



ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥ-
ΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟ-
ΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΥΓΡΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑΣ ΧΩΝΕΥΣΗΣ ΜΕ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ



ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΕΣ:

ΦΑΝΗ ΤΑΣΗ

ΕΛΕΝΗ ΚΟΥΡΕΜΕΝΟΥ

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ:

ΠΕΤΡΟΣ ΣΑΜΑΡΑΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ (2019)

Περιεχόμενα

1	Θεωρητικό Μέρος	6
1.1	Ζωικά Απόβλητα και Αναερόβια Χώνευση	6
1.2	Αμμωνιακά ιόντα στα ζωικά απόβλητα	7
1.3	Τα αμμωνιακά ιόντα ως περιοριστικός παράγοντας	8
1.4	Κυκλική Οικονομία	9
2	Φύκη.....	9
2.1	Μικροφύκη.....	10
2.1.1	Μορφολογία κυττάρων.....	10
2.1.2	Αναπαραγωγή φυκών.....	11
2.1.3	Συνθήκες ανάπτυξης μικροφυκών	13
2.1.4	Δυναμική ανάπτυξης μικροφυκών	18
2.1.5	Απομάκρυνση θρεπτικών ουσιών από τα λύματα προς ανάπτυξη των φυκών	19
2.2	Συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών.....	20
2.2.1	Συστήματα καλλιέργειας ανοιχτού τύπου	20
2.2.2	Συστήματα καλλιέργειας κλειστού τύπου	22
2.2.3	Υβριδικά συστήματα.....	24
2.2.4	Περιοριστικοί παράγοντες των καλλιεργειών.....	28
2.2.5	Υγρό κλάσμα χωνεμένου ζωικού αποβλήτου ως λίπασμα	29
2.2.6	Περιβαλλοντικές επιπτώσεις.....	30
3	Πειραματικό μέρος - Υλικά και μέθοδοι	30
3.1	Πρόελευση ζωικού υπολείμματος.....	30
3.2	Ανάπτυξη στελεχών μικροφυκών από το χωνεμένο ζωικό απόβλητο	30
	31
3.3	Ανάπτυξη στελεχών μικροφυκών από το ακατέργαστο ζωικό υπόλειμμα και το χωνεμένο ζωικό υπόλειμμα από τη δεξαμενή	31
3.4	Συστηματικός έλεγχος κυτταρικής ανάπτυξης.....	32
3.5	Μέτρηση κυττάρων μικροφυκών σε οπτικό μικροσκόπιο	32
3.6	Μέθοδος προσδιορισμού χλωροφύλλης α.....	33
4	Καλλιέργεια των μικροφυκών σε θρεπτικό μέσο	34
5	Μέτρηση αμμωνιακού αζώτου	37
6	Αποτελέσματα και Σχόλια.....	37
6.1	Περιοριστικός παράγοντας Lagoon.....	38
6.2	Αποτελέσματα ανάπτυξης μικροφυκών σύμφωνα με την καμπύλη κυτταρικής ανάπτυξης.....	39

6.3	Αποτελέσματα καταγραφής χλωροφύλλης α	42
6.4	Αποτελέσματα ανάπτυξης μικροφυκών στα θρεπτικά μέσα.....	45
6.5	Απομάκρυνση αμμωνιακού αζώτου.....	47
7	Συμπεράσματα.....	48
8	Βιβλιογραφία	49

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Επιθυμούμε να εκφράσουμε την ευγνωμοσύνη μας στον Καθηγητή και επιβλέποντα της παρούσας πτυχιακής εργασίας κ. Πέτρο Σαμαρά, για την εμπιστοσύνη και την ευκαιρία που μας έδωσε, να ασχοληθούμε με ένα τόσο ενδιαφέρον και συνάμα οικολογικής σημασίας θέμα.

Επιπρόσθετα θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ευχαριστίες μας στο προσωπικό του εργαστηρίου(κα. Γρούνα Χρυσάνθη, τον καθηγητή Jonathan Rhodes) για την βοήθειά τους καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Γεωπονίας του ΑΠΘ Ιωαννα Πεϊτζίκα για τις πολύτιμες γνώσεις της και την άψογη συνεργασία μας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επεξεργασία των κτηνοτροφικών αποβλήτων για παραγωγή βιοαερίου επιφέρει τεράστιες ποσότητες υγρού κλάσματος χωνεμένου υπολείμματος. Το υγρό αυτό κλάσμα φορτισμένο με μεγάλες ποσότητες αμμωνιακών ιόντων απαιτεί με τη σειρά του επεξεργασία προκειμένου να διατεθεί ως νερό άρδευσης. Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η εκμετάλλευση του φορτίου αυτού ως θρεπτικό μέσο για καλλιέργεια μικροφυκών και η απομάκρυνση του αμμωνιακού φορτίου. . Σε αυτή τη μελέτη, διερευνήθηκαν οι ρυθμοί ανάπτυξης μικροφυκών μέσα σε αναλογίες 1%, 2% και 5% ακατέργαστων ζωικών αποβλήτων και υγρού χωνεμένου ζωικού αποβλήτου μιας Μονάδας παραγωγής βιοαερίου, καταμετρώντας τον αριθμό των κυττάρων σε πλάκα Neubauer και την τιμή της χλωροφύλλης α μέσα σε διάστημα 70 ημερών. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το ανεπτυγμένο στέλεχος μικροφυκών σε νέο υγρό κλάσμα χωνεμένου ζωικού υπολείμματος και εξετάστηκε η απομάκρυνση του φορτίου των αμμωνιακών ιόντων. Η μεγαλύτερη ανάπτυξη μικροφυκών σημειώθηκε σε ακατέργαστα ζωικά απόβλητα αναλογίας 5% με μέγιστο αριθμό κυττάρων μικροφυκών $1040 \cdot 10^5$ ανά mL και τιμή χλωροφύλλης α $100 \cdot 10^{-8}$ mg/mL. Η αντίστοιχη απομάκρυνση των αμμωνιακών ιόντων βρέθηκε 78% σε διάστημα 26 ημερών.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι γεγονός ότι η ρύπανση κάθε μορφής, αποτελεί ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα που αντιμετωπίζει η ανθρωπότητα. Τα αποβαλλόμενα οργανικά απόβλητα κτηνοτροφικών μονάδων, όσο και τα απόβλητα προερχόμενα από ανθρώπινες δραστηριότητες, οδηγούν στη μόλυνση του περιβάλλοντος.

Στα πλαίσια μιας προσπάθειας διαχείρισης του όγκου των αποβλήτων, θέτονται στόχοι οι οποίοι αφορούν την μείωση των ορίων διάθεσής μας, με στόχο πολύ μικρότερες απαιτήσεις σε χώρο και όγκο και συνεπώς οικονομικότερη διαχείριση. Παράλληλα, αναζητούνται τρόποι που θα βοηθήσουν στην καλύτερη δυνατή αξιοποίηση των αποβλήτων, με στόχο τη μείωση μας περιβαλλοντικής υποβάθμισης.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον μας εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, παρουσιάζουν τα είδη φυκών, η κατάταξη των οποίων βασίζεται κυρίως στον τύπο μας χλωροφύλλης που φέρουν. Στην κατηγορία αυτών ανήκουν τα μικροάλγη, τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν και να επιβιώσουν σε υδαρές συνθήκες, στην περίπτωση μας στο υγρό περιβάλλον των κτηνοτροφικών αποβλήτων.

Στην εργασία μας, θα ερευνηθούν οι συνθήκες και οι ρυθμοί ανάπτυξης των μικροαλγών σε αμμωνιακό περιβάλλον και κατόπιν στο υγρό κλάσμα χωνεμένου ζωικού υπολείμματος, προκειμένου να διερευνηθεί η απομάκρυνση του φορτίου των αμμωνιακών ιόντων.

Θεωρητικό Μέρος

1.1 Ζωικά Απόβλητα και Αναερόβια Χώνευση

Η αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού επιφέρει αύξηση παραγωγής τροφίμων και κατανάλωσης ενέργειας. Η χρήση ανόργανων λιπασμάτων προκαλεί μείωση των φυσικών ορυκτών αποθεμάτων και αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον. Η εκμετάλλευση και σωστή διαχείριση των τεράστιων όγκων ζωικών αποβλήτων αποτελεί λύση στα παραπάνω προβλήματα. Με τη διεργασία της Αναερόβιας Χώνευσης οργανικών αποβλήτων επιτυγχάνεται ανάκτηση ανόργανων στοιχείων τα οποία χρησιμοποιούνται ως λίπασμα και παραγωγή βιοαερίου για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών (Ma *et al.*, 2018).

Αναερόβια χώνευση καλείται η διαδικασία κατά την οποία αποσυντίθεται η οργανική ύλη, απουσία οξυγόνου και παραλαμβάνονται ως προϊόντα το βιοαέριο και το χωνεμένο υπόλειμμα (T Lukehurst *et al.*, 2010). Η ποιότητα του χωνεμένου υπολείμματος που προκύπτει εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την ποιότητα των ζωικών αποβλήτων με τα οποία τροφοδοτείται η μονάδα παραγωγής βιοαερίου (Seadi and Lukehurst, 2012). Η διαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων στα χωνεμένα απόβλητα

τα λόγω ανοργανοποίησής τους, τα καθιστούν κατάλληλα για χρήση ως λίπασμα σε σχέση με τα ακατέργαστα απόβλητα. Επιπλέον, μέσω της αναερόβιας χώνευσης γίνεται αδρανοποίηση παθογόνων ζώων και φυτών και σπόρων ζιζανίων. Παρότι τα πλεονεκτήματα της αναερόβιας χώνευσης αποβλήτων είναι αρκετά ως προς τη χρήση τους για εδαφοβελτιωτικό, πολλές χώρες προϋποθέτουν ποιοτικό έλεγχο εξαιτίας της παρουσίας οργανικών ρύπων, αποτρέποντας πιθανές αρνητικές επιπτώσεις στο έδαφος, στη βλάστηση και την ανθρώπινη υγεία (Seadi and Lukehurst, 2012).

Με την αξιοποίηση του χωνεμένου υπολείμματος πραγματοποιείται ανακύκλωση των θρεπτικών στοιχείων, συμβάλλοντας στη βιωσιμότητα της γεωργικής παραγωγής (T Lukehurst *et al.*, 2010). Η περιεχόμενη θρεπτική αξία των διαφόρων ειδών αποβλήτου παρουσιάζεται στον Πίνακα 1 και η εναπόθεσή τους στις καλλιέργειες πρέπει να γίνεται με σύνεση καθώς φέρουν μεγάλες ποσότητες αμμωνιακού φορτίου (Oenema and Tamminga, 2005).

Πίνακας 1 Χαρακτηριστικά ζωικών αποβλήτων (T Lukehurst *et al.*, 2010)

Feedstock	TS %	Total N	NH ₄ -N	P	K	S	Mg
Dairy cow slurry	6	3.0	2.0	0.5	2.9	0.4	0.4
Pig slurry	4	4.0	2.5	0.9	2.1	0.4	0.2
Poultry:							
Layer manure	30	16.0	3.2	5.7	7.5	1.5	1.3
Broiler/turkey litter	60	30.0	12	10.9	15	3.3	2.5
Farmyard Manure							
Cattle	25	6.0	0.6	1.5	6.7	0.7	0.4
Pig	25	7.0	0.7	3.1	4.2	0.7	0.4

1.2 Αμμωνιακά ιόντα στα ζωικά απόβλητα

Οι ζωοτροφές περιέχουν πλεόνασμα πρωτεϊνών και αμινοξέων, δηλαδή πηγών αζώτου, τα οποία δεν αφομοιώνονται από τα ζώα και εκκρίνονται. Το άζωτο εμφανίζεται ως ουρία στα ούρα και ως οργανικό άζωτο στα περιττώματα των ζώων (Ndegwa *et al.*, 2008). Μέσα σε χρονικό διάστημα από μία έως μερικές ημέρες η ουρία μετατρέπεται από το ένζυμο ουρεάση που βρίσκεται στα περιττώματα σε αμμωνιακά ιόντα (Béline *et al.*, 1998).

Η οργανική ουσία των ζωικών ακατέργαστων αποβλήτων, απουσία οξυγόνου και με τη δράση μικροοργανισμών, μετατρέπεται σε διοξείδιο του άνθρακα και μεθάνιο, που συνιστούν το βιοαέριο. Κατά την αναερόβια χώνευση, σχεδόν όλο το άζωτο που βρίσκεται εξ αρχής στα ακατέργαστα ζωικά απόβλητα, παραμένει (Mital, 1997). Κατά το στάδιο της υδρόλυσης, πραγματοποιείται ανοργανοποίηση των οργανικών ενώσεων, όπως του οργανικού αζώτου σε αμμωνιακά ιόντα (Eriksson and Runevad, 2016). Επομένως, η συγκέντρωση αμμωνιακών ιόντων αυξάνεται και είναι σε κατάλληλη μορφή να προσληφθεί από τα φυτά (Huang *et al.*, 2017).

Μετά την παραγωγή του βιοαερίου, το χωνεμένο υπόλειμμα διαχωρίζεται σε στερεό και υγρό κλάσμα ώστε να γίνει αποτελεσματικά η αξιοποίηση του κάθε υποπροϊόντος (Cavalli *et al.*, 2017). Η διαφορά των δύο υποπροϊόντων έγκειται στην περιεκτικότητα των αμμωνιακών ιόντων που υπερτερούν στο υγρό κλάσμα έναντι του στερεού (Cavalli *et al.*, 2017). Μετά τον διαχωρισμό τους τοποθετείται το υγρό κλάσμα σε μία ανοιχτή δεξαμενή αποθήκευσης προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως λίπασμα (Maldaner *et al.*, 2018).

Σύμφωνα με την οδηγία Directive, 2008/98/EC περί διαχείρισης αποβλήτων, τα υποπροϊόντα των αποβλήτων θα πρέπει να διοχετεύονται με τέτοιο τρόπο ώστε να μην προκύπτουν περιβαλλοντικές επιβαρύνσεις. Με την εναπόθεση μεγάλων ποσοτήτων αμμωνιακών ιόντων στις καλλιέργειες τα φυτά αν και έχουν στη διάθεση τους μεγάλες ποσότητες θρεπτικών ώστε να αναπτυχθούν γρήγορα, σύντομα λόγω περιβαλλοντικών και μικροβιακών συνθηκών το διαθέσιμο άζωτο χάνεται (Alburquerque *et al.*, 2012). Επομένως, απαιτείται βελτιστοποίηση μεταξύ του ρυθμού εναπόθεσης και αφομοίωσης αμμωνιακών ιόντων από τα φυτά ώστε να επιτυγχάνεται ένας ικανοποιητικός κύκλος καλλιέργειας (Alburquerque *et al.*, 2012). Συνυπολογίζοντας το κόστος μεταφοράς με το περιβαλλοντικό κόστος, μίας τέτοιας μεταχείρισης κρίνεται ανεπικερδής (Haruny, 1997).

1.3 Τα αμμωνιακά ιόντα ως περιοριστικός παράγοντας

Το αμμωνιακό φορτίο το οποίο προστίθεται στο έδαφος δεν διατίθεται στα φυτά άμεσα (Θερίος, 2005). Αυτό συμβαίνει λόγω της δέσμευσης των αμμωνιακών ιόντων από τα κατιόντα της αργίλου με αποτέλεσμα να καθίστανται μη διαθέσιμα για τα φυτά. Με χορήγηση Καλίου στην καλλιέργεια 7-10 μέρες μετά την διάθεση NH_4^+ παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση Αζώτου (Θερίος, 2005).

Επιπλέον, μπορεί να συμβεί βιολογική δέσμευση αζώτου στο έδαφος από μικροοργανισμούς όπου το στερούν από τα φυτά. Η ακινητοποίηση του εδαφικού αζώτου συμβαίνει όταν υπάρχει πολύς άνθρακας στα φυτικά υπολείμματα, τον οποίο καταναλώνουν οι μικροοργανισμοί και πολλαπλασιάζονται σε μεγάλους ρυθμούς. Για τη σύνθεση των πρωτεϊνών τους απαιτούν και άζωτο το οποίο δεσμεύουν από το έδαφος, με αποτέλεσμα η καλλιέργεια να υποφέρει από έλλειψη αζώτου και να οδηγείται σε θάνατο (Κεραμίδας and Σινάνης, 2004). Οι μικροοργανισμοί προτιμούν NH_4^+ συγκριτικά με NO_3^- αν υπάρχουν και οι δύο μορφές αζώτου διαθέσιμες (Θερίος, 2005). Επανέρχεται στο έδαφος και καθίσταται διαθέσιμο ως παραπροϊόν του μεταβολισμού των μικροοργανισμών, είτε ως οργανική ουσία των νεκρών μικροοργανισμών (Βερεσόγλου, 2002).

Τέλος, τα αμμωνιακά ιόντα οξειδώνονται σε νιτρικά ιόντα σύμφωνα με τη διεργασία της νιτροποίησης σε καλώς αεριζόμενα εδάφη (Βερεσόγλου, 2002; Θερίος, 2005). Η οξείδωση των αμμωνιακών ιόντων συμβαίνει σε δύο στάδια, αρχικά με τη δράση των βακτηρίων *Nitrosomonas*, μετατρέποντάς τα σε νιτρώδη και μετέπειτα με τη δράση των βακτηρίων *Nitrobacter* μετατρέποντας τα νιτρώδη σε νιτρικά. Τα βακτήρια αυτά είναι χημειοσυνθετικοί αυτότροφοι οργανισμοί καθώς η ενέργεια που απαιτούν για

τις δραστηριότητές τους προκύπτει από την οξείδωση(Βερεσόγλου, 2002; Θεριός, 2005).

1.4 Κυκλική Οικονομία

Συνοψίζοντας τα οφέλη, μπορεί να ειπωθεί πως επιτυγχάνονται οι στόχοι της Κυκλικής Οικονομίας για τη διαχείριση των αποβλήτων(Stiles *et al.*, 2018). Το απόβλητο μιας μονάδας Παραγωγής Βιοαερίου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κύριο προϊόν για την παραγωγή μικροφυκών. Στη συνέχεια, το απομένον υγρό μετά την καλλιέργεια μικροφυκών, αποφορτισμένο από τη μεγάλη συγκέντρωση των αμμωνιακών ιόντων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως νερό άρδευσης. Τέλος, η βιομάζα των μικροφυκών χρησιμοποιείται για παραγωγή ενέργειας(Zhan *et al.*, 2017).

Φύκη

Τα φύκη, αποτελούν μια μορφή ζωής που παρατηρείται σε υδρότοπους αλλά και σε συστήματα επεξεργασίας λυμάτων. Είναι μικροοργανισμοί, οι οποίοι διαφοροποιούνται από τους μύκητες και τα πρωτόζωα κυρίως ως προς την ικανότητα που έχουν να φωτοσυνθέτουν. Είναι θαλλόφυτα (στερούνται ριζών, στελεχών και φύλλων) που περιέχουν χλωροφύλλη α ως κύρια χρωστική φωτοσυνθετική ουσία(Sluijan, 2009). Τα φύκη ποικίλουν από μονοκύτταρους μικροοργανισμούς μέχρι μεγάλα επιμήκη πολυκυτταρικά συσσωματώματα τα οποία έχουν μήκος έως και 30m. Τα κύτταρα από τα οποία αποτελούνται αυτά τα συσσωματώματα διατηρούνται ανεξάρτητα και αυτό το γεγονός τα διαφοροποιεί από τα φυτά που είναι κι αυτά φωτοσυνθετικοί οργανισμοί.

Η κατάταξη των φυκών βασίζεται κυρίως στον τύπο της χλωροφύλλης που φέρουν, στη δομή του κυττάρου τους και στο είδος του οργανικού υλικού που αποθηκεύεται. Ανάλογα με το μέγεθός τους, διακρίνονται στα Μικροφύκη όπου κυμαίνονται μεταξύ 0.2μm -200μm και στα Μακροφύκη με μέγεθος από μερικά εκατοστά έως δεκάδες μέτρα. (Γκέλης, 2015) Οι κυριότερες ομάδες αυτών είναι:

- τα χλωρόφυτα (chlorophyta)
- τα χρυσόφυτα (chrysofyceae)
- τα πυρρόφυτα (pyrophyta)
- τα ροδόφυτα (rhodophyta)
- τα φαιόφυτα (phaeophyta) και
- τα ευγλενόφυτα. (euglenophyta)

Τα είδη των φυκών - αλγών που παρουσιάζουν ενδιαφέρον σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων είναι τα χλωρόφυτα, τα χρυσόφυτα και τα ευγλενόφυ-

τα, τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των μικροφυκών, τα οποία μελετάμε στην παρούσα εργασία.

2.1 Μικροφύκη

Τα μικροφύκη ή αλλιώς μικροάλγη, αποτελούν μια τεράστια ομάδα ετερότροφων φωτοσυνθετικών οργανισμών που δύνανται να καλλιεργηθούν για την παραγωγή ενέργειας. Μπορούν να καλλιεργηθούν κάτω από δύσκολες κλιματικές συνθήκες και μπορούν να παράγουν μεγάλη ποικιλία οικονομικά ενδιαφερόντων βιοπροϊόντων, όπως λίπη, έλαια, σάκχαρα και λειτουργικές βιοενεργές ενώσεις. Παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην ανάπτυξη μελλοντικών σεναρίων για παραγωγή ανανεώσιμης ενέργειας. Συγκεκριμένα είδη μικροαλγών είναι αποτελεσματικά στην παραγωγή υδρογόνου και οξυγόνου μέσω της βιοφωτόλυσης, ενώ άλλα παράγουν φυσικά υδρογονάνθρακες κατάλληλους για άμεση χρήση σαν υγρά καύσιμα υψηλής ενέργειας.

Λόγω του **μικρού** τους μεγέθους, μπορούν να εξεταστούν εύκολα σε εργαστηριακή κλίμακα, με αποτέλεσμα να μας δίνουν πλήθος εξελισσόμενων οικονομικών επιλογών. Στη βιομάζα τους, μπορούν να ενσωματωθούν αποτελεσματικά σταθερά ισότοπα, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο γενετικές και μεταβολικές έρευνες να πραγματοποιούνται σε πολύ μικρότερη χρονική περίοδο από ότι τα συμβατικά φυτά.

2.1.1 Μορφολογία κυττάρων

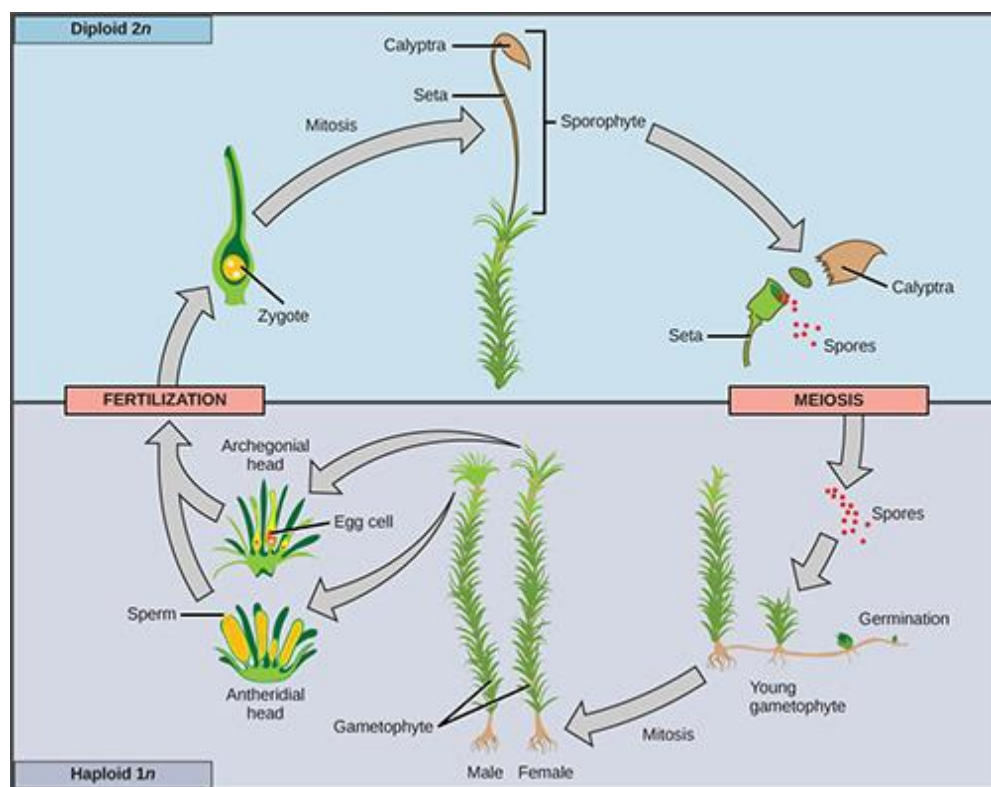
Τα μικροφύκη παρουσιάζονται ως μονοκύτταρα, σε αποικίες ή νηματοειδή (Edited by Amos, 2004). Μπορεί επίσης να προβάλλουν κινητικότητα λόγω ύπαρξης μαστίγιων. Επιπρόσθετα, ο αριθμός των κυττάρων των αποικιών μπορεί να είναι συγκεκριμένος (πχ *Scenedesmus*) ή απροσδιόριστος (πχ *Pediastrum*). Σύμφωνα με τη δομή τους, διακρίνονται σε ευκαρυωτικά και προκαρυωτικά. (Edited by Amos, 2004) Τα μικροάλγη κυρίως κατατάσσονται στα ευκαρυωτικά φύκη, που αποτελούν μια πολυφυλετική κατηγορία οργανισμών.

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν οργανωμένο πυρήνα και κυτταρική μεμβράνη που περικλείει τα οργανίδια. Οι χλωροφύλλες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα, περιέχονται στα θυλακοειδή των χλωροπλαστών. Ανάλογα με το γένος του μικροφύκου, τα θυλακοειδή μπορεί να περιέχουν και φυκοβιλιπρωτεΐνες ή μπορεί αυτές να βρίσκονται ελεύθερες ανάμεσα σ' αυτά. Για παράδειγμα, στα Κρυπτοφύκη, το άμυλο μπορεί να βρίσκεται μέσα στα θυλακοειδή των χλωροπλαστών, ενώ στα Ροδοφύκη εκτός. (Edited by Amos, 2004; Sluiman, 2009). Επίσης, στα ευκαρυωτικά μι-

κροφύκη, στα οποία οργανίδια γίνεται αναγωγή του αζώτου, τα πυρηνοειδή μπορεί να υπάρχουν μέσα στους χλωροπλάστες. (Edited by Amos, 2004)

2.1.2 Αναπαραγωγή φυκών

Υπάρχουν δύο βασικοί τρόποι αναπαραγωγής των φυκών. Ορισμένα άλγη είναι μονοκύτταρα και επιδεικνύουν τους απλούστερους δυνατούς κύκλους ζωής. Υπάρχει μια γενετική φάση και μια φυτική φάση. Κατά τη διάρκεια της γενετικής φάσης, οι κύστες απελευθερώνονται. Οι κύστες ανοίγουν για να σχηματίσουν γαμέτες και στη συνέχεια σχηματίζουν το ζύγω. Από εκεί, η φυτική φάση συμβαίνει έτσι ώστε το φυτό να αναπτύσσεται και να σχηματίζονται νέες κύστες. Τα περισσότερα άλγη έχουν δύο αναγνωρίσιμες φάσεις, σπορόφυτα και γαμετόφυτα. Η κύρια διαφορά είναι ότι απαιτείται ένας αρσενικός και θηλυκός τύπος για να σχηματίσουν το ζύγω.

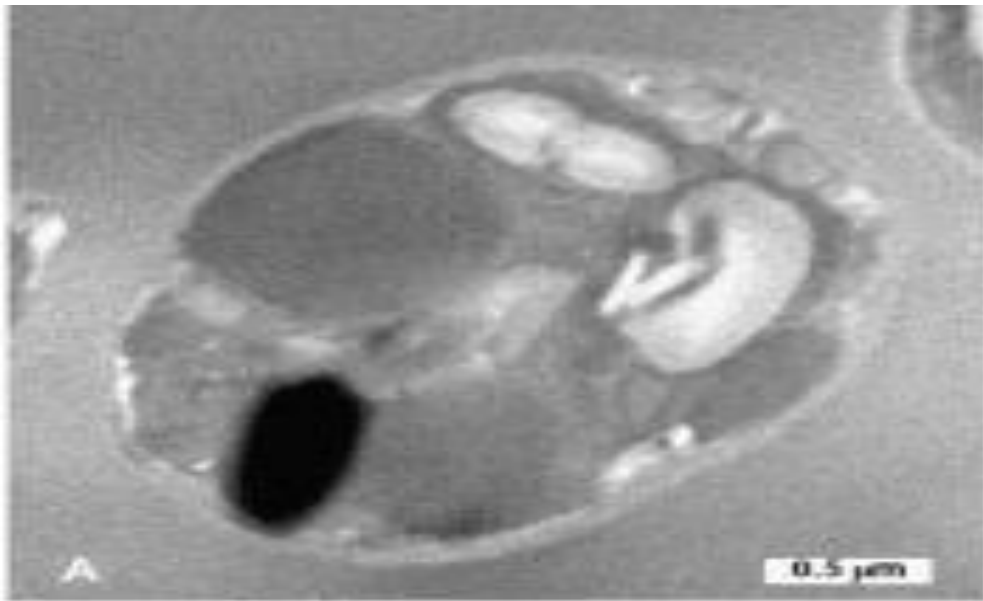


Σχήμα 1 Δύο φάσεις αναγέννησης των φυκών. Αυτός ο τύπος απαιτεί ένα αρσενικό και ένα θηλυκό για να σχηματίσει το ζύγω.

Τα μικροφύκη αναπαράγονται αγενώς με κυτταρική μίτωση, όπου μετά από αύξηση του κυττάρου γεννώνται δύο πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά μπορούν επίσης να προκύψουν από θρυμματοποίηση και παραγωγή σπορίων, όπως είναι τα ζωοσπόρια, τα οποία φέρουν μαστίγια και τα απλανοσπόρια ή υπνοσπόρια, αν δε φέρουν μαστίγια. Με τον ίδιο τρόπο, παράγονται και αυτοσπόρια, τα οποία φέρουν μαστίγια, αλλά δεν έχουν την ικανότητα κίνησης. Σε δεύτερη φάση, στο στάδιο της ανάπαυσης, μεταξύ δυο

διαδοχικών μιτώσεων, τα συστατικά κάθε κυττάρου διπλασιάζονται, έτσι ώστε κάθε θυγατρικό να πάρει όλη τη γενετική πληροφορία του αρχικού κυττάρου. Στη φάση της μίτωσης, προκύπτει η διαίρεση του πυρήνα. (Edited by Amos, 2004)

Ένας άλλος τρόπος αναπαραγωγής των μικροφυκών, είναι η εγγενής αναπαραγωγή, η οποία γίνεται με σύντηξη διαφορετικών γαμετών μορφολογικά σε ζυγωτή. Αυτός ο τρόπος αναπαραγωγής, εξαρτάται από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των γαμετών και επιδέχεται διαφοροποιήσεις ανά τον κύκλο ζωής. (Edited by Amos, 2004; Γκέλης, 2015)



Σχήμα 2: Κύτταρο *Chlorella Vulgaris* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Στα προκαρυωτικά κύτταρα, ανήκουν τα κυανοβακτήρια, τα οποία δε διαθέτουν οργανωμένο πυρήνα και η εξωτερική τους μεμβράνη μοιάζει με αυτήν των κατά Gram αρνητικών βακτηρίων. (Edited by Amos, 2004) Διαθέτουν θυλακοειδή, δηλαδή μεμβρανώδεις σάκους στους οποίους πραγματοποιείται η φωτοσυνθετική δραστηριότητα, ενώ στερούνται ορισμένων οργανιδίων όπως χλωροπλαστών και μιτοχονδρίων. Οι κύριες φωτοσυνθετικές χρωστικές των κυανοβακτηρίων, χλωροφύλλη α και φυκοκυανίνη, αποδίδουν σ' αυτά το χαρακτηριστικό τους όνομα, ως κυανο-πράσινα φύκη. Η αναπαραγωγή τους γίνεται με απλή διχοτόμηση ή πολλαπλή διχοτόμηση και τα κύτταρα μένουν ενωμένα μέσα σε μεμβράνη πλάσματος. (Edited by Amos, 2004; Γκέλης, 2015)



Σχήμα 3: Απεικόνιση διαιρεμένου κυττάρου *Synechococcus sp.* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Συντομογραφίες: cw: κυτταρικό τοίχωμα, t: θυλακοειδή, cs: καρβοξυσώματα. Κλίμακα= 0.5μm

2.1.3 Συνθήκες ανάπτυξης μικροφυκών

Οι σημαντικότερες παράμετροι που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των φυκών είναι η ποσότητα και η ποιότητα των θρεπτικών ουσιών, το φως, το pH, η αναταραχή, η αλατότητα και η θερμοκρασία. Επίσης, οι διάφοροι παράγοντες μπορεί να είναι αλληλεξαρτώμενοι και μια παράμετρος που είναι βέλτιστη για ένα σύνολο συνθηκών δεν είναι απαραίτητα βέλτιστη για άλλη.

Πίνακας 2 Γενικευμένο σύνολο συνθηκών καλλιέργειας μικροφυκών

Παράμετροι	Εύρος	Optima
Θερμοκρασία (° C)	16-27	18-24
Αλατότητα (gl ⁻¹)	12-40	20-24
Ένταση φωτός (lux)	1,000-10,000 (εξαρτάται από τον όγκο και την πυκνότητα)	2.500-5.000
Φωτοπερίοδος (φως: σκοτάδι, ώρες)		16: 8 (ελάχιστο) 24: 0 (μέγιστο)
pH	7-9	8.2-8.7

1. Φως

Όπως συμβαίνει με όλα τα φυτά, οι φωτοσυνθέτες μικροάλγης, δηλαδή αφομοιώνουν τον ανόργανο άνθρακα για μετατροπή σε οργανική ύλη. Το φως είναι η πηγή ενέργειας που οδηγεί αυτή την αντίδραση και από την άποψη αυτή πρέπει να ληφθεί υπόψη η ένταση, η φασματική ποιότητα και η φωτοπερίοδος. Η ένταση του φωτός παίζει σημαντικό ρόλο, αλλά οι απαιτήσεις ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με το βάθος της καλλιέργειας και την πυκνότητα της καλλιέργειας των φυκών: σε υψηλότερα βάθη και συγκεντρώσεις κυττάρων η ένταση του φωτός πρέπει να αυξηθεί για να διεισδύσει μέσω της καλλιέργειας (π.χ. 1,000 lux είναι κατάλληλη για φιάλες erlenmeyer, 5.000-10.000 απαιτείται για μεγαλύτερους όγκους). Το φως μπορεί να είναι φυσικό ή να τροφοδοτείται από σωλήνες φθορισμού. Πολύ υψηλή ένταση φωτός (π.χ. άμεσο ηλιακό φως, μικρό δοχείο κοντά στο τεχνητό φως) μπορεί να προκαλέσει φωτοαναστολή. Επίσης, θα πρέπει να αποφεύγεται η υπερθέρμανση λόγω φυσικού και τεχνητού φωτισμού. Φθορίζοντες σωλήνες που εκπέμπουν είτε στο μπλε είτε στο κόκκινο φως φάσμα θα πρέπει να προτιμάται δεδομένου ότι αυτές είναι τα πιο ενεργά τμήματα του φωτός φάσματος για φωτοσύνθεση. Η διάρκεια του τεχνητού φωτισμού πρέπει να είναι τουλάχιστον 18 ώρες φωτός την ημέρα, αν και το καλλιεργούμενο φυτοπλαγκτόν αναπτύσσεται κανονικά υπό συνεχή φωτισμό.

2. pH

Η περιοχή pH για τα περισσότερα είδη καλλιεργούμενων φυκών είναι μεταξύ 7 και 9, με το βέλτιστο εύρος να είναι 8,2-8,7. Η πλήρης κατάρρευση της καλλιέργειας λόγω της διάσπασης πολλών κυτταρικών διεργασιών μπορεί να προκύψει από την αποτυχία να διατηρηθεί ένα αποδεκτό pH. Το τελευταίο επιτυγχάνεται με αερισμό της καλλιέργειας. Στην περίπτωση της καλλιέργειας φυκών υψηλής πυκνότητας, η προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα επιτρέπει να διορθωθεί το αυξημένο pH, το οποίο μπορεί να φθάσει σε οριακές τιμές έως και pH 9 κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των αλγών. Η τιμή του pH επηρεάζει το ρυθμό δέσμευσης των αμμωνιακών ιόντων από τα μικροφύκη, όπως για παράδειγμα η βέλτιστη τιμή για το είδος *Chlorella vulgaris* που είναι 7-8 (Jia and Yuan, 2016). Είναι απαραίτητο να προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα, όπως EDTA, ώστε να ρυθμίζεται η τιμή του pH, διότι μία διαταραχή από τη βέλτιστη τιμή μπορεί να είναι καταστροφική για την καλλιέργεια.

3. Αερισμός/ ανάμιξη

Η ανάμιξη είναι απαραίτητη για να αποφευχθεί η καθίζηση των φυκών, για να διασφαλιστεί ότι όλα τα κύτταρα του πληθυσμού είναι εξίσου εκτεθειμένα στο φως και τα θρεπτικά συστατικά, για να αποφευχθεί η θερμική διαστρωμάτωση (π.χ. σε υπαίθριες καλλιέργειες) και να βελτιωθεί η ανταλλαγή αερίων μεταξύ του μέσου καλλιέργειας και του αέρα. Η τελευταία είναι πρωταρχικής σημασίας καθώς ο αέρας περιέχει την πηγή άνθρακα για τη φωτοσύνθεση με τη μορφή διοξειδίου του άνθρακα. Για πολύ πυκνές καλλιέργειες, το CO₂ που προέρχεται από τον αέρα (που περιέχει 0,03% CO₂) και διαβιβάστηκε μέσω της καλλιέργειας περιορίζει την ανάπτυξη των φυκών και καθαρό διοξείδιο του άνθρακα μπορεί να συμπληρωθεί με την παροχή αέρα

(π.χ. σε ποσοστό 1% του όγκου αέρα). CO₂ επιπλέον απομονώνει επιπλέον το νερό έναντι μεταβολών του pH ως αποτέλεσμα της CO₂ / HCO₃⁻ ισορροπίας. Ανάλογα με την κλίμακα του συστήματος καλλιέργειας, η ανάμιξη επιτυγχάνεται με ανάδευση καθημερινά με το χέρι (δοκιμαστικοί σωλήνες, μεμβράνες), αερισμό (σάκοι, δεξαμενές) ή με χρήση τροχών με κουπιά και αντλιών ψεκασμού. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι δεν μπορούν όλα τα είδη των φυκών να ανεχθούν έντονη ανάμιξη.

4. Θερμότητα

Η βέλτιστη θερμοκρασία για τις καλλιέργειες φυτοπλαγκτόν είναι γενικά μεταξύ 20 και 24 ° C, αν και αυτό μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τη σύνθεση του μέσου καλλιέργειας, το είδος και το στέλεχος καλλιεργούνται. Τα πιο συχνά καλλιεργημένα είδη μικροφυκών αντέχουν θερμοκρασίες μεταξύ 16 και 27 ° C. Θερμοκρασίες μικρότερες από 16 ° C θα επιβραδύνουν την ανάπτυξη, ενώ εκείνες που υπερβαίνουν τους 35 ° C είναι θανατηφόρες για ορισμένα είδη. Ακραίες θερμοκρασίες περιορίζουν τις κυτταρικές διεργασίες, την πρόσληψη του αζώτου, τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης και επομένως αναστέλλουν την ανάπτυξη της καλλιέργειας. Εάν είναι απαραίτητο, οι καλλιέργειες φυκών μπορούν να ψυχθούν με ροή κρύου νερού στην επιφάνεια του δοχείου καλλιέργειας ή με έλεγχο της θερμοκρασίας του αέρα με ψυκτικές μονάδες κλιματισμού. Σύμφωνα με έρευνα που συγκρίνει την απομάκρυνση των αμμωνιακών ιόντων σε θερμοκρασίες 5°C, 15°C, 25°C, αποδείχθηκε πως η θερμοκρασία 25°C είναι η καταλληλότερη (Delgadillo-Mirquez *et al.*, 2016).

5. Αλμυρότητα

Το θαλάσσιο φυτοπλαγκτόν είναι εξαιρετικά ανεκτικό στις μεταβολές της αλατότητας. Τα περισσότερα είδη αναπτύσσονται καλύτερα σε μια αλατότητα που είναι ελαφρώς χαμηλότερη από αυτή του φυσικού ενδιαίτηματός τους, η οποία λαμβάνεται με αραιώση του θαλασσινού νερού με νερό της βρύσης. Οι αλατότητες 20-24 g l⁻¹ έχουν βρεθεί ότι είναι οι βέλτιστες.

6. Θρεπτικά συστατικά

Οι συγκεντρώσεις των κυττάρων σε καλλιέργειες φυτοπλαγκτόν είναι γενικά υψηλότερες από εκείνες που απαντώνται στη φύση. Οι καλλιέργειες των φυκών πρέπει επομένως να εμπλουτιστούν με θρεπτικά συστατικά για να καλύψουν τις ανεπάρκειες στο θαλασσινό νερό. Εκτός από τρία βασικά στοιχεία, δηλαδή άνθρακα, άζωτο, φώσφορο, πρέπει επίσης να παρέχονται ιονικά συστατικά όπως π.χ. το σίδηρο και τα ιχνοστοιχεία για την ανάπτυξη των φυκών. Τα κυριότερα μικροθρεπτικά είναι : Cl, S, Na, Ca και ιχνοστοιχεία: Mn, Zn, Cu, Co, V, Br, I. Τα μακροθρεπτικά περιλαμβάνουν νιτρικό, φωσφορικό (σε αναλογία περίπου 6:1) και πυριτικό. Κάθε είδος μικροφύκους έχει διαφορετικές απαιτήσεις ανόργανων στοιχείων και σε οποιαδήποτε καλλιεργητική τεχνική θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι ανάγκες του και να διαμορφώνεται το ανάλογο θρεπτικό μέσο. Η έμφαση δίνεται συνήθως στο άζωτο και τον φώσφορο.

I. Άνθρακας

Ο άνθρακας, με τη μορφή διοξειδίου του άνθρακα, μπορεί να στερεωθεί από την ατμόσφαιρα και βιομηχανικά καυσαέρια μέσω της φωτοσυνθετικής δράσης των αυτότροφων μικροφυκών. Ορισμένα μικροάλγη παρουσιάζουν ετεροτροφική συμπεριφορά, χρησιμοποιώντας οργανικές μορφές άνθρακα, ενώ άλλες μπορεί να έχουν τόσο αυτοτροφικά όσο και ετεροτροφικά χαρακτηριστικά ταυτόχρονα. Σε αντίθεση με τα φυτά, στα μικροφύκη δεν αρκεί το CO₂ που βρίσκεται στην ατμόσφαιρα και είναι απαραίτητη η διοχέτευση άνθρακα στην καλλιέργεια. Η στέρηση CO₂ επιφέρει επαύξηση του pH και η καλλιέργεια εκτίθεται σε κίνδυνο. Επομένως, η παροχή άνθρακα κρίνεται απαραίτητη, όπως απευθείας παροχή ατμοσφαιρικού CO₂ μέσω σωλήνα, οξικού οξέως και ανθρακική ή διττανθρακική σόδα (Edited by Amos, 2004). Ο άνθρακας μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί υπό μορφή διαλυτών ανθρακικών αλάτων για κυτταρική ανάπτυξη, είτε με άμεση πρόσληψη είτε μετατροπή ανθρακικού προς ελεύθερο διοξείδιο του άνθρακα μέσω δραστηκότητας καρβοανυδράσης.

II. Άζωτο

Το άζωτο είναι μια κρίσιμη θρεπτική ουσία που απαιτείται για την ανάπτυξη όλων των οργανισμών. Το οργανικό άζωτο βρίσκεται σε μια ποικιλία βιολογικών ουσιών, όπως πεπτίδια, πρωτεΐνες, ένζυμα, χλωροφύλλη, μόρια μεταφοράς ενέργειας (ADP, ATP) και γενετικά υλικά (RNA, DNA) (L Barsanti, P Gualtieri, 2006). Το οργανικό άζωτο που προέρχονται από ανόργανες πηγές που περιλαμβάνουν νιτρικό (NO₃⁻), νιτρώδες (NO₂⁻), νιτρικό οξύ (HNO₃), αμμωνίου (NH₄⁺), αμμωνία (NH₃), και αέριο άζωτο (N₂). Τα μικροφύκη παίζουν βασικό ρόλο στη μετατροπή του ανόργανου αζώτου στην οργανική του μορφή μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται αφομοίωση. Επιπλέον, τα κυανοβακτήρια είναι ικανά να μετατρέπουν το ατμοσφαιρικό άζωτο σε αμμωνία μέσω στερεώσεως.

Η αφομοίωση, η οποία εκτελείται από όλα τα ευκαρυωτικά φύκια, απαιτεί ανόργανο άζωτο μόνο στις μορφές νιτρικών, νιτρώδων και αμμωνίου. Η μετατόπιση του ανόργανου αζώτου συμβαίνει διαμέσου της μεμβράνης πλάσματος, ακολουθούμενη από τη μείωση του οξειδωμένου αζώτου και την ενσωμάτωση του αμμωνίου σε αμινοξέα. Τα νιτρικά και τα νιτρώδη υφίστανται μείωση με τη βοήθεια αναγωγάσης νιτρικών και αναγωγάσης νιτρώδων, αντίστοιχα. Η νιτρική ρεδοκτάση χρησιμοποιεί τη μειωμένη μορφή δινουκλεοτιδίου αδενίνης νικοτιναμιδίου (NADH) για να μεταφέρει δύο ηλεκτρόνια, με αποτέλεσμα τη μετατροπή των νιτρικών σε νιτρώδη. Οι νιτρώδεις ενώσεις μειώνονται σε αμμώνιο με αναγωγή νιτρώδων και φερρεδοξίνη (Fd), μεταφέροντας συνολικά έξι ηλεκτρόνια στην αντίδραση. Έτσι, όλες οι μορφές ανόργανου αζώτου τελικά μειώνονται σε αμμώνιο πριν ενσωματωθούν σε αμινοξέα μέσα στο ενδοκυτταρικό υγρό.

Το αμμώνιο θεωρείται ότι αποτελεί την προτιμώμενη μορφή αζώτου επειδή μια οξειδοαναγωγική αντίδραση δεν εμπλέκεται στην αφομοίωση του. Έτσι, απαιτεί λιγότερη ενέργεια. Μελέτες έχουν δείξει ότι, γενικά, τα φύκια τείνουν να προτιμούν το αμμώνιο πάνω από τα νιτρικά άλατα και η κατανάλωση νιτρικών αλάτων δεν εμφανίζεται μέχρι να καταναλωθεί σχεδόν πλήρως το αμμώνιο (SY Maestrini et.al., 1986). Συνεπώς, τα λύματα με υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά για την ταχεία ανάπτυξη μικροφυκών.

III. Φώσφορος

Ο φωσφόρος είναι επίσης ένας βασικός παράγοντας στον ενεργειακό μεταβολισμό των φυκών και βρίσκεται στα νουκλεϊκά οξέα, τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τα ενδιάμεσα του μεταβολισμού των υδατανθράκων. Τα ανόργανα φωσφορικά παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των κυττάρων των αλγών και στον μεταβολισμό τους. Κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού στα φύκια, ο φωσφόρος, κατά προτίμηση με τις μορφές του $H_2PO_4^-$ και HPO_4^{2-} , ενσωματώνεται σε οργανικές ενώσεις μέσω φωσφορυλίωσης, μεγάλο μέρος της οποίας συνεπάγεται την παραγωγή ATP από διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), που συνοδεύεται από μια μορφή εισόδου ενέργειας (ME Martinez, JM, Bioresource Technology).

Η εισαγωγή ενέργειας μπορεί να προέλθει από την οξείδωση των αναπνευστικών υποστρωμάτων, από το σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων ή, στην περίπτωση της φωτοσύνθεσης, από το φως. Τα φωσφορικά μεταφέρονται με ενεργοποιημένη μεταφορά μέσω της μεμβράνης πλάσματος του κυττάρου των φυκών. Δεν υπάρχουν μόνο ανόργανες μορφές φωσφόρου που χρησιμοποιούνται από μικροφύκη, αλλά ορισμένες ποικιλίες των φυκών είναι σε θέση να χρησιμοποιήσουν τον φωσφόρο που βρίσκεται σε οργανικούς εστέρες για ανάπτυξη (EJ Kuenzler, 1965).

Αν και το ορθοφωσφορικό είναι γενικά αναγνωρισμένο ως το περιοριστικό θρεπτικό συστατικό στα συστήματα γλυκού νερού, πολλές περιπτώσεις ευτροφισμού προκαλούνται από περιττό φωσφόρο, που μπορεί να προκύψει από την απορροή των λυμάτων (DL Correll, 1998). Παρόμοια με την αφαίρεση του αζώτου, η απομάκρυνση του φωσφόρου στα λύματα δεν ρυθμίζεται μόνο από την πρόσληψη στο κύτταρο, αλλά και από εξωτερικές συνθήκες όπως το pH και το διαλυμένο οξυγόνο. Ο φωσφόρος δεν μπορεί να υπάρχει σε αέρια κατάσταση, έτσι το φωσφορικό θα καθιζάνει από το μέσο ως αποτέλεσμα του αυξημένου pH και της υψηλής συγκέντρωσης διαλυμένου οξυγόνου.

IV. Σίδηρος

Από τα απαραίτητα ιχνοστοιχεία για την ανάπτυξη των μικροφυκών είναι ο σίδηρος και παίζει σημαντικό ρόλο στα βιομόρια των κυττάρων. Λειτουργεί ως μεταφορέας ηλεκτρονίων και συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις όπως τη φωτοσύνθεση, την αναπνοή, την αναγωγή των νιτρικών και τη σύνθεση του DNA (Edited by Amos, 2004; Επιμέλεια Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2009).

V. Μαγνήσιο

Εκτός του ότι είναι συστατικό των χλωροφυλλών, ενώνεται με το ATP καθιστώντας το ενεργό σε διάφορες ενζυμικές αντιδράσεις καθώς επίσης ενεργοποιεί διάφορα ένζυμα απαραίτητα για τη φωτοσύνθεση, την αναπνοή και τη βιοσύνθεση του DNA (Επιμέλεια Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2009).

VI. Μολυβδαίνιο

Το μολυβδαίνιο απαιτείται σε πολύ μικρότερη ποσότητα και παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη (Επιμέλεια Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2009; Γκέλης, 2015).

2.1.4 Δυναμική ανάπτυξης μικροφυκών

Η ανάπτυξη μιας αξονικής καλλιέργειας μικροφυκών χαρακτηρίζεται από πέντε φάσεις:

- Υστέρηση ή φάση επαγωγής

Αυτή η φάση, κατά τη διάρκεια της οποίας λαμβάνει χώρα μικρή αύξηση στην κυτταρική πυκνότητα, είναι σχετικά μεγάλη όταν μια καλλιέργεια φυκών μεταφέρεται από μια πλάκα σε υγρή καλλιέργεια. Οι καλλιέργειες που εμβολιάζονται με εκθετικά αναπτυσσόμενα φύκια έχουν σύντομες φάσεις υστέρησης, οι οποίες μπορούν να μειώσουν σημαντικά τον απαιτούμενο χρόνο για την αναβάθμιση. Η υστέρηση στην ανάπτυξη αποδίδεται στην φυσιολογική προσαρμογή του κυτταρικού μεταβολισμού στην ανάπτυξη, όπως η αύξηση των επιπέδων των ενζύμων και των μεταβολιτών που εμπλέκονται στην κυτταρική διαίρεση και στη σταθεροποίηση του άνθρακα.

Εκθετική φάση

Κατά τη διάρκεια της δεύτερης φάσης, η κυτταρική πυκνότητα αυξάνεται ως συνάρτηση του χρόνου t σύμφωνα με μια λογαριθμική λειτουργία:

$$C_t = C_0 \cdot E^{mt}$$

με C_t και C_0 να είναι οι συγκεντρώσεις κυττάρων στο χρόνο t και 0 , αντίστοιχα, και m = ειδική ταχύτητα ανάπτυξης. Ο συγκεκριμένος ρυθμός ανάπτυξης εξαρτάται κυρίως από τα είδη των φυκών, την ένταση του φωτός και τη θερμοκρασία.

- Φάση μείωσης του ρυθμού ανάπτυξης

Η κυτταρική διαίρεση επιβραδύνεται όταν θρεπτικά συστατικά, φως, pH, διοξείδιο του άνθρακα ή άλλοι φυσικοί και χημικοί παράγοντες αρχίζουν να περιορίζουν την ανάπτυξη.

- Στατική φάση

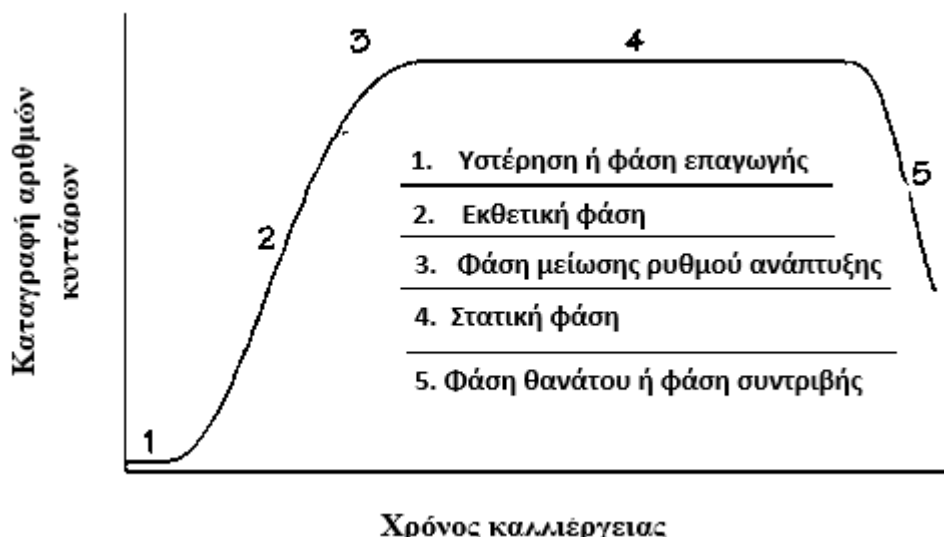
Στο τέταρτο στάδιο ο περιοριστικός παράγοντας και ο ρυθμός ανάπτυξης είναι ισορροπημένοι, πράγμα που έχει ως αποτέλεσμα μια σχετικά σταθερή κυτταρική πυκνότητα.

- Φάση θανάτου ή φάση "συντριβής"

Κατά τη διάρκεια του τελικού σταδίου, η ποιότητα του νερού επιδεινώνεται και τα θρεπτικά συστατικά εξαντλούνται σε ένα επίπεδο ανίκανο να διατηρήσει την ανάπτυξη. Η πυκνότητα κυττάρων μειώνεται ταχέως και η καλλιέργεια τελικά καταρρέει.

Στην πράξη, οι συγκρούσεις καλλιέργειας μπορούν να προκληθούν από διάφορους λόγους, συμπεριλαμβανομένης της εξάντλησης ενός θρεπτικού συστατικού, έλλειψης οξυγόνου, υπερθέρμανσης, διαταραχής του pH ή μόλυνσης. Το κλειδί για την επιτυ-

χία της παραγωγής φυκιών είναι η διατήρηση όλων των καλλιεργειών στην εκθετική φάση της ανάπτυξης. Πάντως, η θρεπτική αξία των παραγόμενων φυκών είναι κατώτερη όταν η καλλιέργεια είναι πέρα από τη φάση 3 λόγω της μειωμένης πεπτικότητας, της ανεπαρκούς σύνθεσης και της πιθανής παραγωγής τοξικών μεταβολιτών.



Σχήμα 4: Φάσεις ανάπτυξης της καλλιέργειας των μικροφυκών

2.1.5 Απομάκρυνση θρεπτικών ουσιών από τα λύματα προς ανάπτυξη των φυκών

Τα μικροφύκη μπορούν να χρησιμοποιούν θρεπτικά συστατικά από τα περισσότερα λύματα. Τα θρεπτικά συστατικά επηρεάζουν σημαντικά την ανάπτυξη των μικροφυκών και την περιεκτικότητα σε λιπίδια και την παραγωγή τους. Ορισμένα είδη *Chlorella* είναι ετερότροφα ή αναμειγνύονται και μπορούν να καταναλώνουν οργανικές μορφές άνθρακα επιπλέον των ανόργανων θρεπτικών ουσιών ως μέρος της μεταβολικής τους διαδικασίας. Αυτό μπορεί να είναι ένα πλεονέκτημα όταν χρησιμοποιούνται ρεύματα λυμάτων που περιέχουν υπολείμματα άνθρακα, όπως χωνεμένο γαλακτοκομικό λίπασμα (L Wang et.al., 2010). Το οξικό άλας, το οποίο απαντάται σε ορισμένα απόβλητα, αποδείχθηκε ότι καταναλώνεται αποτελεσματικά κατά τη διάρκεια ετεροτροφικής ή μιξοτροφικής καλλιέργειας μικροφυκών (A Bhatnagar et.al., 2010). Η ετεροτροφική ανάπτυξη δεν αποτελεί πλεονεκτική στρατηγική στα απόβλητα υγρά με ανεπάρκεια οργανικού άνθρακα. Υπό ετεροτροφικές συνθήκες, η προσθήκη άνθρακα με τη μορφή οξικού νατρίου ή γλυκόζης ήταν απαραίτητη για την επίτευξη απομάκρυνσης αμμωνίου σε επίπεδο ισοδύναμο με αυτό υπό αυτοτροφικές συνθήκες για την ανάπτυξη του *C. vulgaris* (O Perez-Garcia et.al., 2011)

Η πιο αποδοτική καλλιεργητική τεχνική είναι η μιξοτροφική, όπου τα φύκη εναλλάσσουν τον μεταβολισμό τους ανάλογα με τη διαθεσιμότητα της ηλιακής ενέργειας, του CO₂ και των οργανικών ενώσεων στο περιβάλλον. Οι μη αξενικές καλλιέργειες, που είναι ένα μείγμα διαφορετικών ειδών φυκών, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την απομάκρυνση των θρεπτικών ουσιών από τα λύματα. Σε αυτόν τον τύπο με-

ταβολισμού παρατηρείται μεγαλύτερη ανάπτυξη βιομάζας συγκριτικά με τις υπόλοιπες τεχνικές και οικονομικότερη σε μεγάλη κλίμακα καλλιέργειας ανοιχτού τύπου (Zhan *et al.*, 2017). Επιπλέον, παρατηρήθηκε σε μιξοτροφική καλλιέργεια του είδους *Chodatella sp.* απομάκρυνση αμμωνιακών 99.7% και 75.9% ολικού φωσφόρου, ενώ για το είδος *Chlorella vulgaris* οι τιμές απομάκρυνσης ήταν 72% και 28% αντίστοιχα (Li *et al.*, 2014). Ένας συνδυασμός *C. vulgaris*, *Scenedesmus falcatus*, *Chlamydomonas mirabilis* και *Microcystis aeruginosa* έδειξε μείωση κατά 58% της αμμωνίας και 34% μείωση των φωσφορικών αλάτων κατά τη διάρκεια της φάσης επεξεργασίας των αλγών στη διαδικασία επεξεργασίας αστικών λυμάτων (BD Tripathi, SC Shukla, 1991).

2.2 Συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών

Τα αναπτυσσόμενα άλγη σε απόβλητα που περιέχουν πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία λύματα, θα μπορούσαν να συμβάλουν στην αντιμετώπιση της απαίτησης για φθηνά μέσα καλλιέργειας και, όταν συνδυάζονται με ένα οικονομικό σύστημα καλλιέργειας φυκών, μπορούν να προσφέρουν μια οικονομικά αποδοτική παροχή βιομάζας φυκών στην μεταγενέστερη επεξεργασία. Τα περισσότερα από τα τρέχοντα συστήματα καλλιέργειας των φυκών μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες ανάλογα με τον σχεδιασμό του αντιδραστήρα τους: ανοικτά συστήματα, κλειστά συστήματα και υβριδικά συστήματα, τα οποία όλα χρησιμοποιούνται στην ξηρά. Η κύρια διαφορά μεταξύ αυτών των συστημάτων είναι εάν τα άλγη εκτίθενται στο περιβάλλον. Η πρώτη τεχνική μπορεί να πραγματοποιηθεί σε δεξαμενές άμεσα εκτεθειμένες στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Τέτοιες δεξαμενές μπορεί να είναι είτε φυσικές είτε τεχνητές, όπως, νερόλακκοι, λίμνες ή απευθείας στη θάλασσα (Γκέλης, 2015). Οι συνθήκες στα συστήματα κλειστού τύπου είναι ελεγχόμενες και μπορούν να εφαρμοστούν σε απλές κωνικές φιάλες έως και εξειδικευμένες συσκευές τους φωτοβιοαντιδραστήρες (Edited by Amos, 2004). Ωστόσο, αυτές οι τεχνικές μοιράζονται επίσης ένα κοινό χαρακτηριστικό, δηλαδή, ότι όλες χρησιμοποιούν ανεσταλμένες καλλιέργειες σε ένα υδατικό περιβάλλον.

2.2.1 Συστήματα καλλιέργειας ανοιχτού τύπου

Η λιμνοδεξαμενή, ένα τυπικό ανοιχτό σύστημα καλλιέργειας φυκών, έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς από τη δεκαετία του 1950. Μια δεξαμενή διαδρομής είναι συνήθως μόνο περίπου 0,3 μέτρα βάθος για να παρέχει επαρκή ηλιακή ακτινοβολία και να επιτρέψει τη φωτοσύνθεση από τα μικροαλγητικά κύτταρα. Το υλικό από το οποίο είναι φτιαγμένη είναι συνθετικό πλαστικό, πηλός και άσφαλτος (Wang *et al.*, 2018). Σε παραγωγή βιομάζας μικροφυκών, οι καλλιέργειες ανοιχτού τύπου υστερούν συγκριτικά με τις κλειστού τύπου καλλιέργειες, αλλά εξυπηρετούν την απομάκρυνση αζώτου και φωσφόρου από ζωικά, βιομηχανικά και αστικά απόβλητα σε μεγάλη κλίμακα (de Godos *et al.*, 2016). Αυτό επιτυγχάνεται με περιστροφικά πτερύγια τα οποία αναταράσσουν και αναμιγνύουν την καλλιέργεια (Park *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2018) γύρω από την τροχιά διαδρομής με τροχαλίες τροχαλίας (Y Chisti, 2007). Τα περισσότερα συστήματα καλλιέργειας φυκών σε εμπορική κλίμακα είναι ανοικτές λίμνες επειδή είναι σχετικά φθηνές για οικοδόμηση και εύκολο να κλιμακωθούν. Ορισμένες δεξαμενές άλγης είναι χτισμένες σε μη αροτραίες εκτάσεις που γειτονικές με σταθμούς ηλεκτροπαραγωγής για να έχουν πρόσβαση στο διοξείδιο του άνθρακα από καυσαέρια. Ορισμένες είναι χτισμένες κοντά σε σταθμούς επεξεργασίας λυμάτων για εύκολη πρόσβαση σε θρεπτικές προμήθειες.

Παρά το οικονομικό πλεονέκτημα των ανοιχτών λιμνών, υπάρχουν μειονεκτήματα σε πολλές πτυχές. Πρώτον, καθώς το σύστημα εκτίθεται στην ατμόσφαιρα, η απώλεια νερού με εξάτμιση αυξάνεται σημαντικά καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία. Η μόλυνση είναι ένα άλλο αναπόφευκτο ζήτημα με αυτό το σύστημα. Ξεκινώντας με μεγάλες ποσότητες εμβολίου και συχνή σίτιση ή συγκομιδή θα μπορούσε να συμβάλει στη διατήρηση της κυριαρχίας των επιλεγμένων στελεχών φυκιών. Όσον αφορά τα οικονομικά, ένα ανοικτό σύστημα λιμνών μπορεί να είναι η πρώτη επιλογή για την ανάκτηση θρεπτικών ουσιών από τα λύματα. Ωστόσο, εάν τα λύματα χρησιμοποιούνται ως πηγή θρεπτικών συστατικών για μεγάλες δεξαμενές φυκιών, η αποστείρωση μπορεί να είναι απαραίτητη προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι αρνητικές επιπτώσεις των παθογόνων και των βακτηρίων στην ανάπτυξη των φυκών. Ωστόσο, αυτή η διαδικασία αυξάνει επίσης το κόστος κεφαλαίου του συστήματος καλλιέργειας των φυκών.



Σχήμα 5: Ανοικτό σύστημα καλλιέργειας μικροφυκών



Σχήμα 6 : Μαζική καλλιέργεια μικροφυκών σε ανοιχτούς υδατοδιαδρόμους στη Χαβάη



Σχήμα 7: Περιστροφικά πτερύγια. Εγκαταστάσεις Νιγρίτας Σερρών



Σχήμα 8: Παραγωγή μικροφυκών Chlorella, Spirulina. Vedan Biotech, Κεντρικό Ταϊβάν

2.2.2 Συστήματα καλλιέργειας κλειστού τύπου

Σε σύγκριση με τις ανοικτές λίμνες, ο σχεδιασμός κλειστών αντιδραστήρων αποτρέπει την εξάτμιση και τη μόλυνση του νερού και αυξάνει την αποτελεσματικότητα της φωτοσύνθεσης. Για ερευνητικούς σκοπούς, ο τύπος καλλιέργειας φυκών κλειστού τύπου που χρησιμοποιείται είναι η στατική καλλιέργεια ή καλλιέργεια δέσμης (batch culture). Μέσα σε περιέκτες σταθερού όγκου θρεπτικού μέσου πραγματοποιείται αρ-

χικά ενοφθαλμισμός συγκεκριμένου είδους φύκους και στη συνέχεια μελετάται ο ρυθμός ανάπτυξής του. Με αυτό το εγχείρημα επιτυγχάνεται απομόνωση στελεχών φυκών και συντήρηση της καλλιέργειας μέσα στο θρεπτικό μέσο. Επιπλέον, στις στατικές καλλιέργειες απαραίτητη είναι η παροχή αέρα ή η μηχανική ανάδευση των δοχείων που περιέχουν τα κύτταρα των φυκών. Η ποσότητα του εμβολίου με τα κύτταρα των φυκών παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη της καλλιέργειας. Απαραίτητη είναι και η αποστείρωση των οργάνων και του θρεπτικού μέσου ώστε να μην υπάρξει επιμόλυνση της καλλιέργειας. Η ανάπτυξη στατικής καλλιέργειας μπορεί να επιτευχθεί σε γυάλινες φιάλες, δοκιμαστικούς σωλήνες, τριβλία Petri και διαφανείς σάκους πολυαιθυλενίου.

Τυπικοί κλειστοί αντιδραστήρες περιλαμβάνουν αντιδραστήρες επίπεδης πλάκας, σωληνοειδείς φωτοβιοαντιδραστήρες και συστήματα σάκων (MA Borowitzka, 1999). Οι επίπεδες πλάκες και οι σωληνοειδείς αντιδραστήρες είναι καλά σχεδιασμένοι για να εξασφαλίζουν τη βέλτιστη διαθεσιμότητα φωτός και την ανταλλαγή αερίων. Η δέσμευση του ηλιακού φωτός μπορεί επίσης να μεγιστοποιηθεί με την αλλαγή της διάταξης των σωληναρίων του αντιδραστήρα ανάλογα με τον προσανατολισμό του ήλιου. Σε δεδομένα εργαστηρίου μπορούν να σχεδιαστούν αρκετοί τύποι φωτοβιοαντιδραστήρων, λίγοι όμως είναι αυτοί όπου μπορούν να εφαρμοστούν σε μεγαλύτερη κλίμακα σε εξωτερικό χώρο. Μία στρατηγική σε μεγαλύτερη κλίμακα απαιτεί τον βέλτιστο φωτισμό και βέλτιστη θερμοκρασία, παροχή CO₂, εμπλουτισμό θρεπτικών στοιχείων, απομάκρυνση παραγόμενου O₂ και μεταφορά ζώντων κυττάρων φυκών από και προς τον βιοαντιδραστήρα (Wang *et al.*, 2018). Φωτοβιοαντιδραστήρες κλειστού τύπου μπορούν να διαταχθούν με διάφορους τρόπους, όπως, οριζόντιων, κεκλιμένων, κάθετων και σπειροειδών (Edited by Amos, 2004).

Αν και η παραγωγή βιομάζας των φυκιών θα μπορούσε να βελτιωθεί σημαντικά, τα έξοδα εγκατάστασης και συντήρησης αυτών των αντιδραστήρων είναι πολύ υψηλότερα από τις ανοικτές λίμνες, κάτι που αποτελεί τον κύριο περιοριστικό παράγοντα για την εμπορευματοποίηση κλειστών συστημάτων. Τα συστήματα σάκων χρησιμοποιούν μεγάλους πλαστικούς σάκους διαμέτρου περίπου 0,5 m εξοπλισμένα με συστήματα αερισμού (MA Borowitzka, 1999). Η διατήρηση αυτού του τύπου συστήματος είναι εργαστηριακής έντασης και η καλλιέργεια των φυκιών συνήθως συντρίβεται λόγω ανεπαρκούς ανάμιξης.

Οι κλειστοί αντιδραστήρες είναι κατάλληλοι για φωτοαυτοτροφικές, μιξοτροφικές ή ετεροτροφικές άλγες. Ορισμένα στελέχη φυκιών πρέπει να καλλιεργούνται χωρίς ρύπους σε κλειστούς αντιδραστήρες για την παραγωγή προϊόντων φυκών υψηλής αξίας για τη βιομηχανία τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων. Ορισμένες εταιρείες εργάζονται επίσης για την κλιμάκωση κλειστών αντιδραστήρων με χαμηλό κόστος. Το Lumian™ AGS4000 είναι ένα σύστημα ανάπτυξης φυκών υψηλής ανάπτυξης 4000 λίτρων που αναπτύχθηκε από την Solix BioSystems. Αυτό το σύστημα περιλαμβάνει μια λεκάνη ανάπτυξης με 20 Lumian panels ενσωματωμένη με ένα σύστημα στήριξης για την προετοιμασία των μέσων, τη συγκομιδή, την επανέκθεση και τον καθαρισμό

του συστήματος. Αυτό το σύστημα είναι σε θέση να παρέχει μια μεγάλη ποσότητα καθαρού εμβολίου για πολλαπλές λίμνες αλγών.

2.2.3 Υβριδικά συστήματα

Τα υβριδικά συστήματα συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα των ανοικτών και των κλειστών συστημάτων σε ένα σύστημα καλλιέργειας δύο σταδίων. Το πρώτο στάδιο χρησιμοποιεί κλειστούς φωτοβιοαντιδραστήρες για την καλλιέργεια του εμβολίου για το δεύτερο στάδιο, όπου καλλιεργούνται άλγη σε ανοικτές λίμνες. Με αυτόν τον τρόπο, οι καλλιέργειες εκτίθενται σε ελάχιστη μόλυνση πριν τροφοδοτηθούν σε μεγάλες λίμνες. Οι επαρκείς ποσότητες σπόρων από τους φωτοβιοαντιδραστήρες βοηθούν επίσης να διατηρηθούν τα προτιμώμενα είδη φυκών κυρίαρχα στις λίμνες. Ωστόσο, οι εφαρμογές μεγάλης κλίμακας περιορίστηκαν από το κόστος της πρώτης φάσης. Η εταιρεία Cellana προσπαθεί να εμπορευματοποιήσει το πατενταρισμένο σύστημα παραγωγής της άλγης, το οποίο ζευγαρώνει φωτοβιοαντιδραστήρες κλειστής καλλιέργειας με ανοικτές λίμνες θαλασσινού νερού σε διεργασία δύο σταδίων στη Χαβάη. Η εγκατάσταση εμπορικής κλίμακας πρέπει να βρίσκεται δίπλα σε σταθμό παραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας για τον μετριασμό των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα.



Σχήμα 9: Σωληνωτοί φωτοβιοαντιδραστήρες στήλης



Σχήμα 10: Επίπεδοι φωτοβιοαντιδραστήρες



Σχήμα 11: Αυλωτός φωτοβιοαντιδραστήρας χωρητικότητας 4000 λίτρων για την παραγωγή υψηλής προστιθέμενης αξίας προϊόντων από μικροφύκη (IGV-Biotech)



Σχήμα 12: Βιοαντιδραστήρες πολυαιθυλενίου μιας χρήσης, 300 L. Plagton S.A., Μύτικας Αιτωλοακαρνανίας



Σχήμα 13: Βιοαντιδραστήρας βιομηχανικής κλίμακας, 2,500 L. Plagton S.A, Μύτικας Αιτ/νιας



Σχήμα 14: Φωτοβιοαντιδραστήρας Εργαστηρίου τύπου Eppendorf



Σχήμα 15: Υβριδική τεχνολογία Ανάπτυξης Φυκών, Algaewheel



Σχήμα 16: Σύστημα μεταχείρισης αποβλήτων Algaewheel, στο Summit Lake State Park

2.2.4 Περιοριστικοί παράγοντες των καλλιεργειών

Άζωτο

Τα λύματα θεωρούνται ανανεώσιμος πόρος. Το άζωτο (N) ως ανανεώσιμος πόρος έχει μεγάλη σημασία για την ανάπτυξη των οργανισμών (Smith and Smith, 2015). Οι κύριες αζωτούχες ενώσεις που εμπλέκονται στον φυσικό κύκλο N περιλαμβάνουν αέριο άζωτο (N_2), ιόν αμμωνίου (NH_4^+), οργανικό άζωτο, νιτρικό (NO_3^-) και νιτρώδες (NO_2^-). Υπάρχει άφθονο N_2 στην ατμόσφαιρα, αλλά δεν μπορεί να απορροφηθεί άμεσα από οργανισμούς λόγω του ελλείμματος αντιδραστικότητας του μοριακού αζώτου. Για το λόγο αυτό, η βιολογική σταθεροποίηση του αζώτου χρησιμοποιείται συνήθως για καλλιέργειες και φυτά για να απορροφήσει το N_2 στις αντιδρώσες μορφές του, μέσω της αζώτωσης (μετατροπή σε αμμώνιο) και του κεραυνού (μετατροπή σε νιτρικό οξείδιο), αντίστοιχα. Στη συνέχεια, το αμμώνιο μετατρέπεται σε νιτρώδες άλατος με μικροοργανισμούς οξειδώσεως αμμωνίου, ακολουθούμενος από μετασχηματισμό σε νιτρικά μέσω οξειδωτικών μικροοργανισμών νιτρώδους (Li et al., 2018). Αυτή η διαδικασία ονομάζεται νιτροποίηση. Αντιθέτως, η απονίτρωση αναφέρεται ως η μείωση του νιτρικού άλατος στο μοριακό άζωτο με απονίτρωση μικροοργανισμών. Η αμμωνία με νιτρώδη ως δέκτης ηλεκτρονίων μπορεί να οξειδωθεί σε αέριο άζωτο μέσω βακτηρίων οξειδώσεως αναερόβιου αμμωνίου (Ye et al., 2018). Το αμμώνιο που προέρχεται από τη βιολογική σταθεροποίηση του αζώτου δεν αρκεί για

να στηρίζει τη ζήτηση αμμωνίας στον κόσμο για καλλιέργειες και φυτά. Ως εκ τούτου, εφαρμόζεται μια μέθοδος γνωστή ως διαδικασία Haber-Bosch σε βιομηχανική κλίμακα για την παραγωγή αμμωνίας με μοριακό άζωτο που χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη, η οποία χρησιμοποιείται περαιτέρω στην παραγωγή λιπασμάτων.

Αμμωνιακά ιόντα

Το αμμωνιακό φορτίο το οποίο προστίθεται στο έδαφος δεν διατίθεται στα φυτά άμεσα(Θεριός, 2005). Αυτό συμβαίνει λόγω της δέσμευσης των αμμωνιακών ιόντων από τα κατιόντα της αργίλου με αποτέλεσμα να καθίστανται μη διαθέσιμα για τα φυτά. Με χορήγηση Καλίου στην καλλιέργεια 7-10 μέρες μετά την διάθεση NH_4^+ παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση Αζώτου(Θεριός, 2005).

Επιπλέον, μπορεί να συμβεί βιολογική δέσμευση αζώτου στο έδαφος από μικροοργανισμούς όπου το στερούν από τα φυτά. Η ακινητοποίηση του εδαφικού αζώτου συμβαίνει όταν υπάρχει πολύς άνθρακας στα φυτικά υπολείμματα, τον οποίο καταναλώνουν οι μικροοργανισμοί και πολλαπλασιάζονται σε μεγάλους ρυθμούς. Για τη σύνθεση των πρωτεϊνών τους απαιτούν και άζωτο το οποίο δεσμεύουν από το έδαφος, με αποτέλεσμα η καλλιέργεια να υποφέρει από έλλειψη αζώτου και να οδηγείται σε θάνατο(Κεραμίδας and Σινάνης, 2004). Οι μικροοργανισμοί προτιμούν NH_4^+ συγκριτικά με NO_3^- αν υπάρχουν και οι δύο μορφές αζώτου διαθέσιμες(Θεριός, 2005). Επανέρχεται στο έδαφος και καθίσταται διαθέσιμο ως παραπροϊόν του μεταβολισμού των μικροοργανισμών, είτε ως οργανική ουσία των νεκρών μικροοργανισμών(Βερεσόγλου, 2002).

Τέλος, τα αμμωνιακά ιόντα οξειδώνονται σε νιτρικά ιόντα σύμφωνα με τη διεργασία της νιτροποίησης σε καλώς αεριζόμενα εδάφη(Βερεσόγλου, 2002; Θεριός, 2005). Η οξείδωση των αμμωνιακών ιόντων συμβαίνει σε δύο στάδια, αρχικά με τη δράση των βακτηρίων *Nitrosomonas*, μετατρέποντάς τα σε νιτρώδη και μετέπειτα με τη δράση των βακτηρίων *Nitrobacter* μετατρέποντας τα νιτρώδη σε νιτρικά. Τα βακτήρια αυτά είναι χημειοσυνθετικοί αυτότροφοι οργανισμοί καθώς η ενέργεια που απαιτούν για τις δραστηριότητές τους προκύπτει από την οξείδωση(Βερεσόγλου, 2002; Θεριός, 2005)

2.2.5 Υγρό κλάσμα χωνεμένου ζωικού αποβλήτου ως λίπασμα

Πολλές έρευνες έχουν αποδείξει την χρησιμότητα του υγρού κλάσματος χωνεμένου ζωικού αποβλήτου ως λίπασμα στις καλλιέργειες λόγω του αμμωνιακού φορτίου (Albuquerque *et al.*, 2012; Koszel and Lorencowicz, 2015; Sigurnjak *et al.*, 2017; Maldaner *et al.*, 2018), αφηφώντας το περιβαλλοντικό κόστος που επιφέρει.

Τα λιπάσματα με βάση την αμμωνία εισέρχονται τελικά στο υδάτινο περιβάλλον με απορροή, ενώ οι αζωτούχες ενώσεις που καταναλώνονται από τον άνθρωπο και τα ζώα μέσω των καλλιεργειών θα φθάσουν επίσης σε υδάτινες μάζες στις κύριες μορφές λυμάτων και κοπριάς, αντίστοιχα. Αυτό μπορεί να αυξήσει τη συγκέντρωση του

αμμωνίου (οι αζωτούχες ενώσεις υπάρχουν στην κύρια μορφή των ιόντων αμμωνίου στο νερό) στο υδάτινο περιβάλλον.

2.2.6 Περιβαλλοντικές επιπτώσεις

Μόλις η συγκέντρωση του αμμωνίου δεν μπορεί να καθαριστεί από το ίδιο το νερό, θα προκύψουν διάφορα περιβαλλοντικά ζητήματα όπως ο ευτροφισμός (Ye et al., 2016a, Ye et al., 2017). Ο ευτροφισμός προκαλεί τον θάνατο της υδρόβιας ζωής όπως τα ψάρια, υποβαθμίζει την ποιότητα του νερού και καταστρέφει τη βιοποικιλότητα (Ye et al., 2016b). Για τον λόγο αυτό, πρέπει να πραγματοποιηθεί η απομάκρυνση αζώτου / αμμωνίου από τα λύματα προκειμένου να διασφαλιστεί η ανθρώπινη υγεία και η αειφόρος ανάπτυξη.

Πειραματικό μέρος - Υλικά και μέθοδοι

3.1 Προέλευση ζωικού υπολείμματος

Αρχική προσπάθεια ανάπτυξης μικροφυκών πραγματοποιείται σε υγρό κλάσμα χωνεμένου ζωικού υπολείμματος, μετά από θερμοφίλη επεξεργασία μέσα σε αντιδραστήρα, που συλλέγεται από τη Μονάδα παραγωγής Βιοαερίου στο Λαγκαδά Βιογας Lagada Α.Ε.

Μετ' έπειτα ζωικό υπόλειμμα που χρησιμοποιείται και πάλι ως μέσο ανάπτυξης στελεχών μικροφυκών συλλέγεται από τη Μονάδα Παραγωγής Βιοαερίου στη Χαλκηδόνα Θεσσαλονίκης από δύο μέρη. Γίνεται συλλογή ακατέργαστου ζωικού υπολείμματος προτού αυτό μπει στον αντιδραστήρα και υποστεί επεξεργασία (Before Lagoon) και υγρό κλάσμα χωνεμένου υπολείμματος από την ανοιχτή δεξαμενή καθίζησης (Lagoon) και αποθηκεύονται αμέσως στους 4°C προκειμένου να αποφευχθεί η αποσύνθεσή τους.

3.2 Ανάπτυξη στελεχών μικροφυκών από το χωνεμένο ζωικό απόβλητο

Σε φιάλες τύπου Pyrex των 250mL τοποθετούνται 3 μεταχειρίσεις με ωφέλιμο όγκο 150mL εμφιαλωμένου επιτραπέζιου νερού και αποβλήτου. Οι αναλογίες αποβλήτου προς νερό είναι 1%, 2%, 5%, 10% και τοποθετούνται επαναληπτικά σε δύο σειρές (Σχήμα 16). Τα δείγματα τοποθετούνται σε θάλαμο με σταθερή θερμοκρασία 25°C, ειδικό φωτισμό φωτοσύνθεσης κόκκινου-μπλε χρώματος 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και φωτοπερίοδο σκότους/φωτός ίση με 12/12 ώρες. Αρχικά οι φιάλες τροφοδοτούνται με αέρα μέσω πλαστικών σωλήνων και στη συνέχεια εφαρμόζονται πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα για συνεχή ανάδευση. Οι μικρές αναλογίες αποβλήτου/νερού έχουν σαν σκοπό τη διαύγεια του δείγματος ώστε να διαπερνάται από το φως και να επιτελείται η διαδικασία της φωτοσύνθεσης. Το νερό που επιλέγεται ως διαλύτης περιέχει ιχνοστοιχεία και μέταλλά απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροφυκών.

Πίνακας 3 Μεταχειρίσεις ακατέργαστου υπολείμματος

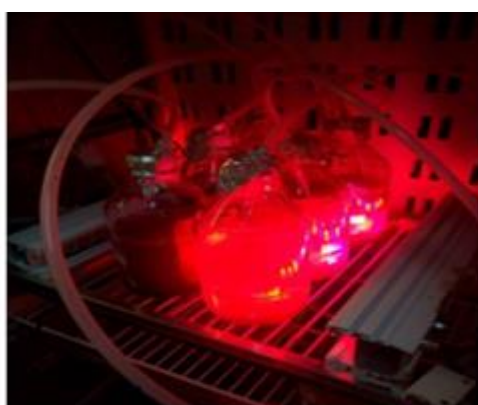


Μεταχείριση	Ακατέργαστο αποβλήτου/εμφιαλωμένο νερό
1	1%
2	1% Επανάληψη
3	2%
4	2% Επανάληψη
5	5%
6	10%

3.3 Ανάπτυξη στελεχών μικροφυκών από το ακατέργαστο ζωικό υπόλειμμα και το χωνεμένο ζωικό υπόλειμμα από τη δεξαμενή

Η ανάπτυξη των μικροφυκών πραγματοποιείται σε σύνολο 6 μεταχειρίσεων, 3 διαφορετικών αναλογιών αποβλήτου για κάθε ένα από τα δύο δείγματα υπολειμμάτων ξεχωριστά. Σε φιάλες Simax Czech Republic 1000mL προστίθεται συνολικός ωφέλιμος όγκος 700mL εμφιαλωμένου επιτραπέζιου νερού και αποβλήτου σε ποσοστό 1%, 2% και 5% ξεχωριστά (Πίνακας 2). Για το φωτισμό των φιαλών χρησιμοποιούνται λάμπες φωτοσύνθεσης 2 σειρών με 12 led κόκκινου-μπλε χρώματος με συνολική ένταση φωτός $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και φωτοπερίοδο σκότους/φωτός ίση με 12/12 ώρες. Οι καλλιέργειες τροφοδοτούνται με αέρα μέσω πλαστικών σωλήνων και επιτυγχάνεται ανάδευση των δειγμάτων και ανανέωση του υπερκείμενου αέρα με άνθρακα, ο οποίος είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη των κυττάρων. Τέλος, η θερμοκρασία του θαλάμου είναι στους 25°C . Επιλέγονται μικρές αναλογίες αποβλήτου στο εμφιαλωμένο επιτραπέζιο νερό προκειμένου το διάλυμα να διαπερνάται από τις ακτίνες του φωτός. Επίσης επιλέγεται ως διαλύτης εμφιαλωμένο επιτραπέζιο νερό διότι περιέχει μέταλλα και ιχνοστοιχεία τα οποία υποβοηθούν την ανάπτυξη των μικροφυκών.

Πίνακας 4 Διάταξη μεταχειρίσεων μέσα στο θάλαμο



Μεταχείριση	Αναλογία υπολείμματος/εμφιαλωμένο νερό
1	1% Lagoon
2	1% Before Lagoon
3	2% Lagoon
4	2% Before Lagoon
5	5% Lagoon
6	5% Before Lagoon

3.4 Συστηματικός έλεγχος κυτταρικής ανάπτυξης

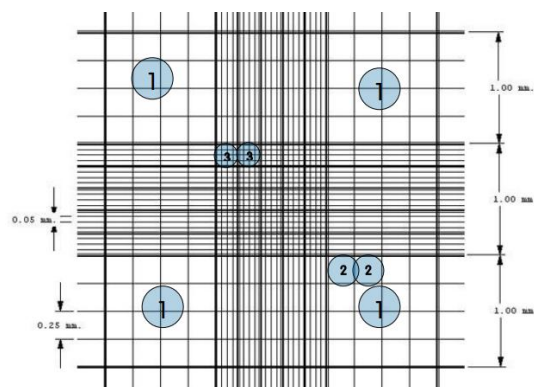
Για τον προσδιορισμό της ανάπτυξης των μικροφυκών πραγματοποιούνται μετρήσεις των κυττάρων σε οπτικό μικροσκόπιο AXIO A1 και της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης σε φασματοφωτόμετρο Helios Alpha&Beta. Κατά την 27^η μέρα του πειράματος γίνεται εμπλουτισμός των δειγμάτων με απόβλητο και εμφιαλωμένο επιτραπέζιο νερό σε ίδιες αναλογίες με τη Φάση 1, προκειμένου να παρατηρηθεί η επαύξηση των υπερκείμενων μικροφυκών. Οι μετρήσεις καταγράφονται ώστε εν συνεχεία να σχεδιαστεί η καμπύλη ανάπτυξης των μικροφυκών συναρτήσει του χρόνου.

3.5 Μέτρηση κυττάρων μικροφυκών σε οπτικό μικροσκόπιο

Για την καταγραφή του αριθμού των κυττάρων στα διάφορα στάδια ανάπτυξής τους χρησιμοποιείται αντικειμενοφόρος πλάκα αιμοκυτταρόμετρου τύπου Neubauer(Σχήμα 17). Δείγμα 0.025mL τοποθετείται με μικροπιπέτα στο κατάλληλα τετραγωνισμένο χώρο καταμέτρησης της πλάκας και από πάνω τοποθετείται καλυπτρίδα (Σχήμα 18). Στη συνέχεια μετρώνται στο μικροσκόπιο με φακό X40 τα καθαρά πράσινα κύτταρα μικροφυκών(Bastidas). Καθ' όλη τη διεξαγωγή του πειράματος σε τακτά χρονικά διαστήματα γίνεται αριθμητική καταμέτρηση των κυττάρων επαναληπτικά από τρία άτομα για μεγαλύτερη ακρίβεια αποτελεσμάτων. Η καταμέτρηση πρέπει να γίνει αμέσως μόλις παρθεί το δείγμα από τον κύριο όγκο της φιάλης λόγω της τάσης που έχουν τα μικροφύκη να κάνουν εστίες συσσωματωμάτων και τα αποτελέσματα να μην είναι αντιπροσωπευτικά.



Σχήμα 17 : Πλάκα αιμοκυτταρόμετρου τύπου Neubauer



Σχήμα 18 : Τετραγωνισμένος χώρος καταμέτρησης κυττάρων, σε πλάκα Neubauer

Η πλάκα αποτελείται από δύο κατάλληλα τετραγωνισμένες επιφάνειες και τοποθετείται το δείγμα σε μία από αυτές. Με το οπτικό μικροσκόπιο διακρίνεται ένα τετράγω-

νο πλέγμα το οποίο είναι χωρισμένο σε εννέα επιμέρους τετράγωνα μήκους 0.1cm το καθένα. Το πάχος μεταξύ της καλυπτρίδας που καλύπτει το δείγμα και της πλάκας είναι 0.01cm. Κάθε ένα από τα τετράγωνα έχει επιπλέον υποδιαιρέσεις για τη διευκόλυνση της καταμέτρησης των κυττάρων. Το κεντρικό κύριο τετράγωνο χωρίζεται σε 25 επιμέρους τετράγωνα, όγκου $4 \cdot 10^{-6}$ mL το καθένα, στα οποία γίνεται η καταγραφή του πληθυσμού των κυττάρων των μικροφυκών. Επιλέγεται ο συγκεκριμένος χώρος για την καταμέτρηση καθώς το μέγεθος των κυττάρων είναι εξαιρετικά μικρό και εξυπηρετεί τους επιμέρους υπολογισμούς. Η συγκέντρωση των κυττάρων των μικροφυκών σε $4 \cdot 10^{-6}$ mL υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Συγκέντρωση (κύτταρα/ mL)} = \frac{\text{Αριθμός κυττάρων}}{\text{Όγκος (mL)}}$$

3.6 Μέθοδος προσδιορισμού χλωροφύλλης α

Για τον προσδιορισμό της χλωροφύλλης επιλέγεται η Τριχρωματική μέθοδος Φασματοφωτομετρίας (Aminot and Rey, 2002). Αρχικά λαμβάνεται δείγμα 10mL από τον κύριο όγκο της φιάλης και φιλτράρεται υπό πίεση κενό αέρος (Σχήμα 19) 0.7 bar, ώστε να μη καταστραφούν τα κύτταρα των μικροφυκών. Το φίλτρο που συγκρατεί τη φυτομάζα, (τύπου Whatman GF/F type, 47 mm σε διάμετρο και 1.2μm σε μέγεθος πόρων), τοποθετείται σε σωληνάριο φυγοκέντρου τύπου Falcon. Στη συνέχεια προστίθενται 20mL ακετόνη 90% στο φιαλίδιο με το φίλτρο και φυγοκεντρείται για 20 λεπτά στις 2500×g στροφές. Επιλέγεται ακετόνη 90% ως εκχυλιστικό μέσο λόγω της χαμηλής τοξικότητάς του, κατάλληλο για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Προκειμένου να εκχυλιστεί η χλωροφύλλη, τα δείγματα παραμένουν για 24 ώρες στους 4°C. Μετά το πέρας μιας ημέρας το δείγμα μετράται στο φασματοφωτόμετρο σε τέσσερα διαφορετικά μήκη κύματος, 630, 647, 664 και 750nm όπου καταγράφονται οι τιμές της απορρόφησης και η τελική τιμή της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης α προσδιορίζεται από την παρακάτω εξίσωση (Jeffrey and Humphrey, 1975):

$$\text{Chlorophyll a} = (11.85 * (E_{664} - E_{750}) - 1.54 * (E_{647} - E_{750}) - 0.08 (E_{630} - E_{750})) * V_e / L * V_f$$

Όπου:

L = μήκος κυψελίδας σε cm.

V_e = όγκος του εκχυλιστικού μέσου σε mL.

V_f = όγκος του δείγματος που φιλτράρεται σε L.

Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης βρίσκεται σε mg/L.



Σχήμα 19 : Συσκευή κενού αέρος

Καλλιέργεια των μικροφυκών σε θρεπτικό μέσο

Αποφασίζεται να απομονωθεί η καλλιέργεια μικροφυκών από τη μεταχείριση με τη μεγαλύτερη ανάπτυξη κυττάρων. Δείγμα μικροφύκους από την κύρια φιάλη καλλιεργείται μέσα σε δύο διαφορετικά πρότυπα, τα οποία περιέχουν όλα τα απαραίτητα στοιχεία για την ανάπτυξή του.

Πίνακας 5 Πρότυπο μέσο Conway

Συστατικά	Ποσότητα
Na ₂ EDTA	45g
NaNO ₃	116g
H ₃ BO ₃	33,6g
NaH ₂ PO ₄	20g
MnCl ₂ *4H ₂ O	0.36g
FeCl ₃ *6H ₂ O	1.3g
Διάλυμα μετάλλων	1 ml
Απιονισμένο νερό	1000 mL

Διάλυμα μετάλλων	
Συστατικά	g /100mL απιονισμένο νερό
ZnCl ₂	2.1
CuSO ₄ 5 H ₂ O	2
CoCl ₂ 6 H ₂ O	2
(NH ₄)Mo ₇ O ₂ 4 H ₂ O	0.9

Πίνακας 6 Πρότυπο μέσο BG-11 (Rippka et al., 1979)

Συστατικά	Ποσότητα
NaNO ₃	1.5 g
K ₂ HPO ₄	0.04 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.075 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.036 g
Citric acid	0.006 g
C ₆ H ₈ FeNO ₇	0.006 g
EDTA Na ₂	0.001 g
Na ₂ CO ₃	0.02 g
Διάλυμα μετάλλων	1 mL
Απιονισμένο νερό	1000 mL

Διάλυμα μετάλλων	
Συστατικά	g /100mL απιονισμένο νερό
H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ 4 H ₂ O	1.86
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	0.22
NaMoO ₄ 2 H ₂ O	0.39
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0.08
Co(NO ₃) ₂ 6 H ₂ O	0.05

Μετά την παρασκευή ακολουθεί αποθήκευση του μέσου Conway σε δώδεκα δοκιμαστικούς σωλήνες των 10mL και σε τέσσερις κωνικές φιάλες των 250mL (Πίνακας 3), ενώ του μέσου BG-11 σε 3 δοκιμαστικούς σωλήνες των 10mL και 5 φιάλες τύπου Simax Czech Republic 250mL με ωφέλιμο όγκο 200mL(Πίνακας 4). Τα διαλύματα μετάλλων αποθηκεύονται στους 4°C για περαιτέρω παρασκευή νέων θρεπτικών μέσων.



Σχήμα 20: Πρότυπο μέσο καλλιέργειας Conway



Σχήμα 21: Πρότυπο μέσο καλλιέργειας BG 11

Ακολουθείται διαφορετική διαδικασία απομόνωσης των μικροφυκών στα θρεπτικά μέσα. Δοκιμαστικός σωλήνας 10mL με θρεπτικό μέσο Copway εμβολιάζεται με 1mL μικροφυκών και παραμένει για 15 ημέρες σε θερμοκρασία 25°C. Μετά το πέρας των 15 ημερών εμβολιάζουμε τη φιάλη θρεπτικού μέσου Copway των 250mL με 5mL από τον δοκιμαστικό σωλήνα θρεπτικού μέσου Copway και με τα ήδη αναπτυγμένα μικροφύκη. Από την άλλη, δοκιμαστικός σωλήνας θρεπτικού μέσου BG-11 10mL εμβολιάζεται με 2.5mL μικροφυκών και παραμένει σε θερμοκρασία 25°C. Μετά από 5 μέρες εμβολιάζεται η φιάλη των 200mL που περιέχει μέσο BG-11 με 5mL από το υπέργειο υγρό κλάσμα του δοκιμαστικού σωλήνα που περιέχει μικροφύκη και μία όμοια δεύτερη φιάλη εμβολιάζεται με 5mL φυτομάζας που έχει καθιζάνει στον δοκιμαστικό σωλήνα(Σχήμα 23).



Σχήμα 23: Φυτομάζα φυκών σε δοκιμαστικό σωλήνα

Μέτρηση αμμωνιακού αζώτου

Το στέλεχος που καλλιεργείται στο θρεπτικό μέσο BG-11 μεταφέρεται σε νέο υγρό κλάσμα χωνεμένου ζωικού αποβλήτου προκειμένου να ερευνηθεί η απομάκρυνση του αμμωνιακού αζώτου συναρτήσει του χρόνου. Μεταφέρθηκαν 50 mL μικροφυκών, με αριθμό κυττάρων $200 \cdot 10^5$ κύτταρα/mL, σε φιάλη Simax Czech Republic με 200mL ωφέλιμο όγκο αποβλήτου. Η φιάλη στη συνέχεια τοποθετήθηκε στους 25°C σε συνεχή ανάδευση και ένταση φωτός $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Το αμμωνιακό άζωτο μετρήθηκε με Ammonium cuvette test (LCK 302) 47-130 mg/L $\text{NH}_4\text{-N}$ στα 550nm σε φασματοφωτόμετρο DR 2800.

Αποτελέσματα και Σχόλια

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι να διερευνηθεί το υγρό κλάσμα χωνεμένου ζωικού υπολείμματος, το ακατέργαστο υπόλειμμα και το χωνεμένο ζωικό υπόλειμμα από την ανοιχτή δεξαμενή αποθήκευσης ως θρεπτικά μέσα ανάπτυξης μικροφυκών. Λόγω της υψηλής θερμοκρασίας που επικρατεί μέσα στον αντιδραστήρα 50-60°C, θανατώνεται κάθε μορφή μικροφύκων ή σπορίων που μπορεί αυτό να περιέχει και δεν παρατηρείται καμία ανάπτυξη στις μεταχειρίσεις. Ανεξάρτητα από το ποσοστό αποβλήτου που περιέχεται στις φιάλες δεν σημειώνεται καμία ανάπτυξη στελεχών μικροφυκών στο υγρό κλάσμα χωνεμένου ζωικού υπολείμματος. Ανάπτυξη μικροφυκών σημειώνεται στα άλλα δύο θρεπτικά μέσα και γίνεται σύγκριση της πορείας ανάπτυξης μικροφυκών των 6 μεταχειρίσεων διαφορετικής περιεκτικότητας ζωικού υπολείμματος. Οι τρεις μεταχειρίσεις γίνονται με χρήση ακατέργαστου ζωικού αποβλήτου (BL) και οι άλλες τρεις με το απόβλητο της δεξαμενής καθίζησης (L). Η μελέτη γίνεται καταγράφοντας τον αριθμό των κυττάρων κατά την πορεία ανάπτυξης των μικροφυκών και προσδιορίζοντας τα επίπεδα συγκέντρωσης της χλωροφύλλης α ως δείκτη φωτοσυνθετικής δραστηριότητας. Το πείραμα διήρκεσε 70 ημέρες και εφαρμόζονται τα πρωτόκολλα προκειμένου να προσδιοριστεί ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροφυκών. Τα πρώτα ικανά προς μέτρηση κύτταρα στο οπτικό μικροσκόπιο εμφανίζονται τη 12^η μέρα, ενώ μέχρι και την 26^η ημέρα ο πληθυσμός των ζωντανών προς μέτρηση κυττάρων φαίνεται να μειώνεται. Έτσι γίνεται εμπλουτισμός των φιαλών με απόβλητο ώστε να παρατηρηθεί η αντίδραση των κυττάρων των μικροφυκών στο νέο θρεπτικό μέσο. Μετά τον εμπλουτισμό γίνεται καταγραφή της χλωροφύλλης α διότι ο πληθυσμός των κυττάρων είναι τόσο μεγάλος που καθίσταται δύσκολη η καταμέτρηση σε οπτικό μικροσκόπιο. Μετά την ανάπτυξή τους διενεργείται απομόνωση των υπερκείμενων μικροφυκών σε δύο θρεπτικά μέσα για συντήρηση της καλλιέργειας. Η θερμοκρασία του θαλάμου είναι στους 25 °C και η ένταση του φωτός στα $400 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ με εναλλαγή σκότους/ημέρας. Οι 6 μεταχειρίσεις έχουν ως εξής:

Πίνακας 7 Μεταχειρίσεις όπου παρατηρείται ανάπτυξη μικροφυκών

Αναλογία αποβλήτου/ εμφιαλωμένου νερού	Είδος αποβλήτου
1%	Lagoon
1%	Before Lagoon
2%	Lagoon
2%	Before Lagoon
5%	Lagoon
5%	Before Lagoon

6.1 Περιοριστικός παράγοντας Lagoon

Στις μεταχειρίσεις υγρού χωνεμένου ζωικού υπολείμματος από την ανοιχτή δεξαμενή καθίζησης, την 26^η μέρα διεξαγωγής του πειράματος, παρατηρείται έντονη δραστηριότητα από πρωτόζωα και τροχόζωα. Είδη ζωοπλαγκτόν ζουν στο περιβάλλον και διεισδύουν σε ανοιχτές δεξαμενές με απόβλητα όπου η διαθεσιμότητα σε θρεπτικά είναι μεγάλη (Montemezzani, 2017). Παρατηρείται στο μικροσκόπιο η εμφάνιση του τροχόζωου *Phyla Rotifera* (Σχήμα 22) το οποίο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τρέφεται με νεκρά ή μικρά ζωντανά κύτταρα μικροφυκών και προκαλεί μεταβολές στον πληθυσμό τους (Wang *et al.*, 2013; Montemezzani, 2017). Επίσης, η θολερότητα του υγρού κλάσματος ζωικού αποβλήτου στις ανοιχτές δεξαμενές σημειώνεται ως περιοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη των μικροφυκών καθώς το φως δεν μπορεί να διεισδύσει και να εξυπηρετήσει την πορεία της φωτοσύνθεσης (Wang *et al.*, 2013). Έτσι, δικαιολογείται ο μικρός πληθυσμός των κυττάρων στις μεταχειρίσεις 1%L, 2%L, 5%L όπου το δείγμα είναι από την ανοιχτή δεξαμενή καθίζησης.

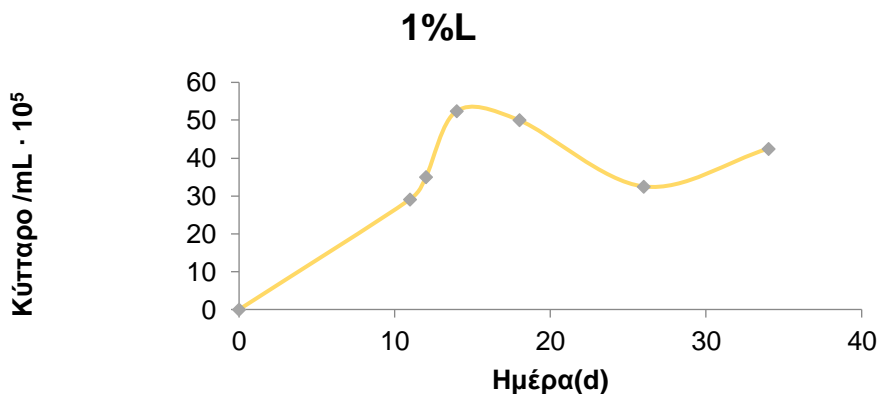


Σχήμα 23 : Phylum Rotifera (Blaylock, 2009)

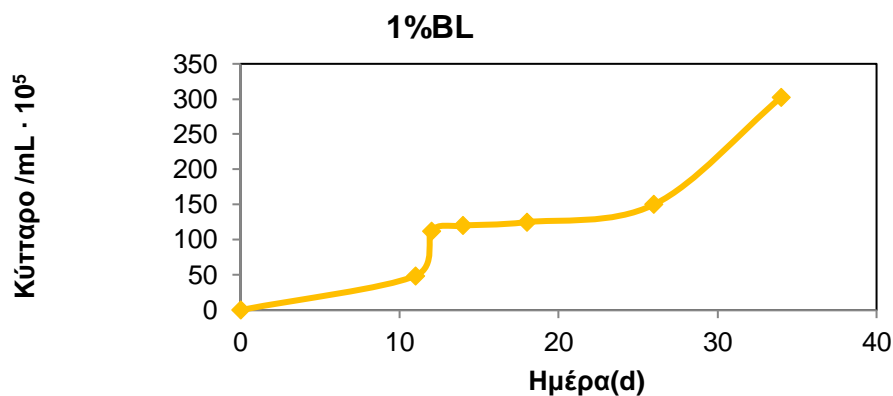
6.2 Αποτελέσματα ανάπτυξης μικροφυκών σύμφωνα με την καμπύλη κυτταρικής ανάπτυξης

Μεταχειρίσεις 1%L και 1%BL

Στο σχήμα 1 και σχήμα 3 απεικονίζονται οι μεταχειρίσεις 1%L και 1%BL αντίστοιχα των συγκεντρώσεων των κυττάρων των μικροφυκών που περιέχονται σε 1mL. Λόγω μικρής ποσότητας ζωικού αποβλήτου και επομένως μικρής διαθεσιμότητας θρεπτικών, η ανάπτυξη των κυττάρων είναι η μικρότερη συγκριτικά με τις άλλες μεταχειρίσεις. Λόγω όμως της μικρής αναλογίας αποβλήτου νερού, το διάλυμα είναι διαυγές με αποτέλεσμα η όποια ανάπτυξη των κυττάρων να σημειωθεί πολύ γρήγορα. Στα δύο αυτά διαγράμματα η φάση υστέρησης έχει παραλειφθεί καθώς η διαθεσιμότητα των θρεπτικών σε συνδυασμό με την ένταση του φωτός και τη θερμοκρασία καθιστά την ανάπτυξη των κυττάρων ευνοϊκή. Τα επίπεδα πληθυσμού στη μεταχείριση 1%L είναι χαμηλότερα λόγω έντονης δραστηριότητας ζωοπλαγκτόν, μόλις $53 \cdot 10^5$ κύτταρα/mL ενώ στη μεταχείριση 1%BL διπλάσιος αριθμός κυττάρων $113 \cdot 10^5$ κύτταρα/mL. Η μείωση του ρυθμού ανάπτυξης στη μεταχείριση 1%BL σημειώνεται νωρίτερα από τη μεταχείριση 1%L και μπαίνει στη στατική φάση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Από την άλλη, η μεταχείριση 1%L μένει στη στατική φάση για πολύ μικρό χρονικό διάστημα και αμέσως μπαίνει στο στάδιο θανάτωσης από πιθανή επίθεση ζωοπλαγκτόν ή μη διαθεσιμότητας θρεπτικών. Μετά την 27^η ημέρα που γίνεται εμπλουτισμός με νέο απόβλητο και άρα θρεπτικών στοιχείων, ο πληθυσμός των κυττάρων αυξάνεται ραγδαία στη μεταχείριση 1%BL με $300 \cdot 10^5$ κύτταρα/mL μέχρι και την 34^η ημέρα, ενώ αυξάνεται με μικρό ρυθμό στη μεταχείριση 1%L την ίδια χρονική περίοδο με $45 \cdot 10^5$ κύτταρα/mL.



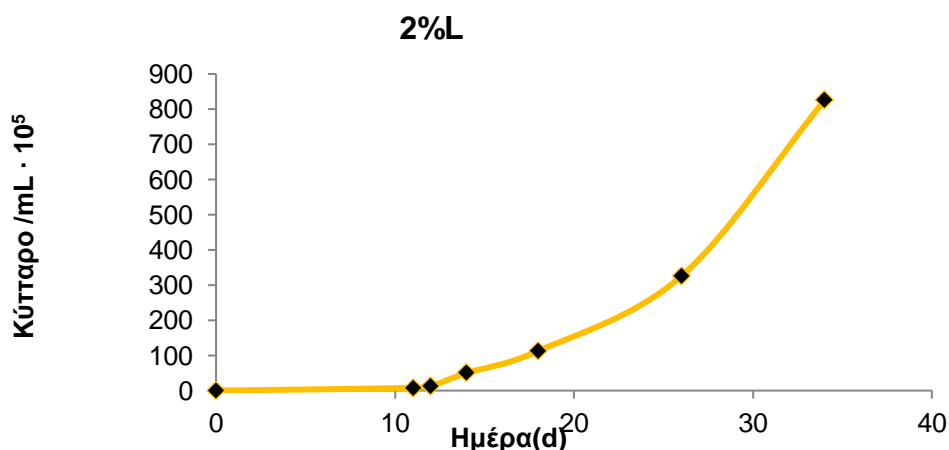
Σχήμα 24 : Καμπύλη ανάπτυξης κυτταρικού πληθυσμού μικροφυκών 1%L



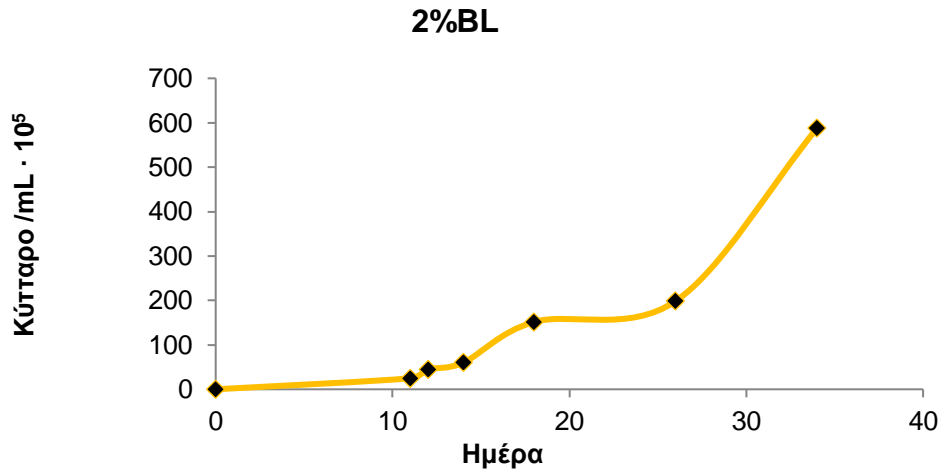
Σχήμα 25 : Καμπύλη ανάπτυξης κυτταρικού πληθυσμού μικροφυκών 1%BL

Μεταχειρίσεις 2%L και 2%BL

Στις μεταχειρίσεις 2%L και 2%BL όπως φαίνεται από τα διαγράμματα Σχήμα και Σχήμα η αναλογία απόβλητο/νερό δίνει καλή απόδοση στη συγκέντρωση κυττάρων. Μάλιστα η μεταχείριση 2%L είναι η δεύτερη πιο αποδοτική καλλιέργεια στο σύνολο. Λόγω μεγαλύτερης θολερότητας και στις δύο μεταχειρίσεις, η φάση υστέρησης δηλαδή η φάση προσαρμογής των κυττάρων διαρκεί μεγάλο χρονικό διάστημα σχεδόν 11 ημέρες. Μέχρι και την 18^η μέρα η μεταχείριση 2%BL υπερτερεί σε πληθυσμό συγκριτικά με την μεταχείριση 2%L. Η εκθετική φάση στη μεταχείριση 2%BL διακόπτεται τη 18^η ημέρα με $150 \cdot 10^5$ κύτταρα/mL και η καλλιέργεια μικροφυκών μπαίνει στη στατική φάση μέχρι και την 27^η ημέρα όπου γίνεται ο εμπλουτισμός και όπως είναι αναμενόμενο λόγω διαθεσιμότητας θρεπτικών αυξάνεται ο ρυθμός ανάπτυξης, $600 \cdot 10^5$ κύτταρα/mL. Από την άλλη η μεταχείριση 2%L εμφανίζει συνεχόμενη εκθετική φάση καθ' όλη τη διάρκεια και μετά τον εμπλουτισμό τα κύτταρα φτάνουν σε σύνολο τα $825 \cdot 10^5$ ανά mL. Στη συγκεκριμένη αναλογία φαίνεται πως το ζωοπλαγκτόν δεν επηρεάζει αρνητικά την κυτταρική ανάπτυξη των μικροφυκών διότι δεν αναπτύσσονται ανταγωνιστικές δραστηριότητες.



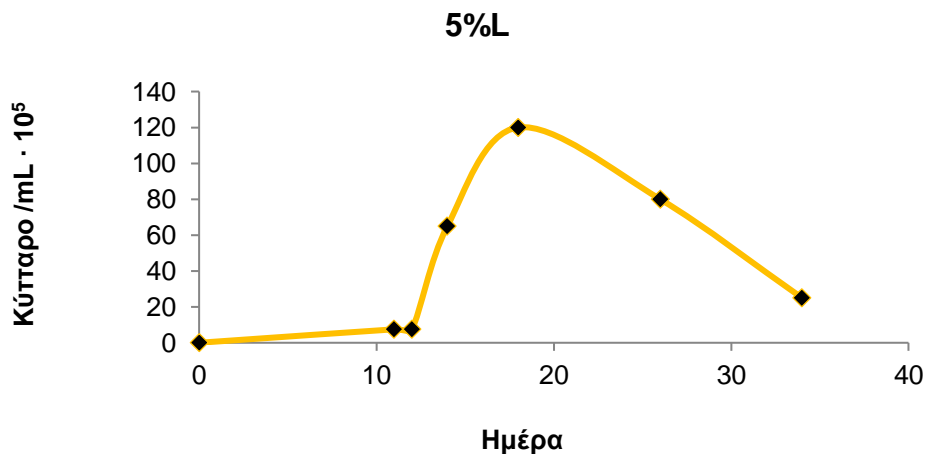
Σχήμα 26: Καμπύλη ανάπτυξης κυτταρικού πληθυσμού μικροφυκών 2%L



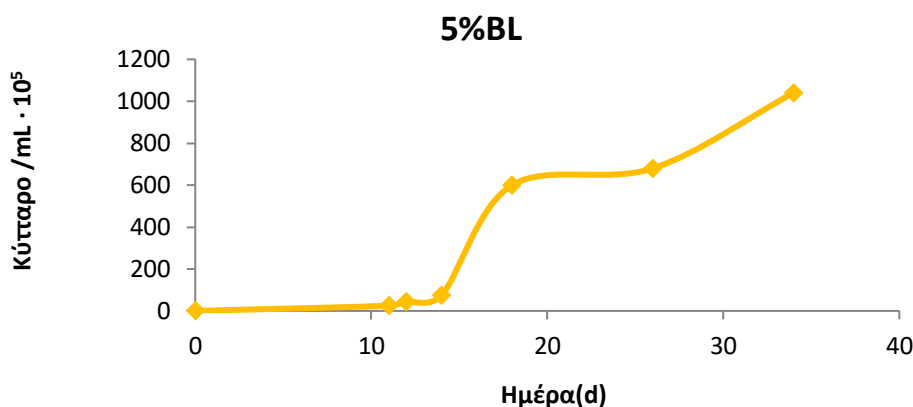
Σχήμα 27: Καμπύλη ανάπτυξης κυτταρικού πληθυσμού μικροφυκών 2%BL

Μεταχειρίσεις 5%L και 5%BL

Στις τελευταίες μεταχειρίσεις 5%L και 5%BL η φάση υστέρησης των κυττάρων των μικροφυκών διαρκεί 11 ημέρες και αποδίδεται και πάλι στη θολερότητα. Και οι δύο μεταχειρίσεις εμφανίζουν μία ραγδαία εκθετική ανάπτυξη την 18^η ημέρα με $120 \cdot 10^5$ κύτταρα/mL και $600 \cdot 10^5$ κύτταρα/mL αντίστοιχα. Η στατική φάση είναι ανύπαρκτη στην πρώτη μεταχείριση και τα κύτταρα μπαίνουν αμέσως στη φάση θανάτου. Ο εμπλουτισμός της 26^{ης} ημέρας φαίνεται να μην επηρεάζει θετικά τα κύτταρα της μεταχείρισης 5%L. Τέλος, η πιο αποδοτική μεταχείριση 5%BL παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανάπτυξη κυττάρων σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Μάλιστα μετά τον εμπλουτισμό ο πληθυσμός των κυττάρων φτάνει τα $1040 \cdot 10^5$ κύτταρα/mL.



Σχήμα 6: Καμπύλη ανάπτυξης κυτταρικού πληθυσμού μικροφυκών 5%L



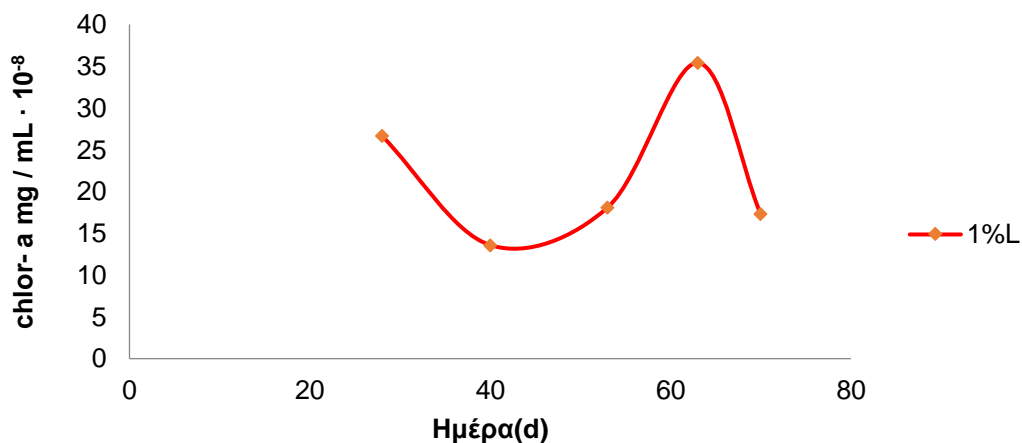
Σχήμα 28: Καμπύλη ανάπτυξης κυτταρικού πληθυσμού μικροφυκών 5%L

6.3 Αποτελέσματα καταγραφής χλωροφύλλης α

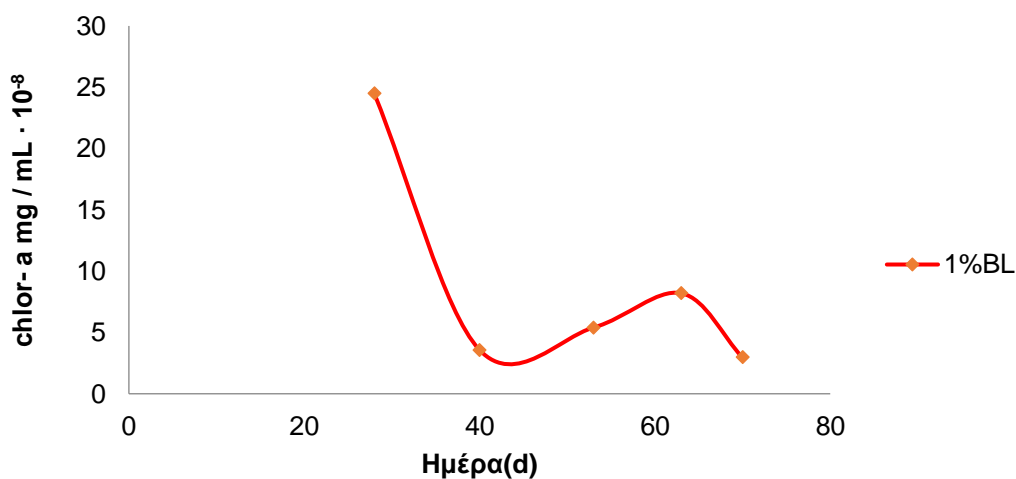
Η χλωροφύλλη α είναι χαρακτηριστικός δείκτης που μαρτυρά τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα. Η μετρήσεις της ξεκινούν δύο μέρες μετά τον εμπλουτισμό με νέο απόβλητο και συνεχίζουν μέχρι να αφομοιωθούν όλα τα θρεπτικά στοιχεία από τα μικροφύκη και να παρατηρηθεί στασιμότητα στην ανάπτυξή τους. Κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, λόγω απρόσμενων διακοπών στην τροφοδοσία ρεύματος και απορρύθμισης της φωτοπερίόδου, υπάρχει μείωση της φωτοσύνθεσης και επομένως των τιμών της χλωροφύλλης α μέχρι και την 53^η ημέρα του πειράματος όπου αποκαθίσταται και σταθεροποιείται η βλάβη. Επίσης, λόγω δράσης του ζωοπλαγκτόν παρατηρείται στις μεταχειρίσεις δείγματος από το Lagoon μία εκθετική αύξηση της τιμής της χλωροφύλλης α. Στις μεταχειρίσεις αυτές την τιμή επηρεάζουν τα προϊόντα αποικοδόμησης των τροχόζων και των πρωτόζων τα οποία λόγω χαρακτηριστικών δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν από τη χλωροφύλλη α, προσμετρούνται ως αυτή και ανεβάζουν την τιμή της λανθασμένα (Strom, 1993; Arfi and Guiral, 1994; Aminot and Rey, 2002). Επομένως δεν μπορούμε να λάβουμε τα αποτελέσματα των μεταχειρίσεων 1%L, 2%L και 3%L ως αξιόπιστα. Από την άλλη στις μεταχειρίσεις 1%BL, 2%BL και 3%BL λόγω απουσίας προϊόντων αποικοδόμησης μπορούμε να τα λάβουμε ως ακριβή. Συγκρινόμενα μάλιστα με τον καταγεγραμμένο πληθυσμό των κυττάρων των μικροφυκών μπορούμε να οδηγηθούμε σε ανάλογα συμπεράσματα.

Μεταχειρίσεις 1%L και 1%BL

Στη μεταχείριση 1%L ο πληθυσμός των κυττάρων την 26^η μέρα είναι $45 \cdot 10^5$ κύτταρα/mL και συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις είναι η λιγότερο αποδοτική. Με τόσο μικρό πληθυσμό κυττάρων είναι αδύνατον να έχει $35 \cdot 10^{-8}$ mg χλωροφύλλη/ mL, ενώ η μεταχείριση 1%BL με πληθυσμό κυττάρων $300 \cdot 10^5$ κύτταρα/mL να έχει μόλις $8 \cdot 10^{-8}$ mg χλωροφύλλη/ mL.



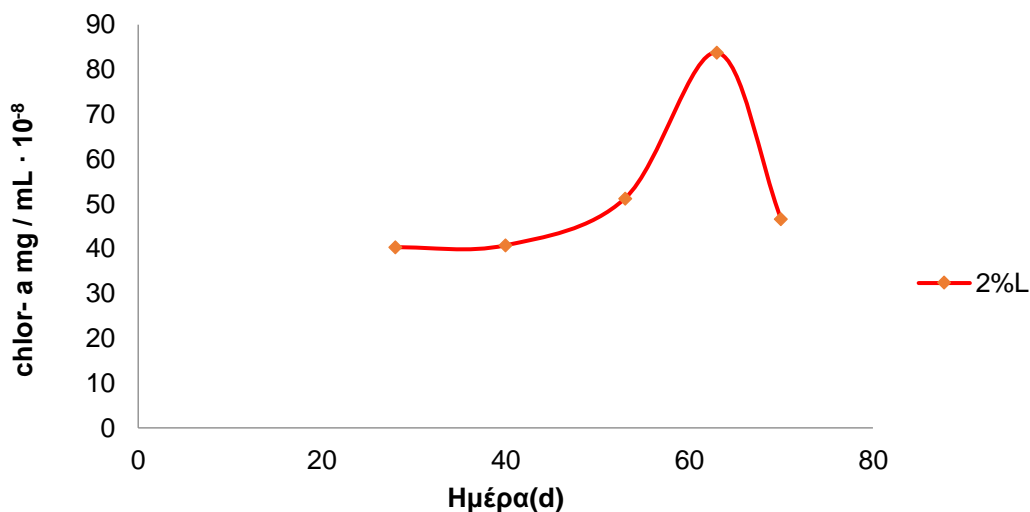
Σχήμα 29: Συγκέντρωση χλωροφύλλης α μεταχείρισης 1%L



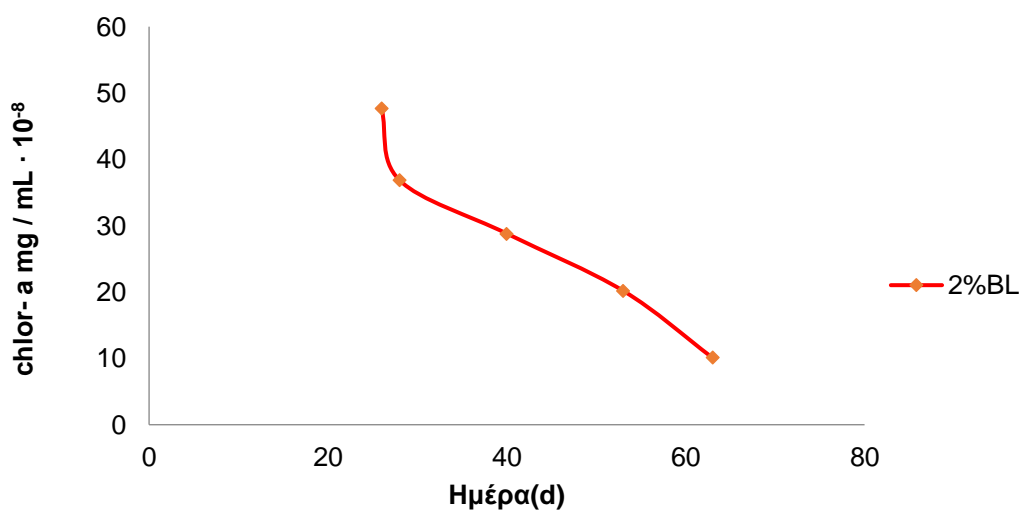
Σχήμα 30: Συγκέντρωση χλωροφύλλης α μεταχείρισης 1%BL

Μεταχειρίσεις 2%L και 2%BL

Όμοια, η μεταχείριση 2%L με πληθυσμό $825 \cdot 10^5$ κύτταρα/mL φαίνεται να έχει μεγάλη τιμή, $84 \cdot 10^{-8}$ mg χλωροφύλλης/ mL. Από την άλλη η μεταχείριση 2%BL με πληθυσμό $600 \cdot 10^5$ κύτταρα/mL έχει τιμή $20 \cdot 10^{-8}$ mg χλωροφύλλης/ mL την 53^η ημέρα, όπου αναλογικά με διπλάσιο πληθυσμό κυττάρων από τη μεταχείριση 1%BL εμφανίζει και διπλάσια σχεδόν τιμή χλωροφύλλης και μπορούμε να το θεωρήσουμε λογικό.



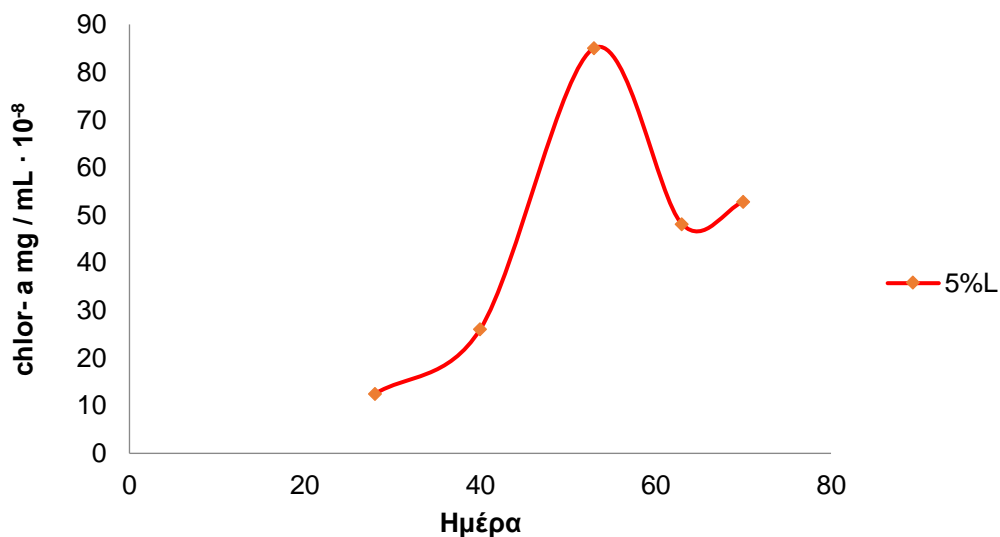
Σχήμα 31: Συγκέντρωση χλωροφύλλης α μεταχείρισης 2%L



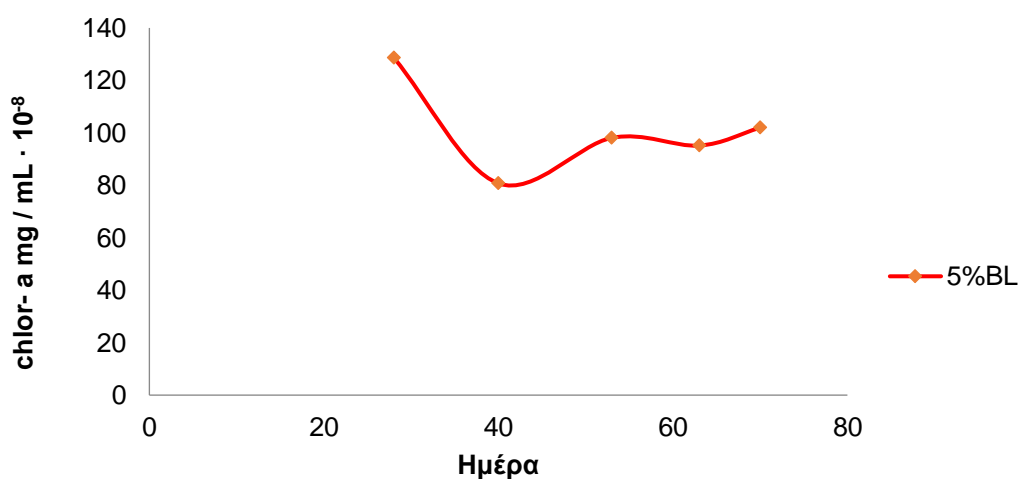
Σχήμα 32: Συγκέντρωση χλωροφύλλης α μεταχείρισης 2%BL

Μεταχειρίσεις 5%L και 5%BL

Τέλος, η μεταχείριση 5%L με πληθυσμό κυττάρων $25 \cdot 10^5$ κύτταρα/mL παρουσιάζει τιμή $85 \cdot 10^{-8}$ mg χλωροφύλλης/ mL η οποία και πάλι θεωρείται ανακριβής. Ενώ, η αποδοτικότερη από όλες μεταχείριση 5%BL με $1040 \cdot 10^5$ κύτταρα/mL έχει τιμή χλωροφύλλης $100 \cdot 10^{-8}$ mg χλωροφύλλης/ mL όπου αναλογικά μπορούμε να το δεχτούμε ως αληθές αποτέλεσμα. Στην τελευταία μεταχείριση παρουσιάζεται μία μικρή αύξηση την 70^η ημέρα και μπορούμε να υποθέσουμε πως τα κύτταρα βρίσκουν και καταναλώνουν κι άλλες μορφές αζώτου και συνθέτουν χλωροφύλλη α.



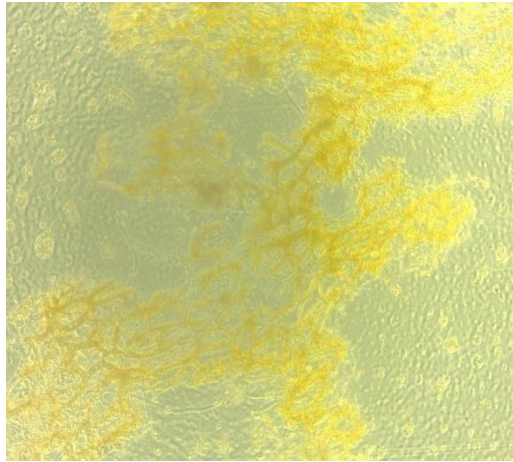
Σχήμα 33: Συγκέντρωση χλωροφύλλης α μεταχείρισης 5%L



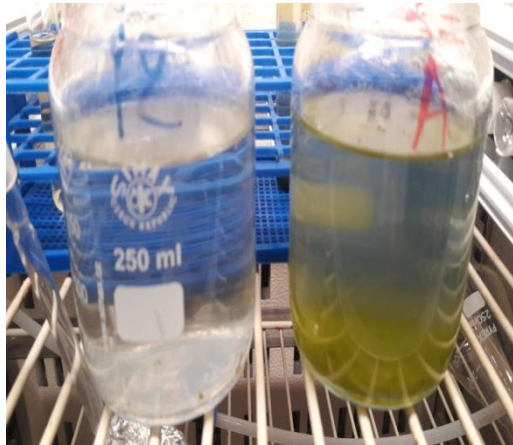
Σχήμα 34: Συγκέντρωση χλωροφύλλης α μεταχείρισης 5% BL

6.4 Αποτελέσματα ανάπτυξης μικροφυκών στα θρεπτικά μέσα

Η απέκκριση ορισμένων οργανικών ουσιών από τα κύτταρα των μικροφυκών μπορεί να προκαλέσει βακτηριακή μόλυνση ακόμα και αν καλλιεργούνται σε μέσο με απλά ανόργανα στοιχεία (Mahadevaswamy and V. Venkataraman, 1981). Όπως παρατηρήθηκε στο οπτικό μικροσκόπιο το μέσο Conway κρίθηκε ακατάλληλο για την ανάπτυξη της καλλιέργειας των μικροφυκών λόγω επιμόλυνσης (Σχήμα 25). Επίσης το μέσο αυτό εξυπηρετεί καλλιέργεια θαλάσσιων μικροφυκών κυρίως. Από την άλλη το μέσο BG-11 όπως φαίνεται οπτικά από την Σχήμα 26 λειτουργεί για την ανάπτυξη και συντήρηση της καλλιέργειας των συγκεκριμένων στελεχών μικροφυκών. Η ανάπτυξη των κυττάρων σημειώνεται μέσα στις πρώτες πέντε ημέρες από τον εμβολισμό.



Σχήμα 35: Επιμόλυνση στο μέσο Conway



Σχήμα 36: Πρώτη ημέρα εμβολιασμού μικροφυκών στο μέσο BG11



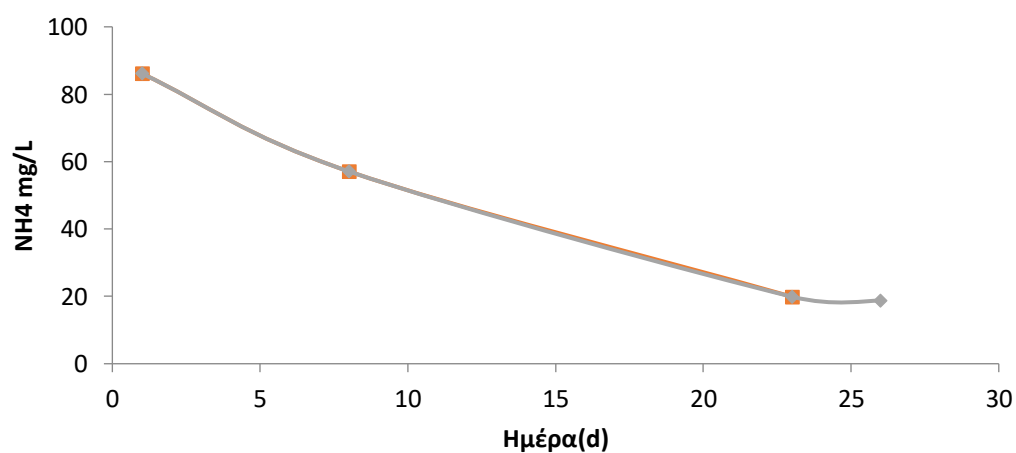
Σχήμα 37: Πέμπτη ημέρα μετά τον εμβολιασμό μικροφυκών στο μέσο BG11



Σχήμα 38 : Εμβολιασμένες φιάλες μέσου BG11

6.5 Απομάκρυνση αμμωνιακού αζώτου

Σε εύρος 26 ημερών η απομάκρυνση του αμμωνιακού αζώτου είναι 78%. Το στέλεχος των μικροφυκών που αναπτύχθηκε από το ακατέργαστο ζωικό υπόλειμμα σημειώνει ανθεκτικότητα στα επίπεδα αμμωνίας του χωνεμένου ζωικού υπολείμματος.



Σχήμα 39: Απομάκρυνση αμμωνιακού αζώτου

Συμπεράσματα

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκαν οι ρυθμοί ανάπτυξης και καλλιέργειας μικροφυκών μέσα σε ακατέργαστα ζωικά απόβλητα και σε υγρό κλάσμα χωνεμένων ζωικών αποβλήτων. Με τη χρήση των αποβλήτων ως μέσο ανάπτυξης μειώνεται το κόστος παραγωγής για την καλλιέργεια μικροφυκών αλλά και τα ίδια τα απόβλητα αποδεσμεύονται από το φορτίο το οποίο προκαλεί περιβαλλοντικά προβλήματα. Η επεξεργασία αποβλήτων με καλλιέργεια μικροφυκών παρουσιάζει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον προκειμένου να αναπτυχθεί ένα δυνατό στέλεχος εκμεταλλεύσιμο για παραγωγή ενέργειας που να παρουσιάζει και τη βέλτιστη δυνατή απομάκρυνση αμμωνιακού φορτίου.

Αποδείχθηκε ό,τι:

- μεγαλύτερη ανάπτυξη μικροφυκών σημειώνεται σε ακατέργαστα ζωικά απόβλητα
- στην ανοιχτή δεξαμενή αποθήκευσης του υγρού κλάσματος χωνεμένου ζωικού υπολείμματος υπάρχει δυνατότητα ανάπτυξης μικροφυκών, αλλά αναπτύσσονται εχθρικές δραστηριότητες από τροχόζωα που μπορεί να αποβούν καταστροφικές για την καλλιέργεια
- στο υγρό κλάσμα χωνεμένου ζωικού υπολείμματος μπορεί να επιτευχθεί καλλιέργεια μικροφυκών αλλά όχι ανάπτυξη αυτών
- τα στελέχη που αναπτύχθηκαν στα ακατέργαστα ζωικά απόβλητα απομακρύνουν τα αμμωνιακά ιόντα όταν καλλιεργούνται σε υγρό κλάσμα χωνεμένου ζωικού αποβλήτου κατά 78% εντός 26 ημερών

Πρέπει να διενεργηθεί έρευνα αναγνώρισης και ταυτοποίησης των ειδών των μικροφυκών που αναπτύσσονται σε ακατέργαστα ζωικά απόβλητα και να διερευνηθούν οι συνθήκες ανθεκτικότητας της καλλιέργειας σε διάφορες συγκεντρώσεις αμμωνιακών ιόντων του υγρού χωνεμένου ζωικού αποβλήτου.

Βιβλιογραφία

- Alburquerque, J.A., de la Fuente, C., Campoy, M., Carrasco, L., Nájera, I., Baixauli, C., Caravaca, F., Roldán, A., Cegarra, J., Bernal, M.P., 2012. Agricultural use of digestate for horticultural crop production and improvement of soil properties. *European Journal of Agronomy* 43, 119-128.
- Aminot, A., Rey, F., 2002. Standard procedure for the determination of chlorophyll a by spectroscopic methods.
- Arfi, R., Guiral, D., 1994. Chlorophyll budget in a productive tropical pond: algal production, sedimentation, and grazing by microzooplankton and rotifers. *Hydrobiologia* 272, 239-249.
- Bastidas, O., Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting.
- Béline, F., Martinez, J., Marol, C., Guiraud, G., 1998. Nitrogen transformations during anaerobically stored 15N-labelled pig slurry. *Bioresource Technology* 64, 83-88.
- Cavalli, D., Corti, M., Baronchelli, D., Bechini, L., Marino Gallina, P., 2017. CO₂ emissions and mineral nitrogen dynamics following application to soil of undigested liquid cattle manure and digestates. *Geoderma* 308, 26-35.
- de Godos, I., Arbib, Z., Lara, E., Rogalla, F., 2016. Evaluation of High Rate Algae Ponds for treatment of anaerobically digested wastewater: Effect of CO₂ addition and modification of dilution rate. *Bioresource Technology* 220, 253-261.
- Delgadillo-Mirquez, L., Lopes, F., Taidi, B., Pareau, D., 2016. Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnology Reports* 11, 18-26.
- Eriksson, L., Runevad, D., 2016. Evaluating digestate processing methods at Linköping biogas plant : A resource efficient perspective. p. 94.
- Haruvy, N., 1997. Agricultural reuse of wastewater: nation-wide cost-benefit analysis. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 66, 113-119.
- Huang, J., Yu, Z., Gao, H., Yan, X., Chang, J., Wang, C., Hu, J., Zhang, L., 2017. Chemical structures and characteristics of animal manures and composts during composting and assessment of maturity indices. *PLOS ONE* 12, e0178110.
- Jeffrey, S.W., Humphrey, G.F., 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 167, 191-194.
- Jia, H., Yuan, Q., 2016. Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and microalgae–bacteria consortia. *Cogent Environmental Science* 2.
- Koszel, M., Lorencowicz, E., 2015. Agricultural Use of Biogas Digestate as a Replacement Fertilizers. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 7, 119-124.
- Li, Y.-R., Tsai, W.-T., Hsu, Y.-C., Xie, M.-Z., Chen, J.-J., 2014. Comparison of Autotrophic and Mixotrophic Cultivation of Green Microalgal for Biodiesel Production. *Energy Procedia* 52, 371-376.
- Ma, H., Guo, Y., Qin, Y., Li, Y.-Y., 2018. Nutrient recovery technologies integrated with energy recovery by waste biomass anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 269, 520-531.
- Mahadevaswamy, M., V. Venkataraman, L., 1981. Microbial load in mass cultures of green algae *Scenedesmus acutus* and its processed powder.
- Maldaner, L., Wagner-Riddle, C., VanderZaag, A.C., Gordon, R., Duke, C., 2018. Methane emissions from storage of digestate at a dairy manure biogas facility. *Agricultural and Forest Meteorology* 258, 96-107.
- Mital, K.M., 1997. *Biogas Systems: Policies, Progress and Prospects*. 22.
- Montemezzani, V., 2017. *Zooplankton Dynamics in Wastewater Treatment High Rate Algal Ponds and development of effective control methods*. The University of Waikato, Hamilton, New Zealand.

- Ndegwa, P.M., Hristov, A.N., Arogo, J., Sheffield, R.E., 2008. A review of ammonia emission mitigation techniques for concentrated animal feeding operations. *Biosystems Engineering* 100, 453-469.
- Oenema, O., Tamminga, S., 2005. Nitrogen in global animal production and management options for improving nitrogen use efficiency. *Science in China. Series C, Life sciences* 48 Spec No, 871-887.
- Park, J.B.K., Craggs, R.J., Shilton, A.N., 2011. Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high rate algal pond. *Water Research* 45, 6637-6649.
- Seadi, T., Lukehurst, C., 2012. Quality Management of Digestate from Biogas Plants Used as Fertiliser.
- Sigurnjak, I., Vaneeckhaute, C., Michels, E., Ryckaert, B., Ghekiere, G., Tack, F.M.G., Meers, E., 2017. Fertilizer performance of liquid fraction of digestate as synthetic nitrogen substitute in silage maize cultivation for three consecutive years. *Science of The Total Environment* 599-600, 1885-1894.
- Sluiman, H., 2009. *Phycology* (4th edition). Robert Edward Lee.
- Stiles, W.A.V., Styles, D., Chapman, S.P., Esteves, S., Bywater, A., Melville, L., Silkina, A., Lupatsch, I., Grünewald, C.F., Lovitt, R., Chaloner, T., Bull, A., Morris, C., Llewellyn, C.A., 2018. Using microalgae in the circular economy to valorise anaerobic digestate: Challenges and Opportunities. *Bioresource Technology*.
- Strom, S.L., 1993. Production of pheopigments by marine protozoa: results of laboratory experiments analysed by HPLC. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 40, 57-80.
- T Lukehurst, C., Frost, P., Seadi, T., 2010. Utilisation of digestate from biogas plants as biofertiliser.
- Wang, H., Zhang, W., Chen, L., Wang, J., Liu, T., 2013. The contamination and control of biological pollutants in mass cultivation of microalgae. *Bioresource Technology* 128, 745-750.
- Wang, M., Keeley, R., Zalivina, N., Halfhide, T., Scott, K., Zhang, Q., van der Steen, P., Ergas, S.J., 2018. Advances in algal-prokaryotic wastewater treatment: A review of nitrogen transformations, reactor configurations and molecular tools. *Journal of Environmental Management* 217, 845-857.
- Zhan, J., Rong, J., Wang, Q., 2017. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *International Journal of Hydrogen Energy* 42, 8505-8517.
- Βερεσόγλου, Δ.Σ., 2002. *Οικολογία*. Έλλα, Λάρισα.
- Γκέλης, Σ., 2015. *Καλλιέργεια φυκών*.
- Edited by Amos, R., 2004. *Handbook of microalgal culture : biotechnology and applied phycology*. Oxford, OX, UK ; Ames, Iowa, USA : Blackwell Science, 2004.
- Θεριός, Ι.Ν., 2005. *Ανόργανη θρέψη και λιπάσματα*. Α.Δ. Γαρταγάνης, Θεσσαλονίκη.
- Κεραμίδης, Β., Σινάνης, Κ., 2004. *Εδαφολογία (Πανεπιστημιακές παραδόσεις)*. Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη.