



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Φωτοβιολογικές προσεγγίσεις για τη βιοτεχνολογική επεξεργασία
υγρών αποβλήτων ελαιουργείων από το μονοκύτταρο χλωροφύκος
*Scenedesmus obliquus***

ΜΑΡΝΕΡΗ ΜΑΤΙΝΑ

Επιβλέπων Καθηγητής : Καθ. Κυριάκος Κοτζαμπάσης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 2015

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 Προέλευση υγρών αποβλήτων (κατσίγαρος)	6
1.2 Σύσταση υγρών αποβλήτων.....	7
1.3 Φαινολικές ενώσεις στα υγρά απόβλητα	9
1.4 Κύριες περιβαλλοντικές επιπτώσεις των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων	11
1.5 Μέθοδοι αποτοξικοποίησης υγρών αποβλήτων.....	12
1.5.1 Φυσικοχημικές μέθοδοι	12
1.5.2 Βιολογικές μέθοδοι.....	13
1.6 Βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων	13
1.6.1 Βιοχημικά μονοπάτια βιοαποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων από βακτήρια.....	14
1.6.2 Βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων από φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς (μικροφύκη).....	15
1.6.3 Βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων με παράλληλη παραγωγή υδρογόνου από μονοκύτταρα χλωροφύκη	18
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	22
2.1 Οργανισμός	22
2.2 Συνθήκες ανάπτυξης.....	23
2.3. Υπολογισμός κυτταρικής συγκέντρωσης.....	24
2.4 Επεξεργασία κατσίγαρου.....	25
2.5. Επαγωγικός φθορισμός-Φυσικοχημικές αναλύσεις της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.....	26
2.6. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση υδρογόνου (H ₂) και οξυγόνου (O ₂) με αέρια χρωματογραφία θερμικής αγωγιμότητας (GC-TCD).....	31
2.7 Ποιοτικός και Ποσοτικός Προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων.....	31
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	33
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	52
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	60
Βιβλιογραφία.....	61

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Κυριάκο Κοτζαμπάση για την πολύτιμη καθοδήγησή του και βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής μου. Ευχαριστώ τους κ. Ιωάννη Καρακάση και κ. Στέργιο Πυρίντσο που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στη τριμελή επιτροπή αξιολόγησης της μεταπτυχιακής διατριβής. Επίσης ευχαριστώ την Κατερίνα Παπαζή για όλη τη βοήθειά της και τις συμβουλές της στο εργαστήριο. Ευχαριστώ όλα τα παιδιά του εργαστηρίου για τις ατέλειωτες ώρες που περάσαμε μαζί. Ευχαριστώ θερμά όλους τους φίλους μου Θέκλα, Μάρα, Σοφία, Φώτη, Ελένη, Εμμανουέλα, Παναγιώτα, Εύα, Οδυσσέα για τη συμπαράσταση τους και την στήριξη που μου έδειξαν σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Και ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, που με στηρίζει τόσα χρόνια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φωτοσυνθετικά μικροφύκη είναι οργανισμοί που υπήρχαν πριν από δισεκατομμύρια χρόνια και κατάφεραν να επιβιώσουν σε ακραίες συνθήκες. Πρόσφατες δημοσιεύσεις του Εργαστηρίου *Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας* έδειξαν ότι τα μονοκύτταρα χλωροφύκη μπορούν να βιοαποικοδομήσουν τοξικές φαινολικές ενώσεις μέσω μίας ξεκάθαρα βιοενεργητικής στρατηγικής. Με βάση τα δεδομένα αυτά, η ιδέα της παρούσας εργασίας επικεντρώθηκε στη δυνατότητα εφαρμογής του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* στην αποικοδόμηση τοξικών αποβλήτων ελαιουργείων (κατσίγαρος), που αποτελούν ένα σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα, εξαιτίας των τοξικών φαινολικών ενώσεων. Σε κλειστό σύστημα πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές πειραμάτων όσον αφορά τη μορφή του κατσίγαρου που χρησιμοποιήθηκε (ακατέργαστος και εκχύλισμα). Στην περίπτωση του ακατέργαστου, το μικροφύκος κατάφερε να επιβιώσει και μάλιστα εκμεταλλεύτηκε το οργανικό φορτίο του κατσίγαρου με αποτέλεσμα να αυξήσει εντυπωσιακά τη βιομάζα του σε σύγκριση με την ανάπτυξη του μικροφύκου στο πλήρες θρεπτικό του, καταφέροντας ταυτόχρονα να βιοαποικοδομήσει ένα σημαντικό ποσοστό τοξικών φαινολικών ενώσεων. Σε πειραματικούς χειρισμούς που χρησιμοποιήθηκε το εκχύλισμα ολικών φαινολικών, επιλέχθηκε η βέλτιστη ποσότητα του εκχυλίσματος και το καταλληλότερο θρεπτικό υπόστρωμα για τη βιοαποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων, την ανάπτυξη και την παραγωγή υδρογόνου (H_2). Η βιοαποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων του κατσίγαρου από το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* είναι μια φωτοελεγχόμενη βιοενεργητική διαδικασία. Το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες σε ένα κλειστό σύστημα μπορεί μέσω συνδυασμού μεταβολικών του διεργασιών να βιοαποικοδομήσει τις τοξικές φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στον κατσίγαρο και σε συνδυασμό με τη φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων να παράγει παράλληλα ενέργεια υπό τη μορφή υδρογόνου (H_2). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αποτελούν μία πρώτη εναλλακτική βιοτεχνολογική προσέγγιση ολοκληρωμένης διαχείρισης των αποβλήτων των ελαιουργείων (κατσίγαρος), όπου το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* συνδυάζει την βιοαποικοδόμηση τοξικών φαινολικών ενώσεων του κατσίγαρου με την παραγωγή υδρογόνου, χρησιμοποιώντας απλώς την ηλιακή ακτινοβολία.

ABSTRACT

Photosynthetic microalgae are organisms that existed billions of years ago and managed to survive in extreme conditions. Recent publications of the Laboratory of Plant Biochemistry and Photobiology showed that unicellular algae can biodegrade toxic phenolic compounds via a clearly bioenergetic strategy. Based on these results, this work focuses on the possible applicability of using algae *Scenedesmus obliquus* to degrade toxic waste mills (OMW), which can be a major environmental problem due to the presence of toxic phenolic compounds. Two series of experiments were conducted in a closed system corresponding to the two types OMW used (crude and extract). In the case of crude OMW, the microalgae managed to survive and indeed exploited the organic load of OMW resulting in an impressive increase of biomass compared to the growth of microalgae in the complete medium managing in the same time to biodegrade a significant percentage of toxic phenolic compounds. The experimental procedures that the extract of phenolics was used, the optimum amount of extract and the appropriate nutrient substrate for biodegradation of phenolic compounds, the growth and production of hydrogen (H₂) were selected. The biodegradation of phenolic compounds of OMW by alga *Scenedesmus obliquus* is a light controlled bioenergetic process. The unicellular alga *Scenedesmus obliquus* can under specific conditions in a closed system biodegrade the toxic phenolic compounds of OMW by combining metabolic processes, and in combination with the photosynthetic electron flow generate parallel energy in the form of hydrogen (H₂). The results of this study consists a first-time alternative biotechnological approach towards an integrated management of waste mills (OMW), using the ability of alga *Scenedesmus obliquus* to combine biodegradation of toxic phenolic compounds with production of hydrogen using only sunlight.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Προέλευση υγρών αποβλήτων (κατσίγαρος)

Το 97% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου συγκεντρώνεται στη περιοχή της Μεσογείου. Οι χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή είναι η Ισπανία, η Ιταλία και η Ελλάδα που κατέχουν το 80% της παγκόσμιας παραγωγής. Η Ελλάδα, με ετήσια παραγωγή της τάξης των 0,4 εκατομμύρια τόνους, συνεισφέρει στο 15% της παγκόσμιας παραγωγής. (Paraskeva and Diamantopoulos, 2006). Σε παγκόσμια κλίμακα υπάρχουν 25.000 ελαιοτριβεία (Niaounakis and Halvadakis, 2004).

Πίνακας 1. Παραγωγή ελαιολάδου και ελαιοκάρπου στις χώρες της Ε.Ε (Niaounakis and Halvadakis, 2004)

	Έκταση (10 ⁶ ha)	Παραγόμενος ελαιόκαρπος (10 ⁶ τόννοι)	Παραγόμενο ελαιόλαδο (10 ⁶ τόννοι)
Ισπανία	2,1	3,8	0,95
Ιταλία	1,14	2,2	0,45
Ελλάδα	0,73	1,9	0,43
Πορτογαλία	0,32	0,29	0,04

Αποτέλεσμα της παραγωγικής διαδικασίας του ελαιολάδου είναι τα απόβλητα των ελαιουργείων, τα οποία είναι ο ελαιοπυρήνας, που αποτελείται από τα αλεσμένα στερεά συστατικά του καρπού (κυρίως του κουκουτσιού), τα ελαιόφυλλα που έχουν μεταφερθεί με τον ελαιοκαρπο και μια σημαντική σε όγκο και οργανικό φορτίο ποσότητα υγρών αποβλήτων, που είναι γνωστά ως "κατσίγαρος". Η ποσότητα των υγρών αποβλήτων διαφοροποιείται σε σχέση με τη διαδικασία εξαγωγής ελαιολάδου. Ευρέως χρησιμοποιούνται δύο συστήματα που βασίζονται στη φυγοκέντρωση και διαφοροποιούνται ανάλογα με τα προϊόντα που δίνουν στο τέλος της επεξεργασίας, το διφασικό (που δίνει ως τελικά προϊόντα λάδι και τον ελαιοπυρήνα) και το τριφασικό (που δίνει ως τελικά προϊόντα λάδι, τον ελαιοπυρήνα και υγρά απόβλητα). Ο κατσίγαρος αποτελείται από νερό το οποίο χρησιμοποιείται σε όλα τα στάδια παραγωγής και από το χυμό του ελαιοκάρπου. Δηλαδή είναι πλούσιος σε σάκχαρα αζωτούχες ενώσεις, οργανικά οξέα, πολυαλκοόλες, πολυφαινόλες και υπολείμματα λαδιού (Mantzavinos and Kalogerakis, 2005). Οι κύριες ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τον κατσίγαρο είναι οι εξής :

- Σκούρο καφέ χρώμα.
- Δυσάρεστη οσμή.

- Υψηλό οργανικό φορτίο.
- Οξινο pH.
- Υψηλή περιεκτικότητα πολυφαινολών.
- Υψηλή περιεκτικότητα σε στερεό υλικό.

1.2 Σύσταση υγρών αποβλήτων

Η σύνθεση των αποβλήτων ελαιοτριβείου δεν είναι σταθερή και σύμφωνα με τους Niaounnakis and Halvadakis (2006) εξαρτάται από:

i) Τη σύσταση των αποβλήτων, η οποία ποικίλει σύμφωνα με:

- Την ποικιλία της ελιάς.
- Την ωριμότητα του καρπού.
- Την ώρα συγκομιδής του καρπού.
- Τη περιεκτικότητα του καρπού σε νερό.
- Τις εδαφοκλιματικές συνθήκες.
- Την παρουσία φυτοπροστατευτικών προϊόντων και λιπασμάτων.

ii) Τη μέθοδο εξαγωγής ελαιολάδου.

iii) Το χρόνο αποθήκευσης.

Τα γενικά χαρακτηριστικά των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων κατεγράφησαν από τους από τους Sierra *et.al.*, (2001) και παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 2)

Πίνακας 2. Γενικά χαρακτηριστικά των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων (Sierra *et. al.*, 2001) [Το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand, COD) είναι η ποσότητα του οξυγόνου που απαιτείται για τη χημική οξειδωση των αποβλήτων. Το βιοχημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (Biochemical Oxygen Demand, BOD) είναι η ποσότητα του οξυγόνου που απαιτείται από μικροοργανισμούς προκειμένου να αποικοδομήσουν βιολογικά τα απόβλητα]

Παράμετροι	Τιμές
pH	4.5-6
Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD 5 g/L)	35-100
Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD g/L)	40-195
Ολικός οργανικός άνθρακας (TOC g/L)	22-64
Λίπη (g/L)	0.3-23
Ανόργανα στοιχεία (g/L)	5-14
Πολυφαινόλες (g/L)	3-24
N (g/L)	5-15
P (g/L)	0.3-1.1
K (g/L)	2.7-7.2
Ca (g/L)	0.12-0.75
Mg (g/L)	0.10-0.90
Na (g/L)	0.04-0.90
Στερεά %	5,5-17,6

Πιο αναλυτικά τα κύρια συστατικά του κατσίγαρου και το ποσοστό τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Κύρια συστατικά των αποβλήτων των ελαιουργείων (Zervakis and Balis. 1996)

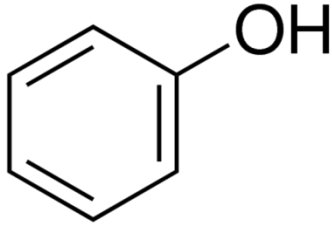
Συστατικό	Συγκέντρωση (%)	Κύρια συστατικά
Νερό	8,3-92	
Λίπη	0,03-1,00	Υπολείμματα ελαίου
Αζωτούχες ουσίες	1,2-2,4	Γλουταμίνη, Γλυκίνη, Αργινίνη, Ιστιδίνη, Προλίνη, Τυροσίνη, Φαινυλαλανίνη, Λυσίνη, Μεθειονίνη, Γλυκοζαμίνη κ.α.
Σάκχαρα	2,0-8,0	Ραφινόζη, Μανόζη, Σακχαρόζη, Γλυκόζη, Αραβινόζη, Ραμινόζη, Γαλακτόζη, Ξυλόζη
Οργανικά οξέα	0,5-1,5	Γαλακτικό, Μηλικό, Μηλονικό, Οξαλικό, Τρυγικό, Φουμαρικό
Πολυαλκοόλες	0,5-1,5	Γλυκερίνη- Μανιτόλη
Πηκτίνες, Τανίνες	0,4-1,5	
Φαινολικές ενώσεις	0,3-0,8	Φλαβονοειδή : Απεγνίνη, Λουτεολίνη, Κερσετίνη Φαινόλες : Καφεϊκό, Κινναμικό, 2,6-διυδροξυβενζοϊκό, π-υδροξυβενζοϊκό, Συρινγγικό, Φερουλικό, π-κουμαρικό, Βανιλικό, Βερατρικό, Πρωτοκατεχικό, Υδροξυτυροσόλη, Τυροσόλη, Πυροκατεχικό, Ελαιοευρωπαϊνή
Ανόργανα συστατικά	0,4-1,5	K, P, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Cl, S

Από όλα αυτά τα συστατικά ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι φαινόλες, μιας και έχουν διττό ρόλο, από τη μία είναι αντιοξειδωτικές ουσίες και βοηθούν στη διατήρηση του λαδιού (Tsimidou *et.al.*, 1992, Ryan *et al.*,1998) και από την άλλη είναι οι κύριοι ρυπαντές των υγρών αποβλήτων και ευθύνονται για τις σημαντικότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις.

Τα απόβλητα των ελαιουργείων λόγω του ότι είναι πλούσια σε θρεπτικά φέρουν και πολλούς μικροοργανισμούς. Η συγκέντρωση μικροοργανισμών στα απόβλητα του ελαιοτριβείου είναι της τάξης των 10^5 cfu/mL (μονάδες σχηματισμού αποικίας/mL) (Niaounakis *et.al.* 2004). Πιο κοινός μικροοργανισμός στον κασίγαρο είναι βακτήρια του γένους *Pseudomonas* ή μικροοργανισμοί που χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να μετασχηματίζουν δύσκολα διασπώμενα συστατικά, όπως μεγαλομοριακές λιπαρές ουσίες, και φαινολικά συστατικά. Επίσης συναντούνται ζύμες του γένους *Saccharomyces* και μύκητες *Penicillium* και *Aspegillus*. Άλλοι μικροοργανισμοί που έχουν απομονωθεί από ελαιόκαρπο είναι στελέχη μυκήτων και βακτηρίων από τα γένη *Aerobacter*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Fusarium* (Fiestas and Borja, 1992).

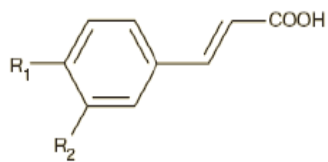
1.3 Φαινολικές ενώσεις στα υγρά απόβλητα

Οι φαινολικές ενώσεις είναι μια μεγάλη ομάδα ενώσεων οι οποίες αποτελούνται από ένα βενζολικό δακτύλιο ο οποίος περιέχει απευθείας ενωμένες μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες. (Εικόνα 1) Στα φυτά έχουν βρεθεί περισσότερες από 4000 διαφορετικές φαινολικές ενώσεις (Χριστοφορίδου, 2001). Οι φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στο ελαιόλαδο προέρχονται από τον καρπό και τα φύλλα της ελιάς. Η ποσότητα τους στο ελαιόλαδο ποικίλει και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το υψόμετρο της περιοχής καλλιέργειας του ελαιόδεντρου, τις κλιματολογικές συνθήκες (ύψος βροχοπτώσεων, θερμοκρασία), τις εργασίες κατά την καλλιέργεια, το βαθμό ωριμότητας του ελαιόκαρπου και τον τύπο του ελαιουργείου που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή του ελαιολάδου (Ryan and Robards, 1998).

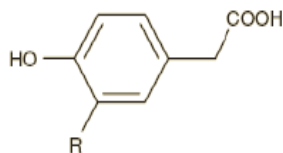


Εικόνα 1. φαινόλη

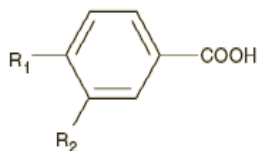
Στους διάφορους τύπους ελαιολάδου έχουν βρεθεί περισσότερες από 20 πολυφαινόλες. Σε μεγάλες ποσότητες βρίσκονται η τυροσόλη και η υδρόξυ-τυροσόλη. Επίσης υπάρχουν παράγωγα του κινναμικού οξέος (ο-κουμαρικό οξύ, p-κουμαρικό οξύ, φεουλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, συναπικό οξύ, 3- υδροξυ-4-μεθοξυκινναμικό οξύ), παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, βανιλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, γαλλικό οξύ, συριγγικό οξύ, γεντιστικό οξύ), φαινολικές αλκοόλες (τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη), σικιμικό οξύ, παράγωγα του φαινολικού οξέος (p-φαινυλοξικό), και οι ενώσεις θυμόλη, καρβακρόλη και οι φλαβονοειδείς ενώσεις καμφερόλη, απιγενίνη και κερκετίνη (Χριστοφορίδου, 2001). Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 2) παρουσιάζονται οι κύριες φαινολικές ενώσεις που συναντώνται στον κατσίγαρο.



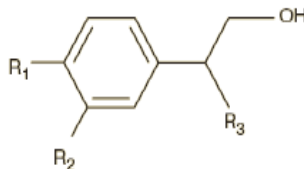
$R_1=H$ $R_2=H$ Κινναμωμικό οξύ
 $R_1=OH$ $R_2=H$ Κουμαρινικό οξύ
 $R_1=OH$ $R_2=OH$ Καφεϊκό οξύ
 $R_1=OH$ $R_2=OCH_3$ Φερουλικό οξύ



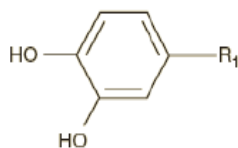
$R=H$ 4-υδροξυφαινιλοξικό οξύ
 $R=OH$ 3,4-διυδροξυφαινιλοξικό οξύ



$R_1=OH$ $R_2=H$ 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ
 $R_1=OH$ $R_2=OH$ Πρωτοκατεχουϊκό οξύ
 $R_1=OH$ $R_2=OCH_3$ Βανιλλικό οξύ



$R_1=OH$ $R_2=H$ $R_3=H$ Τυροσόλη
 $R_1=OH$ $R_2=OH$ $R_3=H$ Υδροξυτυροσόλη
 $R_1=OH$ $R_2=OH$ $R_3=OH$ 3,4-υδροξυφαινιλογλυκόλη



$R_1=H$ Κατεχόλη
 $R_1=CH_3$ 4-μεθυλοκατεχόλη

Εικόνα 2. Κυριότερες φαινολικές ενώσεις που συναντούνται στον κασίγαρο (Niaounakis and Halvadakis, 2006)

1.4 Κύριες περιβαλλοντικές επιπτώσεις των υγρών αποβλήτων των ελαιотριβείων

Τα παραπροϊόντα της ελαιουργίας αποτελούν ένα από τα μεγαλύτερα οικολογικά προβλήματα των χωρών της Μεσογείου. Κυρίως τα υγρά απόβλητα (κασίγαρος) καταλήγουν ακατέργαστα στο περιβάλλον, προκαλώντας διάφορες διαταραχές του οικολογικού συστήματος.

Οι κύριες περιβαλλοντικές επιπτώσεις είναι:

- Κίνδυνος για την υδρόβια ζωή [Η φαινόλη είναι γνωστό ότι είναι τοξική για τα ψάρια σε συγκεντρώσεις 5-25 mg / L (Khan *et al.*, 1981)].
- Επιδείνωση της ποιότητας του εδάφους
- Δυσκολία αποδόμησης του άνθρακα
- Φυτοτοξικότητα

- Δημιουργία στρώματος λίπους στην επιφάνεια υδάτων
- Δυσάρεστες οσμές

Το βασικό πρόβλημα κατά την επεξεργασία του κατσίγαρου είναι η αντιμετώπιση των φαινολικών ενώσεων καθώς και του οργανικού φορτίου.

Λόγω των παραπάνω επιπτώσεων είναι επιτακτική ανάγκη η εφαρμογή μεθόδων που θα μπορέσουν να αποτοξικοποιήσουν τον κατσίγαρο.

1.5 Μέθοδοι αποτοξικοποίησης υγρών αποβλήτων

Πολλοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με την εύρεση μεθόδων αποτοξικοποίησης των υγρών αποβλήτων και τη διάθεσή τους στο περιβάλλον. Όλες έχουν κάποια αρνητικά και κάποια θετικά χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα κάποιες δεν είναι πολύ αποδοτικές σε σχέση με το κόστος τους. Άλλες έχουν πολύ υψηλό κόστος με αποτέλεσμα να μην συμφέρει η εφαρμογή τους ελαιοπαραγωγούς.

1.5.1 Φυσικοχημικές μέθοδοι

Οι κυριότερες φυσικοχημικές μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για την αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου είναι:

1. Εξουδετέρωση, καθίζηση: Προσθήκη χημικών με σκοπό τη δημιουργία στερεού κλάσματος. Με την αφαίρεσή του επιτυγχάνεται μείωση του Χημικά Απαιτούμενου Οξυγόνου των λιπών και των αιωρούμενων στερεών (Tsagaraki *et al.*, 2006).
2. Οξειδωση: Κυρίως με τη χρήση όζοντος και υπεροξειδίου του υδρογόνου, για την απομάκρυνση τόσο το οργανικό φορτίο όσο και το οξειδούμενο ανόργανο φορτίο, σε ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία περιβάλλοντος (Paraskeva and Diamadopoulos, 2006).
3. Θερμικές μέθοδοι: Η εφαρμογή τους γίνεται είτε με τεχνητά μέσα, με σημαντικότερες μεθόδους την αεριοποίηση, τη καύση και τη πυρόλυση, είτε με φυσικό τρόπο (αέρα, ήλιο) σε λίμνες εξάτμισης (Niaounakis and Halvadakis, 2004; Caputo *et. al.*, 2003).
4. Χρήση επιλεγμένων μεμβρανών: Η μέθοδος διαχωρισμού με μεμβράνες εφαρμόζεται για την απομάκρυνση αιωρούμενων, κολλοειδών και διαλυμένων

ουσιών από τα υγρά απόβλητα. Χρησιμοποιείται μια ημιπερατή μεμβράνη η οποία λειτουργεί σαν φυσικό φράγμα μέσω του οποίου οι ουσίες είτε παρακρατούνται είτε περνούν ανάλογα με το μέγεθος τους. (Paraskeva *et al.*, 2006; Μπλίκια, 2009).

5. Φυγοκέντρωση: Διαχωρισμός σε επιμέρους φάσεις και ανάκτηση λαδιού (Mitrakas *et al.*, 1996).

6. Φωτοκατάλυση: Δράση κυρίως υδροξυλίων που παράγονται κατά τη διεργασία, με αποτέλεσμα οξείδωση της οργανικής ύλης και καταστροφή αιωρούμενων σωματιδίων (Azabou *et al.*, 2007).

1.5.2 Βιολογικές μέθοδοι

Αερόβια χώνευση: Κατά την αερόβια χώνευση, χρησιμοποιούνται αερόβιοι μικροοργανισμοί (βακτήρια ή μύκητες) για την αποικοδόμηση του οργανικού κλάσματος που περιέχεται στο απόβλητο (Benitez *et.al.*, 1997; McNamara *et.al.*, 2008; Fountoulakis *et.al.*, 2002). Ένα από τα μειονεκτήματα που προκύπτουν είναι ότι η απαίτηση για οξυγόνο (αερόβια χώνευση) αυξάνει την ενεργειακή κατανάλωση.

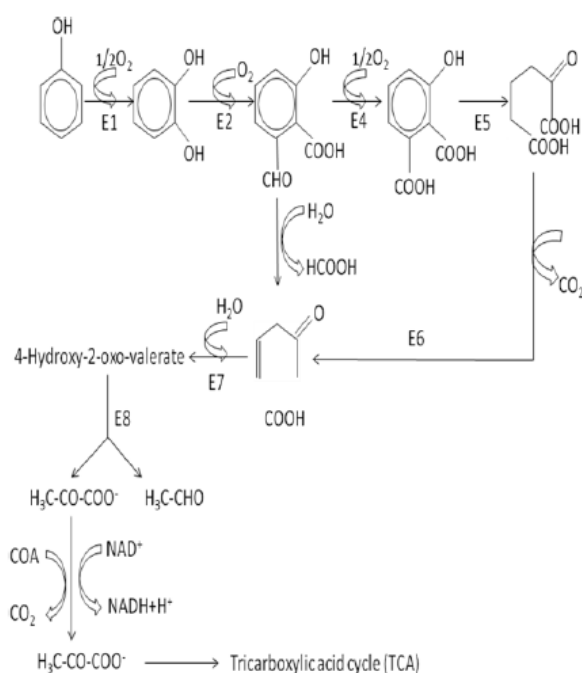
Αναερόβια χώνευση: Κύριο χαρακτηριστικό της χώνευσης αυτής είναι ότι η βιοαποδόμηση της οργανικής ύλης που περιέχεται στο απόβλητο γίνεται από αναερόβιους μικροοργανισμούς απουσία οξυγόνου. Το μεθάνιο που παράγεται κατά την επεξεργασία του αποβλήτου καθιστά τη χώνευση αυτή αυτάρκη έτσι ώστε η απαίτηση για ενέργεια για την λειτουργία της μονάδας να γίνεται χωρίς την κατανάλωση ενέργειας από εξωγενείς παράγοντες (Boari *et.al.*, 1984).

1.6 Βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων

Η βιοαποικοδόμηση είναι μια διαδικασία κατά την οποία αποτοξικοποιούνται χημικές ουσίες μέσω βιολογικών δράσεων ώστε σε περίπτωση εναπόθεσης τους στο περιβάλλον να μην διαταράξουν το οικοσύστημα. Στο περιβάλλον οι περισσότερες χημικές οργανικές ενώσεις βιοαποικοδομούνται από μικροοργανισμούς μέσω της διαδικασίας του μεταβολισμού τους. Ουσιαστικά μέσα από την βιοαποικοδόμηση προσλαμβάνουν ενέργεια αρκετή για να καλύψει τις ανάγκες τους ώστε να αναπτυχθούν.

1.6.1 Βιοχημικά μονοπάτια βιοαποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων από βακτήρια

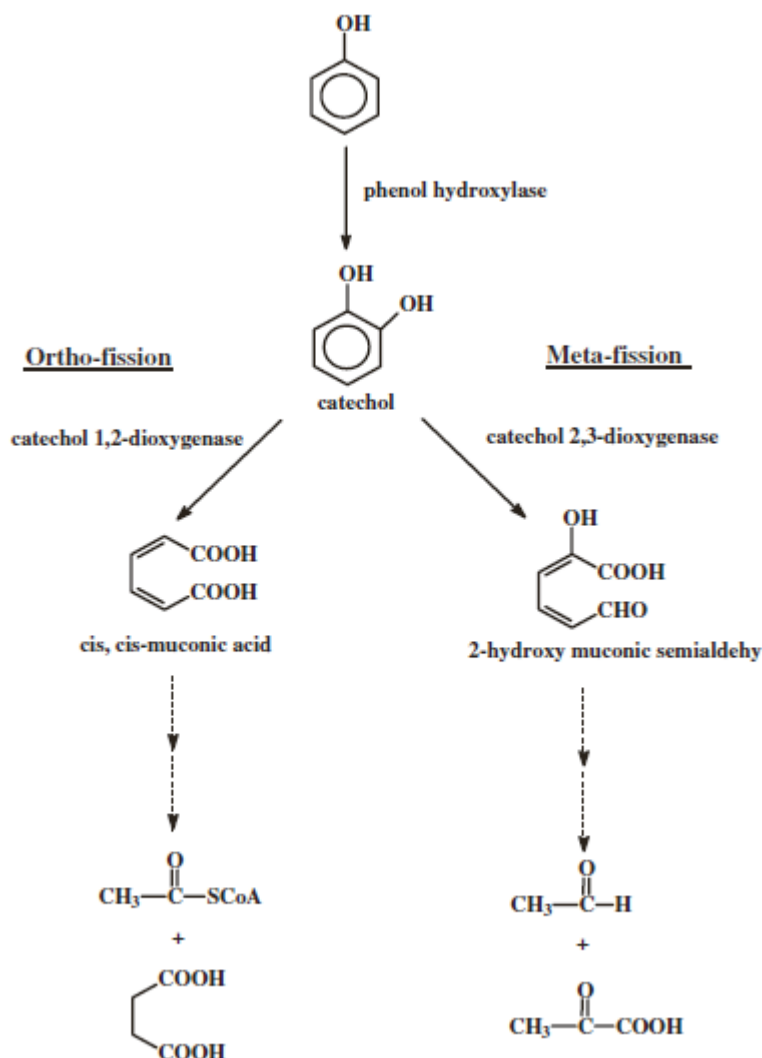
Πολλά αερόβια βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιήσουν τις αρωματικές ενώσεις ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Το τυπικό μεταβολικό μονοπάτι για τον μεταβολισμό μιας αρωματικής ένωσης είναι η διυδροξυλίωση του βενζολικού δακτυλίου προς το σχηματισμό κατεχόλης και επερχόμενη ρίξη του δακτυλίου μέσω *ortho*- ή *meta*- οξειδωσης (Sridevi, *et.al.*, 2012). Αρκετά είναι τα είδη των βακτηρίων που είναι γνωστά για την αποικοδόμηση της φαινόλης όπως τα *Alcaligenes sp.*, *Acrobacter sp.* (Watanabe *et.al.*, 1996), *Rhodococcus erythropolis* (Pietro *et.al.*, 2002), *Candida tropicalis* (Chen *et.al.*, 2002), *Pseudomonas putida* (Chung *et.al.*, 2003) και μύκητες όπως *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Graphium sp.*, (Santos and Linardi, 2004).



Εικόνα 3. Το γενικό μεταβολικό μονοπάτι για την βιοαποικοδόμηση της φαινόλης (Sridevi *et.al.*, 2012)

Το τυπικό μονοπάτι της αποικοδόμησης των φαινολικών από μικροοργανισμούς συμβαίνει μέσω του σχηματισμού παραγώγων κατεχόλης και τη διάσπαση δακτυλίου ακολουθώντας το μονοπάτι της *ortho*- ή της *meta*- σχάσης (Yang and Humphrey, 1975). Και τα δύο μονοπάτια συνήθως χρησιμοποιούν για καταλύτη στο πρώτο στάδιο της αποδόμησης μια μονοοξυγενάση, την υδροξυλάση της φαινόλης. Στο δεύτερο στάδιο όμως τα μονοπάτια διαφοροποιούνται όπως

φαίνεται στο σχήμα (Εικ. 4). Γενικά οι ζύμες και τα βακτήρια για να πραγματοποιήσουν την οξειδωτική αντίδραση της κατεχόλης χρησιμοποιούν κατεχόλη- 1,2- διοξυγενάση και 2,3- διοξυγενάση για τα μονοπάτια της *ortho* -σχάσης και της *meta* -σχάσης αντίστοιχα (Neujahr and Gaal, 1973, Muller and Babel, 1994)

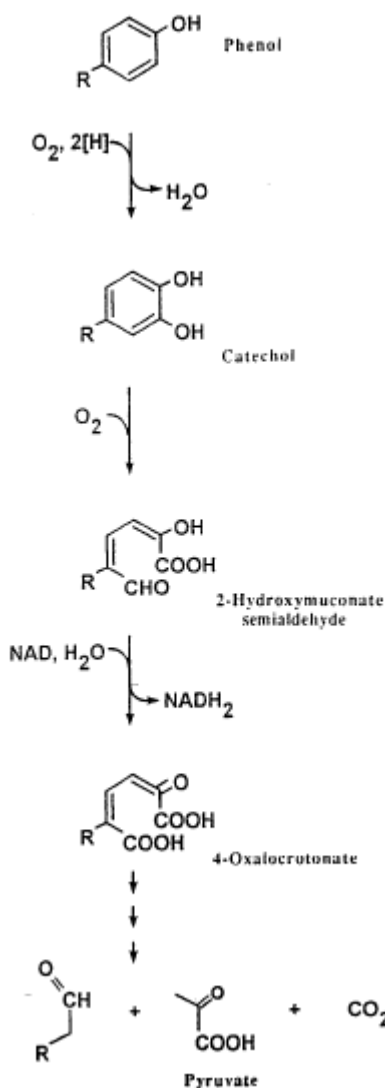


Εικόνα 4 Τα δυο τυπικά μονοπάτια βιοαποικοδόμησης της φαινόλης (*ortho*, *meta*) που λαμβάνουν χώρα σε μικροοργανισμούς (Tsai *et.al.*, 2005)

1.6.2 Βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων από φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς (μικροφύκη)

Οι Semple and Cain (1996) ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν στη διεθνή βιβλιογραφία για μονοπάτι αποικοδόμησης φαινόλης από φύκη. Πιο συγκεκριμένα το φύκος *Ochromonas danica* βιοαποικοδομεί τη φαινόλη χρησιμοποιώντας το *meta*-

μονοπάτι, όπου διασπάται η φαινόλη και παράγεται διοξείδιο του άνθρακα, πυροσταφυλικό και φορμαλδεΐδη, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.

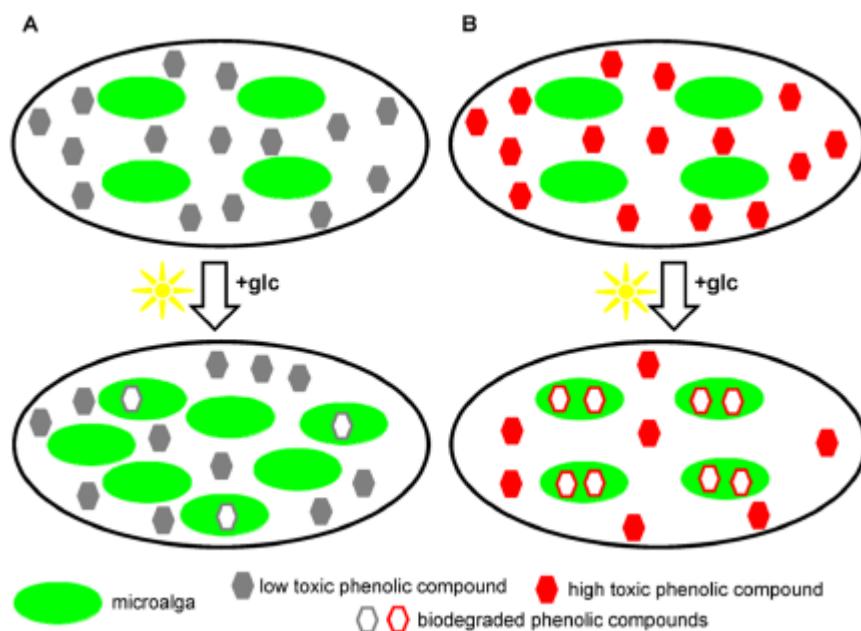


Εικόνα 5. Καταβολισμός της φαινόλης από το μικροφύκος *Ochromonas danica* σύμφωνα με το *meta*-βιοχημικό μονοπάτι (Semple and Cain, 1996)

Η ιδέα της χρησιμοποίησης των μικροφυκών σε βιολογικές διαδικασίες απομάκρυνσης προτάθηκε αρχικά από Oswald και Gotaas (1957), αλλά έχει κερδίσει ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Η χρήση των μικροφυκών σε αυτές τις διαδικασίες παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, όπως: τη χρήση μιας φθηνής ενέργειας σε αφθονία (ηλιακή ακτινοβολία), την παραγωγή βιομάζας υψηλής αξίας και την παραγωγή ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας (Aaronson *et al.*, 1980).

Τα αποτελέσματα των Papazi and Kotzabasis (2013), έδειξαν ότι η βιοαποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων από μικροφύκη (*Scenedesmus obliquus*)

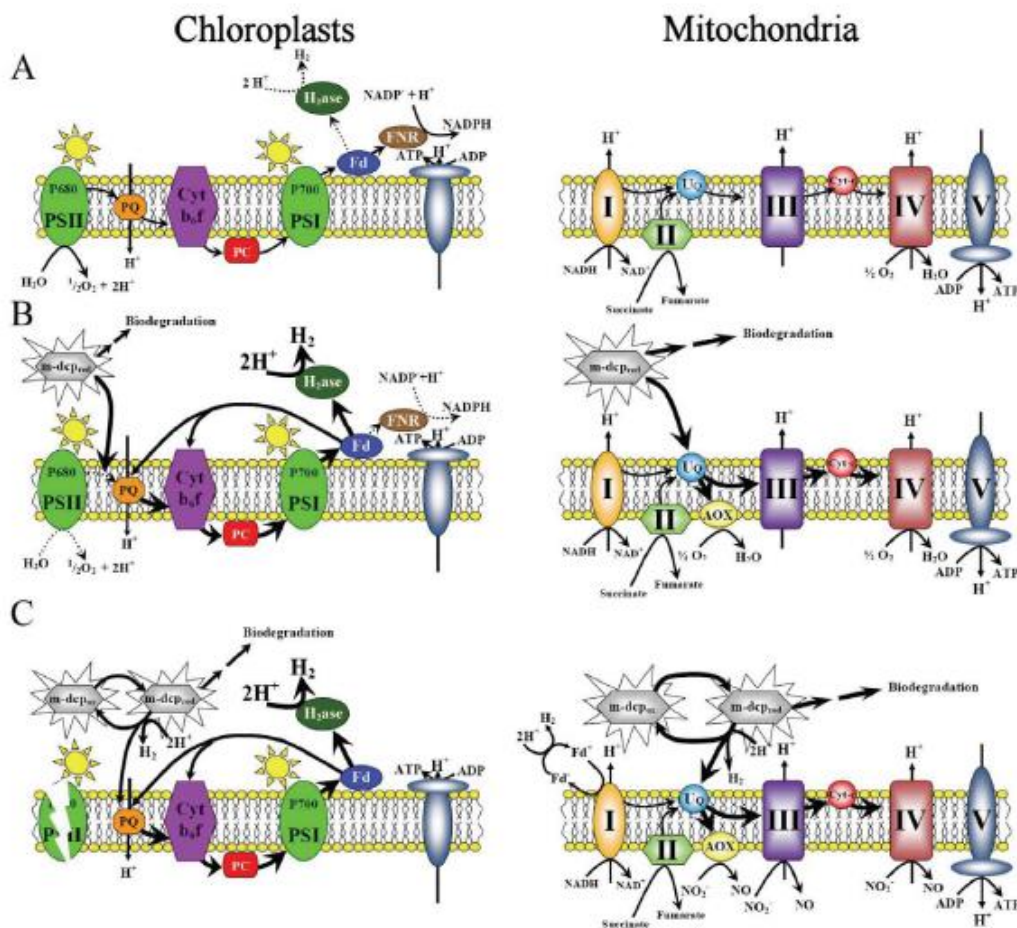
είναι εφικτή με τη χρήση του καταλληλότερου μονοπατιού αποικοδόμησης που γίνεται με βάση το ενεργειακό ισοζύγιο του μικροφύκου. Η βιοαποικοδόμηση είναι μια βιοενεργητική διαδικασία που εξαρτάται και καθορίζεται από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες, όπως η θέση (*ortho*, *meta* ή *para*) και ο αριθμός των υποκαταστατών στο φαινολικό δακτύλιο, τα φαινόμενα του συντονισμού και της επαγωγής, που ελέγχουν τη συμπεριφορά του υποκαταστάτη ως δότη ή δέκτη ηλεκτρονίων, η εξωγενής πηγή του άνθρακα και η ένταση της φωτονιακής ακτινοβολίας. Τέλος φάνηκε πως τα μικροφύκη παρουσιάζουν μια βασική στρατηγική βιοαποικοδόμησης, όπου όταν εκτεθούν σε χαμηλής τοξικότητας φαινολικές ενώσεις επενδύουν την ενέργειά τους στην ανάπτυξη τους και όχι στη βιοαποικοδόμηση, εν αντιθέσει όταν εκτεθούν σε υψηλής τοξικότητας φαινολικές ενώσεις επενδύουν όλα τα ενεργειακά τους αποθέματα στην βιοαποικοδόμηση και όχι στην ανάπτυξη. Στην περίπτωση των χαμηλής τοξικότητας φαινολικών ενώσεων ουσιαστικά το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus* αυξάνει τη βιομάζα του με αποτέλεσμα μετά από ένα χρονικό διάστημα που θα έχει αναπτυχθεί αρκετά η τοξική ουσία που θα αναλογεί σε κάθε κύτταρο ξεχωριστά θα είναι πολύ μικρότερη από τη αρχική συνθήκη (Εικ. 6).



Εικόνα 6. Ένα απλοποιημένο μοντέλο για τη βέλτιστη διαχείριση μεταξύ τοξικότητας, βιοδιασπασιμότητας και την ανάπτυξη της καλλιέργειας, (Parazi and Kotzabasis, 2013)

1.6.3 Βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων με παράλληλη παραγωγή υδρογόνου από μονοκύτταρα χλωροφύκη

Οι Parazi *et.al.*, (2012), παρατήρησαν μεγάλες ποσότητες παραγωγής υδρογόνου σε κλειστό σύστημα καλλιέργειας του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* κατά την διαδικασία βιοαποικοδόμησης συγκεκριμένων διχλωροφαινόλων. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί παραγωγής υδρογόνου στους χλωροπλάστες και στα μιτοχόνδρια από μικτότροφες καλλιέργειες *Scenedesmus obliquus* όταν προστέθηκαν σε αυτές *meta*-διχλωροφαινόλες (m-dcps) φαίνονται στην Εικ. 7.



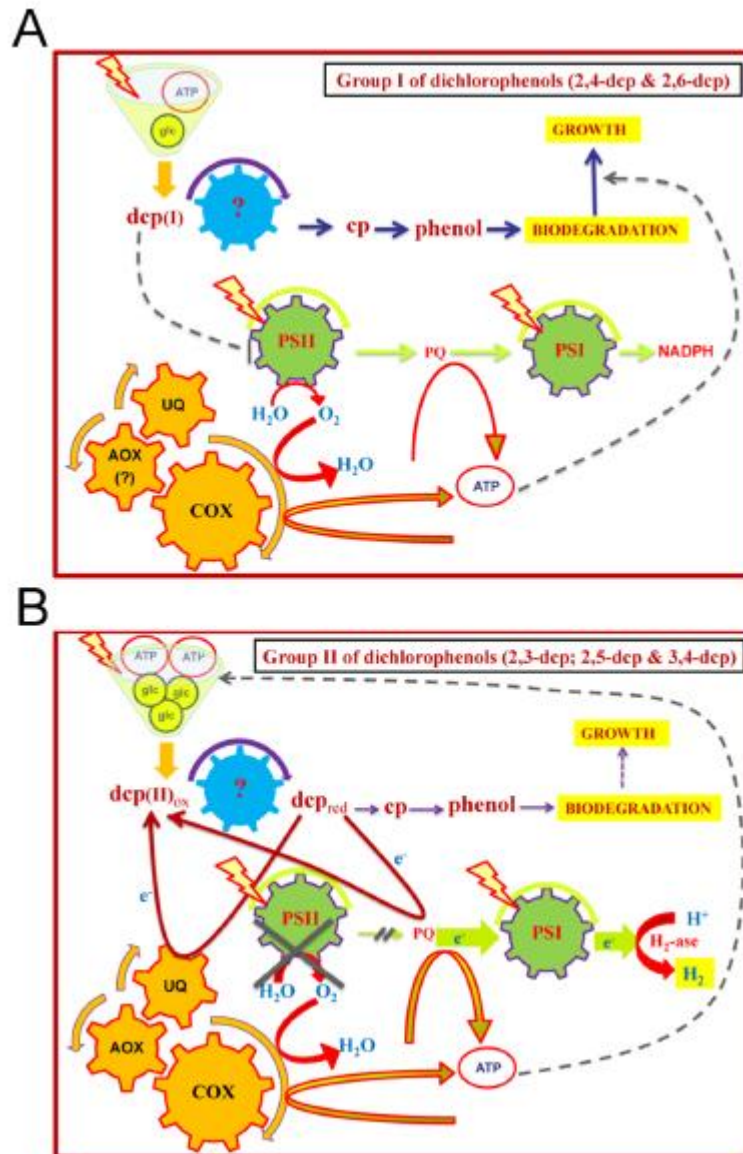
Εικόνα 7 Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί παραγωγής υδρογόνου στους χλωροπλάστες και στα μιτοχόνδρια από μικτότροφες καλλιέργειες *Scenedesmus obliquus* όταν προστέθηκαν σε αυτές *meta*-διχλωροφαινόλες (m-dcps), (A) αερόβιες συνθήκες στους χλωροπλάστες και στα μιτοχόνδρια πριν την εισαγωγή των m-dcps, (B) φυσιολογικές αλλαγές στους χλωροπλάστες και στα μιτοχόνδρια μετά την εισαγωγή των m-dcps, (C) συνθήκες έλλειψης οξυγόνου που προκαλούνται από τα m-dcps στους χλωροπλάστες και στα μιτοχόνδρια. (Parazi *et.al.*, 2012)

Στην Εικ. 7Α φαίνεται η σχηματική απεικόνιση της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στους χλωροπλάστες και στα μιτοχόνδρια πριν την εισαγωγή των *meta*-διχλωροφαινολών (m-dcp). Πριν της εισαγωγής των m-dcps επικρατούσαν αερόβιες συνθήκες, επειδή η κατανάλωση του οξυγόνου από την αναπνοή που πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια ήταν χαμηλότερη από την φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου. Κάτω από αυτές τις συνθήκες το ένζυμο της υδρογενάσης στους χλωροπλάστες δεν ενεργοποιείται αφού η οξείδωση του νερού που πραγματοποιείται στο PSII απελευθερώνει μοριακό οξυγόνο και είναι γνωστό ότι το οξυγόνο είναι ισχυρός αναστολέας της υδρογενάσης.

Στην Εικ. 7Β φαίνονται οι αλλαγές στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων αμέσως μετά την προσθήκη των m-dcps. Στο πρώτο στάδιο της βιοαποικοδόμησης οι m-dcps είναι σε ανηγμένη μορφή. Στα μιτοχόνδρια οι ανηγμένες m-dcps λόγω του οξειδοαναγωγικού τους δυναμικού, μεταφέρουν ηλεκτρόνια στην ουμπικινόνη (UQ) και υπερφορτώνουν την αλυσίδα της αναπνοής πριν από το σύμπλοκο III, με αποτέλεσμα την υψηλή συσσώρευση ηλεκτρονίων και την ενεργοποίηση και του μονοπατιού της εναλλακτικής οξειδάσης, μεγιστοποιώντας τον ολικό ρυθμό αναπνοής και την κατανάλωση οξυγόνου. Ταυτόχρονα στους χλωροπλάστες οι ανηγμένες μορφές των m-dcps, λόγω του οξειδοαναγωγικού τους δυναμικού, μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια τους στη δεξαμενή της πλαστοκινόνης (PQ), απενεργοποιούν το PSII, αναστέλλοντας τη φωτόλυση του νερού και την παραγωγή οξυγόνου και υπερενεργοποιώντας το PSI. Όλες αυτές οι αλλαγές, όπου έχουμε υψηλή κατανάλωση οξυγόνου, οδηγούν σε ανοξικές συνθήκες (που επάγουν την υδρογενάση) και με τη σειρά τους ενισχύουν παράλληλα με τη βιοαποικοδόμηση των διχλωροφαινολών την φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου (Papazi *et.al.*, 2012).

Τέλος στην Εικ. 7C φαίνεται η πιθανή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων κάτω από ανοξικές συνθήκες. Η μεταφορά ηλεκτρονίων στην αναπνοή μπορεί να διατηρηθεί με το να τρέχει με ένα διαφορετικό δότη ηλεκτρονίων, νιτρώδη (NO_2^-), αντί για οξυγόνο. Στους χλωροπλάστες οι ανοξικές συνθήκες ενεργοποιούν περαιτέρω το PSI με αποτέλεσμα να διοχετεύεται συνεχώς μεγάλη ποσότητα ηλεκτρονίων στην υδρογενάση με αποτέλεσμα τη μεγάλη παραγωγή υδρογόνου (Papazi *et.al.*, 2012).

Σε συνέχεια της μελέτης των Parazi *et.al.*, (2012) προτάθηκε ένα μοντέλο από τους Parazi and Kotzabasis (2013) στο οποίο περιγράφεται ο μηχανισμός κατά τον οποίο σε κλειστό σύστημα καλλιέργειας *Scenedesmus obliquus* μέσω της βιοαποικοδόμησης συγκεκριμένων διχλωροφαινόλων παράγεται υδρογόνο. Η σχηματική απεικόνιση του μοντέλου φαίνεται στην Εικ. 8.



Εικόνα 8.Βιοενεργητικά μοντέλα βιοαποικοδόμησης (Α) Χαμηλής τοξικότητας διχλωροφαινόλες, (Β) Υψηλής τοξικότητας διχλωροφαινόλες. Οι χαμηλής τοξικότητας διχλωροφαινόλες (Εικ. 8Α) μειώνουν τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα, και η παραγόμενη ενέργεια από την φωτοσύνθεση και την αναπνοή επενδύεται κυρίως στην ανάπτυξη και όχι στη βιοαποικοδόμηση. Η βιοαποικοδόμηση των υψηλής τοξικότητας διχλωροφαινόλων είναι πιο περίπλοκη (Εικ.8Β). Η ανηγμένη μορφή των διχλωροφαινόλων υψηλής τοξικότητας, σύμφωνα με το οξειδοαναγωγικό δυναμικό, γίνονται δότες ηλεκτρονίων στη φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων και δίνουν τα ηλεκτρόνια στη πλαστοκινόνη. Παράλληλα μπλοκάρουν το PSII και την απελευθέρωση οξυγόνου, οδηγώντας σε ανοξικές συνθήκες. Επιπρόσθετα, το πρώτο βήμα της βιοαποικοδόμησης των διχλωροφαινόλων είναι η αναγωγή των διχλωροφαινόλων, η οποία υποστηρίζει μία συνεχόμενη κυκλική ανατροφοδότηση μεταξύ οξειδωμένων και ανηγμένων διχλωροφαινόλων, η οποία συνεχώς ενισχύει μια δυνατή ροή ηλεκτρονίων στη πλαστοκινόνη, και στη συνέχεια στη φερεδοξίνη. Σαν

αποτέλεσμα η παραγωγή υδρογόνου που προκαλείται από την ενεργοποίηση της υδρογενάσης είναι συνεχόμενη, εξαιτίας των ανοξικών συνθηκών. Η ανοξικές συνθήκες επιτυγχάνονται όχι μόνο από την παρεμπόδιση του PSII αλλά και από την μεταφορά ηλεκτρονίων από τις ανηγμένες διχλωροφαινόλες στην ουμπικινόνη, μέσω του μηχανισμού αναπνοής που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια. Η αυξημένη παραγωγή ενέργειας από την αναπνοή και την παραγωγή φωτοσυνθετικού υδρογόνου, επενδύεται κυρίως στην βιοαποικοδόμηση των διχλωροφαινολών παρά στην ανάπτυξη των μικροφυκών. (Parazi and Kotzabasis, 2013)

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι να διερευνηθούν οι συνθήκες κατά τις οποίες το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* μπορεί να βιοαποικοδομήσει τις φαινολικές ενώσεις του ακατέργαστου κατσίγαρου ή του ολικού εκχυλίσματος των φαινολικών ενώσεων του κατσίγαρου και το κατά πόσο αυτό είναι δυνατό να συνδυαστεί με παράλληλη παραγωγή υδρογόνου.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Οργανισμός

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* (Εικόνα 9). Η φυλογενετική του ταξινόμηση είναι η εξής:

Βασίλειο : Φυτά

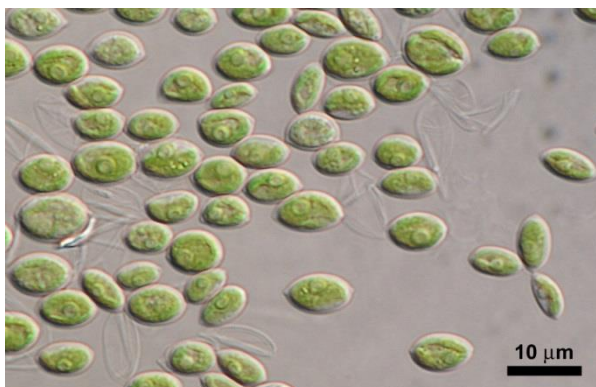
Διαίρεση : Χλωρόφυτα

Κλάση : Χλωροφύκη

Τάξη : Chlorococcales

Γένος : *Scenedesmus*

Είδος : *Scenedesmus obliquus*



Εικόνα 9. Κύτταρα *Scenedesmus obliquus*

Ο οργανισμός αυτός είναι μονοκύτταρος ευκαρυωτικός, με ελλειψοειδή κύτταρα, μήκους περίπου 5-10 μm. Ο κύκλος ζωής του διαρκεί γύρω στις 20 ώρες. Στη διάρκεια αυτή, διαιρείται μία φορά δίνοντας 4-8 θυγατρικά κύτταρα, τα οποία μόλις σχηματιστούν πλήρως, συνήθως αποκόπτονται μεταξύ τους (δε σχηματίζουν κοινόβια). Εξελικτικά βρίσκεται πολύ κοντά στα άλλα δύο γνωστά στο ερευνητικό πεδίο φύκη τη Χλαμυδομονάδα (*Chlamydomonas*) και τη Χλωρέλλα (*Chlorella*).

Πρόκειται για φωτοσυνθετικό μικροοργανισμό, που παράγει οξυγόνο κατά τη φωτοσύνθεσή του. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά της φωτοσυνθετικής του δραστηριότητας μοιάζει με τα γυμνόσπερμα φυτά. Ο άγριος τύπος (wt) έχει την ικανότητα βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης και στο σκοτάδι, όπως και στο φως. Δηλαδή, ακόμη και σε ετερότροφες συνθήκες έχει διαμορφωμένους χλωροπλάστες και ενεργά φωτοσυστήματα I και II.

2.2 Συνθήκες ανάπτυξης

Η καλλιέργεια του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* έγινε σε επιμήκεις γυάλινους σωλήνες (Εικόνα 10) που στο κάτω μέρος είχαν ένα ειδικό στόμιο που επέτρεπε τον αερισμό της καλλιέργειας. Οι σωλήνες αυτοί τοποθετήθηκαν σε ενυδρείο με σταθερή θερμοκρασία στους 30 °C και από μπροστά υπήρχαν λάμπες λευκού φωτισμού με ρυθμιζόμενη ένταση ($\approx 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Οι καλλιέργειες του χλωροφύκου παρέμειναν σε αυτές τις συνθήκες για περίπου 3-4 ημέρες. Έπειτα αυτές οι καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν ως μητρικές καλλιέργειες για την διεξαγωγή των πειραμάτων. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν των Bishop και Senger, 1971 (Πίνακας 4).



Εικόνα 10. Σύστημα προκαλλιέργειας του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε μπουκάλια ερμητικά κλειστά με septa των 125mL (Εικόνα 11). Ο τελικός όγκος της καλλιέργειας στο κάθε μπουκάλι ήταν 50mL. Η δειγματοληψία για τις εκάστοτε μετρήσεις γινόταν καθημερινά την ίδια ώρα με αποστειρωμένες σύριγγες και τα μπουκάλια ανακινούνταν μηχανικά μία φορά την ημέρα ώστε να επιτευχθεί η διαλυτοποίηση των κυττάρων. Τα πειράματα διαρκούσαν από 5 έως 10 μέρες. Τα μπουκάλια κατά τη διάρκεια του πειράματος τοποθετήθηκαν σε ειδικό θάλαμο με σταθερή θερμοκρασία στους 30 °C και η ένταση του φωτισμού στις περισσότερες πειραματικές σειρές ήταν $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



Εικόνα 11. Μπουκάλι των 125 mL, με καλλιέργεια του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*, ερμητικά κλειστό με septa.

Πίνακας 4. Συστατικά του μέσου καλλιέργειας του *Scenedesmus obliquus* (Bishop and Senger,1971)

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (σε g/L)
CaCl₂ x 2H₂O	1,50
KNO₃	80,0
MgSO₄ x7H₂O	24,6
NaCl	0,47
Na₂HPO₄ x 2H₂O	17,8
NaH₂PO₄ x 1H₂O	40,5
FeSO₄ x1H₂O	0,06
Fe(III)citrate	0,24
H₃BO₃	2.86
MnCl₂ x4H₂O	1,81
ZnSO₄ x7H₂O	0,222
CuSO₄ x5H₂O	0,079
MoO₃ (85%-99.5%)	0,0177

Στη παρούσα εργασία δοκιμάστηκαν πειραματικά 2 διαφορετικοί χειρισμοί, όσον αφορά το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Οι χειρισμοί με μιστότροφο θρεπτικό, δηλ. με προσθήκη στο ανόργανο θρεπτικό 5g/L γλυκόζης (+glc) και οι χειρισμοί με αυτότροφο θρεπτικό, δηλαδή χωρίς γλυκόζη (-glc). Βέβαια πραγματοποιήθηκαν και πειράματα χωρίς θρεπτικό, μόνο με νερό.

2.3. Υπολογισμός κυτταρικής συγκέντρωσης

Πραγματοποιήθηκαν 2 διαφορετικές προσεγγίσεις για τον υπολογισμό των κυττάρων, λόγω του ότι η μορφή του κατσίγαρου στην πρώτη σειρά πειραμάτων ήταν ακατέργαστη ενώ στη δεύτερη πραγματοποιήθηκε εκχύλισμα σε νερό. Για την πρώτη πειραματική προσέγγιση η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο με πλάκα Neubauer. Ενώ στην περίπτωση με τα πειράματα που ήταν με το εκχύλισμα του κατσίγαρου, η μέτρηση της κυτταρικής συγκέντρωσης (για

εξοικονόμηση ποσότητας δείγματος και χρόνου) έγινε με την φωτομετρική καταγραφή της θολερότητας του μέσου καλλιέργειας στα 550 nm (Φωτόμετρο UV/VIS Ocean Optics USB4000) (DellaGreca *et al.*, 2001), ενώ παράλληλα συσχετίστηκε με την εκτίμηση της κυτταρικής συγκέντρωσης ($\mu\text{L PCV/mL}$ καλλιέργειας, Packed Cell Volume) με βάση την ακόλουθη καμπύλη αναφοράς:

$$\text{PCV } (\mu\text{L/mL}) = 0,5689 \cdot A_{550\text{nm}}$$

$$R^2 = 0,9992$$

2.4 Επεξεργασία κατσίγαρου

Στα πειράματα όσον αφορά τα λύματα από το ελαιουργείο (κατσίγαρος) δοκιμάστηκαν 2 διαφορετικοί χειρισμοί. Ο πρώτος ήταν να τοποθετηθεί ο κατσίγαρος απευθείας στα μπουκάλια χωρίς καμία επεξεργασία. (ακατέργαστος)

Στον δεύτερο χειρισμό έγινε εκχύλιση κατσίγαρου. Η διαδικασία εκχύλισης περιλαμβάνει τα εξής στάδια: στα 250mL κατσίγαρου προστέθηκε 100mL εξάνιο (Hexane), το διάλυμα ανακινήθηκε και μπήκε σε διαχωριστική χοάνη (Εικόνα 12) έως ότου γίνει πλήρης διαχωρισμός των ελαίων από τον υπόλοιπο κατσίγαρο. Στη συνέχεια στο διάλυμα του κατσίγαρου, πλέον χωρίς τα έλαια, προστέθηκαν 100mL μεθανόλης και ανακινήθηκε καλά και μπήκε σε διαχωριστική χοάνη για να γίνει η εκχύλιση του φαινολικού φορτίου. Στη συνέχεια μπήκε στον εξατμιστήρα (BUCHI, Vacuum controller V-850, Vacuum pump V-700, Rotavapor R-215, Heating bath B-491, HELLAMCO) στους 70 °C. (Εικόνα 13) και παρέμεινε έως ότου εξατμιστεί πλήρως. Τέλος για να ολοκληρωθεί η διαδικασία εκχύλισης το περιεχόμενο που παρέμεινε στη φιάλη επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 20mL διπλά απιονισμένου νερού και αποθηκεύτηκε με σκοπό να χρησιμοποιηθεί στο εκάστοτε πείραμα.



Εικόνα 12 Διαχωριστική χοάνη



Εικόνα 13. Εξατμιστήρας με αντλία κενού (BUCHI, Vacuum controller V-850, Vacuum pump V-700, Rotavapor R-215, Heating bath B-491, HELLAMCO)

Στα πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκε ακατέργαστος κατσίγαρος τα 50mL που ήταν ο τελικός όγκος στα μπουκάλια ήταν απευθείας από τη μητρική καλλιέργεια. Ενώ στα υπόλοιπα πειράματα που χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα κατσίγαρου, πραγματοποιήθηκε πρώτα φυγοκέντρηση της καλλιέργειας (2000 rpm, 3min) για να διαχωριστούν τα κύτταρα από το θρεπτικό και έπειτα προστέθηκε νέο θρεπτικό μέσο στα κύτταρα με τελικό όγκο 50mL και τοποθετήθηκαν στα ερμητικά κλειστά μπουκάλια. Ακολουθήθηκε αυτή η τεχνική διότι ο ακατέργαστος κατσίγαρος είναι πλούσιος σε θρεπτικά και ο στόχος των πειραμάτων ήταν να καταναλωθεί όσο περισσότερο γίνεται από το χλωροφύκος, οπότε δεν ανανεώνονταν το θρεπτικό μέσο στα μπουκάλια για να είναι ο κατσίγαρος η μόνη τροφή. Εν αντιθέσει, στα πειράματα που διεξήχθησαν με εκχύλισμα κατσίγαρου προστέθηκε νέο θρεπτικό μέσο διότι έπρεπε μέσω των θρεπτικών που είχε το μέσο να ενεργοποιηθεί ο μεταβολισμός του χλωροφύκους με απώτερο σκοπό να καταναλώσει τα φαινολικά του κατσίγαρου.

2.5. Επαγωγικός φθορισμός-Φυσικοχημικές αναλύσεις της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού

Μόνο ένα μέρος της ενέργειας που απορροφάται από τις χρωστικές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού χρησιμοποιείται για τη φωτοχημεία της φωτοσύνθεσης. Το υπόλοιπο εκπέμπεται είτε ως θερμότητα είτε ως φθορισμός. Η επαγωγή του φθορισμού από φωτοσυνθετικούς οργανισμούς παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από

τους Kautsky and Hirsch (1931). Η επαγωγή του φθορισμού από τα φυτά πραγματοποιείται σε δύο φάσεις, εκ των οποίων η πρώτη είναι ταχεία και η δεύτερη αργή. Σήμερα, η μελέτη της καμπύλης του επαγωγικού φθορισμού –ιδιαίτερα της ταχείας φάσης- έχει εξελιχθεί σε πολύτιμο ερευνητικό μέσο για τη μελέτη της μοριακής δομής και λειτουργίας, αλλά και της απόδοσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Βάσει της μεθόδου των Strasser and Strasser (1995), μπορεί να εκτιμηθεί, εκτός των άλλων, το μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυνθετικής κεραίας, η πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης και μια σειρά από παραμέτρους, που αφορούν τη μοριακή δομή και τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Ο φθορισμός αυξάνεται όταν η φωτοχημική απόδοση της φωτοσύνθεσης παρεμποδίζεται για οποιοδήποτε λόγο, για παράδειγμα όταν δεν υπάρχει διαθέσιμος οξειδωμένος δέκτης ηλεκτρονίων σε κάποιο σημείο στην πορεία της ηλεκτρονιακής μεταφοράς. Όταν ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός, μετά από την προσαρμογή του στο σκοτάδι, δεχτεί την επίδραση συνεχούς φωτισμού, τότε ο φθορισμός του 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).

Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού έγιναν με τη φορητή συσκευή Plant Efficiency Analyser (Handy PEA, Hansatech Instruments) (Εικόνα 14), και ακολούθησε επεξεργασία των δεδομένων με χρήση εξειδικευμένου λογισμικού εφαρμογής του JIP-test (Biolyzer HP 4.0), σύμφωνα με τη μέθοδο των Strasser and Strasser (1995).

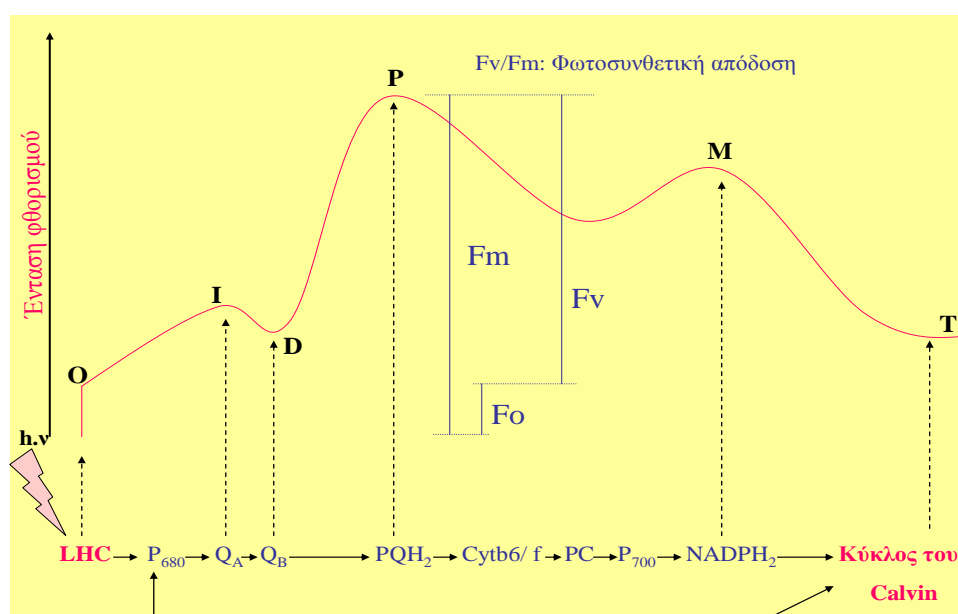
Όλες οι μετρήσεις έγιναν απευθείας στα μπουκαλάκια χωρίς να διαταραχθεί το κλειστό σύστημα, τα οποία προτού διεγερθούν είχαν παραμείνει στο σκοτάδι για 5 min, προκειμένου να «αδειάσουν» τα κέντρα αντίδρασης από ηλεκτρόνια. Από τις μετρήσεις υπολογίστηκε ο

λόγος F_v/F_m , που συνδέεται άμεσα με τη φωτοσυνθετική απόδοση. (Strasser and Strasser, 1995). Επίσης με εφαρμογή του JIP-test για τιμές φθορισμού, που



Εικόνα 14. Handy PEA για τις μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού

αντιστοιχούν σε καθορισμένα στάδια [J, I και P (Εικόνα 15)] υπολογίστηκαν τα επιμέρους χαρακτηριστικά του φωτοσυνθετικού μηχανισμού: ο λόγος ABS/RC, που συνδέεται με το μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PSII, ο λόγος DI_o/RC, που συνδέεται με την ενέργεια που διαχέεται με τη μορφή θερμότητας και ο λόγος RC/CS_o, που συνδέεται με την πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης του PSII καθώς και το PI_{ABS} που εκφράζει την επίδοση ανά απορροφώμενη ενέργεια (Πίνακας 5).



Εικόνα 15. Τυπική καμπύλη επαγωγικού φθορισμού

Η μέθοδος βασίζεται σε μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού με ανάλυση 10 μs σε χρονικό διάστημα 1 δευτερολέπτου. Ο φθορισμός μετρήθηκε με 12-bit ανάλυση και η διέγερση έγινε από 3 διόδους φωτισμού (LEDs) με ένταση ακτινοβολίας μέχρι $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ερυθρού φωτός (650nm).

Πίνακας 5. Βασικές παράμετροι του JIP-test

Μεταβλητή OJIP καμπύλης

F_t

$F_{50\mu\text{s}}$

$F_{300\mu\text{s}}$

$F_J = F_{2\text{ms}}$

$F_I = F_{30\text{ms}}$

Ορισμός

Τιμή φθορισμού σε χρόνο t μετά την ακτινοβολήση

Ένταση φθορισμού στα 50 μs

Ένταση φθορισμού στα 300 μs

Ένταση φθορισμού στο βήμα J (2 ms) της καμπύλης OJIP

Ένταση φθορισμού στο βήμα I (30 ms) της καμπύλης OJIP

$F_P (= F_m)$	Μέγιστη ένταση φθορισμού στο P της καμπύλης OJIP
t_{Fm}	Χρόνος σε (ms) που απαιτείται για να μεγιστοποιηθεί η ένταση του φθορισμού F_m
Area	Συνολική συμπληρωματική περιοχή ανάμεσα στην καμπύλη OJIP και την ευθεία που διέρχεται από το $F = F_m$

Παράμετροι JIP-test

F_o	Ελάχιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί σε «ανοιχτά» κέντρα (open PSII RC _s , t = 0)
F_m	Μέγιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί στο χρόνο όπου όλα τα κέντρα είναι «κλειστά» (closed PSII RC _s , t = t_{Fm})
F_v	Μεταβλητή τιμή φθορισμού τη χρονική στιγμή t
$F_v = F_m - F_o$	Μέγιστη τιμή μεταβλητής τιμής φθορισμού
$V_t = (F_t - F_o)/(F_m - F_o)$	Σχετική μεταβολή φθορισμού τη χρονική στιγμή t
$V_J = (F_J - F_o)/(F_m - F_o)$	Σχετική μεταβολή φθορισμού στο βήμα J
$M_o = (\Delta V/\Delta t)_o =$ $= 4(F_{300\ \mu s} - F_o)/(F_m - F_o)$	Αρχική κλίση σε ms της καμπύλης $V = f(t)$
$S_m = (Area)/(F_m - F_o)$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης OJIP (Area), ομαλοποιούμενο ως προς F_v (αποτελεί μέτρο εκτίμησης του αριθμού των οξειδοαναγωγικών κύκλων της Q_A)
$S_s = V_J/M_o$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης OJIP που αντιστοιχεί μόνο στην OJ φάση (διάστημα όπου η Q_A των RC ανάγεται μία φορά)
$N = S_m/S_s = S_m M_o (1/V_J)$	Μέτρο αριθμού κύκλων αναγωγής της Q_A στο διάστημα t_{Fm}

Ειδικές ροές ενέργειας (ανά κέντρο αντίδρασης που ανάγει Q_A)

$ABS/RC = M_o (1/V_J)(1/\Phi_{P_o})$	Μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας
$TR_o/RC = M_o (1/V_J)$	Ενέργεια που παγιδεύεται ανά κέντρο αντίδρασης (για t = 0)
$ET_o/RC = M_o (1/V_J)\Psi_o$	Ροή ηλεκτρονίων ανά κέντρο αντίδρασης (για t = 0)
$DI_o/RC = (ABS/RC) - (TR_o/RC)$	Μη φωτοχημικά διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης (για t = 0)

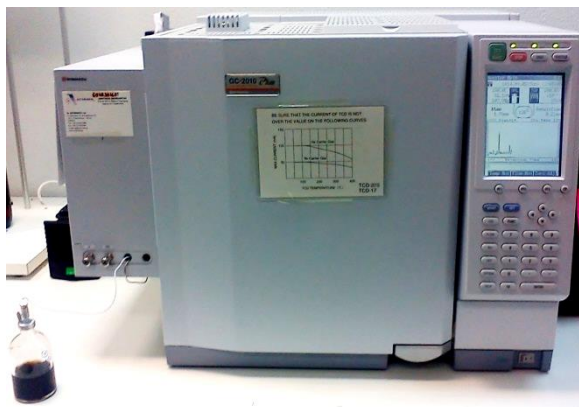
Αποδόσεις ή λόγοι επιμέρους ροών

$\Phi_{P_o} = TR_o/ABS = [1 - (F_o/F_m)]$	Μέγιστη κβαντική απόδοση της πρωτογενούς φωτοχημείας (για t = 0)
$\Psi_o = ET_o/TR_o = 1 - V_J$	Πιθανότητα να προκαλέσει μια διέγερση (exciton) τη μετακίνηση ενός ηλεκτρονίου κατά μήκος της αλυσίδας πέρα από την Q_A^- (για t = 0)

$\Phi_{E_0} = ET_0/ABS = [1-(F_0/F_m)]\Psi_0$	Κβαντική απόδοση της μεταφοράς ηλεκτρονίων (για $t = 0$)
$\Phi_{D_0} = 1 - \Phi_{P_0} = F_0/F_m$	Κβαντική απόδοση της διάχυσης ηλεκτρονίων (για $t = 0$)
Εκτιμώμενες ροές ενέργειας ανά διεγερμένη περιοχή	
ABS/CS_0	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το F_0
ABS/CS_m	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το F_m
$TR_0/CS_0 = \Phi_{P_0}(ABS/CS_0)$	Παγιδευμένη ενέργεια ανά διεγερόμενη περιοχή (για $t = 0$)
$ET_0/CS_0 = \Phi_{E_0}(ABS/CS_0)$	Ροή ηλεκτρονίων ανά περιοχή διέγερσης (για $t = 0$)
$DI_0/CS_0 = (ABS/CS_0) - (TR_0/CS_0)$	Διαχεόμενη ενέργεια ανά περιοχή διέγερσης (για $t = 0$)
Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης	
RC/CS_0	Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης
Δείκτες επίδοσης	
$PI_{ABS} = (RC/ABS) (\Phi_{P_0}/1 - \Phi_{P_0})(\Psi_0/1 - \Psi_0)$	Επιδόσεις ανά απορροφώμενη ενέργεια
$PI_{CS_0} = (RC/CS_0) (\Phi_{P_0}/1 - \Phi_{P_0})(\Psi_0/1 - \Psi_0)$	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης ($t = 0$)
$PI_{CS_m} = (RC/CS_m) (\Phi_{P_0}/1 - \Phi_{P_0})(\Psi_0/1 - \Psi_0)$	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης ($t = t_{Fm}$)
$SFI_{abs} = (1 - \Phi_{P_0})(1 - \Psi_0)$	Δείκτης λειτουργικότητας
Ικανότητα παραγωγής έργου	
$DF_{ABS} = \log(PI_{ABS})$	Εκτιμώμενη παραγωγή έργου ανά απορροφώμενη ενέργεια

2.6. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση υδρογόνου (H₂) και οξυγόνου (O₂) με αέρια χρωματογραφία θερμικής αγωγιμότητας (GC-TCD)

Για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του οξυγόνου και του παραγόμενου υδρογόνου χρησιμοποιήθηκε Αέρια Χρωματογραφία Θερμικής Αγωγιμότητας GC-TCD (Shimadzu GC 2010 Plus, Kyoto, Japan – Εικόνα 16), με φέρον αέριο Αργό (5bar Πίεση - 23.5 ml min⁻¹). 1mL αέριου δείγματος ενύονταν στην GC-TCD μέσω αυτόματου δειγματολήπτη, όπου και ο διαχωρισμός του H₂ και του O₂ γινόταν με βάση τη θερμική αγωγιμότητα των



Εικόνα 16. Αέριος Χρωματογράφος Θερμικής Αγωγιμότητας GC-TCD

αερίων. Η θερμική αγωγιμότητα του Αργού είναι 0.0001772 W cmK⁻¹, του Οξυγόνου 0.0002674 W/cmK και του Υδρογόνου 0.001815 W cmK⁻¹. Για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε μια τριχοειδής στήλη μήκους 30m, διαμέτρου 0,53mm και πάχους 20μm (Vici Metronics MC Poulso,USA) με τη θερμοκρασία του φούρνου στους 120 °C. Η θερμοκρασία του TCD ανιχνευτή ήταν 200°C και του σημείου εισόδου της ένεσης ήταν 180°C. Η ποσοτικοποίηση των H₂ και O₂ έγινε κάνοντας καμπύλη αναφοράς για γνωστές ποσότητες των αερίων.

2.7 Ποιοτικός και Ποσοτικός Προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των φαινολικών ενώσεων στα δείγματα της πρώτης πειραματικής διαδικασίας (ακατέργαστος κατσίγαρος) έγινε με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Τα δείγματα καλλιέργειας μετά το πέρας των πειραμάτων φυγοκεντρήθηκαν για 3 λεπτά στα 1000g με σκοπό τον διαχωρισμό των κυττάρων (ίζημα) από τον κατσίγαρο (υπερκείμενο). Η διαδικασία της εκχύλισης περιλαμβάνει τα εξής βήματα: τα δείγματα από το ίζημα τοποθετήθηκαν στο σύστημα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό (SpeedVac) για 24 ώρες για να φύγει όλη η υγρασία από το δείγμα. Στη συνέχεια στο δείγμα (1g) προστίθενται 5mL μεθανόλης 70% (v/v), ομογενοποιείται το δείγμα, αναδεύεται ισχυρά για 15 λεπτά και στο τέλος

πραγματοποιείται φυγοκέντρωση με σκοπό να αποθηκευτεί το υπερκείμενο. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές. Έπειτα στο συνολικό όγκο του υπερκείμενου που έχει αποθηκευτεί από την παραπάνω διαδικασία εκχύλισης προστίθεται εξάνιο και το δείγμα μπαίνει σε διαχωριστική χοάνη με σκοπό το διαχωρισμό των ελαίων. Μόλις επιτευχθεί ο διαχωρισμός το δείγμα τοποθετείται στον εξατμιστήρα στους 70^ο C (BUCHI, Vacuum controller V-850, Vacuum pump V-700, Rotavapor R-215, Heating bath B-491, HELLAMCO) και τέλος μόλις εξατμιστεί όλος ο υγρός όγκος το υλικό επαναδιαλυτοποιείται σε 2mL μεθανόλης 50% (v/v). Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται και για το υπερκείμενο με τη μόνη διαφορά ότι δεν χρειάζεται να μπει στο σύστημα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό (SpeedVac). Την πρώτη φορά που προστίθεται μεθανόλη, αλλάζουν οι όγκοι, δηλαδή σε 12 mL δείγματος υπερκειμένου προστίθενται 28mL μεθανόλης 100% για να επιτευχθεί το 70% (v/v) μεθανόλης. Στη συνέχεια τα βήματα είναι τα ίδια. Η ανάλυση σε HPLC έγινε ισοκρατικά με τη χρήση στήλης narrow bore C-18 (2.1 mm x 200 mm, 5μm Hypersil, Hewlett Packard) και ένα σύστημα διαλυτών που περιλάμβανε υπερκάθαρο νερό (H₂O) , μεθανόλη (CH₃OH) και οξικό οξύ (CH₃COOH) σε αναλογία 49:50:1. Ο διαχωρισμός έγινε σε σύστημα HPLC (Shimadzu, LC-10AD VP) που ήταν εξοπλισμένο με δύο αντλίες και σύστημα diode array (Shimadzu SPD-M10A). Η ποσοτική εκτίμηση του φαινολικού φορτίου έγινε αθροιστικά παίρνοντας υπόψη όλες τις HPLC κορυφές με φάσμα απορρόφησης χαρακτηριστικό για φαινολικές ενώσεις.

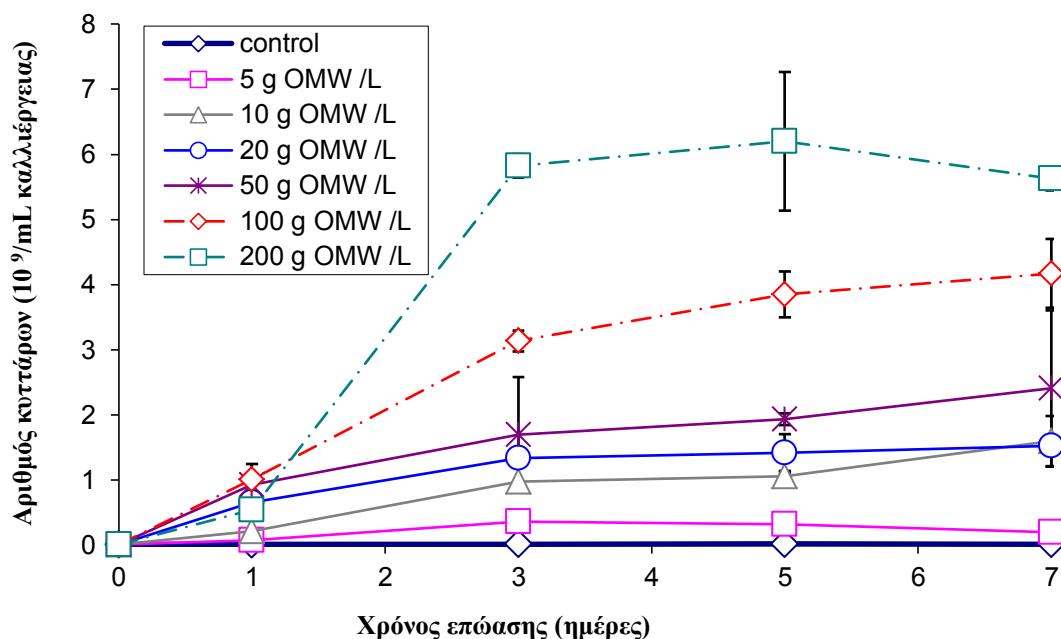
Στη δεύτερη πειραματική σειρά με το εκχύλισμα του κατσίγαρου ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων έγινε φασματοφωτομετρικά (Φωτόμετρο UV/VIS Ocean Optics USB4000). Η προετοιμασία των δειγμάτων περιλαμβάνει τη συλλογή 1mL δείγματος από τα μπουκάλια με αποστειρωμένες σύριγγες, στη συνέχεια στα 200μL δείγματος προστίθενται 800μL μεθανόλης και πραγματοποιείται ανάδευση. Μετά από φυγοκέντρωση στα 1500g για 5 λεπτά, σε 500μL από το υπερκείμενο προστίθενται 500μL μεθανόλης. Ακολουθεί ανάδευση και τέλος φασματοφωτομετρική καταγραφή της UV-περιοχής (200-400nm). Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα Origin 10.0 και Excel 2010.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για να απαντηθεί το κεντρικό ερώτημα της παρούσας διατριβής οργανώθηκε σειρά πειραμάτων, ξεκινώντας από τη συλλογή κασίγαρου από ελαιοτριβείο στη Κρήτη.

Στην πρώτη πειραματική σειρά χρησιμοποιήθηκε ακατέργαστος κασίγαρος, δηλαδή δεν πραγματοποιήθηκε καμιά επεξεργασία σε αυτόν, από τη στιγμή που συλλέχθηκε έως ότου εισήχθηκε στη πειραματική διαδικασία. Αυτή η επιλογή έγινε ως μια πρώτη προσέγγιση, για να διερευνηθεί η αποτελεσματικότητα του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* στη βιοαποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων του κασίγαρου, κρατώντας ταυτόχρονα το κόστος της όλης διαδικασίας στα χαμηλότερα δυνατά επίπεδα (όσα παραπάνω βήματα επεξεργασίας προστίθενται στη μέθοδο τόσο αυξάνεται και το κόστος της). Ταυτόχρονα μελετήθηκε η ανθεκτικότητα του *Scenedesmus obliquus* σε αυτές τις συνθήκες, αλλά και η δυνατότητα συνδυασμού της βιοαποικοδόμησης των φαινολικών ενώσεων με την φωτοσυνθετική παραγωγή αερίου υδρογόνου (H_2).

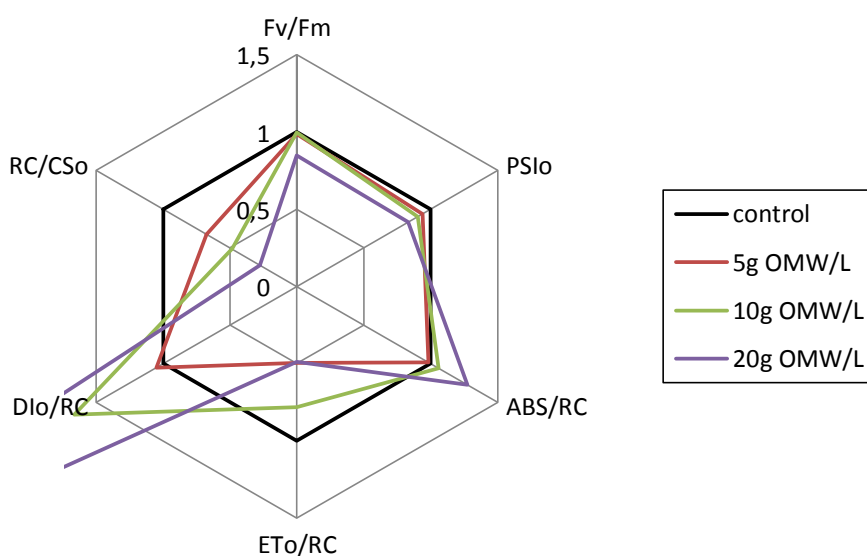
Ο πρώτος πειραματικός έλεγχος αφορούσε την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ακατέργαστου κασίγαρου στην ανάπτυξη της καλλιέργειας (σε κλειστό σύστημα) έχοντας για μάρτυρα (control) τον *Scenedesmus obliquus* σε νερό.



Εικόνα 17. Κινητική ανάπτυξης καλλιέργειας *Scenedesmus obliquus* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ακατέργαστου κασίγαρου, OMW: ακατέργαστος κασίγαρος

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βιομάζα της καλλιέργειας του *Scenedesmus obliquus* αυξάνεται καθώς αυξάνεται και η συγκέντρωση του κατσίγαρου (Εικόνα 17). Οι τιμές είναι πολύ υψηλές και φτάνουν έως τα $6 \cdot 10^9$ κύτταρα/ mL καλλιέργειας στα 200g OMW /L , περίπου 250 φορές πάνω από τις τιμές του μάρτυρα . Βέβαια, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε στη περίπτωση αυτή ότι υπάρχει η πιθανότητα τα κύτταρα που μετρήθηκαν να μην είναι μόνο από το είδος του *Scenedesmus obliquus* αλλά και από άλλους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς που πιθανόν να συνυπάρχουν στον ακατέργαστο κατσίγαρο.

Στη συνέχεια παράλληλα με τη μέτρηση της βιομάζας έγινε έλεγχος της λειτουργικότητας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Στην Εικόνα 18 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αυτής της μέτρησης με έξι βασικές παραμέτρους.

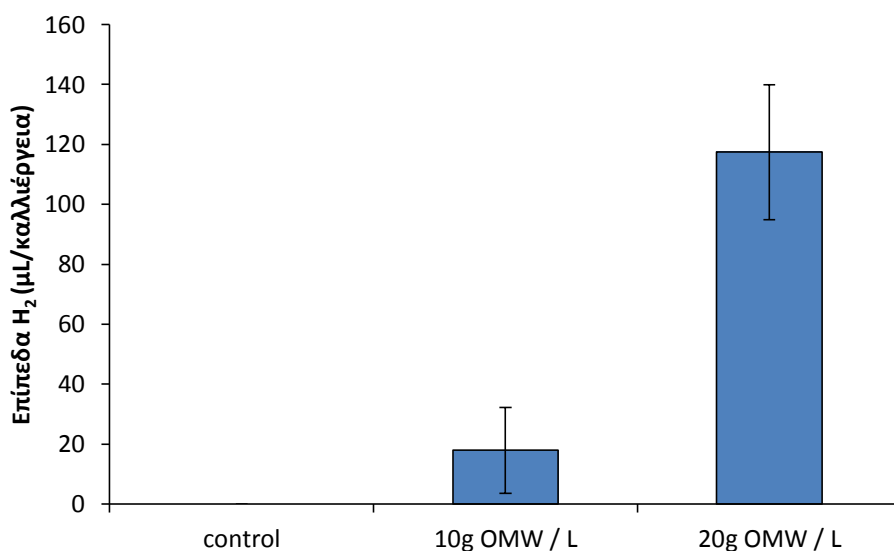


Εικόνα 18. Αλλαγές στη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε καλλιέργειες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ακατέργαστου κατσίγαρου σε σύγκριση με το μάρτυρα ύστερα από τις πρώτες 24 ώρες

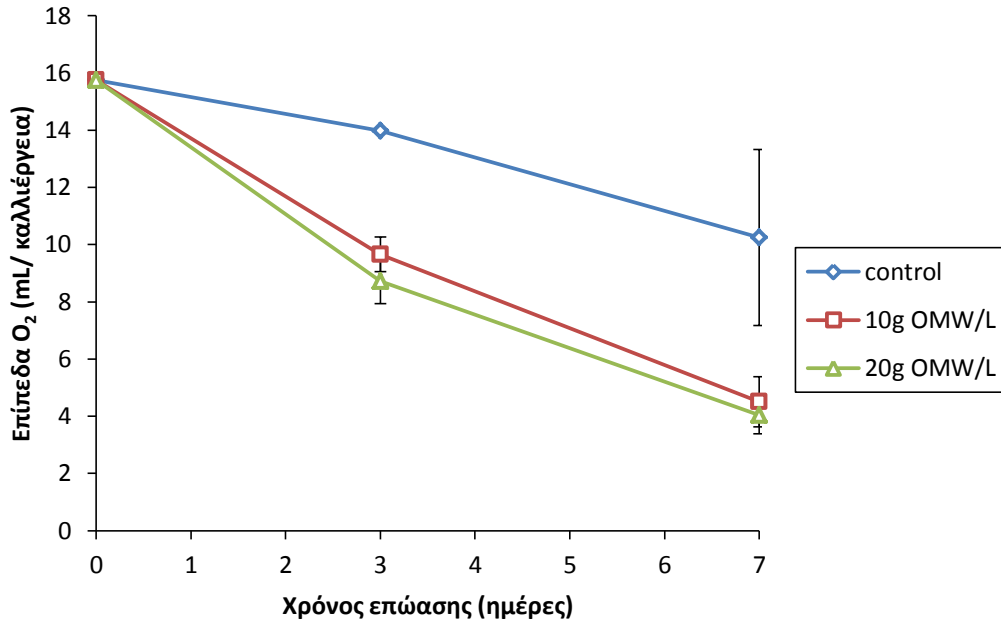
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του κατσίγαρου μειώνεται η πυκνότητα των ενεργών φωτοσυνθετικών κέντρων αντίδρασης (RC/CS₀), αυξάνεται το μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (ABS/RC), μειώνεται η ενεργότητα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETo/RC), μειώνεται η φωτοχημεία (PSII_o), αυξάνεται η μη φωτοχημική διάχυση της ενέργειας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (DII_o/RC) και μειώνεται η φωτοσυνθετική απόδοση (Fv/Fm). Αυτές οι αλλαγές είναι αντίστοιχες με

αυτές που παρατηρούνται στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό όταν από αυτότροφες συνθήκες εκτεθεί σε περιβάλλον με αυξημένη οργανική ύλη (μικτότροφο περιβάλλον), αλλά και με αυτές καλλιεργειών εκτεθειμένων σε καταπόνηση. Στα αποτελέσματα δεν παρουσιάστηκαν οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του κατσίγαρου διότι οι ποσότητες του κατσίγαρου ήταν τόσο μεγάλες με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει σωστή μέτρηση με την τεχνική του επαγωγικού φθορισμού. Αυτό συμβαίνει διότι οι μεγάλες συγκεντρώσεις ακατέργαστου κατσίγαρου που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα μείωσαν δραστικά την ένταση ακτινοβολίας και δεν μπορούσαν να επιτευχθούν κορεσμένες συνθήκες φωτισμού.

Παράλληλα με τις παραπάνω μετρήσεις στη διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις με τη χρήση αεροχρωματογραφίας GC-TCD για την πιθανότητα παραγωγής βιο-υδρογόνου (H_2), μετρώντας παράλληλα και τα επίπεδα του οξυγόνου σε κλειστό σύστημα.



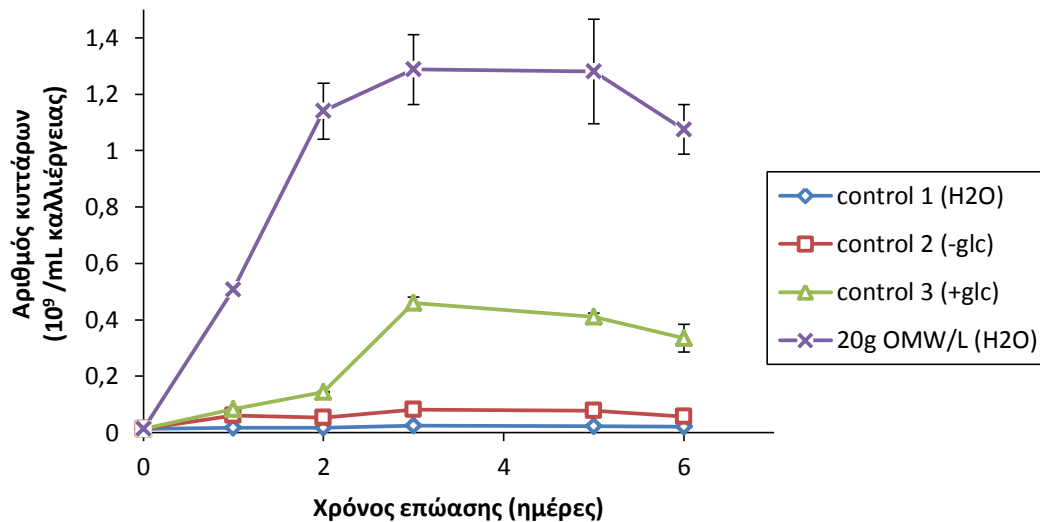
Εικόνα 19. Παραγωγή υδρογόνου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ακατέργαστου κατσίγαρου μετά από 7 ημέρες επώασης



Εικόνα 20. Κινητική κατανάλωσης οξυγόνου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ακατέργαστου κασίγαρου

Από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις κασίγαρου μόνο οι συγκεντρώσεις κασίγαρου των 10g/L και 20g/L παράγααν υδρογόνο μετά από 7 ημέρες επώασης σε κλειστό σύστημα (Εικ.19). Σε αυτό το διάγραμμα φαίνεται ξεκάθαρα πως η συγκέντρωση κασίγαρου 20g/L καλλιέργειας εμφάνισε τις μεγαλύτερες τιμές σε αέριο H_2 την έβδομη ημέρα. Στη συνέχεια τα 10g/L εμφάνισαν μια μικρή ποσότητα H_2 . Η παραγωγή του υδρογόνου, επιβεβαιώνεται και με τη μείωση της συγκέντρωσης οξυγόνου σε αυτές τις συγκεντρώσεις όπως φαίνεται στην Εικόνα 20.

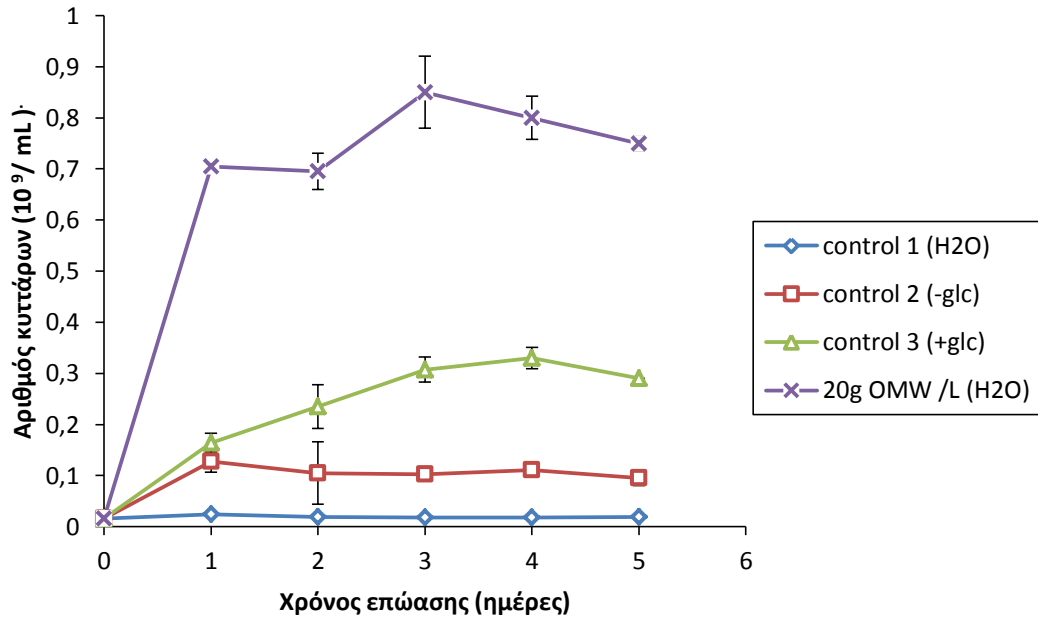
Μετά και από αυτά τα αποτελέσματα για τον περαιτέρω έλεγχο της συμπεριφοράς του *Scenedesmus obliquus* σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα (όπως με ή χωρίς γλυκόζη) χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση των 20g OMW/L.



Εικόνα 21. Κινητική ανάπτυξης καλλιέργειας *Scenedesmus obliquus* σε διαφορετικές συνθήκες, *Scenedesmus obliquus* σε νερό [control 1 (H₂O)], *Scenedesmus obliquus* σε θρεπτικό χωρίς γλυκόζη [control 2 (-glc)], *Scenedesmus obliquus* σε θρεπτικό με γλυκόζη [control 3 (+glc)] και *Scenedesmus obliquus* μαζί με 20g/L ακατέργαστο κασίγαρο σε νερό [20g OMW /L (H₂O)]

Από το διάγραμμα της ανάπτυξης φαίνεται ότι στο χειρισμό με τον κασίγαρο [20g OMW/L (H₂O)] οι καλλιέργειες έχουν εμφανώς μεγαλύτερη ανάπτυξη. Μετά ακολουθεί ο μάρτυρας με το οργανικό θρεπτικό μέσο [control 3 (+glc)] στη συνέχεια ο μάρτυρας που έχει ανόργανο θρεπτικό [control 2 (-glc)] και στο τέλος ο μάρτυρας με το νερό [control 1 (H₂O)] όπως αναμενόταν. Ουσιαστικά παρατηρείται μεγάλη ανάπτυξη της καλλιέργειας των μικροφυκών στον χειρισμό που έχει μόνο ακατέργαστο κασίγαρο αντικαθιστώντας πλήρως ανόργανο και οργανικό θρεπτικό, διότι είναι ένα καλό υπόστρωμα αφού είναι πλούσιος σε οργανική ύλη και θρεπτικά. Και σ' αυτήν την περίπτωση δεν μπορεί να αποκλειστεί πιθανότητα μέτρησης και άλλων φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών που φέρει ο ίδιος ο κασίγαρος.

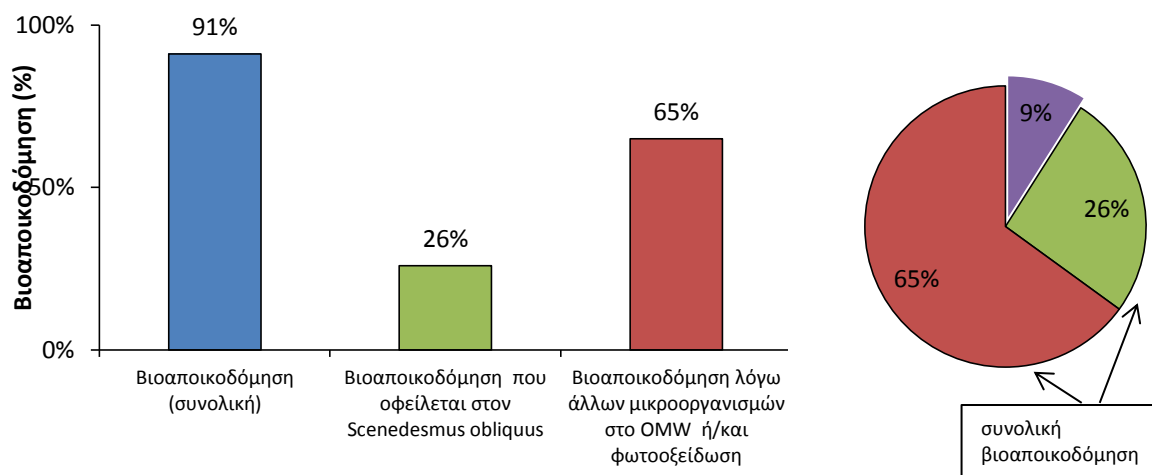
Το ίδιο πείραμα με τους ίδιους χειρισμούς επαναλήφθηκε με μόνη διαφορά τη συνεχή ανάδευση των δειγμάτων για να ελεγχθεί πόσο επηρεάζει η συνθήκη αυτή. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 22.



Εικόνα 22. Ανάπτυξη καλλιέργειας *Scenedesmus obliquus* σε διαφορετικές συνθήκες σε ανάδευση, *Scenedesmus obliquus* σε νερό [control 1 (H₂O)], *Scenedesmus obliquus* σε θρεπτικό χωρίς γλυκόζη [control 2 (-glc)], *Scenedesmus obliquus* σε θρεπτικό με γλυκόζη [control 3 (+glc)] και *Scenedesmus obliquus* μαζί με 20g/L ακατέργαστο κατσίγαρο σε νερό [OMW 20g/L (H₂O)]

Από την Εικ. 22 παρατηρείται πάλι μεγαλύτερη ανάπτυξη στο χειρισμό με τον κατσίγαρο σε σχέση με τους άλλους χειρισμούς που έχουν θρεπτικό με γλυκόζη και χωρίς. Με μια πολύ μικρή διαφορά στις τιμές, είναι λίγο πιο χαμηλές εκεί που υπάρχει ανάδευση σε σύγκριση με αυτά που είναι στατικά, και επιπλέον χρησιμοποιώντας ανάδευση καταναλώνεται παραπάνω ενέργεια.

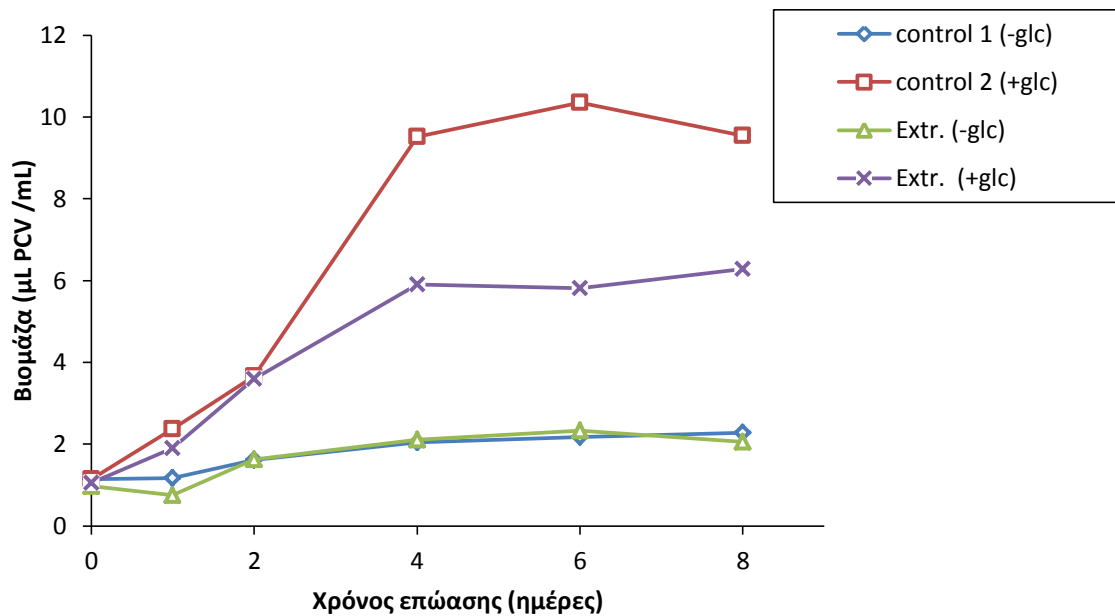
Ο βασικότερος σκοπός της εργασίας αυτής είναι η δυνατότητα της βιοαποικοδόμησης των φαινολικών ενώσεων του κατσίγαρου μέσω του μεταβολισμού του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*. Για αυτόν τον έλεγχο και με σκοπό να μετρηθεί το ποσοστό των ολικών φαινολών που καταναλώθηκε μόνο από το μικροφύκος και όχι από άλλους μικροοργανισμούς που μπορεί να φέρει ο κατσίγαρος ή από άλλους παράγοντες όπως η φωτοοξειδωση των φαινολικών ενώσεων πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στην HPLC με 3 διαφορετικούς χειρισμούς. Δηλαδή υπήρχε ο χειρισμός ακατέργαστος κατσίγαρος χωρίς *Scenedesmus obliquus*, ο μάρτυρας που ήταν *Scenedesmus obliquus* σε νερό και ο χειρισμός με τον *Scenedesmus obliquus* και τον ακατέργαστο κατσίγαρο μαζί [20 g OMW/L]. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 23.



Εικόνα 23. Ποσοστά βιοαποικοδόμησης (%) των φαινολικών ενώσεων του κασιίγαρου 20g OMW/L μετά από 7 ημέρες επώαση

Η συνολική βιοαποικοδόμηση σε διάστημα 7 ημερών ήταν 91%, από αυτό το ποσοστό το 26% της βιοαποικοδόμησης οφείλεται αποκλειστικά στον *Scenedesmus obliquus* και το υπόλοιπο 65% σε άλλους μικροοργανισμούς που πιθανότατα υπάρχουν στον ακατέργαστο κασιίγαρο, ή/και λόγω άλλων παραγόντων όπως η φωτοοξείδωση των φαινολικών ενώσεων.

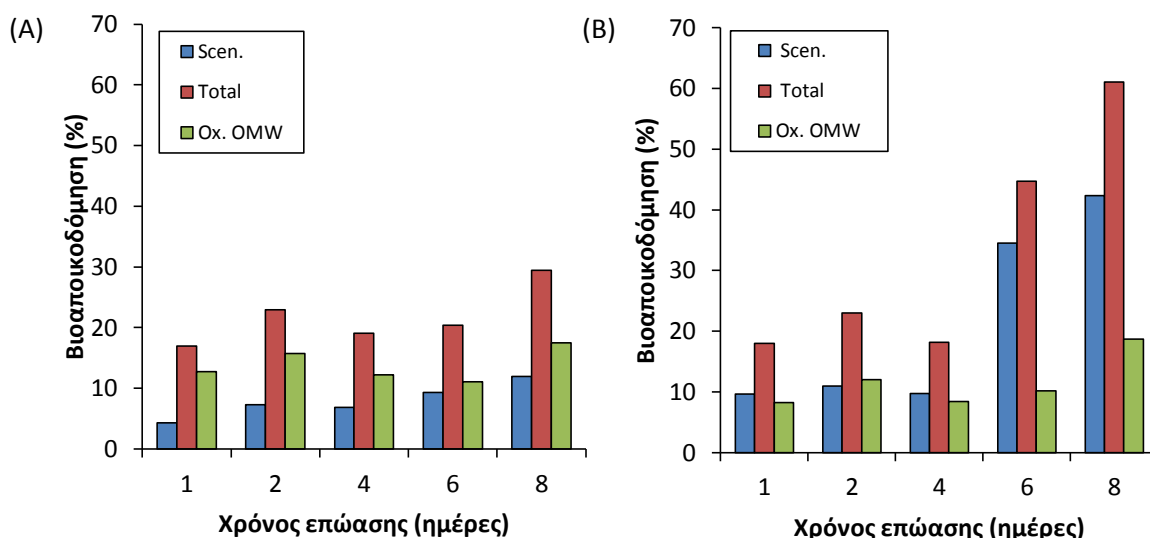
Για να επιλυθεί το εν λόγω ζήτημα, επίδραση άλλων μικροοργανισμών που φέρει ο κασιίγαρος, σχεδιάστηκε σειρά πειραμάτων με ολικό εκχύλισμα κασιίγαρου (αντί του ακατέργαστου κασιίγαρου) ώστε να αποκλειστεί η περίπτωση της επιμόλυνσης λόγω του μικροβιακού φορτίου που φέρει ο κασιίγαρος. Αυτή η πειραματική προσέγγιση πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα (ανόργανο και οργανικό) με μια τυχαία και σταθερή τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος κασιίγαρου για να διαπιστωθεί ποιο είναι το βέλτιστο. Δηλαδή πραγματοποιήθηκε έλεγχος στην επίδραση της γλυκόζης. Σε αυτή τη πειραματική διαδικασία διατηρήθηκε σταθερή μια τυχαία συγκέντρωση του εκχυλίσματος κασιίγαρου που περιείχε (150 mg phenols/L) και διαφοροποιήθηκε το θρεπτικό (με και χωρίς γλυκόζη). Η μετατροπή της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος κασιίγαρου σε g phenols/L πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Folin. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω.



Εικόνα 24. Κινητική ανάπτυξης καλλιέργειας *Scenedesmus obliquus* σε διαφορετικές συνθήκες, *Scenedesmus obliquus* σε θρεπτικό χωρίς γλυκόζη [control 1(-glc)], *Scenedesmus obliquus* σε θρεπτικό με γλυκόζη [control 2 (+ glc)], *Scenedesmus obliquus* μαζί με εκχύλισμα κατσίγαρου σε θρεπτικό χωρίς γλυκόζη [Extr. (- glc)] και *Scenedesmus obliquus* μαζί με εκχύλισμα κατσίγαρου σε θρεπτικό με γλυκόζη [Extr. (+ glc)]

Στην Εικόνα 24 φαίνεται πως παρουσία γλυκόζης το εκχύλισμα του κατσίγαρου [Extr. (+ glc)] προκαλεί παρεμπόδιση στην ανάπτυξη σε σύγκριση με τον αντίστοιχο μάρτυρα [control 2 (+ glc)]. Ενώ οι άλλοι 2 χειρισμοί που δεν έχουν γλυκόζη στο θρεπτικό δεν έχουν ιδιαίτερη διαφοροποίηση στην ανάπτυξη είτε υπάρχει εκχύλισμα κατσίγαρου είτε όχι.

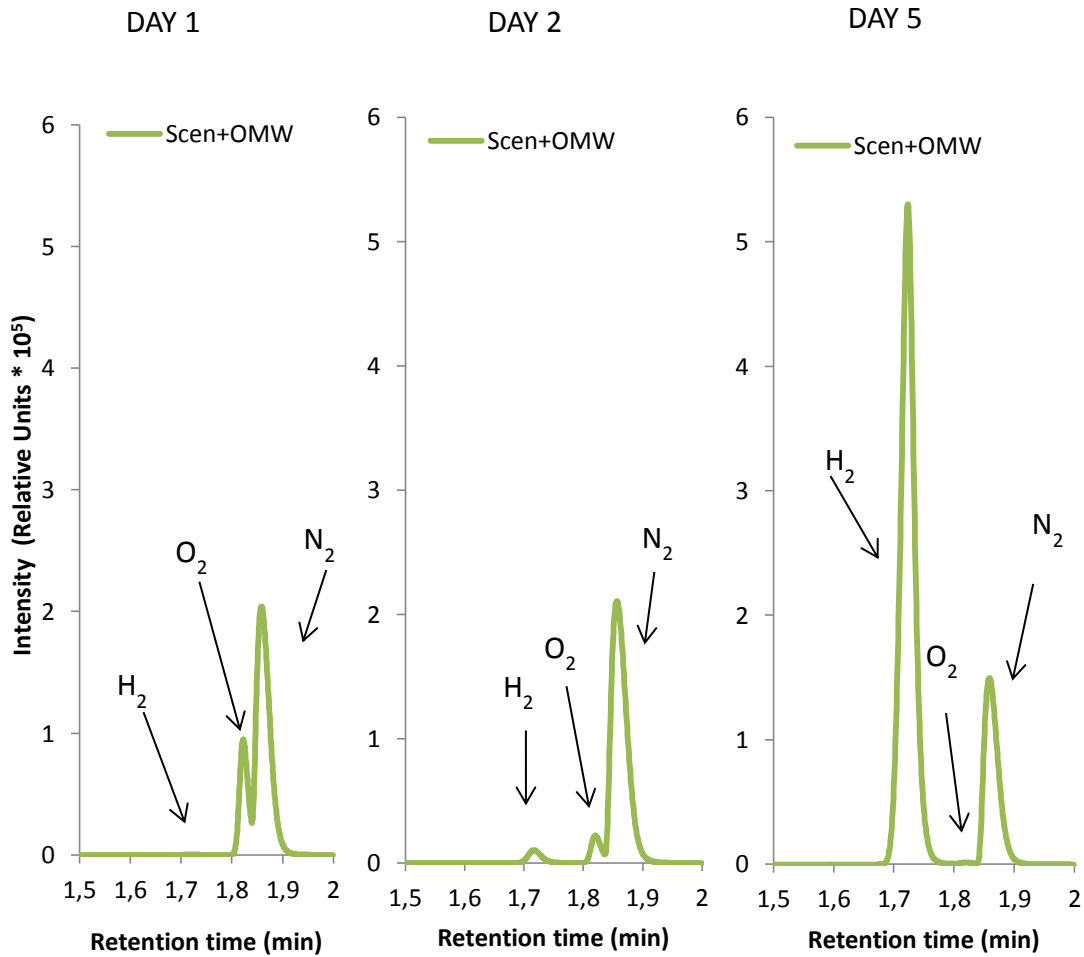
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για την καταγραφή της βιοαποικοδόμησης των φαινολικών ενώσεων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 25.



Εικόνα 25. Ποσοστά βιοαποικοδόμησης (%) στις δυο διαφορετικές συνθήκες, θρεπτικό μέσο χωρίς γλυκόζη (Α) και θρεπτικό μέσο με γλυκόζη (Β). Scen.: βιοαποικοδόμηση που οφείλεται στο *Scenedesmus obliquus*, Total : συνολική βιοαποικοδόμηση, Ox.OMW : οξειδωση του κατσίγαρου.

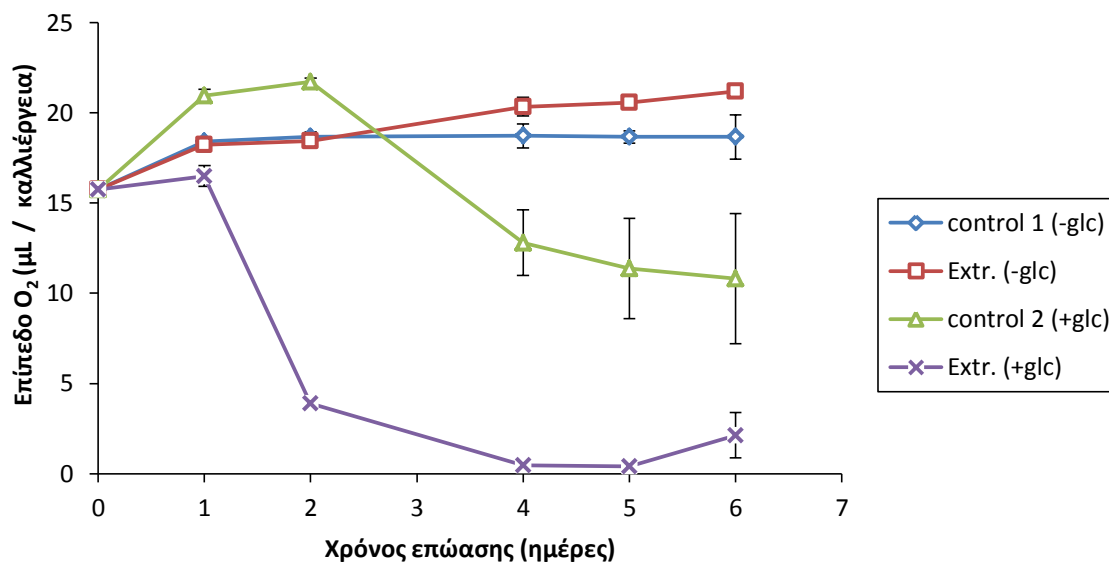
Στα διαγράμματα βιοαποικοδόμησης (ποσοστά %) (Εικόνα 25 Α,Β.) οι χειρισμοί που έχουν γλυκόζη στο θρεπτικό παρουσιάζουν σαφώς μεγαλύτερα ποσοστά βιοαποικοδόμησης, αλλά και μεγαλύτερη βιομάζα (Εικόνα 24). Η συνολική βιοαποικοδόμηση στο χειρισμό με γλυκόζη την 8^η μέρα φτάνει σε ποσοστό 61% , ενώ την αντίστοιχη μέρα στον χειρισμό που δεν έχει γλυκόζη φτάνει στο 30%. Και στους δυο χειρισμούς η αποικοδόμηση του εκχυλίσματος κατσίγαρου λόγω φωτοοξειδωσης είναι περίπου στα ίδια ποσοστά, περίπου 18% για την 8^η μέρα.

Στην Εικόνα 26 παρουσιάζεται ενδεικτικά η κινητική παραγωγής υδρογόνου από τις GC-TCD μετρήσεις στον χειρισμό του *Scenedesmus obliquus* μαζί με 150 mg phenols/L ολικού εκχυλίσματος κατσίγαρου σε θρεπτικό με γλυκόζη.



Εικόνα 26 Κινητική παραγωγής υδρογόνου από προφίλ αέριου χρωματογράφου (GC-TCD) του *Scenedesmus obliquus* μαζί με 150 mg rhepols/L εκχυλίσματος κατσίγαρου σε θρεπτικό με γλυκόζη

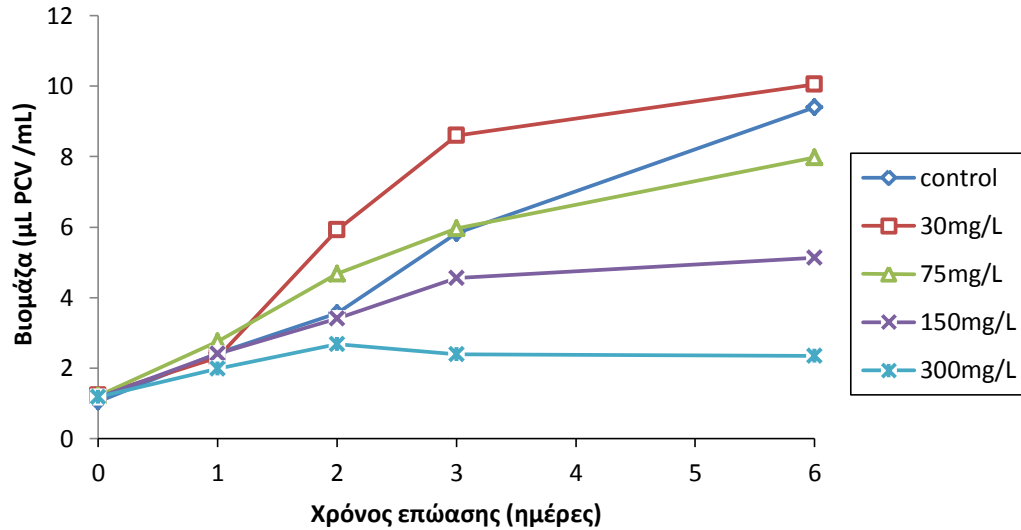
Από τα παραπάνω προφίλ (Εικόνα 26) φαίνεται ξεκάθαρα η υπερβολικά μεγάλη αύξηση στις τιμές του αέριου υδρογόνου στη πάροδο του χρόνου (τη 5^η ημέρα) και η μεγάλη μείωση του οξυγόνου καθώς παράγεται αέριο.



Εικόνα 27. Κινητική κατανάλωσης οξυγόνου σε διαφορετικές συνθήκες, *Scenedesmus obliquus* σε θρεπτικό χωρίς γλυκόζη [control 1(-glc)], *Scenedesmus obliquus* σε θρεπτικό με γλυκόζη [control 2 (+ glc)], *Scenedesmus obliquus* μαζί με εκχύλισμα κατσίγαρου σε θρεπτικό χωρίς γλυκόζη [Extr.(- glc)] και *Scenedesmus obliquus* μαζί με εκχύλισμα κατσίγαρου σε θρεπτικό με γλυκόζη [Extr. (+ glc)]

Στο διάγραμμα που αφορά την κατανάλωση του οξυγόνου (Εικόνα 27) φαίνεται ότι οι δυο χειρισμοί που είχαν γλυκόζη, και ο μάρτυρας [control 2 (+ glc)] αλλά και ο χειρισμός που περιείχε εκχύλισμα κατσίγαρου [Extr. (+ glc)] και παρήγαγαν υδρογόνο αντίστοιχα είχαν μείωση στο οξυγόνο. Ενώ στους άλλους δυο χειρισμούς που δεν είχαν γλυκόζη το οξυγόνο δεν καταναλώθηκε και ως εκ τούτου δεν υπήρχε επαγωγή της υδρογενάσης και παραγωγή υδρογόνου. Η ταχύτητα της μείωσης του O_2 , αλλά και τα υπερβολικά χαμηλά επίπεδα O_2 στον χειρισμό Extr. (+glc) δικαιολογούν τις μεγάλες τιμές H_2 στον εν λόγω χειρισμό.

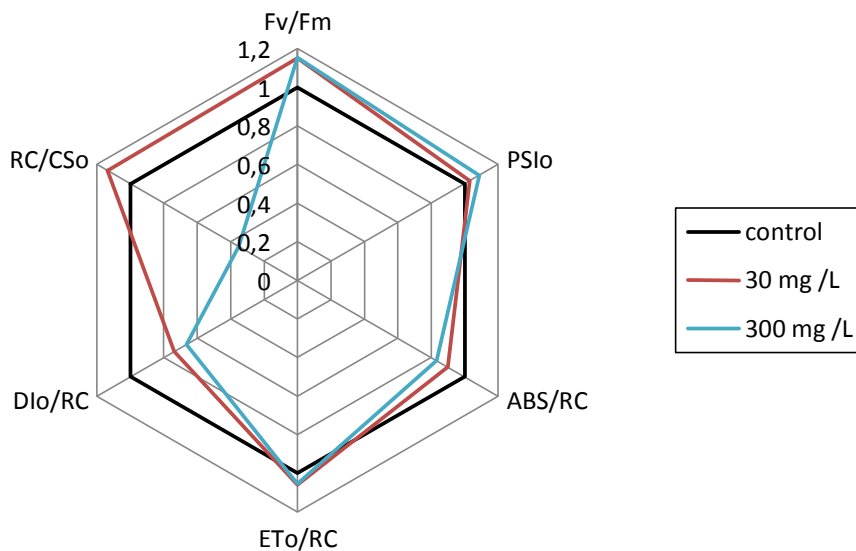
Σε συνέχεια των προηγούμενων πραγματοποιήθηκε πειραματική προσέγγιση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος κατσίγαρου για να διαπιστωθεί ποια είναι η βέλτιστη.



Εικόνα 28. Ανάπτυξη καλλιέργειας *Scenedesmus obliquus* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος κατσίγαρου (φαινολικές ενώσεις mg/L), με μάρτυρα *Scenedesmus obliquus* σε θρεπτικό με γλυκόζη.

Στο πείραμα με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος κατσίγαρου φάνηκε ότι σχετικά μικρές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος αυξάνουν τη βιομάζα ενώ μεγαλύτερες τη μειώνουν (Εικόνα 28).

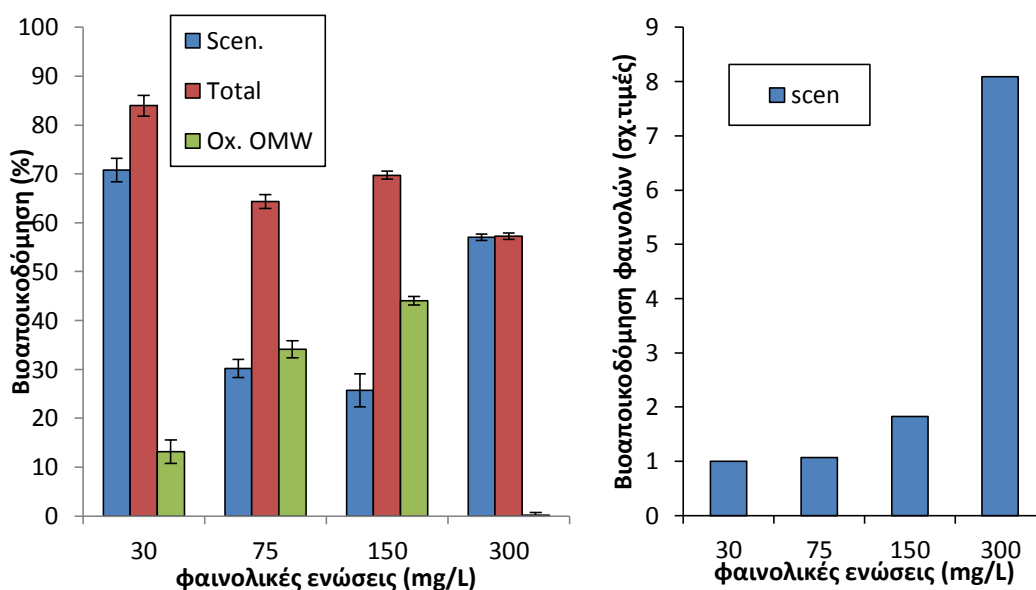
Στη συνέχεια ελέγχθηκε η λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.



Εικόνα 29. Αλλαγές στη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε καλλιέργειες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος κατσίγαρου (φαινολικές ενώσεις mg/L) σε σύγκριση με το μάρτυρα ύστερα από τις πρώτες 24 ώρες

Στην Εικόνα 29 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα για τις δυο ακραίες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος κατσίγαρου, τη μικρότερη (30mg/L) και τη μεγαλύτερη (300mg/L) σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Σχετικά με τις αλλαγές στη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού παρατηρούνται τα εξής : όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του εκχυλίσματος κατσίγαρου μειώνεται η πυκνότητα των ενεργών φωτοσυνθετικών κέντρων αντίδρασης (RC/CSo), μειώνεται το μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (ABS/RC), αυξάνεται η ενεργότητα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (ETo/RC), αυξάνεται η φωτοχημεία (PSIo) και μειώνεται η μη φωτοχημική διάχυση της ενέργειας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (DIO/RC).

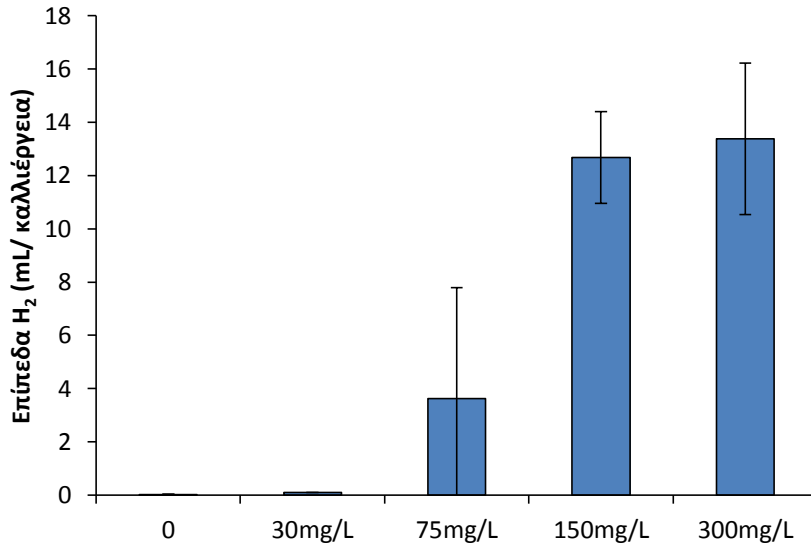
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για την βιοαποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων. Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ολικό εκχύλισμα κατσίγαρου σε νερό με αποτέλεσμα να μπορούν να γίνουν μετρήσεις πιο γρήγορα και με μικρότερο κόστος. Δηλαδή στον ακατέργαστο κατσίγαρο (πάστα) δεν μπορούσαν να πραγματοποιηθούν μετρήσεις φασματοφωτομετρικά λόγω του ότι δημιουργούσε ποσοτικές αλλοιώσεις στην διέλευση του φωτός. Έτσι λοιπόν, με το ολικό εκχύλισμα του κατσίγαρου υπήρχε η δυνατότητα να πραγματοποιηθούν φασματοφωτομετρικές μετρήσεις (βλ Υλικά και Μέθοδοι).



Εικόνα 30. (Α) Συνολικό ποσοστά βιοαποικοδόμησης (Total), ποσοστό βιοαποικοδόμησης λόγω του *Scenedesmus obliquus* (Scen) και ποσοστό βιοαποικοδόμησης λόγω φωτοοξειδωσης (Ox. OMW) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος κατσίγαρου μετά από 6 ημέρες , (Β) βιοαποικοδόμηση των

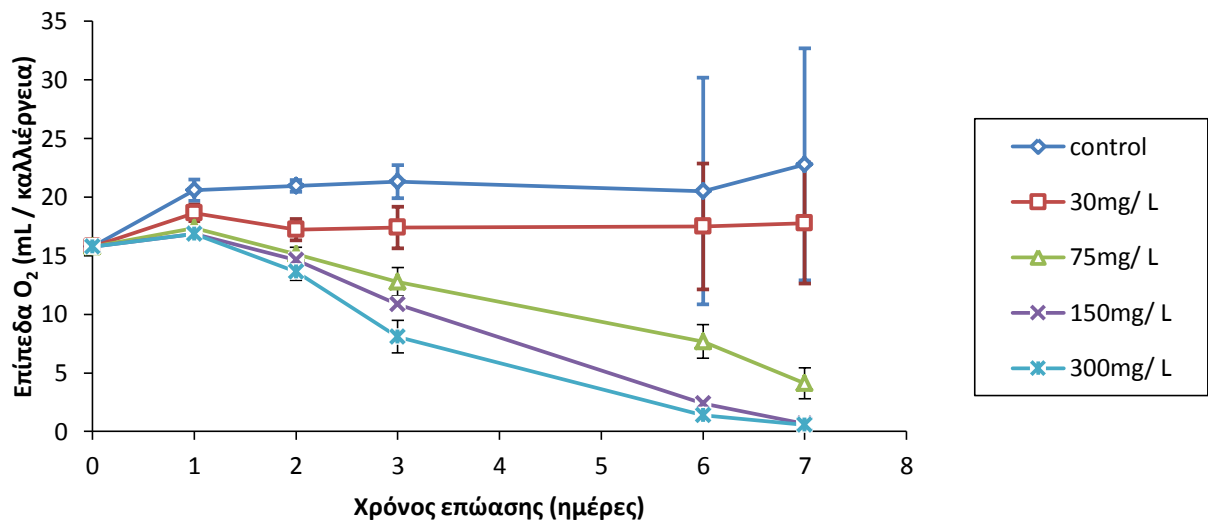
φαινολικών από το *Scenedesmus obliquus*, όπου δόθηκε η τιμή 1 για την βιοαποικοδόμηση στον χειρισμό των 30mg phenols /L εκχυλίσματος κατσίγαρου.

Στην Εικόνα 30Α φαίνεται ότι σε όλες τις συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος κατσίγαρου υπάρχει μεγάλο ποσοστό βιοαποικοδόμησης, όμως αυτά τα ποσοστά δεν αντιπροσωπεύουν αποκλειστικά μόνο τις φαινολικές ενώσεις αφού φασματοφωτομετρικά πραγματοποιήθηκαν σε UV φάσμα (200 - 400 nm) όπου απορροφούν και άλλες ενώσεις. Αυτή δηλαδή είναι μια πρώτη εικόνα για την βιοαποικοδόμηση χωρίς όμως να αποκλειστεί η περίπτωση να έχουν συμπεριληφθεί στη μέτρηση και άλλες ενώσεις. Το μεγαλύτερο ποσοστό βιοαποικοδόμησης ($\approx 70\%$) που οφείλεται αποκλειστικά στο *Scenedesmus obliquus* παρατηρείται στα 30mg/L εκχυλίσματος κατσίγαρου και αμέσως μετά ακολουθεί το ποσοστό που παρουσιάζει η συγκέντρωση των 300mg/L που είναι 57%. Για την επιλογή της βέλτιστης συγκέντρωσης φαινολικών του κατσίγαρου δεν παίζουν ρόλο μόνο οι παραπάνω τιμές ποσοστών βιοαποικοδόμησης αλλά πρωτίστως η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων που αποδομούνται στον ίδιο χρόνο. Δηλαδή, η επιλογή μεγαλύτερης συγκέντρωσης φαινολικών (300mg/L) φαίνεται να είναι πιο αποδοτική παρά το κατά 13% μικρότερο ποσοστό βιοαποικοδόμησης που παρουσιάζει, γιατί στον ίδιο χρόνο βιοαποικοδομείται πολύ μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών (περίπου 8 φορές) (Εικ. 30B). Αυτό φαίνεται στην Εικόνα 30B όπου τη βιοαποικοδόμηση των φαινολικών στο χειρισμό των 30mg/L από το *Scenedesmus obliquus* δόθηκε η τιμή 1, φαίνεται η συνεχώς αυξανόμενη βιοαποικοδόμηση (σε απόλυτες τιμές) με την αύξηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος.



Εικόνα 31. Παραγωγή υδρογόνου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος κατσίγαρου (φαινολικές ενώσεις mg/L) μετά από 6 ημέρες

Στην Εικόνα 31 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την παραγωγή του υδρογόνου που αφορά τα δείγματα με το εκχύλισμα κατσίγαρου, όπου παρατηρείται πολύ μεγαλύτερη παραγωγή υδρογόνου (περίπου 100φορές) σε σχέση με την αντίστοιχη πειραματική σειρά με ακατέργαστο κατσίγαρο. Επίσης τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών εκχυλίσματος εμφανίζει και τα μεγαλύτερα επίπεδα υδρογόνου.

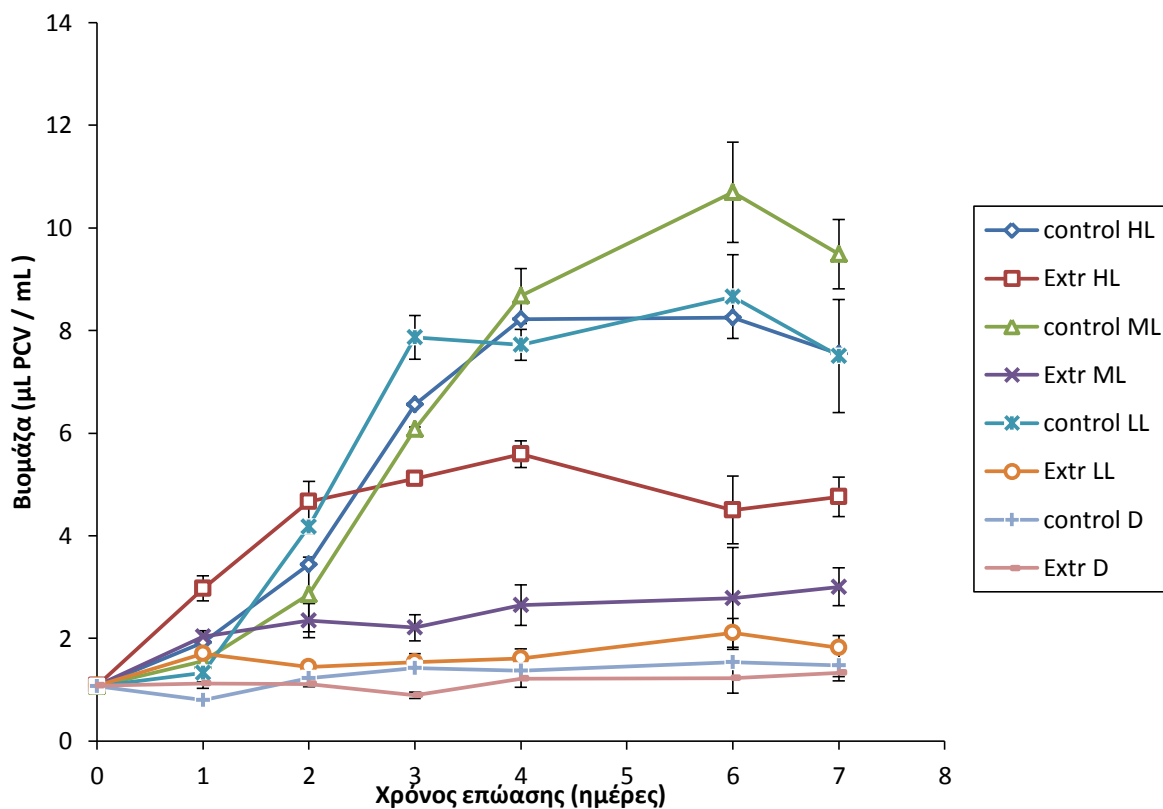


Εικόνα 32. Κινητική κατανάλωσης οξυγόνου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος κατσίγαρου (φαινολικές ενώσεις mg/L)

Όσο αφορά την κατανάλωση οξυγόνου (Εικόνα 32) παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του κατσίγαρου τόσο μειώνονται και τα επίπεδα του οξυγόνου. Και αυτό συμφωνεί με την παραγωγή υδρογόνου (Εικόνα 31) διότι μόνο τότε επικρατούν ανοξικές συνθήκες, απαραίτητες για την έκφραση της υδρογενάσης του ενζύμου που θα παράγει υδρογόνο.

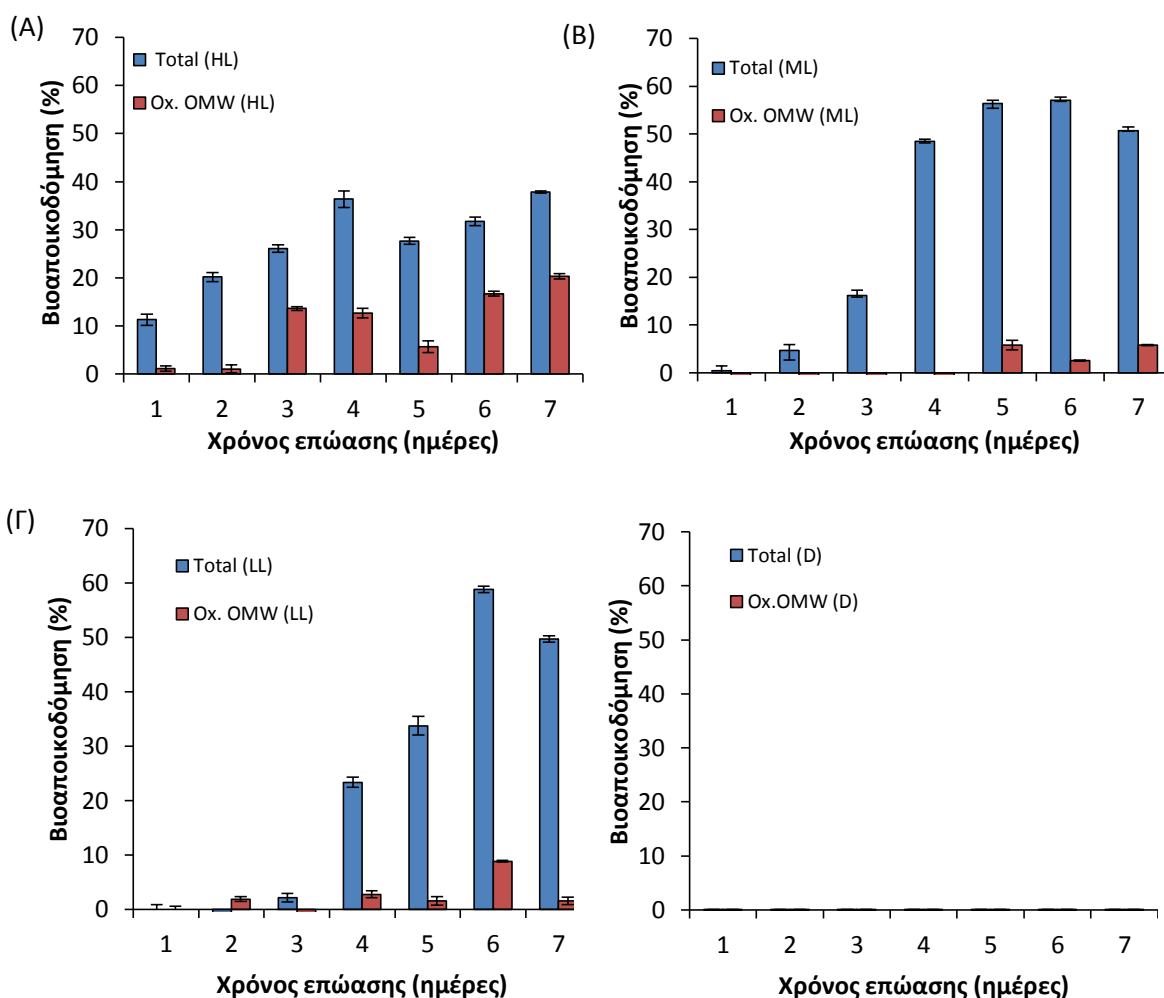
Τα προηγούμενα πειράματα έδειξαν ότι η καταλληλότερη συγκέντρωση εκχυλίσματος κατσίγαρου είναι 300mg/L καλλιέργειας και το θρεπτικό μέσο που είχε καλύτερα αποτελέσματα ήταν αυτό που έχει γλυκόζη.

Επειδή ο *Scenedesmus obliquus* είναι φωτοσυνθετικός οργανισμός επηρεάζεται από την ένταση του φωτός. Με αυτήν τη λογική πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων για τον έλεγχο της καταλληλότερης έντασης φωτισμού, ώστε να βελτιστοποιηθούν όσον το δυνατό περισσότερο οι συνθήκες για την βιοαποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων. Στα πειράματα αυτά μελετήθηκαν τέσσερις διαφορετικές εντάσεις φωτισμού : υψηλή ένταση ($140-150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (HL), μέτρια ένταση ($40-50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)(ML), χαμηλή ένταση ($20-25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (LL) και σκοτάδι (D), με σταθερή τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος κατσίγαρου (300mg/L). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω.



Εικόνα 33 . Κινητική ανάπτυξης καλλιέργειας *Scenedesmus obliquus* σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού με σταθερή τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος του κατσίγαρου (300mg phenols /L) σε θρεπτικό με γλυκόζη

Στο πείραμα που διεξήχθη με τις τέσσερις διαφορετικές εντάσεις φωτός τη μεγαλύτερη αύξηση βιομάζας παρουσίασαν οι μάρτυρες σε όλες τις εντάσεις φωτισμού εκτός από τον μάρτυρα σε σκοτάδι. Συγκεκριμένα μεγαλύτερη βιομάζα είχε ο μάρτυρας στην μέτρια ένταση (control ML) στη συνέχεια ο μάρτυρας στην χαμηλή ένταση φωτισμού (control LL) και έπειτα ο μάρτυρας στη υψηλή ένταση (control HL). Όσον αφορά τους χειρισμούς που είχαν εκχύλισμα κατσίγαρου παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η ένταση φωτισμού αυξάνεται και η βιομάζα. Στο τέλος χωρίς ιδιαίτερη διαφοροποίηση είναι οι δυο χειρισμοί (μάρτυρας και εκχύλισμα κατσίγαρου) που ήταν στο σκοτάδι.



Εικόνα 34 (Α), (Β), (Γ), (Δ). Ποσοστά συνολικής βιοαποικοδόμησης (Total) και βιοαποικοδόμησης του κατσίγαρου (Ox. OMW) για τις 4 διαφορετικές εντάσεις φωτισμού, υψηλή ένταση φωτισμού (HL), μέτρια ένταση φωτισμού (ML), χαμηλή ένταση φωτισμού (LL) και σκοτάδι (D)

Το προφίλ της βιοαποικοδόμησης των φαινολικών ενώσεων από το χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* σε διαφορετικό φωτονιακό επίπεδο φαίνεται στην Εικόνα 34. Πιο συγκεκριμένα στην Εικόνα 34Α φαίνεται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό συνολικής βιοαποικοδόμησης για τους χειρισμούς στην υψηλή ένταση φωτισμού ήταν την έβδομη μέρα με ποσοστό περίπου 37%. Και η αποικοδόμηση του κατσίγαρου λόγω φωτοοξειδωσιών φτάνει σε ποσοστό περίπου 20% για την ίδια μέρα.

Στο γράφημα που αφορά τα ποσοστά βιοαποικοδόμησης για την μέτρια ένταση φωτισμού (Εικόνα 34Β) το μεγαλύτερο ποσοστό συνολικής βιοαποικοδόμησης ήταν την έκτη μέρα με ποσοστό περίπου 57%. Και η αποικοδόμηση του κατσίγαρου λόγω φωτοοξειδωσιών φτάνει σε ποσοστό περίπου 2,5% για την ίδια μέρα.

Στην Εικόνα 34Γ παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό συνολικής βιοαποικοδόμησης για τους χειρισμούς στην χαμηλή ένταση φωτισμού ήταν την έκτη μέρα με ποσοστό περίπου 58%. Και η αποικοδόμηση του κατσίγαρου λόγω φωτοοξειδωσης φτάνει σε ποσοστό περίπου 9 % για την ίδια μέρα. Από το παραπάνω πείραμα διαπιστώθηκε πως οι καλύτερες συνθήκες φωτισμού είναι η μέτρια και η χαμηλή ένταση φωτισμού.

Τέλος οι χειρισμοί που βρίσκονταν στο σκοτάδι δεν είχαν βιοαποικοδόμηση, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 34Δ.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου *Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας* έδειξαν πως κάτω από κατάλληλες συνθήκες το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* μπορεί να βιοαποικοδομήσει φαινολικές ενώσεις. Οι εργασίες έδειξαν ότι η βιοαποικοδόμηση είναι μια βιοενεργητική διαδικασία (ξεκάθαρα θερμοδυναμικά φωτοελεγχόμενη διαδικασία) (Papaži and Kotzabasis, 2006, 2007, 2013) μέσω της οποίας υπάρχει παράλληλα και παραγωγή βιο-υδρογόνου (Papaži *et.al.*, 2012).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των παραπάνω εργασιών, το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* μπορεί να βιοαποικοδομήσει τοξικές φαινολικές ενώσεις με την επιλογή του καταλληλότερου βιοχημικού μονοπατιού αποικοδόμησης. Αυτή η επιλογή εξαρτάται από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες που καθορίζουν το ενεργειακό ισοζύγιο του χλωροφύκου. Αυτοί οι παράγοντες είναι η θέση (*ortho*, *meta* ή *para*) και ο αριθμός των υποκαταστατών στο φαινολικό δακτύλιο, τα φαινόμενα του συντονισμού και της επαγωγής, που ελέγχουν τη συμπεριφορά του υποκαταστάτη ως δότη ή δέκτη ηλεκτρονίων, η εξωγενής πηγή του άνθρακα και η ένταση της φωτονιακής ακτινοβολίας. Συνεπώς για τη βιοαποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων πρέπει να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες για την ενεργοποίηση των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την αποικοδόμησή τους.

Με βάση τις προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου που αφορούσαν στη βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων μέσω του μεταβολισμού του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*, έγινε μια πρώτη προσπάθεια / προσέγγιση για βιοτεχνολογική εκμετάλλευση της στρατηγικής των μικροφυκών. Ως εκ τούτου, με υπόστρωμα τον κασίγαρο, που είναι ένα τοξικό περιβάλλον πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις, εξετάστηκε η καταλληλότητα του (ως φαινολικό υπόστρωμα), η ανθεκτικότητα του *Scenedesmus obliquus* σε αυτό το περιβάλλον και η ικανότητά του να βιοαποικοδομήσει τα φαινολικά κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, καθώς και οι προϋποθέσεις για την παραγωγή υδρογόνου (H₂).

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, που είναι μια πρώτη προσέγγιση του εν λόγω ερωτήματος, έδειξαν ότι το χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* είναι πραγματικά ανθεκτικό και μπορεί να επιβιώνει σε αυτές τις τοξικές συνθήκες. Αυτό

φάνηκε και στους δυο διαφορετικούς χειρισμούς, (ακατέργαστος κατσίγαρος και εκχύλισμα κατσίγαρου) από την μεγάλη αύξηση της βιομάζας όπως φαίνεται στην Εικόνα 17. Παρατηρήθηκε ότι το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus* καλύπτει τις ενεργειακές του ανάγκες από τον κατσίγαρο, αφού δεν έγινε προσθήκη εξωγενούς πηγής άνθρακα στις καλλιέργειες, προσλαμβάνοντας όλα τα απαραίτητα θρεπτικά μέσα από το πλούσιο σε οργανικά ακατέργαστο κατσίγαρο, και αυξάνεται με ταχείς ρυθμούς. Ωστόσο, στην περίπτωση του ακατέργαστου κατσίγαρου, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα τα κύτταρα που μετρήθηκαν να μην είναι μόνο από το είδος *Scenedesmus obliquus* αλλά και από άλλους φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς που συνυπάρχουν στο συγκεκριμένο υπόστρωμα. (Mouncif *et. al.*, 1993, Ntougias *et.al.*, 2013)

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η προσθήκη εξωγενούς πηγής άνθρακα (γλυκόζη) στη καλλιέργεια έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνεται πάρα πολύ η βιομάζα του *Scenedesmus obliquus* σε σχέση με καλλιέργεια που στο θρεπτικό δεν περιέχεται γλυκόζη (Papazi and Kotzabasis, 2007). Ως υπόστρωμα, ο κατσίγαρος φάνηκε να είναι πολύ καλύτερος όσον αφορά την αύξηση της βιομάζας ακόμα και από το οργανικό θρεπτικό που είχε γλυκόζη (Εικ. 21). Η εικόνα αυτή δικαιολογείται από τα θρεπτικά που υπάρχουν στον κατσίγαρο. Επομένως, η οργανική ύλη που περιέχει ο ακατέργαστος κατσίγαρος τροφοδοτεί το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus* με περισσότερη ενέργεια συγκριτικά με ένα θρεπτικό με γλυκόζη σε μια μικτότροφη καλλιέργεια. Σύμφωνα με τους Rincon *et.al.* (2012) η συγκέντρωση των σακχάρων στον κατσίγαρο είναι 17.4g/L, ενώ πειραματικά στους χειρισμούς που προστέθηκε εξωγενώς γλυκόζη, η αντίστοιχη συγκέντρωση ήταν 5g/L. Από τη διαφορά αυτή προκύπτει πως ο κατσίγαρος έχει πολλά περισσότερα σάκχαρα και για αυτό είναι πιο αποδοτικός ως θρεπτικό υπόστρωμα.

Σε ότι αφορά την παραγωγή υδρογόνου, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να παραχθεί υδρογόνο, γεγονός που δικαιολογείται από τις τιμές του αέριου οξυγόνου που ελαττώνονται. Σε ανοξικές συνθήκες ενεργοποιείται η υδρογενάση με αποτέλεσμα την παραγωγή υδρογόνου (Gaffron, 1939). Παρόλο που στη περίπτωση του ακατέργαστου κατσίγαρου οι τιμές του υδρογόνου κινήθηκαν σε χαμηλά επίπεδα (Εικ. 19). Φάνηκε πως όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του κατσίγαρου, και επομένως η βιομάζα είναι μεγαλύτερη, αυξάνεται και η παραγωγή του υδρογόνου. Η παρατήρηση αυτή αφορά τις συγκεντρώσεις

κατσίγαρου 10g/L και 20g/L, στις οποίες παρατηρήθηκαν επίπεδα υδρογόνου, σε σχέση με τον αντίστοιχο μάρτυρα. Επίσης ένας ακόμη λόγος μπορεί να είναι η παρουσία άλλων αερόβιων μικροοργανισμών στον κατσίγαρο οι οποίοι χρησιμοποιούν το διαθέσιμο οξυγόνο με αποτέλεσμα να καταγράφεται μεγάλη μείωση στις τιμές του αλλά όχι ιδιαίτερη αύξηση στα επίπεδα του υδρογόνου.

Σχετικά με τη βιοαποικοδόμηση στην προσέγγιση με τον ακατέργαστο κατσίγαρο το ποσοστό που οφείλεται αποκλειστικά στο *Scenedesmus obliquus* είναι 26% (Εικ. 23). Το 65% από τη συνολική βιοαποικοδόμηση οφειλόταν σε άλλους μικροοργανισμούς ή στην φωτοοξειδωση. Το ποσοστό αυτό δεν είναι αμελητέο, δεδομένου ότι το χλωροφύκος είχε ένα υπόστρωμα πλούσιο σε τροφή (οργανικό υλικό) με αποτέλεσμα οι ενεργειακές του ανάγκες να καλύπτονται και συνεπώς η βιοαποικοδόμηση των φαινολών να έρχεται σε 'δεύτερη' προτεραιότητα. Αυτό συνάδει και με τα αποτελέσματα των Parazi and Kotzabasis (2007) όπου παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη εξωγενούς πηγής άνθρακα (π.χ. γλυκόζη) επηρεάζει και την βιοαποικοδόμηση των φαινολών. Έτσι, σε θρεπτικό υπόστρωμα με γλυκόζη το *Scenedesmus obliquus* δεν αποικοδομεί την απλή φαινόλη, αντίθετα, παρατηρείται βιοαποικοδόμηση της φαινόλης όταν δεν έχει προστεθεί κάποια μορφή άνθρακα στο θρεπτικό. Μεταγενέστερη μελέτη (Parazi and Kotzabasis, 2013) έδειξε ότι όταν το μικροφύκος εκτεθεί σε μια μίξη από φαινολικές ενώσεις και στο θρεπτικό υπόστρωμα υπάρχει γλυκόζη το ποσοστό βιοαποικοδόμησης για την κάθε φαινόλη ξεχωριστά μειώνεται συγκριτικά με το ποσοστό που βιοαποικοδομείται όταν το μικροφύκος εκτεθεί σε κάθε μια από τις φαινόλες ξεχωριστά, δίνοντας προτεραιότητα για την βιοαποικοδόμησή τους στις πιο τοξικές φαινολικές ενώσεις.

Στο δεύτερο πειραματικό χειρισμό, κατά τον οποίο χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα κατσίγαρου, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρουσία γλυκόζης το εκχύλισμα του κατσίγαρου προκαλεί παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του μικροφύκου σε σύγκριση με τον αντίστοιχο μάρτυρα (Εικ. 24). Αυτό μπορεί να συμβαίνει διότι μέσω της διαδικασίας εκχύλισης του κατσίγαρου (βλ. Υλικά και μέθοδοι) αφαιρέθηκαν χρήσιμα θρεπτικά για την ανάπτυξη του *Scenedesmus obliquus*. Επιπλέον, προηγούμενες εργασίες έχουν δείξει ότι σε τοξικό περιβάλλον καλλιέργειας *Scenedesmus obliquus* κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες θα επενδύσουν την ενέργειά τους πρωτίστως στην βιοαποικοδόμηση και δευτερευόντως στην αύξηση της βιομάζας του (Parazi and Kotzabasis, 2013). Αυτό σημαίνει πως τα μικροφύκη

έχοντας τώρα σχετικά περιορισμένα ενεργειακά αποθέματα (σε σχέση με τον ακατέργαστο κατσίγαρο) για την βιοαποικοδόμηση υψηλής τοξικότητας φαινολικών ενώσεων επενδύουν πρωτίστως όλα τα ενεργειακά τους αποθέματα στην βιοαποικοδόμηση. Το συμπέρασμα αυτό γίνεται κατανοητό και από τα αποτελέσματα της βιοαποικοδόμησης που παρουσιάζονται στην Εικ. 25B όπου φαίνονται τα μεγάλα ποσοστά βιοαποικοδόμησης του εκχυλίσματος κατσίγαρου σε θρεπτικό με γλυκόζη. Στους χειρισμούς που στο θρεπτικό δεν υπήρχε προσθήκη γλυκόζης τα ποσοστά βιοαποικοδόμησης ήταν χαμηλότερα (Εικ. 25A). Οι Bui *et.al.* (2012) στη μελέτη τους χρησιμοποίησαν βακτήρια για την βιοαποικοδόμηση φαινολών και παρατήρησαν ότι με τη προσθήκη γλυκόζης μεγαλύτερα ποσοστά βιοαποικοδόμησης φαινολών συγκριτικά με τον χειρισμό που δεν υπήρχε γλυκόζη.

Σχετικά με τα επίπεδα παραγωγής υδρογόνου, φάνηκε ότι οι χειρισμοί που είχαν γλυκόζη και εκχύλισμα κατσίγαρου παρουσίασαν μεγαλύτερες ποσότητες υδρογόνου. Στην Εικ. 26 φαίνεται ενδεικτικά η κινητική παραγωγής υδρογόνου η οποία συμβαδίζει με την Εικ. 27 που φαίνεται ότι το σύστημα οδηγείται σε ανοξικές συνθήκες με την πάροδο των ημερών. Σύμφωνα με τους Papazi and Kotzabasis (2013) σε κλειστό σύστημα, καλλιέργειες του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* όταν βιοαποικοδομούν συγκεκριμένες διχλωροφαινόλες υπάρχει παράλληλα και παραγωγή υδρογόνου (Εικ. 8B). Αυτό συμβαίνει διότι, η ανηγμένη μορφή των διχλωροφαινολών υψηλής τοξικότητας, σύμφωνα με το οξειδοαναγωγικό τους δυναμικό, γίνονται δότες ηλεκτρονίων στη φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων και δίνουν τα ηλεκτρόνια στη πλαστοκινόνη. Παράλληλα μπλοκάρουν το PSII και την απελευθέρωση οξυγόνου, οδηγώντας σε ανοξικές συνθήκες. Επιπρόσθετα, το πρώτο βήμα της βιοαποικοδόμησης των διχλωροφαινολών είναι η αναγωγή των διχλωροφαινολών, η οποία υποστηρίζει μία συνεχόμενη κυκλική ανατροφοδότηση μεταξύ οξειδωμένων και ανηγμένων διχλωροφαινολών, η οποία συνεχώς ενισχύει μια δυνατή ροή ηλεκτρονίων στη πλαστοκινόνη, και στη συνέχεια στη φερεδοξίνη. Σαν αποτέλεσμα η παραγωγή υδρογόνου (H₂) που προκαλείται από την ενεργοποίηση της υδρογενάσης είναι συνεχόμενη, εξαιτίας των ανοξικών συνθηκών. Η ανοξικές συνθήκες επιτυγχάνονται όχι μόνο από την παρεμπόδιση του PSII αλλά και από την μεταφορά ηλεκτρονίων από τις ανηγμένες διχλωροφαινόλες στην ουμπικινόνη, μέσω του μηχανισμού αναπνοής που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια. Η αυξημένη παραγωγή ενέργειας από την αναπνοή και την παραγωγή φωτοσυνθετικού

υδρογόνου, επενδύεται κυρίως στην βιοαποικοδόμηση των διχλωροφαινολών παρά στην ανάπτυξη των μικροφυκών.

Επιπρόσθετα φάνηκε ότι σχετικά μικρές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος αυξάνουν την βιομάζα ενώ μεγαλύτερες τη μειώνουν (Εικ. 28). Αυτή η εικόνα μπορεί να δικαιολογηθεί από τα αποτελέσματα της εργασίας των Papazi and Kotzabasis (2013), όπου το *Scenedesmus obliquus* σε μικτότροφο θρεπτικό και περιβάλλον με χαμηλής τοξικότητας φαινόλες επενδύει την ενέργεια του στην αύξηση της βιομάζας και σε δεύτερη προτεραιότητα μπαίνει η βιοαποικοδόμηση. Ενώ σε θρεπτικό με γλυκόζη και υψηλής τοξικότητας φαινόλες τα κύτταρα του *Scenedesmus obliquus* επενδύουν πολύ περισσότερη ενέργεια στην αποτοξικοποίηση του περιβάλλοντος (βιοαποικοδόμηση) και σε δεύτερη μοίρα την ανάπτυξη. Αυτό συμφωνεί με την Εικόνα 28, γιατί όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του εκχυλίσματος κατσίγαρου στη καλλιέργεια αυξάνεται και η ποσότητα των φαινολικών άρα το περιβάλλον γίνεται πιο τοξικό. Σε πείραμα που χρησιμοποιήθηκαν μυκήλια *Pleurotus ostreatus* για την βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων κατσίγαρου φάνηκε πως όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του κατσίγαρου μειώνεται η αύξηση του μεγέθους (Fountoulakis *et.al.*, 2002). Οι Eroglu *et.al.* (2004) παρατήρησαν ότι τα βακτήρια έχουν μεγαλύτερη ανάπτυξη στις μικρές συγκεντρώσεις σε σχέση με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κατσίγαρου.

Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του κατσίγαρου αυξάνονται τα επίπεδα του υδρογόνου (Εικ. 31) και αντίστοιχα μειώνονται τα επίπεδα του οξυγόνου (Εικ. 32). Δηλαδή όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του εκχυλίσματος τόσο πιο γρήγορα το σύστημα οδηγείται σε ανοξικές συνθήκες με αποτέλεσμα την έκφραση του ενζύμου της υδρογενάσης που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή υδρογόνου. Βέβαια οι τιμές του υδρογόνου που παρατηρήθηκαν ήταν πολύ υψηλές, περίπου 100 φορές, από την αντίστοιχη πειραματική σειρά με τον ακατέργαστο κατσίγαρο. Οι Papazi *et.al.*, (2012) έδειξαν ότι μέσω της βιοαποικοδόμησης συγκεκριμένων διχλωροφαινολών υπάρχει παράλληλα και παραγωγή υδρογόνου, αυτός είναι πιθανόν και ο λόγος που στη συγκεκριμένη περίπτωση παράγεται υδρογόνο. Επιπλέον αν ισχύει αυτός ο μηχανισμός παραγωγής υδρογόνου, το σύστημα τροφοδοτείται με περισσότερες φαινολικές ενώσεις καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του εκχυλίσματος κατσίγαρου. Με αποτέλεσμα το σύστημα να φτάνει πιο γρήγορα σε ανοξικές συνθήκες και να παράγονται και μεγαλύτερες ποσότητες υδρογόνου.

Παράλληλα, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του εκχυλίσματος κατσίγαρου , αυξάνεται και η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων που βιοαποικοδομείται από το *Scenedesmus obliquus* (Εικ. 30). Αποτελέσματα των Papazi and Kotzabasis (2013) έδειξαν ότι το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus* κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες δίνει προτεραιότητα στην βιοαποικοδόμηση των πιο τοξικών φαινολικών ενώσεων (μεγαλύτερα ποσοστά βιοαποικοδόμησης). Αυτό συμβαίνει γιατί όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του εκχυλίσματος αυξάνεται και η τοξικότητα του με αποτέλεσμα το μικροφύκος να βιοαποικοδομεί περισσότερες φαινολικές ενώσεις.

Είναι γνωστό ότι ο συνδυασμός τριών κύριων μεταβολικών μονοπατιών, της βιοαποικοδόμησης των διχλωροφαινολών, της φωτοσυνθετικής ροής ηλεκτρονίων και της αναπνευστικής διαδικασίας, οδηγεί σε υψηλές αποδόσεις φωτοσυνθετικής παραγωγής υδρογόνου (Papazi *et.al.*, 2012; Papazi and Kotzabasis, 2013). Αυτός είναι πιθανόν και ο λόγος αυξημένης παραγωγής υδρογόνου στις συγκεκριμένες συνθήκες.

Στον τελευταίο πειραματικό σχεδιασμό που αφορούσε τις διαφορετικές εντάσεις φωτισμού τα αποτελέσματα έδειξαν πως η βιοαποικοδόμηση είναι μια φωτοεξαρτώμενη διαδικασία. Η αύξηση της βιομάζας του *Scenedesmus obliquus* εξαρτάται από την ένταση φωτισμού (Εικ. 33) σε σταθερή συγκέντρωση εκχυλίσματος κατσίγαρου, όσο αυξάνεται η ένταση φωτισμού αυξάνεται και η βιομάζα του μικροφύκου. Ο κατσίγαρος έχει σκούρο καφέ χρώμα με αποτέλεσμα το φως που φτάνει στα κύτταρα (προκειμένου να φωτοσυνθέσουν) να είναι μειωμένο σε σχέση με αυτό που περνά από τον αντίστοιχο μάρτυρα. Αυτό εξηγεί το γεγονός γιατί στον μάρτυρα η μέτρια ένταση φωτισμού είναι η ιδανική, καθώς προσφέρεται όλο το φως που χρειάζονται τα κύτταρα χωρίς να προκαλείται φωτοαναστολή. Αντίθετα, στο σκουρόχρωμο διάλυμα η μέτρια ένταση φωτισμού δεν επαρκεί. Έτσι, όταν τα κύτταρα βρεθούν σε συνθήκες υψηλού φωτισμού (που δεν επιφέρουν φωτοαναστολή) θα παρατηρηθεί και ανάλογη αύξηση της καλλιέργειας, αφού μόνο σε αυτές τις συνθήκες θα βρουν την απαιτούμενη ποσότητα φωτός (Εικ.33).

Τα ποσοστά βιοαποικοδόμησης διαφοροποιούνται σε σχέση με το φωτονιακό επίπεδο. Από την Εικόνα 34 φαίνεται πως η βιοαποικοδόμηση είναι μια διαδικασία που επηρεάζεται από το φως, αφού στο σκοτάδι (Εικόνα 34Δ) δεν παρατηρήθηκε βιοαποικοδόμηση. Αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα των Papazi and Kotzabasis

(2007,2008), στην εργασία των οποίων παρατηρήθηκε ότι στο σκοτάδι το *Scenedesmus obliquus* δεν αποικοδομεί συγκεκριμένες φαινολικές ενώσεις. Τα μεγαλύτερα ποσοστά συνολικής βιοαποικοδόμησης παρατηρήθηκαν στην μέτρια και χαμηλή ένταση φωτισμού, ενώ τα μικρότερα στην υψηλή (Εικ.34). Αντίθετα, τα ποσοστά αποικοδόμησης του εκχυλίσματος κατσίγαρου λόγω φωτοοξειδωσιών έχουν διαφορετική εικόνα, καθώς τα μεγαλύτερα ποσοστά αποικοδόμησης καταγράφηκαν στην υψηλή ένταση φωτισμού, ενώ πολύ πιο μικρά στη μέτρια και στην χαμηλή ένταση φωτισμού.

Στην υψηλή ένταση φωτισμού τα κύτταρα λαμβάνουν αρκετή ενέργεια μέσα από το φως, άρα παρατηρείται μεγαλύτερη βιομάζα και μικρότερα ποσοστά βιοαποικοδόμησης. Επίσης, στην υψηλή ένταση φωτισμού μπορεί να εμφανιστεί και το φαινόμενο της φωτοοξειδωσιών των φαινολικών ενώσεων. Παρόμοια εξήγηση δίνουν και οι Hodaiifa *et.al.*, (2012) οι οποίοι παρατήρησαν μεγαλύτερη αύξηση στο *Scenedesmus obliquus* όταν αποχρωμάτισαν τον κατσίγαρο λόγω της καλύτερης διέλευσης του φωτός. Από προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου (Parazi and Kotzabasis, 2007) συμπεραίνεται ότι η βιοαποικοδόμηση είναι μια διαδικασία που εξαρτάται από το φως και σε αυτό το συμπέρασμα καταλήγουν και οι Tikoo *et.al.* (1998) που υπέδειξαν ότι η ανοργανοποίηση της πενταχλωροφαινόλης επιτυγχάνεται μόνο κάτω από συνθήκες φωτισμού. Επιπρόσθετες μελέτες έχουν δείξει ότι όσο πιο σκούρο χρώμα έχει ο κατσίγαρος τόσο πιο τοξικές είναι οι φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται σε αυτόν (Eroglu *et.al.*,2008), με αποτέλεσμα έρευνες να δίνουν έμφαση για μεγαλύτερα ποσοστά βιοαποικοδόμησης των φαινολικών ενώσεων του κατσίγαρου στον αποχρωματισμό του (Wu *et.al.*,2009, Sampedro *et.al.*,2009). Προς αυτή την κατεύθυνση, οι Kissi *et.al.* (2001) έδειξαν ότι κάποια είδη νηματοειδών μυκήτων κατάφεραν να αφαιρέσουν πάνω από το 50% των φαινολών που περιείχε και παράλληλα και το χρώμα του κατσίγαρου. Τέλος οι Ettayebi *et.al.*, (2003) χρησιμοποίησαν ένα είδος ζύμης (*Candida tropicalis*) για την αποτοξικοποίηση του κατσίγαρου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ποσοστό μείωσης των φαινολών (βιοαποικοδόμηση) αυξανόταν καθώς αυξανόταν ο αποχρωματισμός του κατσίγαρου.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την παρούσα μελέτη δίνουν μια πρώτη βιοτεχνολογική προσέγγιση κατά την οποία το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί μέσω των μεταβολικών του διεργασιών να βιοαποικοδομεί τις τοξικές φαινολικές ενώσεις που

βρίσκονται στον κατσίγαρο και παράλληλα να παράγει ενέργεια υπό τη μορφή υδρογόνου. Ωστόσο η πλήρης κατανόηση του φαινομένου απαιτεί περαιτέρω μελέτη.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus* παρουσίασε ανθεκτικότητα στο τοξικό περιβάλλον του κατσίγαρου, και στις δυο μορφές (ακατέργαστος και εκχύλισμα) και μάλιστα κατάφερε να βιοαποικοδομήσει ένα σημαντικό ποσοστό των φαινολικών ενώσεων που περιέχονται σε αυτόν.

Η βιοαποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων του κατσίγαρου από το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* είναι μια φωτοελεγχόμενη βιοενεργητική διαδικασία. Το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες σε ένα κλειστό σύστημα μπορεί μέσω συνδυασμού μεταβολικών του διεργασιών να βιοαποικοδομήσει τις τοξικές φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στον κατσίγαρο και σε συνδυασμό με τη φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων να παράγει παράλληλα ενέργεια υπό τη μορφή υδρογόνου (H₂).

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αποτελούν μία πρώτη εναλλακτική βιοτεχνολογική προσέγγιση ολοκληρωμένης διαχείρισης των αποβλήτων των ελαιουργείων (κατσίγαρος), όπου το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* συνδυάζει την βιοαποικοδόμηση τοξικών φαινολικών ενώσεων του κατσίγαρου με την παραγωγή υδρογόνου, χρησιμοποιώντας απλώς την ηλιακή ακτινοβολία.

Βιβλιογραφία

- Aaronson, S., Berner, T., Dubinsky, Z., Algal biomass. In: Shelef, G., Soeder, C.J. (Eds.), Production and Use. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 575–601, 1980
- Azabou, S., Najjar, W., Gargoubi A., Ghorbel A., Sayadi, S., Catalytic wet peroxide photo-oxidation of phenolic olive oil mill wastewater contaminants, Part II. Degradation and detoxification of low-molecular mass phenolic compounds in model and real effluent. Applied Catalysis B: Environmental 77, 166–174, 2007
- Bishop, N.L., Senger, H., Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of *Scenedesmus*; New York: Academic Press. 130–143 p, 1971
- Boari G., Brunetti A., Passino R., Rozzi A., Agricultural Wastes, 10(3): p. 161-175, 1984
- Bui, H.B., Nguyen, L.T., Dang, L.D., Biodegradation of Phenol by Native Bacteria Isolated From Dioxin Contaminated Soils, Journal of Bioremediation and Biodegradation, 3:11, 2012
- Chen, K.C., Lin, Y.H., Chen, W.H., Liu, Y.C., Degradation of phenol by PAA-immobilized *Candida tropicalis*, Enzyme and Microbial Technology, 31:490-497, 2002
- Chung, T.S., Tseng, H.Y., Juang, R.S., Mass transfer effect and intermediate detection for phenol degradation in immobilized *Pseudomonas putida* systems, Process Biochemistry, 38:1497-1507, 2003
- Dellagrecia, M., Fiorentino, L.A., Monaco, P., Pinto, G., Previtiera, L., Zarreli, A., Synthesis and antialgal activity of dihydrophenanthrenes and phenanthrenes II: mimics of naturally occurring compounds in *Juncus effusus*. Journal of chemical ecology, 27(2), pp.257–71, 2001
- Eroglu, E., Gunduz, U., Yucel, M., Turker, L., Eroglu, I., Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source, International Journal of Hydrogen Energy 29: 163 – 171, 2004
- Eroglu, E., Eroglu, I., Gunduz, U., Yucel, M., Comparison of physicochemical characteristics and photofermentative hydrogen production potential of

- wastewaters produced from different olive oil mills in Western-Anatolia, Turkey, *Biomass and bioenergy*, 33:706-711 , 2009
- Ettayebi, K., Errachidi, F., Jamai, L., Tahri-Jouti, M.A., Sendide, K., Ettayebi, M., Biodegradation of polyphenols with immobilized *Candida tropicalis* under metabolic induction, *FEMS Microbiology Letters* 223 : 215-219, 2003
 - Fiestas Ros de Ursinos, J. A., Borja-Padilla, R., 1992. Use and treatment of olive mill wastewater: current situation and prospects in Spain. *Grasas y Aceites*, 43(2), p.101–106
 - Fountoulakis M.S., Dokianakis S.N., Kornaros M.E., Aggelis G.G., Lyberatos G., *Water Research*, 36(19): p. 4735-4744, 2002
 - Gaffron, H., Der auffalende Unterschied in der Physiologie nahe verwandter Algenstaemme nebst Bemerkungen über die Lichtatmung. *Biol. Zentralbl.* 43, 402–410, 1939
 - Hodaifa, G., Martinez, M.E., Orpez, R., Sanchez, S., Inhibitory effects of industrial olive-oil mill wastewater on biomass production of *Scenedesmus obliquus*, *Ecological Engineering*, 42 : 30-34, 2012
 - Kautsky, H. & Hirsch, A., Neue Versuche zur Kohlensureassimilation. *Die Naturwissenschaften*, 19(48), pp.964–964, 1931
 - Khan, K.A., Suidan, M.T., Cross, W.H., Anaerobic activated carbon filter for the treatment of phenol-bearing wastewater, *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 53, 1519–1532, 1981
 - Kissi, M., Mountadar, M., Assobhei, O., Gargiulo, E., Palmieri, G. Giardina, P., Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57, 221-226, 2001
 - Mantzavinos, D. and Kalogerakis N., Treatment of olive mill effluents Part I. Organic matter degradation by chemical and biological processes – an overview. *Environmental International*, Vol. 31, pp 289 – 295, 2005
 - McNamara C.J., Anastasiou C.C., O'Flaherty V., Mitchell R., *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(2): p. 127-134, 2008
 - Mitrakas, M., Papageorgiou, G., Docoslis, A., Sakellaropoulos, G., Evaluation of various pretreatment methods for olive oil mill wastewaters, *European Water Pollution Control*, 6 (6), 10-16, 1996

- Mouncif, M., Tamoh, S., Faid, M. , Achkari – Begdouri, A., A study of chemical and microbiological characteristics of olive mill waste water in Morocco. *Grassas y Aceites* 44(6): 335 – 338, 1993
- Muller, R. H., and Babel, W., Phenol and its derivatives as heterotrophic substrates for microbial growth -an energetic comparison, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42,446–451, 1994
- Neujahr, H. Y., and Gaal, A., phenol hydroxylase from yeast: purification and properties of the enzymes from *Trichosporon cutancum*. *European Journal of Biochemistry*, 35, 386–400, 1973
- Niaounakis, M. and Halvadakis, C.P., “Olive Mill Waste Management. Literature Review and Patent Survey” Typothito-George Dardanos, Athens, Greece, 2004
- Niaounakis, M. and Halvadakis C.P., Olive Processing Waste Management - Literature Review and Patent Survey, Second Edition, Elsevier, 2006.
- Ntougias, S., Bourtzis, K. & Tsiamis, G., The Microbiology of Olive Mill Wastes. Hindawi Publishing Corporation. *BioMed Research International*, Volume 2013, 2013
- Oswald,W., Gotaas, H.B., Photosynthesis in sewage treatment, *Transactions American society of civil engineers*. 122, 73–105,1957
- Papazi, A, and Kotzabasis, K., Inductive and resonance effects of substituents adjust the microalgal biodegradation of toxic phenolic compounds. *Journal of Biotechnology*, 135: 366–373,2008
- Papazi, A., and Kotzabasis, K., Bioenergetic strategy of microalgae for the biodegradation of phenolic compounds - Exogenously supplied energy and carbon sources adjust the level of biodegradation. *Journal of Biotechnology*, 129:706-716, 2007
- Papazi A., Andronis, E., Ioannidis, N.E., Chaniotakis N., Kotzabasis, K., High yields of hydrogen production induced by meta-substituted dichlorophenols biodegradation from the green alga *Scenedesmus obliquus*. *PLoS ONE* 7(11): e49037, 2012
- Papazi A. and Kotzabasis, K., “Rational” Management of Dichlorophenols Biodegradation by the Microalga *Scenedesmus obliquus*. *PLoS ONE* 8(4): e61682, 2013

- Paraskeva, P., Diamadopoulos, E., Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81:1475-1485,2006
- Prieto, M., Hidalgo, A., Serra, J.L., Llama, M.J., Degradation of phenol by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilized on Biolite in a packed-bed reactor, *Journal of Biotechnology*, 97:1-11, 2002
- Rincón, B., Feroso, F.G. and Borja, R., Olive Oil Mill Waste Treatment: Improving the Sustainability of the Olive Oil Industry with Anaerobic Digestion Technology, *Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*, Chapter 15, 2012
- Ryan, D. and Robards, K., Phenolic compounds in olives, *Analyst*, 123 31R-44R, 1998
- Sampedro, T. Cajthaml, S. Marinari, M. Petruccioli, S.Grego and A. D'Annibale, "Organic Matter Transformation and Detoxification in Dry Olive Mill Residue by the Saprophytic Fungus *Paecilomyces farinosus*," *Process Biochemistry*, Vol. 44, No. 2, 216-225, 2009
- Santos, V.L. and Linardi, V.R., Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents-identification and degradation potential, *Process Biochemistry*, 39:1001-1006, 2004
- Semple, K.T. and Cain, R.B., Biodegradation of phenols by the alga *Ochromonas Danica*, *Applied and environmental microbiology*, 62:1265-1273, 1996
- Sierra, J., Marti, E., Montserrat, G., Cruanas, R., Garau, M.A., Characterisation and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal, *The Science of the Total Environment*, 279, 207-214, 2001.
- Strasser, B. & Strasser, R.,. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test. In P Mathis, ed, *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, Kluwer Academic Press, The Netherlands, V., pp.997–980, 1995
- Sridevi, V., Chandana Lakshmi, M.V.V., Manasa, M., Sravani,M., Metabolic pathways for the biodegradation of phenol, *International Journal of Engineering Science and Advanced Technology*, 2:695-705, 2012

- Tikoo, V., Scragg, A.H., Shales, S.W., Degradation of pentachlorophenol by microalgae. *Journal. Chem. Tech. Biotech.* 68, 425–431, 1997
- Tsagaraki E., Lazarides N.H., Petrotos B.K., 2006. Chapter 8, Olive Mill Wastewater Treatment. In: *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*, Ed. Oreopoulou, V., Russ, W., Springer
- Tsai, S.C., Tsai, L.D., Li, Y.K., An isolated *Candida albicans* TL3 Capable of Degrading Phenol at Large Concentration, *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 69 (12): 2358-2367, 2005
- Tsimidou, M., Papadopoulos, G., Boskou, D., Phenolic compounds and stability of virgin olive oil-Part I, *Food Chemistry* 45, 1992
- Watanabe, K., Hino, S., Takahashi, N., Effects of exogenous phenol-degrading bacteria on performance and ecosystem of activated sludge, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82:291-298, 1996
- Wu, L., Ge, G., Wan, J.B., “Biodegradation of Wastewater by Free and Immobilized *Yarrowia lipolytica* W29,” *Journal of Environmental Sciences*, Vol. 21, No. 2., 237-242, 2009
- Yang, R. D., and Humphrey, A. E., Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 17, 1211–1235, 1975
- Zervakis, G. and Balis, C., Bioremediation of olive mill wastes water through the production of fungal biomass. In: Royse D. (ed.) *Proceedings of the Second International Conference on Mushrooms Biology and Mushrooms Products*, pp. 311-323, Pennsylvania, USA, 1996
- Μπλίκια, Π., Βιοτεχνολογικές μέθοδοι επεξεργασίας υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου, Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, 2009
- Χριστοφορίδου Σ., Μελέτη φασμάτων NMR μίας και δύο διαστάσεων προτύπων πολυφαινολών. Μία πρώτη προσέγγιση προσδιορισμού πολυφαινολών στο παρθένο ελαιόλαδο, *Μεταπτυχιακή Διατριβή, Ηράκλειο Κρήτης*, 2001