



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*« Μελέτη της ανάπτυξης πράσινων μικροφυκών με
χρήση αποβλήτων τυροκομείων ως υπόστρωμα. »*

ΣΤΕΡΓΙΟΣ ΧΑΤΖΗΣΕΒΑΣΤΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΑΝΩΤΑΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2021



UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
LABORATORY OF BIOCHEMISTRY



BACHELOR THESIS

*« A study of the growth of green microalgae using
cheese-whey waste-waters as a substrate. »*

STERGIOS CHATZISEVASTOS

THESIS SUPERVISOR: DEMETRIOS GHANOTAKIS

HERAKLION 2021

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η ανάπτυξη ενός φωτοσυνθετικού μικροοργανισμού, του γένους *Chlorella*, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα, απόβλητα τυροκομείου από πρωτογενές στάδιο παραγωγής. Κύριο αντικείμενο της μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση της ικανότητας συγκεκριμένου στελέχους να χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές βιοαποκατάστασης υγρών απόβλητων τυροκομείου, με στόχο την παραγωγή βιομάζας και την ταυτόχρονη μείωση διαφόρων περιβαλλοντικών παραμέτρων από τα απόβλητα. Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται στα απόβλητα τυροκομείου. Παρόλα αυτά περιοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη των κυττάρων φάνηκε να ήταν η έλλειψη κάποιων θρεπτικών συστατικών, που είτε δεν υπήρχαν στα απόβλητα είτε δεν βρίσκονταν σε αφομοιώσιμη μορφή για το μικροβιακό μεταβολισμό. Έτσι, ο εμπλουτισμός των αποβλήτων με θρεπτικά συστατικά (φωσφορικά, αμμώνιο και ιχνοστοιχεία) κρίθηκε απαραίτητος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ενίσχυσε την παραγωγή βιομάζας από τα κύτταρα. Η μικτότροφη καλλιέργεια των κυττάρων, με περιεκτικότητα 50% σε πρωτογενές παστεριωμένο τυρόγαλα και με την προσθήκη ιχνοστοιχείων οδήγησε στις υψηλότερες τιμές κυτταρικής συγκέντρωσης και βιομάζας.

Οι καλλιέργειες των κυττάρων *Chlorella* πραγματοποιήθηκαν τόσο σε φωτοετερότροφες όσο και σε μικτότροφες συνθήκες, χρησιμοποιώντας ως βάση για το θρεπτικό μέσο απόβλητα τυροκομείου από το πρωτογενές στάδιο παραγωγής. Οι καλλιέργειες αφέθηκαν να αναπτυχθούν για χρονικό διάστημα μίας εβδομάδας και μετά το πέρας αυτού του διαστήματος εκτιμήθηκε μια σειρά σημαντικών παραμέτρων. Αυτές αφορούσαν το περιεχόμενο φωτοσυνθετικών χρωστικών, τη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση και την παραγωγή βιομάζας.

Βασικό συμπέρασμα της παρούσας εργασίας ήταν ότι οι συνθήκες που ευνόησαν την ανάπτυξη είχαν άμεση εξάρτηση από την συγκέντρωση και το είδος του τυρογάλακτος, την προσθήκη θρεπτικών συστατικών και το είδος της καλλιέργειας (μικτότροφη ή ετερότροφη). Αποδείχθηκε ότι οι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί μπορούν να προσαρμόζονται σε διαφορετικά περιβάλλοντα με ταυτόχρονη αύξηση της βιομάζας τους, προσφέροντας λύσεις στην παραγωγή τροφίμων και ενέργειας καθώς και στην διαχείριση λυμάτων. Τέλος, από τα αποτελέσματα που προέκυψαν κρίθηκε

απαραίτητο να συνεχιστεί η ερευνητική μελέτη πάνω σε αυτό το πεδίο, για την εξαγωγή περαιτέρω συμπερασμάτων.

Λέξεις κλειδιά: *Chlorella*, καλλιέργεια, ανάπτυξη, βιοαποκατάσταση, απόβλητα τυροκομείου (τυρόγαλα).

ABSTRACT

In the present work, the growth of a photosynthetic microorganism strain of the genus *Chlorella*, was investigated by using as substrate dairy waste from the primary stage of production. The objective of this work was to investigate the ability of this particular strain in bioremediation applications regarding liquid dairy waste. The target was dual, biomass production and simultaneous decrease of various environmental parameters from the waste-waters. It was observed that microalgae had the ability to grow in dairy waste-waters. However, a limiting factor for cell growth appeared to be the lack of some nutrients, which were either absent in the waste or present in unassimilable form by microbial metabolism. Thus, the enrichment of the waste-waters with nutrients (phosphates, ammonium and trace elements) was also investigated. It was shown that enrichment with nutrients enhanced the production of biomass by the cells. The mixotrophic culture of the cells, with a content of 50% in primary pasteurized whey and with the addition of trace elements led to the highest values of cell concentration and biomass.

Chlorella cells were cultured under both heterotrophic and mixotrophic conditions, using as a medium cheese-dairy wastewaters from the primary stage of production. The cultures were allowed to grow for a period of one week. After this period several important parameters were evaluated. These included the evaluation of the content of photosynthetic pigments, maximum photosynthetic efficiency and biomass production.

The main conclusion of the present research was that the conditions that favored the growth were directly dependent on the concentration and type of whey, the addition of nutrients and the type of culture (mixotrophic or heterotrophic). It was shown that photosynthetic microorganisms can adapt to different experimental conditions that cause stress, with the ability of simultaneous increase of their biomass. These characteristics provide a perspective for the development of several application regarding food and energy production as well as waste-water management.

Keywords: *Chlorella* sp., cultivation, growth, bioremediation, dairy waste waters (whey).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	3
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1. Απόβλητα Τυροκομείου – Γαλακτοκομικά Απόβλητα	9
<i>1.1.1. Απόβλητα τυροκομείου: χημική σύσταση, παράμετροι & κατηγορίες</i>	9
<i>1.1.2. Εντροπισμός</i>	11
1.2. Εισαγωγή στην βιοαποκατάσταση	12
1.3. Μικροφύκη	13
<i>1.3.1. Κατηγορίες μικροφυκών – Αξιοποίηση τους στην βιοαποκατάσταση</i>	13
<i>1.3.2. Φωτοσύνθεση</i>	15
<i>1.3.3. Συνθήκες και φάσεις ανάπτυξης φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών</i>	17
<i>1.3.4. Το γένος Chlorella – Εφαρμογές μικροοργανισμού</i>	19
1.4. Σκοπός	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	24
2.1. Συνθήκες ανάπτυξης φωτοσυνθετικού μικροοργανισμού	24
2.2. Προετοιμασία αποβλήτων τυροκομείου	25
2.3. Παρασκευή πειραματικών καλλιεργείων	26
2.4. Πειραματικές συνθήκες που μελετήθηκαν	27
<i>2.4.1. Πειράματα με πρωτογενές Δ₁ παστεριωμένο τυρόγαλα</i>	27
<i>2.4.2. Πειράματα με πρωτογενές Δ₂ απαστερίωτο τυρόγαλα</i>	28
2.5. Μετρήσεις κυτταρικής ανάπτυξης	29
<i>2.5.1. Όγκος καθιζάμενων κυττάρων (Packed Cell Volume, PCV)</i>	29
<i>2.5.2. Ξηρή βιομάζα κυττάρων (Dry Cell Weight, DCW)</i>	30
2.6. Εκχύλιση και ποσοτικοποίηση φωτοσυνθετικών χρωστικών	30
2.7. Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού	32
<i>2.7.1. Αρχή της μεθόδου – Φθορισμός χλωροφύλλης</i>	32
<i>2.7.2. Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού σε δείγματα καλλιεργείων</i>	33
2.8. Πολαρογραφικός προσδιορισμός ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής O₂	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	37
3.1. Μετρήσεις κυτταρικής ανάπτυξης	37
<i>3.1.1. Όγκος καθιζάμενων κυττάρων (Packed Cell Volume, PCV)</i>	37
<i>3.1.2. Ξηρή βιομάζα κυττάρων (Dry Cell Weight, DCW)</i>	43

3.2. Μετρήσεις pH	46
3.3. Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού	49
3.4. Αποτελέσματα συγκεντρώσεων φωτοσυνθετικών χρωστικών	52
3.5. Αποτελέσματα ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής O ₂	57
3.6. Συζήτηση αποτελεσμάτων	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	64
URL LINKS	66
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	67

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

BOD:	Βιοχημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (Biochemical Oxygen Demand)
C_a:	Συγκέντρωση χλωροφύλλης-a
C_b:	Συγκέντρωση χλωροφύλλης-b
Ch_{la}:	Χλωροφύλλη-a
COD:	Χημικώς Απαιτούμενο Οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand)
C_{x+c}:	Συγκέντρωση ολικών καροτενίων και ξανθοφυλλών
DCW:	Ξηρή βιομάζα κυττάρων (Dry Cell Weight)
DO	Διαλυμένο Οξυγόνο (Dissolved Oxygen)
DWW:	Γαλακτοκομικά απόβλητα – Απόβλητα τυροκομείου (Dairy Waste Waters)
F_{max}:	Μέγιστη εκπομπή φθορισμού
F₀:	Εκπομπή φθορισμού τη χρονική στιγμή t=0
F_v /F_{max}	Μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση
F_v:	F _{max} - F ₀
PCV:	Όγκος καθιζαμένων κυττάρων ανά mL καλλιέργειας
t:	Χρόνος σε ημέρες
TAP:	Θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη μικροφυκών (Tris-Acetate-Phosphate)
TDS	Συνολική ποσότητα διαλυμένων στερεών (Total Dissolved Solids)
TN	Συνολική ποσότητα αζώτου (Total Nitrogen)
TP	Συνολική ποσότητα φωσφόρου (Total Phosphorus)
TSS	Συνολική ποσότητα αιωρούμενων στερεών (Total Suspended Solids)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Απόβλητα Τυροκομείου – Γαλακτοκομικά Απόβλητα

1.1.1. Απόβλητα τυροκομείου: χημική σύσταση, παράμετροι & κατηγορίες

Η βιομηχανία των γαλακτοκομικών αποτελεί έναν από τους μεγαλύτερους τομείς στην επεξεργασία τροφίμων, παγκοσμίως. Τα υγρά απόβλητα των τυροκομείων (Dairy Wastewaters), που προκύπτουν από τις διαδικασίες επεξεργασίας του γάλατος και των παραγώγων του, περιέχουν ένα πλήθος ενώσεων, τόσο οργανικών όσο και ανόργανων, όπως λακτόζη, λιπαρά, πρωτεΐνες, ενώσεις φωσφόρου, αζώτου και θείου αλλά και θρεπτικά συστατικά, όπως μέταλλα και βιταμίνες [1, 2].

Τα απόβλητα τυροκομείου αξιολογούνται ως προς κάποιες παραμέτρους, οι οποίες έχουν μεγάλη περιβαλλοντική σημασία. Ανάλογα με την εποχή και την επεξεργασία του γάλατος, ο χαρακτηρισμός των αποβλήτων ποικίλει. Η πρώτη σημαντική παράμετρος είναι το pH, που κυμαίνεται από 4,7-11 [1]. Το χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand, COD), αναφέρεται στην βιβλιογραφία ως η ποσότητα του οξυγόνου που απαιτείται για την πλήρη οξείδωση όλου του οργανικού φορτίου που περιέχεται σε ένα δείγμα. Από την άλλη μεριά, το βιολογικώς απαιτούμενο οξυγόνο (Biological Oxygen Demand, BOD) αναφέρεται στο οξυγόνο που χρειάζονται διάφοροι μικροοργανισμοί, ώστε να βιοαποικοδομήσουν το οργανικό φορτίο σε ένα συγκεκριμένο δείγμα αποβλήτων [3]. Οι τιμές των COD και BOD κυμαίνονται στα 80.000-95.000 mg/L και 40.000-48.000 mg/L, αντίστοιχα. Μεταξύ των κύριων συστατικών του τυρογάλακτος, ο δισακχαρίτης λακτόζη, ο οποίος κατά την υδρόλυσή του δίνει γλυκόζη και γαλακτόζη, είναι υπεύθυνος για τις υψηλές τιμές BOD (30000-50000 mg/L) και COD (60000-80000 mg/L) [4]. Όσο αφορά το ολικό άζωτο (Total Nitrogen, TN), που συναντάται με την μορφή νιτρικών, νιτρωδών και αμμωνιακών ιόντων, υπολογίζεται μεταξύ 14-839 mg/L, ενώ του ολικού φωσφόρου (Total Phosphorus, TP) μεταξύ 9-280 mg/L [1]. Το διαλυμένο οξυγόνο (Dissolved Oxygen, DO) είναι μια εξίσου σημαντική παράμετρος, αφού απαιτείται κυρίως για την αναπνοή των αερόβιων μικροοργανισμών. Η παρουσία του οξυγόνου σε διαλυτή μορφή μέσα στα απόβλητα εξαρτάται από την θερμοκρασία, την σχετική πίεση, την ύπαρξη στερεών ουσιών και την αλατότητα. Αν και το μεγαλύτερο μέρος των αποβλήτων είναι νερό και μόνο ένα ποσοστό της τάξης του 0,1% στερεά, στη βιβλιογραφία συναντώνται διάφορες κατηγοριοποιήσεις για τις ενώσεις αυτές, με τις

κυριότερες να είναι τα ολικά αιωρούμενα στερεά (Total Suspended Solids, TSS) και τα ολικά διαλυτοποιημένα στερεά (Total Dissolved Solids, TDS) [5]. Η συγκέντρωση των μακρο- και των μικρο- συστατικών, όπως το K, Na, Cl, Mg, Ca, Co, Fe, Mn και Ni, μπορεί να είναι πολύ υψηλή στα γαλακτοκομικά απόβλητα [1, 6].

Η επεξεργασία και η εκμετάλλευση του ορού γάλακτος ξεκίνησε στην Ελλάδα το 1998. Μέχρι τότε, ο ορός (whey) θεωρούνταν μόνο ως απόβλητο από την παραγωγή τυριού. Η Ελλάδα είναι μια χώρα όπου τα διάφορα είδη τυριών παράγονται και καταναλώνονται με πολύ υψηλό ρυθμό [7]. Η βιομηχανία γάλακτος ασχολείται με την επεξεργασία του νοπού γάλακτος σε προϊόντα όπως φρέσκο υγρό γάλα, παστεριωμένο, αποστειρωμένο, ομογενοποιημένο, κρέμα γάλακτος, αποξηραμένο (σε σκόνη) ή συμπυκνωμένο γάλα, βούτυρο, γιαούρτι, τυρί και άλλα πολλά. Οι βασικές αρχές της διαδικασίας παρασκευής τυριών είναι κοινές. Ωστόσο, υπάρχουν πολλές παραλλαγές σε όλα τα στάδια της διαδικασίας, με αποτέλεσμα την παραγωγή πολλών διαφορετικών ποικιλιών, ακόμα και από το ίδιο εργοστάσιο. Το τυρί παράγεται με πήξη των πρωτεϊνών του γάλατος, δηλαδή των καζεϊνών, με τρόπο που παγιδεύονται οι στερεές ενώσεις και το λίπος. Το γάλα αναμιγνύεται με μια αρχική καλλιέργεια βακτηρίων και με κατάλληλα ένζυμα, τα οποία καταλύουν την πήξη του [8, 9]. Η διαδικασία μπορεί να επιτευχθεί και με θέρμανση για την μετουσίωση και πήξη των πρωτεϊνών [7]. Η απόδοση του τυριού είναι περίπου 10%, με το υπόλοιπο 90% να είναι ένα υγρό υποπροϊόν που ονομάζεται «ορός γάλακτος». Πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι ο ορός γάλακτος μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω για την παραγωγή λευκών τυριών π.χ. για μανούρι, ανθότυρο, μυζήθρα και γκίτσα. Επίσης χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή ή για παραγωγή πρωτεϊνών. Έτσι, ο ορός «πρωτογενή απόβλητα τυροκομείου» χρησιμοποιείται κυρίως για την περιγραφή του ορού γάλακτος (whey) που προκύπτει κατά την παραγωγή τυριού από νοπό γάλα, ενώ ο ορός «δευτερογενή απόβλητα τυροκομείου» αναφέρεται σε ορό γάλακτος που προκύπτει μετά την παραγωγή λευκών τυριών [8, 10]. Τόσο τα πρωτογενή όσο και τα δευτερογενή απόβλητα τυροκομείου χαρακτηρίζονται από υψηλή θρεπτική περιεκτικότητα (λακτόζη, διαλυτές πρωτεΐνες, λίπη κ.λπ.) και άλλα συστατικά όπως κιτρικό οξύ, γαλακτικό οξύ, βιταμίνες κ.λπ. [11].

Στην βιβλιογραφία, υπάρχει ακόμα μία κατηγοριοποίηση των αποβλήτων τυροκομείου, σε «γλυκός ορός γάλακτος» και «όξινο ορός γάλακτος», ανάλογα με το είδος των βακτηρίων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του τυριού [9, 12] ή ανάλογα με την χρήση οξέος (για τον «όξινο ορό») και ενζύμων (για τον «γλυκό ορό») για την πήξη των καζεϊνών [13].

Σε διεθνές επίπεδο, τα απόβλητα τυροκομείου χρησιμοποιούνται είτε για τη βιομηχανική παραγωγή άλλων ειδών τυριού (π.χ. λευκά τυριά) είτε για την εμπορική παραγωγή άλλων προϊόντων που προέρχονται από ορό γάλακτος (π.χ. σκόνη ορού γάλακτος με γλυκό οξύ, ορός γάλακτος με μειωμένη λακτόζη κ.α.) Εκτός από αυτές τις καθιερωμένες πρακτικές, το τυρόγαλα, όπως ονομάζεται αλλιώς, μπορεί να υποστεί επεξεργασία για την παραγωγή πολύτιμων φαρμακευτικών προϊόντων καθώς και ενέργειας [8].

1.1.2. Ευτροφισμός

Η απόρριψη των αποβλήτων στα υδάτινα και χερσαία οικοσυστήματα μπορεί να οδηγήσει σε πολλά περιβαλλοντικά προβλήματα. Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα είναι και ο ευτροφισμός. Ο ευτροφισμός μπορεί να οριστεί ως η διαδικασία αλλαγής της «θρεπτικής κατάστασης» των νερών με την προσθήκη υπερβολικής ποσότητας επιπλέον θρεπτικών συστατικών. Στις περισσότερες περιπτώσεις ο ευτροφισμός συνδέεται με ανθρώπινες δραστηριότητες, παρόλα αυτά μπορεί να προκύψει και φυσικά λόγω των ιδιαίτερων συνθηκών που επικρατούν σε κάποιες περιοχές [14]. Τα απόβλητα τυροκομείου, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, περιέχουν σημαντικές ποσότητες αζώτου, φωσφόρου και ιχνοστοιχείων, με αποτέλεσμα να οδηγούν στον ευτροφισμό των φυσικών νερών και να διαταράσσουν την ισορροπία του οικοσυστήματος [1]. Το αποτέλεσμα του φαινομένου αυτού, από όπου και αν προέρχεται, είναι η αύξηση της φυτικής βιομάζας εις βάρος άλλων οργανισμών, φυτικών ή ζωικών. Η υπέρμετρη ανάπτυξη φυτοσυνθετικών μικροοργανισμών ευνοεί την ανάπτυξη βακτηρίων. Έπειτα, τα βακτήρια που αναπτύσσονται παρουσία αποβλήτων καταναλώνουν σημαντικές ποσότητες οξυγόνου, με συνέπεια οι ανώτεροι οργανισμοί να αδυνατούν να επιβιώσουν.

Το άζωτο είναι ζωτικής σημασίας για όλους τους οργανισμούς, αφού χρησιμοποιείται για την παρασκευή πρωτεϊνών, για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή. Παρόλα αυτά, σε αυξημένες ποσότητες μειώνει το διαλυμένο οξυγόνο (Dissolved Oxygen, DO) στα φυσικά ύδατα με αρνητικές συνέπειες κυρίως στους θαλάσσιους οργανισμούς (ψάρια). Με την υπερσυσσώρευση των θρεπτικών συστατικών περιορίζεται και η δυνατότητα αξιοποίησης των φυσικών υδάτων, ενώ μπορούν να δημιουργηθούν ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων (στα ύδατα) [5]. Λύση για το πρόβλημα αυτό αποτελεί η κατάλληλη

επεξεργασία των αποβλήτων και λυμάτων, πριν αυτά καταλήξουν στα φυσικά ύδατα. Οι διαδικασίες αυτές συμβάλλουν στην μείωση του ρίσκου της δημόσιας υγείας και του περιβάλλοντος [5, 15].

1.2. Εισαγωγή στην βιοαποκατάσταση

Η ρύπανση των εδαφών, των υπόγειων και επιφανειακών υδάτων και του αέρα με επικίνδυνες και τοξικές χημικές ουσίες είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που αντιμετωπίζει ο πλανήτης. Η ανάγκη προστασίας του περιβάλλοντος, από τις διάφορες μορφές μόλυνσης, οδήγησε στην ανάπτυξη νέων τεχνολογιών που στοχεύουν στην μείωση της συγκέντρωσης των ρύπων και όχι στη συμβατική προσέγγιση της απόρριψης. Η βιολογική αποκατάσταση ή βιοαποκατάσταση συγκαταλέγεται μεταξύ αυτών των νέων τεχνολογιών [16].

Ως βιοαποκατάσταση (bioremediation) ορίζεται η διαδικασία κατά την οποία ζωντανοί οργανισμοί ή/και ένζυμα αυτών χρησιμοποιούνται για την μετατροπή ξενοβιοτικών ουσιών σε λιγότερο τοξικές μορφές [17]. Το αποτέλεσμα και ο στόχος της βιοαποκατάστασης είναι το περιβάλλον να επανέλθει στην αρχική του ισορροπία απαλλαγμένο από αυτές τις ουσίες ή τουλάχιστον η τιμή των ουσιών αυτών να μειωθεί κάτω από τα επιτρεπτά όρια που ορίζουν οι αρμόδιες αρχές [17]. Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οδηγό για την Επεξεργασία Αστικών Λυμάτων, τουλάχιστον το 75% του συνολικού αζώτου και του φωσφόρου θα πρέπει να απομακρύνεται από τα λύματα προτού αυτά απορριφθούν στο περιβάλλον [18].

Μια διεργασία βιοαποκατάστασης βασίζεται στις δραστηριότητες αερόβιων ή αναερόβιων ετεροτροφικών μικροοργανισμών. Έχει αναφερθεί ότι πολλοί μικροοργανισμοί είναι σε θέση να αποικοδομήσουν διαφορετικούς ρύπους [19]. Συνήθως χρησιμοποιούνται στελέχη από βακτήρια ή μύκητες, αν και τα τελευταία χρόνια πολύ συνηθισμένη είναι και η χρήση των μικροφυκών [2]. Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται μακροφύκη, μικροφύκη και κυανοβακτήρια, τότε η διαδικασία ονομάζεται φυκοαποκατάσταση και φέρει το σημαντικό πλεονέκτημα ότι η απομάκρυνση θρεπτικών συστατικών ή ξενοβιοτικών ουσιών συνδυάζεται με την καθήλωση του CO₂ από την ατμόσφαιρα [20]. Επιπλέον, το παραγόμενο O₂ συμβάλει στην περαιτέρω κατεργασία των λυμάτων [21]. Οι μικροοργανισμοί πρέπει να έχουν τις κατάλληλες φυσιολογικές και μεταβολικές ικανότητες να αποικοδομούν τους ρύπους. Η μικροβιακή δραστηριότητα επηρεάζεται από μια σειρά φυσικοχημικών

περιβαλλοντικών παραμέτρων. Οι παράγοντες που επηρεάζουν άμεσα τη βιοαποκατάσταση είναι οι εναλλακτικές πηγές ενέργειας, οι κατάλληλοι δέκτες ηλεκτρονίων, τα θρεπτικά συστατικά, το pH, η θερμοκρασία και διάφορα ανασταλτικά υποστρώματα ή μεταβολίτες [16].

Η βιοαποκατάσταση έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές και τις χημικές τεχνικές αποκατάστασης [17, 22]. Αρχικά, είναι φιλική προς το περιβάλλον, μη επεμβατική (σε πολλές περιπτώσεις) και οικονομικά βιώσιμη. Αποτελεί μια φυσική διαδικασία όπου ο μικροβιακός πληθυσμός μεταβολίζει τους ρύπους, με σκοπό την απομάκρυνσή τους από το περιβάλλον. Επίσης, η διαδικασία μπορεί να λάβει χώρα *in situ*, εμφανίζοντας μειωμένο κόστος σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους της χημικής αποκατάστασης όπου απαιτείται και η μεταφορά του μολυσμένου χώματος ή άντληση των μολυσμένων υδάτων σε ειδικές εγκαταστάσεις (*ex situ*) [16]. Τέλος, η αντικατάσταση των ορυκτών καυσίμων (π.χ. πετρέλαιο) με βιοντίζελ και άλλα βιοκαύσιμα από μικροφύκη, τα οποία είναι καθαρά και ανανεώσιμα καύσιμα, μπορούν να μειώσουν την εκπομπή CO₂ και την υπερθέρμανση του πλανήτη [1]. Αντίθετα, στα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι ορισμένες χημικές ουσίες δεν επιδέχονται βιοαποικοδόμηση (π.χ. βαρέα μέταλλα, ραδιονουκλίδια και μερικές χλωριωμένες ενώσεις). Σε ορισμένες περιπτώσεις, ο μικροβιακός μεταβολισμός των μολυσματικών ουσιών μπορεί να παράγει και τοξικούς μεταβολίτες. Η βιοαποκατάσταση είναι μια διαδικασία η οποία πρέπει να προσαρμόζεται στις συγκεκριμένες συνθήκες του τόπου, πράγμα που σημαίνει ότι πρέπει να πραγματοποιηθούν μελέτες σε μικρή κλίμακα πριν από τον πραγματικό καθαρισμό των τοποθεσιών [16]. Τέλος, απαιτεί την ύπαρξη κατάλληλων περιβαλλοντικών συνθηκών και κάποιες φορές μεγάλη χρονική περίοδο για να επιτευχθεί [17].

1.3. Μικροφύκη

1.3.1. Κατηγορίες μικροφυκών – Αξιοποίηση τους στην βιοαποκατάσταση

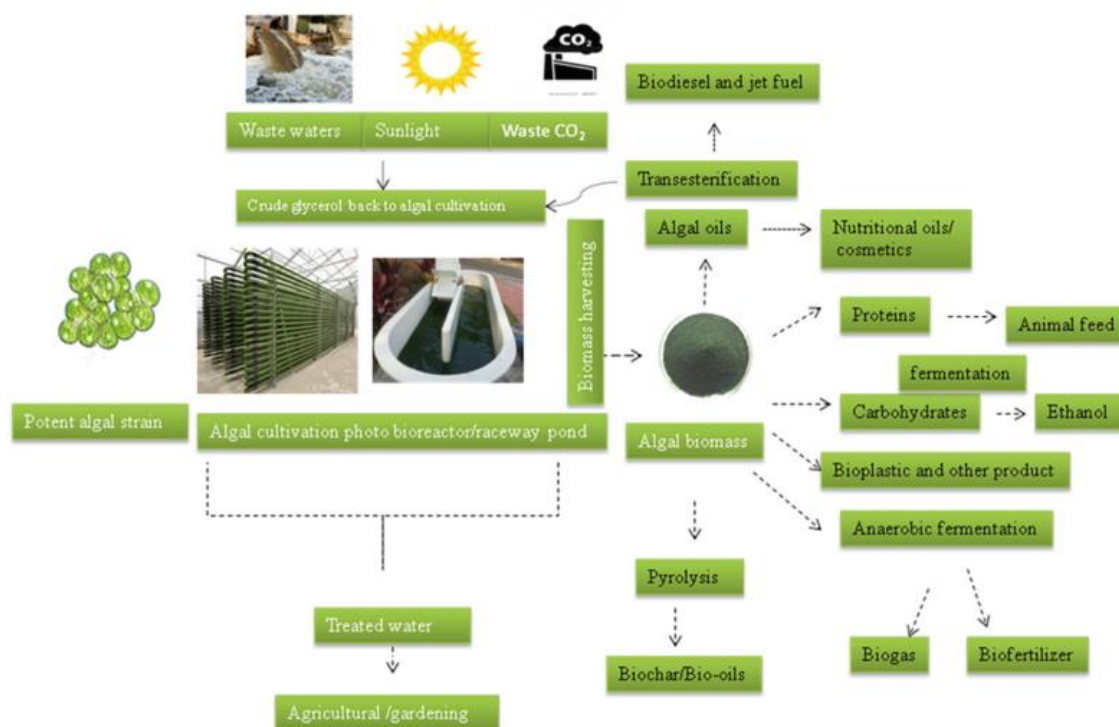
Ο όρος «μικροφύκη» συμπεριλαμβάνει τόσο τα κυανοβακτήρια όσο και τα μονοκύτταρα πράσινα φύκη [23]. Τα μικροφύκη είναι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί. Τα τελευταία χρόνια προσελκύουν πολύ ενδιαφέρον, για τη χρήση της βιομάζας τους και για μια σειρά εμπορικών εφαρμογών όπως η παραγωγή πρώτων υλών, τροφίμων, λιπασμάτων, φαρμακευτικών και καλλυντικών προϊόντων. Τα μικροφύκη αποτελούν μια πλούσια πηγή πρωτεϊνών, λιπιδίων, υδατανθράκων και

φυσικών χρωστικών, όπως καροτενοειδή, ενώ περιέχουν και μια ποικιλία φυσικών οργανικών μορίων υψηλής αξίας [24]. Η βιοχημική τους σύσταση, αλλά και το ποιοτικό και ποσοτικό περιεχόμενο των μεταβολιτών τους, μπορεί να επηρεαστεί από τις συνθήκες στις οποίες αναπτύσσονται (π.χ. φωτεινότητα [18], θερμοκρασία, αλατότητα, διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών) καθώς και από βιοτικούς παράγοντες [25]. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα που διαθέτουν, λόγω του φωτοσυνθετικού τους μηχανισμού, είναι η υψηλή δέσμευση του CO₂ της ατμόσφαιρας, με αποτέλεσμα να σημειώνονται μεγαλύτεροι ρυθμοί ανάπτυξης [24].

Οι κυριότερες διαιρέσεις μικροφυκών είναι τα χλωρόφυτα, τα ερυθροφύκη και τα απτόφυτα. Οι κλάσεις της διαίρεσης «χλωρόφυτα» μπορούν να βρεθούν σε γλυκά και αλμυρά ύδατα ή ακόμα και σε επίγεια περιβάλλοντα. Περιλαμβάνουν μονοκύτταρους και πολυκύτταρους οργανισμούς που περιέχουν χλωροφύλλες a και b στους χλωροπλάστες τους. Κυριότεροι εκπρόσωποι των μονοκύτταρων χλωρόφυτων είναι τα γένη *Chlamydomonas*, *Chlorella* και *Scenedesmus*, που ανήκουν στην κλάση των χλωροφυκών [26]. Τα «ερυθροφύκη» είναι κυρίως θαλάσσια πολυκύτταρα είδη, ενώ σπανιότερα συναντώνται είδη του γλυκού νερού ή μονοκύτταρα. Τα κύτταρα είναι σφαιρικά με έναν κεντρικό πυρήνα και περιέχουν ένα μεγάλο κόκκινο χλωροπλάστη [27]. Τα «απτόφυτα» είναι κυρίως μονοκύτταροι οργανισμοί. Τα περισσότερα είδη αναπτύσσονται σε αλμυρά ύδατα. Όλα τα απτόφυτα περιέχουν χλωροπλάστες και ένα πυρήνα με πυρηνικό φάκελο [28].

Τα μικροφύκη είναι μικροοργανισμοί που μπορούν να προσαρμόζονται και να αναπτύσσονται πολύ εύκολα σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Έχει αναφερθεί ότι η προσαρμογή των φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών σε μολυσμένα περιβάλλοντα (π.χ. με ζιζανιοκτόνα, αντιβιοτικά, βαρέα μέταλλα, κ.λπ.), προκύπτει από μεταλλάξεις που πραγματοποιούνται ως αποτέλεσμα της φυσικής επιλογής. Αυτοί οι μικροοργανισμοί εμφανίζουν χαρακτηριστικά που τους επιτρέπουν να επιβιώνουν σε αυτά τα περιβάλλοντα [29]. Ο συνδυασμός της αποκατάστασης λυμάτων με την παραγωγή βιομάζας φυκών είναι πιθανότατα ένας από τους πιο οικονομικά και περιβαλλοντικά βιώσιμους τρόπους παραγωγής βιοενέργειας και βιολογικών προϊόντων, καθώς τα λύματα αποτελούν πηγή όχι μόνο νερού αλλά και απαραίτητων θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αυτών [6, 22, 30]. Οι υδατάνθρακες, που παράγονται κατά την φωτοσύνθεση, μετατρέπονται σε λιπίδια, τα οποία στην συνέχεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοντίζελ. Η αντίδραση που πραγματοποιείται για την μετατροπή των λιπιδίων σε βιοντίζελ

ονομάζεται «μετεστεροποίηση» [31]. Έτσι, το βιοντίζελ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φιλικό προς το περιβάλλον καύσιμο, στην παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας και μπορεί να ικανοποιήσει τις ενεργειακές απαιτήσεις του πλανήτη [21]. Ταυτόχρονα με την ανάπτυξη βιομάζας και την παραγωγή βιοντίζελ, παρατηρείται και η επιθυμητή απομάκρυνση των θρεπτικών συστατικών από τα απόβλητα, τα οποία ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για το φαινόμενο του ευτροφισμού [6, 32].

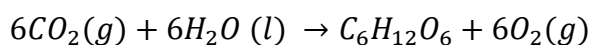


Εικόνα 1: Αξιοποίηση μικροφυκών σε δοκιμασίες βιοαποκατάστασης αποβλήτων για παραγωγή χρήσιμων προϊόντων, όπως συμπληρώματα διατροφής, τροφές ζώων, καλλυντικά, φάρμακα, λιπάσματα κ.α.. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [21].

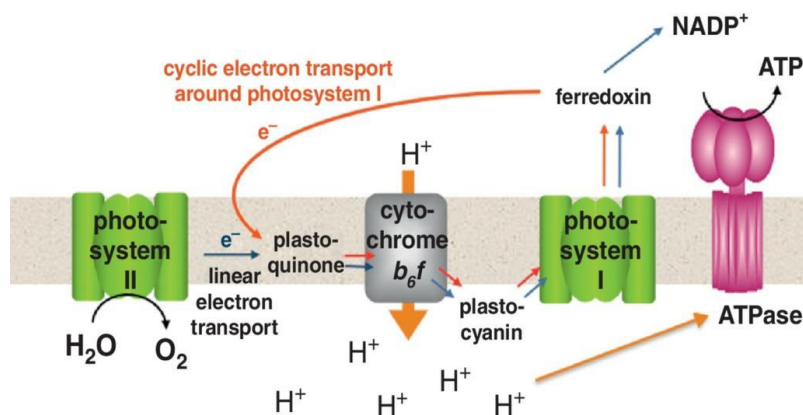
1.3.2. Φωτοσύνθεση

Φωτοσύνθεση είναι η διαδικασία μετατροπής της φωτεινής ενέργειας σε χημική. Με την φωτοσύνθεση χρησιμοποιείται η ηλιακή ενέργεια για τη διάσπαση του νερού και την καθήλωση του διοξειδίου του άνθρακα, παράγοντας οξυγόνο και γλυκόζη. Η φωτοχημική αντίδραση της φωτοσύνθεσης δεν μπορεί να συμβεί χωρίς την παρουσία χλωροφύλλης, η οποία είναι και η ένωση που απορροφά την ακτινοβολία του ήλιου. Η συνολική διαδικασία της φωτοσύνθεσης είναι μια σειρά πολύπλοκων αντιδράσεων, η οποία μπορεί να απλουστευθεί σαν μια διαδικασία δύο σταδίων. Σε

πρώτη φάση, συμβαίνει η διαδικασία που εξαρτάται από την φωτεινή ακτινοβολία (φωτοχημικές ή φωτεινές αντιδράσεις) και στην δεύτερη πραγματοποιούνται οι «σκοτεινές» ή φωτοανεξάρτητες αντιδράσεις. Η συνολική αντίδραση είναι η εξής [33]:

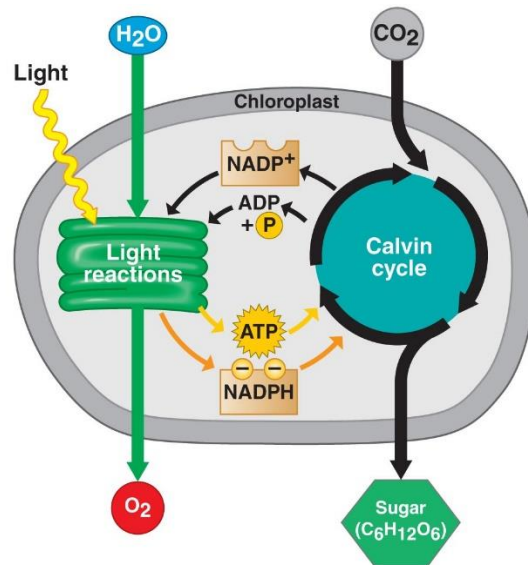


Η διαδικασία της φωτοσύνθεσης στα μικροφύκη και στα φυτά συμβαίνει στις θυλακοειδείς μεμβράνες των χλωροπλαστών τους. Μετά την απορρόφηση των φωτονίων από τις χρωστικές που βρίσκονται στα θυλακοειδή, η ενέργεια μεταφέρεται στα κέντρα αντίδρασης των φωτοσυστημάτων I και II. Οι κυριότερες χρωστικές που χρησιμοποιούνται για την δέσμευση της ηλιακής ακτινοβολίας είναι η χλωροφύλλη-a, η χλωροφύλλη-b, τα καροτενοειδή και οι ξανθοφύλλες. Τα ηλεκτρόνια που προέρχονται από τη διάσπαση του νερού, με την ταυτόχρονη παραγωγή O₂, μεταφέρονται κατά μήκος μιας αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, από το φωτοσύστημα II προς το φωτοσύστημα I. Τα NADPH (μορφή αναγωγικής ισχύος) και ATP (μορφή χημικής ενέργειας) που παράγονται σε αυτήν τη διαδικασία χρησιμοποιούνται σε επόμενο στάδιο. Δεδομένου ότι αυτές οι δύο αντιδράσεις εξαρτώνται από την ηλιακή ενέργεια, ονομάζονται «φωτεινές αντιδράσεις».



Εικόνα 2: Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στις θυλακοειδείς μεμβράνες των χλωροπλαστών, μέσω φωτοσυστήματος II και I. Παραγωγή O₂, NADPH και ATP. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή ^{VI}.

Στη συνέχεια τα μόρια ATP και NADPH μέσω ενζυμικής δράσης ανάγουν το ανόργανο CO₂ και το μετατρέπουν σε 3-φωσφογλυκερικό μέσω μιας σειράς αντιδράσεων γνωστών ως *κύκλος του Calvin*. Περαιτέρω αντιδράσεις οδηγούν στον σχηματισμό υδατανθράκων (γλυκόζη) και άλλων οργανικών ενώσεων. Αυτές οι διαδικασίες μπορούν να πραγματοποιηθούν και απουσία φωτός αναφερόμενες ως «σκοτεινές αντιδράσεις» της φωτοσύνθεσης [34].



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση των φωτεινών και σκοτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή ^{VI}.

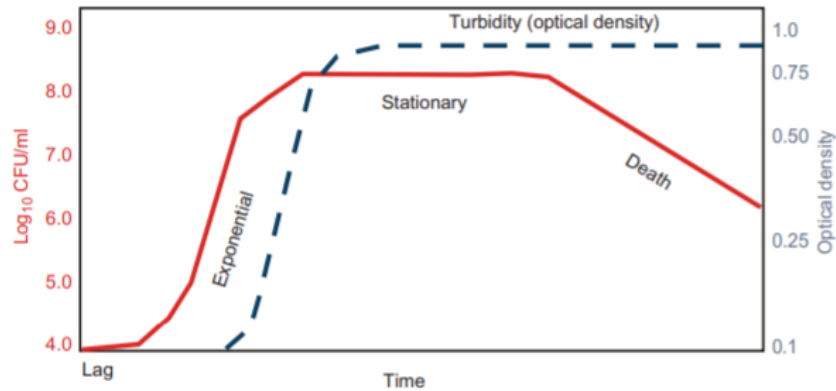
1.3.3. Συνθήκες και φάσεις ανάπτυξης φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών

Όταν μελετάμε συστήματα καλλιεργειών μικροοργανισμών στο εργαστήριο είναι πολύ σημαντικό να γνωρίζουμε τις ενεργειακές απαιτήσεις του κάθε συστήματος ώστε να προετοιμαστούν κατάλληλα θρεπτικά μέσα και οι καλλιέργειες να πραγματοποιηθούν στις κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. θερμοκρασία, φωτισμός, υγρασία κ.α.). Για αυτό τον σκοπό, είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε τους τρόπους με τους οποίους μπορούν να αναπτυχθούν οι μικροοργανισμοί αλλά και τις φάσεις στις καμπύλες ανάπτυξής τους.

Τα μικροφύκη, όπως το στέλεχος του γένους *Chlorella* που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη διπλωματική εργασία, μπορούν να αναπτυχθούν με τρεις διαφορετικούς τρόπους. Ο πρώτος τρόπος ανάπτυξης, που είναι και χαρακτηριστικό όλων των φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών, χαρακτηρίζεται ως **αυτότροφος**. Παράδειγμα αυτότροφων οργανισμών αποτελούν τα χερσαία φυτά. Αυτά χρησιμοποιούν ανόργανα συστατικά, όπως το CO₂ της ατμόσφαιρας και το H₂O από το έδαφος, αλλά και την ηλιακή ενέργεια και θρεπτικά συστατικά του εδάφους, ώστε να παράγουν O₂ και οργανικές ενώσεις (γλυκόζη) [1]. Έτσι, κατά την διαδικασία αυτή μετατρέπουν την ηλιακή ενέργεια σε χημική [24]. Πρακτικά σε εργαστηριακή κλίμακα, η αυτότροφη ανάπτυξη μπορεί να επιτευχθεί παρέχοντας συνεχώς ατμοσφαιρικό αέρα (ως πηγή CO₂) στην καλλιέργεια και ακτινοβολία με κατάλληλες λάμπες ως φωτεινή πηγή. Ο

δεύτερος τρόπος ανάπτυξης αυτών των οργανισμών είναι η **ετερότροφη** ανάπτυξη, κατά την οποία αξιοποιείται η φωτεινή ενέργεια, αλλά το διοξείδιο του άνθρακα δεν επαρκεί ως βασική ή κύρια πηγή άνθρακα. Οι οργανισμοί που χαρακτηρίζονται ως ετερότροφοι έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν ορισμένες πηγές διαλυμένου οργανικού άνθρακα, όπως οξικό ανιόν, γλυκερόλη ή απλά σάκχαρα (γλυκόζη, λακτόζη κ.α.), για την αύξηση της βιομάζας τους [35]. Τέλος, υπάρχει και ένας τρίτος τρόπος ανάπτυξης, ο **μικτότροφος**. Η μικτότροφη ανάπτυξη βρίσκεται ανάμεσα στις προηγούμενες δύο (αυτότροφη και ετερότροφη) και χαρακτηρίζεται, τόσο από την διαδικασία της φωτοσύνθεσης, καθώς στην περίπτωση αυτή υπάρχει επάρκεια διοξειδίου του άνθρακα, όσο και από την χρήση οργανικού υποστρώματος για την αύξηση της βιομάζας. Έτσι, ο μικροοργανισμός χρησιμοποιεί ταυτόχρονα ανόργανες και οργανικές πηγές άνθρακα για την ανάπτυξή του. Η μικτότροφη καλλιέργεια αποτελεί και «χαμηλότερου κόστους» διαδικασία, σε σχέση με την αυτότροφη, λόγω των χαμηλότερων απαιτήσεων φωτός [4, 21, 36].

Μια κλειστή καλλιέργεια (batch culture) περνάει από διακριτές φάσεις ανάπτυξης. Η πρώτη φάση είναι η λανθάνουσα (lag phase). Είναι η φάση κατά την οποία δε λαμβάνει χώρα κυτταρική διαίρεση στο μέσο καλλιέργειας εξαιτίας της προσαρμογής του μικροοργανισμού στις νέες συνθήκες. Με την προσαρμογή των κυττάρων σε αυτές τις συνθήκες ξεκινάει η εκθετική φάση (exponential phase) στην οποία ο πληθυσμός των κυττάρων αυξάνεται εκθετικά. Αυτό συμβαίνει γιατί στο θρεπτικό μέσο βρίσκεται περίσσεια από θρεπτικά συστατικά, που βοηθάει στην ανάπτυξη και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η επόμενη φάση είναι η στατική (stationary phase). Είναι η φάση στην οποία δεν παρατηρείται πλέον αύξηση της βιομάζας των κυττάρων εφόσον έχουν εξαντληθεί τα θρεπτικά συστατικά από το μέσο καλλιέργειας. Ένας άλλος λόγος που μια κλειστή καλλιέργεια φτάνει σε στατική φάση είναι εξαιτίας της συσσώρευσης παραπροϊόντων του μεταβολισμού τα οποία είναι τοξικά για τον μικροβιακό πληθυσμό. Τελευταία είναι η φάση θανάτου (death phase) στην οποία τα κύτταρα που πεθαίνουν είναι περισσότερα από αυτά που διαιρούνται. Συνήθως η φάση θανάτου δεν μπορεί να παρατηρηθεί με μετρήσεις οπτικής πυκνότητας [37, 38].



Εικόνα 4: Τυπική καμπύλη ανάπτυξης ενός βακτηριακού πληθυσμού. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [37].

1.3.4. Το γένος *Chlorella* – Εφαρμογές μικροοργανισμού

Το όνομα *Chlorella* προέρχεται από την ελληνική λέξη “chloros” (χλωρός), που σημαίνει πράσινος και το λατινικό επίθημα “ella” αναφερόμενο στο μικροσκοπικό μέγεθος, που χαρακτηρίζει τα κύτταρα αυτού του γένους. Είναι ένα γένος μονοκύτταρων, πράσινων, σφαιρικών, χωρίς μαστίγια μικροφυκών, που ανήκει στους πιο δημοφιλείς φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς. Η διάμετρος των στελεχών του γένους αυτού κυμαίνεται από 2-10μm [21, 39]. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν το πιο αντιπροσωπευτικό πειραματικό μοντέλο οργανισμού, σε ότι αφορά τις φυσιολογικές και βιοχημικές ιδιότητες των πράσινων μικρο- και μακροφυτών [40]. Υπό ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες τα κύτταρα αναπτύσσονται γρήγορα και αναπαράγονται μέσω αυτοσπορυλίωση. Για μια επιτυχημένη και υγιή ανάπτυξη καλλιέργειας *Chlorella*, απαιτείται μέσα στο υγρό θρεπτικό μέσο να υπάρχουν τα κατάλληλα θρεπτικά συστατικά (ιχνοστοιχεία) αλλά και πηγές άνθρακα (διοξειδίο ή διάφοροι υδατάνθρακες) σε συνδυασμό με ηλιακή ακτινοβολία στην ορατή περιοχή του φάσματος [41]. Τα κύτταρα έχουν την δυνατότητα να αναπτύσσονται αυτότροφα, με την διαδικασία της φωτοσύνθεσης που τα χαρακτηρίζει σαν μικροφύκη. Παρόλα αυτά, παρατηρείται, επίσης, τόσο η ετερότροφη ανάπτυξη όσο και η μικτότροφη (συνδυασμός των προηγούμενων δύο), γεγονός που καθιστά τα κύτταρα ευέλικτα ως προς τις συνθήκες που θα επιλεγούν [21, 23].

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε ένα στέλεχος φωτοσυνθετικού μικροοργανισμού το οποίο βρέθηκε ότι ανήκει στο γένος *Chlorella*. Το συγκεκριμένο στέλεχος απομονώθηκε από ένα ευτροφικό σημείο του ποταμού

Γιόφυρου στο Ηράκλειο της Κρήτης, στα πλαίσια προηγούμενων διατριβών του εργαστηρίου. Στο στέλεχος αυτό πραγματοποιήθηκαν μελέτες ανθεκτικότητα κάτω από αντίξοες συνθήκες ανάπτυξης (παρουσία αναστολέων φωτοσύνθεσης, παρουσία αντιβιοτικών κ.α.), ενώ μελετήθηκε και μια εξωκυτταρική μήτρα πολυσακχαρίτη που παράγεται από τον μικροοργανισμό αυτό. Η συγκεκριμένη πολυμερική δομή, τον προστατεύει κατά την διάρκεια της κυτταρικής ανάπτυξης και παίζει σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων. Η μήτρα αυτή έχει βρεθεί και σε άλλους φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς [29].

Έχει αποδειχθεί ότι μικροφύκη σαν την οικογένεια *Chlorella* αποτελούν πηγή θρεπτικών συστατικών, όπως πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, χρωστικές ουσίες, βιταμίνες και μέταλλα. Στις μέρες μας, μικροοργανισμοί, όπως το φύκος *Chlorella vulgaris* και το κυανοβακτήριο *Spirulina platensis*, καταναλώνονται ως συμπληρώματα διατροφής ενώ τα προϊόντα τους χρησιμοποιούνται για διάφορους σκοπούς όπως βαφές, φαρμακευτικά προϊόντα, ζωοτροφές και καλλυντικά. Το *C. vulgaris* είναι ένα από τα λίγα μικροφύκη που μπορούν να βρεθούν στην αγορά ως συμπλήρωμα διατροφής, ως πρόσθετο, ως χρωστική και ως γαλάκτωμα τροφίμων. Αυτά τα προϊόντα διατίθενται σε διάφορες μορφές όπως κάψουλες, δισκία, εκχυλίσματα και σκόνη. Στην Ιαπωνία παρατηρείται η μεγαλύτερη κατανάλωση *Chlorella*, με χρήση της στην ιατρική περίθαλψη, αφού έχει παρατηρηθεί ότι προσφέρει αντικαρκινικές ιδιότητες, ενώ προστατεύει και από διάφορα καρδιαγγειακά νοσήματα. Όσον αφορά τις ζωοτροφές, το 30% της παραγωγής μικροφυκών πωλείται για τους σκοπούς αυτούς, λόγω της αυξανόμενης ζήτησης για τρόφιμα με φυσική σύνθεση αντί για συνθετικά συστατικά. Επιθυμία τόσο των κτηνοτρόφων όσο και των καταναλωτών είναι η βελτίωση της ποιότητας των ζωικών προϊόντων διατροφής. Έτσι, η οικογένεια *Chlorella*, με την ποσότητα καροτενοειδών και θρεπτικών συστατικών που διαθέτει, ενισχύει την υγεία των ζώων και τα προστατεύει από βαρέα μέταλλα, οξειδωτικό στρες και άλλες παθολογικές καταστάσεις. Από την άλλη μεριά, το σύνολο των θρεπτικών συστατικών, που υπάρχει στο εκχύλισμα των κυττάρων, συνεισφέρει στην ανάπτυξη και προστασία των φυτών. Επομένως, τα μικροφύκη του γένους *Chlorella* βρίσκουν εφαρμογή σε γεωργικούς σκοπούς, λειτουργώντας σαν λίπασμα [42].

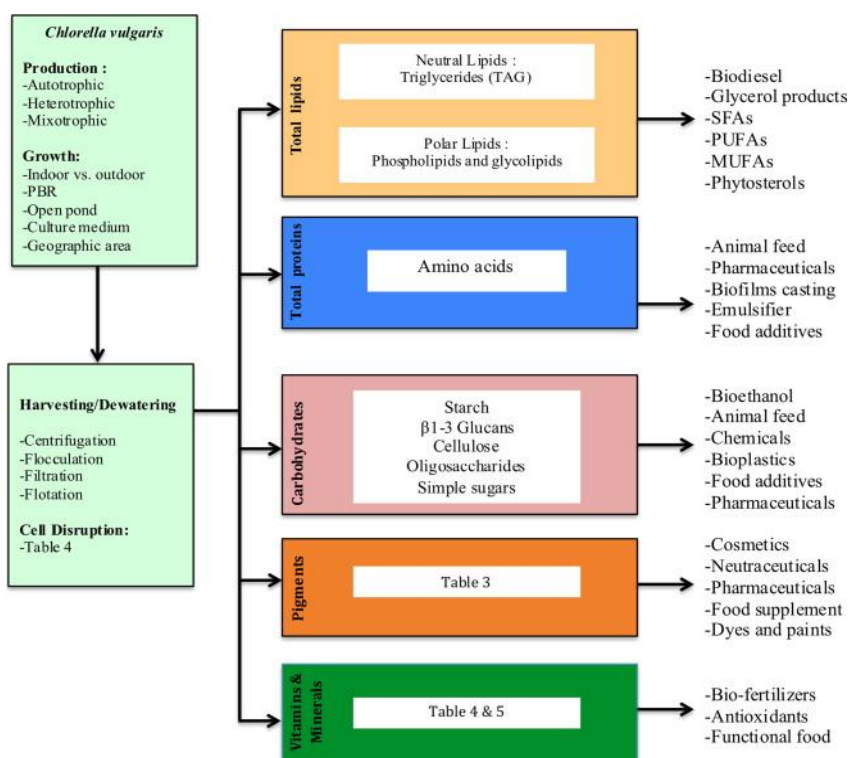


Εικόνες 5 & 6: Συμπληρώματα διατροφής *Chlorella* σε σκόνη και σε μορφή δισκίων. Οι εικόνες λήφθηκαν από τις παραπομπές ^{VII, VIII}.

Μια ακόμα εφαρμογή του γένους *Chlorella*, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αφορά την ικανότητά τους να αφομοιώνουν τον τεράστιο όγκο θρεπτικών συστατικών που συναντάται στα απόβλητα της βιομηχανίας (απόβλητα τυροκομείου, αστικά λύματα, βιομηχανικά απόβλητα κ.α.) [32]. Με αυτό τον τρόπο, μειώνεται η πιθανότητα εμφάνισης του φαινομένου του ευτροφισμού, που διαταρράσσει την ισορροπία του οικοσυστήματος, ενώ μειώνονται και οι κίνδυνοι που απειλούν και το ίδιο το ανθρώπινο είδος [22]. Η οικογένεια *Chlorellaceae* περιλαμβάνει έναν σημαντικό αριθμό γενών και ειδών με ένα ευρύ φάσμα βιοτεχνολογικών εφαρμογών. Η ταξινομική υποδιαίρεση αυτής της οικογένειας περιλαμβάνει πάνω από 40 διαφορετικά γένη, τα οποία είναι πολύ χρήσιμα σε διαδικασίες βιοαποκατάστασης [29]. Ορισμένα είδη μικροφυκών που χρησιμοποιούνται στη βιολογική επεξεργασία των λυμάτων είναι η *Chlorella sp.*, η *Chlorella sorokiniana* (*C. sorokiniana*) και η *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*), που απομακρύνουν επιτυχώς το μεγαλύτερο μέρος του ανόργανου αζώτου και φωσφόρου [22].

Τις δύο τελευταίες δεκαετίες, τα μικροφύκη άρχισαν να ακολουθούν μια νέα πορεία με αυξανόμενες εφαρμογές, που οφείλεται στην εξάντληση των αποθεμάτων ορυκτών καυσίμων, την επακόλουθη αύξηση των τιμών του πετρελαίου και την ανησυχία για την υπερθέρμανση του πλανήτη. Έτσι, οι μικροοργανισμοί του γένους *Chlorella* και γενικότερα τα μικροφύκη θεωρούνται, πλέον, ως πολλά υποσχόμενοι αιφόρος ενεργειακός πόρος λόγω της ικανότητάς τους να συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες λιπιδίων κατάλληλων για παραγωγή βιοντίζελ που αποδίδει σχεδόν σαν καύσιμο πετρελαίου, ύστερα από κατάλληλη μετατροπή [42]. Η παραγωγή βιοντίζελ ξεκίνησε πριν πολλά χρόνια, αλλά με διαφορετικές πρώτες ύλες, όπως έλαια

λαχανικών, ζωϊκά λίπη κ.α.. Παρόλα αυτά, τα μειονεκτήματα ήταν αρκετά και αφορούσαν κυρίως το κόστος και την χρονική διάρκεια της παραγωγής αυτών των υλών. Επομένως, κρίθηκε απαραίτητη η παραγωγή βελτιωμένων βιοκαυσίμων δεύτερης γενιάς, με την χρήση της βιομάζας από υπολείμματα τμημάτων καλλιέργειας (εκτός τροφίμων) όπως μίσχοι, φύλλα και φλοιός [36]. Τα λιπίδια απομονώνονται από τον μικροοργανισμό και με κατάλληλη αντίδραση μετεστεροποίησης παράγονται μεθυλικοί εστέρες λιπαρών οξέων (FAMES), οι οποίοι μπορούν να δώσουν τελικά το επιθυμητό βιοντίζελ [43].



Εικόνα 7: Ροή από την καλλιέργεια και την ανάπτυξη του οργανισμού *Chlorella vulgaris* μέχρι και την απομόνωση χρήσιμων ενώσεων και μορίων για τις διάφορες εφαρμογές. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [42].

1.4. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη ενός μικροφύκου που απομονώθηκε από ευτροφικό ποταμό για εφαρμογές βιοαποκατάστασης υγρών πρωτογενών αποβλήτων τυροκομείου, σε συνδυασμό με την παραγωγή υψηλών ποσοτήτων εμπορικά αξιοποιήσιμης βιομάζας.

Στο πρώτο μέρος, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια του φωτοσυνθετικού μικροοργανισμού, γένους *Chlorella*, σε θρεπτικά μέσα με βάση τα πρωτογενή γαλακτοκομικά απόβλητα. Η ανάπτυξη του συγκεκριμένου στελέχους μετρήθηκε με συγκεκριμένες τεχνικές για την κατασκευή καμπυλών ανάπτυξης. Σκοπός του πρώτου μέρους ήταν ο προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών καλλιέργειας και θρεπτικών μέσων, για μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας.

Στο δεύτερο μέρος, ο σκοπός ήταν με το πέρας της 7^{ης} μέρας της καλλιέργειας να γίνουν περαιτέρω μετρήσεις στα κύτταρα. Οι μετρήσεις αυτές αφορούσαν τον ποσοτικό προσδιορισμό των φωτοσυνθετικών χρωστικών, την μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση των κυττάρων, καθώς και τον ρυθμό φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου. Με τις μετρήσεις αυτές αποκτήθηκε μια γενικότερη εικόνα για την ανάπτυξη των κυττάρων και την προσαρμογή τους στα απόβλητα τυροκομείου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Συνθήκες ανάπτυξης φωτοσυνθετικού μικροοργανισμού

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες από το απομονωμένο στέλεχος *Chlorella* sp.. Οι μητρικές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν φωτοτερότροφα σε θρεπτικό μέσο TAP (Tris-Acetate-Phosphate) σε κωνικές φιάλες των 500 mL με όγκο καλλιέργειας 250 mL. Η ανάπτυξη των μητρικών καλλιεργειών έλαβε χώρα σε δωμάτιο με σταθερή θερμοκρασία $25 \pm 1^\circ\text{C}$ και υπό συνεχή φωτισμό με ένταση ακτινοβολίας $30\text{-}40 \mu\text{mol φωτονίων m}^{-2} \text{s}^{-1}$ με τη χρήση λευκών (cool white) λαμπών φθορισμού. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων τα κύτταρα συλλέχθηκαν από τις μητρικές καλλιέργειες στο τέλος της εκθετικής φάσης.

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου TAP (Tris-Acetate-Phosphate) φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα 1:

Πίνακας 1: Συστατικά υγρού θρεπτικού μέσου TAP (τελικό pH=7,2).

Διαλύματα	Ποσότητα
Trizma-base	2,42 g/L
Phosphate buffer	1mL/L
Hutner's Trace Metals	1mL/L
Solution A	10mL/L
Acetic Acid	1mL/L

Η ρύθμιση του pH στην τιμή 7,2 πραγματοποιήθηκε με προσθήκη υδατικού διαλύματος HCl. Για την δημιουργία στερεού μέσου TAP προστέθηκε επιπλέον 1,5% w/v agar.

Τα stock υδατικά διαλύματα για το θρεπτικό TAP παρασκευάστηκαν ως εξής:

Πίνακας 2: Συστατικά Phosphate buffer I.

Συστατικά	Ποσότητα
K_2HPO_4	104,4 g/L
KH_2PO_4	54,0 g/L

Πίνακας 3: Συστατικά Hutner's Trace Metals.

Συστατικά	Ποσότητα
EDTA	50,00 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4,99 g/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22,0 g/L
H ₃ BO ₃	11,40 g/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	5,06 g/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,57 g/L
Mo ₇ O ₂₄ (NH ₄) ₆ ·4H ₂ O	1,10 g/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,61 g/L

Πίνακας 4: Συστατικά Solution A.

Συστατικά	Ποσότητα
NH ₄ Cl	40,0 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10,0 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O (CaCl ₂)	5,0 g/L (ή 3,8 g/L)

Όλα τα θρεπτικά μέσα και τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο στους 120°C για 20-30 min για την αποφυγή μόλυνσεων από άλλους μικροοργανισμούς. Όλα τα πειράματα παρασκευής καλλιεργειών διεξήχθησαν σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar Flow Hood), ο οποίος είχε προηγουμένως απολυμανθεί με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας και αιθανόλη. Τα πειράματα έλαβαν χώρα παρουσία φλόγας.

2.2. Προετοιμασία αποβλήτων τυροκομείου

Η δειγματοληψία των αποβλήτων τυροκομείου (τυρόγαλα) έγινε από την εταιρία «ΧημικOTEχνική», κατά τον μήνα Νοέμβριο του 2020, ενώ τα υγρά γαλακτοκομικά απόβλητα προμηθεύτηκαν από την «Γαλακτοκομική Κρήτης ΑΕ». Τα δείγματα μοιράστηκαν σε πλαστικά μπουκάλια PET χωρητικότητας 1,5 L και αποθηκεύτηκαν άμεσα σε καταψύκτη στους -20 °C. Λήφθησαν δείγματα από 2 διαφορετικά στάδια παραγωγής. Συγκεκριμένα τα δείγματα ήταν τα εξής:

- Δ₁: πρωτογενές παστεριωμένο
- Δ₂: πρωτογενές απαστερίωτο

Πριν τη χρήση τους στα μέσα καλλιέργειας, τα απόβλητα υπέστησαν την παρακάτω προκατεργασία. Αρχικά, τα απόβλητα υπέστησαν διήθηση με απλή γάζα, για την απομάκρυνση στερεών και συσσωματωμάτων. Έπειτα ακολούθησε αποστείρωση σε αυτόκαυστο για 20'. Μετά την αποστείρωση, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός συσσωματωμάτων στο υγρό, λόγω μετουσίωσης πρωτεϊνών και συσσωμάτωσης λιπιδίων. Ακολούθησε ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου και τα απόβλητα φυγοκεντρήθηκαν στα 5000g με την φυγόκεντρο *Multifuge X Pro Series Centrifuge* για την καθίζηση των στερεών. Συλλέχθηκε το υπερκείμενο μέσω απόχυσης. Μετά την αποστείρωση, ο χειρισμός των αποβλήτων για όλα τα πειράματα έλαβε χώρα σε θάλαμο νηματικής ροής αέρα παρουσία φλόγας.

2.3. Παρασκευή πειραματικών καλλιιεργειών

Πριν τη μεταφορά τους στις θυγατρικές καλλιέργειες, τα κύτταρα από τη μητρική καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκαν στα 2500xg για 8' στους 15°C με την φυγόκεντρο *Multifuge X Pro Series Centrifuge* και ξεπλύθηκαν με απιονισμένο H₂O για την απομάκρυνση εναπομεινάντων θρεπτικών συστατικών. Η αρχική κυτταρική συγκέντρωση για όλα τα πειράματα ρυθμίστηκε στα $0,15 \frac{\mu\text{L PCV}}{\text{mL}}$.

Η μελέτη ανάπτυξης του πράσινου μικροφύκου *Chlorella* στα απόβλητα τυροκομείου, πραγματοποιήθηκε σε φωτοετερότροφες συνθήκες και μικτότροφες συνθήκες. Σε όλες τις περιπτώσεις οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 mL, με όγκο καλλιέργειας τα 100 mL. Στις φωτοετερότροφες συνθήκες οι κωνικές φιάλες καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο, με σκοπό την αποφυγή πιθανής επιμόλυνσης από το περιβάλλον. Οι κωνικές φιάλες της φωτοετερότροφης ανάπτυξης τοποθετήθηκαν πάνω σε πλατφόρμα ανακίνησης (shaker), η οποία λειτουργούσε υπό σταθερή ταχύτητα ανάδευσης στα 110 rpm. Όσον αφορά τις μικτότροφες συνθήκες, όπου ήταν απαραίτητη η παροχή CO₂, υπήρχε συνεχής αερισμός (bubbling) με ατμοσφαιρικό αέρα (ως πηγή CO₂) στο υγρό της καλλιέργειας. Ο αέρας διερχόταν μέσω γυάλινου σιφωνίου, αφού πρώτα περνούσε από φίλτρο σύριγγας διαμέτρου 0,22μm προς αποφυγή επιμολύνσεων από το περιβάλλον. Επιπλέον, ο αερισμός συνεισφέρει και στην ανάδευση της καλλιέργειας. Η ανάπτυξη των καλλιιεργειών

πραγματοποιήθηκε σε θαλάμους καλλιέργειας με σταθερή θερμοκρασία 25 ± 1 °C και υπό φωτισμό με ένταση ακτινοβολίας 140-160 μmol φωτονίων $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ με τη χρήση λευκών (natural daylight) λαμπτήρων LED (6400 K). Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες του μικροφύκου σε θρεπτικό modified HS και θρεπτικό modified HS + Lactose 7,5% w/v, στις ίδιες συνθήκες που αναπτύχθηκαν τα δείγματα παραπάνω.

2.4. Πειραματικές συνθήκες που μελετήθηκαν

2.4.1. Πειράματα με πρωτογενές Δ_1 παστεριωμένο τυρόγαλα

Πίνακας 5: Συνθήκες ανάπτυξης κυττάρων *Chlorella*. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ_1 (πρωτογενές παστεριωμένο) χωρίς την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v. Οι ίδιες συνθήκες ίσχυαν τόσο για την ετερότροφη όσο και για την μικτότροφη καλλιέργεια.

Συνθήκες
1. Control (Modified HS*)
2. Control + Lactose (Modified HS* + 7,5% w/v lactose)
3. Δ_1 25%
4. Δ_1 50%
5. Δ_1 75%
6. Δ_1 100%

Πίνακας 6: Συνθήκες ανάπτυξης κυττάρων *Chlorella*. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ_1 (πρωτογενές παστεριωμένο) με την προσθήκη ιχνοστοιχείων (Hutner's Trace Metals), μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v. Οι ίδιες συνθήκες ίσχυαν τόσο για την ετερότροφη όσο και για την μικτότροφη καλλιέργεια.

Συνθήκες
1. Control (Modified HS*)
2. Control + Lactose (Modified HS* + 7,5% w/v lactose)
3. Δ_1 25% + Hutner's Trace Metals
4. Δ_1 50% + Hutner's Trace Metals
5. Δ_1 75% + Hutner's Trace Metals
6. Δ_1 100% + Hutner's Trace Metals

2.4.2. Πειράματα με πρωτογενές Δ₂ απαστερίωτο τυρόγαλα

Πίνακας 7: Συνθήκες ανάπτυξης κυττάρων *Chlorella*. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ₂ (πρωτογενές απαστερίωτο) χωρίς την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v. Οι ίδιες συνθήκες ίσχυαν τόσο για την ετερότροφη όσο και για την μικτότροφη καλλιέργεια.

Συνθήκες
1. Control (Modified HS*)
2. Control + Lactose (Modified HS* + 7,5% w/v lactose)
3. Δ ₂ 25%
4. Δ ₂ 50%
5. Δ ₂ 75%
6. Δ ₂ 100%

Σημ. 1: Το ποσοστό δηλώνει την περιεκτικότητα σε τυρόγαλα Δ₁ ή Δ₂.

Σημ. 2: Η συγκέντρωση του διαλύματος Hutner's Trace Metals στις 4 συνθήκες ήταν ίδια με αυτή των Control και Control + Lactose.

Σημ. 3: Οι διάφορες συνθήκες, που δοκιμάζονταν κάθε φορά για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, λάμβαναν χώρα τόσο για την φωτοετερότροφη όσο και για την μικτότροφη ανάπτυξη.

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου Modified HS (Sueoka's High Salt medium) φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα 8:

Πίνακας 8: Συστατικά υγρού θρεπτικού μέσου Modified HS.

Διαλύματα	Ποσότητα
Beijerinck's salts solution	10 mL/L
Phosphate buffer 1 M	10 mL/L
Hutner's Trace Metals	1 mL/L

Τα *stock* υδατικά διαλύματα για το θρεπτικό Modified HS παρασκευάστηκαν ως εξής:

Πίνακας 9: Συστατικά Beijerinck's salts solution για Modified HS.

Συστατικά	Ποσότητα
NH ₄ Cl	40 g/L
CaCl ₂	0,76 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 g/L

Πίνακας 10: Συστατικά Phosphate buffer 1 M για Modified HS.

Συστατικά	Ποσότητα
K ₂ HPO ₄	116 g/L
KH ₂ PO ₄	45,5 g/L

Σημ.: Τα συστατικά και οι ποσότητες για το stock διάλυμα των ιχνοστοιχείων (Hutner's Trace Metals) αναγράφονται στον *Πίνακα 3*.

2.5. Μετρήσεις κυτταρικής ανάπτυξης

2.5.1. Όγκος καθιζάμενων κυττάρων (Packed Cell Volume, PCV).

Η κυτταρική συγκέντρωση, ως ένδειξη της ανάπτυξης, προσδιορίστηκε με μέτρηση του όγκου των καθιζάμενων κυττάρων (Packed Cell Volume, PCV) ανά ml καλλιέργειας και εκφράστηκε σε $\frac{\mu L}{mL} PCV$ καλλιέργειας. Ειδικότερα, γνωστή ποσότητα καλλιέργειας μεταφέρθηκε στους ειδικούς πλαστικούς τριχοειδείς σωλήνες TPP (PCV tubes) και φυγοκεντρίθηκε για 5' σε φυγόκεντρο *Eppendorf Centrifuge 5412*. Στην συνέχεια, με την βοήθεια της βαθμονομημένης περιοχής που υπήρχε στους σωλήνες, προσδιορίστηκε η κυτταρική συγκέντρωση. Οι μετρήσεις κυτταρικής συγκέντρωσης γίνονταν ανά μία μέρα για κάθε πείραμα, από την 1^η έως και την 7^η μέρα (λήξη πειράματος). Σκοπός της μέτρησης της κυτταρικής συγκέντρωσης ήταν η κατασκευή καμπύλης ανάπτυξης, όπως θα παρουσιασθεί αναλυτικά παρακάτω.



Εικόνα 8: Βαθμονομημένοι τριχοειδείς σωλήνες PCV. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή ^{1,11}.

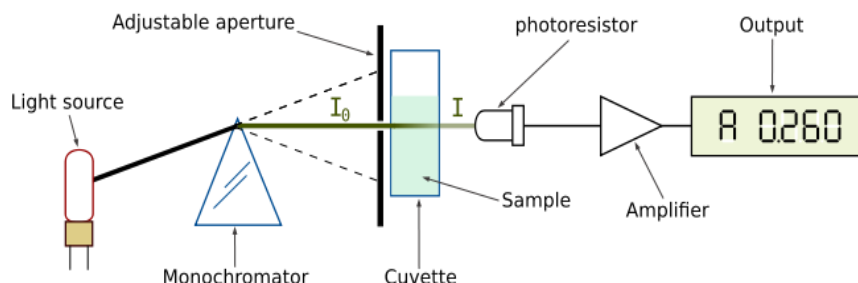
2.5.2. Ξηρή βιομάζα κυττάρων (Dry Cell Weight, DCW)

Μια εναλλακτική τεχνική για την εκτίμηση της ανάπτυξης των κυττάρων ήταν η μέτρηση του ξηρού βάρους των κυττάρων (Dry Cell Weight, DCW). Γνωστή ποσότητα από την καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα και φυγοκεντρίθηκε στα 6.000 rpm για 10' στην φυγόκεντρο *Runne Zentrifugen Heidelberg*. Στην συνέχεια, αφού το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, το ίζημα κυττάρων ξεπλύθηκε με μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού για την απομάκρυνση των αλάτων. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε προζυγισμένα αλουμινένια πιατάκια. Αφήθηκαν για ξήρανση σε φούρνο σε θερμοκρασία 70°C για τουλάχιστον 14h, και έπειτα μετρήθηκε η ξηρή βιομάζα κυττάρων με χρήση αναλυτικού ζυγού τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Οι μετρήσεις ξηρής βιομάζας γίνονταν την 7^η ημέρα κάθε πειράματος.

2.6. Εκχύλιση και ποσοτικοποίηση φωτοσυνθετικών χρωστικών

Η φασματοσκοπία ασχολείται με τη μέτρηση και την ερμηνεία των φασμάτων που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Υπάρχει μια τεράστια ποικιλία φασματοσκοπικών μεθόδων για την επίλυση αναλυτικών προβλημάτων. Οι μέθοδοι διαφέρουν σε σχέση με το είδος που αναλύεται (π.χ. μοριακή ή ατομική φασματοσκοπία), τον τύπο της αλληλεπίδρασης ακτινοβολίας-ύλης (π.χ. απορρόφηση, εκπομπή ή περίθλαση) και την περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που χρησιμοποιείται στην ανάλυση. Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι είναι χρήσιμες τόσο για ποσοτικές όσο και για ποιοτικές αναλύσεις. Το φασματοφωτόμετρο είναι όργανο το οποίο μετρά την ένταση μιας

επιλεγμένης συχνότητας ακτινοβολίας [44]. Η απορρόφηση μιας ουσίας σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος συνδέεται με την συγκέντρωση της ουσίας αυτής μέσω του νόμου των Beer και Lambert, με σχέση ανάλογη [45].



Εικόνα 9: Διάταξη ενός τυπικού φασματοφωτόμετρου. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή ^{III}.

Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές είναι ενώσεις με ποικίλες χημικές δομές. Οι σημαντικότερες χρωστικές στα μικροφύκη είναι η χλωροφύλλη-a, η χλωροφύλλη-b και τα καροτενοειδή. Αυτές είναι και οι πλέον απαραίτητες για την φωτοσυνθετική διαδικασία. Η εκχύλιση των χρωστικών μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους οργανικούς διαλύτες, όπως ακετόνη, μεθανόλη, αιθανόλη κ.α. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η συγκέντρωση των χρωστικών μπορεί να ποσοτικοποιηθεί μετρώντας την απορρόφηση των εκχυλισμάτων σε κατάλληλα μήκη κύματος, ανάλογα και με τον διαλύτη που χρησιμοποιείται [46].

Για την εκχύλιση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φωτοσυνθετικών χρωστικών, γνωστή ποσότητα καλλιέργειας φυγοκεντρίθηκε για 5' σε φυγόκεντρο *Eppendorf Centrifuge 5412* και έπειτα από την απόρριψη του υπερκειμένου, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 mL θερμής (50 °C) μεθανόλης. Τα δείγματα αναδεύτηκαν και αφέθηκαν 5' για επώαση στους 50 °C στο σκοτάδι. Μετά την επώαση, τα δείγματα επέστρεψαν σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε φυγοκέντριση για την καθίζηση των κυτταρικών θραυσμάτων. Στην συνέχεια, μετρήθηκε η απορρόφηση του μεθανολικού εκχυλίσματος σε συγκεκριμένα μήκη κύματος (470,0 nm, 652,4 nm και 665,2 nm) με χρήση ενός φασματοφωτόμετρου υπεριώδους-ορατού (*Shimadzu UV-2700*). Οι εξισώσεις από τις οποίες υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης-a (C_a) της χλωροφύλλης-b (C_b), και των συνολικών καροτενοειδών (C_{x+c}), (σε mg/mL) παρουσιάζονται παρακάτω [46]:

$$C_a = 16,72 * A_{665,2} - 9,16 * A_{652,4}$$

$$C_b = 34,09 * A_{652,4} - 15,28 * A_{665,2}$$

$$C_{x+c} = \frac{(1000 * A_{470} - 1,63 * C_a - 104,96 C_b)}{221}$$

2.7. Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού

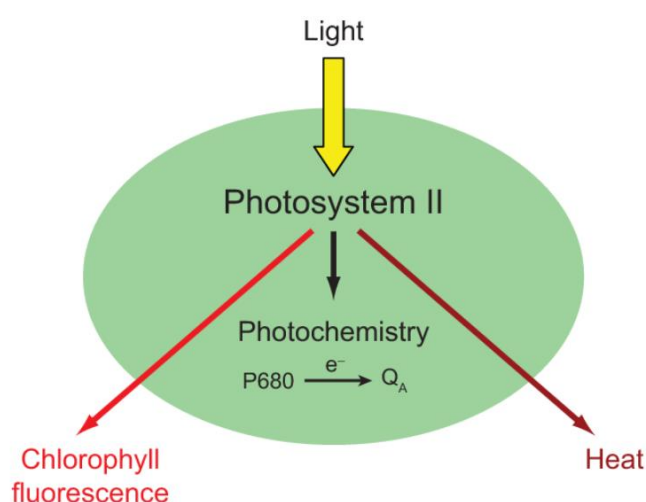
2.7.1. Αρχή της μεθόδου – Φθορισμός χλωροφύλλης

Η αρχή στην οποία βασίζεται η ανάλυση φθορισμού της χλωροφύλλης είναι σχετικά απλή. Η ηλιακή ενέργεια που απορροφάται από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές μπορεί να ακολουθήσει 3 διαφορετικές πορείες. Το μεγαλύτερο ποσοστό ενέργειας χρησιμοποιείται για την φωτοσύνθεση και την επακόλουθη παραγωγή ATP και NADPH. Η περίσσεια της ενέργειας μπορεί είτε να διαχυθεί και να απομακρυνθεί με την μορφή θερμότητας είτε να δώσει εκ νέου εκπομπή φωτός, και πιο συγκεκριμένα δευτερεύουσας ακτινοβολίας [34], [47]. Η εκπομπή δευτερεύουσας ακτινοβολίας χαρακτηρίζεται με τον γενικό όρο φωταύγεια. Αν αυτή η εκπομπή γίνει σε χρονικό διάστημα $10^{-9} - 10^{-6}$ s μετά τη διέγερση, η φωταύγεια χαρακτηρίζεται ως φθορισμός. Η επαγωγή του φθορισμού από τα φυτά πραγματοποιείται σε δύο φάσεις, εκ των οποίων η πρώτη είναι ταχεία και η δεύτερη αργή. Αυτή η διαχείριση γίνεται από το φωτοσυνθετικό μηχανισμό με σκοπό την καλύτερη διαχείριση της ηλιακής ενέργειας και ταυτόχρονα την προστασία του από μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες [48].

Η μελέτη του επαγωγικού φθορισμού στην ταχεία φάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της δομής, της λειτουργίας και της απόδοσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Ο φθορισμός χλωροφύλλης είναι από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές για μελέτες φυσιολογίας φυτικών οργανισμών, καθώς παρέχει με ευκολία και με σχετικά χαμηλό κόστος μια πληθώρα πληροφοριών σε πραγματικό χρόνο για την κατάσταση του φωτοσυστήματος II, ενώ ταυτόχρονα είναι μη καταστροφική μέθοδος [49].

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, ο Kautsky και οι συνεργάτες του παρατήρησαν αλλαγές στην απόδοση του φθορισμού χλωροφύλλης. Διαπίστωσαν ότι, κατά τη μεταφορά φωτοσυνθετικού υλικού από το σκοτάδι στο φως, σημειωνόταν αύξηση της απόδοσης φθορισμού χλωροφύλλης για μια χρονική περίοδο περίπου 1 s. Αυτή η

αύξηση εξηγήθηκε ως συνέπεια της μείωσης των αποδέκτων ηλεκτρονίων στην φωτοσυνθετική οδό, του PSII, ιδίως της κινόνης Q_A . Μόλις το PSII απορροφήσει φως και το Q_A αποδεχθεί ένα ηλεκτρόνιο, δεν μπορεί να δεχτεί άλλο έως ότου περάσει το πρώτο σε έναν επόμενο φορέα ηλεκτρονίων (Q_B). Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, το κέντρο αντίδρασης θεωρείται ότι είναι «κλειστό». Σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή, η παρουσία ενός ποσοστού κλειστών κέντρων αντίδρασης οδηγεί σε μια συνολική μείωση της αποτελεσματικότητας της φωτοχημείας και έτσι σε μια αντίστοιχη αύξηση στην απόδοση του φθορισμού [47]. Ο φθορισμός αυξάνεται από το αρχικό του επίπεδο (F_0) σε ένα μέγιστο επίπεδο (F_m) και στη συνέχεια μειώνεται βαθμιαία μέχρι ένα σταθερό επίπεδο (F_s). Η ταχεία αυτή μεταβολή του φθορισμού περιγράφεται από την καμπύλη του Kautsky, από την οποία υπολογίζεται και ο λόγος F_v / F_{max} , όπου $F_v = F_{max} - F_0$.



Εικόνα 10: Ροή της φωτεινής ενέργειας που απορροφάται από το φωτοσύστημα II. Η ενέργεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί φωτοχημικά για τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από την χλωροφύλλη στο κέντρο αντίδρασης (P680) στον αποδέκτη κινόνης (Q_A). Μη-φωτοχημικά, η ενέργεια μπορεί να φύγει από σύστημα μέσω φθορισμού χλωροφύλλης ή θερμότητας. Αναλόγως με τις συνθήκες, η ροή ενέργειας θα ευνοηθεί περισσότερο προς μια συγκεκριμένη διαδρομή, μειώνοντας την ενέργεια που θα καταλήξει στις άλλες δύο. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή ^V.

2.7.2. Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού σε δείγματα καλλιεργειών

Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού έγιναν με τη φορητή συσκευή Handy Plant Efficiency Analyser (Hansatech Instruments, Kings' Lynn, Norfolk, UK), σύμφωνα με τη μέθοδο των Strasser & Strasser [50]. Τα δεδομένα επεξεργάστηκαν με

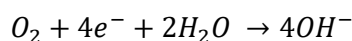
την χρήση εξειδικευμένου λογισμικού εφαρμογής του JIP-test (BiolyzerHP 4.0). Για τις μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού τα δείγματα (κωνικές φιάλες) τοποθετήθηκαν αρχικά σε σκοτεινό θάλαμο για 10', έτσι ώστε τα μόρια της χλωροφύλλης-a στα κέντρα αντίδρασης, να επιστρέψουν στη θεμελιώδη κατάσταση, και γίνει δυνατή η εκτίμηση της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης. Η μέθοδος βασίζεται σε μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού με ανάλυση 10 μs σε χρονικό διάστημα 1 s. Ο φθορισμός μετρήθηκε με 12-bit ανάλυση και η διέγερση πραγματοποιήθηκε από 3 διόδους φωτισμού (LEDs) με ένταση ακτινοβολίας 3000 μmol·m⁻²·s⁻¹ ερυθρού φωτός (650 nm). Από τις μετρήσεις υπολογίστηκε ο λόγος Fv/Fm, που αποτελεί τη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση του φωτοσυστήματος II.



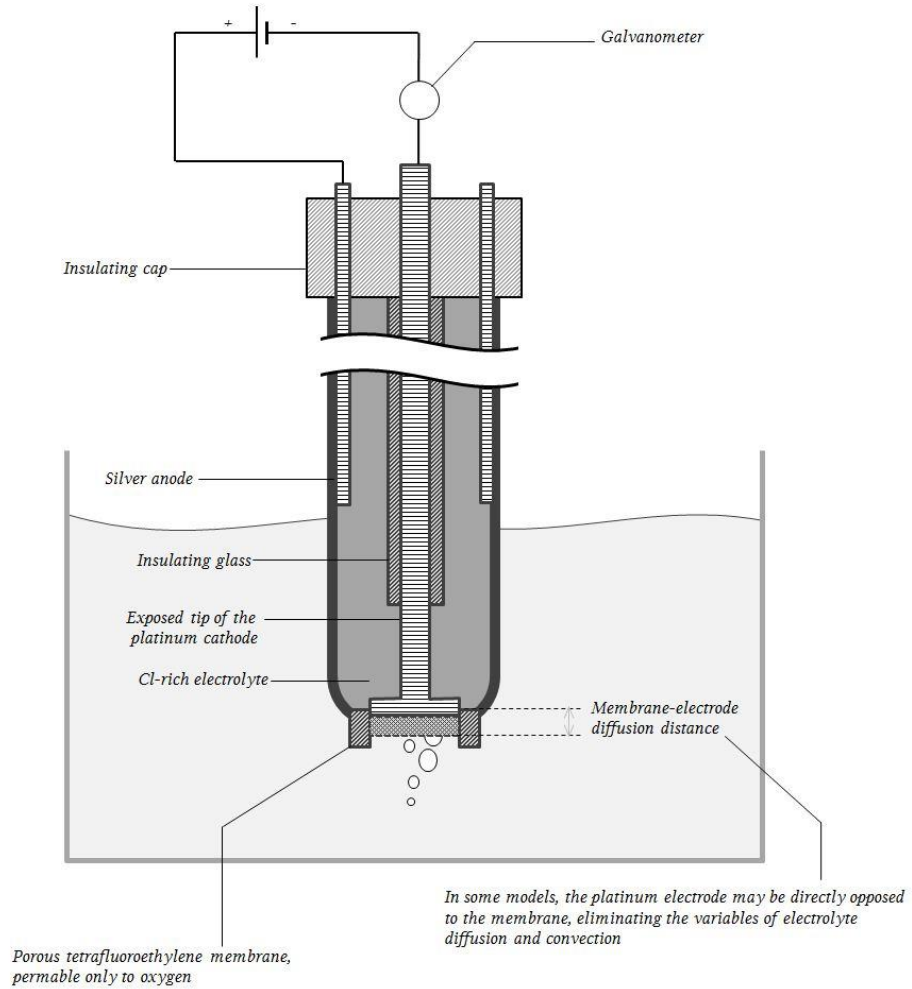
Εικόνα 11: Handy Plant Efficiency Analyzer για τις μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή ^{IV}.

2.8. Πολαρογραφικός προσδιορισμός ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής O₂

Η μέτρηση του ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου πραγματοποιήθηκε με χρήση ενός επιλεκτικού ηλεκτροδίου οξυγόνου τύπου Clark (YSI model 5300 Biological Oxygen Monitor) [51]. Η διάταξη του ηλεκτροδίου αποτελείται από μια άνοδο αργύρου και μια κάθοδο πλατίνας, σε διάλυμα ηλεκτρολύτη KCl, όπου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Για τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ ανόδου και καθόδου χρησιμοποιείται οξυγόνο, το οποίο εισέρχεται επιλεκτικά στον ηλεκτρολύτη από το δείγμα μέσω μιας ημιπερατής μεμβράνης, και ανάγεται στην κάθοδο σύμφωνα με την ημιαντίδραση:



Οι μετρήσεις φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Delieu και Walker σε κορεσμένη ατμόσφαιρα CO₂ [52]. Η παροχή φωτός για τη διεξαγωγή των μετρήσεων πραγματοποιήθηκε με δύο λάμπες LED λευκού φωτός (6400 K) έντασης 1100 – 1200 μmol φωτονίων m⁻² s⁻¹. Στις μετρήσεις μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας η πηγή της φωτεινής ακτινοβολίας ήταν αρκετή, έτσι ώστε το φως να μην αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για τη μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα. Ο άλλος περιοριστικός παράγοντας, το CO₂, αέριο απαραίτητο για την φωτοσύνθεση, αντιμετωπίστηκε με την προσθήκη NaHCO₃ στο διάλυμα επαναιώρησης των δειγμάτων. Για τις μετρήσεις έκλυσης οξυγόνου, δείγματα καλλιεργειών συλλέχθηκαν και φυγοκεντρίθηκαν για 5' στα 6.000 rpm. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 4 mL ρυθμιστικού διαλύματος με το οποίο είχε προηγουμένως σταθεροποιηθεί το ηλεκτρόδιο (0,896% w/v Tricine και 0,034% w/v NaHCO₃, με ρύθμιση σε pH=7,6). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε υδρόψυκτη γυάλινη κυψελίδα σε θερμοκρασία 25°C η οποία ρυθμίστηκε με τη χρήση θερμοστάτη με κυκλοφορητή νερού. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν για χρονικό διάστημα 75 s, με μέτρηση ανά 5 s. Η μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα καταγράφηκε σε ένταση φωτισμού 1100 – 1200 μmol φωτονίων·m⁻²·s⁻¹ και τελικά εκφράστηκε σε mmol O₂ (mol Chl)⁻¹·min⁻¹..



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση ενός ηλεκτροδίου οξυγόνου τύπου Clark, με τα βασικά του στοιχεία να επισημαίνονται. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή ^{IX}.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Μετρήσεις κυτταρικής ανάπτυξης

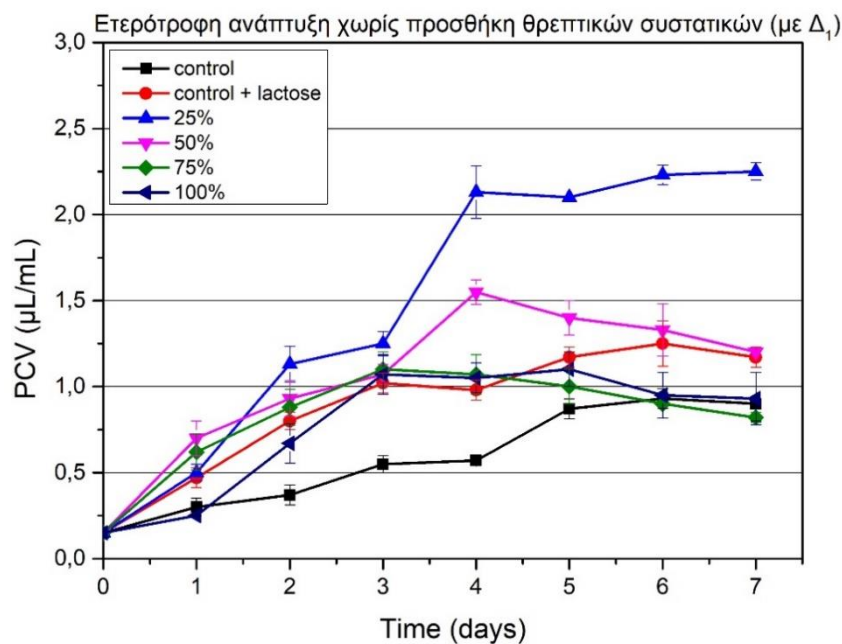
3.1.1. Όγκος καθιζάμενων κυττάρων (Packed Cell Volume, PCV)

Στις *Εικόνες 13, 14, 15, 16, 17, 18* παρουσιάζονται οι γραφικές παραστάσεις των καμπυλών ανάπτυξης του μικροφύκου *Chlorella*, από την ημέρα 0 μέχρι και την 7^η ημέρα της καλλιέργειας. Η συγκέντρωση των κυττάρων εκφράστηκε σε μονάδες $\frac{\mu L PCV}{mL}$. Οι μετρήσεις γίνονταν ανά μία μέρα για 7 ημέρες. Σε κάθε γράφημα παρουσιάζονται 4 συνθήκες μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιέχει και λακτόζη 7,5% w/v.

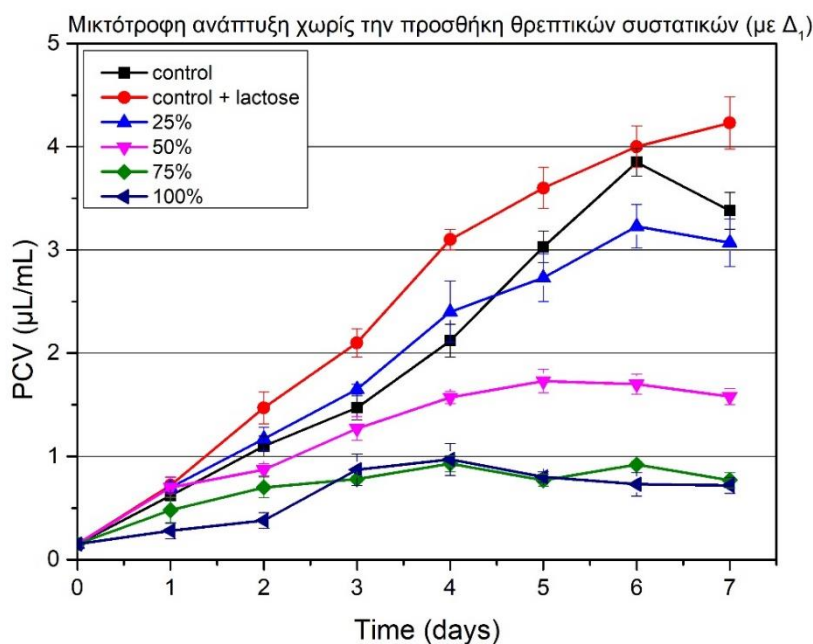
Στην *Εικόνα 13*, στην ετερότροφη καλλιέργεια, είναι φανερό ότι όλες οι συνθήκες κυμαίνονται σε χαμηλές τιμές PCV. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η συνθήκη 25% Δ₁, όπου φαίνεται μια εκθετική αύξηση των κυττάρων από την 1^η ημέρα μέχρι και 4^η ημέρα, καταλήγοντας τελικά σε μια συγκέντρωση περίπου $2,25 \frac{\mu L PCV}{mL}$ την 7^η ημέρα του πειράματος. Η συγκέντρωση αυτή είναι σημαντικά μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των δύο μαρτύρων που υπήρχαν στο πείραμα, υποδεικνύοντας έτσι ότι στην συνθήκη 25% ήταν καταλληλότερες οι συνθήκες για την ικανοποιητική ανάπτυξη του μικροφύκου. Ειδικότερα, το διάλυμα είναι λιγότερο θολό, λόγω αραίωσης του τυρογάλακτος, επομένως τα μικροφύκη δέχονται πιθανώς μεγαλύτερη ποσότητα φωτεινής ακτινοβολίας. Επιπλέον, συγκριτικά με τις υπόλοιπες συνθήκες, η συνθήκη 25% Δ₁ περιέχει την μικρότερη ποσότητα τυρογάλακτος και άρα λιγότερα ολικά στερεά σωματίδια, τα οποία δρουν ανασταλτικά. Τέλος, η λακτόζη βρίσκεται και σε χαμηλότερη συγκέντρωση στο διάλυμα (25%) σε σχέση με τις υπόλοιπες συνθήκες που μελετώνται (50%, 75% και 100%). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το φαινόμενο της όσμωσης να είναι πιο ασθενές και τα κύτταρα να μην κινδυνεύουν από συρρίκνωση λόγω διάχυσης νερού προς το εξωτερικό (για εξισορρόπηση συγκέντρωσης λακτόζης).

Στην *Εικόνα 14*, που παρουσιάζονται οι τιμές για την μικτότροφη ανάπτυξη, φαίνεται ότι καμία συνθήκη δεν ξεπέρασε σε ποσότητα βιομάζας τους δύο μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν. Παρόλα αυτά, η συνθήκη 25% Δ₁ φαίνεται και πάλι να οδηγεί στα βέλτιστα αποτελέσματα σε σχέση με τις υπόλοιπες συνθήκες. Μάλιστα αυτή η αύξηση, που παρατηρείται στις τιμές κυτταρικής συγκέντρωσης φτάνει σε μια τελική συγκέντρωση λίγο μεγαλύτερη από $3 \frac{\mu L PCV}{mL}$. Όσον αφορά τις υπόλοιπες τρεις

συνθήκες, συγκριτικά με την ετερότροφη καλλιέργεια, εμφανίζουν βελτιωμένη ανάπτυξη σε σχέση με τις αντίστοιχες συνθήκες όπου δεν εμφανίστηκε bubbling, καταλήγοντας στο ότι η αξιοποίηση τόσο του διοξειδίου του άνθρακα, όσο και του οργανικού υποστρώματος που υπάρχει στο τυρόγαλα, βοηθάει στην περαιτέρω ανάπτυξη του μικροφύκου.



Εικόνα 13: Καμπύλες ανάπτυξης του μικροφύκου *Chlorella* από την ημέρα 0 μέχρι και την ημέρα 7. Η ανάπτυξη των καλλιεργειών πραγματοποιήθηκε κάτω από ετερότροφες συνθήκες. Οι μετρήσεις του όγκου πακεταρισμένων κυττάρων (PCV) γίνονταν καθημερινά, για 7 ημέρες. Η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ήταν $0,15 \frac{\mu\text{L PCV}}{\text{mL}}$. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος καθώς και η τυπική απόκλιση (\pm) των τιμών αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ₁ (πρωτογενές παστεριωμένο) χωρίς την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v.

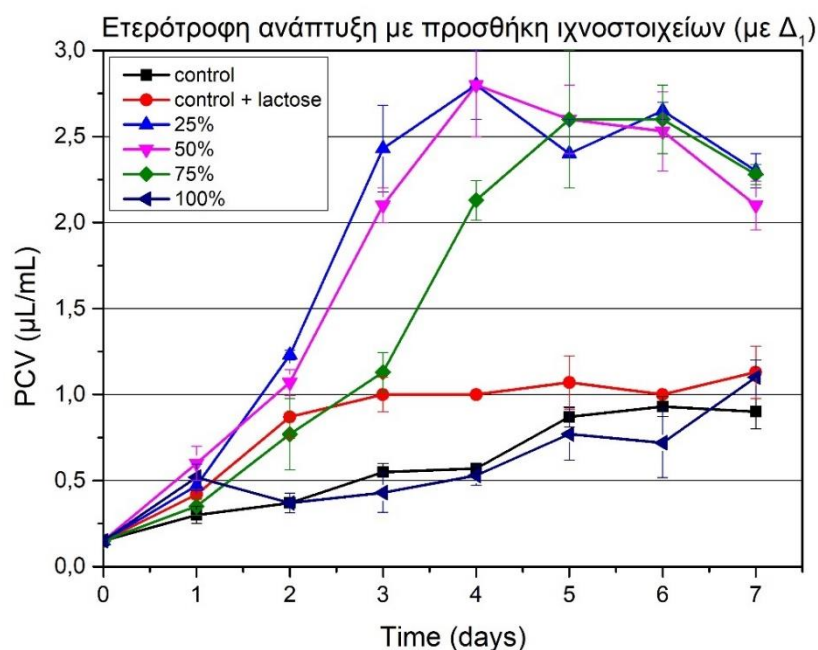


Εικόνα 14: Καμπύλες ανάπτυξης του μικροφύκου *Chlorella* από την ημέρα 0 μέχρι και την ημέρα 7. Η ανάπτυξη των καλλιεργειών πραγματοποιήθηκε κάτω από μικτότροφες συνθήκες. Οι μετρήσεις του όγκου πακεταρισμένων κυττάρων (PCV) γίνονταν καθημερινά, για 7 ημέρες. Η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ήταν $0,15 \frac{\mu L PCV}{mL}$. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος καθώς και η τυπική απόκλιση (\pm) των τιμών αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ₁ (πρωτογενές παστεριωμένο) χωρίς την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v.

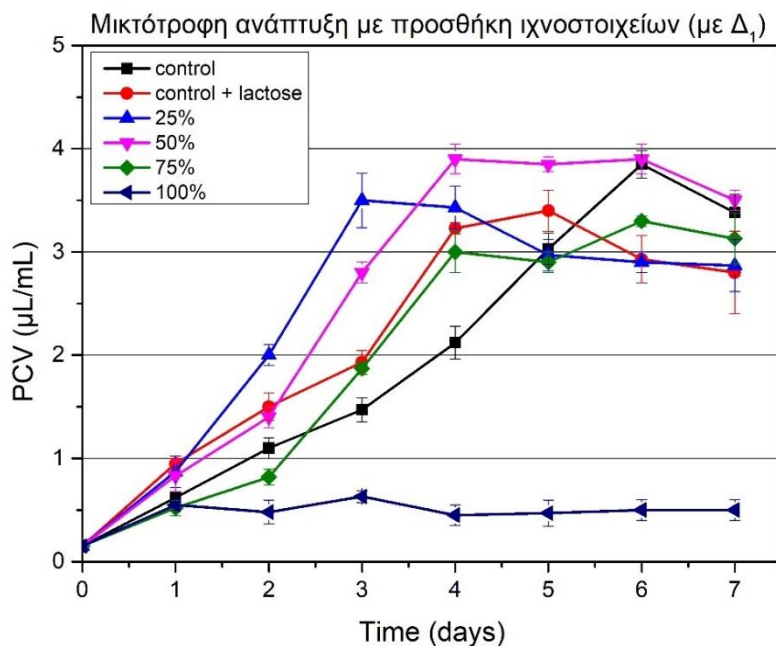
Στην *Εικόνα 15*, στην ετερότροφη ανάπτυξη με την προσθήκη ιχνοστοιχείων, οι συνθήκες φαίνεται να είναι πιο ευνοϊκές για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του μικροφύκου. Πιο συγκεκριμένα, οι συνθήκες 25%, 50% και 75% Δ₁ παρουσιάζουν πολύ σημαντική ανάπτυξη, μεγαλύτερη και από αυτή των δύο μαρτύρων. Οι τιμές των συγκεντρώσεων μεταξύ των ημερών 4 – 6 είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες της ημέρας 7. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα περνάνε από την στατική φάση στην φάση θανάτου, όπου συσσωρεύονται τοξικά παραπροϊόντα του μεταβολισμού τους ή εξαντλώνται τα θρεπτικά συστατικά του μέσου. Η συνθήκη 100% οδηγεί σε τιμές συγκεντρώσεων πολύ κοντά στους δύο μάρτυρες.

Όσον αφορά την αντίστοιχη μικτότροφη ανάπτυξη του πειράματος με τα ιχνοστοιχεία, η ανάπτυξη είναι βελτιωμένη για όλες τις συνθήκες, εκτός από αυτή με

100% Δ₁ (+Hutner's Trace Metals), όπου τα κύτταρα δεν εμφάνισαν ουσιαστική ανάπτυξη σε σχέση με την ημέρα 0. Οι υπόλοιπες τρεις συνθήκες (25%, 50% και 75%) προσεγγίζουν συγκεντρώσεις υψηλότερες της τιμής $3 \frac{\mu\text{L PCV}}{\text{mL}}$, με αυτή του 50% Δ₁ να εμφανίζει το μεγαλύτερο αποτέλεσμα. Και σε αυτή την περίπτωση, η μικτότροφη ανάπτυξη έδωσε καλύτερες τιμές ανάπτυξης σε σχέση με την ετερότροφη, ενώ το διάλυμα των ιχνοστοιχείων που προστέθηκε, ήταν αυτό που έδωσε ώθηση στις συνθήκες 50% και 75% να αναπτυχθούν πολύ περισσότερο σε σχέση με το προηγούμενο πείραμα που αναλύθηκε.



Εικόνα 15: Καμπύλες ανάπτυξης του μικροφύκου *Chlorella* από την ημέρα 0 μέχρι και την ημέρα 7. Η ανάπτυξη των καλλιιεργειών πραγματοποιήθηκε κάτω από ετερότροφες συνθήκες. Οι μετρήσεις του όγκου πακεταρισμένων κυττάρων (PCV) γίνονταν καθημερινά, για 7 ημέρες. Η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ήταν $0,15 \frac{\mu\text{L PCV}}{\text{mL}}$. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος καθώς και η τυπική απόκλιση (\pm) των τιμών αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ₁ (πρωτογενές παστεριωμένο) με την προσθήκη ιχνοστοιχείων (Hutner's Trace Metals), μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v.



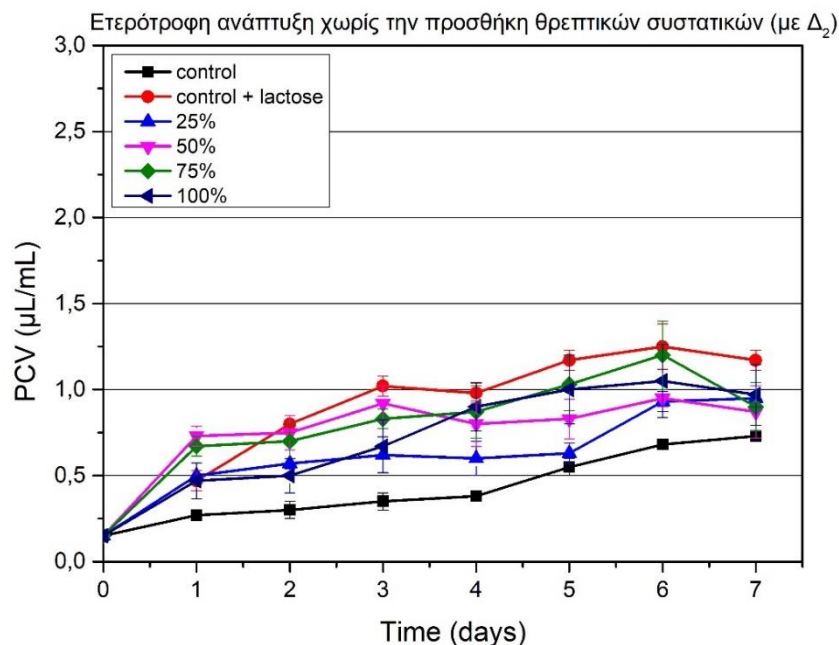
Εικόνα 16: Καμπύλες ανάπτυξης του μικροφύκου *Chlorella* από την ημέρα 0 μέχρι και την ημέρα 7. Η ανάπτυξη των καλλιιεργειών πραγματοποιήθηκε κάτω από μικτότροφες συνθήκες. Οι μετρήσεις του όγκου πακεταρισμένων κυττάρων (PCV) γίνονταν καθημερινά, για 7 ημέρες. Η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ήταν $0,15 \frac{\mu L PCV}{mL}$. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος καθώς και η τυπική απόκλιση (\pm) των τιμών αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ₁ (πρωτογενές παστεριωμένο) με την προσθήκη ιχνοστοιχείων (Hutner's Trace Metals), μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v.

Στην *Εικόνα 17*, όπου στο θρεπτικό μέσο της ετερότροφης καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε Δ₂ πρωτογενές απαστερίωτο τυρόγαλα, φαίνεται ότι η ανάπτυξη δεν ήταν ικανοποιητική σε καμία από τις συνθήκες που μελετήθηκαν. Ειδικότερα, οι τιμές των συγκεντρώσεων των πακεταρισμένων κυττάρων, κυμαίνονται κάτω της τιμής του $1 \frac{\mu L PCV}{mL}$. Οι τιμές αυτές είναι κοντά σε αυτές των μαρτύρων. Όσον αφορά τις συνθήκες 25% και 50%, αυτές εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερη ανάπτυξη συγκριτικά με τις αντίστοιχες συνθήκες, στην αντίστοιχη πειραματική σειρά με το Δ₁.

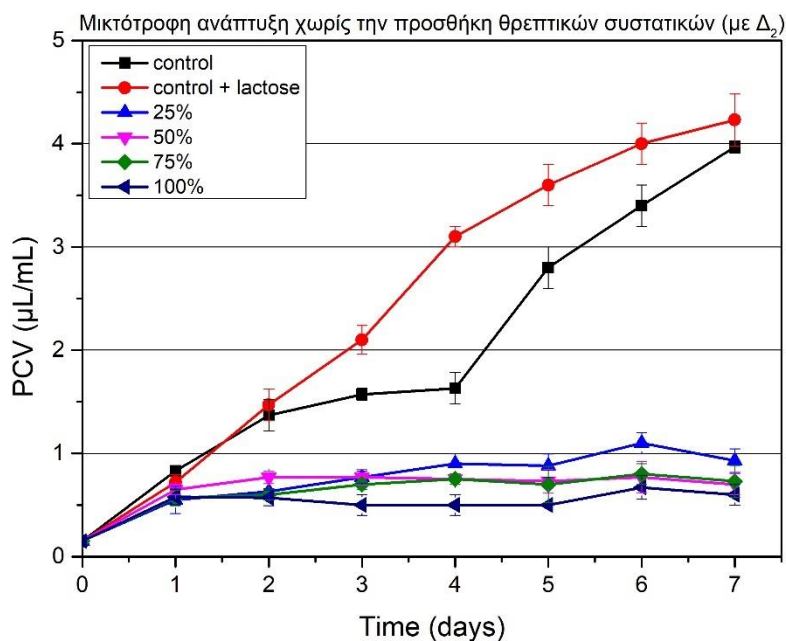
Το ίδιο ισχύει και στην μικτότροφη ανάπτυξη, στην *Εικόνα 18*, όπου με εξαίρεση τις τιμές των δύο μαρτύρων, οι υπόλοιπες τιμές των τεσσάρων συνθηκών ήταν μικρότερες από $1 \frac{\mu L PCV}{mL}$.

Ένας λόγος για την χαμηλή ανάπτυξη, τόσο στην ετερότροφη όσο και στην μικτότροφη καλλιέργεια, αποτελεί η βάση του θρεπτικού μέσου, δηλαδή το τυρόγαλα.

Το συγκεκριμένο τυρόγαλα είναι πρωτογενές απαστερίωτο, το οποίο πιθανόν να έχει υπερβολικά ποσοστά οργανικού άνθρακα αλλά και άλλων ενώσεων, με αποτέλεσμα να δρουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη και στον πολλαπλασιασμό του μικροφύκου.



Εικόνα 17: Καμπύλες ανάπτυξης του μικροφύκου *Chlorella* από την ημέρα 0 μέχρι και την ημέρα 7. Η ανάπτυξη των καλλιεργειών πραγματοποιήθηκε κάτω από ετερότροφες συνθήκες. Οι μετρήσεις του όγκου πακεταρισμένων κυττάρων (PCV) γίνονταν καθημερινά, για 7 ημέρες. Η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ήταν $0,15 \frac{\mu L PCV}{mL}$. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος καθώς και η τυπική απόκλιση (\pm) των τιμών αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ₂ (πρωτογενές απαστερίωτο) χωρίς την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v.



Εικόνα 18: Καμπύλες ανάπτυξης του μικροφύκου *Chlorella* από την ημέρα 0 μέχρι και την ημέρα 7. Η ανάπτυξη των καλλιεργειών πραγματοποιήθηκε κάτω από μικτότροφες συνθήκες. Οι μετρήσεις του όγκου πακεταρισμένων κυττάρων (PCV) γίνονταν καθημερινά, για 7 ημέρες. Η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ήταν $0,15 \frac{\mu\text{L PCV}}{\text{mL}}$. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος καθώς και η τυπική απόκλιση (\pm) των τιμών αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ₂ (πρωτογενές απαστεριώτο) χωρίς την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v.

3.1.2. Ξηρή βιομάζα κυττάρων (Dry Cell Weight, DCW)

Τα αποτελέσματα ξηρής βιομάζας κυττάρων (DCW) την ημέρα 0 και την ημέρα 7 παρουσιάζονται στους παρακάτω Πίνακες 11, 12, 13. Όσον αφορά την ημέρα 0, η ξηρή βιομάζα με τον αρχικό εμβολιασμό των κυττάρων ήταν ίδια για όλα τα πειράματα και τις συνθήκες και ίση με $0,032 \pm 0,002 \text{ mg/mL}$. Ο αριθμός της ξηρής βιομάζας την ημέρα 0 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση ίση με $0,15 \frac{\mu\text{L PCV}}{\text{mL}}$.

Αναφορικά με τον Πίνακα 11 παρατηρείται ότι η μικτότροφη ανάπτυξη οδήγησε σε υψηλότερη παραγωγή ξηρής βιομάζας σε σχέση με την ετερότροφη. Από τις συνθήκες που μελετήθηκαν, η 25% Δ₁ πρωτογενή παστεριωμένα απόβλητα τυροκομείου εμφάνισε την μεγαλύτερη ανάπτυξη, παρά την έλλειψη των θρεπτικών συστατικών. Μάλιστα, στην ετερότροφη ανάπτυξη η ξηρή βιομάζα της συνθήκης 25%

ήταν μεγαλύτερη από το control και το con (lac) (control + lactose 7,5% w/v), στα οποία είχε προστεθεί πηγή αζώτου, πηγή φωσφόρου, πηγή ασβεστίου, πηγή μαγνησίου και ιχνοστοιχεία. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από την *Εικόνα 13*, όπου η συγκέντρωση των πακεταρισμένων κυττάρων την 7^η ημέρα της ετερότροφης καλλιέργειας ήταν μεγαλύτερη και από τους δύο μάρτυρες. Στις συνθήκες 75% και 100% δεν παρουσιάστηκε σημαντική ανάπτυξη, συγκριτικά με την συνθήκη 25%, ενώ υπήρχαν μικρές διαφορές μεταξύ ετερότροφης και μικτότροφης ανάπτυξης. Από τις μετρήσεις ξηρής βιομάζας (DCW) και πακεταρισμένων κυττάρων (PCV) είναι ξεκάθαρο ότι η συνθήκη 25% Δ₁ στην μικτότροφη ανάπτυξη οδηγεί και σε καλύτερα αποτελέσματα.

Πίνακας 11: Αποτελέσματα μετρήσεων ξηρής βιομάζας (DCW) του μικροφύκου *Chlorella*, την 7^η ημέρα καλλιέργειας, για την ετερότροφη και την μικτότροφη ανάπτυξη. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος καθώς και η τυπική απόκλιση (\pm) των τιμών αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ₁ (πρωτογενές παστεριωμένο) χωρίς την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v.

Συνθήκες	DCW (mg/mL) (ετερότροφα)	DCW (mg/mL) (μικτότροφα)
Control	0,246 \pm 0,059	0,942 \pm 0,051
con (lac)	0,296 \pm 0,080	0,812 \pm 0,050
Δ ₁ 25%	0,563 \pm 0,025	0,846 \pm 0,074
Δ ₁ 50%	0,329 \pm 0,040	0,408 \pm 0,108
Δ ₁ 75%	0,222 \pm 0,014	0,216 \pm 0,035
Δ ₁ 100%	0,247 \pm 0,037	0,201 \pm 0,012

Όσον αφορά τον *Πίνακα 12*, όπου στις συνθήκες που μελετήθηκαν προστέθηκαν ιχνοστοιχεία (Hutner's Trace Metals), παρατηρήθηκε μεγαλύτερη αύξηση βιομάζας στην μικτότροφη ανάπτυξη σε σχέση με την ετερότροφη. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η συνθήκη 100%, όπου ισχύει το αντίστροφο. Η μέγιστη αύξηση βιομάζας σημειώθηκε στην συνθήκη 25% με ετερότροφη ανάπτυξη και στην συνθήκη 50% με μικτότροφη ανάπτυξη. Οι ετερότροφες συνθήκες 50% και 75% σημείωσαν, επίσης, υψηλές τιμές στο DCW, πολύ κοντά στην μέγιστη. Γενικά, η προσθήκη των ιχνοστοιχείων φάνηκε ότι βοήθησε τις καλλιέργειες να αναπτυχθούν περαιτέρω σε σχέση με το προηγούμενο πείραμα, στο οποίο δεν είχε γίνει κάποια παρόμοια προσθήκη.

Στις συνθήκες 100% των Πινάκων 11, 12 φαίνεται ότι η μικτότροφη ανάπτυξη οδηγεί μικρότερη ξηρή βιομάζα από ότι η ετερότροφη. Αυτό μπορεί να οφείλεται και σε κάποια παρεμπόδιση στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό της μικτότροφης ανάπτυξης, εξαιτίας της υπερβολικής ποσότητας των θρεπτικών συστατικών (π.χ. λακτόζη, πηγές αζώτου και φωσφόρου) που περιέχονται στην συγκεκριμένη συνθήκη. Τα συστατικά αυτά μπορούν να δράσουν ως ανασταλτικοί παράγοντες στην φωτοσυνθετική διαδικασία, με αποτέλεσμα να δίνουν μικρότερα ποσοστά ξηρής βιομάζας σε σχέση με τα κύτταρα που αναπτύσσονται μόνο ετερότροφα. Μια άλλη εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι η παροχή αέρα προκαλεί καταπόνηση (stress) στα κύτταρα μιας και η αρχική κυτταρική συγκέντρωση είναι πολύ χαμηλή.

Πίνακας 12: Αποτελέσματα μετρήσεων ξηρής βιομάζας (DCW) του μικροφύκου *Chlorella*, την 7^η ημέρα καλλιέργειας, για την ετερότροφη και την μικτότροφη ανάπτυξη. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος καθώς και η τυπική απόκλιση (\pm) των τιμών αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ_1 (πρωτογενές παστεριωμένο) με την προσθήκη ιχνοστοιχείων (Hutner's Trace Metals), μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v.

Συνθήκες	DCW (mg/mL) (ετερότροφα)	DCW (mg/mL) (μικτότροφα)
Control	0,246 \pm 0,059	0,942 \pm 0,051
con (lac)	0,308 \pm 0,047	0,679 \pm 0,120
Δ_1 25% +H	0,617 \pm 0,031	0,692 \pm 0,095
Δ_1 50% +H	0,592 \pm 0,029	0,896 \pm 0,029
Δ_1 75% +H	0,566 \pm 0,057	0,732 \pm 0,098
Δ_1 100% +H	0,284 \pm 0,051	0,158 \pm 0,061

Στο Πίνακα 13 φαίνονται τα αποτελέσματα της ξηρής βιομάζας χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα πρωτογενή απαστερίωτα απόβλητα τυροκομείου (Δ_2). Με μια πρώτη ματιά, φαίνεται ότι υπάρχουν μικρές διαφορές μεταξύ των δύο διαφορετικών τρόπων ανάπτυξης, με την ετερότροφη να οδηγεί σε ελαφρώς μεγαλύτερες τιμές ξηρής βιομάζας. Η συνθήκη με 25% Δ_2 οδηγεί οριακά σε καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τις υπόλοιπες 3 συνθήκες που μελετώνται. Σε σχέση με τις καλλιέργειες των μαρτύρων, τα «control» και «con (lac)» στην ετερότροφη ανάπτυξη, η τιμή της συνθήκης 25% πλησιάζει τον μάρτυρα με την λακτόζη, ενώ στην

μικτότροφη ανάπτυξη οι τιμές των 4 συνθηκών είναι σημαντικά μικρότερες από αυτές των θετικών μαρτύρων.

Πίνακας 13: Αποτελέσματα μετρήσεων ξηρής βιομάζας (DCW) του μικροφύκου *Chlorella*, την 7^η ημέρα καλλιέργειας, για την ετερότροφη και την μικτότροφη ανάπτυξη. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος καθώς και η τυπική απόκλιση (\pm) των τιμών αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ_2 (πρωτογενές παστεριωτό) χωρίς την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v.

Συνθήκες	DCW (mg/mL) (ετερότροφα)	DCW (mg/mL) (μικτότροφα)
Control	0,212 \pm 0,033	0,917 \pm 0,059
con (lac)	0,296 \pm 0,080	0,812 \pm 0,050
Δ_2 25%	0,275 \pm 0,012	0,246 \pm 0,028
Δ_2 50%	0,226 \pm 0,032	0,189 \pm 0,024
Δ_2 75%	0,267 \pm 0,063	0,188 \pm 0,038
Δ_2 100%	0,250 \pm 0,044	0,145 \pm 0,044

Γενικά, φαίνεται ότι τα κύτταρα αναπτύσσονται περισσότερο σε μικτότροφες συνθήκες, αφού εκτός από την εξωτερική πηγή άνθρακα που υπάρχει στα απόβλητα τυροκομείου (π.χ. λακτόζη), αξιοποιούν και το CO₂ που τους παρέχεται μέσω του αερισμού («bubbling»). Το αέριο αυτό είναι απαραίτητο για την φωτοσυνθετική διαδικασία, κατά την οποία τα κύτταρα μπορούν να αναπτύσσονται και να πολλαπλασιάζονται. Έτσι, μπορεί να ερμηνευτεί το γεγονός γιατί στις περισσότερες περιπτώσεις η μικτότροφη καλλιέργεια οδηγούσε σε μεγαλύτερες τιμές βιομάζας και καλύτερη ανάπτυξη. Η αύξηση αυτή της βιομάζας ήταν ανάλογη με την αύξηση του αριθμού των κυττάρων. Από την άλλη, φαίνεται ότι τα ιχνοστοιχεία που προστέθηκαν σε συγκεκριμένο πείραμα, έδωσαν ώθηση στα κύτταρα ώστε να πολλαπλασιαστούν.

3.2. Μετρήσεις pH

Στους Πίνακες 14, 15, 16 παρουσιάζονται οι μετρήσεις του pH την ημέρα 0 και την 7^η ημέρα της καλλιέργειας για την ετερότροφη και την μικτότροφη ανάπτυξη. Την ημέρα 0 οι μετρήσεις αφορούν τόσο την ετερότροφη όσο και την μικτότροφη ανάπτυξη, αφού δεν υπάρχει κάποια διαφοροποίηση ως προς το pH στην αρχή των πειραμάτων. Με μια πρώτη ματιά, φαίνεται ότι το πρωτογενές παστεριωμένο τυρόγαλα

(Δ_1) έχει πιο όξινο pH από το πρωτογενές απαστερίωτο (Δ_2). Στις συνθήκες control και con (lac) για τα 3 πειράματα υπάρχει η ίδια τιμή pH, μιας και η σύστασή τους ήταν ίδια.

Στον Πίνακα 14 παρατηρείται πτώση στις τιμές του pH, με την μεγαλύτερη πτώση να παρατηρείται στην συνθήκη 25% Δ_1 , τόσο στην ετερότροφη όσο και στην μικτότροφη ανάπτυξη. Οι τιμές του pH, στις συγκεκριμένες περιπτώσεις, έπεσαν κάτω από 5. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην παραγωγή κάποιου παραπροϊόντος μεταβολισμού των κυττάρων, το οποίο οδηγούσε σε πιο όξινο pH ή στην κατανάλωση κάποιας άλλης ένωσης η οποία διατηρούσε το pH σε υψηλότερες τιμές. Πάντως, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα συγκέντρωσης καθιζάμενων κυττάρων και ξηρής βιομάζας, φαίνεται ότι μεγαλύτερη ανάπτυξη κυττάρων οδηγεί και σε μεγαλύτερη πτώση pH την ημέρα 7. Αυτό επιβεβαιώνεται και στον Πίνακα 15, στο πείραμα με το πρωτογενές παστεριωμένο τυρόγαλα μαζί με την προσθήκη των ιχνοστοιχείων. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, παρατηρείται μείωση των τιμών pH, με τις συνθήκες 25%, 50% και 75% της ετερότροφης και της μικτότροφης ανάπτυξης να παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες αποκλίσεις από τις αντίστοιχες τιμές της ημέρας 0. Οι συγκεκριμένες συνθήκες ήταν και αυτές που εμφάνισαν υψηλή παραγωγή ξηρής βιομάζας αλλά είχαν και υψηλή συγκέντρωση στις μετρήσεις PCV. Επομένως, φαίνεται ότι μεγαλύτερη ανάπτυξη και κυτταρική συγκέντρωση οδηγεί σε μεγαλύτερη μείωση του pH. Συγκριτικά με τους τρόπους καλλιέργειας, στην μικτότροφη ανάπτυξη παρατηρήθηκε, γενικότερα, μεγαλύτερη πτώση του pH.

Πίνακας 14: Τιμές pH υπερκείμενων διαλυμάτων, την ημέρα 0, πριν τον αρχικό εμβολιασμό των κυττάρων, και την 7^η ημέρα καλλιέργειας, για την ετερότροφη και την μικτότροφη ανάπτυξη. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος καθώς και η τυπική απόκλιση (\pm) των τιμών αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ_1 (πρωτογενές παστεριωμένο) χωρίς την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v.

Συνθήκες	Day 0	Day 7	
	pH	pH (ετερότροφα)	pH (μικτότροφα)
Control	7,25 \pm 0,02	7,26 \pm 0,03	6,35 \pm 0,03
con (lac)	7,15 \pm 0,02	7,10 \pm 0,03	6,07 \pm 0,03
Δ_1 25%	5,38 \pm 0,02	4,80 \pm 0,02	4,62 \pm 0,02
Δ_1 50%	5,32 \pm 0,02	5,19 \pm 0,02	5,16 \pm 0,01
Δ_1 75%	5,30 \pm 0,01	5,30 \pm 0,01	5,27 \pm 0,03
Δ_1 100%	5,25 \pm 0,02	5,29 \pm 0,02	5,27 \pm 0,01

Πίνακας 15: Τιμές pH υπερκείμενων διαλυμάτων, την ημέρα 0, πριν τον αρχικό εμβολιασμό των κυττάρων, και την 7^η ημέρα καλλιέργειας, για την ετερότροφη και την μικτότροφη ανάπτυξη. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος καθώς και η τυπική απόκλιση (\pm) των τιμών αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ_1 (πρωτογενές παστεριωμένο) με την προσθήκη ιχνοστοιχείων (Hutner's Trace Metals), μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v.

Συνθήκες	Day 0	Day 7	
	pH	pH (ετερότροφα)	pH (μικτότροφα)
Control	7,25 \pm 0,02	7,26 \pm 0,03	6,35 \pm 0,03
con (lac)	7,15 \pm 0,02	6,73 \pm 0,03	6,54 \pm 0,05
Δ_1 25% +H	5,38 \pm 0,02	4,27 \pm 0,03	4,30 \pm 0,04
Δ_1 50% +H	5,32 \pm 0,02	4,74 \pm 0,06	4,50 \pm 0,02
Δ_1 75% +H	5,30 \pm 0,01	4,95 \pm 0,05	4,49 \pm 0,01
Δ_1 100% +H	5,25 \pm 0,02	5,09 \pm 0,04	5,46 \pm 0,01

Στον Πίνακα 16, που αναφέρεται στο πείραμα με το πρωτογενές απαστερίωτο τυρόγαλα (Δ_2) χωρίς την προσθήκη των θρεπτικών συστατικών, παρατηρείται και σε αυτή την περίπτωση μείωση των τιμών pH για την ετερότροφη και την μικτότροφη ανάπτυξη. Την μεγαλύτερη μείωση δείχνουν να έχουν οι συνθήκες 25% και 50% Δ_2 ,

όπου η τιμή pH είναι κάτω από 6. Η πτώση αυτή μπορεί να οφείλεται σε έναν από τους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Πίνακας 16: Τιμές pH υπερκείμενων διαλυμάτων, την ημέρα 0, πριν τον αρχικό εμβολιασμό των κυττάρων, και την 7^η ημέρα καλλιέργειας, για την ετερότροφη και την μικτότροφη ανάπτυξη. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος καθώς και η τυπική απόκλιση (\pm) των τιμών αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ_2 (πρωτογενές απαστερωτό) χωρίς την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v.

Συνθήκες	Day 0	Day 7	
	pH	pH (ετερότροφα)	pH (μικτότροφα)
Control	7,25 \pm 0,02	7,20 \pm 0,03	6,32 \pm 0,02
con (lac)	7,15 \pm 0,02	7,10 \pm 0,03	6,07 \pm 0,03
Δ_2 25%	6,41 \pm 0,03	5,73 \pm 0,01	5,53 \pm 0,03
Δ_2 50%	6,35 \pm 0,02	5,31 \pm 0,02	5,92 \pm 0,02
Δ_2 75%	6,31 \pm 0,01	6,05 \pm 0,01	5,51 \pm 0,01
Δ_2 100%	6,27 \pm 0,03	6,05 \pm 0,02	6,01 \pm 0,02

3.3. Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού

Στους παρακάτω Πίνακες 17, 18, 19 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (F_v/F_{max}) την 7^η ημέρα της καλλιέργειας. Στις συνθήκες που δεν υπάρχει τιμή F_v/F_{max} δεν ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί μέτρηση επαγωγικού φθορισμού, λόγω εξαιρετικά χαμηλής κυτταρικής συγκέντρωσης ή καταστροφής του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Από τον Πίνακα 17 φαίνεται ότι με αύξηση της συγκέντρωσης του τυρογάλακτος Δ_1 χωρίς την περαιτέρω προσθήκη θρεπτικών συστατικών, μειώνεται η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση. Αυτό συμβαίνει τόσο στην ετερότροφη όσο και στην μικτότροφη ανάπτυξη. Η συνθήκη 25% παρουσιάζει μεγαλύτερη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση σε σχέση με την συνθήκη 50%. Ειδικότερα, στην ετερότροφη ανάπτυξη η μέτρηση F_v/F_{max} με 25% Δ_1 είναι κατά πολύ μικρότερη σε σχέση με τους δύο μάρτυρες. Από την άλλη, η μέτρηση της συνθήκης 25% Δ_1 στην μικτότροφη ανάπτυξη είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση και με

την αντίστοιχη τιμή της ετερότροφης και με αυτή που περιέχει 50% Δ_1 . Παρόλα αυτά απέχει πολύ από τους δύο μάρτυρες.

Η μείωση του λόγου F_v/F_{max} μπορεί να οφείλεται σε αναστολή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, που προκαλείται από την αυξανόμενη συγκέντρωση τυρογάλακτος. Τα τυροκομικά απόβλητα, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, περιέχουν τεράστιες ποσότητες οργανικών και ανόργανων ενώσεων, τα οποία μπορούν να δράσουν σαν ανασταλτικοί παράγοντες κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου. Επομένως, γίνεται σαφές ότι η συγκέντρωση του τυρογάλακτος επηρεάζει και τις μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού.

Οι μετρήσεις αυτές μπορούν να συσχετιστούν και με την κυτταρική συγκέντρωση. Συγκεκριμένα, η συνθήκη 25% Δ_1 εμφανίζει, εκτός από τον υψηλότερο λόγο F_v/F_{max} , και μεγαλύτερη κυτταρική συγκέντρωση (PCV) σε σχέση με την συνθήκη 50%. Άρα, φαίνεται ότι μεγαλύτερη κυτταρική συγκέντρωση οδηγεί σε μεγαλύτερη τιμή μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας.

Πίνακας 17: Αποτελέσματα μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (F_v/F_{max}) του μικροφύκου *Chlorella*, την 7^η ημέρα καλλιέργειας, για την ετερότροφη και την μικτότροφη ανάπτυξη. Για κάθε συνθήκη λήφθηκαν τριπλέτα μετρήσεων από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος καθώς και η τυπική απόκλιση (\pm) των τιμών αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ_1 (πρωτογενές παστεριωμένο) χωρίς την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, μαζί με δύο control, εκ των οποίων το ένα περιείχε λακτόζη 7,5% w/v. Στις συνθήκες που δεν υπάρχει τιμή F_v/F_{max} δεν ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί μέτρηση επαγωγικού φθορισμού, λόγω εξαιρετικά χαμηλής κυτταρικής συγκέντρωσης, αλλά και καταστροφής του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Συνθήκες	F_v/F_{max} (ετερότροφα)	F_v/F_{max} (μικτότροφα)
Control	0,788 ± 0,013	0,717 ± 0,019
con (lac)	0,703 ± 0,045	0,538 ± 0,067
Δ_1 25%	0,062 ± 0,020	0,311 ± 0,068
Δ_1 50%	0,044 ± 0,001	0,058 ± 0,017
Δ_1 75%	-	-
Δ_1 100%	-	-

Η ίδια τάση παρατηρείται και στον Πίνακα 18, όπου η αυξανόμενη συγκέντρωση τυρογάλακτος Δ_1 δίνει μικρότερο λόγο F_v/F_{max} . Και σε αυτό το πείραμα η συνθήκη 25% παρουσιάζει τις καλύτερες μετρήσεις στην ετερότροφη και στην

μικτότροφη ανάπτυξη σε σχέση με τις υπόλοιπες που μελετήθηκαν. Όμως, στην συγκεκριμένη περίπτωση, οι μεγαλύτερες τιμές επαγωγικού φθορισμού δεν συνοδεύτηκαν με τις μεγαλύτερες τιμές κυτταρικής ανάπτυξης (PCV & DCW), όπως συνέβη στο προηγούμενο πείραμα.

Πίνακας 18: Αποτελέσματα μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (F_v/F_{max}) του μικροφύκου *Chlorella*, την 7^η ημέρα καλλιέργειας, για την ετερότροφη και την μικτότροφη ανάπτυξη. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος καθώς και η τυπική απόκλιση (\pm) των τιμών αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ_1 (πρωτογενές παστεριωμένο) με την προσθήκη ιχνοστοιχείων (Hutner's Trace Metals), μαζί με δύο control, εκ των οποίων το ένα περιείχε λακτόζη 7,5% w/v. Στις συνθήκες που δεν υπάρχει τιμή F_v/F_{max} δεν ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί μέτρηση επαγωγικού φθορισμού, λόγω εξαιρετικά χαμηλής κυτταρικής συγκέντρωσης, αλλά και καταστροφής του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Συνθήκες	F_v/F_{max} (ετερότροφα)	F_v/F_{max} (μικτότροφα)
Control	0,788 \pm 0,013	0,717 \pm 0,019
con (lac)	0,723 \pm 0,034	0,587 \pm 0,043
Δ_1 25% +H	0,471 \pm 0,037	0,410 \pm 0,111
Δ_1 50% +H	-	0,197 \pm 0,075
Δ_1 75% +H	0,226 \pm 0,040	-
Δ_1 100% +H	-	-

Τέλος, από τον Πίνακα 19 φαίνεται ότι δεν πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού στις συνθήκες 50%, 75% και 100% με τυρόγαλα Δ_2 . Έτσι, η μοναδική συνθήκη που μετρήθηκε (25%) συγκρίθηκε με τους δύο μάρτυρες. Στην ετερότροφη καλλιέργεια η τιμή ήταν πολύ πιο χαμηλή από τις δύο των control, ενώ στην μικτότροφη καλλιέργεια η τιμή της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης ξεπέρασε οριακά εκείνη του μάρτυρα με την λακτόζη. Συμπερασματικά, είναι προφανές ότι η μικτότροφη ανάπτυξη σε 25% Δ_2 τυρόγαλα, οδήγησε σε ικανοποιητικά αποτελέσματα, όσον αφορά τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Ο μηχανισμός φάνηκε ότι δεν επηρεάστηκε μετά την χρήση τυρογάλακτος ως θρεπτικό μέσο, παρόλο που η κυτταρική συγκέντρωση ήταν πολύ χαμηλή.

Πίνακας 19: Αποτελέσματα μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (F_v/F_{max}) του μικροφύκου *Chlorella*, την 7^η ημέρα καλλιέργειας, για την ετερότροφη και την μικτότροφη ανάπτυξη. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος καθώς και η τυπική απόκλιση (\pm) των τιμών αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ_2 (πρωτογενές απαστερίωτο) χωρίς την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, μαζί με δύο control, εκ των οποίων το ένα περιείχε λακτόζη 7,5% w/v. Στις συνθήκες που δεν υπάρχει τιμή F_v/F_{max} δεν ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί μέτρηση επαγωγικού φθορισμού, λόγω εξαιρετικά χαμηλής κυτταρικής συγκέντρωσης, αλλά και καταστροφής του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Συνθήκες	F_v/F_{max} (ετερότροφα)	F_v/F_{max} (μικτότροφα)
Control	0,750 \pm 0,019	0,689 \pm 0,005
con (lac)	0,703 \pm 0,045	0,538 \pm 0,067
Δ_2 25%	0,208 \pm 0,071	0,541 \pm 0,074
Δ_2 50%	-	-
Δ_2 75%	-	-
Δ_2 100%	-	-

3.4. Αποτελέσματα συγκεντρώσεων φωτοσυνθετικών χρωστικών

Στον Πίνακα 20 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης-a, της χλωροφύλλης-b και των ολικών καροτενίων και ξανθοφυλλών την ημέρα 0 της καλλιέργειας. Στους Πίνακες 21, 23, 25 αναγράφονται οι τιμές των φωτοσυνθετικών χρωστικών σε ετερότροφες συνθήκες, ενώ στους Πίνακες 22, 24, 26 αναγράφονται οι τιμές που αναφέρονται στην μικτότροφη ανάπτυξη, στα 3 πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

Πίνακας 20: Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις (\pm) των συγκεντρώσεων χλωροφύλλης-a, χλωροφύλλης-b και των ολικών καροτενίων και ξανθοφυλλών, την ημέρα 0, αμέσως μετά τον αρχικό εμβολιασμό των κυττάρων. Οι τιμές αυτές αφορούν όλα τα πειράματα, τόσο για την ετερότροφη όσο και για την μικτότροφη ανάπτυξη.

Day 0		
C_a ($\mu\text{g/mL}$)	C_b ($\mu\text{g/mL}$)	C_{x+c} ($\mu\text{g/mL}$)
0,68 \pm 0,05	0,19 \pm 0,04	0,28 \pm 0,02

Στους Πίνακες 21, 22 παρουσιάζονται οι τιμές των φωτοσυνθετικών χρωστικών για την ετερότροφη και την μικτότροφη ανάπτυξη αντίστοιχα. Από τις συνθήκες που

μελετήθηκαν μόνο η 25% Δ₁ στην ετερότροφη και οι 25% Δ₁ και 50% Δ₁ στην μικτότροφη έδωσαν αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις των χρωστικών. Οι συνθήκες 25% Δ₁ ήταν και εκείνες που έδωσαν και τις μεγαλύτερες τιμές βιομάζας και κυτταρικής συγκέντρωσης, υποδεικνύοντας ότι αναπτύσσονταν κάτω από σχετικά ευνοϊκές συνθήκες. Η ανάπτυξή τους αυτή συνοδεύτηκε και με ικανοποιητικές τιμές στις συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης-a, της χλωροφύλλης-b και των ολικών καροτενοειδών.

Πίνακας 21: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων χλωροφύλλης-a, χλωροφύλλης-b και ολικών καροτενίων και ξανθοφυλλών, την 7^η ημέρα της καλλιέργειας, για την ετερότροφη ανάπτυξη. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων απορρόφησης από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση (\pm) αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ₁ (πρωτογενές παστεριωμένο) χωρίς την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v. Στις συνθήκες που δεν υπάρχει τιμή συγκέντρωσης για τις διάφορες χρωστικές, οι τιμές των απορροφήσεων ήταν 0.

Day 7			
Συνθήκες	C_a (μg/mL)	C_b (μg/mL)	C_{x+c} (μg/mL)
control	3,74 ± 0,05	1,09 ± 0,04	1,47 ± 0,03
con (lac)	4,36 ± 0,10	1,38 ± 0,08	1,57 ± 0,03
Δ ₁ 25%	1,52 ± 0,10	0,86 ± 0,05	0,84 ± 0,07
Δ ₁ 50%	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Δ ₁ 75%	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Δ ₁ 100%	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Πίνακας 22: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων χλωροφύλλης-a, χλωροφύλλης-b και ολικών καροτενίων και ξανθοφυλλών, την 7^η ημέρα της καλλιέργειας, για την μικτότροφη ανάπτυξη. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων απορρόφησης από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση (\pm) αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ_1 (πρωτογενές παστεριωμένο) χωρίς την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v. Στις συνθήκες που δεν υπάρχει τιμή συγκέντρωσης για τις διάφορες χρωστικές, οι τιμές των απορροφήσεων ήταν 0.

Day 7			
Συνθήκες	C_a (μg/mL)	C_b (μg/mL)	C_{x+c} (μg/mL)
control	16,96 \pm 1,36	6,27 \pm 2,80	5,26 \pm 0,52
con (lac)	10,32 \pm 0,46	3,39 \pm 0,34	3,49 \pm 0,13
Δ_1 25%	2,49 \pm 0,04	1,21 \pm 0,04	1,03 \pm 0,04
Δ_1 50%	0,34 \pm 0,04	0,04 \pm 0,05	0,34 \pm 0,02
Δ_1 75%	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Δ_1 100%	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00

Οι τιμές των χρωστικών, στο πείραμα με την προσθήκη των ιχνοστοιχείων, παρουσιάζονται στους Πίνακες 23, 24 για την ετερότροφη και την μικτότροφη καλλιέργεια, αντίστοιχα. Από την ετερότροφη ανάπτυξη, οι συνθήκες που έδωσαν τιμές ήταν οι 25% Δ_1 και 75% Δ_1 . Η 25% πλησίαζε σε πολύ καλό βαθμό τις αντίστοιχες τιμές του θετικού μάρτυρα χωρίς την λακτόζη, ενώ η 75% οδήγησε σε πολύ χαμηλά αποτελέσματα. Στην μικτότροφη ανάπτυξη, καμία από τις προς μελέτη συνθήκες δεν έδωσε τιμές συγκεντρώσεων χρωστικών, το οποίο ήταν μη αναμενόμενο για δύο λόγους. Αρχικά, στην μικτότροφη ανάπτυξη τα κύτταρα αξιοποιούν και την διαδικασία της φωτοσύνθεσης για τον πολλαπλασιασμό τους, επομένως οι χρωστικές θα έπρεπε να είναι σε υψηλή συγκέντρωση λόγω της χρησιμότητάς τους στην δέσμευση της ηλιακής ακτινοβολίας. Επίσης, από τις μετρήσεις κυτταρικής συγκέντρωσης και ξηρής βιομάζας, τα κύτταρα σε αυτές τις συνθήκες παρουσίασαν πολύ καλή ανάπτυξη, η οποία δεν συνοδεύτηκε με τις αναμενόμενες συγκεντρώσεις των φωτοσυνθετικών χρωστικών. Το πιο πιθανό σενάριο, είναι ότι ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός μπλοκαρίστηκε εξαιτίας κάποιας ένωσης του τυρογάλακτος, που βρίσκεται σε πλεόνασμα, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η παραγωγή των χρωστικών. Στις συνθήκες καταπόνησης των κυττάρων (συνθήκες stress), τα κύτταρα προσπαθούν να

προσαρμοστούν στις νέες συνθήκες με αποτέλεσμα κάποιες ενώσεις να μειώνονται και κάποιες άλλες να αυξάνονται.

Πίνακας 23: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων χλωροφύλλης-a, χλωροφύλλης-b και ολικών καροτενίων και ξανθοφυλλών, την 7^η ημέρα της καλλιέργειας, για την ετερότροφη ανάπτυξη. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων απορρόφησης από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση (\pm) αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ_1 (πρωτογενές παστεριωμένο) με την προσθήκη ιχνοστοιχείων (Hutner's Trace Metals), μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v. Στις συνθήκες που δεν υπάρχει τιμή συγκέντρωσης για τις διάφορες χρωστικές, οι τιμές των απορροφήσεων ήταν 0.

Day 7			
Συνθήκες	C_a (μg/mL)	C_b (μg/mL)	C_{x+c} (μg/mL)
Control	3,74 \pm 0,05	1,09 \pm 0,04	1,47 \pm 0,03
con (lac)	4,80 \pm 0,17	1,70 \pm 0,04	1,65 \pm 0,06
Δ_1 25% +H	2,23 \pm 0,07	0,90 \pm 0,03	0,62 \pm 0,02
Δ_1 50% +H	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Δ_1 75% +H	0,83 \pm 0,03	0,49 \pm 0,10	0,26 \pm 0,04
Δ_1 100% +H	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00

Πίνακας 24: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων χλωροφύλλης-a, χλωροφύλλης-b και ολικών καροτενίων και ξανθοφυλλών, την 7^η ημέρα της καλλιέργειας, για την μικτότροφη ανάπτυξη. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων απορρόφησης από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση (\pm) αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ_1 (πρωτογενές παστεριωμένο) με την προσθήκη ιχνοστοιχείων (Hutner's Trace Metals), μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v. Στις συνθήκες που δεν υπάρχει τιμή συγκέντρωσης για τις διάφορες χρωστικές, οι τιμές των απορροφήσεων ήταν 0.

Day 7			
Συνθήκες	C_a (μg/mL)	C_b (μg/mL)	C_{x+c} (μg/mL)
Control	16,96 \pm 1,36	6,27 \pm 2,80	5,26 \pm 0,52
con (lac)	6,59 \pm 0,32	0,85 \pm 0,64	3,02 \pm 0,08
Δ_1 25% +H	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Δ_1 50% +H	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Δ_1 75% +H	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Δ_1 100% +H	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00

Τέλος, στους Πίνακες 25, 26 παρουσιάζονται οι τιμές των χρωστικών για το πείραμα με το πρωτογενές απαστερίωτο Δ₂ τυρόγαλα. Καμία από τις προς μελέτη συνθήκες δεν οδήγησε σε αποτέλεσμα, κάτι που σημαίνει ότι το Δ₂ τυρόγαλα προκάλεσε έντονη καταπόνηση στα κύτταρα, με συνέπεια να επηρεάζονται οι φωτοσυνθετικές χρωστικές. Οι καλλιέργειες σε θρεπτικό μέσο με βάση το Δ₂ δεν έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα, και ως εκ τούτου κρίνεται απαραίτητη η αλλαγή των συνθηκών για την ανάπτυξη των κυττάρων σε παρόμοια περιβάλλοντα.

Πίνακας 25: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων χλωροφύλλης-a, χλωροφύλλης-b και ολικών καροτενίων και ξανθοφυλλών, την 7^η ημέρα της καλλιέργειας, για την ετερότροφη ανάπτυξη. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων απορρόφησης από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση (\pm) αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ₂ (πρωτογενές απαστερίωτο) χωρίς την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v. Στις συνθήκες που δεν υπάρχει τιμή συγκέντρωσης για τις διάφορες χρωστικές, οι τιμές των απορροφήσεων ήταν 0.

Day 7			
Συνθήκες	C_a (μg/mL)	C_b (μg/mL)	C_{x+c} (μg/mL)
control	2,32 \pm 0,13	0,27 \pm 0,23	1,14 \pm 0,06
con (lac)	4,36 \pm 0,10	1,38 \pm 0,08	1,57 \pm 0,03
Δ ₂ 25%	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Δ ₂ 50%	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Δ ₂ 75%	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Δ ₂ 100%	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00

Πίνακας 26: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων χλωροφύλλης-a, χλωροφύλλης-b και ολικών καροτενίων και ξανθοφυλλών, την 7^η ημέρα της καλλιέργειας, για την μικτότροφη ανάπτυξη. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων απορρόφησης από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση (\pm) αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ_2 (πρωτογενές απαστερίωτο) χωρίς την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v. Στις συνθήκες που δεν υπάρχει τιμή συγκέντρωσης για τις διάφορες χρωστικές, οι τιμές των απορροφήσεων ήταν 0.

Day 7			
Συνθήκες	C_a (μg/mL)	C_b (μg/mL)	C_{x+c} (μg/mL)
control	16,96 \pm 1,36	6,27 \pm 2,80	5,26 \pm 0,52
con (lac)	10,32 \pm 0,46	3,39 \pm 0,34	3,49 \pm 0,13
Δ_2 25%	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Δ_2 50%	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Δ_2 75%	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Δ_2 100%	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00

3.5. Αποτελέσματα ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής O₂

Στους Πίνακες 27, 28, 29 παρουσιάζονται οι τιμές του ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου εκφρασμένες σε mmol O₂ (mol Chl)⁻¹·min⁻¹, την 7^η ημέρα της καλλιέργειας, τόσο για την ετερότροφη όσο και για την μικτότροφη ανάπτυξη. Στις συνθήκες που η τιμή είναι μηδέν δεν παρατηρήθηκε καθόλου φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου, λόγω βλάβης του φωτοσυστήματος II. Ένας άλλος λόγος θα μπορούσε να είναι και ο κυτταρικός θάνατος την 7^η ημέρα της καλλιέργειας, με αποτέλεσμα να μην παρατηρείται καθόλου φωτοσυνθετική δραστηριότητα και άρα παραγωγή οξυγόνου. Στους παρακάτω πίνακες όλες οι συνθήκες «control» και «con (lac)» έδειξαν να έχουν φωτοσυνθετική δραστηριότητα με παραγωγή οξυγόνου. Αυτό είναι αναμενόμενο, αφού το θρεπτικό μέσο των μαρτύρων είναι ένα υδατικό διάλυμα εμπλουτισμένο με τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, όπως φώσφορο, άζωτο και ιχνοστοιχεία (συν λακτόζη ο ένας από τους δύο μάρτυρες). Τα θρεπτικά αυτά συστατικά βοηθούν στην ανάπτυξη και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, διατηρώντας σε υγιή κατάσταση τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό με αποτέλεσμα ο ρυθμός παραγωγή οξυγόνου να είναι αρκετά υψηλός.

Στον Πίνακα 27 όλες οι συνθήκες για την ετερότροφη ανάπτυξη είχαν ρυθμό παραγωγής οξυγόνου μηδέν. Αυτή η παρατήρηση ισχύει και για την μικτότροφη ανάπτυξη, με εξαίρεση να αποτελεί η συνθήκη 25% Δ₁, όπου η τιμή του ρυθμού προσεγγίζει σε σημαντικό βαθμό την τιμή του αντίστοιχου μάρτυρα (χωρίς την λακτόζη). Αυτό δείχνει ότι η ποσότητα του τυρογάλακτος στην συγκεκριμένη συνθήκη δεν δρούσε ανασταλτικά στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό και στο φωτοσύστημα II. Η μικτότροφη συνθήκη 25% Δ₁ ήταν εκείνη που κατέληξε στην μεγαλύτερη τιμή κυτταρικής συγκέντρωσης και ξηρής βιομάζας. Επίσης, η συγκέντρωση της χλωροφύλλης-a σε σχέση με τις άλλες συνθήκες που μελετήθηκαν (πλην των δύο μαρτύρων) ήταν η μεγαλύτερη.

Πίνακας 27: Αποτελέσματα ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου εκφρασμένα σε mmol O₂ (mol Chl)⁻¹·min⁻¹, την 7^η ημέρα της καλλιέργειας, για την ετερότροφη και την μικτότροφη ανάπτυξη. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων απορρόφησης από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση (±) αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ₁ (πρωτογενές παστεριωμένο) χωρίς την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v. Στις συνθήκες με τιμή μηδέν δεν υπήρχε φωτοσυνθετική δραστηριότητα.

Day 7		
Συνθήκες	Ρυθμός παραγωγής οξυγόνου [mmol O₂ (mol Chl)⁻¹·min⁻¹] (ετερότροφα)	Ρυθμός παραγωγής οξυγόνου [mmol O₂ (mol Chl)⁻¹·min⁻¹] (μικτότροφα)
Control	936,27 ± 251,45	862,07 ± 142,62
con (lac)	460,23 ± 0,00	73,05 ± 5,06
Δ ₁ 25%	0,00 ± 0,00	789,47 ± 112,78
Δ ₁ 50%	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Δ ₁ 75%	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Δ ₁ 100%	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Όσον αφορά τον Πίνακα 28, φαίνεται και πάλι ότι μόνο μία συνθήκη οδήγησε σε αποτελέσματα ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου, η 25% Δ₁ στην ετερότροφη ανάπτυξη. Η τιμή αυτή, βέβαια, είναι πολύ πιο χαμηλή σε σχέση και με την προηγούμενη συνθήκη που αναλύθηκε στον Πίνακα 27 και σε σχέση με τους δύο θετικούς μάρτυρες του συγκεκριμένου πειράματος. Αυτό υποδηλώνει μια βλάβη στον

φωτοσυνθετικό μηχανισμό, που μπορεί να οφείλεται στην βάση του θρεπτικού μέσου, το τυρόγαλα.

Πίνακας 28: Αποτελέσματα ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου εκφρασμένα σε $\text{mmol O}_2 (\text{mol Chl})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, την 7^η ημέρα της καλλιέργειας, για την ετερότροφη και την μικτότροφη ανάπτυξη. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων απορρόφησης από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση (\pm) αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ_1 (πρωτογενές παστεριωμένο) με την προσθήκη ιχνοστοιχείων (Hutner's Trace Metals), μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v. Στις συνθήκες με τιμή μηδέν δεν υπήρχε φωτοσυνθετική δραστηριότητα.

Day 7		
Συνθήκες	Ρυθμός παραγωγής οξυγόνου [$\text{mmol O}_2 (\text{mol Chl})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] (ετερότροφα)	Ρυθμός παραγωγής οξυγόνου [$\text{mmol O}_2 (\text{mol Chl})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] (μικτότροφα)
Control	936,27 \pm 251,45	862,07 \pm 142,62
con (lac)	681,88 \pm 116,47	209,41 \pm 64,44
Δ_1 25%	38,38 \pm 66,47	0,00 \pm 0,00
Δ_1 50%	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Δ_1 75%	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Δ_1 100%	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00

Τέλος, στον Πίνακα 29 καμία από τις προς μελέτη συνθήκες δεν έδειξε να έχει φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου. Κατά τη χρήση του συγκεκριμένου τυρογάλακτος τα κύτταρα δεν εμφάνισαν ούτε ανάπτυξη ούτε και φωτοσυνθετική δραστηριότητα, όπως είναι φανερό και από τις μετρήσεις κυτταρικής συγκέντρωσης, ξηρής βιομάζας, επαγωγικού φθορισμού και φωτοσυνθετικών χρωστικών. Αυτό υποδηλώνει ότι η αξιοποίησή του μπορεί να συμβεί σε συνδυασμό με άλλες συνθήκες, όπως για παράδειγμα με την προσθήκη θρεπτικών συστατικών.

Πίνακας 29: Αποτελέσματα ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου εκφρασμένα σε $\text{mmol O}_2 (\text{mol Chl})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, την 7^η ημέρα της καλλιέργειας, για την ετερότροφη και την μικτότροφη ανάπτυξη. Για κάθε συνθήκη λήφθηκε τριπλέτα μετρήσεων απορρόφησης από τις οποίες προέκυψε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση (\pm) αυτών. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βαθμίδωση συγκέντρωσης τυρογάλακτος Δ_2 (πρωτογενές παστεριώτο) χωρίς την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, μαζί με δύο μάρτυρες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε λακτόζη 7,5% w/v. Στις συνθήκες με τιμή μηδέν δεν υπήρχε φωτοσυνθετική δραστηριότητα.

Day 7		
Συνθήκες	Ρυθμός παραγωγής οξυγόνου [$\text{mmol O}_2 (\text{mol Chl})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] (ετερότροφα)	Ρυθμός παραγωγής οξυγόνου [$\text{mmol O}_2 (\text{mol Chl})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] (μικτότροφα)
Control	1171,86 \pm 227,00	2121,69 \pm 265,04
con (lac)	460,23 \pm 0,00	73,05 \pm 5,06
Δ_2 25%	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Δ_2 50%	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Δ_2 75%	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Δ_2 100%	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00

3.6. Συζήτηση αποτελεσμάτων

Έχοντας ερμηνεύσει και συζητήσει τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι προφανές ότι το μικροφύκος του γένους *Chlorella* έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται καλύτερα στο πρωτογενές παστεριωμένο τυρόγαλα (Δ_1) από ότι στο παστεριώτο (Δ_2). Αυτό φαίνεται και από τις καμπύλες ανάπτυξης μεταξύ των δύο πειραμάτων που δεν έγινε προσθήκη θρεπτικών συστατικών. Η ανάπτυξη των κυττάρων ήταν ελαφρώς βελτιωμένη στο θρεπτικό μέσο με το Δ_1 τυρόγαλα. Με την προσθήκη των ιχνοστοιχείων τα κύτταρα εμφάνισαν αξιοσημείωτη ανάπτυξη συγκριτικά με την πειραματική σειρά στο ίδιο τυρόγαλα, όπου δεν πραγματοποιήθηκε κάποια ανάλογη προσθήκη. Φαίνεται ότι τα ιχνοστοιχεία απουσιάζουν από το πρωτογενές τυρόγαλα Δ_1 με αποτέλεσμα να δυσχαιραίνεται η ανάπτυξη των κυττάρων. Πιθανόν, κάποια ανάλογη προσθήκη θρεπτικών συστατικών στο θρεπτικό μέσο με το Δ_2 να οδηγούσε σε περαιτέρω ανάπτυξη στα κύτταρα. Η μικτοτρόφη ανάπτυξη οδήγησε σε καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την ετερότροφη, λόγω της

αξιοποίησης του CO₂ σαν πηγή άνθρακα μέσω φωτοσύνθεσης, πέρα από το οργανικό υπόστρωμα που υπήρχε στα πρωτογενή απόβλητα τυροκομείου. Τα καλύτερα αποτελέσματα κυτταρικής συγκέντρωσης και ξηρής βιομάζας παρατηρήθηκαν στην συνθήκη 25% Δ₁ στην μικτότροφη ανάπτυξη χωρίς την προσθήκη θρεπτικών και στην συνθήκη 50% Δ₁ στην μικτότροφη ανάπτυξη με την προσθήκη των ιχνοστοιχείων. Με την χρήση του Δ₂ ως βάση για το θρεπτικό μέσο δεν παρατηρήθηκε ικανοποιητική ανάπτυξη σε συγκρίσιμο βαθμό με τις προηγούμενες δύο συνθήκες. Όσον αφορά τις μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού, τις συγκεντρώσεις των φωτοσυνθετικών χρωστικών και τον ρυθμό φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου έδειξαν ότι επηρεάζονται σε σημαντικό βαθμό από την σύσταση του τυρογάλακτος που χρησιμοποιείται. Για αυτό τον λόγο, κρίνεται αναγκαία η περαιτέρω μελέτη των συνθηκών ανάπτυξης του μικροφύκου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Τα απόβλητα τυροκομείων περιέχουν θρεπτικά συστατικά, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την καλλιέργεια μικροφυκών.
- Το πρωτογενές παστεριωμένο τυρόγαλα (Δ_1) οδήγησε τα κύτταρα *Chlorella* σε μεγαλύτερη ανάπτυξη σε σχέση με το πρωτογενές απαστερίωτο (Δ_2).
- Η μικτότροφη ανάπτυξη αποδείχθηκε αποδοτικότερη σε σχέση με την ετερότροφη, λόγω υψηλότερης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, με την παροχή αερίου CO_2 , πέρα από την αξιοποίηση του οργανικού υποστρώματος.
- Υψηλές συγκεντρώσεις τυρογάλακτος (75% και 100%) προκαλούν καταπόνηση στα κύτταρα και οδηγούν σε χαμηλές τιμές ανάπτυξης.
- Η προσθήκη διαλύματος ιχνοστοιχείων (Hutner's Trace Metals) οδήγησε σε αισθητά βελτιωμένη κυτταρική ανάπτυξη, ακόμα και στις συνθήκες που χωρίς την προσθήκη του, δεν σημειωνόταν σημαντική ανάπτυξη.
- Υψηλότερες τιμές κυτταρικής συγκέντρωσης (PCV) και ξηρής βιομάζας (DCW) παρατηρήθηκαν στην συνθήκη 25% Δ_1 στην μικτότροφη ανάπτυξη χωρίς την προσθήκη θρεπτικών και στην συνθήκη 50% Δ_1 στην μικτότροφη ανάπτυξη με την προσθήκη των ιχνοστοιχείων. Με την χρήση του Δ_2 ως βάση για το θρεπτικό μέσο δεν παρατηρήθηκε ικανοποιητική ανάπτυξη σε συγκρίσιμο βαθμό με τις προηγούμενες δύο συνθήκες.
- Όσον αφορά το pH, αύξηση της κυτταρικής συγκέντρωσης οδήγησε σε μείωση του pH την ημέρα 7 της κάθε καλλιέργειας.
- Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές επηρεάστηκαν από τις νέες συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων (σε θρεπτικό μέσο με τυρόγαλα) με αποτέλεσμα να δώσουν πολύ χαμηλές τιμές σε λίγες περιπτώσεις, ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις οι συγκεντρώσεις ήταν μηδέν.
- Οι μετρήσεις του ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου ήταν σημαντικά χαμηλές, με μοναδική εξαίρεση την συνθήκη 25% Δ_1 χωρίς την προσθήκη των θρεπτικών συστατικών στην μικτότροφη ανάπτυξη. Η ίδια συνθήκη οδήγησε σε πολύ καλές τιμές κυτταρικής συγκέντρωσης, ξηρής βιομάζας, επαγωγικού φθορισμού και χρωστικών.

- Με βάση τις μετρήσεις κυτταρικής συγκέντρωσης και ξηρής βιομάζας η συνθήκη 50%, στην μικτότροφη καλλιέργεια με την προσθήκη ιχνοστοιχείων, έδωσε τις υψηλότερες τιμές. Για αυτό τον λόγο κρίθηκε ως η πιο αποδοτική συνθήκη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Με την παρούσα διπλωματική εργασία έγινε ακόμα ένα βήμα στην μελέτη της βιοαποκατάστασης υγρών αποβλήτων τυροκομείου, με την χρήση πράσινων μικροφυκών. Ειδικότερα, μελετήθηκε η ανάπτυξη της *Chlorella* σε υγρά θρεπτικά μέσα, τα οποία βασίζονται σε τυροκομικά απόβλητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το συγκεκριμένο στέλεχος έχει τη δυνατότητα να επιτύχει ανάπτυξη σε συγκρίσιμο βαθμό με τυπικά θρεπτικά μέσα ανάπτυξης μικροφυκών. Στην βιβλιογραφία, υπάρχει πληθώρα μελετών για τους φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς και τη λεγόμενη φυκοαποκατάσταση των γαλακτοκομικών λυμάτων. Πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε φύκια που “γεννήθηκαν” σε μολυσμένα περιβάλλοντα (λύματα) και σε αλληλεπιδράσεις μικροβίων για αποτελεσματικότερη απομάκρυνση θρεπτικών συστατικών. Το φαινόμενο της «συμβίωσης» μεταξύ διαφορετικών μικροοργανισμών θα μπορούσε να οδηγήσει σε υψηλότερες αποδόσεις βιομάζας και βιοαποκατάστασης. Για παράδειγμα, στην περίπτωση των γαλακτοκομικών αποβλήτων και των μικροφυκών, θα μπορούσε να συνδυαστεί καλλιέργεια βακτηριακών στελεχών που βιοαποικοδομεί περίπλοκες ενώσεις, δίνοντας νέα «τροφή» στα μικροφύκη.

Με την βιοαποκατάσταση, επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των θρεπτικών συστατικών των λυμάτων, τα οποία βρίσκονται σε σημαντικές ποσότητες και ευθύνονται για το φαινόμενο του ευτροφισμού. Τα πράσινα μικροφύκη, τα οποία αναπτύσσονται αυτότροφα, ετερότροφα αλλά και μικτότροφα, έχουν την ικανότητα να αξιοποιούν τις ανόργανες πηγές αζώτου και φωσφόρου, τον οργανικό και ανόργανο άνθρακα, καθώς και τα ιχνοστοιχεία, που βρίσκονται στα διάφορα είδη λυμάτων. Επόμενο βήμα είναι να πραγματοποιηθεί μια ευρύτερη μελέτη για την αξιολόγηση της βιοαποκατάστασης από στελέχη *Chlorella* σε μεγαλύτερη κλίμακα (π.χ. σε βιοαντιδραστήρες ή ακόμα και απευθείας στο επιβαρυνόμενο περιβάλλον). Επίσης, σημαντικές είναι και οι έρευνες που αφορούν τις συνθήκες ανάπτυξης (π.χ. αλλαγή του pH στο θρεπτικό, αλλαγή στη θερμοκρασία καλλιέργειας των μικροοργανισμών, μεταβολή στην ένταση του φωτισμού κ.λπ.), ώστε να υπάρχει περαιτέρω διερεύνηση των παραγόντων που επηρεάζουν την ικανότητα προσαρμογής στα απόβλητα. Τέλος, ζωτικής σημασίας είναι και η προσπάθεια ακινητοποίησης των μικροφυκών σε βιοσυμβατά υλικά (π.χ. σφαιρίδια αλγινικού), προκειμένου να προχωρήσει και να

επιτευχθεί ο απώτερος σκοπός της φυκοαποκατάστασης σε μεγαλύτερη κλίμακα και συστήματα.

Συνοψίζοντας, αποδείχθηκε πως τα μικροφύκη έχουν τη δυνατότητα να προσαρμόζονται σε διαφορετικά περιβάλλοντα με ταυτόχρονη αύξηση της βιομάζας τους, προσφέροντας λύσεις σε μια σειρά διαφορετικών σύγχρονων προβλημάτων, όπως την παραγωγή τροφίμων και ενέργειας και τη διαχείριση υδατικών λυμάτων. Αυτή η ευελιξία τους τα καθιστά τους πλέον κατάλληλους υποψήφιους για βιοτεχνολογικές εφαρμογές στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας και της αειφόρου ανάπτυξης. Από τα παραπάνω, κρίνεται απαραίτητο να συνεχιστεί η ερευνητική μελέτη πάνω σε αυτό το πεδίο. Η εκμετάλλευση των φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών μπορεί να ανοίξει νέες πόρτες στο ζήτημα των εναλλακτικών μορφών ενέργειας, σε συνδυασμό με την αποκατάσταση του περιβάλλοντος.

URL LINKS

- I. https://www.tpp.ch/page/produkte/07_pcv_roehrchen.php (Εικόνα 8)
- II. <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/product/sigma/z719919> (Εικόνα 8)
- III. <https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A6%CE%B1%CF%83%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%BF%CF%86%CF%89%CF%84%CF%8C%CE%BC%CE%B5%CF%84%CF%81%CE%BF> (Εικόνα 9)
- IV. <http://www.hansatech-instruments.com/product/handy-pea/> (Εικόνα 11)
- V. <https://cid-inc.com/blog/chlorophyll-fluorescence-detects-water-stress/>
(Εικόνα 10)
- VI. <https://apbionotebook.wordpress.com/chapter-10-photosynthesis/> (Εικόνες 2,3)
- VII. <https://www.vita4you.gr/blog-vita4you/el/item/253-chlorella-gia-prostasia-apo-tis-toxines-kai-tis-elftheres-rizes.html> (Εικόνα 5)
- VIII. <https://www.zachospharmacy.gr/el/antiojeidvtika-symphhrvmata-orashw/2137-superfoods-chlorella-detoxification-30caps--5213006870125.html> (Εικόνα 5)
- IX. <https://www.oio-7.xyz/products.aspx?cname=clark+oxygen+electrode&cid=40> (Εικόνα 12)

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Daneshvar, E., et al., *Sequential cultivation of microalgae in raw and recycled dairy wastewater: Microalgal growth, wastewater treatment and biochemical composition*. *Bioresour Technol*, 2019. **273**: p. 556-564.
2. Fazal, T., et al., *Bioremediation of textile wastewater and successive biodiesel production using microalgae*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2018. **82**: p. 3107-3126.
3. Woodard and I. Curran, *5 - Waste Characterization*, in *Industrial Waste Treatment Handbook (Second Edition)*, Woodard and I. Curran, Editors. 2006, Butterworth-Heinemann: Burlington. p. 83-126.
4. Abreu, A.P., et al., *Mixotrophic cultivation of Chlorella vulgaris using industrial dairy waste as organic carbon source*. *Bioresour Technol*, 2012. **118**: p. 61-6.
5. Akpor. *Environmental and public health implications of wastewater quality*. 2012.
6. Zhou, W., et al., *Growing wastewater-born microalga Auxenochlorella protothecoides UMN280 on concentrated municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and energy feedstock production*. *Applied Energy*, 2012. **98**: p. 433-440.
7. Philippopoulos, C.D. and M.T. Papadakis, *Current trends in whey processing and utilization in Greece*. *International Journal of Dairy Technology*, 2001. **54**(1): p. 14-19.
8. Valta, K., et al., *Current Treatment Technologies of Cheese Whey and Wastewater by Greek Cheese Manufacturing Units and Potential Valorisation Opportunities*. *Waste and Biomass Valorization*, 2017. **8**(5): p. 1649-1663.
9. Tsakali, E., et al. *A review on whey composition and the methods used for its utilization for food and pharmaceutical products*. in *Proc. 6th Int. Conf. Simul. Modelling Food Bioind.* 2010.
10. Kaminarides, S., K. Nestoratos, and T. Massouras, *Effect of added milk and cream on the physicochemical, rheological and volatile compounds of Greek whey cheeses*. *Small Ruminant Research*, 2013. **113**(2): p. 446-453.

11. Rivas, J., et al., *Treatment of cheese whey wastewater: combined coagulation-flocculation and aerobic biodegradation*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(13): p. 7871-7.
12. Tsakali, E., et al., *A review on whey composition and the methods used for its utilization for food and pharmaceutical products*. 2010.
13. Pintado, M.E., A.C. Macedo, and F.X. Malcata, *Review: Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheeses*. Food Science and Technology International, 2001. **7**(2): p. 105-116.
14. Richardson, K. and B.B. Jørgensen, *Eutrophication: Definition, History and Effects*, in *Eutrophication in Coastal Marine Ecosystems*. 1996. p. 1-19.
15. Preisner, M., E. Neverova-Dziopak, and Z. Kowalewski, *Analysis of eutrophication potential of municipal wastewater*. Water Sci Technol, 2020. **81**(9): p. 1994-2003.
16. Boopathy, R., *Factors limiting bioremediation technologies*. Bioresource Technology, 2000. **74**(1): p. 63-67.
17. Vidali, M., *Bioremediation. An overview*. Pure and Applied Chemistry, 2001. **73**(7): p. 1163-1172.
18. Nzayisenga, J.C., et al., *Effects of light intensity on growth and lipid production in microalgae grown in wastewater*. Biotechnology for Biofuels, 2020. **13**(1): p. 4.
19. Dzionek, A., D. Wojcieszynska, and U. Guzik, *Natural carriers in bioremediation: A review*. Electronic Journal of Biotechnology, 2016. **23**: p. 28-36.
20. Olguín, E.J. and G. Sánchez-Galván, *Heavy metal removal in phytofiltration and phycoremediation: the need to differentiate between bioadsorption and bioaccumulation*. New Biotechnology, 2012. **30**(1): p. 3-8.
21. Ummalyma, S.B., D. Sahoo, and A. Pandey, *Bioremediation and Biofuel Production from Chlorella sp.: A Comprehensive Review*, in *Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment*, M.A. Alam and Z. Wang, Editors. 2019, Springer Singapore: Singapore. p. 635-655.
22. Sriram, S. and R. Seenivasan, *Microalgae cultivation in wastewater for nutrient removal*. Algal Biomass Utln, 2012. **3**(2): p. 9-13.
23. Masojídek, J. and G. Torzillo, *Mass Cultivation of Freshwater Microalgae*. 2008. p. 2226-2235.

24. Zeng, X., et al., *Autotrophic cultivation of Spirulina platensis for CO₂ fixation and phycocyanin production*. Chemical Engineering Journal, 2012. **183**: p. 192-197.
25. Stengel, D.B., S. Connan, and Z.A. Popper, *Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application*. Biotechnology Advances, 2011. **29**(5): p. 483-501.
26. Leliaert, F., et al., *Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae*. Critical Reviews in Plant Sciences, 2012. **31**(1): p. 1-46.
27. Gantt, E. and S.F. Conti, *The ultrastructure of Porphyridium cruentum*. The Journal of cell biology, 1965. **26**(2): p. 365-381.
28. Edvardsen, B., et al., *Phylogenetic reconstructions of the Haptophyta inferred from 18S ribosomal DNA sequences and available morphological data*. Phycologia, 2000. **39**(1): p. 19-35.
29. Nazos, T.T., et al., *Characterization of a novel herbicide and antibiotic-resistant Chlorella sp. with an extensive extracellular matrix*. 2020. **143**(3): p. 315-334.
30. Gnansounou, E. and J. Kenthorai Raman, *Life cycle assessment of algae biodiesel and its co-products*. Applied Energy, 2016. **161**: p. 300-308.
31. López-González, D., et al., *Pyrolysis of three different types of microalgae: Kinetic and evolved gas analysis*. Energy, 2014. **73**: p. 33-43.
32. Hena, S., S. Fatimah, and S. Tabassum, *Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production*. Water Resources and Industry, 2015. **10**: p. 1-14.
33. Petela, R., *An approach to the exergy analysis of photosynthesis*. Solar Energy, 2008. **82**(4): p. 311-328.
34. Lambers, H., F.S. Chapin, and T.L. Pons, *Photosynthesis*, in *Plant Physiological Ecology*. 2008, Springer New York: New York, NY. p. 11-99.
35. Girard, J.-M., et al., *Phycoremediation of cheese whey permeate using directed commensalism between Scenedesmus obliquus and Chlorella protothecoides*. Algal Research, 2017. **22**: p. 122-126.
36. Sreekanth, D., et al. *Bioremediation Of Dairy Wastewater Using Microalgae For The Production Of Biodiesel*. 2014.

37. Maier, R.M. and I.L. Pepper, *Chapter 3 - Bacterial Growth*, in *Environmental Microbiology (Third Edition)*, I.L. Pepper, C.P. Gerba, and T.J. Gentry, Editors. 2015, Academic Press: San Diego. p. 37-56.
38. Yates, G.T. and T. Smotzer, *On the lag phase and initial decline of microbial growth curves*. *Journal of Theoretical Biology*, 2007. **244**(3): p. 511-517.
39. Liu, J., Z. Sun, and F. Chen, *Chapter 6. Heterotrophic Production of Algal Oils*. 2013.
40. Krienitz, L., V.A.R. Huss, and C. Bock, *Chlorella: 125 years of the green survivalist*. *Trends in Plant Science*, 2015. **20**(2): p. 67-69.
41. Kuhl, A. and H. Lorenzen, *Chapter 10 Handling and Culturing of Chlorella*, in *Methods in Cell Biology*, D.M. Prescott, Editor. 1964, Academic Press. p. 159-187.
42. Safi, C., et al., *Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014. **35**: p. 265-278.
43. Pandey, A., S. Srivastava, and S. Kumar, *Development and cost-benefit analysis of a novel process for biofuel production from microalgae using pre-treated high-strength fresh cheese whey wastewater*. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020. **27**(19): p. 23963-23980.
44. Penner, M.H., *Basic Principles of Spectroscopy*, in *Food Analysis*, S.S. Nielsen, Editor. 2017, Springer International Publishing: Cham. p. 79-88.
45. Swinehart, D.F., *The Beer-Lambert Law*. *Journal of Chemical Education*, 1962. **39**(7): p. 333.
46. Wellburn, A.R., *The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution*. *Journal of Plant Physiology*, 1994. **144**(3): p. 307-313.
47. Maxwell, K. and G.N. Johnson, *Chlorophyll fluorescence—a practical guide*. *Journal of Experimental Botany*, 2000. **51**(345): p. 659-668.
48. Strasser, R., A. Srivastava, and M. Tsimilli-Michael, *The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples*. *Probing photosynthesis: Mechanism, regulation and adaptation*, 2000.
49. Wang, T., et al., *Chlorophyll a Fluorescence Transient and 2-Dimensional Electrophoresis Analyses Reveal Response Characteristics of Photosynthesis to*

- Heat Stress in Malus. 'Prairifire'*. Plants (Basel, Switzerland), 2020. **9**(8): p. 1040.
50. Strasser, B. and R. Strasser. *Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test*, P. Mathis (Ed.), *Photosynthesis: From Light to Biosphere, Vol. V. in Proceedings of the Xth International Photosynthesis Congress. Montpellier, France, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*. 1995.
51. Leland C. Clark, J., et al., *Continuous Recording of Blood Oxygen Tensions by Polarography*. Journal of Applied Physiology, 1953. **6**(3): p. 189-193.
52. DELIEU, T. and D.A. WALKER, *POLAROGRAPHIC MEASUREMENT OF PHOTOSYNTHETIC OXYGEN EVOLUTION BY LEAF DISCS*. New Phytologist, 1981. **89**(2): p. 165-178.