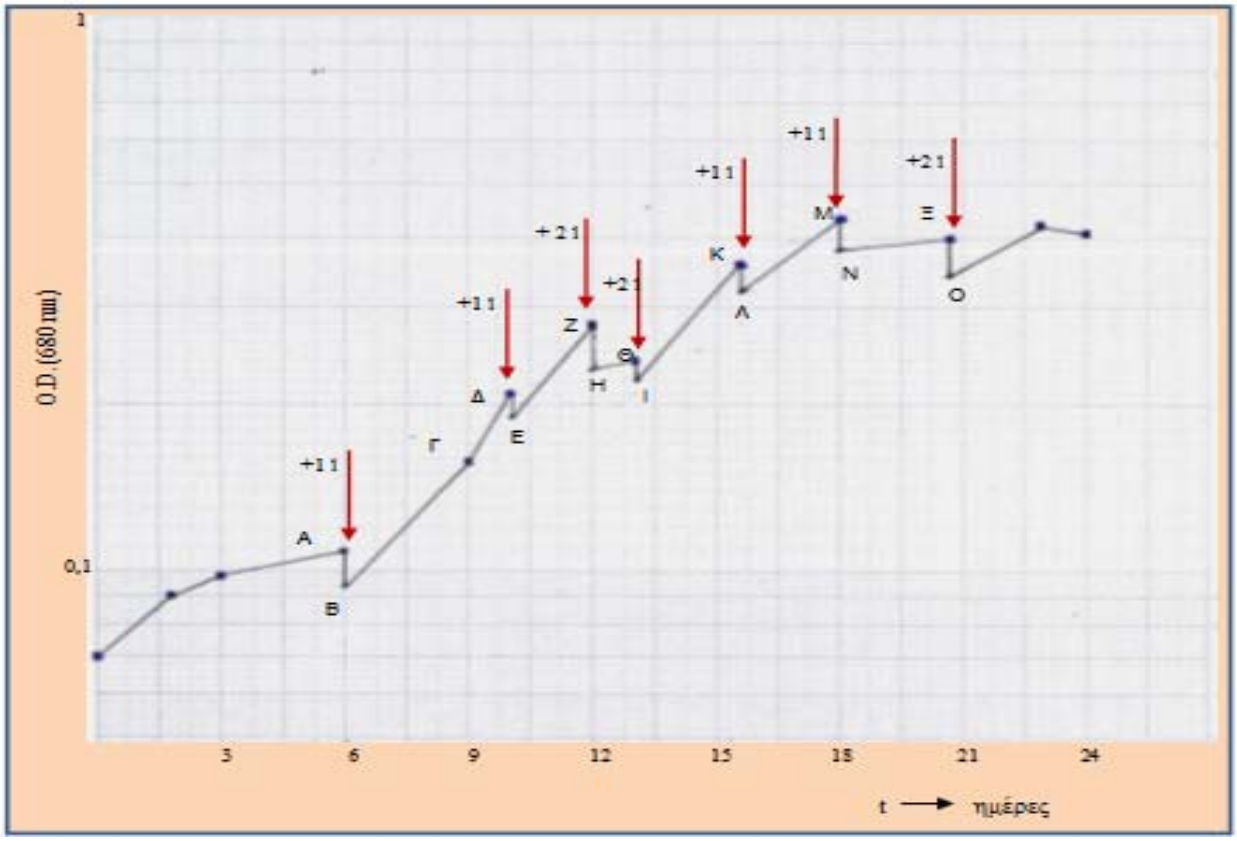
α  β γ

Εικόνα 3.17. (α) Φωτογραφία (100x) από φωτονικό μικροσκόπιο του μικροφύκους *Chlorella* sp. AKA13, (β) Φωτογραφία της υγρής καλλιέργειας του μικροφύκους *Chlorella* sp. AKA13 10 μέρες μετά τον αρχικό εμβολιασμό, (γ) Φωτογραφία της υγρής καλλιέργειας του μικροφύκους *Chlorella* sp. AKA13 20 μέρες μετά τον αρχικό εμβολιασμό.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.18, στην καλλιέργεια του στελέχους *Chlorella sp.* AKA13 έγινε προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος την $6^{η}$, $10^{η}$, $12^{η}$, $13^{η}$, $17^{η}$ και $18^{η}$ ημέρα καλλιέργειας. Στα χρονικά διαστήματα μεταξύ της προσθήκης θρεπτικού υποστρώματος και επόμενης μέτρησης οπτικής πυκνότητας υπολογίστηκαν οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης για το μικροφύκος. Στον Πίνακα 3.6 παρουσιάζονται οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης που υπολογίστηκαν για το στέλεχος *Chlorella sp.* AKA13.

Από τους ειδικούς ρυθμούς αύξησης προκύπτει πως τη μέγιστη ανάπτυξη το μικροφύκος την εμφάνισε μετά τη δέκατη μέρα καλλιέργειας και έως τη δωδέκατη. Στη συνέχεια η ανάπτυξη του μικροοργανισμού μέχρι τη $15^{η}$ μέρα καλλιέργειας μειώθηκε παρά την προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος. Τη $17^{η}$ μέρα έγινε ξανά προσθήκη θρεπτικού υποστρώμτος για να έχει ο

μικροοργανισμός νέα θρεπτικά ώστε να συνεχίσει να ανπτύσσεται αλλά μετά από μια ελάχιστη αύξηση μίας ημέαρς μπήκε στη φάση στασιμότητας. Ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης του στελέχους *Chlorella* sp. ΑΚΑ13 ήταν 0,13 h^{-1} και η παραγωγή βιομάζας μετά τις 20 ημέρες καλλιέργειας ήταν 0,85 g/l.



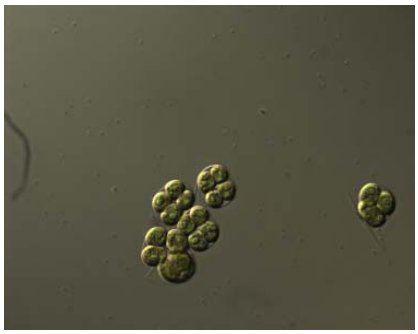
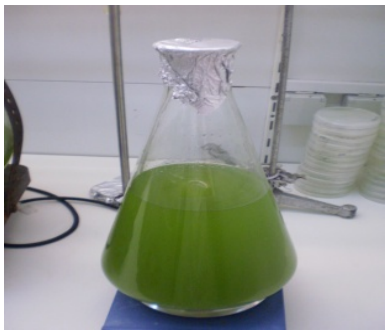
Εικόνα 3.18. Καμπύλη αύξησης του στελέχους *Chlorella sp.* ΑΚΑ13 σε υγρή κλειστή καλλιέργεια 12 l. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25±1°C) και φωτισμού (φωτοπερίοδος 12:12 h και ένταση φωτισμού 200 μml/ms). Στο Διάγραμμα παρουσιάζονται οι μέρες στις οποίες πραγματοποιήθηκε προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος με κόκκινα βέλη και η ποσότητα του θρεπτικού υποστρωματος που προστέθηκε κάθε φορά.

Πίνακας 3.6. Ειδικοί ρυθμοί αύξησης του στελέχους *Chlorella* sp. ΑΚΑ13 σε ημιτροφοδοτούμενη καλλιέργεια στα χρονικά διαστήματα ανάμεσα στην προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος και επόμενης μέτρησης οπτικής πυκνότητας.

Χρονικά διαστήματα (ημέρες)	**Ειδικοί ρυθμοί αύξησης (h^{-1})**
6 – 10	$\mu_{max\ B-\Delta} = 0,14$
10 – 12	$\mu_{max\ E-Z} = 0,13$
13 - 17	$\mu_{max\ I-K} = 0,11$

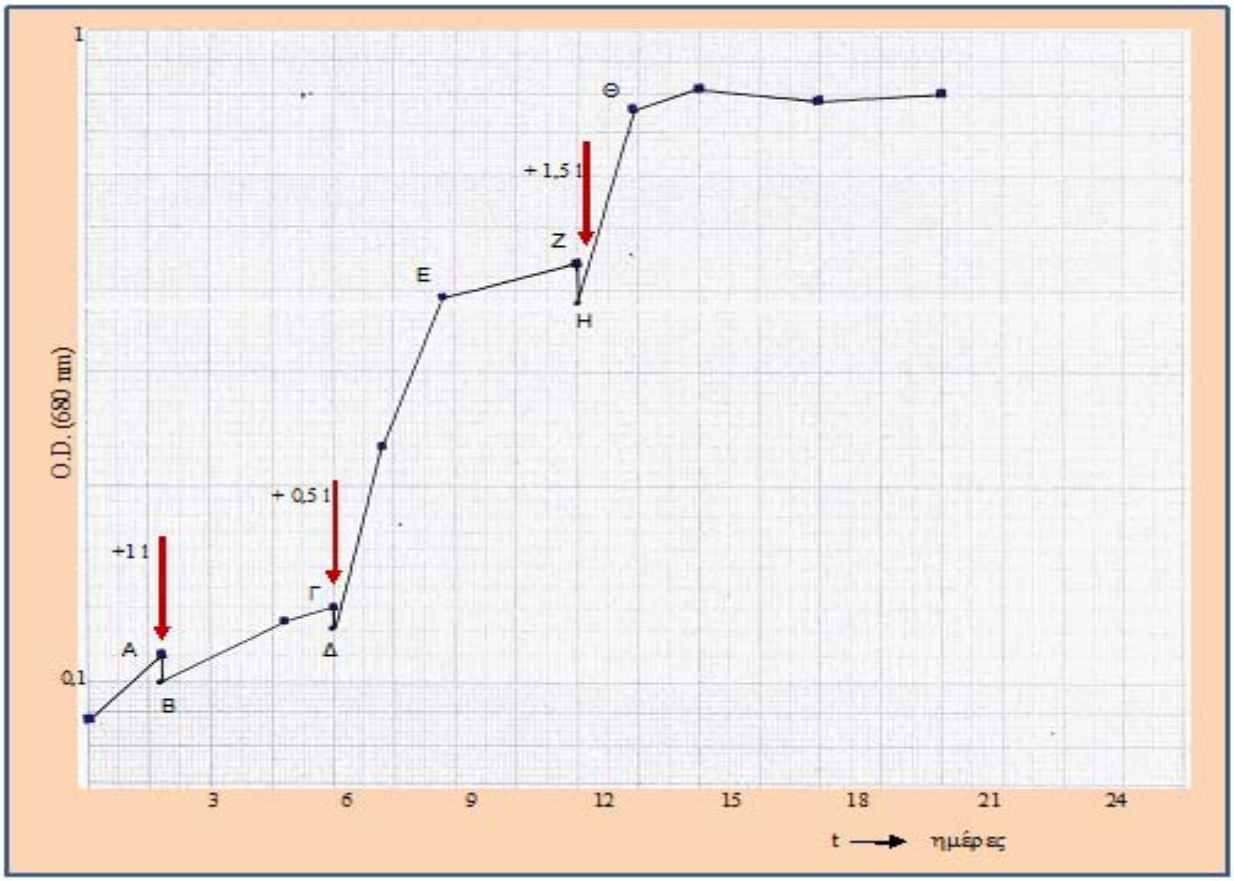
***Coelastropsis* sp. AKB2:**

Το στέλεχος *Coelastropsis* sp. AKB2, καλλιέργήθηκε κωνική φιάλη 3 λίτρων (Εικόνα 3.19 β, γ). Η καλλιέργεια ξεκίνησε με 1 λίτρο θρεπτικού υποστρώματος Walne medium το οποίο εμβολιάστηκε με μισό λίτρο καλλιέργειας του στελέχους. Στο διάγραμμα που εμφανίζεται στην Εικόνα 3.20, παρουσιάζεται η ανάπτυξη του μικροφύκους κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (με βάση την οπτική πυκνότητα), οι μέρες στις οποίες πραγματοποιήθηκε προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος και η ποσότητα του θρεπτικού υποστρωματος που προστέθηκε κάθε φορά. Επίσης με βέλη υποδεικνύονται τα διαστήματα στα οποία υπολογίστηκαν οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης του μικροφύκους.

α  β  γ

Εικόνα 3.19. (α) Φωτογραφία (100x)από φωτονικό μικροσκόπιο του μικροφύκους *Coelastropsis* sp. AKB2, (β) Φωτογραφία της υγρής καλλιέργειας του μικροφύκους *Coelastropsis* sp. AKB2 10 μέρες μετά τον αρχικό εμβολιασμό, (γ) Φωτογραφία της υγρής καλλιέργειας του μικροφύκους *Coelastropsis* sp. AKB2 20 μέρες μετά τον αρχικό εμβολιασμό.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.20, στην καλλιέργεια του στελέχους *Coelastropsis* sp. AKB2 έγινε προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος την $2^{η}$, $6^{η}$ και $12^{η}$ ημέρα καλλιέργειας. Στα χρονικά διαστήματα μεταξύ της προσθήκης θρεπτικού υποστρώματος και επόμενης μέτρησης οπτικής πυκνότητας υπολογίστηκαν οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης για το μικροφύκος. Στον Πίνακα 3.7 παρουσιάζονται οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης που υπολογίστηκαν για το στέλεχος *Coelastropsis* sp. AKB2.



Εικόνα 3.20. Καμπύλη αύξησης του στελέχους *Coelastropsis* sp. AKB2 σε υγρή κλειστή καλλιέργεια 3 l. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25±1°C) και φωτισμού (φωτοπερίοδος 12:12 h και ένταση φωτισμού 200 μml/ms). Στο Διάγραμμα παρουσιάζονται οι μέρες στις οποίες πραγματοποιήθηκε προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος με κόκκινα βέλη και η ποσότητα του θρεπτικού υποστρωματος που προστέθηκε κάθε φορά.

Πίνακας 3.7. Ειδικοί ρυθμοί αύξησης του στελέχους *Coelastropsis* sp. AKB2 σε ημιτροφοδοτούμενη καλλιέργεια στα χρονικά διαστήματα ανάμεσα στην προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος και επόμενης μέτρησης οπτικής πυκνότητας.

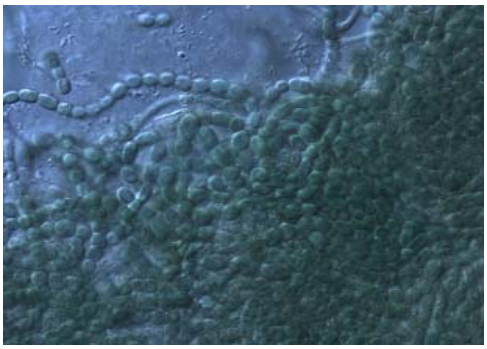
Χρονικά διαστήματα (ημέρες)	**Ειδικοί ρυθμοί αύξησης (h^{-1})**
7 - 8	$\mu_{max\ E\text{-}Z} = 0,37$
12 - 15	$\mu_{max\ \Theta\text{-}I} = 0,33$

Από τους ειδικούς ρυθμούς αύξησης προκύπτει πως τη μέγιστη ανάπτυξη το μικροφύκος την εμφάνισε από την έκτη έως την όγδοη ημέρα καλλιέργειας. Μετά την προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος τη 12 η ημέρα καλλιέργειας το μικροφύκος παρουσίασε αύξηση η οποία διήρκησε μέχρι τις 15 ημέρες όπου ο μικροοργανισμός μπήκε στη φάση στασιμότητας. Ο μέσος

ειδικός ρυθμός αύξησης του στελέχους *Coelastropsis* sp. AKB2 ήταν 0,35 h^{-1} και η παραγωγή βιομάζας μετά τις 20 ημέρες καλλιέργειας ήταν 1 g/l.

***Bumilleriopsis* sp. AKA16:**

Το στέλεχος *Bumilleriopsis* sp. AKA16, καλλιέργήθηκε κωνική φιάλη 3 λίτρων (Εικόνα 3.21). Η καλλιέργεια ξεκίνησε με μισό λίτρο θρεπτικού υποστρώματος Walne medium το οποίο εμβολιάστηκε με μισό λίτρο καλλιέργειας του στελέχους. Στο διάγραμμα που εμφανίζεται στην Εικόνα 3.22, παρουσιάζεται η ανάπτυξη του μικροφύκους κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (με βάση την οπτική πυκνότητα), οι μέρες στις οποίες πραγματοποιήθηκε προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος και η ποσότητα του θρεπτικού υποστρωματος που προστέθηκε κάθε φορά. Επίσης με βέλη υποδεικνύονται τα διαστήματα στα οποία υπολογίστηκαν οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης του μικροφύκους.

α  β

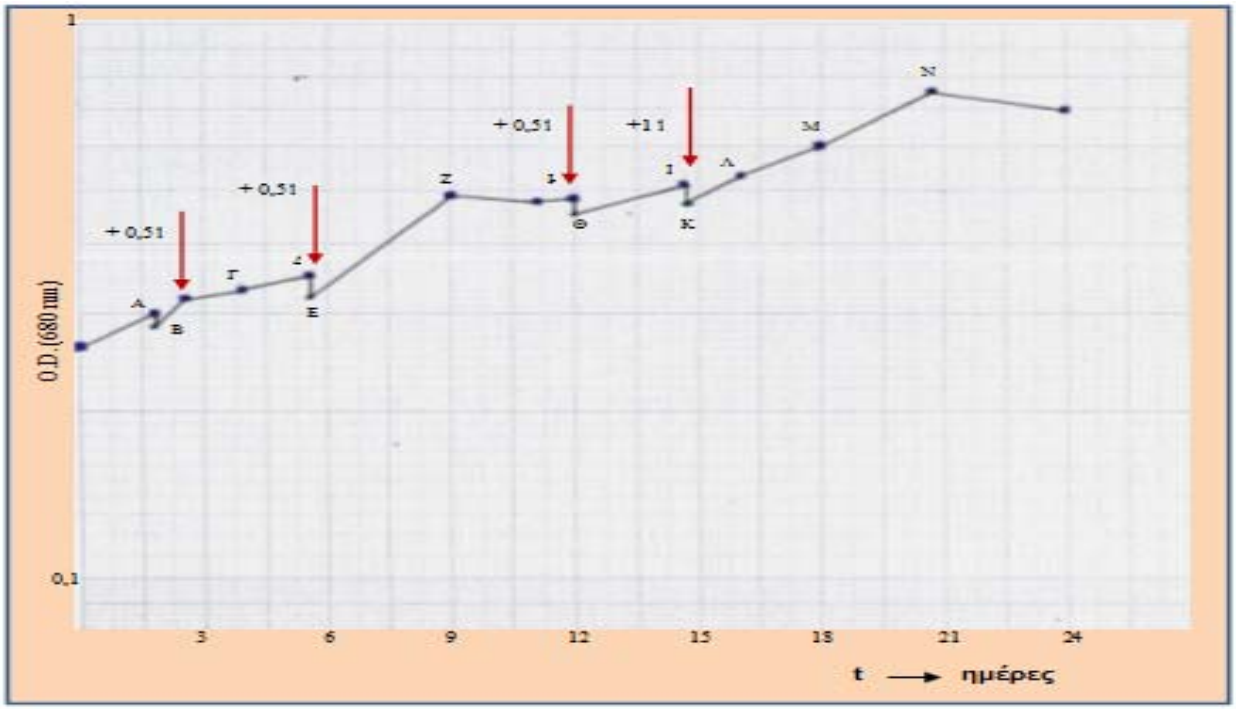
Εικόνα 3.21. (α) Φωτογραφία (100x)από φωτονικό μικροσκόπιο του μικροφύκους *Bumilleriopsis* sp. AKA16, (β) Φωτογραφία της υγρής καλλιέργειας του μικροφύκους *Bumilleriopsis* sp. AKA16 20 μέρες μετά τον αρχικό εμβολιασμό.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.22, στην καλλιέργεια του στελέχους *Bumillleriopsis* sp. AKA16 έγινε προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος την $1^{η}$, $5^{η}$, $12^{η}$ και $14^{η}$ ημέρα καλλιέργειας. Στα χρονικά διαστήματα μεταξύ της προσθήκης θρεπτικού υποστρώματος και επόμενης μέτρησης οπτικής πυκνότητας υπολογίστηκαν οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης για το μικροφύκος. Στον Πίνακα 3.8 παρουσιάζονται οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης που υπολογίστηκαν για το στέλεχος *Bumillleriopsis* sp. AKA16.

Πίνακας 3.8. Ειδικοί ρυθμοί αύξησης του στελέχους *Bumilleriopsis* sp. AKA16 σε ημιτροφοδοτούμενη καλλιέργεια στα χρονικά διαστήματα ανάμεσα στην προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος και επόμενης μέτρησης οπτικής πυκνότητας.

Χρονικά διαστήματα (ημέρες)	Ειδικοί ρυθμοί αύξησης (h^{-1})
1 - 5	$\mu_{max\ B\text{-}\Gamma} = 0,15$
6 - 9	$\mu_{max\ E\text{-}Z} = 0,13$
12 - 14	$\mu_{max\ M\text{-}N} = 0,15$

Από τους ειδικούς ρυθμούς αύξησης προκύπτει πως τη μέγιστη ανάπτυξη το μικροφύκος την εμφάνισε τις πρώτες 5 μέρες καλλιέργειας. Μετά την προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος τη 12 η ημέρα καλλιέργειας το μικροφύκος παρουσίασε αύξηση η οποία διήρκησε μέχρι τις 15 ημέρες όπου ο μικροοργανισμός μπήκε στη φάση στασιμότητας. Ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης του στελέχους *Bumilleriopsis* sp. AKA16 ήταν 0,16 h^{-1} και η παραγωγή βιομάζας μετά τις 20 ημέρες καλλιέργειας ήταν 2,12 g/l.



Εικόνα 3.22. Καμπύλη αύξησης του στελέχους *Bumilleriopsis* sp. AKA16 σε υγρή κλειστή καλλιέργεια 3 l. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25±1°C) και φωτισμού (φωτοπερίοδος 12:12 h και ένταση φωτισμού 200 μml/ms). Στο Διάγραμμα παρουσιάζονται οι μέρες στις οποίες πραγματοποιήθηκε προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος με κόκκινα βέλη και η ποσότητα του θρεπτικού υποστρωματος που προστέθηκε κάθε φορά.

***Chlorella* sp. AKA17:**

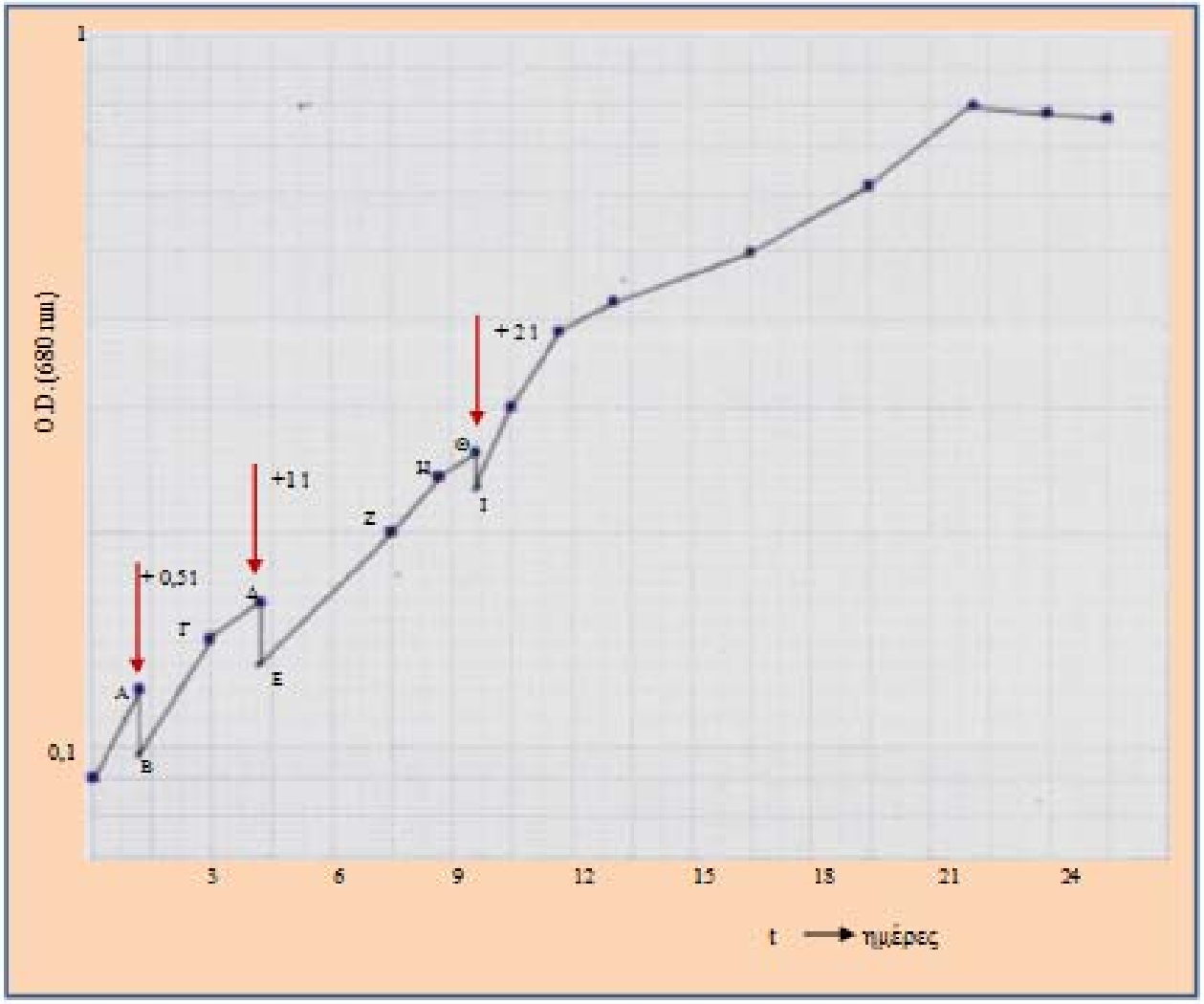
Το στέλεχος *Chlorella* sp. AKA17, καλλιέργήθηκε κωνική φιάλη 3 λίτρων. Η καλλιέργεια ξεκίνησε με μισό λίτρο θρεπτικού υποστρώματος Walne medium το οποίο εμβολιάστηκε με μισό λίτρο καλλιέργειας του στελέχους. Στο διάγραμμα που εμφανίζεται στην Εικόνα 3.23, παρουσιάζεται η ανάπτυξη του μικροφύκους κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (με βάση την οπτική πυκνότητα), οι μέρες στις οποίες πραγματοποιήθηκε προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος και η ποσότητα του θρεπτικού υποστρωματος που προστέθηκε κάθε φορά

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.23, στην καλλιέργεια του στελέχους *Chlorella sp.* AKA17 έγινε προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος την $1^{η}$, $4^{η}$ και $10^{η}$ ημέρα καλλιέργειας. Στα χρονικά διαστήματα μεταξύ της προσθήκης θρεπτικού υποστρώματος και επόμενης μέτρησης οπτικής πυκνότητας υπολογίστηκαν οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης για το μικροφύκος. Στον Πίνακα 3.9 παρουσιάζονται οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης που υπολογίστηκαν για το στέλεχος *Chlorella sp.* AKA17.

Πίνακας 3.9. Ειδικοί ρυθμοί αύξησης του στελέχους *Chlorella* sp. σε ημιτροφοδοτούμενη καλλιέργεια στα χρονικά διαστήματα ανάμεσα στην προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος και επόμενης μέτρησης οπτικής πυκνότητας.

Χρονικά διαστήματα (ημέρες)	**Ειδικοί ρυθμοί αύξησης (h^{-1})**
1 - 4	$\mu_{max\ B\text{-}\Gamma} = 0,17$
4 - 7	$\mu_{max\ E\text{-}Z} = 0,21$

Από τους ειδικούς ρυθμούς αύξησης προκύπτει πως τη μέγιστη ανάπτυξη το μικροφύκος την εμφάνισε μεταξύ τέταρτης και έβδομης ημέρας καλλιέργειας. Μετά τη $15η^{η}$ ημέρα καλλιέργειας ο μικροοργανισμός μπήκε στη φάση στασιμότητας. Ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης του στελέχους *Chlorella* sp. AKA17 ήταν 0,0,19 h^{-1} και η παραγωγή βιομάζας μετά τις 20 ημέρες καλλιέργειας ήταν 2,28 g/l.

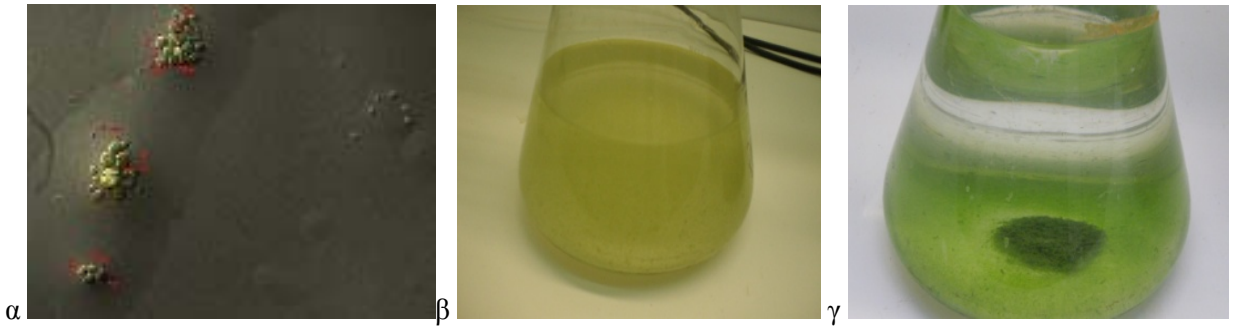


Εικόνα 3.23. Καμπύλη αύξησης του στελέχους *Chlorella* sp. AKA17 σε υγρή κλειστή καλλιέργεια 3 l. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25±1°C) και φωτισμού (φωτοπερίοδος 12:12 h και ένταση φωτισμού 200 μml/ms). Στο Διάγραμμα παρουσιάζονται οι μέρες στις οποίες πραγματοποιήθηκε προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος με κόκκινα βέλη και η ποσότητα του θρεπτικού υποστρωματος που προστέθηκε κάθε φορά.

Scendesmus dissociatus KOPM4:

Το στέλεχος *Scendesmus dissociatus* KOPM4, καλλιεργήθηκε σε κωνική φιάλη 3 λίτρων (Εικόνα 3.24). Η καλλιέργεια ξεκίνησε με μισό λίτρο θρεπτικού υποστρώματος Walne medium το οποίο εμβολιάστηκε με μισό λίτρο καλλιέργειας του στελέχους. Μετά τις πρώτες 10 ημέρες ανάπτυξης δεν παρουσιάστηκε ιδιαίτερη αύξηση της βιομάζας, καθώς οι τιμές της φωτομέτρησης της βιομάζας στα 680 nm ήταν πολύ χαμηλές. Στις 13 ημέρες ανάπτυξης άρχισαν να σχηματίζονται συσσωματώματα στον πυθμένα της κωνικής φιάλης παρά την παρουσία

ανάδευσης και δεν ήταν δυνατή η περαιτέρω φωτομέτρηση της βιομάζας. Η βιομάζα που συλλέχθηκε στο τέλος της καλλιέργειας ήταν 0.59 g/l.



Εικόνα 3.24. (α) Φωτογραφία (100x) από φωτονικό μικροσκόπιο του μικροφύκους *Scendesmus dissociatus* KOPM4, (β) Φωτογραφία της υγρής καλλιέργειας του μικροφύκους *Scendesmus dissociatus* KOPM4 10 μέρες μετά τον αρχικό εμβολιασμό, (γ) Φωτογραφία της υγρής καλλιέργειας του μικροφύκους *Scendesmus dissociatus* KOPM4 20 μέρες μετά τον αρχικό εμβολιασμό.

Στέλεχος ΑΣΠ14:

Το στέλεχος ΑΣΠ14, καλλιέργήθηκε κωνική φιάλη 3 λίτρων. Η καλλιέργεια ξεκίνησε με μισό λίτρο θρεπτικού υποστρώματος Walne medium το οποίο εμβολιάστηκε με μισό λίτρο καλλιέργειας του στελέχους. Στο διάγραμμα που εμφανίζεται στην Εικόνα 3.25, παρουσιάζεται η ανάπτυξη του μικροφύκους κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (με βάση την οπτική πυκνότητα), οι μέρες στις οποίες πραγματοποιήθηκε προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος και η ποσότητα του θρεπτικού υποστρωματος που προστέθηκε κάθε φορά

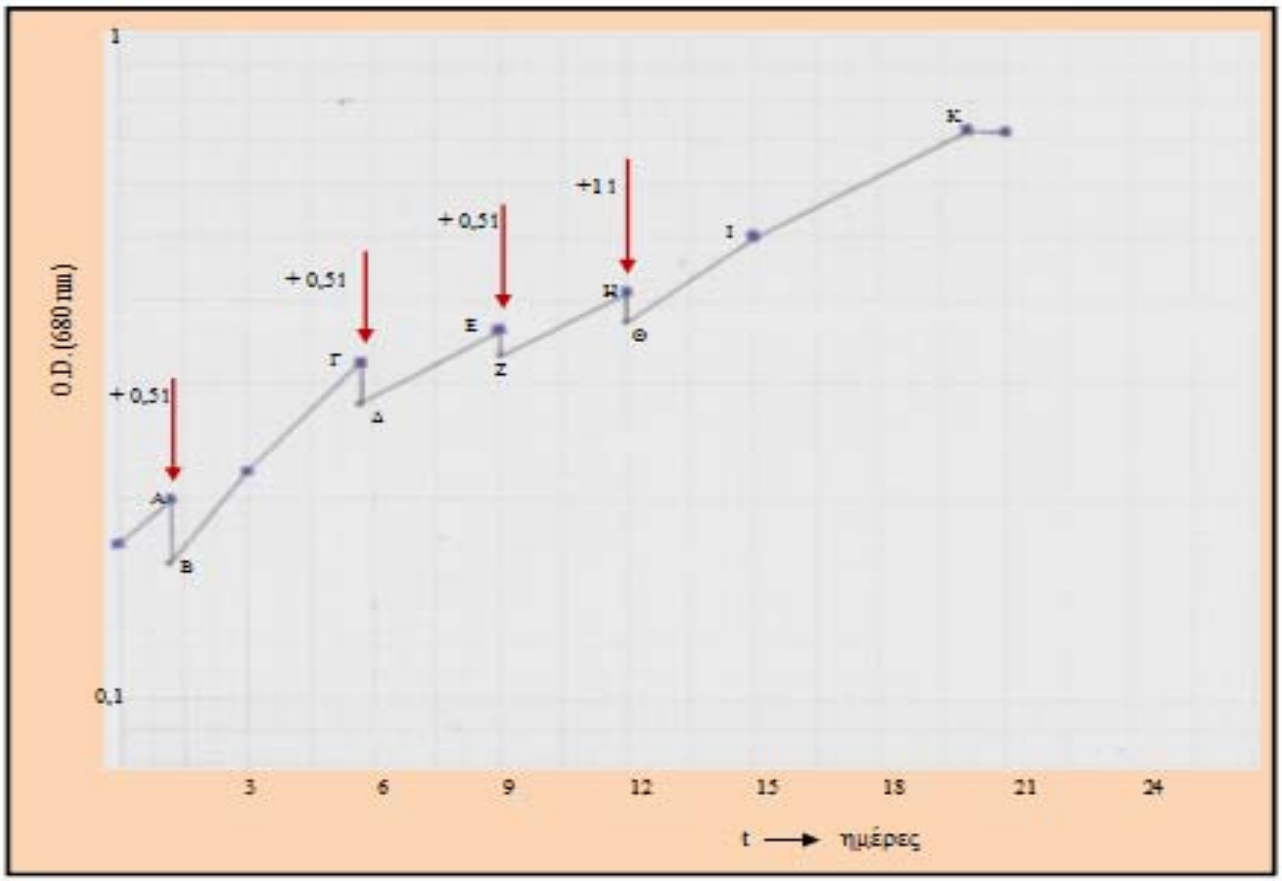
Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.25, στην καλλιέργεια του στελέχους ΑΣΠ14 έγινε προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος την $1^{η}$, $5^{η}$, $9^{η}$ και $12^{η}$ ημέρα καλλιέργειας. Στα χρονικά διαστήματα μεταξύ της προσθήκης θρεπτικού υποστρώματος και επόμενης μέτρησης οπτικής πυκνότητας υπολογίστηκαν οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης για το μικροφύκος. Στον Πίνακα 3.10 παρουσιάζονται οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης που υπολογίστηκαν για το στέλεχος ΑΣΠ14.

Από τους ειδικούς ρυθμούς αύξησης προκύπτει πως τη μέγιστη ανάπτυξη το μικροφύκος την εμφάνισε μεταξύ τέταρτης και έβδομης ημέρας καλλιέργειας. Με τη σταδιακή προσθήκη υποστρώματος στις 5, 9 και 12 ημέρες καλλιέργειας ο μικροοργανιμσός διατήρησε τη ικανότητα ανάπτυξής του. Μετά τη 15η ^{η} ημέρα καλλιέργειας ο μικροοργανισμός μπήκε στη φάση

στασιμότητας. Ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης του στελέχους ΑΣΠ14 ήταν 0,12 h^{-1} και η παραγωγή βιομάζας μετά τις 20 ημέρες καλλιέργειας ήταν 1,5 g/l.

Πίνακας 3.10. Ειδικοί ρυθμοί αύξησης του ΑΣΠ14 σε ημιτροφοδοτούμενη καλλιέργεια στα χρονικά διαστήματα ανάμεσα στην προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος και επόμενης μέτρησης οπτικής πυκνότητας.

Χρονικά διαστήματα (ημέρες)	Ειδικοί ρυθμοί αύξησης (h^{-1})
1 - 5	$M_{max1} = 0,14$
5 - 9	$M_{max2} = 0,1$
9 - 12	$\mu_{max3} = 0,1$
12 - 15	$\mu_{max4} = 0,14$
18 - 21	$\mu_{max5} = 0,09$



Εικόνα 3.25. Καμπύλη αύξησης του στελέχους ΑΣΠ14 σε υγρή κλειστή καλλιέργεια 3 l. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25±1°C) και φωτισμού (φωτοπερίοδος 12:12 h και ένταση φωτισμού 200 μml/ms). Στο Διάγραμμα παρουσιάζονται οι μέρες στις οποίες πραγματοποιήθηκε προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος με κόκκινα βέλη και η ποσότητα του θρεπτικού υποστρωματος που προστέθηκε κάθε φορά.

Στον Πίνακα 3.11 παρουσιάζεται η παραγωγή βιομάζας (g/l) για κάθε μικροφύκος που μελετήθηκε. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.11, τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας έδωσαν τα στελέχη *Chlorella sp.* ΑΚΑ9, *Chlorella* sp. ΑΚΑ17, *Bumilleriopsis* sp. ΑΚΑ16 και ΑΣΠ14 (1,65 g/l, 2,28 g/l, 2,12 g/l και 1,5 g/l αντίστοιχα). Τη μικρότερη παραγωγή βιομάζας έδωσαν τα στελέχη *Chlorella sp.* ΑΚΑ13 (0,85 g/l) και *Scendesmus dissociatus* ΚΟΡΜ4 (0,59 g/l). Παρόλα αυτά, και τα εφτά μικροφύκη επιλέχθηκαν για ανάλυση του λιπιδικού τους προτύπου. Το στέλεχος *Scendesmus dissociatus* ΚΟΡΜ4 που έδωσε τη μικρότερη παραγωγή βιομάζας έχει βρεθεί πως είναι καλός υποψήφιος για παραγωγή λιπιδίων κατάλληλων για βιοντίζελ, ενώ τα στελέχη *Coelastropsis* sp. ΑΚΒ2 και ΑΣΠ14, παρουσίαζαν ενδιαφέρον καθώς το λιπιδικό πρότυπο των μικροφυκών που ανήκουν σε αυτό το γένος δεν είναι ιδιαίτερα μελετημένο.

Πίνακας 3.11. Παραγωγή βιομάζας από τις ημιτροφοδοτουμενες καλλιέργειες των επιλεγμένων μικροφυκών

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΒΙΟΜΑΖΑ (g/l)
Chlorella sp. ΑΚΑ9	**1,65**
Chlorella sp. ΑΚΑ13	0,85
Coelastropsis sp. ΑΚΒ2	1,00
Scendesmus dissociatus ΚΟΡΜ4	0,59
Chlorella sp. ΑΚΑ17	**2,28**
Bumilleriopsis sp. ΑΚΑ16	**2,12**
ΑΣΠ14	**1,50**

3.3.1.1 Ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση των παραγόμενων λιπιδίων από τα απομονωμένα μικροφύκη

Μετά την επιλογή των στελεχών με τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας (Πίνακας 3.11) έγινε χρώση των κυττάρων των στελεχών αυτών με τη λιποφιλική φθορίζουσα χρωστική BODIPY 505/515 (§2.7), με σκοπό να εντοπιστούν τα στελέχη που συσσωρεύουν στα κύτταρά τους τα περισσότερα λιπίδια.

Αρχικά βρέθηκε η κατάλληλη συγκέντρωση χρωστικής με την οποία «βάφτηκαν» τα κύτταρα (§2.7.1). Από τις τρεις συγκεντρώσεις χρωστικής BODIPY 505/515 που δοκιμάστηκαν (0,67 μl/ml, 0,8 μl/ml και 1 μl/ml), η καλύτερη χρώση επιτεύχθηκε με συγκέντρωση 1 μl/ml. Με χρήση της μικρότερης συγκέντρωσης 0,67 μl/ml δεν παρατηρήθηκε χρώση σε κανένα από τα

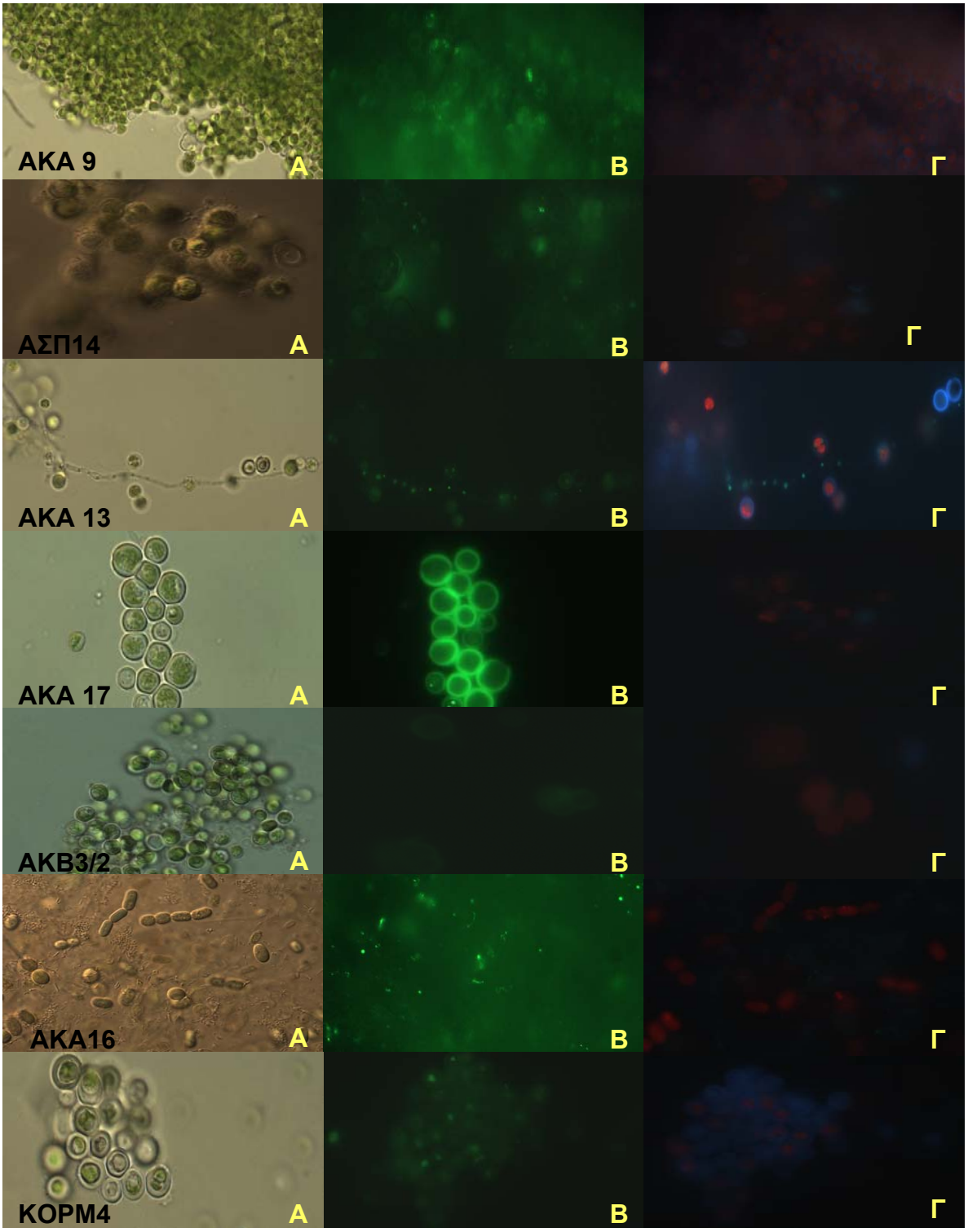
εξεταζόμενα μικροφύκη ή κυανοβακτήρια. Η συγκέντρωση χρωστικής 0,8 μl/ml οδήγησε σε χρώση των κυττάρων ωστόσο όχι αρκετά έντονη ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα. Με χρήση συγκέντρωσης χρωστικής 1 μl/ml εμφάνισαν ικανό φθορισμό τα κύτταρα όλων των εξεταζόμενων μικροφυκών. Ωστόσο σε μερικές περιπτώσεις εμφανίστηκε και φθορισμός του θρεπτικού υποστρώματος. Στη συνέχεια δοκιμάστηκαν διάφοροι χρόνοι χρώσης (5, 10 και 15 λεπτά) και βρέθηκε ο κατάλληλος χρόνος για το κάθε στέλεχος μικροφύκους. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3.12) παρουσιάζεται για κάθε μικροφύκος η διάρκεια του φθορισμού, όπως παρατηρήθηκε και μετρήθηκε στο μικροσκόπιο, για τους διαφορετικούς χρόνους χρώσης με χρήση συγκέντρωσης χρωστικής 1 μl/ml.

Πίνακας 3.12. Εφαρμογή χρώσης με χρήση της φθορίζουσας χρωστικής BODIPY 505/515 σε κάθε στέλεχος μικροφύκους και μέτρης της διάρκειας φθορισμού με παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

	Διάρκεια Φθορισμού (min)						
Χρόνος χρώσης (min)	***Chlorella sp.* ΑΚΑ9**	***Chlorella sp.* ΑΚΑ13**	***Coelastropsis sp.* ΑΚΒ2**	**Geminella sp. ΑΚΑ16**	***Chlorella sp.* ΑΚΑ17**	***Scendesmus sp.* ΚΟΡΜ4**	**ΑΣΠ14**
5	3	2	2	3	6	-	5
10	8	10	5	5	10	4	10
15	10	10	8	6	15	8	10

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.12 , τα περισσότερα στελέχη μετά τα 10 λεπτά επώασης στο σκοτάδι με τη χρωστική διατηρούν το φθορισμό τους για αρκετό χρόνο ώστε να παρατηρηθούν και να φωτογραφηθούν στο μικροσκόπιο. Τα στελέχη *Coelastropsis* sp. ΑΚΒ3/2, *Scendesmus dissociatus* ΚΟΡΜ4 και *Geminella* sp. ΑΚΑ16 παρουσίασαν δυσκολία στη χρώση των κυττάρων τους, καθώς η χρωστική ήθελε πολύ χρόνο για να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη και να βάψει τα λιποσώματά τους. Μετά από 15 λεπτά επώασης με τη χρωστική η ένταση του φθορισμού παρέμενε αρκετά έντονη ώστε να είναι δυνατή η φωτογράφισή τους.

Στην Εικόνα 3.26 φαίνονται τα αποτελέσματα από τη χρώση των κυττάρων των επιλεγμένων στελεχών με τη φθορίζουσα χρωστική στο πράσινο φάσμα καθώς και ο αυτοφθορισμός των διαφόρων οργανιδίων (κυρίως των χλωροπλαστών) στο μπλε φάσμα του μικροσκοπίου φθορισμού. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.26, σε κάποια κύτταρα μικροφυκών τα λιπίδια φαίνονται να είναι συσσωρευμένα στην κυτταρική μεμβράνη ενώ σε άλλα ξεχωρίζουν τα λιποσώματα που περιέχουν λιπίδια.



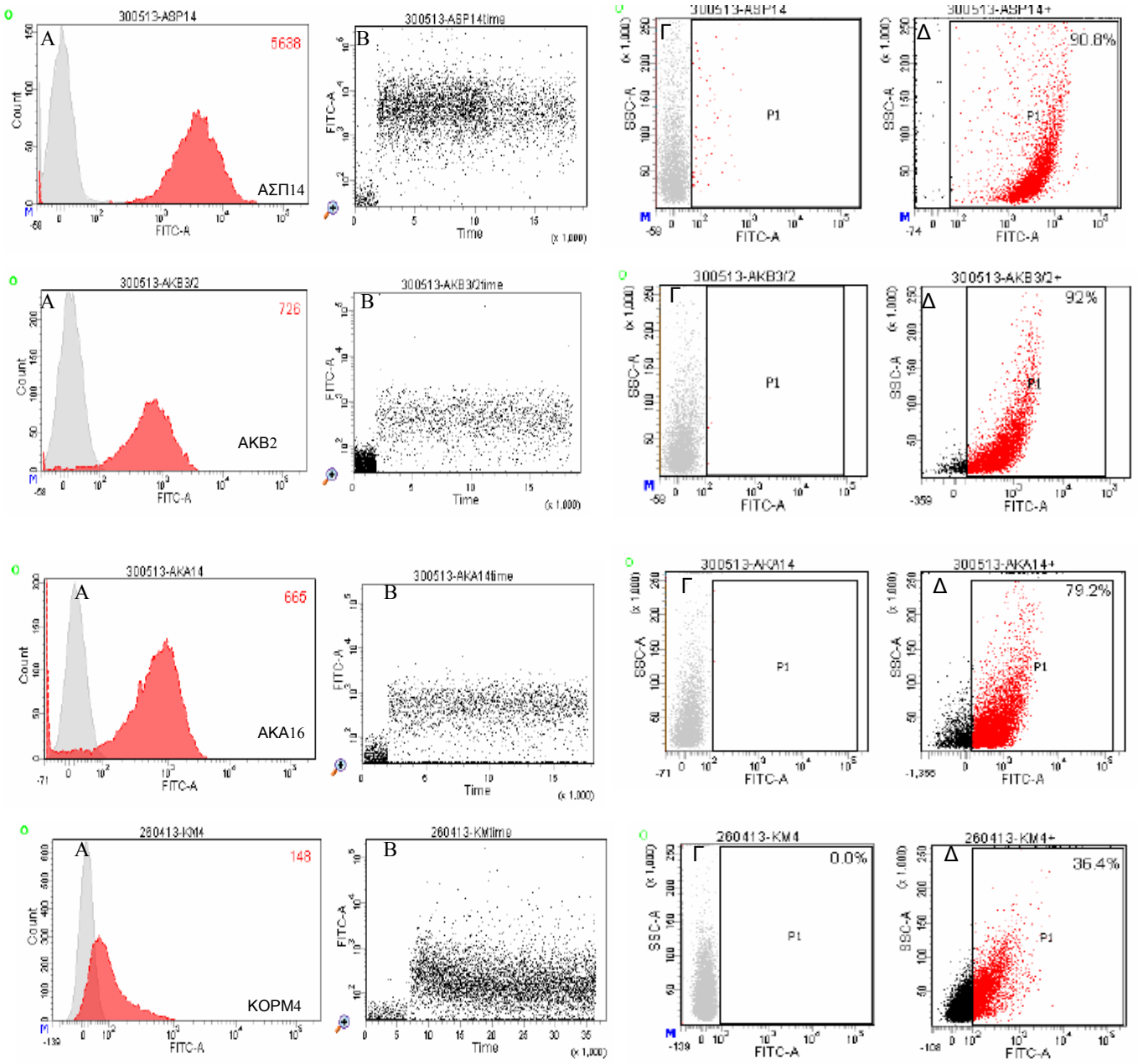
Εικόνα 3.26. Φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού σε μεγέθυνση 100x των μικροφυκών *Chlorella sp.* AKA9, *Chlorella sp.* AKA13, *Chlorella* sp. AKA17, *Coelastropsis* sp. AKB3/2 , *Geminella* sp. AKA16 και *Scendesmus dissociatus* KOPM4. (A) κύτταρα πριν τη χρώση, (B) με πράσινο χρώμα φαίνεται ο φθορισμός της χρωστικής η οποία έχει βάψει τα συσσωρευμένα στο κύτταρο λιπίδια και (Γ) με μπλε και κόκκινο χρώμα φαίνεται ο αυτοφθορισμός των κυττάρων στο μπλε φάσμα του μικροσκοπίου φθορισμού.

Τα στελέχη *Chlorella sp.* ΑΚΑ9, *Chlorella sp.* ΑΚΑ13, *Scendesmus dissociatus* ΚΟΡΜ4, *Geminella* sp. ΑΚΑ16 και ΑΣΠ14 εμφάνισαν φθορισμό σε διάφορα σωματίδια μέσα στο κυτταρόπλασμα τα οποία πιθανώς είναι λιποσώματα (Εικόνα 3.26). Το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 εμφάνισε επίσης έντονο φθορισμό στην κυτταρική του μεμβράνη, γεγονός που υποδεικνύει πως και αυτό το μικροφύκος συσσωρεύει τα λιπίδιά του εκεί. Το στέλεχος *Coelastropsis* sp. ΑΚΒ3/2 εμφάνισε επίσης έντονο φθορισμό στην κυτταρική του μεμβάνη. Τα κύτταρα των μικροφυκών *Geminella* sp. ΑΚΑ16, *Coelastropsis* sp. ΑΚΒ2 και ΑΣΠ14 εμφάνισαν τον πιο έντονο φθορισμό ενώ τα κύτταρα των μικροφυκών *Chlorella sp.* ΑΚΑ9 και *Scendesmus dissociatus* ΚΟΡΜ4 εμφάνισαν τον πιο ασθενή.

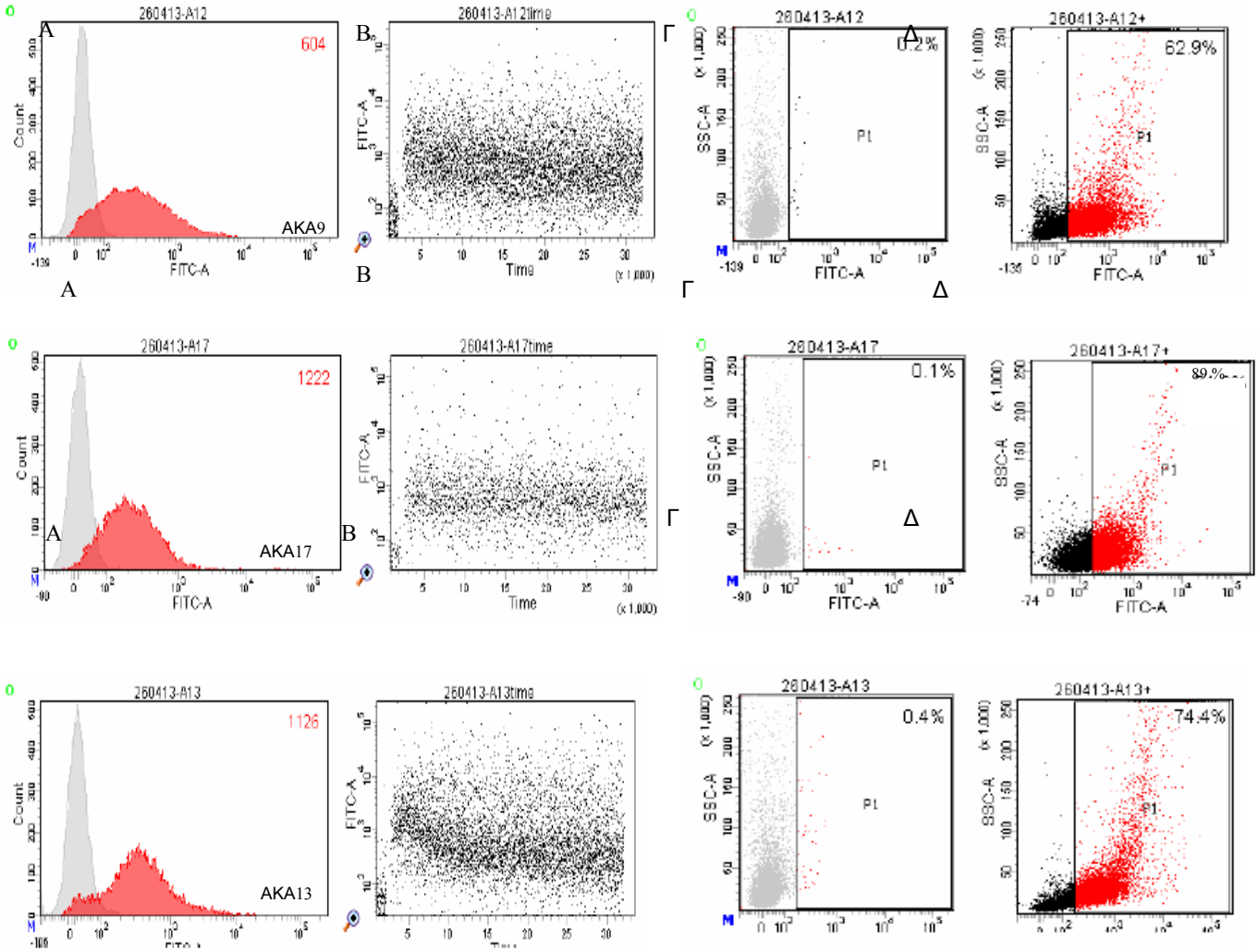
Με την παρατήρηση των κυττάρων των μικροφυκών μετά τη χρώση, έγινε μια πρώτη εκτίμηση για την ικανότητα παραγωγής και συσσώρευσης λιπιδίων στα κύτταρά τους. Από τα 7 επιλεγμένα στελέχη, τη μεγαλύτερη απόδοση σε λιπίδια αναμένεται να έχουν τα στελέχη *Chlorella* sp. ΑΚΑ17, *Coelastropsis* sp. ΑΚΒ2, *Chlorella* sp. ΑΚΑ13 και ΑΣΠ14, καθώς εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ένταση φθορισμού.

Στη συνέχεια, αφού βρέθηκε η κατάλληλη συγκέντρωση χρωστικής και ο κατάλληλος χρόνος χρώσης για κάθε στέλεχος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των επιλεγμένων στελεχών με το κυτταρόμετρο ροής BD FACS Canto II (§2.7.2). Με τη βοήθεια του λογισμικού FACS Diva, προέκυψαν διαγράμματα και ιστογράμματα που δείχνουν την ένταση του φθορισμού, το ποσοστό των κυττάρων που έδωσαν φθορισμό και την ένταση του φθορισμού σε σχέση με το χρόνο (Εικόνες 3.27, 3.28).

Η ανάλυση των βαμμένων κυττάρων των μικροφυκών με το κυτταρόμετρο ροής οδήγησε στα αναμενόμενα από την παρατήρηση στο μικροσκόπιο αποτελέσματα. Το μεγαλύτερο ποσοστό βαμμένων κυττάρων, το οποίο αντιστοιχεί σε ποσοστό συσσωρευμένων λιπιδίων, έδωσαν τα στελέχη ΑΣΠ14 (90,8%), *Coelastropsis* sp. ΑΚΒ3/2 (92%), *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 (89%) και *Geminella* sp. ΑΚΑ16 (79,2%). Τα στελέχη *Chlorella* sp. ΑΚΑ9 και *Chlorella* sp. ΑΚΑ13 παρουσίασαν επίσης υψηλά ποσοστά βαμμένων κυττάρων (62,9 % και 89% αντίστοιχα). Ωστόσο η μέθοδος αυτή εκτίμησης των παραγόμενων λιπιδίων είναι καθαρά ποιοτική.



Εικόνα 3.27. Αποτελέσματα από την ανάλυση των κυττάρων επιλεγμένων μικροφυκών σε κυτταρόμετρο ροής, (Α) Ιστόγραμμα, με γκρι χρώμα παρουσιάζονται τα άβαφα κύτταρα και με κόκκινο τα κύτταρα μετά τη χρώση, στον άξονα x αντιστοιχεί η ένταση φθορισμού της χρωστικής, (Β) Ένταση φθορισμού σε σχέση με το χρόνο, αρχικά μετρήθηκε ο φθορισμός χωρίς χρώση έγινε παύση της μέτρησης, χρώση και ακολούθησε μέτρηση των βαμμένων κυττάρων, (Γ)(Δ) Διάγραμμα plot, Αρχικά εμφανίζονται τα άβαφα κύτταρα και το ποσοστό που έδωσε αυτοφθορισμό και στη συνέχεια τα βαμμένα κύτταρα με το ποσοστό των κυττάρων που βάφτηκαν, ο άξονας x αντιστοιχεί στη μέση πυκνότητα φθορισμού και ο άξονας y στην εσωτερική πολυπλοκότητα των κυττάρων.



Εικόνα 3.28. Αποτελέσματα από την ανάλυση των κυττάρων επιλεγμένων μικροφυκών σε κυτταρόμετρο ροής, (Α) Ιστόγραμμα, με γκρι χρώμα παρουσιάζονται τα άβαφα κύτταρα και με κόκκινο τα κύτταρα μετά τη χρώση, στον άξονα x αντιστοιχεί η ένταση φθορισμού της χρωστικής, (Β) Ένταση φθορισμού σε σχέση με το χρόνο, αρχικά μετρήθηκε ο φθορισμός χωρίς χρώση έγινε παύση της μέτρησης, χρώση και ακολούθησε μέτρηση των βαμμένων κυττάρων, (Γ)(Δ) Διάγραμμα plot, Αρχικά εμφανίζονται τα άβαφα κύτταρα και το ποσοστό που έδωσε αυτοφθορισμό και στη συνέχεια τα βαμμένα κύτταρα με το ποσοστό των κυττάρων που βάφτηκαν, ο άξονας x αντιστοιχεί στη μέση πυκνότητα φθορισμού και ο άξονας y στην εσωτερική πολυπλοκότητα των κυττάρων.

Επίσης από τα διαγράμματα διασποράς της έντασης φθορισμού με το χρόνο, φαίνεται πως για τα στελέχη *Coelastropsis* sp. AKB3/2 και *Geminella* sp. AKA16 η ένταση του φθορισμού εξασθενεί γρήγορα σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη.

Έχοντας τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής, πραγματοποιήθκε στη συνέχεια η ποσοτική ανάλυση των παραγόμενων λιπιδίων, ώστε να υπολογιστεί η συγκέντρωση και το είδος των λιπιδίων που παράγει κάθε στέλεχος.

Με βάση τα κριτήρια που προαναφέρθηκαν (§2.7.3) επιλέχθηκε το απλοποιημένο πρωτόκολλο των Jing Kang and Wang (2004) για την εξαγωγή λιπιδίων και τη μεθυλίωσή τους, που πραγματοποιούνται σε ένα βήμα, ως το αποτελεσματικότερο. Για μελέτη του λιπιδικού τους προφίλ επιλέχθηκαν τα στελέχη μικροφυκών που έδωσαν τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας (Πίνακας 3.11).

Μετά από σύγκριση με τους χρόνους έκλουσης των κορυφών των πρότυπων δειγμάτων (Πίνακας 3.13), έγινε ταυτοποίηση των μεθυλεστέρων που παράγονται από κάθε στέλεχος. Στον Πίνακα 3.14, παρουσιάζονται τα επεξεργασμένα αποτελέσματα από την ανάλυση των δειγμάτων με τον αέριο χρωματογράφο. Συγκεκριμένα, για κάθε στέλεχος η ανάλυση έγινε εις διπλούν και στον Πίνακα 3.14 φαίνονται οι χρόνοι έκλουσης και ο μέσος όρος από τα εμβαδά των κορυφών που έδωσε το χρωματογράφημα.

Πίνακας 3.13. Χρόνοι έκλουσης μεθυλεστέρων των πρότυπων μιγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (§ 2.7.3) για να πραγματοποιηθεί η ταυτοποίηση των παραγόμενων μεθυλεστέρων από τα εξεταζόμενα μικροφύκη και κυανοβακτήρια.

Χρόνος έκλουσης (min)	**Ονομασία κατά IUPAC**	**Κοινή ονομασία**
25,48	Myristic acid methyl ester	C14:0
27,38	Myristoleic acid methyl ester	C14:1
29,98	Pentadecanoic acid methyl ester	C15:0
31,73	cis-10-Pentadecanoic acid methyl ester	C15:1
34,12	Hexadecanoic acid methyl ester	C16:0, Palmitic acid methyl ester
35,29	Methyl-cis-hexadecanoate	C16:1, Palmitoleic acid methyl ester
37,92	Heptadecanoic acid methyl ester	C17:0,Margaric acid methyl ester
39,04	cis-10-Heptadecanoic acid methyl ester	C17:1
41,49	Octadecanoic acid methyl ester	C18:0, Stearic acid methyl ester
42,34	Methyl-trans-9-actadecanoate	C18:1
52,75	Heneicosanoic acid methyl ester	C21:0

Όσον αφορά το βιοντίζελ, τα λιπίδια που παρουσιάζουν ενδιαφέρον είναι αυτά που έχουν στο μόριό τους από 12 άτομα άνθρακα και πάνω. Εξαιτίας αυτού, οι μεθυλεστέρες με λιγότερα από 12 άτομα άνθρακα δεν έχουν υπολογιστεί και δεν αναφέρονται για τα μικροφύκη που μελετήθηκαν. Επίσης οι μεθυλεστέρες οι κορυφές των οποίων είχαν εμβαδό λιγότερο από 100 δεν έχουν συνυπολογιστεί, καθώς τα εμβαδά αυτά αντιστοιχούν σε πολύ μικρές ποσότητες

μεθυλεστέρων. Επίσης, κάποια από τα παραγόμενα λιπίδια δεν ταυτοποίηθηκαν καθώς δεν αντιστοιχούσαν σε κάποια από τις ταυτοποιημένες κορυφές των πρότυπων μιγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.14, το στέλεχος *Bumilleriopsis sp.* ΑΚΑ16 έδωσε τη μικρότερη συνολική παραγωγή λιπιδίων, ενώ τη συνολικά μεγαλύτερη την εμφανίζουν τα στελέχη *Chlorella* sp**.** ΑΚΑ17 και ΑΣΠ14. Επίσης, τα δύο αυτά στελέχη, παρουσιάζουν ιδιαίτερη ποικιλία στα λιπίδια που παράγουν.

Πίνακας 3.14: Χρόνοι έκλουσης και ο μέσος όρος των δειγμάτων (§2.7.3) από τα ολοκληρωμένα εμβαδά των κορυφών που προέκυψαν από τα χρωματογραφήματα (Παράρτημα 1).

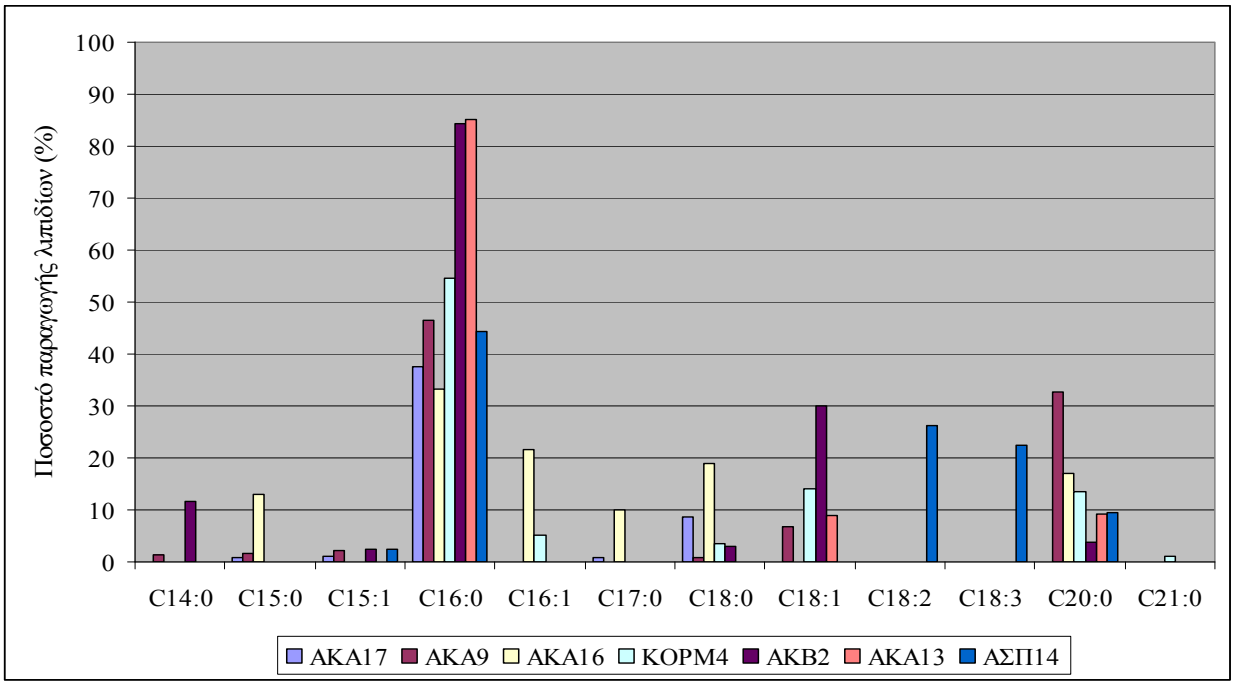
t (min)	Standard	ΑΚΑ17	ΑΚΑ9	ΑΚΒ3/2	ΑΚΑ16	ΚΟΡΜ4	ΑΣΠ14	ΑΚΑ13
21,024							276,87	
22,797							463,52	
23,37 - 23,42					1433,97		1316,69	
25,004							349,38	
25,483 - 28,63	1373,96		152,42	763,19				
29,986 - 30,081	177,44	156,42	182,2					
31,904 - 32,301		171,01	253,35	156,21	618		309	
33,96 - 34,276	5791,11	6664,3	5565,35	5593,01	1588,54	5586,095	5582,638	5583,502
35,175 - 35,34		195,25			1039,91	519,955	61,55	
35,968 - 36,348		531,98						
36,71 - 36,902					473,34		529,61	
37,916 - 38,07	1863,56	159,73					221,15	
39,042 - 40,499	139,78						1438,18	
41,488 - 41,541	7134,88	1536,15	106,19	202,7		357,44		
42,335 - 42,711	3186,95	1731	817,74	2002,345	898,33	1450,338	1174,334	587,1669
43,176 - 43,384			203,13					224,13
43,999 - 44,264	1833,15					248,87	3313,19	
45,111	151,43							
46,275 - 46,308	105,67						2822,64	
47,531 - 48,317	10768,11						245,58	
48,742 - 48,804					0		525,79	
49,621 - 49,841		4828,19	3911,14	1955,57	817,3	1386,435	1201,9	600,95
50,515 - 50,786		1149,6	737,35	245,19		512,78		481,1
51,997 - 52,458	426,92					104,55		
57,544	1334,36	627,61						
Μ.Ο.		**17.193,87**	**11.928,87**	**6.644,71**	**4.780,65**	**10.257,09**	**12.593,92**	**6.560,10**

Η ταυτοποίηση των μεθυλεστέρων (Πίνακας 3.15) έδειξε πως τα απομονωμένα μικροφύκη παράγουν μια αξιόλογη ποικιλία λιπιδίων ικανά να χρησιμοποιηθούν για βιοντίζελ.

Τα περισσότερα από τα μικροφύκη που μελετήθηκαν, παράγουν μεθυλεστέρες του Παλμιτικού (C16:0), του Αραχιδικού (C20:0) και του Οκταδεκανοϊκού οξέος (C18:0), τα οποία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοντίζελ και άλλων βιοτεχνολογικών προϊόντων.

Επίσης τα περισσότερα από τα στελέχη που μελετήθηκαν παράγουν ποικιλία λιπιδίων με μεγάλο αριθμό ατόμων άνθρακα (C>17). Το στέλεχος ΑΣΠ14 είναι το μόνο από τα μελετούμενα στελέχη που παράγει Λινολεϊκό και Λινολενικό οξύ και το στέλεχος *Scendesmus dissociatus* ΚΟΡΜ4 παράγει Εικοσανοϊκό οξύ (C21:0).

Στη συνέχεια, για κάθε στέλεχος υπολογίστηκε το ποσοστό παραγωγής κάθε μεθυλεστέρα ως προς το σύνολο των παραγόμενων λιπιδίων (Πίνακας 3.16). Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.16, σε όλα τα στελέχη το μεγαλύτερο ποσοστό παραγωγής εμφανίζει το Παλμιτικό οξύ. Επίσης, όλα σχεδόν τα μικροφύκη παρουσιάζουν παραγωγή Αραχιδικού οξέος και ειδικά το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ9 εμφανίζει ποσοστό παραγωγής περίπου 33% από τα συνολικά παραγόμενα οξέα. Στην Εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 3.29), παρουσιάζονται για κάθε στέλεχος τα παραγόμενα λιπίδια και το ποσοστό παραγωγής για το κάθε ένα ως προς τα συνολικά.



Εικόνα 3.29. Λιπαρά οξέα που παράγονται από κάθε μικροφύκος και το ποσοστό παραγωγής κάθε λιπαρού οξέος ως προς τα συνολικά παραγόμενα.

Πίνακας 3.15. Μεθυλεστέρες που προκύπτουν από τη μετεστεροποίηση των λιπαρών οξέων που εκχυλίστηκαν από κάθε μικροφύκος

***Chlorella* sp. AKA17**	**ΑΣΠ14**	***Chlorella* sp. AKA9**	***Coelastropsis* sp. AKB2**	***Bumilleriopsis* sp. AKA16**	***Scendesmus dissociatus* KOPM4**	***Chlorella* sp. AKA13**
Pentadecanoic acid Methyl ester (C15:0)	Cis – 10-Pentadecanoic acid methyl ester (C15:1)	Myristic acid methyl ester (C14:0)	Myristic acid methyl ester (C14:0)	Cis –10-Pentadecanoic acid methyl ester (C15:1)	Hexadecanoic acid methyl ester (C16:0)	Hexadecanoic acid methyl ester (C16:0)
Cis – 10-Pentadecanoic acid methyl ester (C15:1)	Hexadecanoic acid methyl ester (C16:0)	Pentadecanoic acid methyl ester (C15:0)	Cis –10-Pentadecanoic acid methyl ester (C15:1)	Hexadecanoic acid methyl ester (C16:0)	Heptadecanoic acid methyl ester (C16:1)	Methyl-trans-9-octadecanoic acid methyl ester (C18:1)
Hexadecanoic acid methyl ester(C16:0)	Heptadecanoic acid methyl ester (C16:1)	Cis – 10-Pentadecanoic acid methyl ester (C15:1)	Hexadecanoic acid methyl ester (C16:0)	Heptadecanoic acid methyl ester (C16:1)	Octadecanoic acid methyl ester (C18:0)	Arachidic acid methyl ester (C20:0)
Heptadecanoic acid methyl ester(C17:0)	Heptadecanoic acid methyl ester (C17:0)	Hexadecanoic acid methyl ester (C16:0)	Octadecanoic acid methyl ester (C18:0)	Methyl-trans-9-octadecanoic acid methyl ester (C18:1)	Methyl-trans-9-octadecanoic acid methyl ester (C18:1)	
Octadecanoic acid methyl ester (C18:0)	Cis-10-Heptadecanoic acid methyl ester (C17:1)	Octadecanoic acid methyl ester (C18:0)	Methyl-trans-9-octadecanoic acid methyl ester (C18:1)	Arachidic acid methyl ester (C20:0)	Arachidic acid methyl ester (C20:0)	
Methyl-trans-9-octadecanoic acid methyl ester (C18:1)	Methyl-trans-9-octadecanoic acid methyl ester (C18:1)	Methyl-trans-9-octadecanoic acid methyl ester (C18:1)	Arachidic acid methyl ester (C20:0)		Heneicosanoic acid methyl ester (21:0)	
Arachidic acid methyl ester(C20:0)	Linoleic acid methyl ester (C18:2)	Arachidic acid methyl ester (C20:0)				
	Linolenic acid methyl ester (C18:3)					
	Arachidic acid methyl ester (C20:0)					

Πίνακας 3.16. Ποσοστό (%) παραγωγής κάθε μεθυλεστέρα ως προς το σύνολο των παραγόμενων μεθυλεστέρων κάθε μικροφύκος.

ΣΤΕΛΕΧΗ	Λιπίδια (%)											
	C14:0	C15:0	C15:1	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C21:0
Chlorella sp. ΑΚΑ17		0,8	0,97	37,5		0,9	8,6					
Chlorella sp. ΑΚΑ9	1,27	1,53	2,12	46,6			0,9	6,85			32,8	
Bumilleriopsis sp. ΑΚΑ16		12,9		33,2	21,75	9,9	18,8				17,1	
Chlorella sp. ΚΟΡΜ4				54,5	5,1		3,48	14,1			13,5	1,02
Coelastropsis sp. ΑΚΒ2	11,5		2,35	84,2			3	30			3,69	
Chlorella sp. ΑΚΑ13				85,1				8,9			9,16	
ΑΣΠ14			2,45	44,33					26,3	22,4	9,5	

Το στέλεχος ΑΣΠ14, όπως προαναφέρθηκε, είναι το μόνο που παράγει Λινολεϊκό και Λινολενικό οξύ και μάλιστα σε υψηλά ποσοστά (26,3 και 22,4% αντίστοιχα). Το στέλεχος *Bumilleriopsis* sp. ΑΚΑ16, παρότι παρουσίασε τη χαμηλότερη συνολική παραγωγή λιπαρών οξέων, παρουσιάζει υψηλά ποσοστά παραγωγής Παλμιτολεϊκού οξέος (C16:1,21,75%), στεαρικού οξέος (18,8%) και αραχιδικού οξέος (17,1%). Τα στελέχη *Scendesmus dissociatus* ΚΟΡΜ4 και *Chlorella* sp. ΑΚΑ9 εμφάνισαν μεγάλη συνολική παραγωγή λιπαρών οξέων, αλλά μικρά ποσοστά παραγωγής για κάθε ένα από τα παραγόμενα οξέα, με εξαίρεση για το *Scendesmus dissociatus* ΚΟΡΜ4 το Παλμιτικό οξύ (54,5%) και για το *Chlorella* sp. ΑΚΑ9 το Παλμιτικό (46,6%) και το Αραχιδικό οξύ (32,8%). Τα στελέχη *Coelastropsis* sp. ΑΚΒ3/2 και *Chlorella* sp. ΑΚΑ13 παρουσίασαν τόσο μικρή συνολική παραγωγή λιπιδίων όσο και μικρή ποικιλία παραγόμενων λιπιδίων.

Μετά την ανάλυση του λιπιδικού προφίλ των επιλεγμένων στελεχών επιλέχθηκαν τα στελέχη εκείνα που έδωσαν μεγάλη συνολική παραγωγή λιπιδίων, μεγάλη ποικιλία παραγόμενων λιπιδίων και υψηλά ποσοστά παραγωγής λιπαρών οξέων μεγάλου αριθμού ατόμων άνθρακα. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν τα στελέχη *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 και ΑΣΠ14. Το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 έδωσε τη μεγαλύτερη συνολική παραγωγή λιπιδίων και εμφανίζει ποικιλία παραγόμενων λιπαρών οξέων.

Το στέλεχος ΑΣΠ14 έδωσε επίσης μεγάλη παραγωγή λιπιδίων αλλά και υψηλά ποσοστά παραγωγής λιπαρών οξέων μεγάλου αριθμού ατόμων άνθρακα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.13

Με βάση τη συγκέντρωση του πρότυπου μίγματος μεθυλεστέρων που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των παραγόμενων λιπιδίων από τα επιλεγμένα μικροφύκη (§2.12), υπολογίστηκε η συγκέντρωση των παραγόμενων λιπιδίων ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας και ανά λίτρο καλλιέργειας (Πίνακας 3.17).

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.17, τη μεγαλύτερη συγκέντρωση παραγόμενων λιπαρών οξέων ανά λίτρο καλλιέργειας παρουσίασαν τα στελέχη *Chlorella* sp. ΑΚΑ17, *Chlorella* sp. ΑΚΑ9, *Bumilleriopsis* sp. ΑΚΑ16 και ΑΣΠ14. **Παρόλα αυτά για περαιτέρω μελέτη επιλέχθηκαν τα στελέχη *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 και ΑΣΠ14** για τους λόγους που αναφέρονται και παραπάνω, δηλαδή εμφάνισαν μεγαλύτερη συνολική παραγωγή λιπιδίων (Πίνακας 3.14), μεγαλύτερα ποσοστά παραγωγής λιπαρών οξέων μεγάλου αριθμού ατόμων άνθρακα (Πίνακας 3.15) και υψηλή παραγωγή βιομάζας (Πίνακας 3.11).

Πίνακας 3.17. Παραγωγή μεθυλεστέρων ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας και ανά λίτρο καλλιέργειας για κάθε μικροφύκος.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	mg μεθυλεστέρων/ g βιομάζας	mg μεθυλεστέρων/ l καλλιέργειας
***Chlorella sp.* ΑΚΑ9**	**159,05**	**262,45**
Chlorella sp. ΑΚΑ13	87,45	74,50
Coelastropsis sp. ΑΚΒ2	88,60	88,60
Scendesmus dissociatus ΚΟΡΜ4	136,75	80,50
***Chlorella* sp. ΑΚΑ17**	**229,25**	**522,50**
Bumilleriopsis sp. ΑΚΑ16	63,75	134,65
ΑΣΠ14	**169,90**	**189,20**

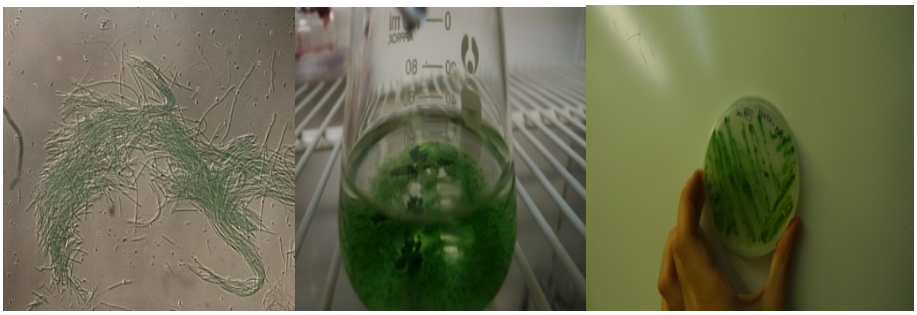
3.3.2 Μελέτη αύξησης των απομονωμένων κυανοβακτηρίων

Πραγματοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες κλειστού τύπου (Εικόνα 3.30), σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25±1°C) και φωτισμού (φωτοπερίοδος 12:12h) των τριών απομονωμένων από την περιοχή του Ασπροπύργου κυανοβακτηρίων σε θρεπτικό υπόστρωμα Walne medium, σε κωνικές των 100ml και 250ml, με διάρκεια ένα μήνα.

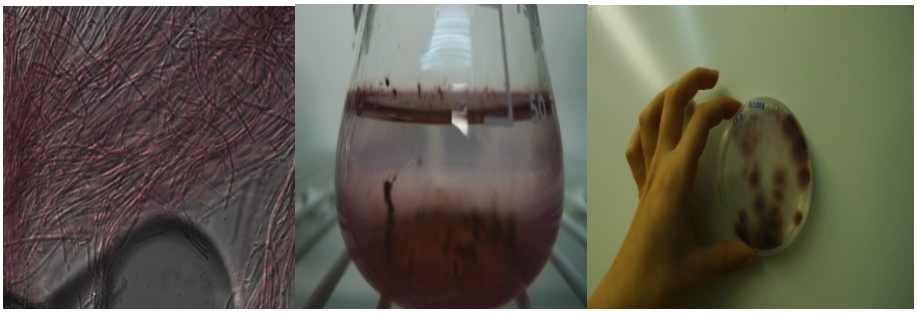
Στον Πίνακα 3.18 παρουσιάζεται η παραγωγή βιομάζας από κάθε κυανοβακτήριο. Τα κυανοβακτήρια δεν εμφάνισαν μεγάλη παραγωγή βιομάζας με εξαίρεση το μη ταυτοποιημένο κυανοβακτήριο ΑΣΚ3. Παρότι δεν είχαν μεγάλη απόδοση σε βιομάζα και για τα τρία στελέχη, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του λιπιδικού τους προφίλ.

Πίνακας 3.18: Παραγωγή βιομάζας από τα κυανοβακτήρια του Ασπρόπυργου

Στέλεχος	Βιομάζα (mg/ml)
Phormidium sp.,ΑΣΚ1 (Λίμνη Κουμουνδούρου)	0,305
ΑΣΚ2 (Λίμνη Κουμουνδούρου)	0,920
ΑΣΚ3 (Θάλασσα Ασπρόπυργου)	**4,650**



Phormidium sp. ΑΣΚ1



ΑΣΚ2

ΑΣΚ3

Εικόνα 3.30. Καλλιέργειες και φωτογραφίες από φωτονικό μικροσκόπιο (x100) των τριών κυανοβακτηρίων που απομονώθηκαν από την περιοχή του Ασπρόπυργου

3.3.2.1 Ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση των παραγόμενων λιπιδίων από τα απομονωμένα κυανοβκτήρια

Τα κυανοβακτήρια μετά τη χρώση τους με τη χρωστική BODIPY 505/515, έδωσαν πολύ ασθενή φθορισμό ο οποίος είχε μικρή διάρκεια (περίπου 2 λεπτά),. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η φωτογράφιση των κυττάρων των κυανοβακτηρίων στο μικροσκόπιο φθορισμού καθώς και η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

Για τη μελέτη του λιπιδικού προφίλ των κυανοβακτηρίων, επιλέχθηκε το ίδιο πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για τα μικροφύκη (§ 2.7.3). Για μελέτη του λιπιδικού τους προφίλ επιλέχθηκαν τα τρία κυανοβακτήρια που απομονώθηκαν από την περιοχή του Ασπροπύργου (Πίνακας 3.18).

Τα τρία εξεταζόμενα κυανοβακτήρια έδωσαν μόνο μία κορυφή στο χρωματογράφημα στα 33,96 λεπτά, η οποία αντιστοιχεί στο μεθυλεστέρα του παλμιτικού οξέος. Επίσης η παραγόμενη ποσότητα του μεθυλεστέρα είναι μικρή. Το γεγονός αυτό τα καθιστά ακατάλληλα για περαιτέρω χρήση στη συγκεκριμένη έρευνα, καθώς για την παραγωγή βιοντίζελ χρειάζεται ποικιλία λιπιδίων μεγάλου αριθμού ατόμων άνθρακα.

3.4 Μελέτη επίδρασης διαφόρων συνθηκών στην ανάπτυξη των μικροφυκών και στην παραγωγή των λιπιδίων τους.

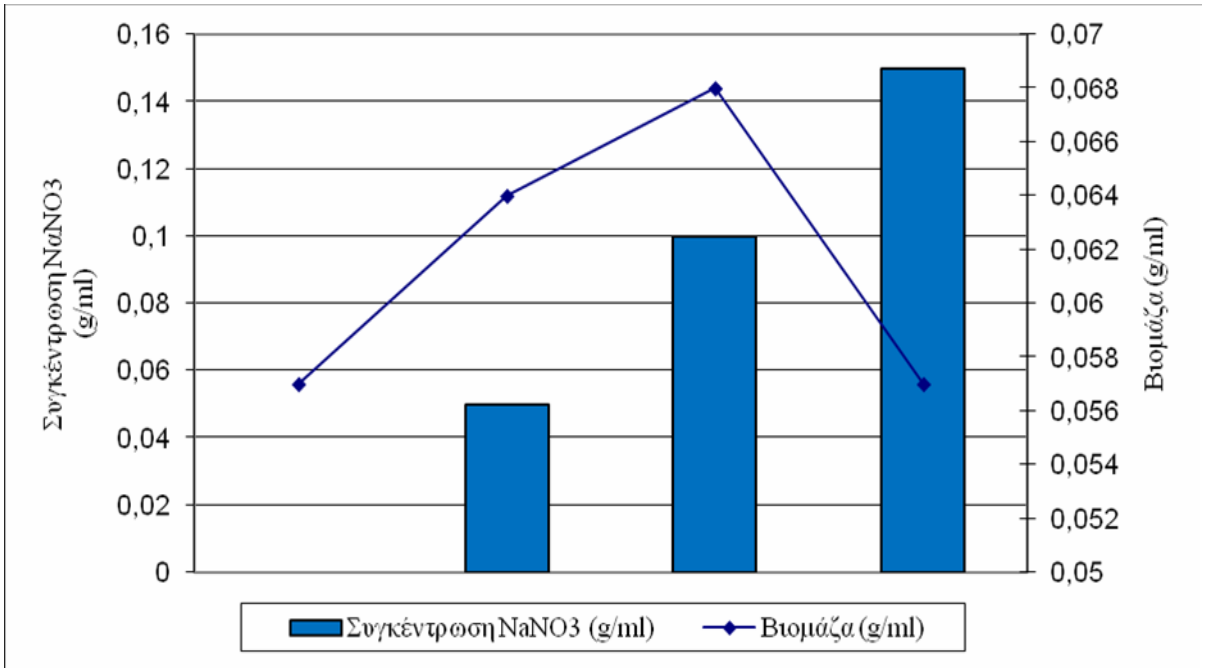
Η συγκέντρωση των νιτρικών στο θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των μικροφυκών καθώς και η τιμή του pH, επιδρούν στην παραγωγή των λιπιδίων τους. Για το λόγο αυτό δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις νιτρικών και διάφορες τιμές pH, οι οποίες χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία για την ανάπτυξη μικροφυκών, ώστε να βρεθούν οι κατάλληλες τιμές για κάθε στέλεχος που να οδηγούν στη μέγιστη παραγωγή λιπιδίων.

3.4.1 Επίδραση της συγκέντρωσης νιτρικών στην παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων των μικροφυκών

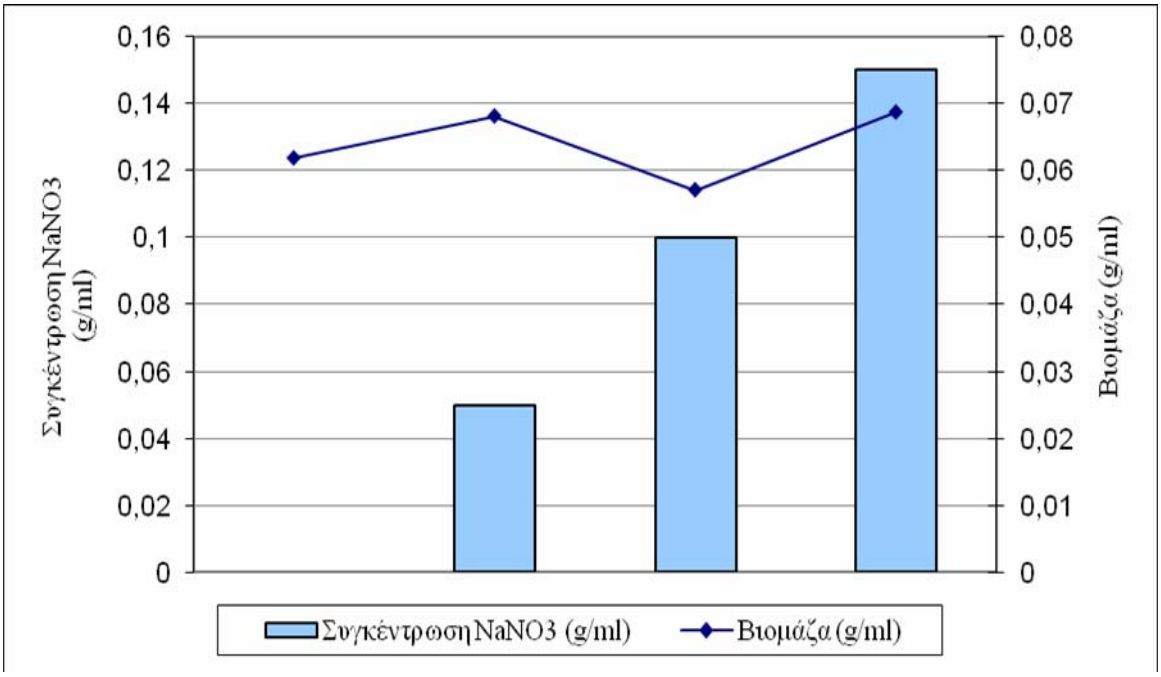
Τα στελέχη *Chlorella sp.* ΑΚΑ17 και ΑΣΠ14, που έδωσαν τη μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων στη διαλογή που έγινε μεταξύ των μικροφυκών, χρησιμοποιήθηκαν για να μελετηθεί η επίδραση της συγκέντρωσης του $NaNO_3$ στην παραγωγή της βιομάζας και των λιπιδίων τους.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.31, τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας το στέλεχος ΑΣΠ14 τη δίνει με συγκεντρώσεις $NaNO_3$ στο θρεπτικό υπόστρωμα 0,05 g/l με παραγωγή βιομάζας 0,064 g/ml και 0,1 g/l $NaNO_3$ με παραγωγή βιομάζας 0,068 g/ml. Η παραγωγή βιομάζας στις συγκεντρώσεις $NaNO_3$ 0 g/l και 0.15 g/l είναι σχεδόν η ίδια με τιμές 0,0568 g/ml και 0,057 g/ml για κάθε συγκέντρωση αντίστοιχα.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.32, το στέλεχος *Chlorella sp.* ΑΚΑ17 εμφανίζει παρόμοια παραγωγή βιομάζας για συγκεντρώσεις $NaNO_3$ 0,05 g/l και 0,15 g/l με τιμές 0,068 g/ml και 0.07 g/ml αντίστοιχα, ενώ με συγκέντρωση $NaNO_3$ 0,1 g/l εμφανίζει τη μικρότερη παραγωγή βιομάζας (0,0571 g/ml).



Εικόνα 3.31. Παραγωγή βιομάζας (g/ml) στις διάφορες συγκεντρώσεις $NaNO_3$ από το στέλεχος ΑΣΠ14.



Εικόνα 3.32. Παραγωγή βιομάζας (g/ml) στις διάφορες συγκεντρώσεις $NaNO_3$ από το στέλεχος *Chlorella sp.* ΑΚΑ17.

Μετά την ολοκλήρωση των καλλιεργειών στις 22 ημέρες και τη συλλογή της βιομάζας ακολούθησε εξαγωγή και μελέτη των παραγόμενων λιπιδίων. Μετά από αυτό σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα που αφορούν στην παραγωγή βιομάζας, καθορίστηκε η

συγκέντρωση νιτρικών που οδηγεί στην ταυτόχρονη μέγιστη παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων για κάθε στέλεχος.

Ακολουθώντας το απλοποιημένο πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε και στα προηγούμενα πειράματα (§ 2.7.3), πραγματοποιήθηκε η εξαγωγή των λιπιδίων και η μεθυλίωσή τους. Στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 3.19) παρουσιάζονται τα επεξεργασμένα αποτελέσματα από την ανάλυση των δειγμάτων με τον αέριο χρωματογράφο (χρόνοι έκλουσης και ο μέσος όρος από τα εμβαδά των κορυφών που έδωσε το χρωματογράφημα).

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 3.19, το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17, παρουσιάζει τη μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων στη συγκέντρωση 0,1 g/l $NaNO_3$. Επίσης το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 έδωσε αρκετές κορυφές σε μεγάλους χρόνους έκλουσης, οι οποίες αντιστοιχούν σε μεθυλεστέρες μεγάλης αλυσίδας, σε όλες τις συγκεντρώσεις $NaNO_3$, με ιδιαίτερα μεγάλη παραγωγή Λινολεϊκού οξέος. Με συγκέντρωση $NaNO_3$ 0,05 g/l το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 εμφάνισε παραγωγή Εικοσανοϊκού οξέος (C21:0) σε μικρή βέβαια ποσότητα.

Το στέλεχος ΑΣΠ14 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων στη συγκέντρωση 0 g/l $NaNO_3$. Τη μεγαλύτερη όμως ποικιλία παραγόμενων λιπιδίων εμφάνισε στα 0,15 g/l $NaNO_3$, ωστόσο τα λιπίδια παράγονται σε μικρές ποσότητες. Σε συγκέντρωση νιτρικών 0,05 g/l το μικροφύκος παράγει Λινολενικό οξύ (C18:3), που είναι και το μεγαλύτερου αριθμού ατόμων άνθρακα λιπαρό οξύ που παρήγαγε το στέλεχος στο συγκεκριμένο πείραμα.

Ανάμεσα στα δύο στελέχη τη μεγαλύτερη συνολική παραγωγή λιπιδίων παρουσιάζει το *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 καθώς και τη μεγαλύτερη ποικιλία παραγόμενων λιπιδίων. Αξιοσημείωτο και για τα δύο στελέχη είναι πως στη συγκέντρωση 0,15 g/l $NaNO_3$, που ήταν η συγκέντρωση νιτρικών που χρησιμοποιήθηκε στα προηγούμενα πειράματα, προέκυψαν λιγότερες και μικρότερου εμβαδού κορυφές στα χρωματογραφήματα. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι δεν έγινε σωστά η υδρόλυση των λιπαρών οξέων κατά την εκχύλιση των λιπιδίων τους. Παρόλα αυτά τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι συγκρίσιμα, καθώς ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία ταυτόχρονα για όλα τα δείγματα.

Πίνακας 3.19. Χρόνοι έκλουσης και ο μέσος όρος των δειγμάτων (§2.7.3) από τα ολοκληρωμένα εμβαδά των κορυφών που προέκυψαν από τα χρωματογραφήματα.

t (min)	ΑΚΑ17 0g $NαNO_3$	ΑΚΑ17 0,05g $NαNO_3$	ΑΚΑ17 0,1g $NαNO_3$	ΑΚΑ17 0,15g $NαNO_3$	ΑΣΠ14 0g $NαNO_3$	ΑΣΠ14 0,05g $NαNO_3$	ΑΣΠ14 0,1g $NαNO_3$	ΑΣΠ14 0,15g $NaNO_3$
21,024								
23,37 - 23,42					1032,67			839,16
25,483 - 28,63				9397	1678,25			1059,25
29,986 - 30,081				2154,15	912,66			
31,904 - 32,301						898,93		168,09
33,96 - 34,276	6224,47	17510,04	17715,2		1134,75	3768,8	3422,73	5933,15
35,175 - 35,34	477,24	1136,54	1771,41		7451,65			939,4
36,71 - 36,902					517,39			
37,916 - 38,07							3085,15	
39,042 - 40,499	1562,91	835,66	1094,55					
41,488 - 41,541	2239,42	4912,78	5349,59					
43,176 - 43,384								
43,999 - 44,264							1000,92	
45,111						1241,17	1320,51	
46,275 - 46,308								
47,531 - 48,317	6282,08		14169,19	6617,1				2680,31
48,742 - 48,804	934,96	11164,22				1303,28		
49,621 - 49,841		1661,33	1530,34					
50,515 - 50,786	752,94							
51,997 - 52,458		509,99						
Μ.Ο.	18.474,02	37.730,56	41.630,28	18.168,25	12.727,37	7.212,18	8.829,31	11.619,36

Πίνακας 3.20. Ταυτοποίηση παραγόμενων μεθυλεστέρων που προκύπτουν από τη μετεστεροποίηση των λιπαρών οξέων που παράγονται από το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 στις διάφορες συγκεντρώσεις $NaNO_3$.

Chlorella sp.,ΑΚΑ17 (0g/l $NaNO_3$)	*Chlorella sp.*,ΑΚΑ17 (0.05g/l $NaNO_3$)	*Chlorella sp.*,ΑΚΑ17 (0.1g/l $NaNO_3$)	*Chlorella sp.*,ΑΚΑ17 (0.15g/l $NaNO_3$)
Palmitic acid methyl ester (C16:0)	Palmitic acid methyl ester (C16:0)	Palmitic acid methyl ester (C16:0)	Myristic acid methyl ester (C14:0)
Methyl-cis-9-hexadecanoic acid methyl ester (C16:1)	Methyl-cis-9-hexadecanoic acid methyl ester (C16:1)	Methyl-cis-9-hexadecanoic acid methyl ester (C16:1)	Pentadecanoic acid methyl ester (C15:0)
Cis-10-heptadecanoic acid methyl ester (C17:1)	Cis-10-heptadecanoic acid methyl ester (C17:1)	Cis-10-heptadecanoic acid methyl ester (C17:1)	Linoleic acid methyl ester (C18:2)
Stearic acid methyl ester (C18:0)	Stearic acid methyl ester (C18:0)	Stearic acid methyl ester (C18:0)	
Linoleic acid methyl ester (C18:2)	Linolenic acid methyl ester (C18:3)	Linoleic acid methyl ester (C18:2)	
Linolenic acid methyl ester (C18:3)	Linoleic acid methyl ester (C18:2)	Linolenic acid methyl ester (C18:3)	
Arachidic acid methyl ester (C20:0)	Heneicosanoic acid methyl ester(C21:0)		

Πίνακας 3.21. Ταυτοποίηση παραγόμνων μεθυλεστέρων που προκύπτουν από τη μετεστεροποίηση των λιπαρών οξέων που παράγονται από το στέλεχος ΑΣΠ14 στις διάφορες συγκεντρώσεις $NaNO_3$.

ΑΣΠ14 (0g/l $NaNO_3$)	ΑΣΠ14 (0.05g/l $NaNO_3$)	ΑΣΠ14 (0.1g/l $NaNO_3$)	ΑΣΠ14 (0.15g/l $NaNO_3$)
Myristic acid methyl ester (C14:0)	Palmitic acid methyl ester (C16:0)	Palmitic acid methyl ester (C16:0)	Myristic acid methyl ester (C14:0)
Pentadecanoic acid methyl ester (C15:0)		Heptadecanoic acid methyl ester (C17:0)	Cis-10-Pentadecanoic acid methyl ester (C15:1)
Palmitic acid methyl ester (C16:0)	Linolenic acid methyl ester (C18:3)		Palmitic acid methyl ester (C16:0)
Methyl-cis-9-hexadecanoic acid methyl ester (C16:1)			Methyl-cis-9-hexadecanoic acid methyl ester (C16:1)
			Linoleic acid methyl ester (C18:2)

Στους Πίνακες 3.20 και 3.21, παρουσιάζονται αναλυτικά οι μεθυλεστέρες που προκύπτουν από τη μετεστεροποίηση των λιπαρών οξέων που παράγονται από κάθε στέλεχος στις διάφορες συγκεντρώσεις $NaNO_3$. Η ταυτοποίηση των μεθυλεστέρων έγινε σε σύγκριση με τα πρότυπα μίγματα μεθυλεστέρων (Πίνακας 3.12).

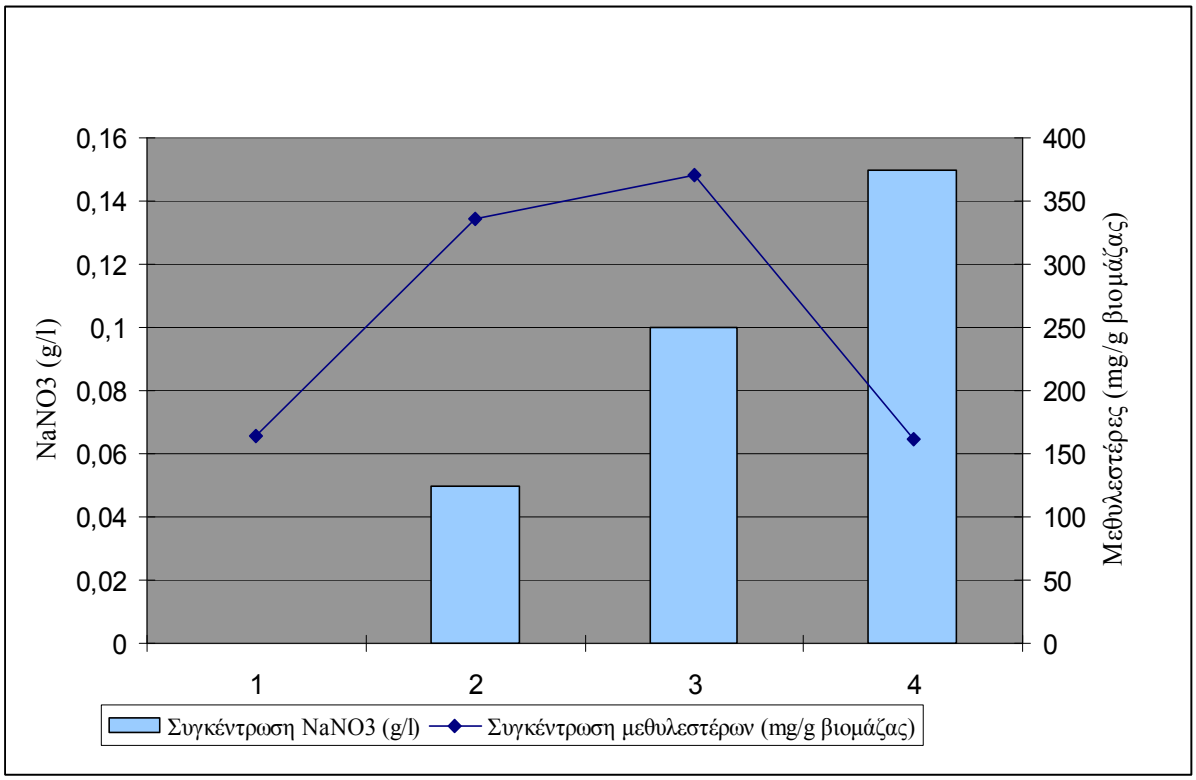
Όπως και προηγούμενα, με τη βοήθεια του πρότυπου μίγματος μεθυλεστέρων που χρησιμοποιήθηκε, υπολογίστηκε η ποσότητα των παραγόμενων μεθυλεστέρων για κάθε μικροφύκος. Στον Πίνακα 3.22 παρουσιάζεται η ποσότητα των παραγόμενων μεθυλεστέρων ανά γραμμάριο βιομάζας στις διάφορες συγκεντρώσεις νιτρικών για τα δύο μικροφύκη που μελετήθηκαν και στις Εικόνες 3.33 και 3.34, παρουσιάζεται η παραγωγή μεθυλεστέρων για κάθε συγκέντρωση $NaNO_3$ για τα δύο μικροφύκη.

Πίνακας 3.22. Παραγωγή μεθυλεστέρων ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας για κάθε μικροφύκος στις διάφορες συγκεντρώσεις νιτρικών.

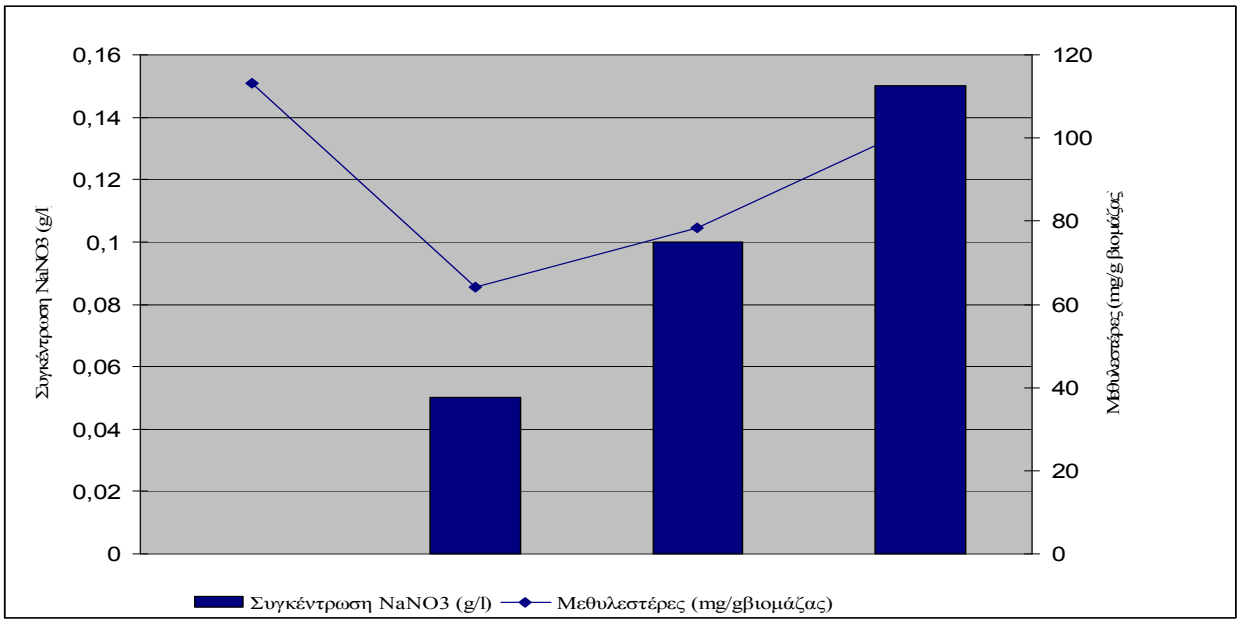
Στέλεχος	**Συγκέντρωση $NaNO_3$ (g/l)**	**mg μεθυλεστέρων/ g βιομάζας**
Chlorella sp. AKA17	0	164,20
	0,05	335,35
	0,1	**370,05**
	0,15	161,50
ΑΣΠ14	**0**	**113,10**
	0,05	64,10
	0,1	78,45
	0,15	103,25

Όπως προέκυψε και μετά τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των παραγόμενων λιπιδίων, το στέλεχος *Chlorella sp.* AKA17 δίνει τη μέγιστη παραγωγή λιπιδίων σε συγκέντρωση $NaNO_3$ 0,1 g/ml. Επίσης υψηλή παραγωγή λιπιδίων εμφανίζει για συγκέντρωση $NaNO_3$ 0,05 g/ml. Το στέλεχος ΑΣΠ14 εμφανίζει τη μέγιστη παραγωγή λιπιδίων σε συγκεντρώσεις $NaNO_3$ 0 g/ml και 0,15 g/ml. Τη χαμηλότερη παραγωγή λιπιδίων εμφανίζει για συγκέντρωση $NaNO_3$ 0,05 g/ml.

Συγκρίνοντας τη συνολική παραγωγή λιπιδίων των δύο στελεχών προκύπτει πως για όλες τις συγκεντρώσεις νιτρικών, το στέλεχος *Chlorella sp.* AKA17 παρουσίασε πολύ μεγαλύτερη παραγωγή από το στέλεχος ΑΣΠ14. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3.23), παρουσιάζεται το ποσοστό κάθε λιπαρού οξέος ως προς τη συνολική παραγωγή λιπιδίων για κάθε στέλεχος στις διάφορες συγκεντρώσεις $NaNO_3$.



Εικόνα 3.33. Παραγωγή μεθυλεστέρων (mg μεθυλεστέρα / g βιομάζας) στις διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$ για το στέλεχος *Chlorella sp.* ΑΚΑ17.



Εικόνα 3.34. Παραγωγή μεθυλεστέρων (mg μεθυλεστέρα / g βιομάζας) στις διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$ για το στέλεχος ΑΣΠ14.

Από τη συγκεντρωτική παρουσίαση των ποσοστών παραγωγής κάθε λιπαρού οξέος από το στέλεχος *Chlorella sp.* ΑΚΑ17, στις 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$ (Εικόνα 3.35), προκύπτει πως το μόνο λιπίδιο που παρήγαγε το μικροφύκος σε όλες τις συγκεντρώσεις $NaNO_3$ είναι το Λινολεϊκό οξύ και μάλιστα σε υψηλά ποσοστά (30% - 36%). Σε συγκέντρωση $NaNO_3$ 0 g/l το μικροφύκος εμφάνισε υψηλή παραγωγή Παλμιτικού οξέος και Λινολεϊκού οξέος. Με συγκέντρωση 0,05 g/l νιτρικών στο θρεπτικό υπόστρωμα το μικροφύκος παρήγαγε επίσης σε υψηλά ποσοστά Παλμιτικό και Λινολεϊκό οξύ. Με συγκέτρωση νιτρικών 0,1 g/l το μόνο αξιοσημείωτο λιπίδιο που παρήγαγε το μικροφύκος ήταν το Λινολεϊκό. Τέλος με συγκέντρωση νιτρικών 0,15 g/l το μικροφύκος εμφάνισε τη μέγιστη παραγωγή Μυριστικού οξέος σε ποσοστό 51,7 % επί των συνολικά παραγόμενων λιπιδίων.

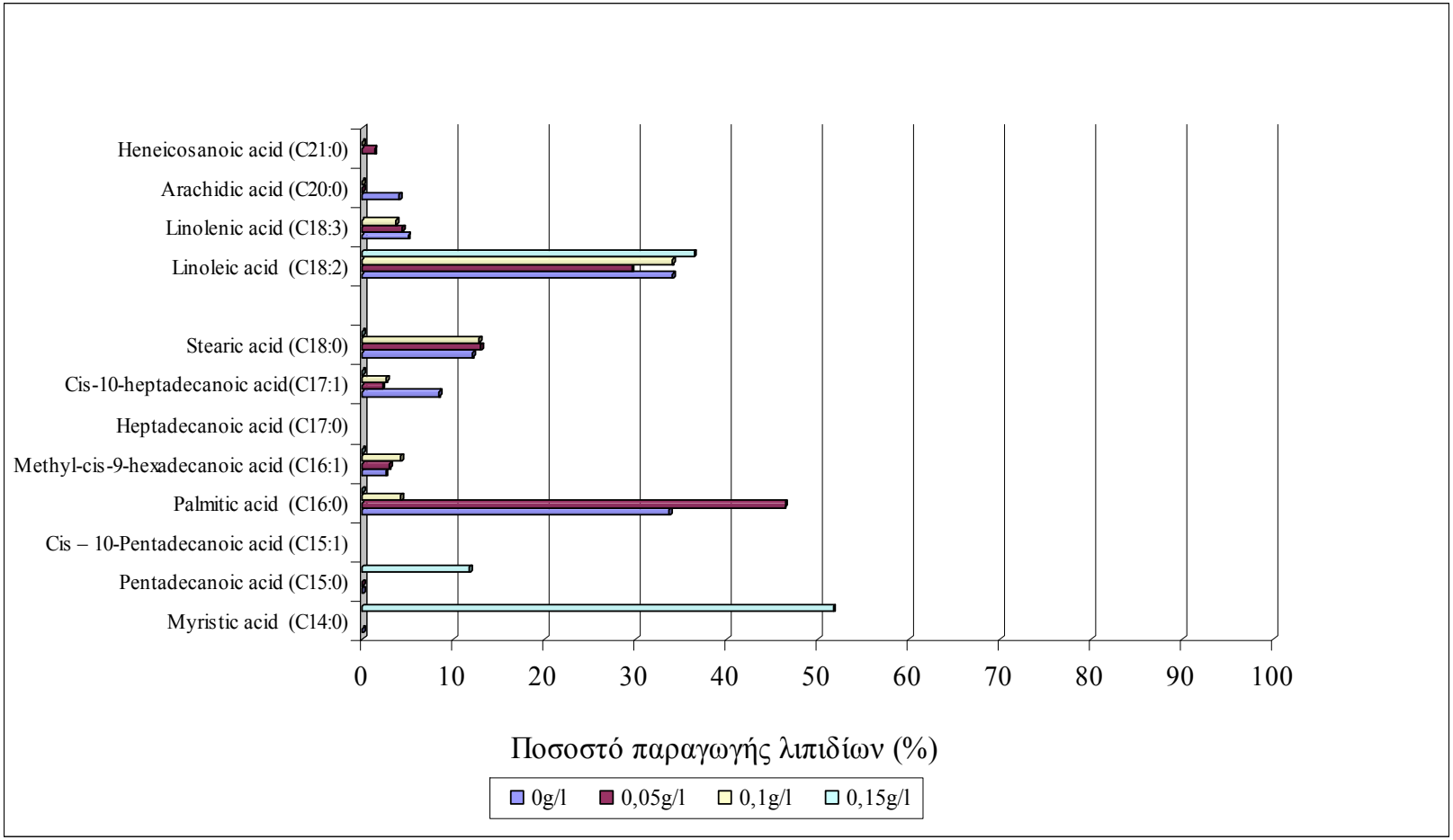
Το στέλεχος ΑΣΠ14 με μηδενική προσθήκη νιτρικών στο θρεπτικό υπόστρωμα παρουσίασε τη μεγαλύτερη συνολικά παραγωγή λιπιδίων (113,1 mg μεθυλεστέρων/ g βιομάζας), η οποία όμως δε διέφερε σημαντικά από τα παραγόμενα λιπίδια σε συγκέντρωση νιτρικών 0,15 g/l. Τα ποσοστά των παραγόμενων λιπιδίων με μηδενική προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος ήταν υψηλότερη, ειδικά η παραγωγή Παλμιτολεϊκού οξέος (58,2 %), από ότι με συγκέτρωση νιτρικών 0,15 g/l, όπου μόνο η παραγωγή Λινολεϊκού οξέος ήταν αξιοσημείωτη (23,1 %). Με συγκέντρωση νιτρικών 0,05 g/l το στέλεχος ΑΣΠ14 έδωσε παραγωγή Παλμιτικού οξέος σε υψηλό ποσοστό (52,5 %) και παραγωγή Λινολενικού οξέος σε ποσοστό 18,1 %. Τέλος με προσθήκη 0,1 g/l νιτρικών στο θρεπτικό υπόστρωμα το μικροφύκος παρήγαγε μόνο Παλμιτικό και Μαργαρικό οξύ.

Μετά από τον υπολογισμό των συνολικά παραγόμενων λιπιδίων, την ταυτοποίησή τους και τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των λιπιδίων στις διάφορες συγκεντρώσεις νιτρικών, επιλέχθηκε η κατάλληλη συγκέντρωση για κάθε στέλεχος, στην οποία επιτυγχάνεται ταυτόχρονα η μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας και η μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων. Για το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 η συγκέντρωση αυτή ήταν τα 0,1 g/l και για το ΑΣΠ14 ήταν τα 0 g/l $NaNO_3$.

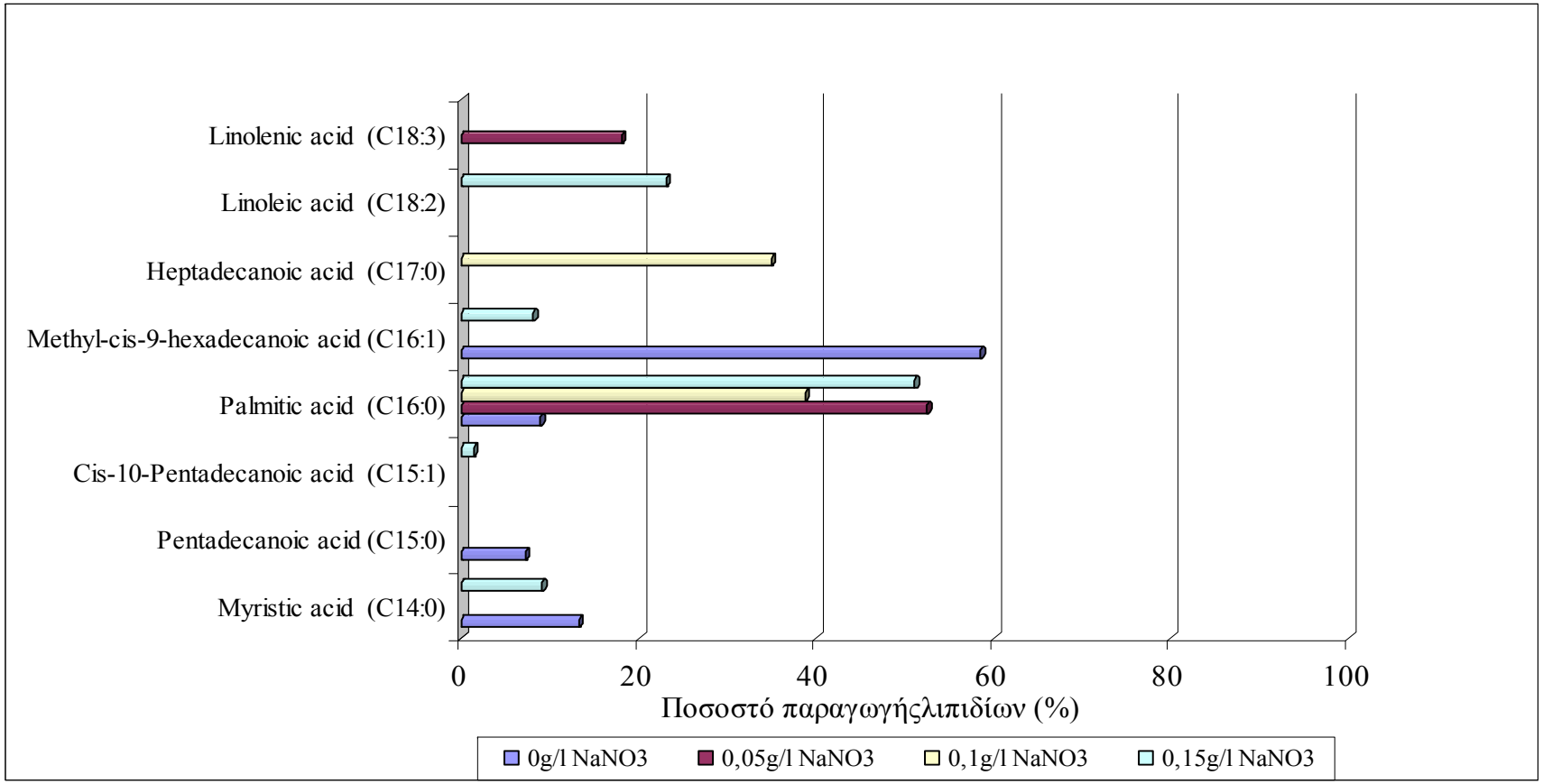
Στις Εικόνες 3.35 και 3.36 που ακολουθούν παρουσιάζονται διαγραμματικά τα παραγόμενα λιπαρά οξέα από κάθε στέλεχος και τα ποσοστά παραγωγής του καθενός για τις διάφορες συγκεντρώσεις νιτρικών που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 3.23. Ποσοστό (%) παραγωγής κάθε λιπαρού οξέος ως προς τα συνολικά παραγόμενα λιπαρά οξέα από κάθε μικροφύκος, στις διάφορες συγκεντρώσεις $NaNO_3$.

Λιπίδια (%)												
Μικροφύκη	**C14:0**	**C15:0**	**C15:1**	**C16:0**	**C16:1**	**C17:0**	**C17:1**	**C18:0**	**C18:2**	**C18:3**	**C20:0**	**C21:0**
Chlorella sp. AKA17 0g/l NaNO3				33,70	2,58		8,46	12,20	34,00	5,06	4,07	
Chlorella sp. AKA17 0,05g/l NaNO3				46,40	3,01		2,21	13,02	29,58			1,35
Chlorella sp. AKA17 0,1g/l NaNO3				4,22	4,25		2,63	12,80	34,00	3,70		
Chlorella sp. AKA17 0,15g/l NaNO3	51,70	11,8							36,40			
ΑΣΠ14 0g/l NaNO3	13,20	7,20		8,90	58,5							
ΑΣΠ14 0,05g/l NaNO3				52,50						18,10		
ΑΣΠ14 0,1g/l NaNO3				38,80		34,90						
ΑΣΠ14 0,15g/l NaNO3	9,12		1,40	51,10	8,10				23,10			



Εικόνα 3.35. Ποσοστό παραγωγής κάθε λιπαρού οξέος από το στέλεχος *Chlorella sp.* ΑΚΑ17, σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$.



Εικόνα 3.36. Ποσοστό παραγωγής κάθε λιπαρού οξέος από το στέλεχος ΑΣΠ14, στις 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$.

3.4.2 Επίδραση του pH στην παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων

Το pH αποτελεί έναν επίσης σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροφυκών και τη συσσώρευση των λιπιδίων τους. Για να βρεθεί η κατάλληλη τιμή ph που οδηγεί στη μέγιστη παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων για τα δύο επιλεγμένα στελέχη, δοκιμάστηκαν τέσσερις τιμές, με βάση τη βιβλιογραφία: pH 6, που ήταν η αρχική τιμή στο θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε, pH 7, pH 8 και pH 9 (§2.8.2).

Πίνακας 3.24. Παραγωγή βιομάζας των στελεχών ΑΣΠ14 και *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 στις διάφορες τιμές ph.

	Βιομάζα (g/ml)	
pH	**ΑΣΠ14**	***Chlorella* sp. ΑΚΑ17**
6	0,09	0,08
7	0,12	0,09
8	0,13	0,10
9	0,11	0,12

Στον Πίνακα 3.24 παρουσιάζεται η παραγόμενη βιομάζα των δύο στελεχών στις εξεταζόμενες τιμές του pH. Το στέλεχος ΑΣΠ14 εμφάνισε μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας σε pH 8 (0,13 g/ml) με μικρή ωστόσο διαφορά από τη βιομάζα που παρήγαγε στις υπόλοιπες τιμές pH. Το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 εμφάνισε μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας σε τιμή pH 9 και πάλι όμως χωρίς σημεντικές διαφορές από την παραγόμενη βιομάζα στις άλλες τιμές pH.

Μετά την ολοκλήρωση των καλλιεργειών στις 22 ημέρες και τη συλλογή της βιομάζας ακολούθησε εξαγωγή και μελέτη των παραγόμενων λιπιδίων. Μετά από αυτό σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα που αφορούν στην παραγωγή βιομάζας, καθορίστηκε η τιμή του pH που οδηγεί στην ταυτόχρονη μέγιστη παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων για κάθε στέλεχος.

Ακολουθώντας το απλοποιημένο πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε και στα προηγούμενα πριράματα (§2.7.4), πραγματοποιήθηκε η εξαγωγή των λιπιδίων και η μεθυλίωσή τους. Στον Πίνακα 3.26 παρουσιάζονται τα επεξεργασμένα αποτελέσματα από την ανάλυση των δειγμάτων με τον αέριο χρωματογράφο (χρόνοι έκλουσης και ο μέσος όρος από τα εμβαδά των κορυφών που έδωσε το χρωματογράφημα).

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.26, τη μέγιστη παραγωγή λιπιδίων το στέλεχος ΑΣΠ14 την παρουσίασε σε pH 9 ενώ τη μεγαλύτερη ποικιλία παραγόμενων λίπιδίων την εμφάνισε σε pH 6 και 8. Όσον αφορά το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17, τη μέγιστη παραγωγή λιπιδίων αλλά και τη μεγαλύτερη ποικιλία παραγόμενων λιπιδίων την έδωσε σε pH 9.

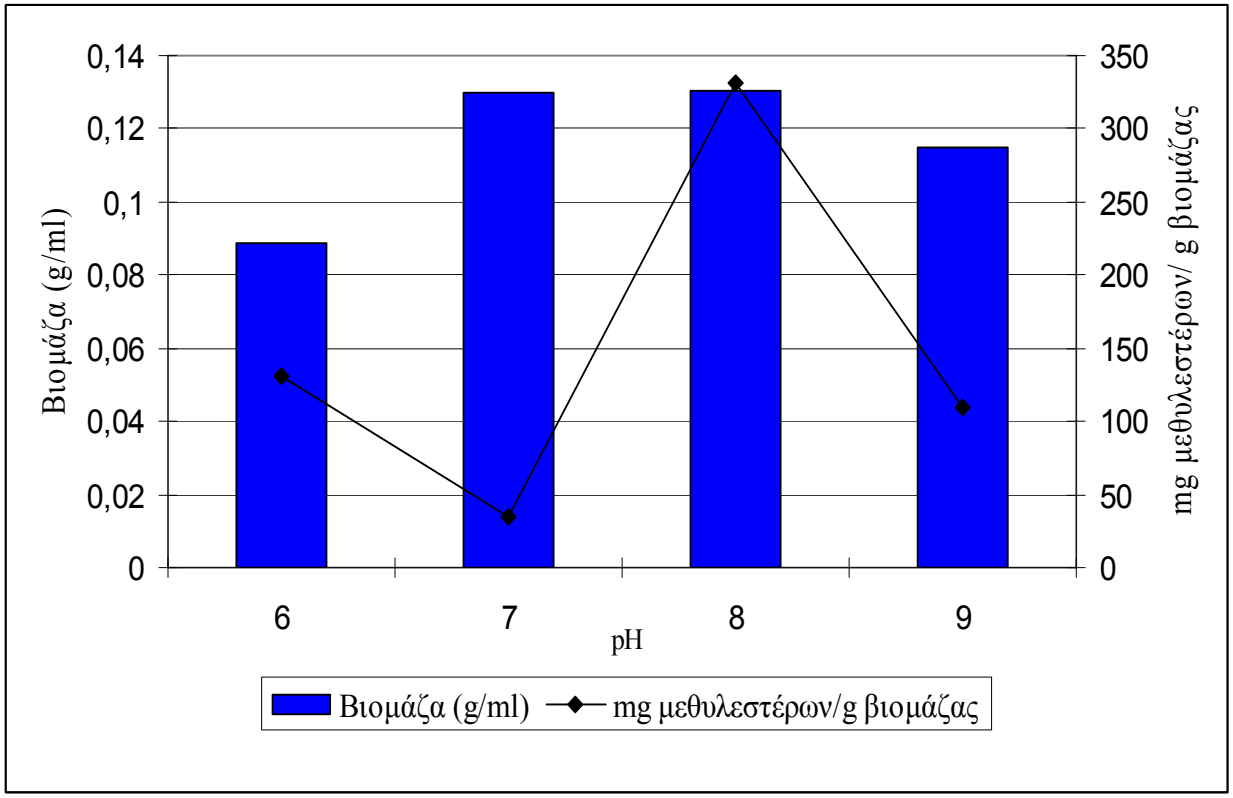
Όπως και προηγούμενα, με τη βοήθεια του πρότυπου μίγματος μεθυλεστέρων που χρησιμοποιήθηκε, υπολογίστηκε η ποσότητα των παραγόμενων μεθυλεστέρων για κάθε μικροφύκος. Στον Πίνακα 3.25 παρουσιάζεται η ποσότητα των παραγόμενων μεθυλεστέρων ανά γραμμάριο βιομάζας στις διάφορες τιμές pH για τα δύο μικροφύκη που μελετήθηκαν και στις Εικόνες 3.37 και 3.38, παρουσιάζεται η παραγωγή βιομάζας και μεθυλεστέρων για κάθε τιμή ph για τα δύο μικροφύκη.

Πίνακας 3.25. Συγκέντρωση παραγόμενων μεθυλεστέρων στις διάφορες τιμές pH των δύο εξεταζόμενων μικροφυκών.

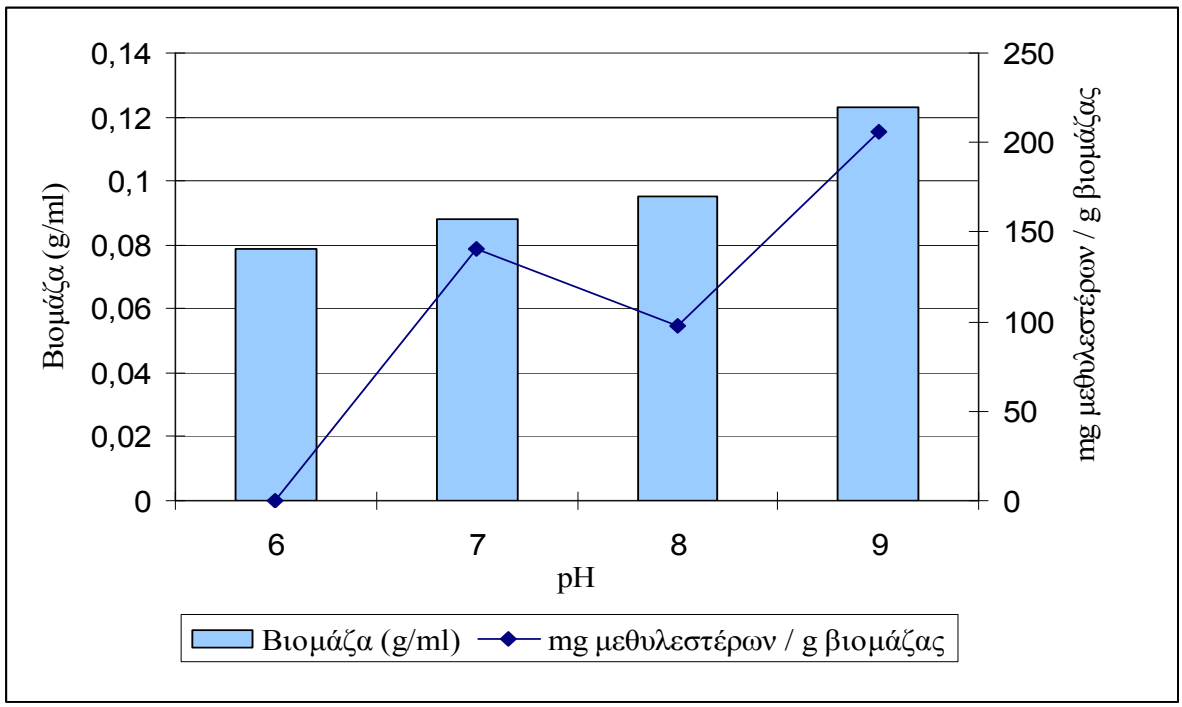
Στέλεχος	**τιμές pH**	**mg μεθυλεστέρων/ g βιομάζας**
Chlorella sp. ΑΚΑ17	6	27,63
	7	141,02
	8	97,53
	9	**205,60**
ΑΣΠ14	6	130,65
	7	34,15
	8	**331,11**
	9	109,23

Μετά τον υπολογισμό των παραγόμενων μεθυλεστέρων (Πίνακας 3.25, Εικόνα 3.37), προκύπτει πως τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων ταυτόχρονα το στέλεχος ΑΣΠ14 την εμφάνισε σε τιμή pH 8. Αντίστοιχα το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 δίνει τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων σε τιμή pH 9 (Πίνακας 3.25, Εικόνα 3.38). Στη συνέχεια τα παραγόμενα λιπίδια ταυτοποιήθηκαν και υπολογίστηκε το ποοστό παραγωγής για το καθένα σε σχέση με τα συνολικά παραγόμενα λιπίδια.

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.26, το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 σε pH 9 παρουσίασε όχι μόνο τη συνολικά μεγαλύτερη παραγωγή μεθυλεστέρων αλλά και τη μεγαλύτερη ποικιλία παραγόμενων λιπιδίων. Το στέλεχος ΑΣΠ14 σε pH 8, που έδωσε τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας και τη μεγαλύτερη συνολικά παραγωγή λιπιδίων, παρουσίασε ποικιλία παραγόμενων μεθυλεστέρων σε υψηλά ποσοστά.



Εικόνα 3.37. Παραγωγή μεθυλεστέρων (mg μεθυλεστέρα / g βιομάζας) στις διαφορετικές τιμές pH για το στέλεχος ΑΣΠ14.



Εικόνα 3.38. Παραγωγή μεθυλεστέρων (mg μεθυλεστέρα / g βιομάζας) στις διαφορετικές τιμές pH για το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17.

Μετά την ανάλυση με τον Αέριο Χρωματογράφο (Πίνακας 3.26) και τον υπολογισμό του ποσοστού παραγωγής του κάθε λιπιδίου ως προς τα συνολικά, προέλυψε πως τα δύο μικροφύκη ΑΣΠ14 και *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 παρουσιάζουν διαφορετικά λιπιδικά πρότυπα σε κάθε τιμή ph εκτός κάποιων εξαιρέσεων.

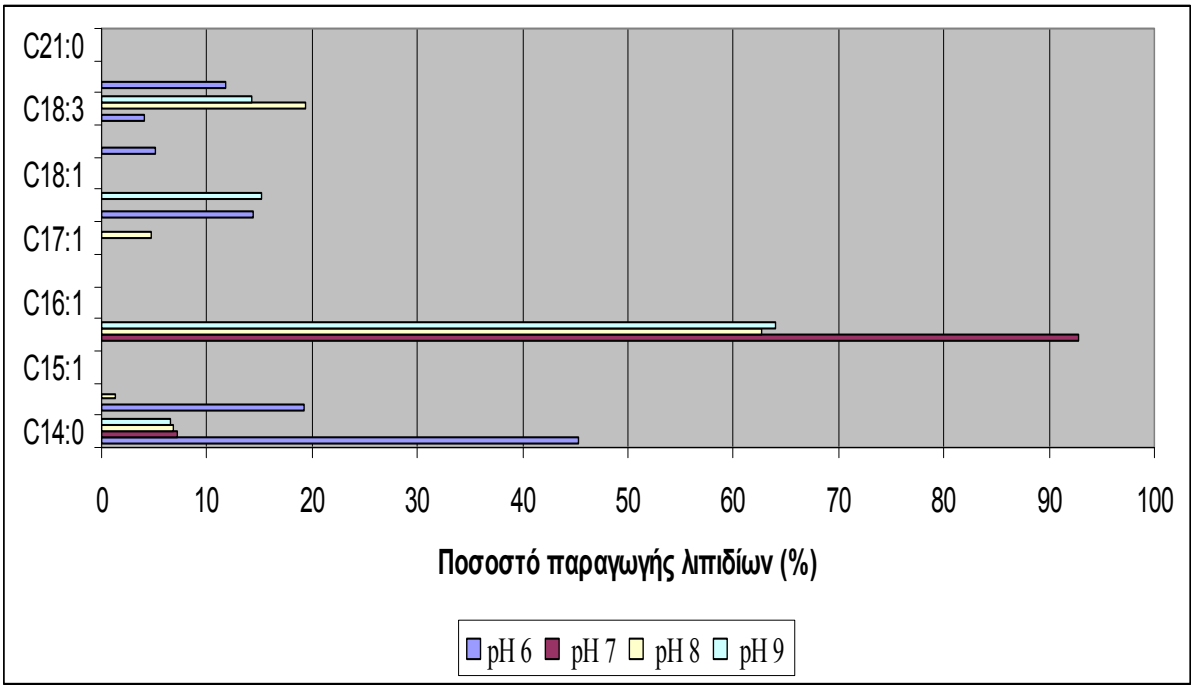
Το στέλεχος ΑΣΠ14 εμφάνισε μεγαλύτερη ποικιλία παραγόμενων λιπιδίων σε pH 6 και 8. Συγκεκριμένα η ανάλυση με τον Αέριο Χρωματογράφο έδειξε παραγωγή Μυριστικού οξέος (45,3 %), Πενταδεκανοϊκού οξέος (19,28 %), Στεαρικού οξέος (14,38 %), Λινολεϊκού οξέος (5,17 %), Λινολενικού οξέος (4,06 %) και Αραχιδικού οξέος (11,79 %) σε pH 6 και σε pH 8 έδειξε παραγωγή παραγωγή Μυριστικού οξέος και Πενταδεκανοϊκού οξέος σε ποσοστά 6,76% και 1,25 % αντίστοιχα, παραγωγή Παλμιτικού οξέος σε ποσοστό 62,64 %, ένα μικρό ποσοστο Επταδεκανοϊκού οξέος (4,76%) και παραγωγή Λινολενικού οξέος σε ποσοστό 19,41 % (Πίνακας 3.27). Σε pH 7 το μικροφύκος έδωσε υψηλή παραγωγή Παλμιτικού (31,24 %) και Λινολενικού οξέος (45,86 %) ενώ εμφάνισε μικρότερη παραγωγή Επταδεκανοϊκού, Στεαρικού και Οκταδεκανοϊκού οξέος.

Εξαιτίας του ότι η συνολική παραγωγή λιπιδίων από το στέλεχος ΑΣΠ14 ήταν σχεδόν τριπλάσια, σε pH 8 (331,11 mg μεθυλεστέρων / g βιομάζας) από ότι σε pH 6 (130,65 mg μεθυλεστέρων / g βιομάζας) σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η παραγωγή βιομάζας ήταν μεγαλύτερη σε pH 8, η τιμή αυτή του pH θεωρήθηκε πως είναι κατάλληλη για τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων.

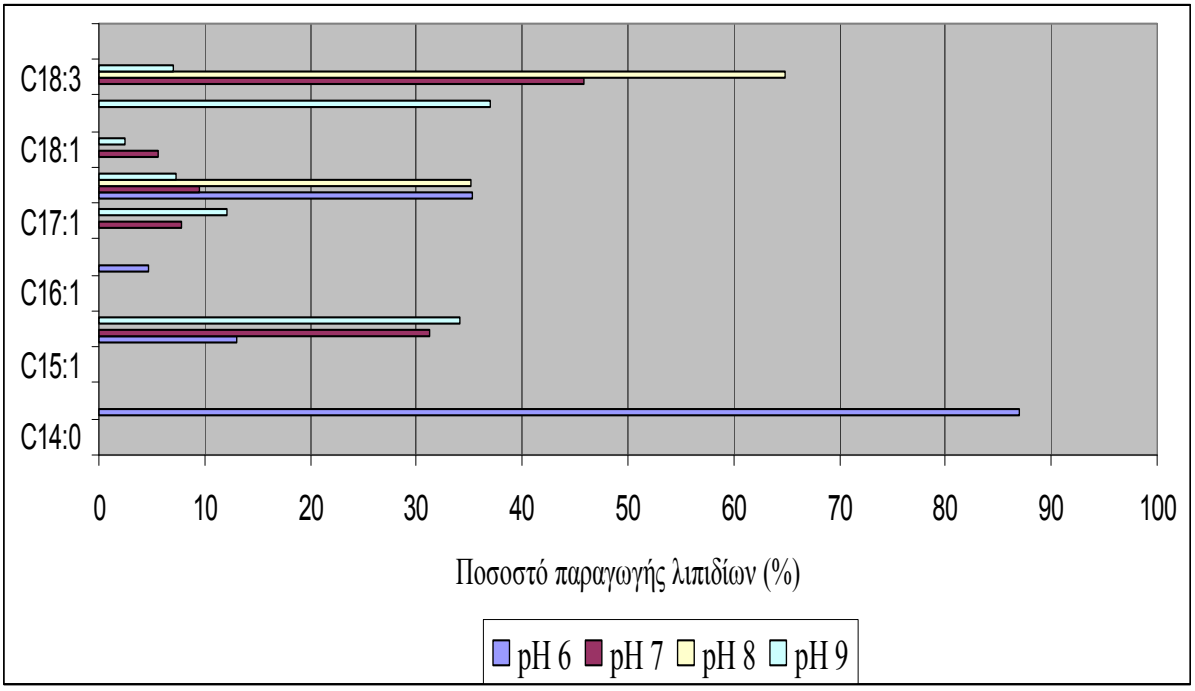
Το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 εμφάνισε μεγαλύτερη ποικιλία παραγόμενων λιπιδίων σε pH 7 και 9. Συγκεκριμένα εμφάνισε παραγωγή Παλμιτικού οξέος σε ποσοστό 31,24 % , μικρά ποσοστά παραγωγής Επταδεκανοϊκού, Στεαρικού και Οκταδεκανοϊκού οξέος (7,76 %, 9,57 %, 5,55 % αντίστοιχα) και παραγωγή Λιμολενικού οξέος σε ποσοστό 45,86 % σε pH 7. Σε pH 9 εκτός από παραγωγή Παλμιτικού οξέος, Επταδεκανοϊκού, Στεαρικού, Οκταδεκανοϊκού και Λινολενικού οξέος (σε ποσοστά 34,07 %, 12,06 %, 7,26 %, 2,52 % και 7,05 % αντίστοιχα), εμφάνισε παραγωγή Λινολεϊκού οξέος σε υψηλό ποσοστό (37,02 %) (Πίνακας 3.27). Σε pH 6 το μικροφύκος έδωσε μόνο παραγωγή Πενταδεκανοϊκού και Παλμιτικού οξέος με μικρή συνολική παραγωγή λιπιδίων 27,63 mg μεθυλεστέρων/g βιομάζας. Η συνολική παραγωγή λιπιδίων του στελέχους σε pH 7 ήταν 141,02 mg μεθυλεστέρων/g βιομάζας, ενώ σε pH 9 ήταν 205,6 mg μεθυλεστέρων/g βιομάζας. Η τιμή λοιπόν pH 9 επιλέχθηκε ως η καταλληλότερη για τη μέγιστη παραγωγή λιπιδίων.

Πίνακας 3.26. Χρόνοι έκλουσης και ο μέσος όρος των δειγμάτων (§2.7.3) από τα ολοκληρωμένα εμβαδά των κορυφών που προέκυψαν από τα χρωματογραφήματα.

t (min)	ΑΣΠ14 pH 6	ΑΣΠ14 pH 7	ΑΣΠ14 pH 8	ΑΣΠ14 pH 9	ΑΚΑ17pH 6	ΑΚΑ17 pH 7	ΑΚΑ17 ph 8	ΑΚΑ17 pH 9
21,024								
22,797								
23,37 - 23,42								
25,004								
25,483 - 28,63	4440	185,44	1680,73	537,72				
29,986 - 30,081	1889,58		309,87		1802,55			
31,904 - 32,301								
33,96 - 34,276		2376,04	15557,55	5249,21	269,58	3304,69	4279,9	5255,11
35,175 - 35,34								
35,968 - 36,348								
36,71 - 36,902								
37,916 - 38,07								
39,042 - 40,499			1183,62			821,41		1860,38
41,488 - 41,541	1409,31			1241,05		1012,39	1065,9	1119,54
42,335 - 42,711						587,58		388,81
43,176 - 43,384								
43,999 - 44,264	506,55							
45,111								
46,275 - 46,308								
47,531 - 48,317	398,59		4820,36	1164,51				5708,54
48,742 - 48,804			1281,17			4850,64	1969,3	1087,93
49,621 - 49,841								
50,515 - 50,786								
51,997 - 52,458								
53,274	1155,05							
57,544								
58,47								
Μ.Ο.	9.799,08	2.561,48	24.833,3	8.192,49	2.072,13	10.576,71	7.315,1	15.420,31



Εικόνα 3.39. Ποσοστά παραγόμενων λιπιδίων από το στέλεχος ΑΣΠ14 στις 4 τιμές pH που δοκιμάστηκαν.



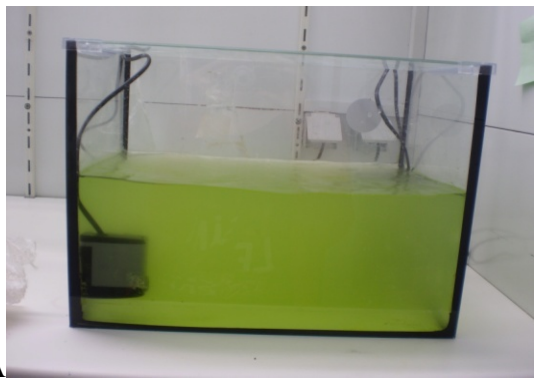
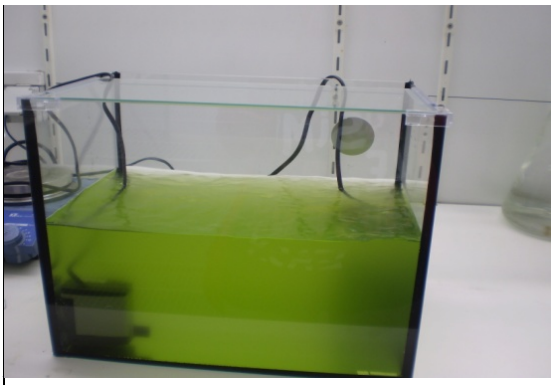
Εικόνα 3.40. Ποσοστά παραγόμενων λιπιδίων από το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 στις 4 τιμές pH που δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 3.27. Ποσοστό (%) παραγωγής κάθε λιπαρού οξέος ως προς τα συνολικά παραγόμενα λιπαρά οξέα από κάθε μικροφύκος, στις διάφορες τιμές pH.

Μικροφύκη	**Λιπίδια (%)**										
	C14:0	**C15:0**	**C16:0**	**C16:1**	**C17:0**	**C17:1**	**C18:0**	**C18:1**	**C18:2**	**C18:3**	**C20:0**
Chlorella sp. ΑΚΑ17 pH 6		86,99	13,00								
Chlorella sp. ΑΚΑ17 pH 7			31,24			7,76	9,57	5,55		45,86	
Chlorella sp. ΑΚΑ17 pH 8							35,12			64,88	
Chlorella sp. ΑΚΑ17 pH 9			34,07			12,06	7,26	2,52	37,02	7,05	
ΑΣΠ14 pH 6	45,30	19,28					14,38		5,17	4,06	11,79
ΑΣΠ14 pH 7	7,20		92,76								
ΑΣΠ14 pH 8	6,76	1,25	62,64			4,76				19,41	
ΑΣΠ14 pH 9	6,56		64,00				15,15			14,21	

3.5 Αναβάθμιση σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια προσομοιώνοντας συνθήκες πεδίου

Μετά τον προσδιορισμό της κατάλληλης συγκέντρωσης νιτρικών και της κατάλληλης τιμής pH για τα δύο επιλεγμένα μικροφύκη, *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 και ΑΣΠ14 πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε μεγαλύτερη κλίμακα (20 l) προσομοιάζοντας συνθήκες πεδίου. Για το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση $NaNO_3$ 0,1 g/l και pH 9, ενώ για το στέλεχος ΑΣΠ14 χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση $NaNO_3$ 0 g/l και pH 8 (§2.9).

A  B 

Εικόνα 3.41. Καλλιέργειες μετά από 20 μέρες ανάπτυξης, (A) *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 και (B) ΑΣΠ14. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25±1°C) και φωτισμού (φωτοπερίοδος 12:12 h και ένταση φωτισμού 200 μml/ms).

Κάθε 30 ημέρες απομακρύνονταν 10 l από τις καλλιέργειες και συλλεγόταν η βιομάζα και στη συνέχεια γινόταν προσθήκη φρέσκου θρεπτικού υποστρώματος ίσου όγκου. Στον Πίνακα 3.28 παρουσιάζεται η συλλεγόμενη βιομάζα στο τέλος κάθε μήνα καλλιέργειας. Μετά το τέλος των 90 ημερών καλλιέργειας συλλέχθηκε η συνολική βιομάζα και πραγματοποιήθηκε εκχύλιση λιπιδίων. Υπολογίστηκε στη συνέχεια η συγκέντρωση των παραγόμενων μεθυλεστέρων και καθορίστηκε και τα παραγόμενα μικροφύκη ταυτοποιήθηκαν.

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.28 με την πάροδο του χρόνου καλλιέργειας και την ανανέωση του θρεπτικού υποστρώματος η βιομάζα των δύο μικροφυκών συνεχώς αυξάνεται ειδικά για το στέλεχος ΑΣΠ14, όπου στους 3 μήνες η βιομάζα εφταπλασιάστηκε. Η βιομάζα του στελέχους *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 παρουσίασε πιο αργή ανάπτυξη, ωστόσο συνέχισε να αυξάνεται μέχρι τις 90 μέρες.

Πίνακας 3.28. Συλλεγόμενη βιομάζα στο τέλος κάθε μήνα καλλιέργειας των δύο επιλεγμένων στελεχών.

	Παραγωγή βιομάζας (g/l)	
Ημέρες καλλιέργειας	ΑΣΠ14	*Chlorella* sp. ΑΚΑ17
30	3,0	6,0
60	12,2	8,9
90	21,3	9,0

Μετά τους 3 μήνες καλλιέργειεας και τη συλλογή της βιομάζας, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση λιπιδίων για τα δύο στελέχη και ανάλυσή τους με Αέριο Χρωματογράφο. Προέκυψε (Πίνακας 3.29) πως το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 παράγει περισσότερα λιπίδια και συγκεκριμένα σχεδόν την πενταπλάσια ποσότητα από το στέλεχος ΑΣΠ14, κάτω από τις επιλεγμένες συνθήκες καλλιέργειας. Εκτός όμως από τη μεγαλύτερη συνολική παραγωγή λιπιδίων το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 εμφανίζει και μεγαλύτερη ποικιλία παραγόμενων λιπιδίων όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.29.

Πίνακας 3.29. Χρόνοι έκλουσης και ο μέσος όρος των δειγμάτων από τα ολοκληρωμένα εμβαδά των κορυφών που προέκυψαν από τα χρωματογραφήματα.

t (min)	**ΑΣΠ14 20 l**	***Chlorella* sp. ΑΚΑ17 20 l**
25,004		1053,82
25,483 - 28,63	579,14	315,31
29,986 - 30,081	526,37	406,63
31,904 - 32,301	5535,45	18154,02
33,96 - 34,276	406,94	193,43
35,175 - 35,34		1055,91
35,968 - 36,348		458,56
39,042 - 40,499		3213,47
41,488 - 41,541		3072,47
42,335 - 42,711		727,45
46,275 - 46,308		11958,56
47,531 - 48,317		2113,31
48,742 - 48,804	1250,63	
49,621 - 49,841		
Μ.Ο.	8.298,53	42.722,94

Πίνακας 3.30. Ποσοστό (%) παραγωγής κάθε λιπαρού οξέος ως προς τα συνολικά παραγόμενα λιπαρά οξέα από κάθε μικροφύκος.

	Λιπίδια (%)	
	***Chlorella* sp. ΑΚΑ17**	**ΑΣΠ14**
Myristic acid (C14:0)	0,75	6,97
Pentadecanoic acid (C15:0)	0,97	6,30
Cis-10-Pentadecanoic acid (C15:1)	43,57	66,7
Palmitic acid (C16:0)	0,46	4,90
Methyl-cis-9-hexadecanoic acid (C16:1)	2,53	
cis-heptadecanoic acid (C17:1)	7,71	
methyl-trans-9-octadecanoate acid(C18:1)	1,75	
Linoleic acid (C18:2)	28,70	
Linolenic acid (C18:3)	5,07	
Arachidic acid (C20:0)		15,10

Μετά την ταυτοποίση των παραγόμενων λιπιδίων υπολογίστηκαν τα ποσοστά παραγωγής τους. Στον Πίνακα 3.30 παρουσιάζονται τα ποσοστά των παραγόμενων μεθυλεστέρων για τα δύο στελέχη, μετά την πάροδο 90 ημερών καλλιέργειας.

Το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 παρουσίασε μεγάλη ποικιλία παραγόμενων λιπιδίων με 14 έως και 18 άτομα άνθρακα. Τα υψηλότερα ποσοστά παραγωγής εμφάνισαν το Πενταδεκανοϊκό οξύ (43,57 %) και το Λινολεϊκό οξύ (28,7) (Εικόνα 3.40). Η συνολική συγκέντρωση των παραγόμενων λιπιδίων ήταν 555,58 mg / g βιομάζας.

Το στέλεχος ΑΣΠ14 εμφάνισε μικρή παραγωγή λιπιδίων συνολικά αλλά και ως προς την ποικιλία. Από τα παραγόμενα λιπίδια σε σημαντικά ποσοστά παράχθηκαν τα Cis-10-Pentadecanoic οξύ σε ποσοστό 66,7% και Αραχιδικό οξύ σε ποσοστό 15,1% (Πίνακας 3.30). Η συγκέντρωση των συνολικά παραγόμενων μεθυλεστέρων για το συγκεκριμένο στέλεχος ήταν 110,65 mg / g βιομάζας.

Συνοπτικά λοιπόν, το στέλεχος ΑΣΠ14 έδωσε τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας κάτω από τις επιλεγμένες συνθήκες καλλιέργειας (pH 8, συγκέντρωση $NaNO_3$ 0 g/l) αλλά έδωσε πολύ μικρή παραγωγή λιπιδίων. Αντίθετα το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 έδωσε

μικρότερη παραγωγή βιομάζας αλλά πολύ μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων στις επιλεγμένες συνθήκες καλλιέργειας (pH 9, συγκέντρωση $NaNO_3$ 0,1 g/l) .

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα μικροφύκη θεωρούνται πολύ καλοί υποψήφιοι μικροοργανσιμοί για παραγωγή βιοντίζελ εξαιτίας των γρήγορων ρυθμών αύξησης και της ικανότητάς τους να συσσωρεύουν λιπίδια στα κύτταρά τους (Liang et al., 2010). Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης μελετήθηκαν δείγματα από τα μνημεία της Ακρόπολης, την περιοχή του Ασπρόπυργου και τη λίμνη της Κορώνεια για την απομόνωση μικροφυκών και κυανοβακτηρίων, με σκοπό την εύρεση φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών με μεγάλη παραγωγή βιομάζας και ικανότητα παραγωγής λιπιδίων κατάλληλων για βιοντίζελ. Οι περιοχές αυτές δειγματοληψίας επιλέχτηκαν εξαιτίας των χαρακτηριστικών τους. Τα μνημεία της Ακρόπολης και η περιοχή του Ασπρόπυργου, είναι περιοχές επιβαρυμένες με ατμοσφαιρική ρύπανση και η λίμνη Κουμουνδούρου στην περιοχή του Ασπρόπυργου, η οποία είναι βιομηχανική περιοχή, ρυπαίνεται κατ` επανάληψη με πετρελαϊκά απόβλητα. Τέλος η λίμνη της Κορώνεια αποτελεί προστατευόμενη περιοχή του δυτικού NATURA, αλλά έχει παρατηρηθεί αρκετές φορές περιστασιακή μόλυνση από τη χρήση φυτοφαρμάκων και λιπασμάτων στις αγροτικές καλλιέργειες της περιοχής. Επιλέγοντας λοιπόν τέτοιου είδους ιδιάζοντα οικοσυστήματα είναι αναμενόμενο να απομονωθούν μικροοργανισμοί με ιδιαίτερες ιδιότητες και μορφολογικά χαρακτηριστικά.

Συνολικά απομονώθηκαν 74 μικροφύκη και 4 κυανοβακτήρια από τις τρεις εξεταζόμενες περιοχές. Με τη βοήθεια της μικροσκοπίας και των μοριακών τεχνικών τα απομονωμένα στελέχη ταυτοποιήθηκαν φαινοτυπικά και μοριακά. Η πλειοψηφία των απομονωμένων μικροφυκών από τις περιοχές της Ακρόπολης και της λίμνης Κορώνεια ανήκαν στο γένος *Chlorella*, ενώ τα στελέχη από την περιοχή του Ασπρόπυργου εμφάνισαν μεγάλη ποικιλότητα καθώς είχαν αντιπροσώπους από 7 διαφορετικά γένη μικροφυκών. Από τα 4 απομονωμένα κυανοβακτήρια ταυτοποιήθηκε μόνο το ένα που απομονώθηκε από την περιοχή του Ασπρόπυργου και ανήκε στο γένος *Phormidium* sp., τα υπόλοιπα στελέχη δεν ταυτοποιήθηκαν φαινοτυπικά, καθώς δεν εμφάνισαν ομοιότητα με κάποιο από τα κατατεθημένα στελέχη της Τράεζας Στελεχών CCALA. Η αλληλούχηση του 16S rRNA γονιδίου των μη ταυτοποιημένων κυανοβακτηρίων έδειξε πως είναι όλα νηματοειδή κυανοβακτήρια χωρίς να εμφανίζουν ομοιότητα στην αλληλουχία τους με κάποιο κατατεθειμένο στέλεχος ενώ επιβεβαίωσε την ταυτοποίηση του στελέχους *Phormidium* sp. ΑΣΚ1 .

Όλα τα απομονωμένα μικροφύκη και κυανοβακτήρια αναπτύχθηκαν στα θρεπτικά υποστρώματα BG11, Walne medium και Jaworski:Euglena Gracilis medium, το οποίο απορρίφθηκε εξαρχής καθώς ήταν ακριβό στην παρασκευή του και δε θα ήταν εύκολο να χρησιμοποιηθεί σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας. Τελικά επιλέχθηκαν τα θρεπτικά

υποστρώματα BG11 και Walne medium για την ανάπτυξη των μικροφυκών και το θρεπτικό υπόστρωμα Walne medium για την ανάπτυξη των κυανοβακτηρίων, για το γεγονός ότι χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιβλιογραφία (www.ccap.ac.uk, Katircioglu et al., 2005, Ilavarasi et al., 2011, Makarevičiene et al., 2011, Lincymol et al., 2012) αλλά και γιατί είναι οικονομικά στην παρασκευή τους. Το γεγονός ότι τα απομονωμένα στελέχη μικροφυκών και κυανοβακτηρίων αναπτύχθηκαν σε ελάχιστα θρεπτικά υποστρώματα, χωρίς παροχή CO_2 ή πηγής άνθρακα, υποδεικνύει ότι είναι κατάλληλα για χρήση σε βιομηχανική κλίμακα.

Η επιλογή των κατάλληλων στελεχών για παραγωγή βιοντίζελ μεταξύ των απομονωμένων βασίστηκε σε κάποιους βασικούς παράγοντες, την ικανότητα των μικροφυκών να αναπτύσσονται με τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά ή κάτω από συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες και την υψηλή παραγωγή βιομάζας (Mata et al., 2010).

Πραγματοποιήθηκαν υγρές κλειστές καλλιέργειες των απομονωμένων μικροφυκών σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25°C±1) και φωτισμού (φωτοπερίοδος 12:12 ώρες) όλων των στελεχών με χρήση του κατάλληλου θρεπτικού υποστρώματος για το κάθε ένα. Η χρήση φωτοπεριόδου κατά την καλλιέργεια μικροφυκών έχει αποδειχτεί ότι οδηγεί σε μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας. Οι Wahidin και συνεργάτες (2012) παρατήρησαν πως το μικροφύκος *Nannochloropsis* sp. δίνει τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας όταν αναπτύσσεται στους 23 °C και με φωτοπερίοδο 18:6 ώρες φως:σκοτάδι. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από άλλες μελέτες (Bouterfas et al., 2006, Kalpesh et al., 2012). Τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας έδωσαν τα στελέχη *Chlorella* sp. AKA9, *Chlorella* sp. AKA13, *Coelastropsis sp.* AKB3/2, *Bumilleriopsis* sp. AKA16, *Chlorella* sp. AKA4, *Chlorella* sp. AKA17 *Scendesmus dissociatus* KOPM4 και ΑΣΠ14 και επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη.

Τα επιλεγμένα αυτά στελέχη καλλιεργήθηκαν στη συνέχεια σε ημιτροφοδοτούμενα συστήματα μεγαλύτερου όγκου και μελετήθηκε η πορεία ανάπτυξής τους. Τα ημιτροφοδοτούμενα συστήματα χρησιμοποιούνται ευρέως και σε βιομηχανικό επίπεδο καθώς με τη χρήση τους επιτυγχάνεται μεγάλη παραγωγή βιομάζας χωρίς να υπάρχει ο περιορισμός του θρεπτικού υποστρώματος (Doucha and Livanský, 2012). Στις καλλιέργειες αυτές χρησιμοποιήθηκε θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με το θρεπτικό υπόστρωμα Walne medium.

Τα τρία στελέχη του γένους *Chlorella* που αναπτύχθηκαν σε ημιτροφοδοτούμενο σύστημα έδωσαν υψηλή παραγωγή βιομάζας και συγκεκριμένα η παραγωγή βιομάζας για το στέλεχος *Chlorella* sp. AKA9 ήταν 1,65 g/l, για το στέλεχος *Chlorella* sp. AKA13 0,85 g/l και για το στέλεχος *Chlorella* sp. AKA17 ήταν 2,28 g/l που ήταν και η μεγαλύτερη παραγωγή

βιομάζας από τα 7 επιλεγμένα στελέχη. Τα μικροφύκη του γένους *Chlorella* θεωρούνται μια καλή πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντίζελ (Mata et al., 2010) με υψηλές αποδόσεις σε βιομάζα. Η παραγωγή βιομάζας του στελέχους *Chlorella* sp. AKA17 πλησιάζει την παραγωγή βιομάζας των *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11 και *Chlorella sorokiniana* IAM-212 τα είχαν απόδοση σε βιομάζα 0,23 και 0,17 g/l/day σε ετερότροφη καλλιέργεια (Mata et al., 2010).

Τα μικροφύκη του γένους *Coelastropsis* δεν έχουν μελετηθεί ιδιαίτερα ως πρώτη ύλη για παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων και δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα όσον αφορά στην αυτότροφη ανάπτυξή τους και το στέλεχος ΑΣΠ14 δεν ταυτοποιήθηκε συνεπώς δεν ήταν δυνατή η σύγκριση της απόδοσής του με γνωστά στελέχη. Παρόλα αυτά και σε σύγκριση με την παραγωγικότητα του στελέχους *Chlorella* sp. AKA17, η παραγόμενη βιομάζα των *Coelastropsis* sp. AKB2 και ΑΣΠ14 ήταν υψηλή (1 g/l και 1,5 g/l αντίστοιχα) .

Το στέλεχος *Scendesmus dissociatus* KOPM4, έδωσε μικρή παραγωγή βιομάζας συγκριτικά με τα υπόλοιπα μικροφύκη (0,59 g/l). Ωστόσο πολλοί αντιπρόσωποι του γένους *Scendesmus* σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, έχουν την ικανότητα συσσώρευσης λιπιδίων στα κύτταρά τους (Gouveia and Oliveira, 2008), για τον λόγο αυτό επιλέχθηκε ως στέλεχος κατάλληλο για ανάλυση του λιπιδικού του προφίλ.

Η ικανότητα των επιλεγμένων μικροφυκών για παραγωγή λιπιδίων εκτιμήθηκε τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Η ποιοτική εκτίμηση των παραγόμενων λιπιδίων έγινε με τη χρήση της λιποφιλικής φθορίζουσας χρωστικής BODIPY 505/515, παρατήρησης σε μικροσκόπιο φθορισμού και ανάλυσης με κυτταρομετρία ροής, ενώ η ποσοτική εκτίμηση των παραγόμενων λιπιδίων έγινε μέσω εκχύλισης και μετεστεροποίησης των λιπιδίων, μετεστεροποίησής τους και ανάλυσης με Αέρια Χρωματογραφία. Ο συνδυασμός της κυτταρομετρίας ροής με φθορίζουσες χρωστικές αποτελεί σημαντική προσέγγιση για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων κυτταρικών χαρακτηριστικών (Hyka et al., 2012). Επίσης αποτελεί μια γρήγορη μέθοδο για την επιλογή κατάλληλων στελεχών. Η ανάλυση με Αέρια Χρωματογραφία όμως δίνει και τη δυνατότητα ταυτοποίησης των παραγόμενων λιπιδίων. Σε πρόσφατες μελέτες έχει χρησιμοποιηθεί η ανάλυση με Κυτταρομετρία Ροής ώστε να επιλεγούν κατάλληλα μικροφύκη για την παραγωγή λιπιδίων, με τη βοήθεια χρωστικών (Nile red, BODIPY). Οι Gouveia και συνεργάτες (2009) πραγματοποίησαν μελέτη της ικανότητας παραγωγής λιπιδίων για τα μικροφύκη *Chlorella protothecoides, Scendesmus obliquus* και *Neochloris oleoabundans*, χρησιμοποιώντας τόσο ανάλυση με κυτταρομετρία ροής όσο και με Αέριο Χρωματογράφο παίρνοντας τα ίδια αποτελέσματα και από τις δύο αναλύσεις.

Μετά τη χρώση των κυττάρων των επιλεγμένων μικροφυκών και την παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού έγινε μια αρχική εκτίμηση για την ικανότητα παραγωγής και

συσσώρευσης λιπιδίων στα κύτταρά τους. Έντονο φθορισμό εμφάνισαν τα στελέχη *Colelastropsis* sp. ΑΚΒ2, *Chlorella* sp. ΑΚΑ17, *Chlorella* sp. ΑΚΑ13 και ΑΣΠ14. Τα στελέχη αυτά παρουσίασαν και υψηλό ποσοστό βαμμένων κυττάρων στην ανάλυση με Κυτταρομετρία Ροής. Συγκεκριμένα, το στέλεχος ΑΣΠ14 εμφάνισε ποσοστό βαμμένων κυττάρων 90,8%, το στέλεχος *Coelastropsis* sp. ΑΚΒ2 92%, το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 89% και το στέλεχος *Geminella* sp. ΑΚΑ16 79,2%. Με βάση τα αποτελέσματα από την ποιοτική αυτή ανίχνευση των παραγόμενων λιπιδίων αναμένεται τα στελέχη που έδωσαν τον πιο έντονο φθορισμό και τα υψηλότερα ποσοστά βαμμένων κυττάρων, μετά την ανάλυση με την Αέρια Χρωματογραφία να δώσουν και τη συνολικά μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων.

Το κάθε μικροφύκος έχει χαρακτηριστικό λιπιδικό πρότυπο το οποίο καθορίζεται από τις συνθήκες ανάπτυξής του (Mata et al., 2010). Τα λιπίδια που είναι κατάλληλα για βιοντίζελ αποτελούνται από 12 έως 22 άτομα άνθρακα ενώ κατάλληλα θεωρούνται επίσης κάποια λιπίδια της οικογένειας των ω3 και ω6 λιπαρών οξέων (Mata et al., 2010). Τα παραγόμενα λιπίδια όλων των εξεταζόμενων στην παρούσα εργασία μικροφυκών αποτελούνταν από 15 έως 20 άτομα άνθρακα.

Μετά την εκχύλιση των λιπιδίων και την ανάλυση με Αέρια Χρωματογραφία προέκυψε πως σε όλα τα μικροφύκη που αναπτύχθηκαν στα ημιτροφοδοτούμενα συστήματα (§ 3.3.1) το μεγαλύτερο ποσοστό παραγωγής (33,2 - 85,1 %) εμφανίζει το Παλμιτικό οξύ (C16:0). Το Παλμιτικό οξύ είναι ένα σύνηθες λιπαρό οξύ τόσο στα μικροφύκη όσο και στα ανώτερα φυτά και θεωρείται ως ένα κατάλληλο λιπαρό οξύ στην παραγωγή ανανεώσιμου βιοντίζελ (Knoth, 2008, Herrera-Valencia et al., 2011). Επίσης, όλα σχεδόν τα εξεταζόμενα μικροφύκη παρουσιάζουν παραγωγή Αραχιδικού οξέος και ειδικά το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ9 εμφανίζει ποσοστό παραγωγής περίπου 33 % από τα συνολικά παραγόμενα οξέα. Το Αραχιδικό οξύ (C20:0) συναντάται σπάνια σε θαλάσσια μικροφύκη και στα περισσότερα θαλάσσια είδη δεν υπάρχει παρά σε πολύ μικρά ποσοστά επί των συνολικά παραγόμενων λιπαρών οξέων (Kalpesh et al., 2012). Το στέλεχος ΑΣΠ14 μετά την ανάπτυξή του στο ημιτροφοδοτούμενο σύστημα (Εικόνα 3.25) είναι το μόνο που παράγει Λινολεϊκό και Λινολενικό οξύ και μάλιστα σε υψηλά ποσοστά (26,3 % και 22,4 % αντίστοιχα). Τα δύο αυτά λιπαρά οξέα αποτελούν τα βασικά πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που συναντώνται σε μικροφύκη (Gouveia and Oliveira, 2009).

Μετά τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των παραγόμενων μεθυλεστέρων προέκυψε πως τα στελέχη *Chlorella* sp. ΑΚΑ17, ΑΣΠ14 και *Chlorella* sp. ΑΚΑ9 είχαν τη μεγαλύτερη απόδοση σε μεθυλεστέρες με συγκέντρωση 229,25 mg, 169,90 mg και 159,05 mg μεθυλεστέρων ανά γραμμάριο βιομάζας αντίστοιχα. Από προηγούμενες μελέτες (Yan et al.,

2011, Duong et al., 2012) έχει προκύψει πως η απόδοση των διαφόρων στελεχών του γένους *Chlorella,* σε λιπίδια κυμαίνεται από 10 έως και 48 % επί της ξηρής βιομάζας ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης. Η παραγωγικότητα σε λιπίδια (ποσοστό επί της ξηρής βιομάζας) των δύο στελεχών της *Chlorella* που μελετήθηκαν ήταν 15,9 % για το στέλεχος ΑΚΑ9 και 23 % για το ΑΚΑ17 αντίστοιχα, ποσοστά αρκετά υψηλά για αυτότροφη καλλιέργεια. Τα αποτελέσματα συμφωνούν και με την εργασία των Mutlu και συνεργάτες (2011) όπου το στέλεχος *Chlorella protothecoides* έδωσε παρόμοια απόδοση σε λιπίδια η οποία αντιστοιχούσε στο 14,57 % επί της ξηρής βιομάζας. Όσον αφορά στο στέλεχος ΑΣΠ14, το ποσοστό παραγωγής λιπιδίων που είναι της τάξης του 17% επί της ξηρής βιομάζας και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ήταν το μόνο από τα μελετώμενα μικροφύκη που παράγει Λινολεϊκό και Λινολενικό οξύ, καθιστά το συγκεκριμένο στέλεχος πιθανή πρώτη ύλη για παραγωγή λιπιδίων κατάλληλων για βιοντίζελ.

Το στέλεχος *Geminella* sp. ΑΚΑ16 έδωσε τη μικρότερη παραγωγή λιπιδίων (63,75 mg μεθυλεστέρων / γραμμάριο βιομάζας). Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με το αποτέλεσμα από την ανάλυση με Κυτταρομετρία Ροής όπου εμφάνισε υψηλό ποσοστο βαμμένων κυττάρων. Η διαφορά που προέκυψε μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο τεχνικών για το στέλεχος *Geminella* sp. ΑΚΑ16 μπορεί να οφείλεται σε διάφορους λόγους. Όπως αναφέρουν οι Cirulis et al (2012), οι συνθήκες χρώσης επηρεάζουν δραματικά την ένταση του φθορισμού της χρωστικής. Ο έντονος φθορισμός μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιήθηκε να έβαψε και άλλα οργανίδια εκτός από τα λιποσώματα ή μεμβράνες. Επίσης μπορεί να οφείλεται στον αυτοφθορισμό της χρωστικής, ο οποίος ειδικά για το στέλεχος *Geminella* sp. ΑΚΑ16 ήταν πολύ έντονος κατά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Όπως αναφέρουν και οι Cooper et al (2010), ο αυτοφθορισμός της φθορίζουσας χρωστικής BODIPY 505/515 δεν προκαλεί παρεμβολές στις μετρήσεις φθορισμού όταν χρησιμοποιείται το πράσινο φίλτρο φθορισμού (488 nm), όπως στη συγκεκριμένη ανάλυση, κάποιες φορές όμως και ανάλογα με το είδος του μικροφύκους, μπορεί να συμβεί. Επίσης, τα μικροφύκη έχουν ιδιαίτερα παχύ κυτταρικό τοίχωμα το οποίο δεν είναι εύκολα διαπερατό. Είναι λοιπόν πιθανό σε κάποια μικροφύκη η χρωστική BODIPY να μην κατάφερε να διαπεράσει το κυτταρικό τοίχωμα παρά τη χρήση του DMSO ως φορέα της χρωστικής (Cirulis et al., 2012).

Από τα μικροφύκη που εξετάστηκαν τελικά επιλέχτηκαν τα στελέχη *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 και ΑΣΠ14 για περαιτέρω μελέτη καθώς έδωσαν μεγάλη παραγωγή βιομάζας, μεγάλη συνολική παραγωγή λιπιδίων και τη μεγαλύτερη ποικιλία παραγόμενων λιπιδίων. Το επόμενο βήμα ήταν η βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάπτυξης που θα οδηγούσαν στη

μέγιστη παραγωγή λιπιδίων. Η στέρηση θρεπτικών και συγκεκριμένα η στέρηση νιτρικών καθώς και η μεταβολή του pH έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε αύξηση της συσσώρευσης λιπιδίων στα κύτταρα των μικροφυκών (Gouveia and Oliveira, 2009, Pruvost et al., 2011, Kalpesh et al., 2012).

Το άζωτο είναι το κρίσιμο θρεπτικό συστατικό που επηρεάζει τον μεταβολισμό των λιπιδίων στα μικροφύκη. Η τάση για αύξηση της συσσώρευσης λιπιδίων, ιδιαίτερα τριγλυκεριδίων, ως απόκριση σε μείωση της παροχής νιτρικών αλάτων στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης έχει παρατηρηθεί σε διάφορα μικροφύκη (Hsieh et al., 2009, Yeh et al., 2011, Praveenkumar et al., 2012). Η τιμή του pH στο περιβάλλον ανάπτυξης των μικροοργανισμών επηρεάζει τη μεμβρανική όσμωση και κατά συνέπεια την ικανότητα απορρόφησης θρεπτικών συστατικών. Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει την επίδραση του pH στις κινητικές αύξησης των μικροοργανισμών και συμπέραναν ότι το pH είναι ο βασικός περιβαλλοντικός παράγοντας που επηρεάζει την κυτταρική ανάπτυξη και τον σχηματισμό των διαφόρων προϊόντων, όπως είναι και τα λιπίδια (Amanullah et al., 2001).

Δοκιμάστηκαν λοιπόν 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις νιτρικών, η συγκέντρωση του αρχικού θρεπτικού υποστρώματος 0,15 g/l $NaNO_3$, 0,00 g/l, 0,1 g/l και 0,05 g/l, και μελετήθηκε ταυτόχρονα η παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων για το κάθε στέλεχος. Το στέλεχος *Chlorella* sp. AKA17 έδωσε σχεδόν την ίδια παραγωγή βιομάζας στα 0,05 και 0,15g/l $NaNO_3$ (0,0682 mg/ml και 0,0688 mg/ml αντίστοιχα) που ήταν και η μεγαλύτερη, ενώ η μέγιστη παραγωγή λιπιδίων επιτεύχθηκε στα 0,1 g/l $NaNO_3$. Με τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των παραγόμενων μεθυλεστέρων προέκυψε πως σε συγκέντρωση $NaNO_3$ 0,1 g/l η απόδοση σε μεθυλεστέρες για το στέλεχος *Chlorella* sp. AKA17 αντιστοιχούσε στο 37 % της ξηρής βιομάζας (370,05 mg μεθυλεστέρων ανά g βιομάζας). Παρόμοια παραγωγή λιπιδίων παρατήρησαν οι Mutlu και συνεργάτες (2011) για το μικροφύκος *Chlorella vulgaris* με πλήρη στέρηση νιτρικών η οποία αντιστοιχούσε στο 35,6 % της ξηρής βιομάζας. Στα συνολικά παραγόμενα λιπίδια από το στέλεχος *Chlorella* sp. AKA17 προέκυψε αύξηση 10% με μείωση της συγκέντρωσης νιτρικών σε σχέση με τα αρχικά παραγόμενα λιπίδια. Αντίστοιχα αποτελέσματα αναφέρουν οι Converti και συνεργάτες (2009), για το μικροφύκος *Chlorella vulgaris,* το οποίο παρουσίασε αύξηση 16% στην παραγωγή λιπιδίων μετά από μείωση της συγκέντρωσης νιτρικών στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης.

Το στέλεχος ΑΣΠ14 σε συγκέντρωση $NaNO_3$ 0,1 g/l έδωσε τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας (0,068 g/ml) ενώ η μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων επιτεύχθηκε με πλήρη στέρηση νιτρικών, η οποία αντιστοιχούσε στο 11% της ξηρής βιομάζας. Όπως αναφέρουν οι Nigam

και συνεργάτες (2011), η μείωση της συγκέντρωσης νιτρικών επάγει την παραγωγή λιπιδίων αλλά οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή βιομάζας. Τέτοιου είδους παρατηρήσεις προκύπτουν και από παλαιότερες μελέτες (Evans and Ratledge, 1984; Yoon and Rhee, 1983). Έχει επίσης αναφερθεί πως η εναλλαγή ανάμεσα σε μείωση των νιτρικών και σε πλήρη στέρηση οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής λιπιδίων (Widjaja et al., 2009, Nigam et al., 2011). Αύξηση έως και 70% επί της ξηρής βιομάζας στο λιπιδικό περιεχόμενο έχει παρατηρηθεί σε διάφορα στελέχη μικροφυκών ως απόκριση σε μειωμένη προσθήκη νιτρικών στο θρεπτικό υπόστρωμα, με τα παραγόμενα λιπίδια να περιέχουν κυρίως κορεσμένα και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (Borowitzka, 1988, Hu, 2004, Roessler, 1990, Kalpesh et al., 2012).

Αξιοσημείωτη παρατήρηση και για τα δυο εξεταζόμενα μικροφύκη, ήταν η αλλαγή του λιπιδικού τους προτύπου με τη μείωση της συγκέντρωσης νιτρικών στο θρεπτικό υπόστρωμα. Για το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 παρατηρήθηκε πως η μείωση της συγκέντρωσης νιτρικών στο θρεπτικό υπόστρωμα οδήγησε στην επαγωγή παραγωγής Λινολεϊκού και Λινολεϊκού οξέος και μάλιστα σε υψηλά ποσοστά, ενώ δεν εμφανίστηκε παραγωγή Στεαρικού οξέος (C17:0). Το στέλεχος ΑΣΠ14 παρουσίασε μεγάλη παραγωγή Παλμιτικού οξέος (C16:0) σε όλες τις συγκεντρώσεις νιτρικών καθώς και υψηλή παραγωγή Παλμιτολεϊκού οξέος (C16:1) σε πλήρη στέρηση νιτρικών. Επίσης με μείωση της συγκέντρωσης νιτρικών δεν εμφάνισε παραγωγή Λινολεϊκού οξέος, ενώ μια μικρού ποσοστού παραγωγή Λινολενικού οξέος εμφανίστηκε σε συγκέντρωση 0,05 g/l.

Όπως έχει αναφερθεί το κάθε μικροφύκος έχει το δικό του μοναδικό λιπιδικό πρότυπο, το οποίο επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Για παράδειγμα, μείωση των νιτρικών στο θρεπτικό υπόστρωμα σε συνδυασμό με αύξηση της αλατότητας, οδήγησε σε επαγωγή παραγωγής του μεθυλ-τρανς-9-οκταδεκανοϊκού (C18:1) σε διάφορα μικροφύκη (Mata et al., 2010). Άλλοι ερευνητές αναφέρουν μεγάλες διαφοροποιήσεις στο λιπιδικό πρότυπο διαφόρων μικροφυκών μετά από μείωση ή και πλήρη στέρηση νιτρικών στο θρεπτικό υπόστρωμα (Pratoomyot et al., 2005; Natrah et al., 2007).

Ο δεύτερος παράγοντας που εξετάστηκε για την επίδρασή του στην παραγωγή λιπιδίων από τα δύο επιλεγμένα στελέχη ήταν το pH. Τα εξεταζόμενα μικροφύκη ΑΣΠ14 και *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 αναπτύχθηκαν σε 4 τιμές pH (6, 7, 8 και 9) και έδωσαν ταυτόχρονα τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων σε pH 8 και 9 αντίστοιχα.

Η αλλαγή του pH στο θρεπτικό υπόστρωμα οδήγησε σε διαφοροποίηση του λιπιδικού προφίλ των δύο στελεχών. Το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 εμφάνισε υψηλό ποσοστό παραγωγής Λινολενικού οξέος (64,88 %) σε ph 8 και Στεαρικού οξέος (35,12 %) ωστόσο δεν εμφάνισε παραγωγή άλλων λιπιδίων σε αυτή την τιμή pH. Σε pH 7 εμφάνισε μεγαλύτερη

ποικιλία παραγόμενων λιπιδίων, Παλμιτικό, Επταδεκανοϊκό, Στεαρικό, Οκταδεκανοϊκό και Λινολενικό οξύ και μάλιστα το Παλμιτικό και το Λινολενικό οξύ σε υψηλά ποσοστά. Τέλος στο pH 9 όπου έδωσε τη συνολικά μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων, τα παραγόμενα λιπίδια περιλάμβαναν Παλμιτικό, Επταδεκανοϊκό, Στεαρικό, Οκταδεκανοϊκό, Λινολεϊκό και Λινολενικό οξύ. Η συνολική παραγωγή σε λιπίδια για το στέλεχος *Chlorella* sp. AKA17 αντιστοιχούσε στο 20% της ξηρής βιομάζας

Το στέλεχος ΑΣΠ14 εμφάνισε επίσης διαφοροποιήσεις στο λιπιδικό του πρότυπο στις διάφορες τιμές pH. Σε όλες τις τιμές του pH εμφάνισε παραγωγή Μυριστικού οξέος σε χαμηλά ωστόσο ποσοστά. Εκτός από το pH 6, στις υπόλοιπες τιμές pH παρουσιάστηκε παραγωγή Παλμιτικού οξέος σε υψηλά ποσοστά. Σε pH 8, όπου έδωσε τη μέγιστη παραγωγή λιπιδίων εμφάνισε παραγωγή Λινολενικού οξέος σε ποσοστό 19,41 %, που ήταν και το μεγαλύτερης αλυσίδας λιπαρό οξύ που παρήγαγε το στέλεχος στις συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας. Για το στέλεχος ΑΣΠ14 η συνολική παραγωγή σε λιπίδια άγγιζε το 33% της βιομάζας.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι μεταβολές στο pH έχει αποδειχτεί ότι επηρεάζουν σημαντικά τη λιπιδική σύσταση των μικροφυκών (Kalpesh et al., 2012). Με βάση μορφολογικές παρατηρήσεις, το αλκαλικό pH παρεμποδίζει την ανάπτυξη των μικροφυκών με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούν την ενέργειά τους για να παράγουν λιπίδια (Guckert et al., 1990). Συγκεκριμένα, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ένα στέλεχος *Chlorella* και ένα στέλεχος *Chlamydomonas* παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση στην παραγωγή της βιομάζας αλλά παράλληλα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στη συνολική παραγωγή κορεσμένων λιπαρών οξέων και τριγλυκεριδίων με αύξηση του pH στο θρεπτικό υπόστρωμα (Guckert et al.,1990). Υπάρχουν όμως και αναφορές για μικροφύκη τα οποία σε αυξημένες τιμές ph παρουσίασαν μειωμένη παραγωγή τριγλυκεριδίων. Συγκεκριμένα οι Tatsuzawa και συνεργάτες (1996) αναφέρουν για το *Chlamydomonas* sp. ότι έδωσε μεγαλύτερη παραγωγή τριγλυκεριδίων σε pH 1 από ότι σε υψηλότερα pH.

Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων αυτών επιλέχθηκε η κατάλληλη συγκέντρωση νιτρικών αλάτων και τιμή pH για κάθε στέλεχος, όπου επιτυγχάνεται ταυτόχρονα μεγάλη παραγωγή βιομάζας και η μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων. Για το στέλεχος *Chlorella* sp. AKA17 η συγκέντρωση νιτρικών που επιλέχτηκε ήταν τα 0,1 g/l $NaNO_3$ και pH 9, ενώ για το ΑΣΠ14 ήταν τα 0,0 g/l $NaNO_3$ και pH 8.

Με χρήση της κατάλληλης συγκέντρωσης νιτρικών και τιμής του pH για το κάθε στέλεχος, θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με Walne medium ως θρεπτικό υπόστρωμα και προσομοίωση συνθηκών πεδίου (όπως περιγράφονται στην παράγραφο 2.9)

πραγματοποιήθηκαν ημιτροφοδοτούμενες καλλιέργειες τελικού όγκου 20 λίτρων. Μετά την ολοκλήρωση των καλλιεργειών στις 90 μέρες, η βιομάζα που συλλέχτηκε ήταν κατά 23% αυξημένη για το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 και 54% αυξημένη για το στέλεχος ΑΣΠ14 σε σχέση με την παραγωγή βιομάζας που προέκυψε από τις ημιτροφοδοτούμενες καλλιέργειες. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με μελέτη που πραγματοποιήθηκε για το *Nannochloropsis* sp. σε δεξαμενή όγκου 20 λίτρων με στέρηση νιτρικών οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής βιομάζας κατά 15% κατά την έναρξη της καλλιέργειας και έφτασε σε αύξηση 50% στο τέλος της καλλιέργειας 25 μέρες μετά σε σχέση με την παραγωγή βιομάζας που προέκυψε με χρήση του αρχικού θρεπτικού υποστρώματος. Όπως και στις καλλιέργειες των δύο επιλεγμένων στελεχών, στην παρούσα μελέτη, ο ρυθμός αύξησης του *Nannochloropsis* sp. ήταν αργός στην αρχή και αυξήθηκε μετά την πρώτη εβδομάδα καλλιέργειας (Rodolfi et al., 2008).

Η παραγωγή λιπιδίων μετά την ολοκλήρωση των καλλιεργειών των δύο στελεχών εμφάνισε σημαντικές διαφοροποιήσεις. Το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 εμφάνισε μεγάλη παραγωγή λιπιδίων που έφτανε το 50% της ξηρής βιομάζας (555,58 mg μεθυλεστέρων/g βιομάζας), με μια αξιόλογη ποικιλία λιπιδίων με 14 έως 18 άτομα άνθρακα. Το μεγαλύτερο ποσοστό παραγωγής εμφάνισε το cis-10-πενταδεκανοϊκό οξύ (C15:1) (43,57%).

Το στέλεχος ΑΣΠ14 σε αντίθεση με τη μεγάλη παραγωγή βιομάζας, έδωσε πολύ μικρή παραγωγή λιπιδίων που έφτανε μόλις το 11% της ξηρής βιομάζας. Επίσης παρουσίασε παραγωγή περισσότερων κορεσμένων λιπαρών οξέων, Μυριστικού (C14:0), Πενταδεκανοϊκού (C15:0) και cis-10- πενταδεκανοϊκού (C15:1). Προκύπτει λοιπόν για το μικροφύκος ΑΣΠ14, ότι ο συνδυασμός στέρησης νιτρικών και αύξησης της τιμής του pH οδήγησε σε μειωμένη παραγωγή λιπιδίων. Είναι πολύ πιθανό η ταυτόχρονη επιβολή της μείωσης των νιτρικών και της αύξησης του pH να επηρέασε τον μεταβολισμό των λιπιδίων (Kalpesh et al., 2012).

Όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.9, το εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε για τις καλλιέργειες των 20 λίτρων είχε αναπτυχθεί στις συνθήκες εκείνες που έδωσαν τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας. Στις μεγάλου όγκου καλλιέργειες εφαρμόστηκε μείωση της συγκέντρωσης νιτρικών με χρήση της κατάλληλης συγκέντρωσης για κάθε στέλεχος όπως αυτή καθορίστηκε για τη μέγιστη παραγωγή λιπιδίων. Τέτοιου είδους υβριδικά συστήματα καλλιέργειας αναφέρονται και σε βιομηχανική κλίμακα. Τα συστήματα αυτά αποτελούν μια μέθοδο που συνδυάζει δύο ξεχωριστά στάδια ανάπτυξης σε φωτοβιοαντιδραστήρες και ανοιχτά συστήματα. Το πρώτο στάδιο στοχεύει στη μέγιστη δυνατή παραγωγή βιομάζας και το δεύτερο, με επιβολή των κατάλληλων συνθηκών καταπόνησης, όπως στέρηση νιτρικών ή

αύξηση pH, στη μέγιστη δυνατή παραγωγή λιπιδίων (Huntley and Redalje, 2007, Rodolfi et al., 2008).

Η ίδια διαδικασία για επιλογή στελεχών κατάλληλων για παραγωγή βιοντίζελ ακολουθήθηκε και για τα απομονωμένα κυανοβακτήρια από την περιοχή του Ασπρόπυργου. Τα τρία στελέχη κυανοβακτηρίων αναπτύχθηκαν σε υγρές κλειστές καλλιέργειες σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25°C±1) και φωτισμού (φωτοπερίοδος 12:12 ώρες) με θρεπτικό υπόστρωμα Walne medium. Η παραγωγή βιομάζας που εμφάνισαν τα στελέχη *Phormidium* sp. ΑΣΚ1 και ΑΣΚ2 ήταν πολύ μικρή σε αντίθεση με το στέλεχος ΑΣΚ3 που παρουσίασε παραγωγή βιομάζας ίση με 4,65 mg / ml. Παρόλο όμως που δεν έδωσαν όλα μεγάλη παραγωγή βιομάζας και για τα τρία στελέχη κυανοβακτηρίων πραγματοποιήθηκε ανάλυση του λιπιδικού τους προτύπου καθώς τα δύο στελέχη ήταν άγνωστα και το ταυτοποιημένο στέλεχος *Phormidium* sp. ΑΣΚ1 δεν έχει μελετηθεί ως προς την ικανότητα παραγωγής λιπιδίων .

Οι εικόνες που προέκυψαν από τη χρώση των απομονωθέντων κυανοβακτηρίων με τη φθορίζουσα χρωστική BODIPY 505/515 και την παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο έδειξαν πολύ μικρή ένταση φθορισμού, με αποτέλεσμα να μηνείναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί ανάλυση με Κυτταρομετρία Ροής.

Μετά την εκχύλιση των λιπιδίων των κυανοβακτηρίων και την ανάλυσή τους με Αέρια Χρωματογραφία προέκυψε παραγωγή μόνο Παλμιτικού οξέος και σε πολύ μικρή ποσότητα και για τα τρία στελέχη. Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα πως τα κυανοβακτήρια που απομονώθηκαν δεν ήταν κατάλληλα για περαιτέρω μελέτη, καθώς δεν είχαν τις απαραίτητες προδιαγραφές που να τα καθιστούν πιθανή πρώτη ύλη για παραγωγή βιοντίζελ.

Μετά την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης προέκυψε πως ανάμεσα στα 74 μικροφύκη που απομονώθηκαν, το στέλεχος *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 έχει τα χαρακτηριστικά εκείνα που να το καθιστούν κατάλληλο για πρώτη ύλη για παραγωγή βιοντίζελ. Το συγκεκριμένο στέλεχος έχει δυνατότητα ανάπτυξης σε φτωχό θρεπτικό υπόστρωμα, όπως είναι το θαλασσινό νερό, το οποίο είναι άφθονο στη χώρα μας, με μια μικρή προσθήκη ιχνοστοιχείων και μετάλλων. Επίσης, έδωσε μεγάλη παραγωγή βιομάζας, ενώ μετά τις καλλιέργειες ημιπιλοτικής κλίμακας (παράγραφος §2.9) έδωσε παραγωγή λιπιδίων που αντιστοιχούσε στο 50% της βιομάζας με το λιπιδικό του πρότυπο να περιλαμβάνει λιπαρά

οξέα κατάλληλα για βιοντίζελ σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία (Belarbi et al., 2000, Knothe, 2006, Gouveia and Oliveira, 2009).

Γενικά Συμπεράσματα

- Απομονώθηκαν 74 μικροφύκη και 4 κυανοβακτήρια από τις περιοχές της Ακρόπολης, της λίμνης Κορώνεια και του Ασπρόπυργου, με ιδιαίτερα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά, τα οποία ταυτοποιήθηκαν φαινοτυπικά και μοριακά.
- Όλα τα απομονωμένα στελέχη εμφάνισαν ικανότητα ανάπτυξης σε φτωχά θρεπτικά υποστρώματα. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς σε βιομηχανικό επίπεδο παίζει μεγάλο ρόλο το χαμηλό κόστος παραγωγής.
- Επιλέχτηκαν τα 6 στελέχη μικροφυκών με τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων και τελικά επιλέχτηκαν 2, τα *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 και ΑΣΠ14, τα οποία παρουσίασαν μεγάλη παραγωγή βιομάζας, μεγάλη συνολική παραγωγή λιπιδίων αλλά και μεγάλη ποικιλία παραγόμενων λιπιδίων. Το λιπιδικό τους πρότυπο περιλάμβανε λιπαρά οξέα με 14 έως 21 άτομα άνθρακα και σε υψηλά ποσοστά, τα οποία θεωρούνται απαραίτητα για την παραγωγή βιοντίζελ.
- Αριστοποιήθηκαν οι συνθήκες ανάπτυξης (συγκέντρωση νιτρικών στο θρεπτικό υπόστρωμα, pH) για το κάθε στέλεχος για τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων.
- Τα επιλεγμένα στελέχη αναπτύχθηκαν σε κλειστές υγρές καλλιέργειες μεγάλου όγκου με χρήση των βέλτιστων συνθηκών με προσομοίωση συνθηκών πεδίου. Τα αποτελέσματα από τις καλλιέργειες οδήγησαν στην επιλογή του στελέχους *Chlorella* sp. ΑΚΑ17 ως το αποδοτικότερο σε παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων.

Στον Πίνακα 4.1 που ακολουθεί παρουσιάζονται συνοπτικά η παραγωγικότητα σε βιομάζα και λιπίδια των δύο επιλεγμένων στελεχών ΑΣΠ14 και *Chlorella sp.* ΑΚΑ17 στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν. Σε κάθε περίπτωση αναφέρονται οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν.

Πίνακας 4.1. Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για τα επιλεγμένα στελέχη ΑΣΠ14 και *Chlorella sp.* ΑΚΑ17.

Μικροφύκη	**Σύστημα καλλιέργειας**	**Παραγωγή βιομάζας**	**Παραγωγικότητα**	**Περιεχόμενο σε λιπίδια επί ξηρής βιομάζας**	**Παραγωγικότητα λιπιδίων (mg/l/d)**	**Επισημάνσεις**
Chlorella sp. ΑΚΑ17	Αυτότροφη καλλιέργεια 3 l	2.28 ± 0.05 (g/l)	0.12 (g/l/d)	23%	26.1	20 μέρες καλλιέργειας, BG11
	Βέλτιστη συγκέντρωση νιτρικών (250 ml)	0.068 ± 0.05 (g/ml)	0.003 (g/ml/d)	37 %	5	20 μέρες καλλιέργειας, BG11 (0.1 g/l N)
	Αυτότροφη καλλιέργεια (250 ml)	0.095 ± 0.02 (g/ml)	0.005 (g/ml/d)	21 %	3.8	20 μέρες καλλιέργειας, BG11 (pH 9)
	Καλλιέργεια 20l	23.7 ± 0.03 (g/l)	0.26 (g/l/d)	55 %	7.3	90 μέρες καλλιέργειας, Θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με ιχνοστοιχεία, 0.1 g/l N, pH 9
ΑΣΠ14	Αυτότροφη καλλιέργεια 3 l	1.5 ± 0.02 (g/l)	0.075 (g/l/d)	17 %	9.46	20 μέρες καλλιέργειας, BG11
	Βέλτιστη συγκέντρωση νιτρικών 250 ml	0.069± 0.035 (g/ml)	0.0034 (g/ml/d)	11.3 %	1.56	20 μέρες καλλιέργειας, BG11 (0 g/l N)
	Αυτότροφη καλλιέργεια (250 ml)	0.115 ± 0.005 (g/ml)	0.0058 (g/ml/d)	33 %	7.62	20 μέρες καλλιέργειας, BG11 (pH 8)
	Καλλιέργεια 20l	36.5 ± 0.1 (g/l)	0.402 (g/l/d)	11 %	2.3	90 μέρες καλλιέργειας, Θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με ιχνοστοιχεία 0 g/l N, pH 8

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Alcaine A.** (2010). "Biodiesel from Microalgae", Royal School of Technology
2. **Alvarez E.V.** (2006). "Genomic DNA isolation from green and brown algae (*Caulerpales* and *Fucales)* for microsatellite library construction", Journal of Phycology, 42:741-745
3. **Amanullah A., McFarlane C.M., Emery A.N., Nienow A.W.** (2001). "Scale-down model to simulate spatial pH variations in large-scale bioreactors", Biotechnology and Bioengineering, 73:390-399
4. **Angermayr A.S., Hellingwerf K.J., Lindblad P., Teixera de Mattos M.J.** (2009). "Energy Biotechnology with cyanobacteria" Current Opinion in Biotechnology, 20:257-263
5. **Auinger B.M., Pfandl K., Boenigk J.** (2008). "Improved Methodology of Protists and Microalgae from Pankton Samples Preserved n Lugol`s Iodine Solution: Combining Microscopic Analysis with Single-Cell PCR", Applied and Environental Microbiology, 74:2505-2510
6. **Barclay W.R.** (2005). "Mixture of omega-3 and omega-6 highly unsattiurated fatty acids from euryhaline microorganisms", US Patent 6977161
7. **Beer L., Boyd E., Peter J.,Posewitz M. (2009).** 'Engineering algae for biohydrogen and biofuel production', Current Opinion in Biotechnology, 20:264-271
8. **Behrens P.W., Thompson J.M., Apt K., Pfeifer J.W., Wynn J.P., Lippmeier C.** (2007). "Production of high levels of DHA in microalgae using modified amounts of chloride and potassium". US Patent 7163811
9. **Belarbi E.H., Molina Grima E., Chisti Y.** (2000). "A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentanoic acid esters from microalgae and fish oils", Enzyme Microbial Technology, 26:516-529
10. **Benemann J.R., Oswald W.J.** (1996). "Systems and Economic Analysis of Microalgae Ponds for Conversion of CO_2 to Biomass", Final Report, Pittsburgh Energy Technology Center
11. **Berard A., Dorigo U., Humbert J.F., Martin-Laurent F.** (2004). "Microalgae community structure analysis based on 18S rDNA amplification from DNA extracted directly from soil as a potential soil bioindicator", Agronomie 25:1-7
12. **Bergquist P.L., Hardiman E.H., Ferrari B.C., Winsley T.** (2009). "Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology", Extremophiles, 13:389-401

13. **Borowitzka M.A.** (1988). 'Fats, oils and hydrocarbons", In: Borowitzka M.A., Borowitzka L.J., editors, Micro-algal biotechnology, Cambridge:Cambridge University Press, pp.257-287
14. **Boutte C., Grubusic S., Balthasart P., Wilmotte A.** (2005). "Testing of primers for the study of cyanobacterial molecular diversity by DGGE", Journal of Microbiological Methods, doi:10.1016/j.mimet.2005.09.017
15. **Bouterfas R., Belkoura M., Dauta A.** (2006). "The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake", Limnetica, 25(3): 647-656
16. **Bozbas K.** (2008). "Biodiesel as an alternative motor fuel: production and policies in the European Union". Renewable and Sustainable Energy Reviews, 12:542-552
17. **Brennan L., Owende P.** (2009). "Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and co-products", Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14:557-577
18. **Bruton T., Lyons H., Lerat Y., Stanley M., Rasmussen M.B.** (2009). " A review of the potential of marine algae as a source of biofuel in Ireland". Sustainable Energy Ireland, p.88
19. **Burkill P.H.** (1987). "Analytical flow cytometry and its application to marine microbial ecology", In: Microbes in the sea, Wiley New York, pp. 139-166
20. **Burkill P.H., Mantoura R.F.C., Cresser M.** (1990). "Therapid analysis of single marine cells by flow cytometry", Philisophical Transactions of the Royal Society, 333:99-112
21. **Camacho R.F., Sanchez M.A., Ceron G.M.C., Camacho G., Grima M.E., Chisti Y.** (2004). "Mixing in bubble columns: a new approach for characterizing dispersion coefficients", Chemical Engineering Sciences, 59:4369-4376
22. **Canakci M., Sanli H.** (2008). "Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties". Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35: 431-441
23. **Cantrell K.B., Ducey T., Ro K.S., Hunt P.G.** (2008). "Livestock waste-to-bioenergy generation opportunities". Bioresource Technology, 99(17): 7941-7953
24. **Carvahlo A.P., Meireles L.A., Malcata F.X.** (2006). "Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances". Biotechnology Progress, 22(6): 1490-14506
25. **Carvalho A.P., Malcata F.X.** (2005). "Optimization of ω-3 fatty acid production by microalgae: Crossover effects of CO^2 and light indensity under batch and continuous cultivation modes", Marine Biotechnology, 7:381-388

26. **Chen M.**, **Tang H., Ma H., Holland T.C., Salley S.O.** (2011). "Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*", Bioresource Technology, 102:1649-1655
27. **Chen W., Zhang C.W., Song R.L., Sommerfield M., Hu Q.** (2009). "A hgh throughput Nile red method for quantitve measurement of neutral lipids in microalgae", Journal of Microbiology Methods, 77:41-47
28. **Chi Z.Y., Liu Y., Frear C., Chen S.L.** (2009). "Study of a two-stage growth of DHA-producing marine algae *Schizochytrium limacinum* SR21 with shifting dissolved oxygen level", Applied Microbial and Biotechnology, 81:1141-1148
29. **Chisti Y.** (2007). "Biodiesel from Microalgae". Biotechnology Advances, 25(3): 294-306
30. **Chojnkcka K., Marquez-Rocha F.J. (**2004). "Stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae". Biotechnology, 3(1): 21-34
31. **Cirulis J.T., Strasser R.C., Scott J.A., Ross G.M. (**2012). "Optimization of staining conditions for microalgae with tree lipophilic dyes to reduce precipitation and fluorecence variability", Cytometry, 81(7):618-626
32. **Coleman A.W., Mai J.C.** (1997). "Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 sequence comparisons as a tool for predicting genetic relatedness", Journal of Molecular Evolution, 45:168-177
33. **Coleman A.W., Suarez A., Golf L.J.** (1994). " Molecular delineation of species and syngens on volvocacean green algae (Chlorophyta)", Journal of Phycology, 30:80-90
34. **Converti A., Casazza A.A., Ortiz E.Y., Perego P., Del Borghi M.** (2009). "Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production", Chemical Engineering Processes, 48:1146-1151
35. **Cooper M.S., Hardin W.R., Petersen T.W., Cattolico R.A.** (2010). "Visualizing 'green oil' in live algal cells", Journal of Bioscience and Bioengineering, 109:198-201
36. **Cravotto G., Boffa L., Mantegna S., Perego P., Avogadro M., Cintas P.** (2008). "Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves". Ultrasonics Sonochemistry, 15(5):898-902
37. **Davey H.M.** (2010). "Prospects for the automation of analysis and interpretation of flow cytometric data", Cytometry Part A, 77:3-5
38. **De la Jara A., Mendoza H., Martel A., Molina C., Nordstron L., de l Rosa V.** (2003). "Flow cytometric determnation of lipid content in marine dinoflagellate, *Crypthecodinium cohnii*", Journal of Applied Phychology, 15: 433-438

39. **Diaz M., Herrero M., Garcia L.A., Quiros C.** (2010). "Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses", Biochemical Engineering Journal, 48:385-407

40. **Dismukes G.C., Carrieri D., Bennette N., Ananyev G.M., Posewitch M.C.** (2008). "Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels". Current Opinion in Biotechnology, 19(3): 235-240

41. **Doan T.T.Y., Obbard J.P.** (2011). "Improved Nile red staining of *Nannochloropsis sp.*", Journal of Applied Phychology, 23:895-901

42. **Doucha J., Livansky K.** (2012). "Production of high-density *Chlorella* culture grown in fermenters", Journal of Applied Phycology, 24:35-43

43. **Duong V.T., Li Y., Nowak E., Schenk P.M.** (2012). "Microalgae Isolationd Selection for Prospective Biodiesel Production", Energies, 5(6): 1835-1849

44. **Einicker-Lamas M., Mezian G.A., Fernandes T.B., Silva F.L.S., Guerra F., Miranda K., Attias M., Oliveira M.M.** (2002). "*Euglena gracilis* as a model for the study of Cu^{2+} and Zn^{2+} toxicity and accumulation in euaryotic cells", Environmental Polution, 120:779-786

45. **El-Sheek M.M., Rady A.A.** (1995). " Effect of phosphorus starvation on growth, photosynthesis and some metabolic processes in the unicellular green alga *Chlorella kessleri*", Phyton, 35:139-151

46. **European Commission** (2007). "Communication from the commission to the European council and the European parliament: an energy policy for Europe", In:EC COM 1, Final 2007, p.27

47. **Evans C.T., Ratledge C.** (1984). "Effect of Nitrogen Source on Lipid Accumulation in Oleaginous Yeasts", Journal of Genetic Microbiology, 130:1693

48. **Fork D.C., Murata N., Sato N.** (1979). "Effect of growth temperature on the lipid and fatty acid composition and the dependence on temperature of light-induced redox reaction of chytochrome f and of light energy redistribution in the thermophilic blue-green alga *Synechococcus lividus*", Plant Physiology, 63:524-530

49. **Gerber F., Krummen M., Potgeter H., Roth A., Siffrin C., Spoendlin C.** (2004). "Practical aspects of fast reversed-phase high performance liquid chromatography using 3μm particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practise", Journal of Chromatography, 1036:127-133

50. **Godhe A., Anderson D.M., Rehnstam-Holm A.S.** (2002). "PCR amplification of microalgal DNA for sequencing and species identification: studies on fixatives and algal growth stages", Harmful Algae, 1:375-382

51. **Gonzales M.A., Gómez P.I., Montoya R.** (1999). "Comparison of PCR-RFLP analysis of the ITS region with morphological criteria of various strains of Dunaliella", Journal of Applied Phycology, 10:573-580

52. **Gouveia L., Oliveira A.C.** (2009). "Microalgae as a raw material for biofuel production", Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 36:269-274

53. **Gouveia L., Marques A.E., da Silva T.L., Reis A.** (2009). '*Neochloris oleabundans* UTEX1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production", Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 36:821-826

54. **Govender T., Ramanna L., Rawat I., Bux F.** (2012). "BODIPY staining, an alternative to the Nile Red fluorescence method for the evaluation of intracellular lipids in microalgae", Bioresource Technology, 114:507-511

55. **Grima E.M., Fernandez F.G.A., Camacho F.G., Chisti Y.** (1999). "Photobioreactors: light regime, mass transfer and scaleup", Journal of Biotechnology, 70:231-247

56. **Guckert J.B., Cooksey K.E.** (1990). "Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in Chlorella during pH-induced cell cycle inhibition", Journal of Phycology, 26:72-79

57. **Guderjan M., Elez-Martinez P., Knorr D.** (2007). "Application of pulsed electric fields at oil yield and content of functional food ingredients at the production of rapeseed oil', Innovations Food Science, 8:55-62

58. **Guderjan M.,Töpfl S., Angersbach A., Knorr D.** (2005). 'Impact of pulsed electric field treatment on the recovery and quality of plant oils', Journal of Food Engineering, 67:281-287

59. **Gushina I.A., Harwood J.L.** (2006). "Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae", Progress in Lipid Research, 45:160-186.

60. **Guzman H.M., Valido A.D., Duarte L.C., Presmanes K.F.** (2011). "Analysis of interspecific variation in relative fatty acid composition: use of flow cytometry to estimate unsaturation index and relative polyunsaturated fatty acid content in microalgae", Journal of Applied Phychology, 23:7-15

61. **Hejazi M.A., Barzegari A., Gharajeh N.H., Hejazi M.S.** (2010). "Introduction of a novel 18s gene arrangement along with distinct ITS region in the saline water microalga Dunaliella", Saline Systems, 6:4

62. **Hsieh C.H., Wu W.T.** (2009). "Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation", Bioresource Technology, 100:3921-3926

63. **Hu C., Li M., Zhu Q., Liu Z.** (2008). "Variation of lipid and fatty acid compositions of the marine microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae) under

laboratory and outdoor conditions", World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24(7):1209-14

64. **Hu Q.** (2004). "Environmental effects on cell composition", Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Oxford:Blackwell Science Ltd, p.83-93

65. **Hu Q., Sommerfield M., Jarvis E., Ghirardi M., Poewitz M., Seibert M., Darzins A.** (2008). "Microalgal tiacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances", Plant Journal, 54:621-639.

66. **Huntley M.E., Redalje D.G.** (2007). "Mitigation Adaptation Strategies" Global Change, 12:573-608

67. **Hyka P., Lickova S., Přibyl P., Melzoch K., Kovar K.** (2012). "Flow Cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae", Biotechnology Advances, doi:10.1016/j.biotechadv.2012.04.007

68. **Ilavarasi A., Mubarakali D., Pravenkumar R., Balder E., Thajuddin N.** (2011). "Optimization of various growth media to freshwater microalgae for biomass production", Biotechnology, 10(6): 540-545

69. **Iyovo G.D., Du G., Chen J.** (2010). "Sustaianble biomethane, biofertilizer and biodiesel system from poultry waste", Indian Journal of Science and Technology, 3:1062-1069

70. **Jang E.S., Jung M.Y., Min D.B.** (2005). "Hydrogenation for low trans and high conjugated fatty acids", Comprehensive Reviews in Food Science and Safety, 4:22-30

71. **Jiang H.**, **Gao K.** (2004). "Effects of lowering temperature during culture on the production of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (bacillariophyceae)", Journal of Phycology, 40:651-654

72. **Kalpesh K.S., Schuhmann H., Schenk P.M.** (2012). "High lipid induction in microalgae for biodiesel production", Energies, 5:1532-1553

73. **Kanel S. and Guelcher S.A.** (1999). "Method of rupturing microalgae cells". US Patent 6000551

74. **Kang J.X., Wang J.** (2005). "A simplified method for analysis of polyunsaturated fatty acids", BMC Biochemistry, 6:5

75. **Katircioglu H., Beyatli Y., Aslim B., Yűksekly Z., Atici T.** (2005). "Screening for Antimicrobial Agent Production of Some Microalgae in Freshwater", The internet Journal of Microbiology, 2:2

76. **Khosla V.** (2009). "Where will biofuels and biomass feedstocks come from". http://www.khoslaventures.com/presentations/WhereWillBiomasComeFrom.doc [11/6/2008], p.31

77. **Knothe G.** (2006). "Analyzing biodiesel: standards and other methods", Journal of American Oil and Chemistry Society, 83:823-833

78. **Kuhne S., Lakatos M., Foltz S., Muffler K., Ulber R.** (2013). " Characterization of terrestrial cyanobacteria to increase process efficiency in low energy consuming production process", Sustainable Chemical Processes, 1:6

79. **Kumar P., Shahi S.K., Sharma P.K.** (2012). "Effect of various cultural factors on isolated Spirulina strain for lipid and biomass accumulation", Current Discovery, 1(1):13-18

80. **Lal R.** (2008). "Black and burried carbons` impacts on soil quality and ecosystem services", Soil and Tillage Research, 99(1):1-3

81. **Lamprinou V., Mammali M., Katsifas E.A., Pantazidou A.I., Karagkouni A.D.** (2012). "Phenotypic and Molecular Biological Characterization of Cyanobacteria from Marble Surfaces of Treated and Untreated Sites of Propylaea (Acropolis, Athens)", Geomocrobiology Journal, 30:371-378

82. **Lehmann J., Gaunt J., Rondon M.** (2006). "Bio-char sequestration in terrestrial ecosystems", Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change, 11:395-419

83. **Liang Y., Sarkany N., Chi Y., Blackburn J.W.** (2011). "Batch stage study of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation", Bioresource and Technology, 101:6745-6750

84. **Lincymol K.P., Itoop G., Lakshmi D.P., Anegkutty J.** (2012). "Modulation in Nutritional Quality of Microalgae *Chaetocero calcitranis* in Different Culture Media", Fishery Technology, 49(2)

85. **Lindstrom S.C., Hanic L.A.** (2005). "The phylogeny of North American *Urospora* (Ulotrichales, Chlorophyta) based on sequence analysis of nuclear ribosomal genes, introns and spacers", Phycologia, 44(2):194-201

86. **Liu Z.Y., Wang G.C., Zhou B.C.** (2008). "Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*", Bioresource Technology, 99:4717-4722

87. **Lynch D.V., Thompson T.G.** (1982). "Low temperature-induced alterations in the chloroplast and microsomal membranes of *Dunaliella salina*", Plant Physiology, 69:1369-1375

88. **Lynn S.G., Kilham S.S., Kreeger D.A., Interlandi S.J.** (2000). "Effect of nutrient availability on the biochemical and elemental stoichiometry in the freshwater diatom *Stephanodiscus minutulus* (bacillariophyceae)", Journal of Phycology, 36:510-522

89. **Makarevičiene V., Andrulevičiute V., Skorupskaite V., Kasperovičiene J.** (2011). "Cultivation of microalgae *Chlorella* sp. ans *Scendesmus* sp. as a potential biofuel feedstock", Environmental Research Engineering and Management, 3(57):21-27

90. **Marcus A.** (2010). "Viral Explosion: Decomating bacteria because we love them", MBL Microbial Diversity Course, Final Project, 1:1-19

91. **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

92. **Matthew T., Zhou W., Rupprecht J., Lim L., Thomas-Hall S.R., Doebbe A., Kruse O., Hankamer B., Marx U.C., Smith S.M.** (2009). "The metabolome o *Chlamydomonas reinhardtii* following induction of anaerobic H_2 production by sulfur depletion", The Journal of Biological Chemistry, 284:23415-23425

93. **Mercer P. and Armenta R.E**. (2011). ' Development in oil extraction from microalgae', European Journal of Lipid Science

94. **Miao X., Wu Q.** (2006). "Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil", Bioresource Technology, 97:841-846.

95. **Moore A.** (2008). " Biofuels are dead: long-live biofuels. New Biotechnology, 25(1): 6-12

96. **Morgan-Kiss R.M., Priscu J.C., Pcock T., Gudynaite-Savitch L., Huner N.P.A.** (2006). "Adaption and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environmemts", Microbial and Molecular Bilogy Reviews, 70:222-252

97. **Murata N., Troughton J.H., Fork D.C.** (1975). "Relationships between the transition of the physical phase of membrane lipids and photosynthetic parameters in *Anacystis nidulans* and lettuce and spinach chloroplasts", Plant Physiology, 56:508-517

98. **Mutlu Y.B., Işik O., Uslu L., Koc K., Durmaz Y.** (2011). "The effects of nitrogen and phosphorus deficiences and nitrate addition on the lipid content of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae)", African Journal of Biotechnology, 10(3):453-456

99. **Natrah F., Yoso V.F.M., Shari V.M. Abas F., Mariana N.S.** (2007). "Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value", Journal of Applied Phycology, 19:711-718

100. **Nigam S., Rai M.P., Sharma R.** (2011). "Effect of nitrogen on growth and lipid content of Chlorella pyrenoidosa", American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 7(3):124-129

101. **Norton T.A., Melkoniam M., Anderson R.A.** (1996). "Algal Biodiversity". Phycologia, 35:308-326

102. **Parmar A, Singh N.K., Pandey A., Gnansounou E., Madamwar D.** (2011). "Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels". Bioresource Technology, 102:10163-10172.

103. **Patil V., Tran K.Q., Giselrod H.R.** (2008). "Towards Sustainable Production of Biofuels from Microalgae", International Journal of Molecular Sciences, 9:1188-1195

104. **Pratoomyot J.**, Srivilas P., Noiraksar T. (2005). "Fatty acids composition of 10 microalgal species". Journal of Science and Technology, 27(6):1179-1187

105. **Praveenkumar R., Shameera K., Mahalakshmi G., Akbarsha M.A., Thajuddin N.** (2012). "Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga *Chlorella* sp. Bum11008: Evaluation for biodiesel production", Biomass Bioenergy, 37:60-66

106. **Pruvost J., Vooren G., Gouic B., Mossion A., Legrand J.** (2011). "Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application", Bioresource Technology, 102:150-158

107. **Pultz O., Scheinbenbogan K.** (1998). "Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input". Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 59: 123-152

108. **Pulz O., Gross W.** (2004). "Valuable products from biotechnology of microalgae". Applied Microbiology and Biotechnology, 65(6): 635-648

109. **Radakovits R., Jinkerson R.E., Fuerstenberg S.I., Tae H., Settlage R.E., Boore J.L., Posewitz M.C.** (2012). "Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*", Nature Communications, 3:686

110. **Reckermann M.** (2000). "Flow-sorting in aquatic Ecology', Marine Science, 64:235-246

111. **Reinhardt G., Rettenmaier N., Köppen S.** (2008). "How sustainable are biofuels for transportation?". In: Bioenergy: challenges and opportunities. International conference and exhibition in bioenergy.

112. **Reitan K.I., Rainuzzo J.R., Olsen Y.** (1994). "Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae", Journal of Phycology, 30:455-462

113. **Renaud S.M., Thinh L.V., Lambrinidis G., Parry D.L.** (2002). "Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures", Aquaculture, 211:195-214

114. **Richardson K., Beardall J., Raven J.A.** (1983). "Adaptation of unicellular algae to irradiance: An analysis of strategies", New Phytology, 93:157-191

115. **Richmond A.** (2004). "Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology". Blackwell Science Ltd.

116. **Rodolfi L., Zittelli G.C., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G**. (2008). "Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor". Biotechnology and Bioengineering, 102(1): 100-112

117. **Roessler P.G.** (1990). "Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae:Commercial implications ans future research directions", Journal of Phycology, 26:393-399

118. **Rogner H.H.** (2000). "Energy and the challenge of sustainability", Energy Resources. In: Goldemberg J, editor. New York: UNDP/UNDESA/WEC.

119. **Rosenberg J.N., Oyler G.A., Wilkinson L., Betebaugh M.J.** (2008). "A green light for engineered algae redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution". Current Opinion in Biotechnology, 19(5): 430-436

120. **Ruxton C.H.S., Reed S.C., Simpson M.J.A., Millington K.J.** (2007). "The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence", Journal of Human Nutrition and Dietics, 20(3):275-285

121. **Sato N., Hagio M., Wada H., Tsuzuki A.M**. (2000). 'Environmental effects on acidic lipids of thylakoid membranes', Biochemical Society Transactions, 28:912-914

122. **Sato N.**, **Murata N.** (1980). "temperature shift-induced responses in lipids in the blue-green alga *Anabaena variabilis*: The central role of diacylgalactosylglycerol in thermo-adaptation", Lipids and Lipid Metabolism, 619:353-366

123. **Schenk P., Thomas-Hall S., Stephens E., Marx U., Mussgnug J., Posten C.** (2008). "Second generation boifuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production". BioEnergy Resource, 1(1): 20-43

124. **Searchinger T., Heimlich R., Houghton R.A., Dong F., Elobeid A., Fabiosa J.** (2008). "Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change". Science, 319(5867): 1238-1240

125. **Sforza E., Bertucco A., Morsinott Giacometti G.M.** (2010). "Vegetal oil from microalgae:species selection and optimizationof growth parameters" Chemical Engineering Transactions, 20:199-204

126. **Shapiro H.M.** (2003). "Practical Flow Cytometry", 4th Edition, Wiley-Liss, New York

127. **Sheehan J., Dunahay T., Benemann J., Roessler P.** (1998). "A look back at the US Department of Energy`s Aquatic Species Program:Biodiesel from algae", US Report NREL/TP-580-24190. Golden CO: National Renewable Energy Laboratory, p. 323

128. **Shuhman H., Lim D.K.Y., Schenk P.M.** (2011). "Perspctives on metabolic engineering for increased lipid contents in microalgae", Biofuels, 3:71-86

129. **Somerville C.** (1995). "Direct tests of the role of membrane lipid composition in low-temperature-induced photoinhibition and chilling sensitivity in plants and cyanobacteria", Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 92:6215-6218

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

131. **Taiharo N. NIWA Ecotoxicology Laboratory** (1998). "Marine algae: *Dunaliella tertiolecta*",Chronic Toxicity Tet Protocol

132. **Takagi M.**, **Yoshida T.** (2006). "Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells", Journal of Biosciences and Bioenergy, 101:223-226

133. **Tatsuzawa H., Takizawa E., Wada M., Yamamoto Y.** (1996). "Fatty acid and lipic composition of the acidophilic green alga *Chlamydomonas* sp.". Journal of Phycology, 32:598-601

134. **Thomson G.A**.(1996). 'Lipids and membrane function in green algae', Biochemistry and Biophysics Acta, 1302:17-45

135. **Tredici M.R.** (1999). "Bioeractors, photo. In:Flickinger M.C., Drew S.W., editors. Encyclopedia of bioprocess technology:fermentation, biocatalysis and bioseperation", p.395-419

136. **Ugarte D.G., Walsh M.E., Shapouri H., Slinsky P.** (2003). "The economic impacts of bioenergy crop production in US agriculture", USDA Agricultural Economic Report No. 816:41

137. **Van den Hoek C., Mann D.G., Jahns H.M. (1995)**"Algae. An introduction to phycology", Cambridge University Press

138. **Veal D.A., Deere D., Ferrari B., Piper J., Attfield P.V.** (2000). "Fluorecense staining and flow cytometry for monitoring microbial cells", Journal of Microbiology Methods, 243:191-210

139. **Wahidin S., Idris A., Shaleh S.R.** (2012). " Effect of photoperiod on the growth of unicellular microalgae *Nannochloropsis* sp.", Journal of Biobased Materials and Bioenergy, 6:6

140. **Wang B., Li Y., Wu N., Lan C.** (2008)."CO_2 bio-mitigation using microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology, 79(5): 707-718

141. **Wei F.**, **Gao G.Z., Wang X.F., Dong X.Y.** (2008). 'Quantitve determination of oil content in small quantity of oilseed rape by ultrasound-assisted extraction combined with gas chromatography', Ultrasonic Sonochemistry, 15:938-942.

142. **Widjaja A. (2009).** 'Lipid Production from Microalgae as a promising candidate for biodiesel production', Makara Technologi, 13:47-51

143. **Widjaja A., Chien C.C., Ju Y.H.** (2009). "Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*", Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 40: 13-20

144. **Williams J.A.** (2002). "Keys to bioreactor selection". CEP Magazine, 34-41

145. **Williams P.J. and Laurens M.L.** (2010). "Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: review & analysis of the biochemistry, energetics & economics", Energy & Environmental Science, 3:554-590

146. **Xiong W., Xiang L.X., Wu Q.** (2008). "High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for micro-biodiesel production", Applied Microbiology and Biotechnology, 78(1):29-36

147. **Yamaguchi K.** (1996). "Recent advances in microalgal bioscience in Japan with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review". Journal of Applied Phycology, 8(6): 487-502

148. **Yan L., Schenk P.M**. (2011). "Selection of Cultured Microalgae for producing Omega-3 Bio-Lipid Oil; Report for Queensland Sea Scallop Trading Pty Ltd; The University of Queensland, Australia, p.36

149. **Yanquin L., Horsman M., Wang B., Wu N., Christopher Q.L.** (2010). "Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*", Springer Science, 81:629-636

150. **Yeh K.L., Chang J.S.** (2011). "Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid production of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* esp-31: Implications for biofuels", Biotechnology Journal, 6: 1358-1366

151. **Yentsch C.M., Horan P.H.** (1989). "Cytometry in Aquatic Sciences", Cytometry, 10:497-499

152. **Yoon S.H., Rhee J.S.** (1983). "Lipid from yeast fermentation: Effects of cultural conditions on lipid production and its characteristics of *Rhodotorula glutinis*", Journal of American Oil Chemistry, 60:1281

153. **Zhu C., Lee Y., Chao T.** (1997). "Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* tk1", Journal of Applied Phycology, 9:451-457

154. **Παπαδογιάννης Ι.Ν.και Σαμανίδου Β.Φ.** (2001). «Ενόργανη Χημική Ανάλυση», Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη

155. www.ccap.ac.uk

156. www.ypeka.gr

157. www.theoildrum.com/node/9547