ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ - ΔΙΑΧΕΙΡΗΣΗ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Βιοαποικοδόμηση ολικού φαινολικού φορτίου υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (κατσίγαρος) και παραγωγή ενέργειας από αυτά με τη μορφή αέριου υδρογόνου (H_2)

Ιωάννης Παππάς

Επιβλέπων Καθηγητής: Καθ. Κυριάκος Κοτζαμπάσης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2016

Πανεπιστήμιο Κρήτης - Τμήμα Βιολογίας
ΠΜΣ: Περιβαλλοντική Βιολογία Διαχείριση Χερσαίων και Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων

Επιβλέπων: Καθηγητής Κυριάκος Κοτζαμπάσης

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Κυριάκος Κοτζαμπάσης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας

Ιωάννης Βόντας, Αναπληρωτής Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθήνας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής

Στέργιος Πυρίντσος, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας

Πρόλογος

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας, του Τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Κρήτης για το μεταπτυχιακό κύκλο σπουδών στα πλαίσια του ΠΜΣ "Περιβαλλοντική Βιολογία - Διαχείριση χερσαίων και θαλάσσιων βιολογικών πόρων".

Με τη διεκπεραίωση αυτής της εργασίας αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά, αρχικά, τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Καθηγητή Κυριάκο Κοτζαμπάση, για την ευκαιρία που μου έδωσε με την ανάθεση αυτού του θέματος. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την υπομονή του, την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της δουλειάς μου.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Στέργιο Πυρίντσο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιωάννη Βόντα, που συμφώνησαν να συμμετάσχουν στην τριμελή εξεταστική επιτροπή της εργασίας μου.

Ακόμη ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στην Αικατερίνη Παπαζή, μεταδιδάκτορα του εργαστηρίου, για την ουσιαστική βοήθεια και καθοδήγηση που μου πρόσφερε από την αρχή μέχρι το τέλος της εργασίας με συνέπεια, υπομονή και υπευθυνότητα. Επιπλέον ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου και προπάντων τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Αθηνά Παρασύρη για την πολύτιμη βοήθεια της.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που με αγαπούν και με στηρίζουν ο καθένας με τον τρόπο του. Η συμπαράσταση, η εμψύχωσή σας και η μεγάλη κατανόησή που δείξατε, συνέβαλαν στην επιτυχή εκτέλεση της παρούσας εργασίας και σας ευχαριστώ.

Περίληψη

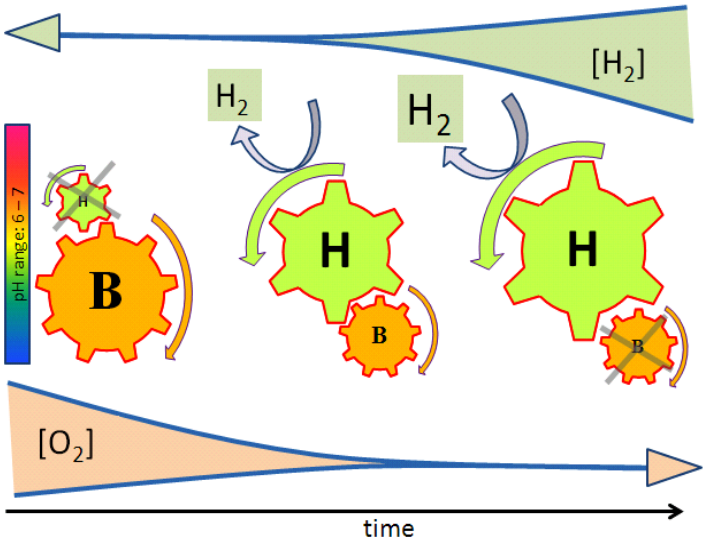
Τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων (κατσίγαρος) έχουν σημαντικές ρυπαντικές ιδιότητες, κυρίως λόγω της υψηλής συγκέντρωσης τοξικών φαινολικών ενώσεων. Η αρχική ιδέα αυτής της εργασίας ήταν να ελέγξει αν θα μπορούσε το ολικό φαινολικό φορτίο του κατσίγαρου να βιοαποικοδομηθεί από μικροφύκη, παίρνοντας υπόψη τη βιοενεργητική στρατηγική τους να βιοαποικοδομούν φαινολικές ενώσεις, όπως αναδείχθηκε από τους Papazi and Kotzabasis (2007 and 2008). Ταυτόχρονα θέλαμε να ελέγξουμε τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε την πιθανή βιοαποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων του κατσίγαρου από τα μικροφύκη ως «καύσιμο» για την παροχέτευση ηλεκτρονίων μέσω της φωτοσυνθετικής ροής ηλεκτρονίων στην υδρογενάση για την παραγωγή μοριακού υδρογόνου, σύμφωνα με τον μηχανισμό που περιέγραψαν πρόσφατα οι Papazi et al. (2012).

Για να αποκλειστεί η τυχαιότητα του αποτελέσματος, η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε με μεμονωμένα δείγματα κατσίγαρου από 14 διαφορετικά ελαιοτριβεία από όλον τον Ελλαδικό χώρο, όπου παρά τις όποιες διαφοροποιήσεις μεταξύ τους, ανέδειξαν ότι η ρύθμιση του pH αποτελεί το κλειδί για την βιοαποικοδόμηση του ολικού φαινολικού φορτίου, αλλά και για την παραγωγή μοριακού υδρογόνου. Όταν το όξινο pH (pH 4-5), που επικρατεί σε όλους τους κατσίγαρους που ελέγξαμε, διαμορφωθεί σε pH$\geq$6,5 τότε σε κλειστά συστήματα παρατηρούμε σημαντικά επίπεδα παραγωγής μοριακού υδρογόνου αλλά και υψηλά ποσοστά αποικοδόμησησης του ολικού φαινολικού φορτίου του κατσίγαρου. Η παρούσα εργασία έδειξε ξεκάθαρα ότι οι δύο διαδικασίες (παραγωγή H_2 και βιοαποικοδόμηση του τοξικού φαινολικού φορτίου) είναι ανταγωνιστικές καθώς η μεν αποικοδόμηση του ολικού φαινολικού φορτίου χρειάζεται την παρουσία οξυγόνου (λόγω της συμμετοχής (μονο)οξυγενασών στα βιοχημικά μονοπάτια βιοαποικοδόμησης των φαινολικών), η δε παραγωγή μοριακού υδρογόνου για να ξεκινήσει χρειάζεται την επικράτηση συνθηκών ανοξίας.

Πειραματικές σειρές με κατσίγαρο που επωάστηκε σε κλειστά, αλλά και σε ανοικτά συστήματα έδειξαν ξεκάθαρα, ότι η βιοαποικοδόμηση του ολικού φαινολικού φορτίου σε ανοικτά συστήματα (παρουσία οξυγόνου) είναι πλήρης (100% αποικοδόμηση του ολικού φαινολικού φορτίου) ήδη την 7^{η} ημέρα επώασης, παρουσία, αλλά και απουσία του μονοκύτταρου χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus*. Οι αναπάντεχες αποδόσεις των χειρισμών κατσίγαρου χωρίς την προσθήκη μικροφυκών, ανέδειξαν την ύπαρξη συγκεκριμένης χλωρίδας (χλωροφύκη, κυανοφύκη, βακτήρια, …) στον κατσίγαρο που παραμένει ανενεργή λόγω κυρίως του όξινου pH του κατσίγαρου. Μόλις

διαφοροποιήσουμε το pH του κατσίγαρου προς το ουδέτερο (pH:6,5), φαίνεται να ενεργοποιείται έντονα ο μεταβολισμός των εν λόγω οργανισμών (λόγω και του υψηλού οργανικού φορτίου του κατσίγαρου) επάγοντας τη βιοαποικοδόμηση των τοξικών φαινολικών ενώσεων και σε κλειστά συστήματα αυτός ο μεταβολισμός εγκαθιδρύει γρήγορα ανοξικές συνθήκες και επάγει την παραγωγή H_2. Η εξωγενής προσθήκη του χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus* συμβάλει σε αυτή τη διαδικασία, αλλά δεν είναι και απαραίτητη!

Φαίνεται λοιπόν ότι η μικροχλωρίδα που φέρει ο κατσίγαρος (και στα 14 δείγματα κατσίγαρου που έχουμε ελέγξει) είναι ικανή κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες να παράξει μοριακό υδρογόνο και να αποτοξικοποιήσει το φαινολικό φορτίο του. Το μόνο που έχουμε να κάνουμε είναι να εξασφαλίσουμε την εναλλαγή των κατάλληλων συνθηκών (ρύθμιση pH, κλειστό ή ανοικτό σύστημα, κλπ), και η ίδια η μικροχλωρίδα του κατσίγαρου μπορεί να αποτοξικοποιήσει πλήρως τον κατσίγαρο και να παράξει μεγάλες ποσότητες H_2. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δίνουν για πρώτη φορά την άμεση δυνατότητα χρήσης μίας μεθόδου πλήρους αποτοξικοποίησης του κατσίγαρου στον τόπο παραγωγής του (στο κάθε ελαιοτριβείο), με ταυτόχρονη παραγωγή μεγάλης ποσότητας υδρογόνου που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί επίσης άμεσα ως πηγή ενέργειας. Εκτός από την περιβαλλοντική συμβατότητα της μεθόδου, αλλά και τη βιωσιμότητα μίας τέτοιας εφαρμογής στα πλαίσια μίας πράσινης βιοτεχνολογικής προσέγγισης, η σχέση κόστους/κέρδους διαφαίνεται να είναι ιδιαίτερα δελεαστική και εγγυάται την ευρεία χρήση της στο μεσογειακό χώρο και ιδιαίτερα εδώ στην Κρήτη στο άμεσο μέλλον.



Γραφική απεικόνιση ανταγωνιστικής σχέσης μεταξύ βιοαποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων και παραγωγής μοριακού υδρογόνου από την μικροχλωρίδα του κατσίγαρου. B: Μηχανισμός βιοαποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων, H: Φωτοσυνθετικός μηχανισμός παραγωγής υδρογόνου.

Abstract

Wastewater from olive oil mills has significant polluting properties, especially due to the high concentration of aromatic compounds (mainly phenolics). The current project aims to study the biodegradation of the total phenolic compounds in olive mills wastewater (OMW) by algae, taking into account their bioenergetic strategy to biodegradate phenols (Papazi and Kotzabasis,2007, 2008). In the meanwhile we tried to test the possibility to use the biodegradation of the total phenolic compounds in OMW by algae as electrons source for transferring electrons through the photosynthetic electron flow to hydrogenase yielding large amounts of H_2 according to the mechanism recently has been described by Papazi et al. (2012).

To exclude the randomness of the results, we used individual samples of OMW from 14 different mills around Greece. The results have shown that the pH adjustment is the key not only for the biodegradation of the total phenolic compounds but also for the production of molecular hydrogen. When the acidic pH (pH 4-5) was configured at pH> 6,5, significant levels of molecular hydrogen production and high biodegradation of total phenolic compounds in OMW (in closed systems), were observed. This study has clearly demonstrated that the two processes (production of H_2 and biodegradation of toxic phenolic compounds) are competitive, since the biodegradation of the total phenolic compound requires the presence of oxygen [because of the essential need of (mono) oxygenases in the biochemical pathways which are involved in the biodegradation of phenols], and the production of molecular hydrogen needs anoxic conditions to start.

Samples of OMW (mixture of the 14 mills around Greece), which were incubated in closed and open systems, have clearly shown that the biodegradation of the total phenolic compounds in open systems is complete (100% degradation of the total phenolic compound), in a period of 7 days of incubation, with and without additional algae (*Scenedesmus obliquus*). The fact, there was 100% biodegradation in algae free treatments, revealed the existence of specific micro flora (algae, cyanobacteria, bacteria, ...) in the OMW which remains inactive, mainly due to the acidic pH of OMW. The pH adjustment of OMW to pH: 6,5 or higher, activates the metabolism of these organisms, inducing the biodegradation of toxic phenolic compounds. In closed systems the activation of metabolism leads to the establishment of anoxic conditions and induces H_2 production. Although the addition of algae contributes to this process, it seems it is not necessary!

It seems that the micro flora in OMW is able under certain conditions to produce molecular hydrogen and detoxificate the total of the phenolic compounds in OMW. All we have to do is create the proper conditions (pH regulation, closed or open system, etc.), and the OMW's micro flora itself can fully biodegrade the total of the phenolic compounds in OMW and at the same time can produce high amounts of H_2. The results of the present study give for first time the possibility to use a complete detoxification method of OMW at the place of olive oil production (in each mill), with simultaneous production of high amount of hydrogen which could used as an energy source. In addition to the environmental compatibility and the sustainability of the process, the cost / benefit ratio appears to be very appealing and ensures a wide use in the Mediterranean region and especially here in Crete in the near future.

Περιεχόμενα

Πρόλογος 2
Περίληψη 3
Abstract 5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ 7
Παραγωγική διαδικασία ελαιόλαδου 7
Υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (κατσίγαρος) 10
Προβλήματα σε περιβάλλον και υγεία 13
Διαχείριση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (κατσίγαρος) 15
Φυσικές μέθοδοι επεξεργασίας 15
Θερμικές μέθοδοι επεξεργασίας 16
Φυσικοχημικές μέθοδοι επεξεργασίας 16
Βιολογικές μέθοδοι επεξεργασίας 18
Βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων 20
Βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων από μικροφύκη 21
Παραγωγή υδρογόνου από χλωροφύκη μέσω του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε ανοξικές συνθήκες 23
Βιοαποικοδόμηση *meta*-υποκατεστημένων διχλωροφαινολών από το χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* και παραγωγή υδρογόνου 27
Σκοπός 29
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 30
Οργανισμός 30
Περιοχή δειγματοληψίας κατσίγαρου 30
Συνθήκες ανάπτυξης 31
Εκτίμηση Κυτταρικού Όγκου 32
Διαφορετικοί χειρισμοί - Συνθήκες επώασης 33
Απομόνωση ολικού φαινολικού φορτίου 35
Ποσοτική ανάλυση ολικών φαινολικών ενώσεων 35
Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση υδρογόνου (H_2) και οξυγόνου (O_2) με αέρια χρωματογραφία θερμικής γωγιμότητας (GC-TCD) 36
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 37
ΣΥΖΗΤΗΣΗ 58
Συμπεράσματα 63
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 65

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η καταγωγή του ελαιοδέντρου χάνεται στα βάθη του χρόνου, στους θρύλους και στις παραδόσεις των λαών γύρω από τη Μεσόγειο. Οι πρώτες καλλιέργειες χρονολογούνται από το 6000 π.Χ. στην περιοχή της Συρίας. Από τον 11ο π.Χ. αιώνα η καλλιέργεια του ελαιοδέντρου είχε διαδοθεί σε όλη τη λεκάνη της Μεσογείου, ενώ εισήχθη στην Ισπανία κατά τη διάρκεια της περιόδου της θαλάσσιας κυριαρχίας των Φοινίκων (1050 π.Χ.). Με την ανακάλυψη της Αμερικής (1492 μ.Χ.), η καλλιέργεια του ελαιοδέντρου διαδόθηκε πέρα από τη Μεσόγειο. Ελαιόδεντρα καλλιεργούνται πλέον στην Καλιφόρνια, στην Αργεντινή, στην Αυστραλία, στη Νότια Αφρική, στη Κίνα κ.α..

Το ελαιόδεντρο (*Olea europaea L.*) είναι ένα πολύμορφο, αειθαλές, μέσου μεγέθους δένδρο, έχει μικρά, λογχοειδή, πράσινα φύλλα με ομαλές άκρες και έναν μικρό μίσχο και ευδοκιμεί στα μεσογειακά κλίματα με θερμά, ξηρά καλοκαίρια και ήπιους χειμώνες. Ο καρπός του ελαιόδεντρου είναι σαρκώδης δρύπη και αποτελείται από το περικάρπιο και το ενδοκάρπιο. Το περικάρπιο αποτελείται από το επικάρπιο (φλούδα) και το μεσοκάρπιο (σάρκα) και αντιστοιχεί στο 70-80% του συνολικού βάρους του καρπού [Bianchi, 2003]. Το ενδοκάρπιο, που περιέχει το ενδοσπέρμιο, αντιστοιχεί στο 18-22% του συνολικού βάρους του καρπού [Bianchi, 2003].

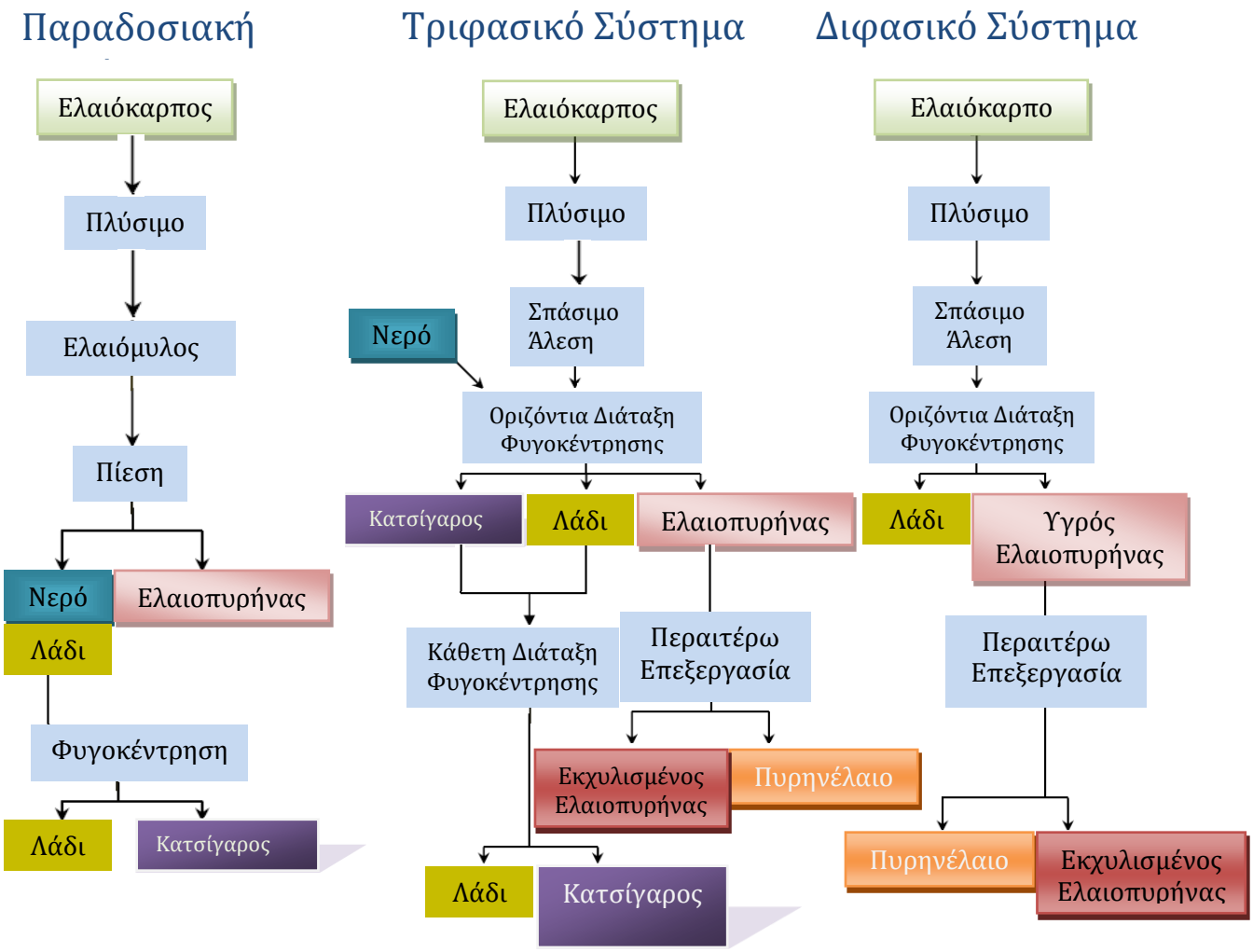
Το ελαιόδεντρο ανθίζει την άνοιξη και η ωρίμανση των καρπών του διαρκεί αρκετούς μήνες, ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος της καλλιεργήσιμης περιοχής, την ποικιλία, την ηλικία του ελαιόδεντρου, τη διαθεσιμότητα του νερού, τη θερμοκρασία, το φως, τη μέθοδο καλλιέργειας και τη χρήση λιπασμάτων. Το βάρος του καρπού αυξάνεται μέχρι τον Οκτώβριο-Νοέμβριο και στη συνέχεια μειώνεται λόγω μείωσης της υγρασίας του. Η συσσώρευση του ελαίου ξεκινάει στα τέλη Ιουλίου και μεγιστοποιείται στη διάρκεια του φθινοπώρου και του χειμώνα. Το ελαιόδεντρο εναλλάσσει την παραγωγή των καρπών του, με κύρια χαρακτηριστικά τη μακροζωία και τη διατήρηση της παραγωγικότητας του, για πολλά χρόνια.

Παραγωγική διαδικασία ελαιόλαδου

Η παραγωγή ελιάς και ελαιόλαδου εντοπίζεται κυρίως στις χώρες της Ευρώπης, με επίκεντρο χώρες της Μεσογείου, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 95% της παραγωγής, δηλαδή 2,5 – 3 εκατομμύρια τόνους το χρόνο [International Oil Council].

Στην Ελλάδα, την τρίτη στη σειρά ελαιοπαραγωγό χώρα μετά την Ισπανία και την Ιταλία αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους τομείς γεωργικής παραγωγή, με περίπου 400.000 τόνους ετησίως [Niaounakis and Halvadakis, 2006].

Για την παραγωγή του ελαιολάδου υπάρχουν τρεις μέθοδοι, η παραδοσιακή μέθοδος πίεσης, και τα φυγοκεντρικά συστήματα τριών και δύο φάσεων (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. *Διάγραμμα ροής των τριών διαφορετικών διαδικασιών παραγωγής ελαιολάδου α) Παραδοσιακή β) τριών φάσεων γ) δύο φάσεων.*

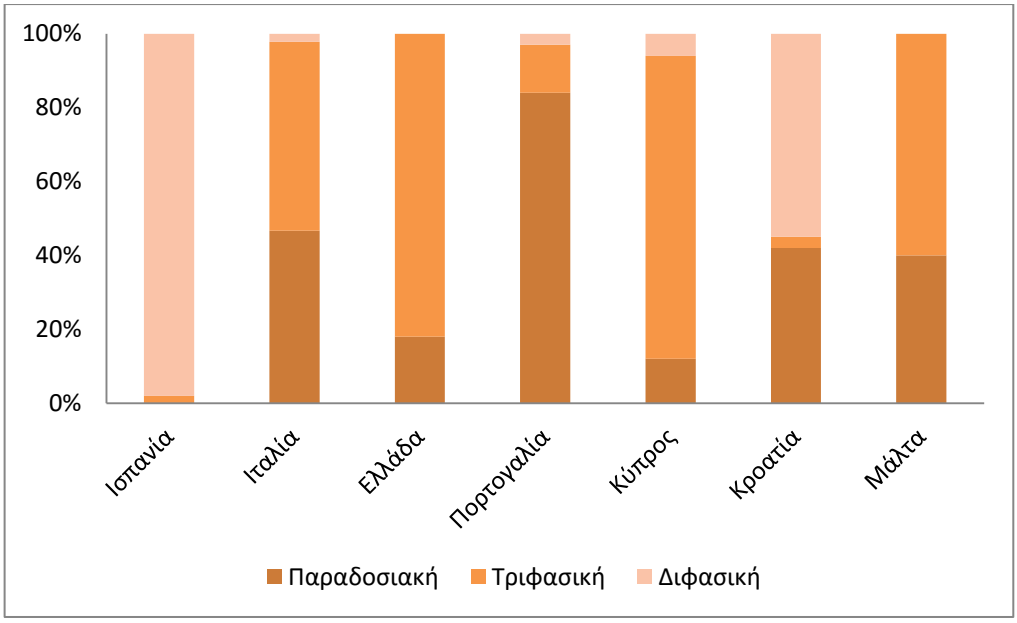
Η παραδοσιακή μέθοδος είναι μια ασυνεχής διαδικασία, στην οποία το άλεσμα των καρπών δημιουργεί μια υγρή φάση και στερεά απόβλητα (ελαιοπυρήνας). Από την υγρή φάση, μετά από επεξεργασία, προκύπτει το ελαιόλαδο και τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου που από εδώ και έπειτα θα ονομάζονται **κατσίγαρος**. Παρά το γεγονός ότι θεωρείται απαρχαιωμένη διαδικασία, εξακολουθεί να εφαρμόζεται σε αρκετές χώρες, μεταξύ των οποίων είναι και η Ελλάδα (εικόνα 2) [Roig et al., 2006] .

Κατά την τριφασική διαδικασία, η φυγόκεντρος διαχωρίζει την ελαιοκάμβη σε ελαιόλαδο, ελαιοπυρήνα και κατσίγαρο. Το κύριο μειονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι η μεγάλη απαίτηση σε νερό ώστε να καταστεί δυνατός ο διαχωρισμός, και συνεπώς η παραγωγή σημαντικού όγκου κατσίγαρου.

Το διφασικό σύστημα ήρθε να αντικαταστήσει το τριφασικό, καθώς η κύρια διαφορά μεταξύ τους είναι η ενσωμάτωση του κατσίγαρου στον ελαιοπυρήνα (ελαιοπολτός). Το διφασικό σύστημα πλεονεκτεί στην αισθητά μικρότερη κατανάλωση νερού, καθώς χρησιμοποιείται μόνο κατά το πλύσιμο, στον περιορισμό του όγκου κατσίγαρου, και στις χαμηλότερες τιμές Βιοχημικά Απαιτούμενου Οξυγόνου (Biochemical Oxygen Demand, BOD), δηλαδή η ποσότητα του διαλυμένου οξυγόνου που χρησιμοποιείται από τους μικροοργανισμούς για την πλήρη οξείδωση της οργανικής ύλης σε δείγματα νερού. Από την άλλη, η υγρασία του ελαιοπολτού και το ρυπαντικό φορτίο είναι πλέον αυξημένα, καθιστώντας το χειρισμό, τη μεταφορά και την αποθήκευση των αποβλήτων προβληματική.

Η συγκέντρωση των πολυφαινολών στο ελαιόλαδο του τριφασικού συστήματος είναι μικρότερη λόγω του προστιθέμενου νερού, ενώ το παραγόμενο από διφασικό σύστημα ελαιόλαδο είναι υψηλότερης ποιότητας και σταθερότερο στην οξείδωση [Μπλίκα, 2009].Τα φυγοκεντρικά συστήματα παράγουν απόβλητα χαμηλότερης περιεκτικότητας σε στερεά, συγκριτικά με τα παραδοσιακά [Μπλίκα, 2009].

Έχουν αναπτυχθεί επίσης και άλλες τεχνικές παραγωγής ελαιόλαδου, όπως η μέθοδος Sinolea [Boskou, 2006] ή μέθοδοι που αποτελούν συνδυασμό της παραδοσιακής μεθόδου και των πιο μοντέρνων φυγοκεντρικών μεθόδων. Η αποδοχή όμως αυτών των μεθόδων είναι περιορισμένη εξαιτίας της μικρής απόδοσης που έχουν.



Εικόνα 2. *Τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται στα ελαιοτριβεία της Ευρώπης [Kotronarou and Méndez, 2003].*

Οι μέθοδοι εξαγωγής του ελαιόλαδου ποικίλουν ανάλογα με τη χώρα˙ στην Ισπανία επικρατεί κατά 98% το διφασικό σύστημα, στην Ιταλία και στην Ελλάδα συναντάμε κυρίως το τριφασικό (*Εικόνα 2*). Η κύρια περιβαλλοντική παράμετρος που συνδέεται με τη λειτουργία των ελαιουργείων στην Ελλάδα, είναι τα παραγόμενα υγρά απόβλητα (κατσίγαρος). Ο κατσίγαρος παράγεται ως επί το πλείστον από ελαιοτριβεία που χρησιμοποιούν φυγοκεντρικούς διαχωριστήρες τριών φάσεων, τα οποία είναι και τα πολυπληθέστερα στον ελλαδικό χώρο. Δευτερευόντως κατσίγαρος παράγεται και από τα ελαιοτριβεία που χρησιμοποιούν την παραδοσιακή μέθοδο. Τα παραγόμενα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου αποτελούν μια πρόκληση για χώρες όπως η Ελλάδα που έχουν υιοθετήσει το σύστημα τριών φάσεων.

Υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (κατσίγαρος)

Τα υγρά απόβλητα ελαιουργείου εφεξής **κατσίγαρος**, αποτελούν ένα φυτικό εκχύλισμα προερχόμενο από τη μάλαξη, τη φυγοκέντρηση σε τριφασικό σύστημα, και τον ελαιοδιαχωρισμό του μείγματος νερού και χυμού του ελαιοκάρπου. Γενικά πρόκειται για υγρά απόβλητα σκούρου χρώματος (με απόχρωση από κίτρινο-πράσινο έως καφέ-μαύρο), θολά, υψηλού οργανικού ρυπαντικού φορτίου, χαμηλής βιοαποικοδομησιμότητας, υψηλής

ηλεκτρικής αγωγιμότητας, με χαρακτηριστική έντονη οσμή η οποία οφείλεται κυρίως σε πτητικά οξέα. Επίσης εμφανίζουν όξινο pH, υψηλή ρυθμιστική ικανότητα και επιφανειακή τάση, και είναι πλούσια σε ανόργανα και οργανικά υδατοδιαλυτά συστατικά [Μπαλατσούρας, 1997].

Η σύσταση των αποβλήτων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως τα χαρακτηριστικά του καρπού (ποικιλία ελιάς, στάδιο ωρίμανσης, θρέψη) και τεχνικά χαρακτηριστικά (κλιματολογικές συνθήκες, σύστημα συγκομιδής του καρπού, μέθοδος παραγωγής ελαιόλαδου). Στους παρακάτω πίνακες (πίνακας 1 και 2) παρουσιάζονται τα κυριότερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και συστατικά του κατσίγαρου.

Πίνακας 1. *Κύρια συστατικά του κατσίγαρου [Zervakis and Balis, 1996].*

Συστατικά	**Συγκέντρωση (%)**	**Κύρια Συστατικά**
Νερό	83 – 92	
Λίπη	0,03 – 1	Υπολείμματα ελαίου
Αζωτούχες Ενώσεις	1,2 – 2,4	Γλουταμίνη, Ιστιδίνη, Γλυκίνη, Προλίνη, Αργινίνη, Τυροσίνη, Φαινυλαλανίνη
Σάκχαρα	2 – 8	Ραφινόζη, Σακχαρόζη, Μανόζη, Γλυκόζη, Αραβινόζη, Ραμνόζη, Γαλακτόζη, Ξυλόζη
Οργανικά Οξέα	0,5 – 1,5	Οξικό, Ηλεκτρικό, Κιτρικό, Γλυκερινικό, Γαλακτικό, Μηλονικό, Οξαλικό, Φουμαρικό
Πολυαλκοόλες	0,5 – 1,5	Γλυκερίνη, Μανιτόλη
Πηκτίνες *Ταννίνες*	0,4 – 1,5	
Φαινολικές Ενώσεις	0,3 – 0,8	Φλαβονοειδή: Απεγινίνη, Λουτεολίνη, Κερσετίνη
		Φαινόλες: Καφεϊκό, Κινναμικό, 2,6-Διυδροξυβενζοϊκό, π-υδροηυβενζοϊκό, Συρινγγικό, Φερουλικό, π-Κουμαρικό, Βανιλλικό, Βερατρικό, Πρωτοκατεχικό, Τυροσόλη, Υδροξυτυροσόλη, Πυροκατεχικό, Ελαιοευρωπεΐνη
Ανόργανα Στοιχεία	0,4 – 1,5	K,P,Na,Ca,Mg,Fe,Mn,Zn,Cu,Cl, S

Περισσότερες από 30 διαφορετικές φαινολικές ενώσεις έχουν ανιχνευθεί στον κατσίγαρο και έχουν δημοσιευθεί από διάφορους ερευνητές. Σε ότι αφορά το μοριακό τους βάρος (ΜΒ), παρατηρούνται δύο βασικές κατηγορίες [Tsagaraki et al., 2006].

- Φαινολικά μονομερή, φλαβονοειδή, μη αυτοοξειδούμενες ταννίνες και άλλες ενώσεις με ΜΒ < 10kDa.
- Μεσαίου και μεγάλου μοριακού βάρους (ΜΒ > 10kDa) σκουρόχρωμα πολυμερή, τα οποία προέρχονται από τον πολυμερισμό και την αυτοοξείδωση των φαινολικών ενώσεων της πρώτης ομάδας.

Το χρώμα του κατσίγαρου εξαρτάται από την αναλογία των δύο αυτών ομάδων.

Ανάλογα τώρα με τη χημική τους σύσταση χωρίζονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες:

- Παράγωγα του κινναμικού οξέος (κινναμικό οξύ, ο-, π- κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ).
- Παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (βενζοϊκό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ).
- Παράγωγα της β-3,4-διυδροξυφαινυλαιθανόλης όπως τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη.

Πίνακας2. *Κύρια Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά του κατσίγαρου [Fiesta Ros de Ursinos and Broja - Padilla, 1992; Hamdi and Ellouz, 1992].*

	Όρια τιμών
Νερό (%)	83 – 93
Οργανικά συστατικά (%)	4 – 16
Ανόργανα Συστατικά (%)	1 – 2
Πυκνότητα (g/cm^3)	1.024
Αγωγιμότητα (μS/cm)	80.000 – 160.000
pH	4,5 – 6,5
Βιοχημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (BOD) (mg/L)	14.000 – 110.000
Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (COD) (mg/L)	41.400 – 130.000

Γενικά οι οργανικές ουσίες του κατσίγαρου μπορούν να διαχωριστούν σε ενώσεις άμεσα διασπώμενες (π.χ. σάκχαρα, οργανικά οξέα, αμινοξέα), βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή (πρωτεΐνες, ημικυταρρίνες) και δύσκολα διασπώμενα συστατικά όπως μεγαλομοριακές λιπαρές ουσίες και φαινολικές ενώσεις [Οιχαλιώτης και Ζερβάκης, 1999]. Οι Visioli et al. (1995) αναφέρουν ότι τα εκχυλίσματα κατσίγαρου διαθέτουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια φθηνή πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών.

Παρά το ότι το πιο σημαντικό, από ποσοτική άποψη, τμήμα του οργανικού κλάσματος καταλαμβάνεται από σάκχαρα, οι πολυφαινόλες και οι λιπαρές ουσίες είναι αυτές που προσδίδουν στον κατσίγαρο ανεπιθύμητες ιδιότητες (χρώμα, φυτοτοξικότητα κ.α.).

Προβλήματα σε περιβάλλον και υγεία

Τα απόβλητα των ελαιουργείων (κατσίγαρος) συγκαταλέγονται στα ιδιαίτερα τοξικά, από άποψη ρυπαντικού φορτίου, αγροτοβιομηχανικά απόβλητα. Χαρακτηριστικά αναφέρεται, ότι τα υγρά απόβλητα ενός ελαιουργείου μέσης δυναμικότητας, συνολικού όγκου φυτικών αποβλήτων 50m^3/day, με βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD) 40g/L, ισοδυναμούν με αστικά λύματα ενός οικισμού 30.000 κατοίκων όσο αφορά τη ρυπογόνο δύναμη [Μπαλατσούρας Γ.,1999]. Έτσι δεδομένου ότι από 1 τόνο επεξεργάσιμου ελαιοκάρπου παράγονται μόλις 200 κιλά ελαιόλαδο και ταυτόχρονα 400-1200 λίτρα υγρά απόβλητα (κατσίγαρο), και ότι η ελαιοκομική περίοδος διαρκεί 4 – 5 μήνες γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι η ρύπανση που προκαλείται από τα ελαιουργεία είναι ένα από τα σημαντικότερα περιβαλλοντικά προβλήματα που απασχολούν τις χώρες της Μεσογείου.

Τα μεγαλύτερα προβλήματα δημιουργούνται από την αλόγιστη διάθεση του κατσίγαρου σε υδάτινους αποδέκτες αλλά και στο έδαφος και έχουν γίνει πολλές μελέτες για τις επιπτώσεις είτε στους οργανισμούς που ζουν στο νερό και στο έδαφος είτε στις καλλιέργειες στα εδάφη αυτά. Στα προβλήματα αυτά έρχονται να προστεθούν η οπτική ρύπανση και η δυσοσμία. Αξίζει να σημειωθεί πως η αλόγιστη διάθεσή του κατσίγαρου μπορεί να καταστρέψει τις ικανότητες αυτοκαθαρισμού των συστημάτων, μεταβάλλοντας τη βιολογική ισορροπία.

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες για τη ρύπανση, τόσο σε θαλάσσια οικοσυστήματα, όσο και σε υδάτινους αποδέκτες γλυκού νερού. Έχουν αναφερθεί σοβαρές επιπτώσεις στη μείωση της βιοποικιλότητας, όπου προέρχονται κυρίως από τα λιπίδια που σχηματίζουν ένα στρώμα στην επιφάνεια του νερού και εμποδίζουν την είσοδο του φωτός και του οξυγόνου, από τη συσσώρευση στερεών συστατικών στον πυθμένα των χειμάρρων,

από την εισχώρηση στερεών συστατικών στο σώμα των υδρόβιων οργανισμών, και από τη δράση τοξικών συστατικών όπως των φαινολών [Βορεάδου Α.,1993]. Σε χείμαρρους με μεγάλη παροχή νερού και με 7-8 μήνες παραμονής του νερού στην κοίτη, παρατηρήθηκε μείωση των ειδών στα ρυπασμένα από τον κατσίγαρο τμήματα της διαδρομής μέχρι και 41 %, ενώ σε χείμαρρους με μικρότερη παροχή νερού έφτασε στο 71% περίπου [Βορεάδου Α.,1993].

Όσο αφορά το έδαφος, η εναπόθεση του κατσίγαρου αλλοιώνει τα χαρακτηριστικά του [BenSassi et al.,2006] και την παρούσα μικροβιακή κοινότητα [Karpouzas et al.,2010;Kotsou et al.2004]. Επιπροσθέτως αυξάνει την υδροφοβικότητα στο επιφανειακό στρώμα του εδάφους και την διαπερατότητα των αργιλικών εδαφών, ενισχύοντας, έτσι, τη διάβρωση του εδάφους και τη διαφυγή των αποβλήτων στον υδροφόρο ορίζοντα [Jarboui et al., 2008;Mahmoud et al., 2010;Πατώνη, 2010]. Η πιθανότητα οι ρύποι αυτοί να καταλήξουν σε καλλιεργούμενες εκτάσεις μετά από άρδευση των ρυπασμένων υδάτων είναι αυξημένη, ιδιαίτερα αν λάβουμε υπόψη ότι οι εγκαταστάσεις των ελαιοτριβείων συχνά εδράζουν σε περιοχές παραγωγής ελαιοκάρπου.

Οι φαινολικές ενώσεις και τα οργανικά οξέα που υπάρχουν στον κατσίγαρο, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, μπορούν να προκαλέσουν έντονα φαινόμενα υποτονικότητας [D' Annibale et al., 2004;Aliotta et al., 2002;Capasso et al., 1992], και έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στη βλάστηση και ανάπτυξη των φυτών [Saez et al., 1992]. Έχει ακόμα αναφερθεί ότι η άμεση εφαρμογή κατσίγαρου μπορεί να προκαλέσει πτώση των καρπών και των φύλλων στα φυτά [Κουσέρη,2008].

Η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων μη εύκολα βιοαποικοδομήσιμων μορίων, όπως μακριές αλυσίδες λιπαρών οξέων, δυσχεραίνουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών, και η μεγάλη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις, οργανικά οξέα, ταννίνες και ανόργανα άλατα παρεμποδίζουν τις μικροβιακές και φυτικές δραστηριότητες [Λοϊζίδης, 2009].

Τέλος η αποδόμηση των οργανικών ουσιών, από τους μικροοργανισμούς που καταφέρνουν να επιβιώσουν ή και ακόμα να επικρατήσουν στο ρυπασμένο περιβάλλον, απαιτεί την κατανάλωση οξυγόνου, έτσι λόγω της μετέπειτα έλλειψης οξυγόνου που προκαλείται, διαταράσσεται ακόμα περισσότερο η μικροβιακή κοινότητα των υδατικών και εδαφικών περιβαλλόντων [Πατώνη, 2010].

Το αντίκτυπο του κατσίγαρου στην υγεία είναι εξίσου σοβαρό. Μετά από κατάποση έχουν αναφερθεί παθήσεις, όπως γαστρεντερικές ενοχλήσεις, ηπατικά και νεφρικά προβλήματα, νευρικοί σπασμοί, καρδιακές αρρυθμίες, ακόμα και θάνατος. Σε ποντίκια έχει παρατηρηθεί καρκινογένεση, αν και δεν υπάρχουν αντίστοιχα αποτελέσματα σε

ανθρώπους. Προβλήματα μπορούν να δημιουργηθούν ακόμη και όταν έρθει σε επαφή με το δέρμα, όπως ερεθισμός, εγκαύματα και νέκρωση ιστών [Environmental Health Criteria for Phenols].

Διαχείριση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (κατσίγαρος)

Η επεξεργασία του κατσίγαρου μπορεί να γίνει με φυσικές μεθόδους (μηχανικές, θερμικές), με φυσικοχημικές μεθόδους και βιολογικές μεθόδους. Παρακάτω θα γίνει μια σύντομη αναφορά σε αυτές τις μεθόδους επεξεργασίας του κατσίγαρου.

Φυσικές μέθοδοι επεξεργασίας

Απλές φυσικές μέθοδοι, όπως η αραίωση, η ιζηματοποίηση, η επίπλευση, η φυγοκέντριση και η διήθηση, έχουν εφαρμοστεί για την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων. Όμως, καμία από αυτές τις μεθόδους, εάν εφαρμοστεί μόνη της, δεν είναι ικανή να μειώσει το οργανικό φορτίο και την τοξικότητα των υγρών αποβλήτων σε επίπεδα επιτρεπτά για την ασφαλή διάθεση τους στο περιβάλλον.

Η αραίωση συνήθως εφαρμόζεται, πριν από τις βιολογικές μεθόδους επεξεργασίας, με στόχο την ελάττωση της τοξικότητας των αποβλήτων. Οι υπόλοιπες μέθοδοι έχουν σαν στόχο τη δημιουργία συσσωματωμάτων και στη συνέχεια την απομάκρυνση τους από το υγρό κλάσμα, ώστε να μειωθεί το οργανικό κλάσμα των αποβλήτων. Δυστυχώς, αυτό δεν μπορεί να επιτευχθεί απόλυτα, εξαιτίας της λεπτά κατανεμημένης και μερικώς γαλακτοποιημένης φύσης των σωματιδίων που αιωρούνται. Επίσης, η εφαρμογή τους παρουσιάζει πολλά προβλήματα, λόγω μεγάλων ποσοτήτων ιζήματος που παράγονται, το οποίο πρέπει να επεξεργαστεί περαιτέρω για να διατεθεί με ασφάλεια στο περιβάλλον. Για παράδειγμα, μελέτες έδειξαν ότι η επεξεργασία των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με φυγοκέντρική διαδικασία οδήγησε σε μείωση του COD μόλις κατά 21% και του BOD κατά 15% [Al-Malah *et al*., 2000].

Στην κατηγορία των φυσικών μεθόδων επεξεργασίας ανήκει η επεξεργασία των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων με μεμβράνες. Η δομή και τα χαρακτηριστικά της μεμβράνης καθορίζουν τη φύση του διαχωρισμού, καθώς η διαπερατότητα εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων και των πόρων των μεμβρανών.

Ο διαχωρισμός με μεμβράνες διακρίνεται (βάσει του μεγέθους των πόρων) σε: μικροδιήθηση, υπερδιήθηση, νανοδιήθηση και αντίστροφη ώσμωση. Η τεχνολογία των μεμβρανών χρησιμοποιείται για τη συμπύκνωση, τον καθαρισμό και την κλασματοποίηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων και είναι αποτελεσματική για την ανάκτηση και την

επαναχρησιμοποίηση υποπροϊόντων αξίας (π.χ. πολυφαινόλες) και νερού, ενώ το συμπύκνωμα μπορεί να αποτεφρωθεί. Ωστόσο, ένα στάδιο προ-φιλτραρίσματος είναι απαραίτητο ώστε να αφαιρεθούν τα μεγάλα αιωρούμενα στερεά σωματίδια, καθώς δημιουργούνται προβλήματα στην ομαλή λειτουργία των μεμβρανών (π.χ. φράξιμο των πόρων). Σύμφωνα με τους Paraskeva et al. (2007), η υπερδιήθηση σε συνδυασμό με τη νανοδιήθηση και/ή την αντίστροφη ώσμωση αποδείχθηκε ως μια ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδος επεξεργασίας και κλασματοποίησης του κατσίγαρου. Το τελικό υγρό προϊόν θεωρήθηκε κατάλληλο για άρδευση, λόγω της μικρής περιεκτικότητας του σε οργανικά συστατικά, ιόντα και φαινολικές ενώσεις (μείωση περίπου 95%).

Θερμικές μέθοδοι επεξεργασίας

Η καύση και η πυρόλυση των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων αποτελούν τις πιο διαδεδομένες θερμικές μεθόδους επεξεργασίας. Τα πλεονεκτήματα από την εφαρμογή τους είναι η μείωση του όγκου των αποβλήτων και η ανάκτηση ενέργειας. Ωστόσο, τα μειονεκτήματα τους είναι το υψηλό κόστος καθώς και η πιθανή εκπομπή αέριων τοξικών ρύπων στην ατμόσφαιρα.

Η εξάτμιση και η απόσταξη ανήκουν στις θερμικές μεθόδους επεξεργασίας, οι οποίες συμπυκνώνουν το οργανικό και ανόργανο περιεχόμενο των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων. Η ενέργεια για την εξάτμιση προέρχεται από θερμότητα καύσης ή από φυσική πηγή (π.χ. ήλιος). Τα στερεά υπολείμματα που προκύπτουν έχουν υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο, οπότε χρησιμοποιούνται συνήθως για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας. Οι Potoglou et al.(2004) έδειξαν ότι, η εξάτμιση και η απόσταξη των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων με χρήση ηλιακής ακτινοβολίας οδηγεί σε μείωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD) κατά περίπου 80%.

Οι λίμνες εξάτμισης είναι απλές εφαρμογές, χαμηλού κόστους, αλλά υπάρχει κίνδυνος ρύπανσης του υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα εάν η μόνωση της λεκάνης δεν είναι κατάλληλη ή υπάρξει κάποια διαρροή. Κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η έντονη δυσοσμία που αναδύεται από τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων, η οποία γίνεται αντιληπτή σε μεγάλη απόσταση. Μετά την εξάτμιση των υγρών αποβλήτων, τα στερεά που απομένουν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως λίπασμα αλλά και να επεξεργαστούν περαιτέρω με κομποστοποίηση [Paredes *et al.*, 2002].

Φυσικοχημικές μέθοδοι επεξεργασίας

Η κροκίδωση, η προσρόφηση, η οξείδωση, οι προηγμένες τεχνικές οξείδωσης, η υγρή οξείδωση, η οξείδωση Fenton και η ηλεκτροχημική οξείδωση αποτελούν τις βασικότερες

φυσικοχημικές μεθόδους που εφαρμόζονται για την επεξεργασία του κατσίγαρου. Η κροκίδωση αφορά στη χημική αποσταθεροποίηση κολλοειδών σωματιδίων εξαιτίας της προσθήκης κατάλληλων ηλεκτρολυτών, οι οποίοι μειώνουν το φορτίο των σωματιδίων, με αποτέλεσμα να μειώνονται οι ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις και τα κολλοειδή σωματίδια να σχηματίζουν μεγαλύτερα συσσωματώματα, τα οποία καθιζάνουν. Συχνά η προσθήκη ενός κροκιδωτικού μέσου για να προάγει τη συσσωμάτωση είναι απαραίτητη (π.χ. $FeCl_3$, $AlCl_3$, $FeSO_4$, $Ca(OH)_2$). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η επεξεργασία των υγρών αποβλήτων με 6 g $AlCl_3$/L οδηγεί σε μείωση του COD κατά 94% και των φαινολικών ενώσεων κατά 91% [Sarika *et al.*, 2005].

Η προσρόφηση αφορά στη φυσική σύνδεση των διαλυμένων ουσιών των υγρών αποβλήτων στην επιφάνεια πορωδών στερεών. Συνήθως, ως παράγοντας προσρόφησης χρησιμοποιείται ενεργός άνθρακας. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η προσρόφηση σε ενεργό άνθρακα, αφού έχει προηγηθεί κροκίδωση, οδήγησε σε μείωση του COD των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων κατά 30% [Kestioglou *et al.*, 2005]. Η οξείδωση μπορεί να οδηγήσει όχι μόνο στη διάσπαση τοξικών ουσιών που περιέχονται στα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων αλλά και στη σχεδόν πλήρη ανοργανοποίηση τους. Το όζον, ένα ισχυρό οξειδωτικό μέσο, αντιδρά με ενώσεις που περιέχουν αρωματικούς δακτυλίους και διπλούς δεσμούς. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η μικρή μείωση του COD (18-20%) που παρατηρήθηκε μετά από 2 h οζονισμού υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων αρχικής συγκέντρωσης 10 g COD/L, ίσως οφείλεται στη διάσπαση των μεγάλων οργανικών ενώσεων σε μικρότερες, ενώ παρατηρήθηκε αποχρωματισμός και σχεδόν ολοκληρωτική απομάκρυνση των φαινολικών ενώσεων [Benitez *et al.*, 1999].

Οι προηγμένες τεχνικές οξείδωσης περιλαμβάνουν τη δημιουργία και τη δράση ριζών υδροξυλίου, οι οποίες δημιουργούνται από μια πηγή οξυγόνου και μια πηγή ενέργειας, είναι ασταθείς αλλά ιδιαίτερα δραστικές. Η πηγή μοριακού οξυγόνου είναι συνήθως το όζον (O_3) ή το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), ενώ η υπεριώδης ακτινοβολία (UV) ή η ηλιακή ακτινοβολία είναι η πηγή ενέργειας. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η επεξεργασία υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με O_3/UV και H_2O_2/UV στις βέλτιστες τιμές του pH (7 και 2, αντίστοιχα) οδήγησε σε μείωση του COD και των φαινολικών ενώσεων κατά 99%, για 5 h οζονισμού με 535 mg O_3/L και 750-1000 mg H_2O_2/L[Aktas *et al.*, 2001]. Η διεργασία της οξείδωσης στην οποία χρησιμοποιείται οξυγόνο σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης είναι γνωστή ως υγρή οξείδωση. Η υγρή οξείδωση με ή χωρίς τη χρήση καταλύτη μπορεί να προάγει την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων ή να οδηγήσει στη σχεδόν πλήρη ανοργανοποίηση τους. Υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων

αραιωμένα 1:10 με αστικά απόβλητα σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης (180°C, 7MPa) υφίστανται μείωση του COD κατά 30% και μείωση των φαινολικών ενώσεων κατά 80% [Rivas *et al.*, 2001].

Η οξείδωση Fenton, η οποία συνδυάζει χημική οξείδωση και συσσωμάτωση με χρήση H_2O_2 και προσθήκη $FeSO_4$, αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη τεχνολογία. Παράμετροι όπως η συγκέντρωση των ιόντων δισθενούς ή τρισθενούς σιδήρου, η συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, το pH και ο χρόνος αντίδρασης έχουν πρωταρχική σημασία για τη διεργασία. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, πλήρη απομάκρυνση φαινολικών ενώσεων και μείωση του COD κατά 40-60% παρατηρήθηκε όταν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων επεξεργαστήκαν με 2-3 g $FeSO_4$*7H_2O/L και 3 ml H_2O_2 (60% w/w) για 2 h περίπου [Vlyssides *et al.*,2004].

Η ηλεκτροχημική οξείδωση των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων (Ti/Ta/Pt/Ir ως ηλεκτρόδιο ανόδου) οδηγεί στη σχεδόν πλήρη απομάκρυνση των φαινολικών ενώσεων, χωρίς όμως να επιτυγχάνεται υψηλή απομάκρυνση του COD. Ωστόσο, η ηλεκτροχημική οξείδωση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων, με ηλεκτρόδιο ανόδου Ti/Ta/Pt/Ir και βέλτιστη αλατότητα 3 % κ.ο. NaCl, οδήγησε σε μείωση του COD κατά 71% ύστερα από 8 h αντίδρασης [Giannes *et al*., 2003].

Βιολογικές μέθοδοι επεξεργασίας

Οι βιολογικές διεργασίες για την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων θεωρούνται φιλικές προς το περιβάλλον, αξιόπιστες και σε αρκετές περιπτώσεις οικονομικά βιώσιμες λύσεις. Ωστόσο, οι βιολογικές μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων απαιτούν ιδιαίτερη προσοχή στην επιλογή και στον εγκλιματισμό των μικροοργανισμών, λόγω της αντιμικροβιακής δράσης που παρουσιάζουν τα συγκεκριμένα απόβλητα έναντι ορισμένων μικροβιακών ειδών.

Η υψηλή περιεκτικότητα των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων σε ανόργανα άλατα αλλά κυρίως σε αφομοιώσιμες πηγές άνθρακα τα καθιστούν πρόσφορο υπόστρωμα για την ανάπτυξη ποικίλων αερόβιων μικροοργανισμών, όπως οι μύκητες *Pleurotus Ostreatus, Basilus pumilus* και οι ζύμες *Yarrowiali polytica* κ.ά. Η απομάκρυνση του οργανικού φορτίου λαμβάνει χώρα μέσω οξειδωτικών μικροβιακών διεργασιών. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αερόβια επεξεργασία των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου οδήγησε σε μείωση του COD κατά 58-68% για απόβλητα με 65-98 g COD/L και μείωση του COD κατά 81-84% για απόβλητα με 22 g COD/L, ενώ και

στις δυο περιπτώσεις παρατηρήθηκε μείωση των φαινολικών ενώσεων κατά 90% [Benitez *et al.*, 1997b & 1999].

Η αναερόβια χώνευση είναι μια πολύπλοκη βιοχημική διεργασία, κατά την οποία το οργανικό υλικό αποδομείται κυρίως προς μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα, ενώ είναι δυνατή τόσο η αναερόβια παραγωγή υδρογόνου όσο και η φωτοβιολογική παραγωγή υδρογόνου [Eroglu *et al.*, 2004]. Η αραίωση του αποβλήτου, η προσθήκη θρεπτικών συστατικών και η ρύθμιση της αλκαλικότητας θεωρούνται ως αναγκαίες δράσεις για την ομαλή λειτουργία ενός αναερόβιου αντιδραστήρα. Αρκετοί ερευνητές έχουν μελετήσει την επίδραση της αραίωσης των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων όχι μόνο με νερό αλλά και με άλλα υγρά απόβλητα (όπως απόβλητα από χοιροστάσια, κοπριά, οικιακά υγρά απόβλητα, υγρά απόβλητα από σφαγεία κ.ά.) στην αναερόβια χώνευση [Marques *et al.*, 1998;Angelidaki & Ahring, 1997]. Το επιπρόσθετο υγρό ρεύμα αποβλήτων εξασφαλίζει τα επιθυμητά επίπεδα pH και αλκαλικότητας και σε αρκετές περιπτώσεις τα θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για την αναερόβια χώνευση. Σε πολλές περιπτώσεις, έχει δειχθεί ότι, η αναερόβια συγχώνευση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με άλλα υγρά απόβλητα είναι πιο οικονομική και αποτελεσματική από την αναερόβια επεξεργασία κάθε ρεύματος ξεχωριστά. Ωστόσο, πολλές φορές είναι απαραίτητη η προεπεξεργασία των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων ώστε να μειωθεί το υψηλό οργανικό φορτίο και το κλάσμα των ενώσεων (όπως πολυφαινόλες και λιπαρά οξέα μακριάς αλυσίδας) που δρουν παρεμποδιστικά για τους αναερόβιους μικροοργανισμούς.

Τα πλεονεκτήματα της αναερόβιας χώνευσης είναι οι ελάχιστες απαιτήσεις σε ενέργεια, η μικρή απόδοση σε μικροβιακή μάζα και η συνεχής έκλυση αερίου μίγματος, το οποίο είναι ενεργειακά αξιοποιήσιμο. Ωστόσο, τα μειονεκτήματα είναι το υψηλό κόστος εγκατάστασης της μονάδας, ο μεγάλος χρόνος παραμονής του αποβλήτου στον αντιδραστήρα (με τελικά προϊόντα μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα), η πρόκληση δυσάρεστων και ανεπιθύμητων οσμών, η ανάγκη για προεπεξεργασία του αποβλήτου και τέλος η ανάγκη για επιπλέον επεξεργασία του τελικού υγρού προϊόντος.

Κομποστοποίηση είναι η ελεγχόμενη αερόβια βιολογική επεξεργασία στερεών αποβλήτων μέσω ενός θερμόφιλου σταδίου, κατά το οποίο εκλύεται θερμότητα λόγω των εξώθερμων αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα. Με την ολοκλήρωση της θερμόφιλης φάσης και της φάσης ωρίμανσης προκύπτει ένα σταθεροποιημένο οργανοχουμικό προϊόν, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εδαφοβελτιωτικό. Τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσο ρύθμισης της υγρασίας (αντί του

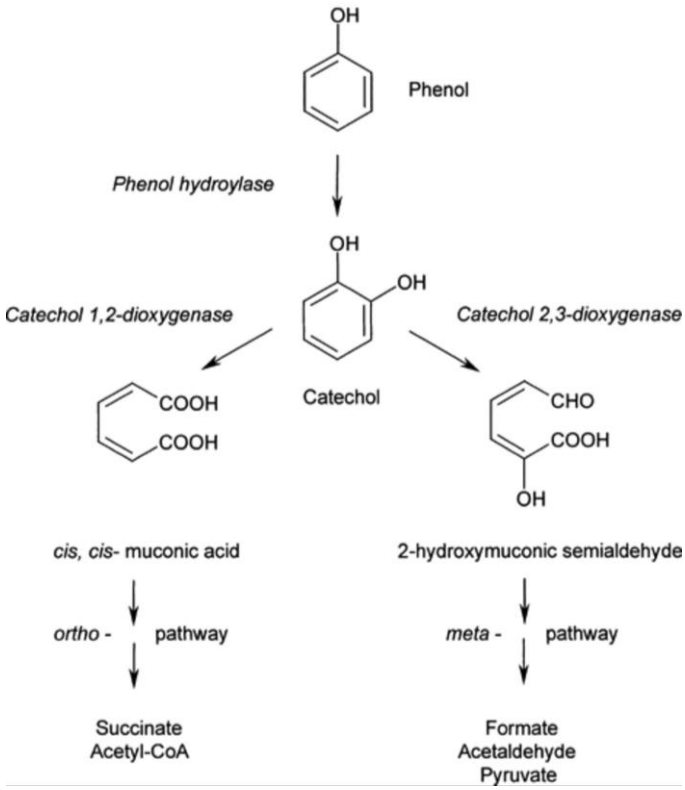
νερού) κατά την διάρκεια κομποστοποίησης διαφόρων στερεών οργανικών υπολειμμάτων [Paredes *et al.*, 2003].

Τέλος, τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων περιέχουν πολύτιμα συστατικά, όπως φαινολικές και αντιοξειδωτικές ενώσεις, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτες ύλες στη βιομηχανία παραγωγής φαρμάκων και καλλυντικών. Οι πιο σημαντικές και με μεγάλη εμπορική αξία αντιοξειδωτικές ενώσεις είναι η υδροξυ-τυροσόλη, η τυροσόλη και η ελευρωπαΐνη.

Βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων

Η αερόβια βιοαποικοδόμηση της φαινόλης άρχισε να ερευνάται από το 1900. Υπάρχουν μικροοργανισμοί (αερόβιοι και αναερόβιοι) σε διάφορα περιβάλλοντα που έχουν τη δυνατότητα να τη χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα και ενέργειας [Van Schie and Young, 2000]. Πολλοί αερόβιοι μικροοργανισμοί που αποικοδομούν τη φαινόλη απομονώθηκαν και έτσι τα μονοπάτια αποικοδόμησής της είναι πλέον γνωστά, ενώ τα τελευταία χρόνια αρκετά γονίδια που εμπλέκονται στην αερόβια αποικοδόμησή της έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί [Van Schie and Young, 2000] .

Στο αερόβιο μονοπάτι αποικοδόμησης της φαινόλης χρησιμοποιείται μοριακό οξυγόνο από το ένζυμο υδροξυλάση της φαινόλης με σκοπό την προσθήκη ενός δεύτερου υδροξυλίου στο φαινολικό δακτύλιο στην ortho θέση ως προς αυτό που ήδη υπάρχει. Η αντίδραση απαιτεί ένα μόριο NADH2. Η σχηματιζόμενη κατεχόλη (1,2-διυδροξυβενζόλιο) μπορεί να αποικοδομηθεί μέσω δύο εναλλακτικών μονοπατιών ανάλογα με τον εκάστοτε οργανισμό. Στο ortho ή αλλιώς β-ketoadipate μονοπάτι, υπάρχει σχάση του αρωματικού δακτυλίου ανάμεσα στα δύο υδροξύλια της κατεχόλης από μια 1,2-διοξυγενάση (intradiolfission), οπότε και σχηματίζεται cis, cis μουκονικό οξύ, το οποίο περαιτέρω μεταβολίζεται μέσω του κύκλου του Krebs.



Εικόνα 3. *Καταβολισμός της φαινόλης από μικροοργανισμούς με το ortho- και meta- βιοχημικό μονοπάτι [Lipthay et al., 2001].*

Στο meta μονοπάτι (Εικόνα 3) η σχάση του φαινολικού δακτυλίου λαμβάνει χώρα στο δεσμό που πρόσκειται στα δύο υδροξύλια της κατεχόλης, με τη βοήθεια του ενζύμου 2,3-διοξυγενάση (extradiolfission), οπότε και σχηματίζεται μια ημιαλδεΰδη, που ακολούθως μεταβολίζεται μέσω του κύκλου του Krebs [Van Schie and Young, 2000]. Όλες οι παραπάνω πληροφορίες σχετικά με τα μονοπάτια αποικοδόμησης της φαινόλης αναφέρονται σε βακτήρια. Το μοναδικό μονοπάτι που υπάρχει στη διεθνή βιβλιογραφία και αναφέρεται σε φύκη είναι αυτό των Semple and Cain (1996), όπου το φύκος *Ochromonas danica*, χρησιμοποιώντας το meta μονοπάτι (όμοιο με εκείνο που προαναφέρθηκε για τα βακτήρια) διασπά τη φαινόλη παράγοντας διοξείδιο του άνθρακα, πυροσταφυλικό και φορμαλδεΰδη.

Βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων από μικροφύκη

Υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές όπου χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί για να βιοαποικοδομήσουν τις φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στον κατσίγαρο. Έχει αναφερθεί ότι ο μύκητας *Coriolopsis rigida* μπορεί να βιοαποικοδομήσει σε ποσοστό μεγαλύτερο από 70% τις φαινολικές ενώσεις (Υδροξυτυροσόλη: 1824 mg/kg στερεών αποβλήτων, Τυροσόλη: 682 mg/kg στερεών αποβλήτων) που υπάρχουν στον κατσίγαρο σε διάστημα 20 ημερών [Sampedro et al., 2004]. Ανάλογες έρευνες με

Phanerochaete flavido-alba [Linares et al., 2003]και *Pleurotus ostreatus* [Aggelis et al., 2003] έδωσαν παρόμοιες βιοαποικοδομήσεις, σε μικρότερα όμως χρονικά διαστήματα, των 10 ημερών και 2 εβδομάδων, αντίστοιχα. Ο μικροοργανισμός *Coriolopsis gallica* έχει αναφερθεί ότι βιοαποικοδομεί ποσοστό μεγαλύτερο από 90% του φαινολικού φορτίου(28 mg/kg εκχυλίσματος ΥΑΕ) των υγρών αποβλήτων του κατσίγαρου σε διάστημα 12 ημερών [Daassi et al, 2014], ενώ οι μικροοργανισμοί *Geotrichum sp., Aspergillus sp.,Candida tropicalis* σε μικρότερα ποσοστά της τάξης του 50% (8,2g tannic acid/L) [Fadil et al., 2003].

Τα βακτήρια όμως αποτελούν ετερότροφους οργανισμούς, απαιτείται λοιπόν η συνεχής παροχή οργανικής ύλης για την κάλυψη των ενεργειακών τους αναγκών για την ανάπτυξη και την βιοαποικοδόμηση των ρύπων. Είναι εύλογο, κατ' επέκταση, να φανταστούμε ότι η χρήση βακτηρίων για την απορρύπανση αποβλήτων χαμηλής συγκέντρωσης ρύπων δεν είναι οικονομικά βιώσιμη. Η προσέγγιση του προβλήματος της βιοαποικοδόμησης ρύπων χρησιμοποιώντας μικροφύκη προτάθηκε αρχικά από τους Oswald and Gotaas, 1975, καθώς είναι φωτοσυνθετικοί αυτότροφοι οργανισμοί. Ενώ η αντιμετώπιση ρύπων με τη χρήση βακτηρίων [Diaz, 2004;Janssen et al.,2005;Kobayashi and Rittmann, 1982],ανώτερων φυτών [Konoßa et al., 1995]και ζώων [James et al., 1977]έχει μελετηθεί εκτενέστερα, η χρήση των μικροφυκών έχει κερδίσει το ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Αυτό οφείλεται στα πλεονεκτήματα που δύναται να προσφέρει η χρήση τους, δηλαδή την χρήση της ηλιακής ενέργειας για τη σύνθεση και την παραγωγή βιομάζας μέσω της φωτοσυνθετικής διαδικασίας και την παραγωγή ουσιών υψηλής εμπορικής αξίας [Aaronson et al., 1980]. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα φύκη είναι οργανισμοί που φέρουν στο γονιδίωμά τους την ικανότητα να ανθίστανται στην παρουσία των φαινολών, δεδομένου ότι επιβίωσαν σε πολύ πιο αντίξοες συνθήκες (NO_x, H_2S) σε σύγκριση με τη σημερινή ατμόσφαιρα. Πολλά είδη μικροφυκών (π.χ. *Chlorella spa., Scenedesmus obliquus, Selenastrum capricornutum και Ochromonas danica*) έχει φανεί πως είναι αρκετά ανθεκτικά [Jankevicius et al., 1992] ώστε να μπορούν να βιοαποικοδομήσουν πλήθος ρύπων, όπως το ζιζανιοκτόνο 2,4-διχλωροφαινοξυοξεικό οξύ[Butler et al.,1975],φαινόλες [Ellis, 1977;Klekner and Kosaric,1992][Tikoo et al.,1997;Pinto et al.,2002]και πολλούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες [Warshawsky et al., 1988;Warshawsky et al., 1995].

Η απλούστερη φαινολική ένωση, η φαινόλη, χρησιμοποιείται από το χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* ως εναλλακτική πηγή άνθρακα, ενώ σε συνδυασμό με την κατάλληλη ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας, επιτυγχάνεται ο πλήρης μεταβολισμός της (100% βιοαποικοδόμηση) [Papazi and Kotzabasis, 2007]. Αυξάνοντας το βαθμό δυσκολίας της βιοδιάσπασης, προσθέτοντας έναν υποκαταστάτη στο φαινολικό δακτύλιο, η

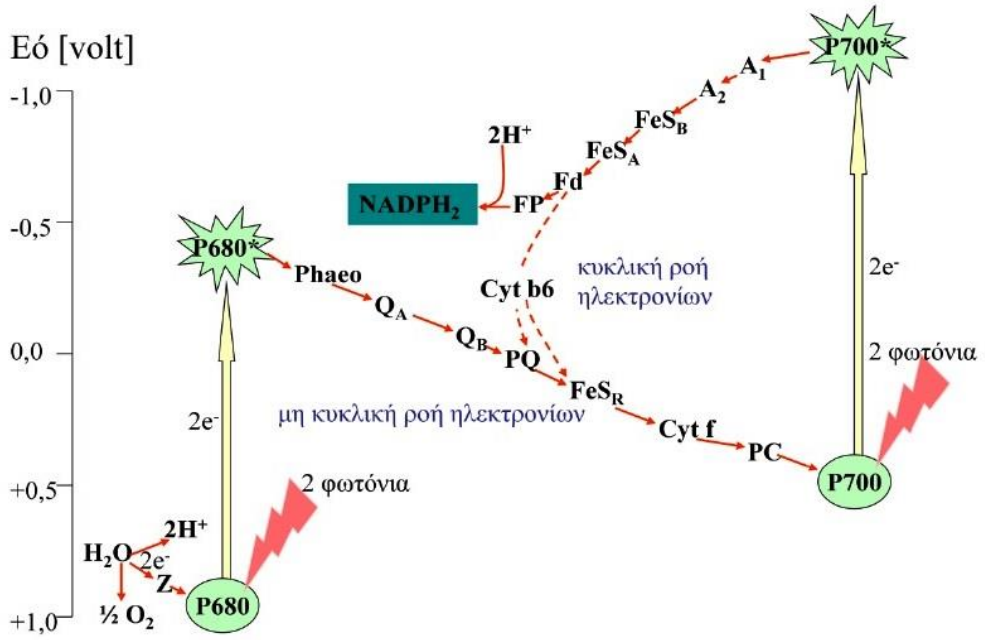
βιοαποικοδόμηση γίνεται μέσω συμμεταβολισμού, και πραγματοποιείται σε δύο διακριτές φάσεις. Κατά την πρώτη φάση, αποσπάται ο υποκαταστάτης (αλογόνο) και κατά τη δεύτερη φάση λαμβάνει χώρα η σχάση του φαινολικού δακτυλίου [Papazi and Kotzabasis, 2007]. Η επιπλέον αύξηση του βαθμού δυσκολίας της βιοαποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων από το χλωροφύκος, που επιτυγχάνεται με την προσθήκη ενός δεύτερου υποκαταστάτη στο φαινολικό δακτύλιο (π.χ. διχλωροφαινόλες), διαφοροποιεί το επίπεδο βιοαποικοδόμησης ανάλογα με το πόσα meta-υποκατεστημένα χλώρια υπάρχουν στο φαινολικό δακτύλιο [Papazi and Kotzabasis, 2013]. Η βιοαποικοδόμηση ξενοβιοτικών ουσιών είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία που εξαρτάται από βιοτικές και αβιοτικές μεταβλητές.

Για την αποτοξικοποίηση μιας ξενοβιοτικής ουσίας από μικροφύκη, υιοθετούνται διαφορετικές στρατηγικές ανάλογα με την τοξικότητα της ουσίας και το ενεργειακό ισοζύγιο του χλωροφύκους. Αυτό το ενεργειακό ισοζύγιο καθορίζεται από πληθώρα βιοτικών και αβιοτικών παραμέτρων. Όσον αφορά τις φαινολικές ενώσεις, 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, καθορίζουν τις ενεργειακές απαιτήσεις για τη βιοδιάσπασή τους, ενώ η εξωγενής πηγή του άνθρακα (ανόργανου ή/και οργανικού) και η ένταση της φωτονιακής ακτινοβολίας είναι οι σημαντικότεροι από τους παράγοντες που ελέγχουν (μέσω της φωτοσυνθετικής και της αναπνευστικής διαδικασίας) τα ενεργειακά αποθέματα του χλωροφύκους που θα επενδυθούν για τη βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων διαφορετικής τοξικότητας και δυσκολίας βιοδιάσπασης [Pinto et al.,2002; Papazi and Kotzabasis, 2007; Papazi and Kotzabasis, 2008; Papazi et al., 2012; Papazi and Kotzabasis, 2013]. Σημαντικό ρόλο παίζουν επίσης η θερμοκρασία [Margesin et al.,2005], το pH [Graham et al., 2004],η διαθεσιμότητα και περιεκτικότητα σε οξυγόνο [Meloa et al., 2005], και η αρχική συγκέντρωση κυττάρων στην καλλιέργεια [Jiang et al., 2012].

Παραγωγή υδρογόνου από χλωροφύκη μέσω του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε ανοξικές συνθήκες

Τα χλωροφύκη, όπως και οι υπόλοιποι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί, έχουν τη δυνατότητα να παράγουν αέριο υδρογόνο σε ανοξικές συνθήκες [Gaffron and Rubin, 1942]. Στην φωτοσύνθεση, η φωτονιακή ενέργεια συλλέγεται από τις χλωροφύλλες των φωτοσυνθετικών κεραιών με αποτέλεσμα το διαχωρισμό φορτίου στο φωτοσύστημα II (PS II) και την φωτοσυνθετική απελευθέρωση οξυγόνου από τη φωτόλυση του νερού. Τα

ηλεκτρόνια μεταφέρονται μέσω της φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στην πλαστοκινόνη, το κυτόχρωμα b6f, την πλαστοκυανίνη, το PS I και τη φερρεδοξίνη. Η ανηγμένη φερρεδοξίνη χρησιμοποιείται για τη μετατροπή του $NADP^+$ σε NADPH, χάρη στη Fe^-NADP^+αναγωγάση (Εικόνα 4). Έπειτα η NADPH χρησιμοποιείται στον κύκλο του Calvin για την παραγωγή υδατανθράκων. Όμως, κάτω από αναερόβιες συνθήκες τα κύτταρα ενεργοποιούν μια Fe-υδρογενάση [Happe and Naber, 1993], που καταλύει την αντίστροφη αναγωγή των πρωτονίων σε μοριακό υδρογόνο (H_2). Στα χλωροφύκη, η υδρογενάση εδράζεται στο χλωροπλάστη και λαμβάνει ηλεκτρόνια κατευθείαν από την ανηγμένη φερρεδοξίνη για τη παραγωγή υδρογόνου [Florin et al., 2001]. Επειδή η υδρογενάση παρεμποδίζεται ισχυρά από την παρουσία του οξυγόνου, η παραγωγή υδρογόνου συντηρείται μόνο σε ανοξία [Benemann et al., 1973].



Εικόνα 4. *Κυκλική και μη κυκλική φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων.*

Η παραγωγή υδρογόνου από χλωροφύκη παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τον Hans Gaffron και τους συνεργάτες τους [Gaffron and Rubin 1942], στο μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus.* Σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου εκφράζεται το γονίδιο μιας υδρογενάσης, η οποία καταλύει την φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου. Τα ηλεκτρόνια προέρχονται είτε από την οξείδωση του νερού από το PS II, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την ταυτόχρονη απελευθέρωση μοριακού οξυγόνου, είτε από τον καταβολισμό ενδογενών υποστρωμάτων με την ταυτόχρονη παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα [Melis and Happe 2001].

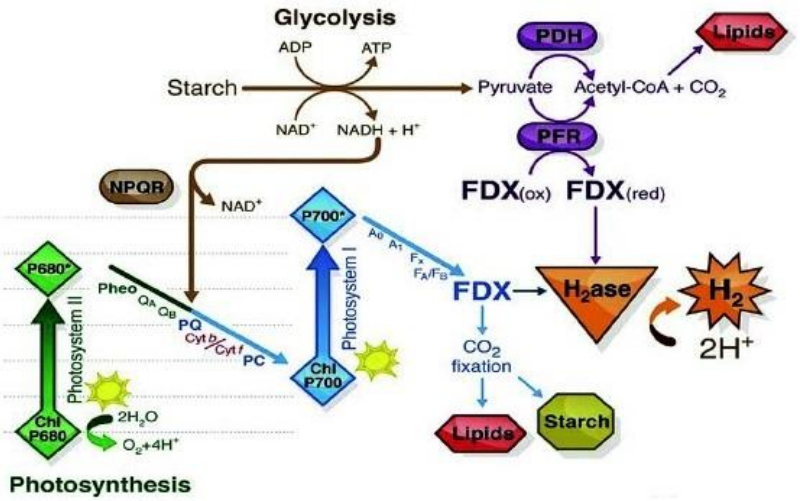
Η φωτοσυνθετική παραγωγή του υδρογόνου μπορεί να είναι το αποτέλεσμα τριών διαφορετικών μονοπατιών αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων: 1) το εξαρτώμενο από το PS II που εμπλέκει τη φωτόλυση του νερού ως τη μοναδική πηγή ηλεκτρονίων για το PS I, τη φερρεδοξίνη και τη Fe-υδρογενάση, 2) το ανεξάρτητο του PS II που χρησιμοποιεί τον καταβολισμό των ενδογενών οργανικών υποστρωμάτων ως αναγωγική πηγή ενέργειας μεταφέροντας ηλεκτρόνια στη δεξαμενή της πλαστοκινόνης παρακάμπτοντας το PSII [Melis and Happe, 2001] και 3) το φωτοανεξάρτητο μονοπάτι όπου στην παραγωγή υδρογόνου δεν εμπλέκετε ούτε το PSII ούτε το PSI (dark fermentation, Εικόνα 5).

PSII εξαρτώμενο μονοπάτι: Το PSII καταλύει την φωτόλυση του νερού από την οποία παράγεται μοριακό οξυγόνο και ηλεκτρόνια, τα οποία μεταφέρονται μέσω της φωτοσυνθετικής γραμμικής ροής ηλεκτρονίων στην φερρεδοξίνη. Η φερρεδοξίνη μπορεί να μεταβιβάσει τα ηλεκτρόνια είτε στην οξειδωαναγωγάση φερρεδοξίνης (FNR), η οποία ανάγει το NADP+ σε NADPH, είτε (σε ανοξικές συνθήκες) στην υδρογενάση, η οποία χρησιμοποιώντας τα ηλεκτρόνια αυτά και πρωτόνια μπορεί να συνθέσει μοριακό υδρογόνο [Florin et al. 2001].

PSII ανεξάρτητο μονοπάτι: Η ροή ηλεκτρονίων προέρχεται από τον καταβολισμό ενδογενών οργανικών υποστρωμάτων (π.χ. άμυλο) σε συνθήκες φωτισμού. Ηλεκτρόνια από αυτή τη διαδικασία εισέρχονται στην φωτοσυνθετική ροή στο σημείο της δεξαμενής της πλαστοκινόνης (PQ) μέσω μιας διαμεμβρανικής αναγωγάσης του NAD(P)H. Ακολουθούν έπειτα την φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και καταλήγουν στην φερρεδοξίνη μέσω του PSI. Η ανηγμένη φερρεδοξίνη μπορεί έπειτα να χρησιμοποιηθεί από την υδρογενάση για τη σύνθεση μοριακού υδρογόνου. Σε αυτήν την περίπτωση το PSII παραλείπεται όμως επειδή και πάλι η όλη διαδικασία λαμβάνει χώρα στο φως, οξυγόνο εξακολουθεί να παράγεται από το PSII ως παραπροϊόν και η δράση της υδρογενάσης αναστέλλεται. Ο μόνος τρόπος να παρακαμφθεί η ανασταλτική δράση του οξυγόνου είναι αυτό να καταναλώνεται γρήγορα μέσω της αναπνευστικής διαδικασίας. Ο καταβολισμός οργανικών υποστρωμάτων εξασφαλίζει ηλεκτρόνια για τη φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο επίπεδο της πλαστοκινόνης, κυρίως από το μονοπάτι της χλωροαναπνοής [Hemschemeier et al., 2009]. Μια NAD(P)H οξειδοαναγωγάση της πλαστοκινόνης είναι υπεύθυνη για την παροχή ηλεκτρονίων από δότες ηλεκτρονίων που βρίσκονται στο στρώμα του χλωροπλάστη προς τη δεξαμενή της πλαστοκινόνης. Και στα δύο αυτά μονοπάτια (PS II εξαρτώμενο και PS II ανεξάρτητο), η απελευθέρωση αερίου υδρογόνου θα μπορούσε να συνεισφέρει στο να διατηρηθεί η φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων μερικά οξειδωμένη υπό συνθήκες ανοξίας και επομένως να

διατηρηθεί η ελάχιστη δυνατή δραστηριότητα χλωροπλαστικής και μιτοχονδριακής μεταφοράς ηλεκτρονίων για τη δημιουργία του ATP που απαιτείται για την επιβίωση του μικροοργανισμού [Melis and Happe, 2001]. Θεωρητικά το PSII-εξαρτώμενο μονοπάτι είναι το πιο αποδοτικό όσον αφορά την σύνθεση υδρογόνου (παράγεται H_2 και O_2 σε αναλογία 2:1), όμως επειδή το οξυγόνο είναι ισχυρός αναστολέας των [Fe-Fe] υδρογενασών, η παραγωγή υδρογόνου σταματά όταν τα επίπεδα οξυγόνου είναι υψηλά.

Φωτοανεξάρτητη ζύμωση: Σε αναερόβιες συνθήκες και έλλειψη φωτός αποθηκευμένοι πολυσακχαρίτες μεταβολίζονται για να παραχθεί το απαραίτητο ATP. Παράλληλα παράγεται NADH το οποίο πρέπει να επανοξειδωθεί ώστε να ανακυκλωθεί. Τα τελικά προϊόντα της ζύμωσης στα χλωροφύκη διαφέρουν μεταξύ των διαφορετικών ειδών και μπορεί να περιλαμβάνουν αιθανόλη, φορμικό οξύ, γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, γλυκερόλη, διοξείδιο του άνθρακα και μοριακό υδρογόνο [Catalanotti et al. 2013]. Οι πληροφορίες που υπάρχουν σχετικά με την φωτοανεξάρητη ζύμωση στα χλωροφύκη προέρχονται κυρίως από το γένος *Chlamydomonas.* Στο *Chlamydomonas* το πυροσταφυλικό που προκύπτει από τον καταβολισμό ενδογενών υποστρωμάτων μπορεί να μεταβολιστεί σε ακέτυλο-συνένζυμο Α είτε από το ένζυμο pyruvate: formatelyase (PFL) με την ταυτόχρονη παραγωγή φορμικού οξέος, είτε από το ένζυμο pyruvate: ferredoxinoxidoreductase (PFOR) με την ταυτόχρονη παραγωγή ακέτυλου-συνενζύμου Α και διοξειδίου του άνθρακα και τη μεταφορά ηλεκτρονίων στη φερρεδοξίνη [Catalanotti et al. 2013]. Η ανηγμένη φερρεδοξίνη, σε ανοξικές συνθήκες, μπορεί να δώσει τα ηλεκτρόνια στην υδρογενάση για την παραγωγή μοριακού υδρογόνου [Catalanotti et al. 2013].



Εικόνα 5. *PSII- εξαρτώμενο, PSII- ανεξάρτητο και φωτοανεξάρτητο μονοπάτι για την παραγωγή H_2.*

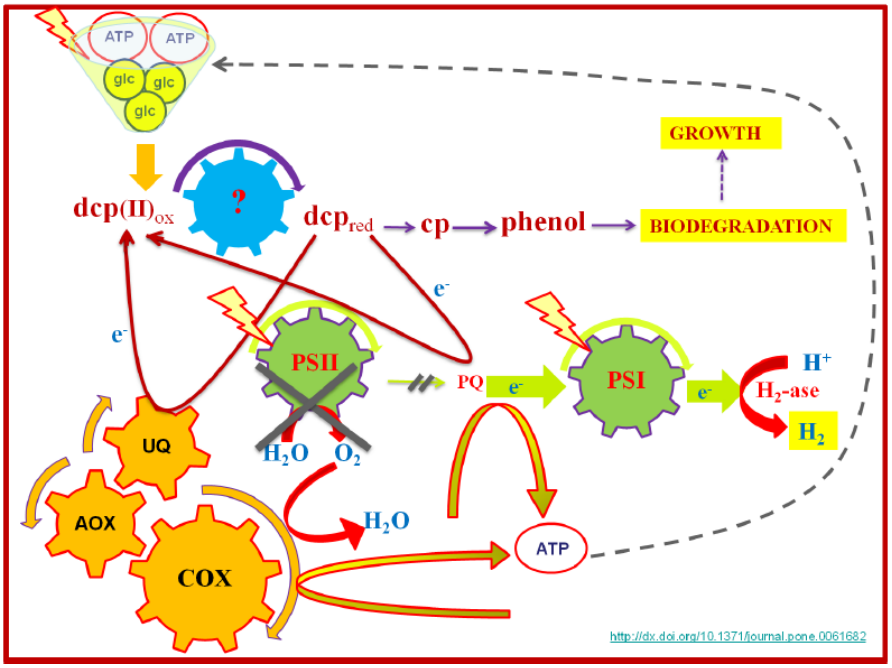
Βιοαποικοδόμηση *meta*υποκατεστημένων διχλωροφαινολών από το χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* και παραγωγή υδρογόνου

Η χρήση βακτηρίων στη βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων ήταν μονόδρομος μέχρι πριν από λίγα χρόνια. Η ιδέα για την χρησιμοποίηση των μικροφυκών σε διαδικασίες βιοαποικοδόμησης ενώ προτάθηκε το 1957 από τους Oswald and Gotaas, απέκτησε ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια [Papazi and Kotzabasis, 2007; 2008]. Η **βιοαποικοδόμηση τοξικών ενώσεων από μικροφύκη** σε αντίθεση με τα βακτήρια και τους μύκητες προσδίδει ένα εξαιρετικό πλεονέκτημα όσο αφορά τη διαδικασία της βιοαποικοδόμησης, που είναι η ικανότητά τους να φωτοσυνθέσεων χρησιμοποιώντας έτσι την απεριόριστη φωτονιακή ακτινοβολία ως πηγή ενέργειας. Την ίδια ικανότητα έχουν και τα φυτά. Όμως σε αντίθεση με αυτά, τα φύκη εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στις αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, αναπτύσσονται γρηγορότερα, είναι πολύ μικρότερα και είναι ευκολότερα στο χειρισμό τους. Τα φύκη έχουν επιδείξει σημαντικά πλεονεκτήματα στο ερευνητικό πεδίο της βιοαποικοδόμησης, λόγω του γεγονότος ότι χρησιμοποιούν φτηνή και άφθονη πηγή ενέργειας (ηλιακή ακτινοβολία) που μπορούν να την επενδύσουν στη βιοαποικοδόμηση.

Οι *meta*υποκατεστημένες διχλωροφαινόλες εισέρχονται στο κύτταρο και ξεκινάει η βιοαποικοδόμηση τους, επηρεάζοντας την φωτοσυνθετική και αναπνευστική δραστηριό τητα. Αναλυτικά σύμφωνα με το μοντέλο που προτείνουν οι Papazi et al. (2012,2014) φαίνεται πως το πρώτο βήμα της βιοαποικοδόμησής τους είναι η αναγωγή τους. Οι ανηγμένες dcps λόγω του οξειδοαναγωγικού τους δυναμικού μπορούν να δώσουν τα ηλεκτρόνια τους και στη φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, πιθανότατα στη δεξαμενή της πλαστοκινόνης (PQ), μπλοκάροντας ταυτόχρονα το ενεργό κέντρο του PS II (οπότε και την παραγωγή O_2). Κάτω από αυτές τις συνθήκες μέσα σε ένα κλειστό σύστημα έχουμε: (1) μία γρήγορη εγκαθίδρυση ανοξικών συνθηκών και ενεργοποίηση της υδρογενάσης, (2) μία πολύ αυξημένη ροή ηλεκτρονίων μέσω του PS I που καταλήγουν στην υδρογενάση και στην παραγωγή H_2, (3) λόγω αυτής της ιδιότυπης φωτοσυνθετικής ροής ηλεκτρονίων αλλά και της ενεργοποίησης της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, έχουμε αύξηση παραγωγής ενέργειας (ATP) που επενδύεται για το μονοπάτι της βιοαποικοδόμησης των *meta*-υποκατεστημένων dcps (Εικόνα 6).

Οι δύο αυτοί μηχανισμοί (βιοαποικοδόμηση *meta*-υποκατεστημένων διχλωροφαινολών και φωτοσυνθετική παραγωγή H_2) δρουν συνεργιστικά και ανοίγουν ένα νέο δρόμο συνδυασμού βιοχημικών μονοπατιών *in*

vivo στα πλαίσια μίας έξυπνης βιοτεχνολογικής προσέγγισης. Μέσα σε αυτά τα πλαίσια έχουμε συνεχή φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου από μικροφύκη, που ως «καύσιμο» χρησιμοποιεί τη βιοαποικοδόμηση τοξικών διχλωροφαινολών και την ηλιακή ακτινοβολία [Papazi et al.2012, 2014].



Εικόνα 6. *Συνδυασμός κεντρικών βιοχημικών μονοπατιών όπου έχουμε βιοαποικοδόμηση meta-υποκατεστημένων διχλωροφαινόλων (dcps) από το χλωροφύκος Scenedesmus obliquus και συνεχή φωτοσυνθετική παραγωγή H_2 από χλωροφύκη [Papazi and Kotzabasis 2013].*

Η δυνατότητα των διχλωροφαινολών να έλκουν ηλεκτρόνια και να ανάγονται κα τά την διαδικασία της βιοαποικοδόμησης τους, καθώς επίσης και η πιθανή συμμετοχή τους ως δότες ηλεκτρονίων στην φωτοσυνθετική αλυσίδα, αποδείχθηκε πειραματικά με αναστολείς,τεχνητούς δότες και δέκτες της φωτοσυνθετικής αλυσίδας [Papazi and Kotzabasis, 2007].Οι δύο αυτοί μηχανισμοί δρουν συνεργιστικά και αρχίζουν με τη βιοαποικοδόμηση μέρους της φαινολικής ένωσης, έπεται η έναρξη της παραγωγής υδρογόνου. Με αυτό τον τρόπο το χλωροφύκος παράγει 100 φορές περισσότερο H_2 από ότι με την κλασική ανοξία (χωρίς προσθήκη dcp).

Σκοπός

Σε συνέχεια προηγούμενων πειραματικών σειρών που αφορούσαν την εξακρίβωση της στρατηγικής βιοαποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων από μικροφύκη [Papazi and Kotzabasis,2007;Papazi and Kotzabasis,2008;Papazi et al.,2012;Papazi and Kotzabasis, 2013], και δεδομένου ότι η αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων από το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* μπορεί να συνδυαστεί με παραγωγή αέριου υδρογόνου (H_2) [Papazi et al., 2012],η παρούσα εργασία επιχειρεί να διερευνήσει ποιες είναι εκείνες οι συνθήκες που επιτρέπουν στο μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* την καλύτερη δυνατή αποικοδόμηση του συνόλου των φαινολικών ενώσεων στον κατσίγαρο και κατά συνέπεια την αποτοξικοποίησή του σε συνδυασμό με την παραγωγή μεγάλης ποσότητας μοριακού υδρογόνου χρησιμοποιώντας ως «καύσιμο» το φαινολικό φορτίο του κατσίγαρου. Επίσης η παρούσα εργασία θα επιχειρήσει να προτείνει ένα μοντέλο διαχείρισης του κατσίγαρου που να συνδυάζει τη βιοαποικοδόμηση του ολικού φαινολικού φορτίου του κατσίγαρου (αποτοξικοποίηση κατσίγαρου) με τη συνεχή παραγωγή εναλλακτικής μορφής ενέργειας όπως το μοριακό υδρογόνο (H_2) .

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οργανισμός

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus*. Είναι ένας μονοκύτταρος ευκαρυωτικός οργανισμός μήκους περίπου 5-10 μm με ελλειψοειδή μορφή κυττάρων (Εικόνα 7). Ο κύκλος ζωής του διαρκεί γύρω στις 20 ώρες. Στη διάρκεια αυτή, διαιρείται μια φορά δίνοντας 4-8 θυγατρικά κύτταρα, τα οποία μόλις σχηματιστούν πλήρως, συνήθως αποκόπτονται μεταξύ τους. Εξελικτικά βρίσκεται πολύ κοντά στα άλλα δυο γνωστά στο ερευνητικό πεδίο φύκη, τη Χλαμυδομονάδα (*Chlamydomonas*) και τη Χλωρέλλα (*Chlorella*).

Φυλογενετική ταξινόμηση:

Βασίλειο: Φυτά

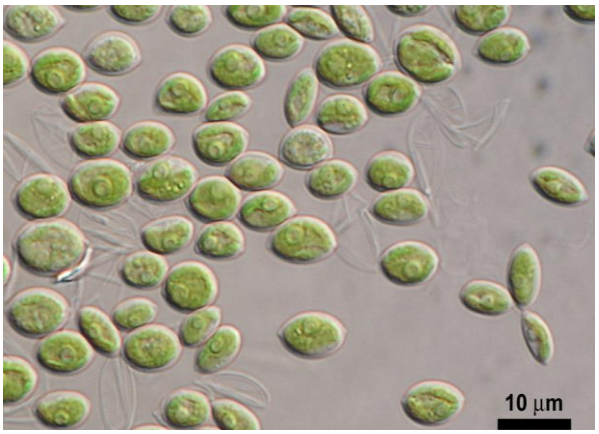
Διαίρεση: Χλωρόφυτα

Κλάση: Χλωροφύκη

Τάξη: Chlorococcales

Γένος: *Scenedesmus*

Είδος: Scenedesmus obliquus



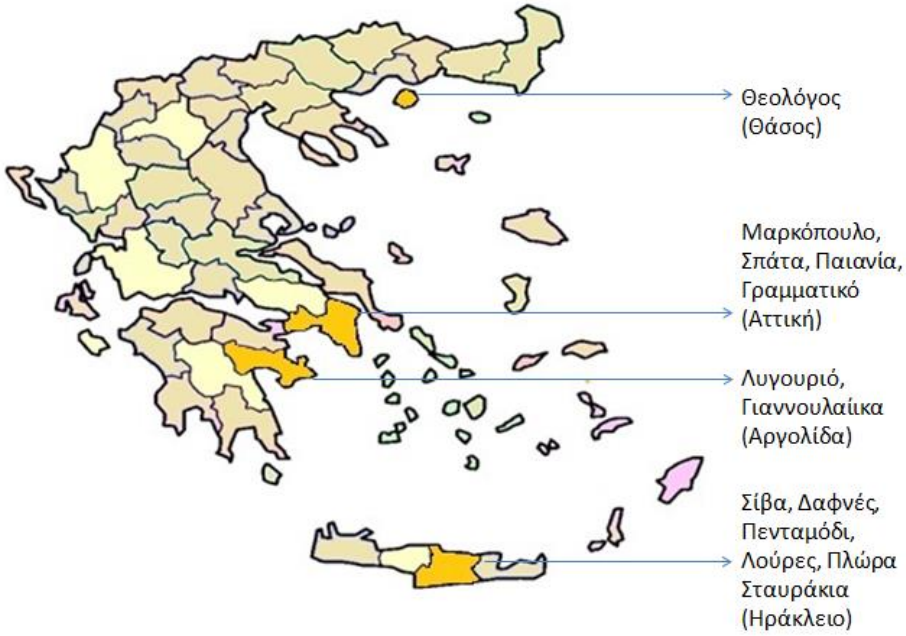
Εικόνα 7. *Το μονοκύτταρο χλωροφύκος Scenedesmus obliquus.*

Πρόκειται για φωτοσυνθετικό μικροοργανισμό, που παράγει οξυγόνο κατά τη φωτοσύνθεσή του. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά της φωτοσυνθετικής του δραστηριότητας μοιάζει με τα γυμνόσπερμα φυτά. Έχει την ικανότητα βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης και στο σκοτάδι, όπως και στο φως. Δηλαδή, ακόμα και σε ετερότροφες συνθήκες έχει διαμορφωμένους χλωροπλάστες και ενεργά φωτοσυστήματα I και II, εφ' όσον του παρέχεται κάποια πηγή οργανικού άνθρακα στο θρεπτικό μέσο.

Περιοχή δειγματοληψίας κατσίγαρου

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε από 14 ελαιοτριβεία (Κρήτη, Αττική, Πελοπόννησο και Βόρειο Αιγαίο). Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν δείγματα κατσίγαρου από τη Σίβα, το Πενταμόδι, τις Δαφνές την Πλώρα τις Λούρες και τα Σταυράκια του Ηρακλείου, το Λυγουριό

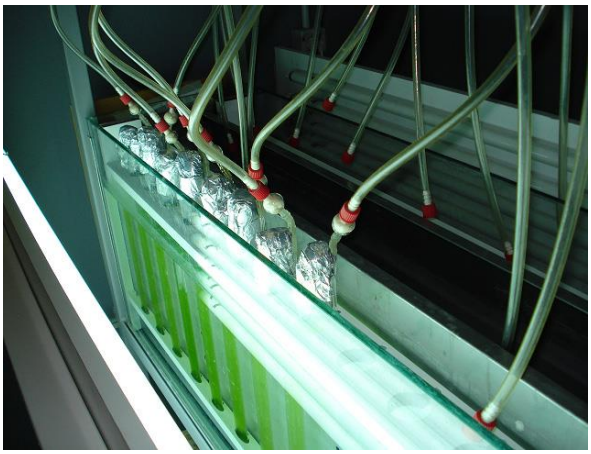
και τα Γιαννουλαίικα της Αργολίδας, το Θεολόγο της Θάσου, το Μαρκόπουλο, τη Παιανία, τα Σπάτα και το Γραμματικό της Αττικής (Εικόνα 8).Η διατήρηση των δειγμάτων μέχρι τη διεξαγωγή των πειραμάτων έγινε σε θερμοκρασία 4°C. Για λόγους ανωνυμίας τα διάφορα ελαιοτριβεία από εδώ και έπειτα θα αναφέρονται με γράμματα του ελληνικού αλφαβήτου. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα με μεμονωμένα δείγματα από κάθε ελαιοτριβείο αλλά και με μίγμα αυτών.



Εικόνα 8. *Περιοχή δειγματοληψίας: ελαιουργεία στο Μαρκόπουλο, τη Παιανία, τα Σπάτα και το Γραμματικό (δύο διαφορετικά ελαιουργία) της Αττικής, τη Σίβα, το Πενταμόδι, τις Δαφνές, την Πλώρα, τις Λούρες και τα Σταυράκια του Ηρακλείου, το Λυγουριό και τα Γιαννουλαίικα της Αργολίδας, και το Θεολόγο της Θάσου.*

Συνθήκες ανάπτυξης

Οι καλλιέργειες του χλωροφύκους αναπτύχθηκαν σε ενυδρείο σταθερής θερμοκρασίας 30°C, μπροστά από λάμπες λευκού φωτισμού ρυθμιζόμενης έντασης (Εικόνα 9). Η ανάπτυξη των οργανισμών έγινε σε επιμήκεις γυάλινους σωλήνες (διαμέτρου 5cm και ύψους 50cm) με ειδικό στόμιο στο κάτω μέρος του σωλήνα, που επιτρέπει τον



Εικόνα 9. *Σύστημα προκαλλιέργειας του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus.*

αερισμό της καλλιέργειας. Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των οργανισμών ήταν το Bishop and Senger, 1971 (Πίνακας 3) . Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε αυτές τις συνθήκες για 4 μέρες, έπειτα χρησιμοποιήθηκαν ως μητρική καλλιέργεια για τη διεξαγωγή του εκάστοτε πειράματος.

***Πίνακας 3**. Συστατικά του μέσου καλλιέργειας του Scenedesmus obliquus [Bishop and Sender, 1971].*

Συστατικά	*Περιεκτικότητα (σε g/L)*
KCl	0,6
CaCl2 x 2H2O	0,015
KNO3	0,81
MgSO4 x7H2O	0,25
NaCl	0,47
$Na_2HPO_4x2H_2O$	0,14
$NaH_2PO_4x1H_2O$	0,26
$Fe_2(SO_4)3x7H_2O$	3,9
Fe(III)citrate	0,24
H_3BO_3	2,8
$MnCl_2x4H_2O$	0,0016
$ZnSO_4x7H_2O$	0,2
$CuSO_4x5H_2O$	0,075
$MoO_3(85\%-99.5\%)$	0,014

Εκτίμηση Κυτταρικού Όγκου

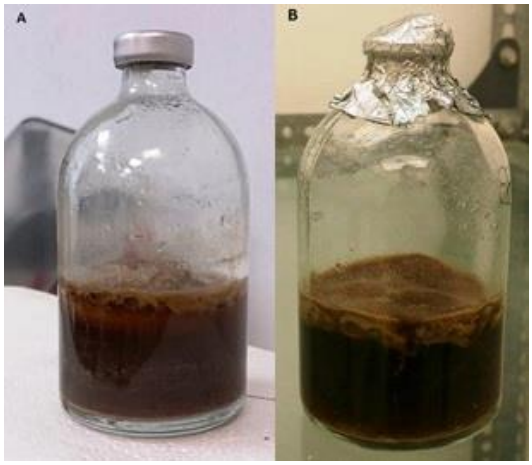
Δείγματα των 200μL από τις καλλιέργειες των φυκών φυγοκεντρήθηκαν σε βαθμονομημένο τριχοειδή υαλοσωλήνα για 5 λεπτά στα 1500g, προκειμένου να καθιζήσουν (Εικόνα 10) [Logothetis et al., 2004]. Η εκτίμηση της κυτταρικής συγκέντρωσης, παρουσιάζεται ως όγκος καθιζάμενων κυττάρων

***Εικόνα 10.** Διαβαθμισμένοι σωλήνες PCV.*

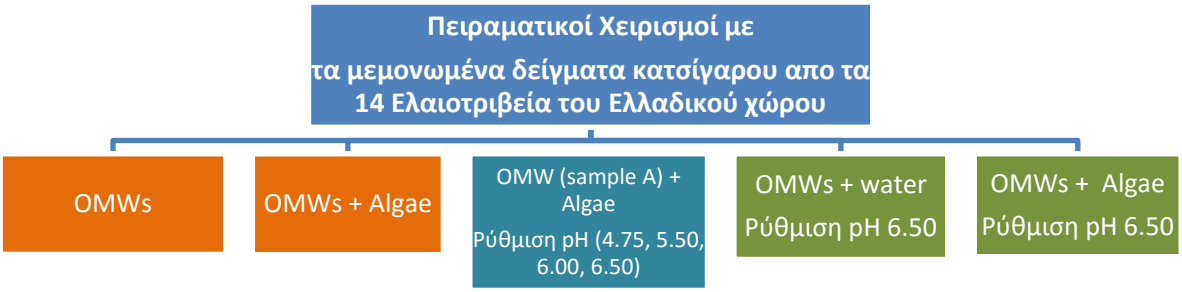
(Packed Cell Volume; PCV) ανά mL καλλιέργειας (μLPCV/mL καλλιέργειας) [Senger and Brinkmann, 1986].

Διαφορετικοί χειρισμοί - Συνθήκες επώασης

Τα πειράματα έλαβαν χώρα σε μπουκαλάκια (serum bottles) των 125mL, τα οποία ανάλογα με τους χειρισμούς (κλειστό ή ανοιχτό σύστημα) ήταν είτε ερμητικά κλειστά με septa (Εικόνα 11.A) είτε ανοιχτά («κλειστά» με αποστειρωμένη γάζα) (Εικόνα 11.B). Ανάλογα με τον κάθε χειρισμό τα μπουκαλάκια περιείχαν είτε κατσίγαρο (Olive Mill Wastewater, OMW), είτε υδατικό διάλυμα κατσίγαρου (1:1 v/v) (OMW + water), είτε καλλιέργεια κυττάρων *Scenedesmus obliquus* σε θρεπτικό (χωρίς προσθήκη γλυκόζης) με κατσίγαρο (1:1 v/v)(OMW+Algae). Η ρύθμιση του pH, όπου κρίθηκε απαραίτητη έγινε με προσθήκη πυκνού υδατικού διαλύματος KOH. Η πυκνότητα των κυττάρων του *Scenedesmus obliquus* στο κάθε μπουκαλάκι στον αντίστοιχο χειρισμό είναι 2,5 – 5 μL PCV/mL. Ο τελικός όγκος στο κάθε μπουκάλι ήταν 50mL ενώ ο υπόλοιπος όγκος αποτελούνταν από αέρα. Τα μπουκαλάκια επωάστηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (30°C),ενώ η ένταση του φωτός στο θάλαμο ήταν 50-60μmolm^{-2}s^{-1}. Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα ροής των πειραμάτων με τη σειρά που πραγματοποιήθηκαν (Εικόνες 12,13 και 14).

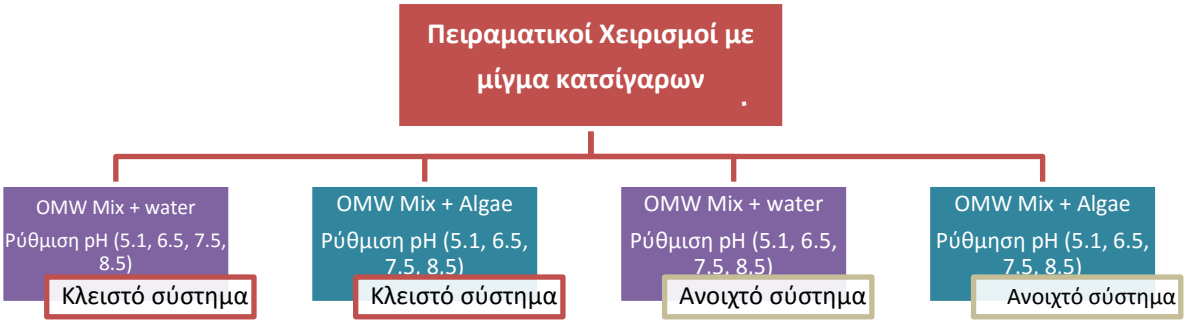


Εικόνα 11. *Μπουκαλάκι (serumbottle) των 125 mL σε κλειστό σύστημα (A) και σε ανοιχτό (B).*

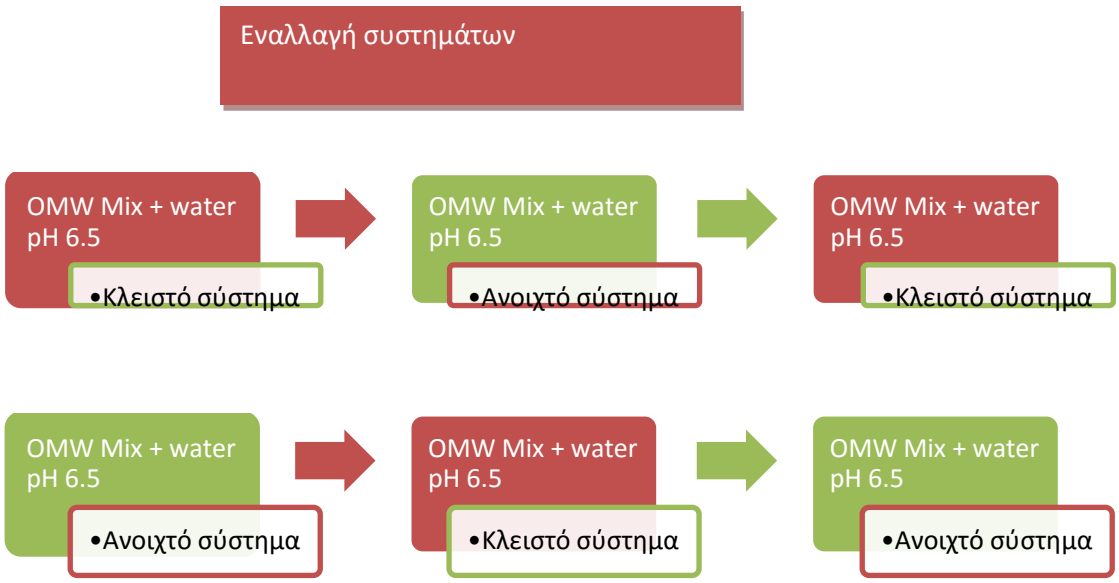


Εικόνα 12. *Πειραματικοί χειρισμοί με μεμονωμένα δείγματα κατσίγαρου από τα 14 ελαιοτριβεία του Ελλαδικού χώρου σε κλειστό σύστημα: με κατσίγαρο (OMWs), με διάλυμα κυττάρων Scenedesmus obliquus σε θρεπτικό (χωρίς προσθήκη γλυκόζης) με κατσίγαρο (1:1 v/v) (OMWs + Algae), με διάλυμα κυττάρων Scenedesmus obliquus σε θρεπτικό (χωρίς προσθήκη γλυκόζης) με κατσίγαρο (δείγμα A) (1:1 v/v) (OMW sample A + Algae) σε διάφορα pH (4.75, 5.50, 6.00, 6.50), με υδατικό διάλυμα κατσίγαρου (1:1 v/v) (OMWs + water) σε pH 6.50 και με διάλυμα κυττάρων Scenedesmus obliquus σε θρεπτικό (χωρίς προσθήκη γλυκόζης) με κατσίγαρο (1:1 v/v)(OMWs + Algae) με pH 6.50.*

Στην πρώτη σειρά πειραμάτων (Εικόνα 12) πραγματοποιήθηκε μέτρηση του ολικού φαινολικού φορτίου την πέμπτη ημέρα επώασης. Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων (Εικόνα 13) πραγματοποιήθηκε μέτρηση του ολικού φαινολικού φορτίου την πρώτη, τρίτη, πέμπτη και έβδομη ημέρα επώασης.



Εικόνα 13. *Πειραματικοί χειρισμοί με μίγμα κατσίγαρου από τα 14 ελαιοτριβεία του Ελλαδικού χώρου: με υδατικό διάλυμα κατσίγαρου (1:1 v/v) (OMW Mix + water) και με διάλυμα κυττάρων Scenedesmus obliquus σε θρεπτικό (χωρίς προσθήκη γλυκόζης) με κατσίγαρο (1:1 v/v) (OMW Mix + Algae) σε διάφορα pH (5.1, 6.5, 7.5, 8,5) σε κλειστό και ανοιχτό σύστημα.*



Εικόνα 14. *Πειραματικοί χειρισμοί με μίγμα κατσίγαρου από τα 14 ελαιοτριβεία του Ελλαδικού χώρου: με υδατικό διάλυμα κατσίγαρου (1:1 v/v) (OMW Mix + water) pH 6.5 και εναλλαγή των συστημάτων από Κλειστό σε Ανοιχτό και πάλι Κλειστό και από Ανοιχτό σε Κλειστό και πάλι σε Ανοιχτό.*

Στην τρίτη σειρά πειραμάτων (Εικόνα 14) πραγματοποιήθηκε μέτρηση του ολικού φαινολικού φορτίου ανά τακτά διαστήματα κατά την εναλλαγή των συστημάτων. Καθ' όλη

τη διάρκεια της επώασης και στις τρείς σειρές πειραμάτων πραγματοποιείτο ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του αερίου όγκου των κλειστών συστημάτων χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας.

Απομόνωση ολικού φαινολικού φορτίου

Για την απομόνωση του ολικού φαινολικού φορτίου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος όπως περιγράφεται από τους De Marco et al. (2007) με κάποιες τροποποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε ανάμειξη 20 mL δείγματος κατσίγαρου με 20 mL ethylacetate. Μετά από μία σύντομη ζωηρή ανάδευση με δίνη (vortex) ακολούθησε ανάδευση στο shaker διάρκειας 10 λεπτών και στη συνέχεια φυγοκέντριση στα 1500 g διάρκειας 10 λεπτών. Στη συνέχεια έγινε συλλογή του υπερκειμένου. Με το ίζημα η διαδικασία επαναλήφθηκε δύο φορές ακόμη. Τα υπερκείμενα από τις τρείς επαναλήψεις υποβλήθηκαν σε εξάτμιση σε ειδικό εξατμιστήρα BUCHI (Εικόνα 15) υπό κενό στους 60°C. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επαναδιάλυση του ολικού φαινολικού φορτίου που έχει μείνει στη σφαιρική φιάλη του εξατμιστήρα σε 3 mL αποσταγμένο νερό (dH_2O)και το διάλυμα τοποθετήθηκε στη κατάψυξη (-20°C) μέχρι τη διαδικασία της ποσοτικοποίησης του ολικού φαινολικού φορτίου.

Εικόνα 15*.Εξατμιστήρας BUCHI (Vacuum controller V-830, Rotavapor R-215, Vacuum pump V700).*

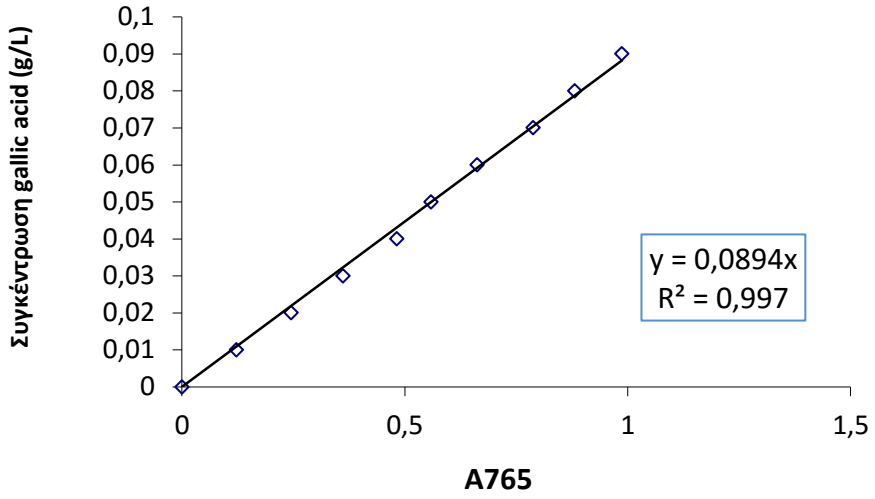
Ποσοτική ανάλυση ολικών φαινολικών ενώσεων

Για την ποσοτικοποίηση των ολικών φαινολικών ενώσεων στα ληφθέντα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος των Singleton and Rossi, 1965. Συνοπτικά, η μέθοδος περιλαμβάνει την ανάμειξη 500μL αντιδραστηρίου Folin – Ciocalteu (F-C 0.2N) με 100μLαπεσταγμένο νερό (dH_2O) και 100μL δείγματος (στο μάρτυρα το δείγμα αντικαταστάθηκε από 100μL dH_2O), 5 λεπτά επώαση στο σκοτάδι, και τέλος επώαση μίας επιπλέον ώρας στο σκοτάδι μετά την προσθήκη 400μLανθρακικού νατρίου

Εικόνα 16*. Φασματοφωτόμετρο UV/VIS (PERKIN ELMERlambda 20).*

(Na_2CO_3)(75 g/L). Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 765 nm σε φασματοφωτόμετρο PERKINELMERlambda20 (Εικόνα 16).

Για την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε καμπύλη αναφοράς με gallic acid, για την αναγωγή των φαινολικών ενώσεων σε γραμμάρια gallic acid ανά λίτρο (gGAE /L), με εξίσωση y = 0,0894 x , όπου X είναι η απορρόφηση στα 765 nm και y η συγκέντρωση του gallic acid σε g/L (Εικόνα 17) [Leouifoudi et al., 2014].



Εικόνα 17. Καμπύλη αναφοράς για την αναγωγή των τιμών απορρόφησης φαινολικών ενώσεων σε αντίστοιχες τιμές gallic acid (g/L).

Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση υδρογόνου (H_2) και οξυγόνου (O_2) 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 18), με φέρον αέριο Αργό (5bar Πίεση - 23.5 mL min^{-1}). 200μL αέριου δείγματος εγχεόταν χειροκίνητα στην GC-TCD (μη αυτόματες εγχύσεις), όπου και ο διαχωρισμός του H_2 και του O_2 γινόταν με βάση τη θερμική αγωγιμότητα των αερίων. Η θερμική αγωγιμότητα του Αργού είναι 0.0001772 Wcm K^{-1}, του Οξυγόνου 0.0002674 Wcm K^{-1} και του Υδρογόνου 0.001815 Wcm K^{-1}. Για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε μια τριχοειδής στήλη μήκους 30 m, διαμέτρου 0,53 mm και πάχους 20 μm (ViciMetronics MC Poulsbo,USA) με

Εικόνα 18. *Αέριος Χρωματογράφος Θερμικής Αγωγιμότητας GC – TCD.*

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 H_2 και του O_2 έγινε χρησιμοποιώντας καμπύλη αναφοράς για γνωστές ποσότητες των αερίων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4) φαίνεται το ολικό φαινολικό φορτίο των δειγμάτων κατσίγαρου από 14 διαφορετικά ελαιοτριβεία του Ελλαδικού χώρου. Οι τιμές του ολικού φαινολικού φορτίου κυμαίνονται από 0,68 g GAE/L έως και 2,22 g GAE/L ενώ παρατηρείται μια σαφή διαφοροποίηση ανάμεσα στα 14 ελαιουργεία.

Πίνακας 4. *Συγκέντρωση ολικού φαινολικού φορτίου των δεκατεσσάρων διαφορετικών ελαιοτριβείων, GAE: gallic acid.*

Ελαιοτριβεία	Ολικό φαινολικό φορτίο [g GAE/L]
Α	1,23 ± 0,06
Β	2,22 ± 0,10
Γ	1,68 ± 0,06
Δ	0,68 ± 0,03
Ε	1,33 ± 0,16
Ζ	2,13 ± 0,19
Η	0,91 ± 0,09
Θ	0,80 ± 0,06
Ι	1,02 ± 0,07
Κ	1,00 ± 0,06
Λ	1,73 ± 0,05
Μ	1,34 ± 0,04
Ν	1,86 ± 0,04
Ξ	2,00 ± 0,05

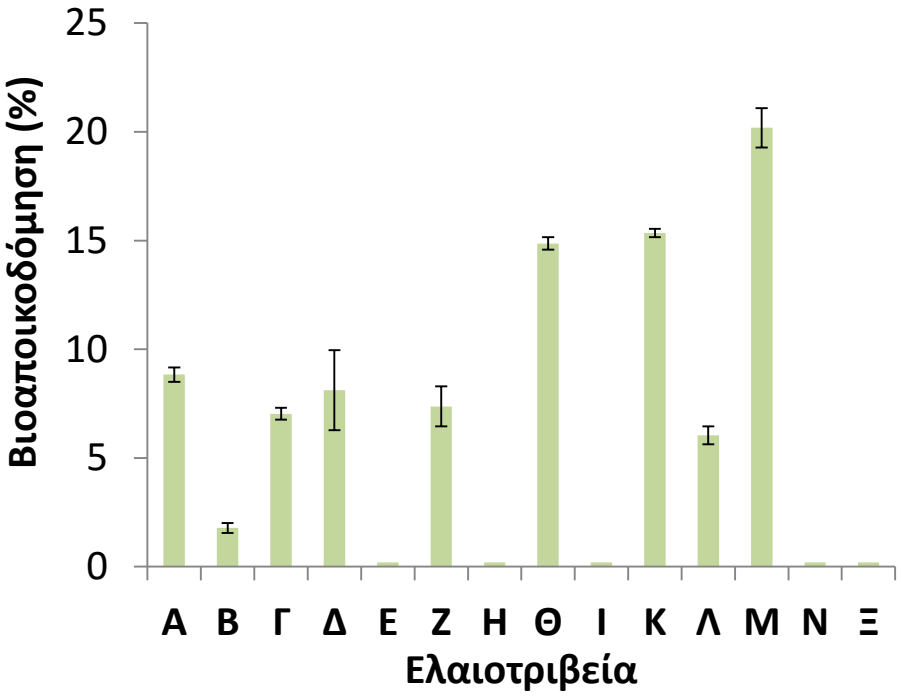
Η διαφοροποίηση αυτή θα μπορούσε να έχει σχέση με πολλούς παράγοντες οι οποίοι μπορεί να σχετίζονται είτε με τη καλλιέργεια τη ελιάς είτε με τον τρόπο απομόνωσης του

ελαιολάδου. Πιο συγκεκριμένα η διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε ενδεχομένως να οφείλεται στους παρακάτω παράγοντες [Κουσερή, 2008]:

- Τον τύπο του ελαιοτριβείου και συγκεκριμένα τον τρόπο διαχωρισμού του λαδιού από την ελαιοζύμη (παραδοσιακή, φυγοκεντρική μέθοδος).
- Την ποικιλία της ελιάς, το στάδιο ωριμότητας της και το χρόνο αποθήκευσης της πριν από την επεξεργασία της.
- Τη χρήση φυτοφαρμάκων και λιπασμάτων ή όχι.
- Την περιοχή καλλιέργειας της ελιάς.
- Τις κλιματολογικές συνθήκες.

Υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές όπου χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί για να βιοαποικοδομήσουν τις φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στον κατσίγαρο. Έχει αναφερθεί ότι ο μύκητας *Coriolopsis rigida* μπορεί να βιοαποικοδομήσει σε ποσοστό μεγαλύτερο από 70% τις φαινολικές ενώσεις (Υδροξυτυροσόλη: 1824 [mg /kg]στερεών αποβλήτων, Τυροσόλη: 682 [mg /kg] στερεών αποβλήτων) που υπάρχουν στον κατσίγαρο σε διάστημα 20 ημερών [Sampedro et al., 2004]. Ανάλογες έρευνες με *Phanerochaete flavido-alba* [Linares et al., 2003] και *Pleurotus ostreatus* [Aggelis et al., 2003] έδωσαν παρόμοιες βιοαποικοδομήσεις, σε μικρότερα όμως χρονικά διαστήματα, των 10 ημερών και 2 εβδομάδων, αντίστοιχα. Ο μικροοργανισμός *Coriolopsis gallica* έχει αναφερθεί ότι βιοαποικοδομεί ποσοστό μεγαλύτερο από 90% του φαινολικού φορτίου (28 μg/mg εκχυλίσματος ΥΑΕ) των υγρών αποβλήτων του κατσίγαρου σε διάστημα 12 ημερών [Daassi et al, 2014], ενώ οι μικροοργανισμοί *Geotrichum sp., Aspergillus sp., Candida tropicalis* σε μικρότερα ποσοστά της τάξης του 50% (8,2g tannic acid/L) [Fadil et al., 2003]. Σύμφωνα με τα παραπάνω έγινε μία προσπάθεια να μελετηθεί πως επιδρούν οι ήδη υπάρχοντες μικροοργανισμοί στον κατσίγαρο (χωρίς την προσθήκη άλλων μικροοργανισμών) στην αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων σε ένα κλειστό σύστημα. Έτσι πραγματοποιήθηκε επώαση συγκεκριμένου όγκου (50mL) από τα 14 διαφορετικά δείγματα κατσίγαρου σε μπουκαλάκια των 125 mL ερμητικά κλειστά με septum σε θερμοκρασία 30° C και σε ένταση φωτός 50 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση του ολικού φαινολικού φορτίου την 5η ημέρα επώασης.

Στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 19) φαίνεται ότι η πλειοψηφία των ελαιοτριβείων κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες εμφανίζει αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων που φτάνει το 20% . Ωστόσο υπάρχουν δείγματα (E,H,I,N και Ξ) που κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες εμφανίζουν ουσιαστικά μηδενικά ποσοστά αποικοδόμησης των φαινολικών ενώσεων.

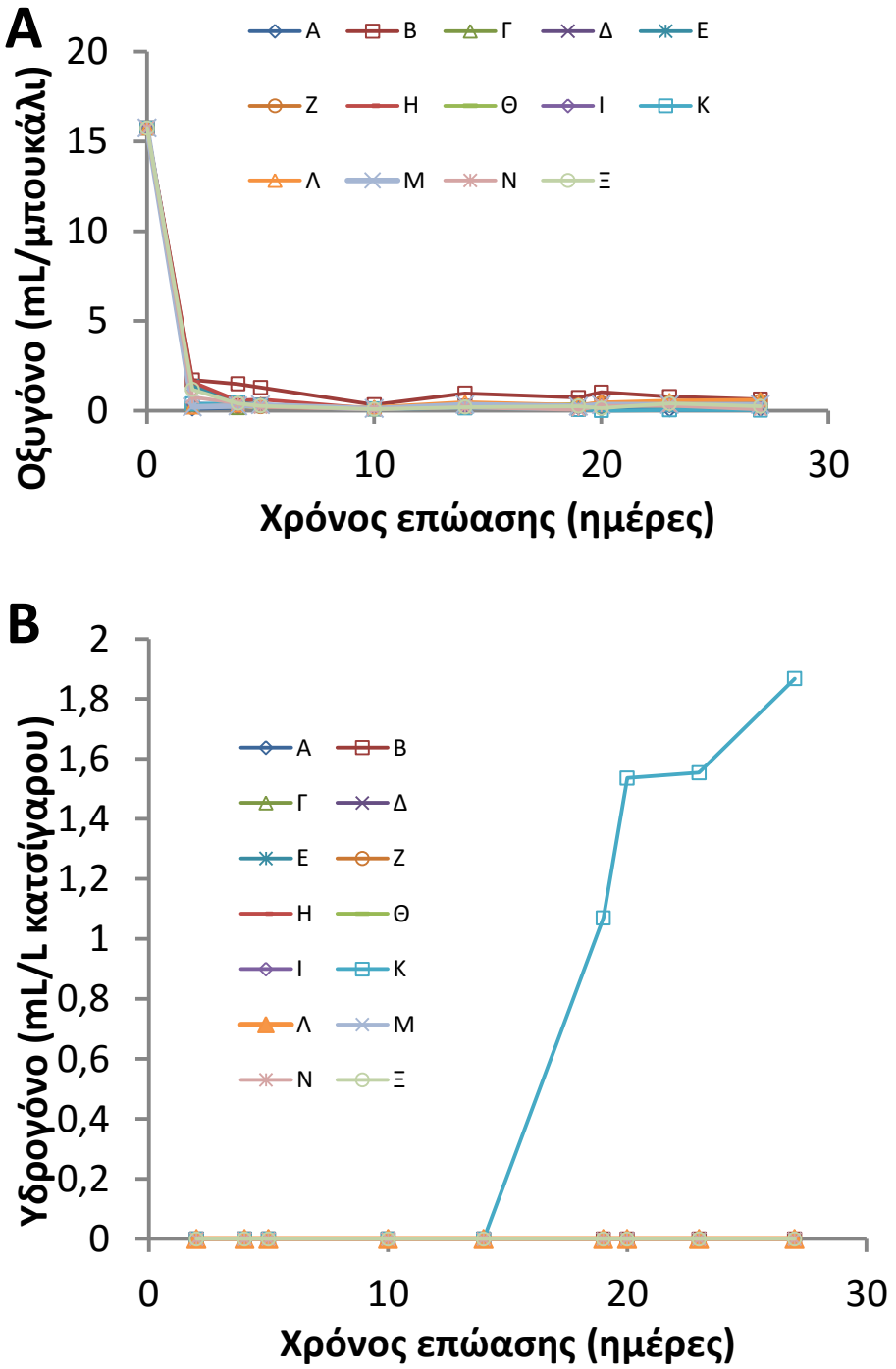


Εικόνα 19. *Ποσοστιαία αποικοδόμηση του ολικού φαινολικού φορτίου σε δείγματα κατσίγαρου από τα 14 διαφορετικά ελαιοτριβεία του Ελλαδικού χώρου μετά από πενθήμερη επώαση σε κλειστό σύστημα.*

Η αποικοδόμηση που παρατηρείται μπορεί να οφείλεται είτε στη φώτοξείδωση των φαινολικών ενώσεων είτε στη μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών που υπάρχουν στον εκάστωτε κατσίγαρο.

Επειδή όπως έχουν δείξει παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου [Papazi et al.,2012] η αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων από μονοκύτταρα χλωροφύκη μπορεί να συνοδεύεται με την παραγωγή H_2 έγινε μία προσπάθεια να ελεγχτεί η πιθανή παραγωγή H_2 σε κλειστά συστήματα. Έτσι καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης πραγματοποιείτο ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του αερίου όγκου των κλειστών συστημάτων χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας (GC-TCD).

Στα παρακάτω διαγράμματα (Εικόνα 20) παρατηρείται σε μία κινητική απεικόνιση η διαφοροποίηση της σύστασης του αέριου όγκου των κλειστών συστημάτων καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης. Παρόλο που σε όλους τους χειρισμούς με τα διαφορετικά δείγματα κατσίγαρου παρατηρείται μια γρήγορη (μέσα σε ένα 24ωρο) εγκαθίδρυση υποξικών συνθηκών (Εικόνα 20.Α) που αποτελεί βασική προϋπόθεση για την παραγωγή H_2, μόνο σε ένα δείγμα (Κ) κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες παρατηρείται κάποια παραγωγή υδρογόνου η οποία φτάνει το 1,87 mL ανά λίτρο κατσίγαρου (Εικόνα 20.Β).

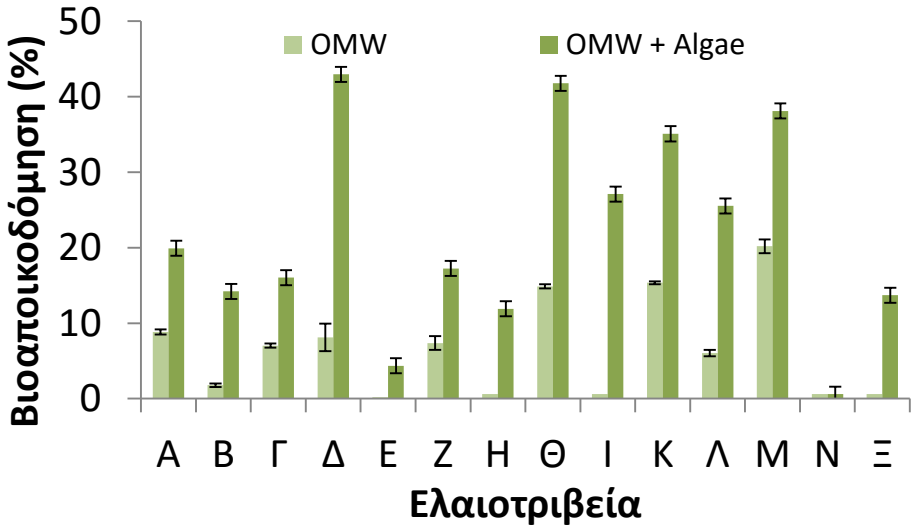


Εικόνα 20. *(Α) Κινητική κατανάλωσης O_2 και (Β) παραγωγής H_2 δειγμάτων κατσίγαρου από τα 14 διαφορετικά ελαιοτριβεία του Ελλαδικού χώρου.*

Η προσέγγιση του προβλήματος της βιοαποικοδόμησης ρύπων χρησιμοποιώντας μικροφύκη προτάθηκε αρχικά από τους Oswald and Gotaas, (1975). Η στροφή στη χρήση των φυκών οφείλεται στα πλεονεκτήματα που δύναται να προσφέρει η χρήση τους σε σχέση με ετερότροφους οργανισμούς, δηλαδή την χρήση της ηλιακής ενέργειας για τη φωτοσυνθετική μετατροπή της σε χημική ενέργεια, που μπορεί στη συνέχεια να την επενδύσει στη βιοαποικοδόμηση τοξικών ενώσεων αλλά και στην παραγωγή βιομάζας

[Aaronson et al., 1980]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία δύο χλωροφύκη (*Ankistrodesmus braunii* και *Scenedesmus quadricauda*) έχει αναφερθεί ότι μπορούν να αποικοδομήσουν σε σημαντικό ποσοστό τις φαινολικές ενώσεις του κατσίγαρου σε διάστημα 5 ημερών [Pinto et al., 2002]. Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus*. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* έχει τη δυνατότητα να αποικοδομεί αρκετές μεμονωμένες τοξικές φαινολικές ενώσεις [Papazi and Kotzabasis.2007,2008,2013; Papazi et al.,2012]. Σε αυτόν το χειρισμό έγινε μια προσπάθεια να ελεγχτεί πως επιδρά το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* στην αποικοδόμηση του φαινολικού φορτίου στο κατσίγαρο. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε επώαση συγκεκριμένου όγκου (25mL) από τα 14 διαφορετικά δείγματα κατσίγαρου και 25 mL υγρής καλλιέργειας κυττάρων του μονοκύτταρου χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus* (χωρίς προσθήκη γλυκόζης) σε μπουκαλάκια των 125 mL ερμητικά κλειστά με septum σε θερμοκρασία $30^{o}C$ και σε ένταση φωτός 50 $\mu molm^{-2}s^{-1}$. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση του ολικού φαινολικού φορτίου την 5η ημέρα επώασης.

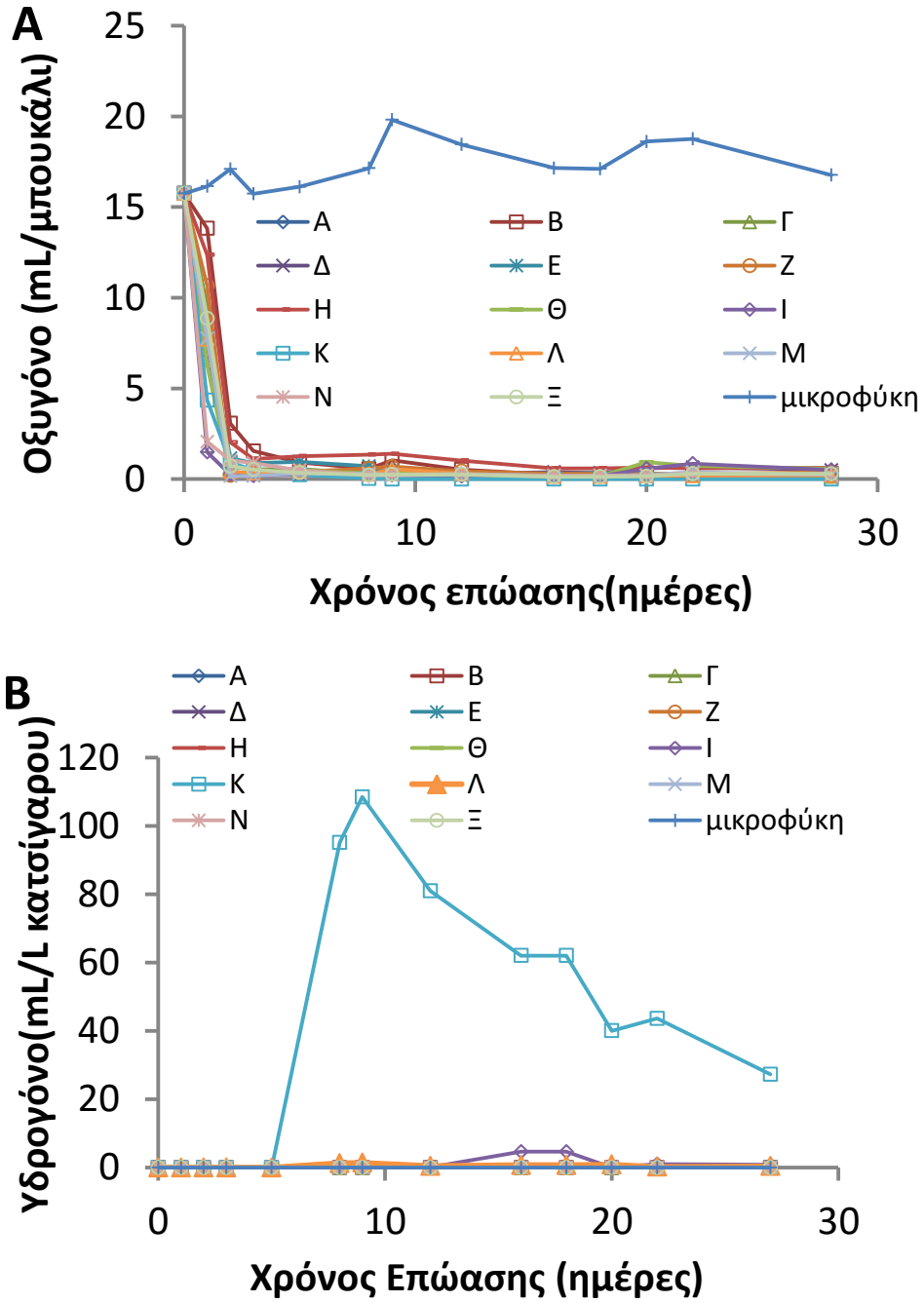
Στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 21) φαίνεται ότι η αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων είναι σαφώς μεγαλύτερη στο χειρισμό με τα κύτταρα του μονοκύτταρου χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus* συγκριτικά με τον χειρισμό χωρίς κύτταρα *Scenedesmus obliquus*. Πιο συγκεκριμένα η αποικοδόμηση στο χειρισμό με τα κύτταρα φθάνει το 43% ενώ στο χειρισμό χωρίς τα κύτταρα μόλις το 20%. Εξαίρεση αποτελεί το δείγμα (N) στο οποίο δεν παρατηρείται αποικοδόμηση.



Εικόνα 21. *Ποσοστιαία αποικοδόμηση του ολικού φαινολικού φορτίου σε δείγματα κατσίγαρου από τα 14 διαφορετικά ελαιοτριβεία του Ελλαδικού χώρου απουσίας (OMW) και παρουσίας (OMW + Algae) κυττάρων του μονοκύτταρου χλωροφύκους Scenedesmus obliquus μετά από πενθήμερη επώαση σε κλειστό σύστημα.*

Είναι γνωστό ότι κατά την βιοαποικοδόμηση των 2,3-, 2,5- και 3,4-διχλωροφαινολών από το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* η ανηγμένη τους μορφή, βάσει του οξειδοαναγωγικού τους δυναμικού, μπορεί να ενσωματωθεί στην αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, στη θέση της ουμπικινόνης, επάγοντας μεγάλη αναπνευστική δραστηριότητα και κατ' επέκταση να δημιουργήσει συνθήκες ανοξίας (σε ένα κλειστό σύστημα) μέσα σε διάστημα λιγότερο από 24 ώρες. Παράλληλα με αυτό το γεγονός, η ανηγμένη μορφή των συγκεκριμένων διχλωροφαινολών ενσωματώνεται και στη φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων πριν από τη δεξαμενή της πλαστοκινόνης (PQ), τροφοδοτώντας με ηλεκτρόνια - ως δότης ηλεκτρονίων - το PSI, παρεμποδίζοντας ολοκληρωτικά την ενεργότητα του PSII και κατ' επέκταση την παραγωγή O_2. Σύμφωνα με το μηχανισμό που έχουν δείξει οι Papazi, et al. (2012), αυτή η μοναδική συγκυρία της συνδυαστικής δράσης ανοξίας και αποκλειστικής ενεργοποίησης του PSI, επάγει την υδρογενάση και την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων H_2 (Papazi, et al. 2012). Στη συνέχεια έγινε μια προσπάθεια να ελεγχτεί η πιθανή παραγωγή H_2 στον κατσίγαρο από το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus*. Έτσι καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης πραγματοποιήθηκε ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του αερίου όγκου των κλειστών συστημάτων.

Στα παρακάτω διαγράμματα (Εικόνα 22) φαίνεται σε μία κινητική απεικόνιση ο αέριος όγκος των κλειστών μπουκαλιών καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης . Φαίνεται ότι το οξυγόνο καταναλώνεται από το πρώτο 24ωρο (Εικόνα 22.Α). Υπό αυτές τις συνθήκες υποξίας παρατηρείται παραγωγή υδρογόνου στο δείγμα (Κ) που στην περίπτωση παρουσίας κυττάρων του μονοκύτταρου χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus* παρατηρείται σημαντική αύξηση των επιπέδων παραγωγής υδρογόνου η οποία φθάνει τα 108,4 mL/L κατσίγαρου συγκριτικά με τα 1,87 mL/L κατσίγαρου που παρατηρήθηκε απουσία του χλωροφύκους (Εικόνα 20.Β), ενώ παρατηρούνται μικρές ποσότητες υδρογόνου και στα δείγματα Ε,Ι,Λ και Μ. Αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από τα αυξημένα επίπεδα στη παραγωγή υδρογόνου η παραγωγή ξεκίνησε σημαντικά νωρίτερα στον χειρισμό παρουσία του χλωροφύκους (5η ημέρα) συγκριτικά με τον χειρισμό απουσίας αυτού (14η ημέρα). Η γραμμή με την ένδειξη μικροφύκη στην εικόνα 22.Α μας δείχνει σε κινητική απεικόνιση την διαφοροποίηση του όγκου του οξυγόνου στον αέριο όγκο των κλειστών μπουκαλιών καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης στο κλειστό μπουκαλάκι που περιείχε καλλιέργεια *Scenedesmus obliquus* χωρίς προσθήκη κατσίγαρου. Παρατηρούμε ότι δεν έχουμε κατανάλωση οξυγόνου στο μπουκαλάκι (μικροφύκη) (Εικόνα 22.Α) και δεδομένου ότι δεν έχουμε παροχή γλυκόζης δεν παρατηρούμε παραγωγή H_2 (Εικόνα 22.Β).



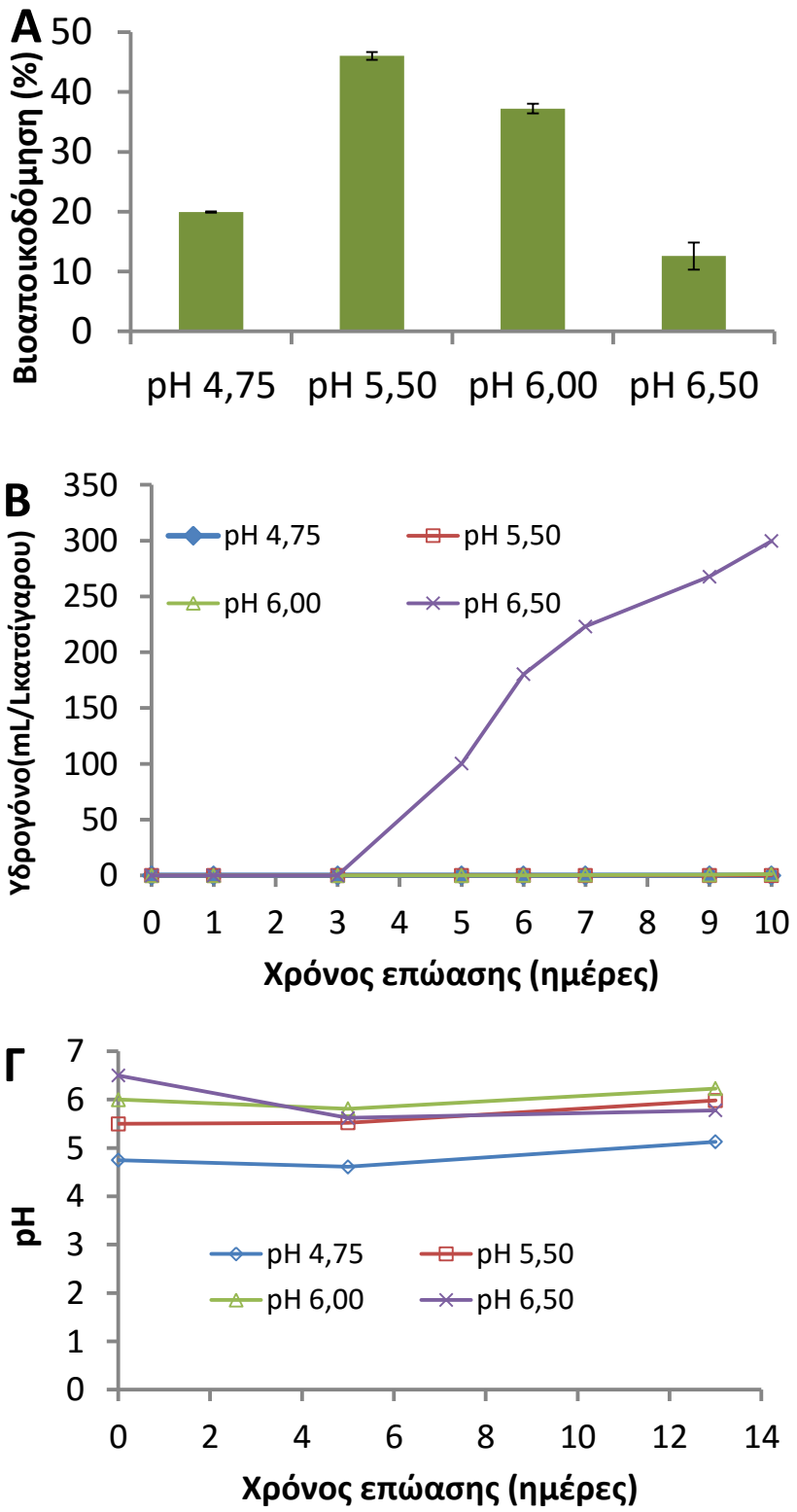
Εικόνα 22. *(Α) Κινητική κατανάλωσης O_2 και (Β) παραγωγής H_2 δειγμάτων κατσίγαρου από τα 14 διαφορετικά ελαιοτριβεία του Ελλαδικού χώρου.*

Δεδομένου ότι η προσθήκη κυττάρων του μονοκύτταρου χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus* στον κατσίγαρο πραγματοποιείται με παράλληλη προσθήκη θρεπτικού από τις μητρικές καλλιέργειες (ρυθμιστικό διάλυμα) ενδεχομένως να επηρεάζεται το pH του. Επειδή αυτή η αλλαγή στο pH είναι πιθανό να επηρεάζει τα αποτελέσματα των μετρήσεών μας, στον επόμενο κύκλο πειραμάτων πραγματοποιήθηκε ρύθμιση του pH σε ένα δείγμα κατσίγαρου που δεν έχει παράξει μέχρι τώρα H_2 (δείγμα Α) με σκοπό να ελεγχτεί το πώς

επηρεάζει αυτή η αλλαγή στο pH αρχικά την αποικοδόμηση του φαινολικού φορτίου του και στη συνέχεια την παραγωγή υδρογόνου . Πιο συγκεκριμένα σε 25 mL από το δείγμα κατσίγαρου Α πραγματοποιήθηκε προσθήκη 25 mL καλλιέργειας κύτταρων και έγινε ρύθμιση του pH(4,75/ 5,50/ 6,00 και 6,50) σε μπουκαλάκια των 125 mL ερμητικά κλειστά με septum. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επώαση σε θερμοκρασία 30° C και σε ένταση φωτός 50 $\mu mol m^{-2}s^{-1}$. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση του ολικού φαινολικού φορτίου την 5η ημέρα επώασης. Καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης πραγματοποιείτο ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του αερίου όγκου των κλειστών συστημάτων.

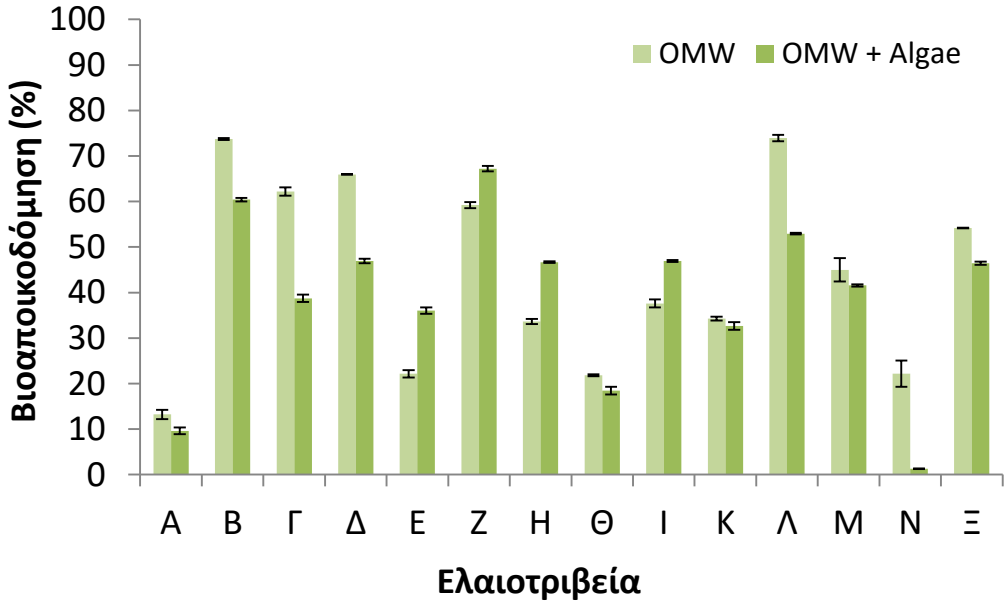
Στα παρακάτω διαγράμματα (Εικόνα 23.Α) φαίνεται αρχικά ότι το pH επηρεάζει τη βιοαποικοδόμηση των φαινολικών με μεγαλύτερο ποσοστό αποικοδόμησης να παρατηρείται στο pH 5,50. Σε μικρότερες και μεγαλύτερες τιμές pH παρατηρούνται μικρότερα ποσοστά αποικοδόμησης. Στο διάγραμμα (Εικόνα 23.Β) σε μία κινητική απεικόνιση της παραγωγής H_2 κατά τη διάρκεια της επώασης, παρατηρείται παραγωγή H_2 στο χειρισμό pH 6,50 από την 3η ημέρα επώασης η οποία μάλιστα φθάνει τα 300 mL/L κατσίγαρου τη δέκατη ημέρα επώασης. Παραγωγή H_2 παρατηρείται καθυστερημένα και στο pH 6,00 αλλά είναι ελάχιστη (1,16 mL/L κατσίγαρου) συγκριτικά με την αντίστοιχη στο pH 6,50. Το γεγονός ότι παρατηρείται μεγάλη παραγωγή H_2 στο χειρισμό με pH 6,50 στον οποίο παρατηρείται σχετικά χαμηλή αποικοδόμηση είναι πιθανό να οφείλεται σε μία μάλλον ανταγωνιστική σχέση ανάμεσα στη βιοαποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων και στην παραγωγή H_2. Στη συνέχεια (Εικόνα 23.Γ) παρατηρείται ότι ενώ στους υπόλοιπους χειρισμούς το pH διατηρείται, στον χειρισμό με pH 6,50 παρατηρείται μια πτώση του pH η οποία πιθανώς σχετίζεται με την παραγωγή H_2. (pH μικρότερο του 5 ίσως να προκαλεί stress στο φύκος και γι αυτό ίσως παρατηρούνται μικρότερα ποσοστά αποικοδόμησης και μηδενική παραγωγή H_2).

Δεδομένου ότι παρατηρήθηκε μεγάλη παραγωγή H_2 στο χειρισμό pH 6,50 και μηδενική ή σχεδόν μηδενική στους υπόλοιπους χειρισμούς (pH 4,75/ 5,50 και 6,00) πραγματοποιήθηκε εφαρμογή pH 6,50 σε όλα τα δείγματα από τα 14 ελαιουργεία. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε επώαση συγκεκριμένου όγκου (25mL) από τα 14 διαφορετικά δείγματα κατσίγαρου και 25 mL υγρής καλλιέργειας κυττάρων του μονοκύτταρου χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus* (χωρίς γλυκόζη) και 25mL νερό σε μπουκαλάκια των 125 mL ερμητικά κλειστά με septum σε θερμοκρασία 30° C και σε ένταση φωτός 50$\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση του ολικού φαινολικού φορτίου τη 5η ημέρα επώασης. Καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης πραγματοποιείτο ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του αερίου όγκου των κλειστών συστημάτων.



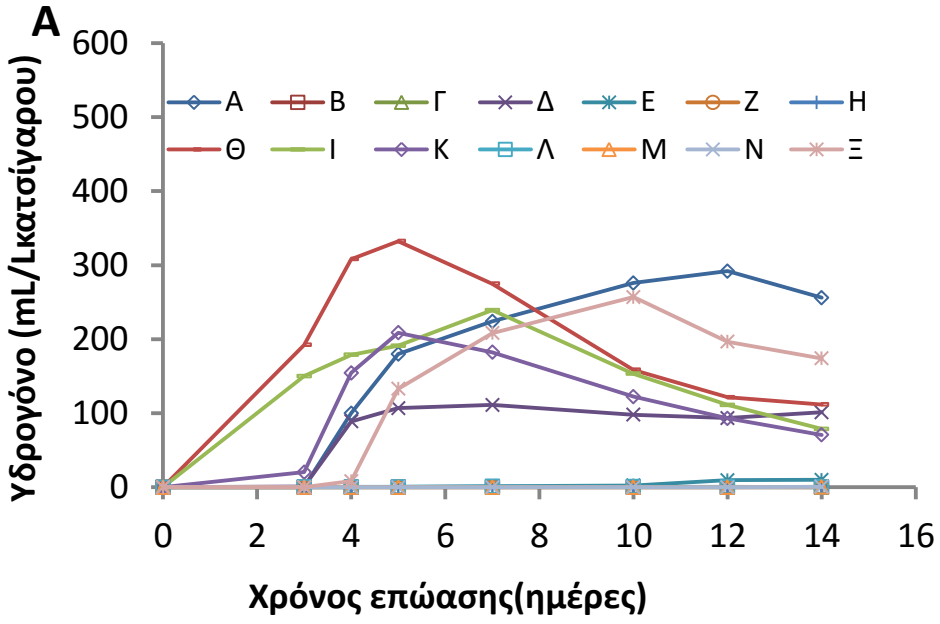
Εικόνα 23. *Α: Αποικοδόμησης (%) του ολικού φαινολικού φορτίου του δείγματος κατσίγαρου Α παρουσία κυττάρων του μονοκύτταρου χλωροφύκους Scenedesmus obliquus στα διάφορα pH (4,75, 5,50, 6,00 και 6,50). Β: Κινητική παραγωγής* H_2 *του δείγματος Α κατά τη διάρκεια 10 ήμερης επώασης. Γ: Κινητική διαφοροποίησης του pH κατά την επώαση.*

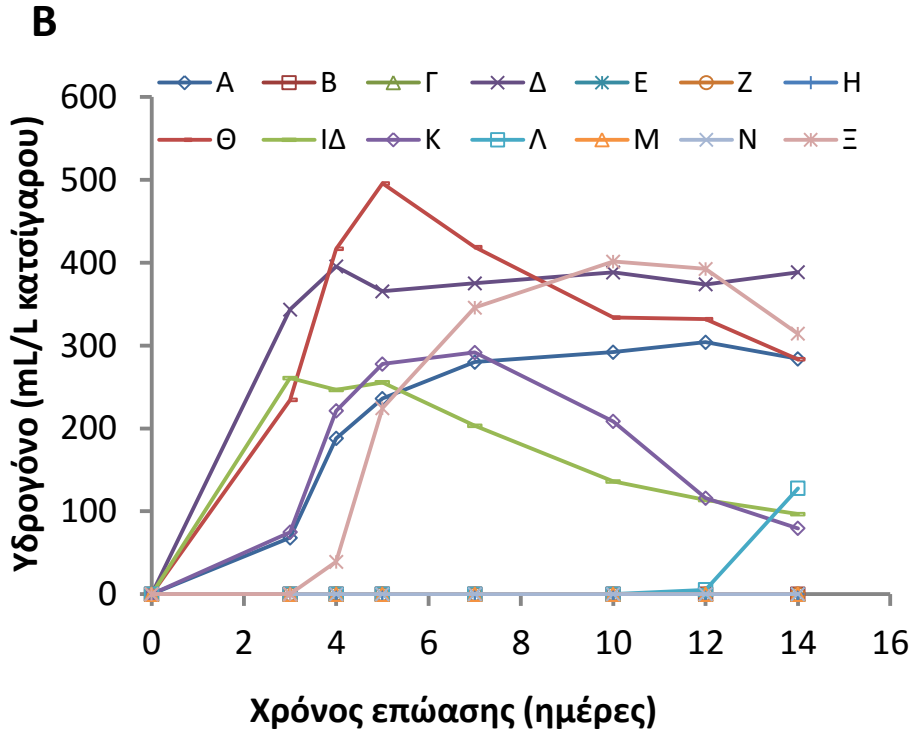
Στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 24) παρατηρείται ότι στο pH 6,50 παρουσία κυττάρων του μονοκύτταρου χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus* (OMW + Algae) η αποικοδόμηση του φαινολικού φορτίου κυμαίνεται από 21 έως και 73 %, ενώ απουσία κυττάρων (OMW) η αποικοδόμηση κυμαίνεται από μηδενική έως και 63 %. Είναι σαφές ότι η ρύθμιση του pH επηρεάζει θετικά την βιοαποικοδόμηση του ολικού φαινολικού φορτίου στον κατσίγαρο.



Εικόνα 24. *Ποσοστιαία Αποικοδόμηση (%) του ολικού φαινολικού φορτίου σε δείγματα κατσίγαρου από τα 14 ελαιοτριβεία του Ελλαδικού χώρου απουσίας (OMW) και παρουσίας (OMW + Algae) κυττάρων του μονοκύτταρου χλωροφύκους Scenedesmus obliquus μετά από πενθήμερη επώαση σε κλειστό σύστημα.*

Η καταγραφή της παραγωγής H_2 κατά τη διάρκεια της επώασης έδειξε ότι στο pH 6,50 τα περισσότερα δείγματα κατσίγαρου παράγουν H_2 (Εικόνα 25). Μάλιστα στο χειρισμό απουσία του χλωροφύκους (Εικόνα 25.Β) η παραγωγή H_2 είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του χειρισμού παρουσία του μονοκύτταρου χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus* (Εικόνα 25.Α). Όσο αφορά την παραγωγή H_2 όπως και στην βιοαποικοδόμηση κύρια παράμετρος φαίνεται να είναι η αλλαγή του pH και όχι η παρουσία ή απουσία κυττάρων του μονοκύτταρου χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus*.



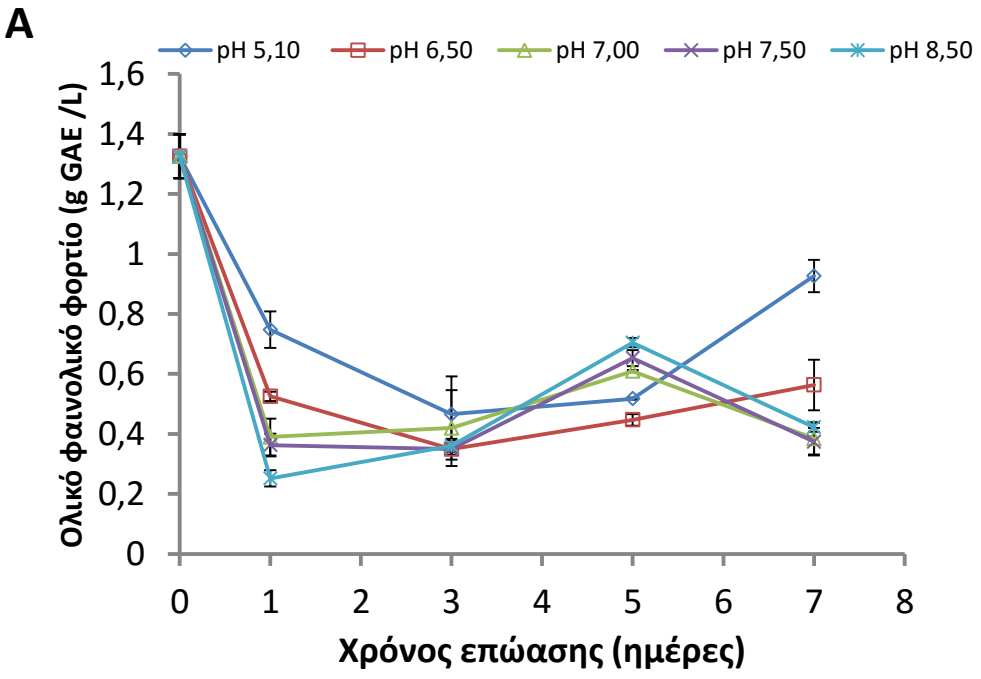


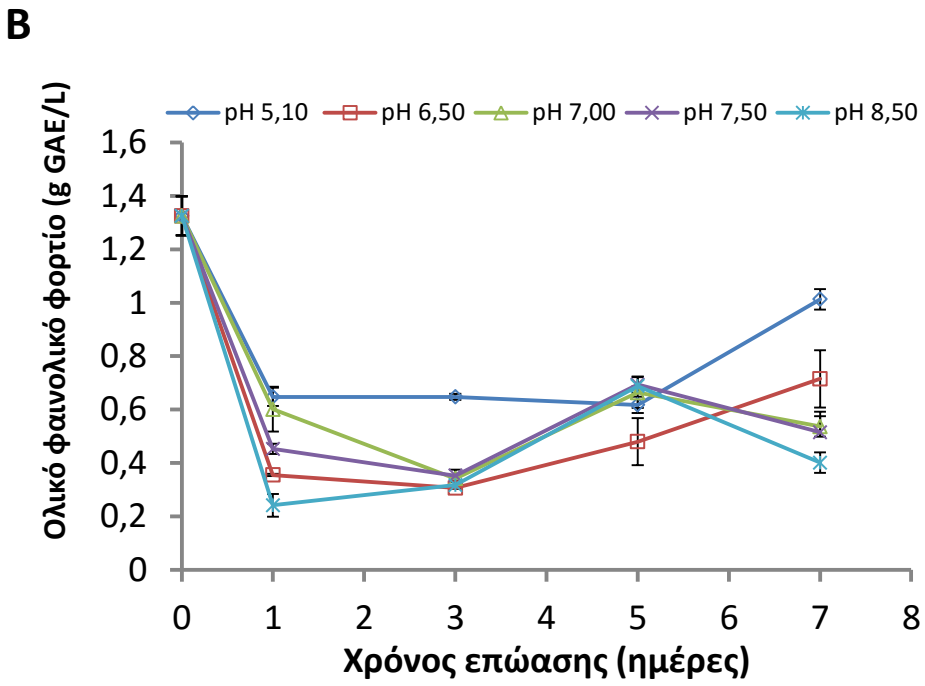
Εικόνα 25. Κινητική παραγωγής H_2 των δειγμάτων από τα 14 διαφορετικά ελαιοτριβεία του Ελλαδικού χώρου Α παρουσία και Β απουσία κυττάρων του μονοκύτταρου χλωροφύκους Scenedesmus obliquus.

Επειδή στόχος της παρούσης εργασίας ήταν να αξαχθούν συμπεράσματα τα οποία θα συμβάλουν σε μία ολοκληρωμένη διαχείριση του κατσίγαρου , οι επόμενοι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε μίγμα κατσίγαρων από τα 14 διαφορετικά ελαιοτριβεία του

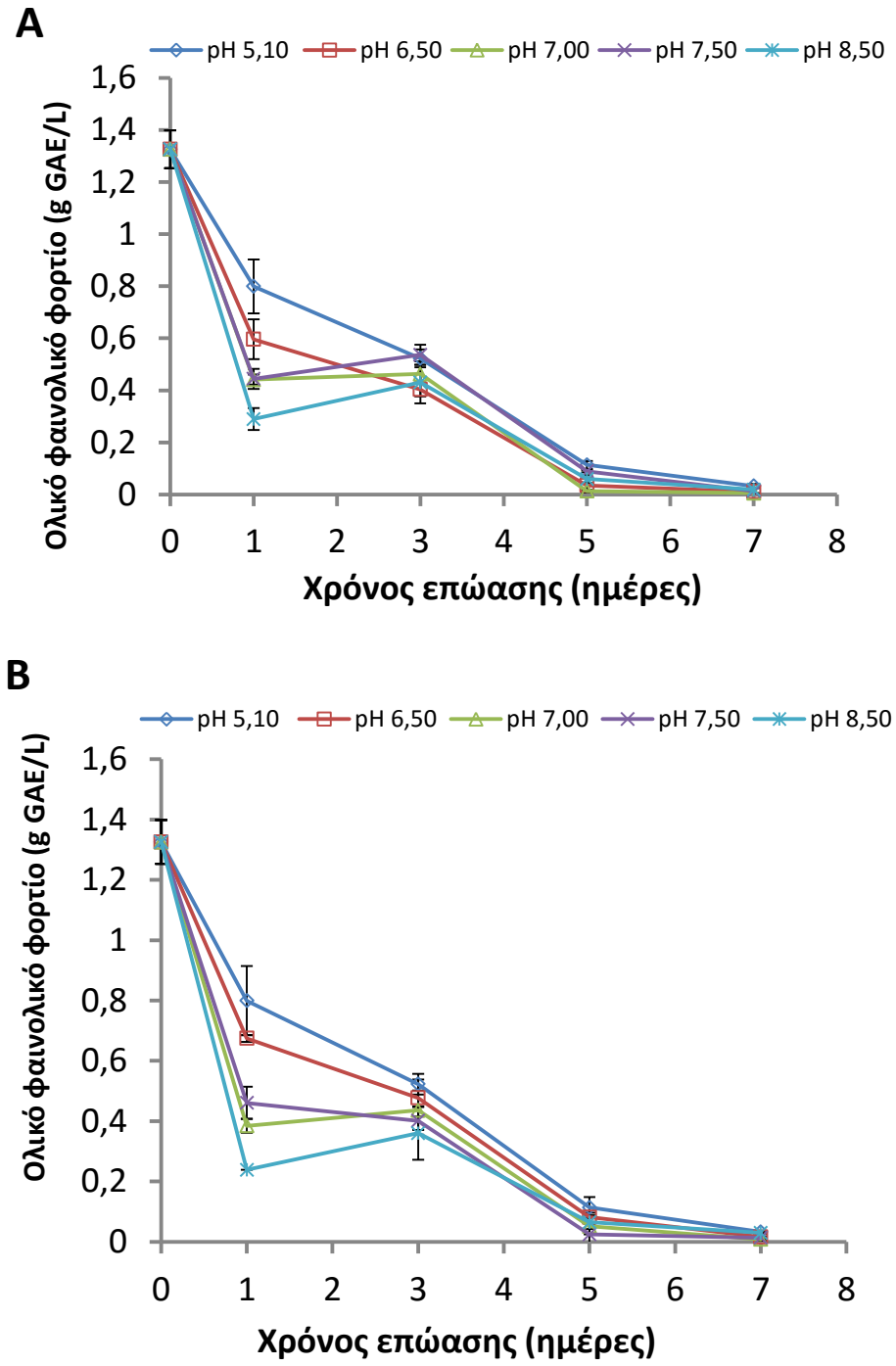
Ελλαδικού χώρου. Δεδομένου ότι η βιοαποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων είτε αυτή πραγματοποιείται από βακτήρια είτε από χλωροφύκη είναι μία διαδικασία στην όποια η ύπαρξη η μη οξυγόνου είναι πολύ σημαντικός παράγοντας [Τα περισσότερα μονοπάτια βιοαποικοδόμησης απαιτούν O_2 λόγω της συμμετοχής οξυγενασών [Van Schie and Young, 2000; Semple and Cain, 1996]] στη συνέχεια ελέγχτηκε το πώς επιδρά το οξυγόνο στην αποικοδόμηση του ολικού φαινολικού φορτίου στον κατσίγαρο. Έτσι δημιουργήθηκαν ανοιχτά και κλειστά συστήματα, με το χλωροφύκος και χωρίς αυτό, που επωάστηκαν με τον ίδιο τρόπο σε διαφορετικές τιμές pH (5,10/ 6,50/ 7,00 /7,50 και 8,50). Καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης σε τακτικά διαστήματα πραγματοποιείτο μέτρηση του ολικού φαινολικού φορτίου ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιείτο ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του αερίου όγκου των κλειστών συστημάτων .

Τα αποτελέσματα αυτής της πειραματικής σειράς έδειξαν ξεκάθαρα ότι στο κλειστό σύστημα την πρώτη ημέρα που δεν έχει καταναλωθεί το διαθέσιμο οξυγόνο παρατηρείται μια σημαντική μείωση του ολικού φαινολικού φορτίου ενώ στη συνέχεια δεν παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές στο ολικό φαινολικό φορτίο (Εικόνα 26). Όσον αφορά το ανοιχτό σύστημα η μείωση του ολικού φαινολικού φορτίου συνεχίζεται καθώς η παροχή οξυγόνου δε διακόπτεται, έτσι την 7η ημέρα επώασης παρατηρείται ότι το ολικό φαινολικό φορτίο έχει φθάσει σε πολύ χαμηλά έως και μηδενικά επίπεδα (Εικόνα 27). Παρόλο που παρατηρούνται μικρές διαφορές στις τιμές του ολικού φαινολικού φορτίου στα διαφορετικά pH και στο ανοιχτό και στο κλειστό σύστημα η τάση που παρατηρείται είναι κοινή και στα 5 διαφορετικά pH. Όσον αφορά την παρουσία και μη του χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus* φαίνεται να μην παίζει σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση του ολικού φαινολικού φορτίου.





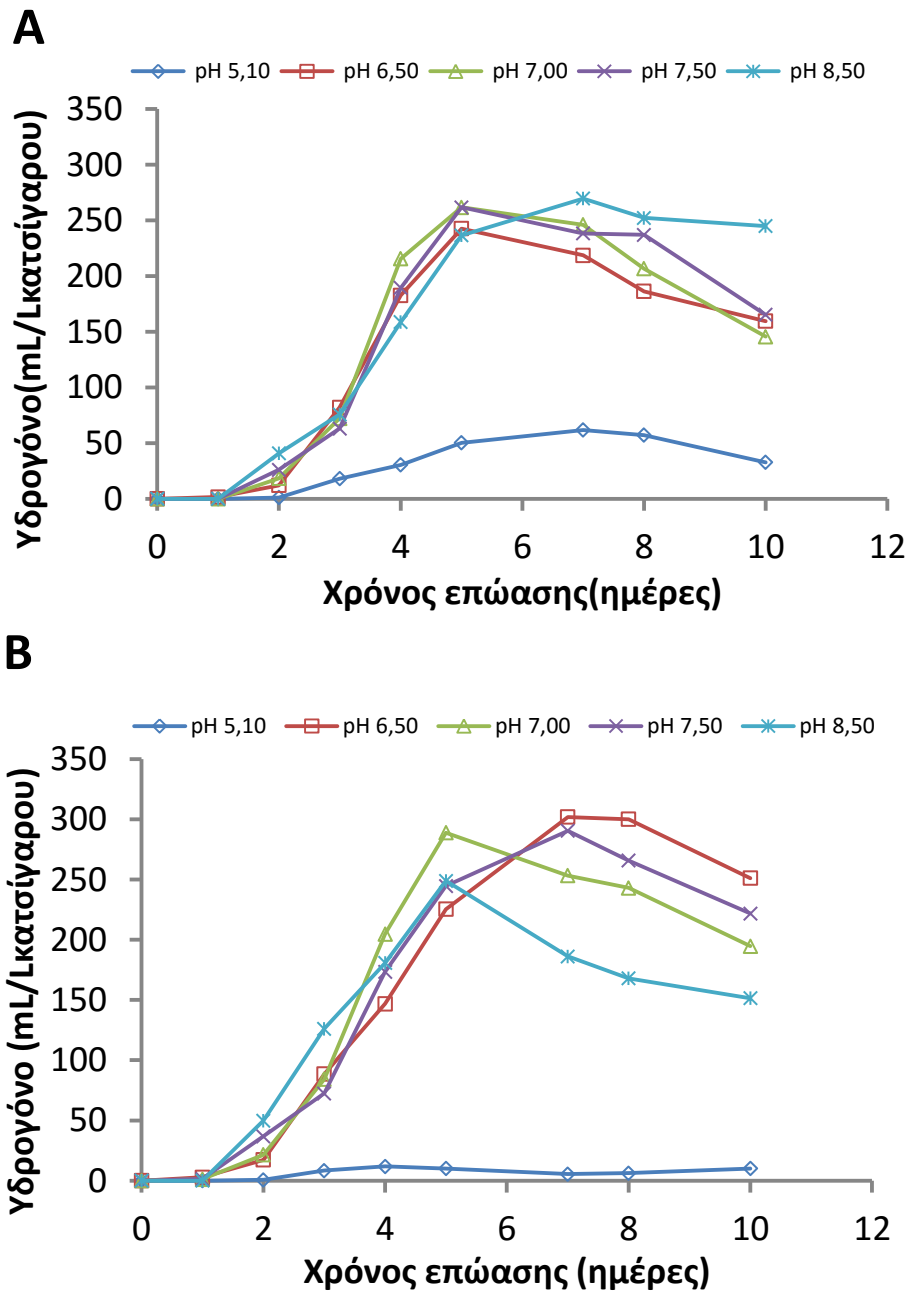
Εικόνα 26. *Κινητική ολικού φαινολικού φορτίου μίγματος κατσίγαρου σε 5 διαφορετικά pH κατά την επώαση σε κλειστό σύστημα παρουσία (A) και απουσία (B) κυττάρων του μονοκύτταρου χλωροφύκους Scenedesmus obliquus.*



Εικόνα 27. *Κινητική ολικού φαινολικού φορτίου μίγματος κατσίγαρου σε 5 διαφορετικά pH κατά την επώαση σε ανοιχτό σύστημα παρουσία (A) και απουσία (B) κυττάρων του μονοκύτταρου χλωροφύκους Scenedesmus obliquus.*

Η κινητική απεικόνιση της παραγωγής H_2 στα κλειστά συστήματα καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης έδειξε ότι και στα 5 διαφορετικά pH, παρατηρείται σημαντική παραγωγή H_2 μετά από 5 ημέρες επώαση με παρόμοιες τιμές (γύρω στα 260 mL/L κατσίγαρου) σε όλα τα pH από το 6,50 έως και το 8,50 (Εικόνα 28.A). Στον αντίστοιχο

χειρισμό χωρίς το χλωροφύκος οι ποσότητες είναι ελαφρώς μεγαλύτερες (γύρω στα 300 mL/L κατσίγαρου) (Εικόνα 28.Β). Οι χαμηλότερες τιμές και στους δύο χειρισμούς παρατηρούνται στο αρχικό pH του μίγματος κατσίγαρου που έχει pH5,10. Όσο αφορά την παραγωγή H_2 επιβεβαιώνεται ότι κύρια παράμετρος υπό τις παρούσες συνθήκες φαίνεται να είναι η αλλαγή του pH και όχι η παρουσία ή απουσία κυττάρων του μονοκύτταρου χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus*.



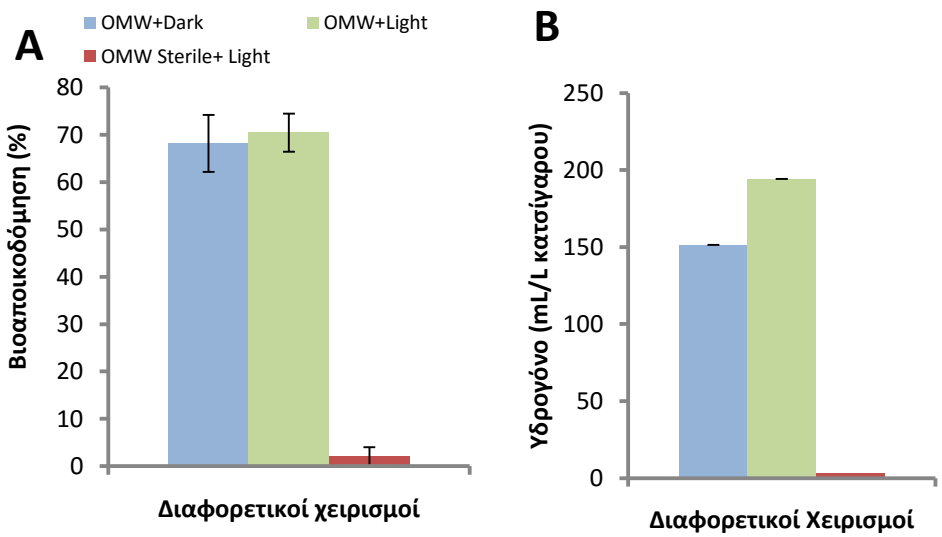
Εικόνα 28. *Κινητική παραγωγής H_2 του μίγματος κατσίγαρου από τα 14 διαφορετικά ελαιοτριβεία του Ελλαδικού χώρου: Α παρουσία και Β απουσία κυττάρων του μονοκύτταρου χλωροφύκους Scenedesmus obliquus.*

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η μειωμένη (έστω και οριακά) παραγωγή υδρογόνου στους χειρισμούς με το χλωροφύκος, θα μπορούσε να δικαιολογηθεί λόγω της αυξημένης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και κατά επέκταση παραγωγής οξυγόνου σε σχέση με τους χειρισμούς χωρίς το χλωροφύκος, καθυστερώντας την υδρογενάση. Από την άλλη μεριά γίνεται σαφές ότι ο κατσίγαρος (από όπου και αν προέρχεται) εμπεριέχει συγκεκριμένη χλωρίδα (βακτήρια, μύκητες, μικροφύκη, …) που επιζεί αλλά δεν μπορεί να λειτουργήσει στο χαμηλό pH (4,0-5,0) του κατσίγαρου. Με την αύξηση του pH ενεργοποιείται ο μεταβολισμός των μικροοργανισμών της συγκεκριμένης χλωρίδας και λόγω του υψηλού οργανικού φορτίου που είναι στη διάθεση τους (μέσω της αναπνευστικής διαδικασίας) δημιουργούν γρήγορα ανοξικές συνθήκες που επάγουν την υδρογενάση (στους οργανισμούς που υπάρχει) και επάγεται παραγωγή H_2.

Για να διαπιστώθεί αν η αποικοδόμηση του ολικού φαινολικού φορτίου στον κατσίγαρο και η παραγωγή υδρογόνου απουσία του μονοκύτταρου χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus* είναι αποτέλεσμα του μεταβολισμού των μικροοργανισμών που βρίσκονται στον κατσίγαρο ή πρόκειται απλά για μία χημική διαδικασία πραγματοποιήθηκαν πειράματα με αποστειρωμένο κατσίγαρο, πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε επώαση 25 ml αποστειρωμένου μίγματος κατσίγαρου και 25 ml απιονισμένου νερού(dH_2O) σε θερμοκρασία 30° C και σε ένταση φωτός 50 μmol m^{-2} s^{-1}. Η επώαση διήρκησε 5 ημέρες και τα αποτελέσματα έδειξαν μηδενική αποικοδόμηση του ολικού φαινολικού φορτίου στον χειρισμό με τον αποστειρωμένο κατσίγαρο (Εικόνα 29.Α) κάτι που ενισχύει τη υπόθεσή μας ότι η αποικοδόμηση που παρατηρείται απουσία του μονοκύτταρου χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus* είναι αποτέλεσμα του μεταβολισμού των μικροοργανισμών που βρίσκονται είδη στον κατσίγαρο και δεν αποτελεί μία χημική διαδικασία. Επιπλέον όπως ήταν αναμενόμενο δεν παρατηρείται παραγωγή υδρογόνου (Εικόνα 29.Β). Όσο αφορά το ερώτημα αν η βιοαποικοδόμηση του φαινολικού φορτίου αλλά και η παραγωγή υδρογόνου από τους μικροοργανισμούς του κατσίγαρου είναι αποκλειστικά φωτοεξαρτώμενες διαδικασίες ή όχι, ο αντίστοιχος πειραματικός έλεγχος έδειξε ότι και οι δύο διαδικασίες λαμβάνουν χώρα και στο σκοτάδι με ελαφρώς μικρότερη απόδοση (Εικόνα 29).

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η αποικοδόμηση του ολικού φαινολικού φορτίου και η παραγωγή H_2 αποτελούν δύο μάλλον ανταγωνιστικές διαδικασίες δεδομένου ότι για τη μεν βιοαποικοδόμηση η παροχή οξυγόνου είναι βασική προϋπόθεση, ενώ για τη δε παραγωγή H_2 απαραίτητη συνθήκη είναι να επικρατούν

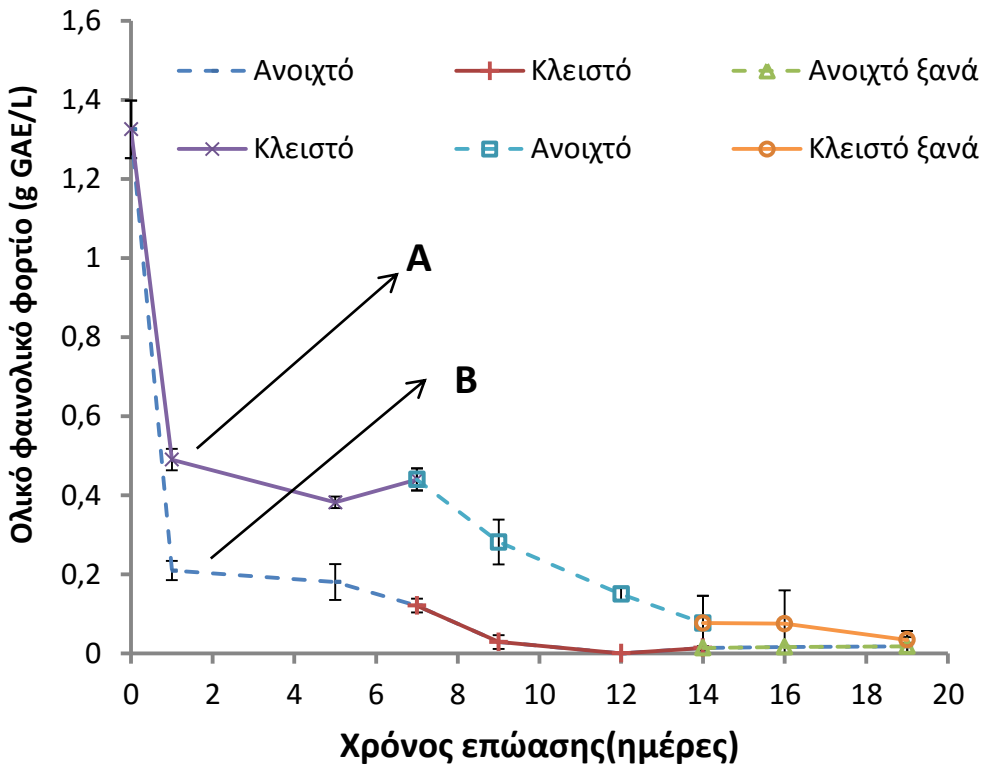
συνθήκες υποξίας. Σε αυτό το σημείο έγινε μία προσπάθεια να μελετηθεί το πώς επιδρά η εναλλαγή αυτή τη φορά κλειστών και ανοιχτών συστημάτων στις δύο διαδικασίες. Στους συγκεκριμένους χειρισμούς δεν χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα του μονοκύτταρου χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus* δεδομένου ότι υπό τις υπάρχουσες συνθήκες η παρουσία ή η απουσία των κυττάρων δεν επηρεάζει σημαντικά την αποικοδόμηση του ολικού φαινολικού φορτίου και την παραγωγή H_2 ενώ πραγματοποιήθηκε ρύθμιση του pH στο 6,5, καθώς στο συγκεκριμένο pH είχαμε την μεγαλύτερη παραγωγή H_2. Έτσι δημιουργήθηκαν ανοιχτά και κλειστά συστήματα τα οποία και εναλλάσσονταν την 7η ημέρα και την 14η ημέρα. Καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης σε τακτικά διαστήματα πραγματοποιείτο μέτρηση ολικού φαινολικού φορτίου ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιείτο ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του αερίου όγκου των εκάστοτε κλειστών συστημάτων.



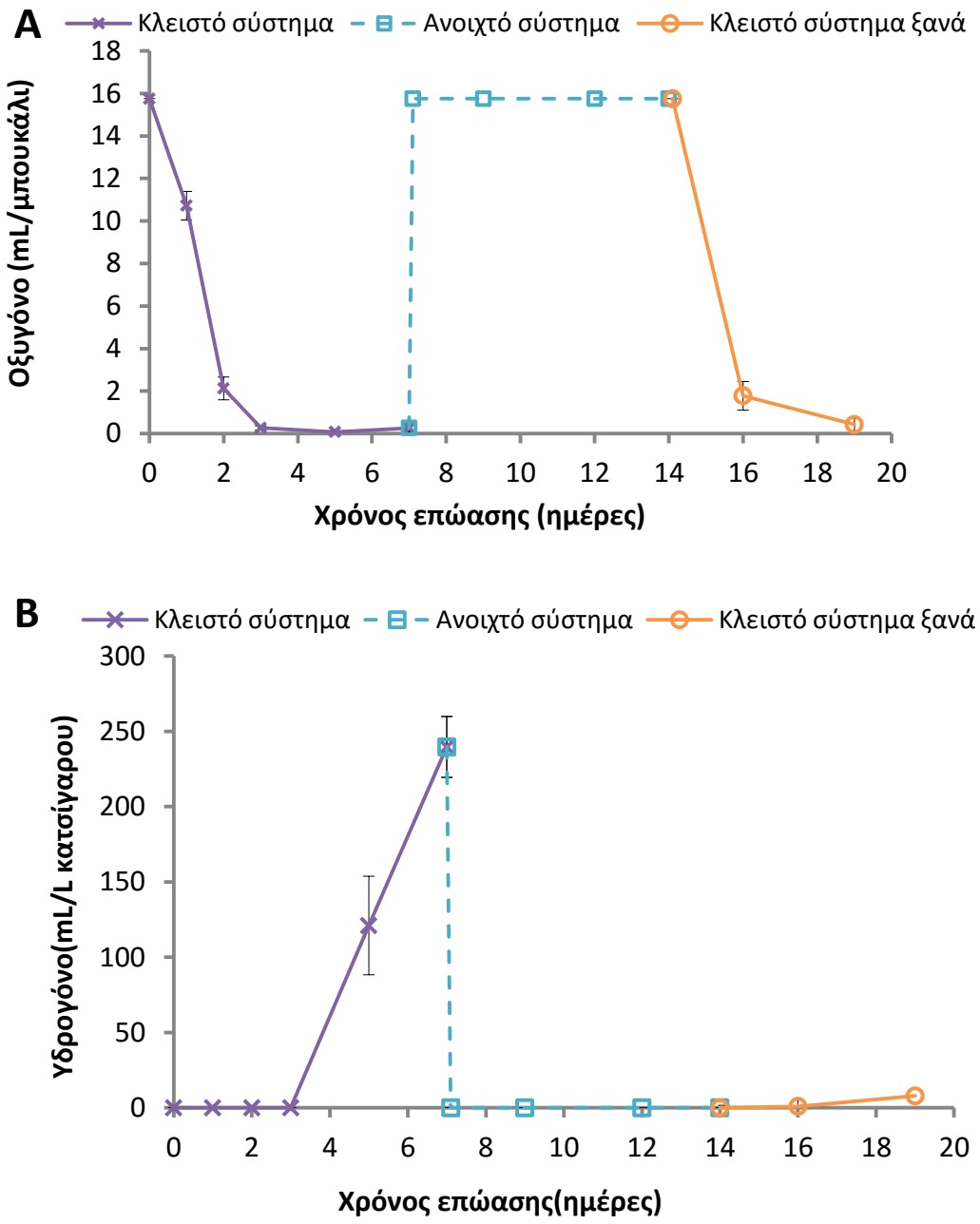
Εικόνα 29. *Α. Ποσοστιαία αποικοδόμηση του ολικού φαινολικού φορτίου την πέμπτη ημέρα επώασης Β. παραγωγή H_2 την πέμπτη ημέρα επώασης, στους πειραματικούς χειρισμούς: μίγμα κατσίγαρων σε συνθήκες έλλειψης φωτός (OMW+Dark), μίγμα κατσίγαρων (OMW+Light) και αποστειρωμένο μίγμα κατσίγαρων (OMWSterile+Light) σε συνθήκες έντασης φωτός 50 μmol $m^{-2}s^{-1}$ (Light) του μίγματος κατσίγαρου από τα 14 διαφορετικών ελαιοτριβεία του Ελλαδικού χώρου.*

Σε αυτή την πειραματική σειρά χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές διαδικασίες: Διαδικασία Α: κλειστά συστήματα - ανοιχτά - και πάλι κλειστά συστήματα. Διαδικασία Β: ανοιχτά συστήματα - κλειστά - και μετά πάλι ανοιχτά συστήματα. Οι εναλλαγές έγιναν την 7η και την 14η ημέρα επώασης ενώ η επώαση διήρκησε 19 ημέρες. Τις πρώτες 7 ημέρες επώασης και στο ανοιχτό και στο κλειστό σύστημα φαίνεται ότι όσο υπάρχει ακόμα

οξυγόνο παρατηρείται σημαντική μείωση του ολικού φαινολικού φορτίου, ωστόσο στο κλειστό σύστημα το ολικό φαινολικό φορτίο παραμένει σταθερό μετά τη κατανάλωση του οξυγόνου (μετά την πρώτη ημέρα επώασης) ενώ συνεχίζει να μειώνεται στο ανοιχτό σύστημα που υπάρχει διαθέσιμο οξυγόνο φθάνοντας σε πολύ χαμηλά επίπεδα (Εικόνα 30). Μετά την πρώτη εναλλαγή την έβδομη ημέρα στο ανοιχτό πλέον σύστημα (πρώην κλειστό) και εφόσον το οξυγόνο είναι πλέον διαθέσιμο παρατηρείται σημαντική μείωση του ολικού φαινολικού φορτίου το οποίο φθάνει σε χαμηλά επίπεδα, ενώ στο κλειστό πλέον σύστημα (πρώην ανοιχτό) παρατηρείται συνέχιση της μείωσης του ολικού φαινολικού φορτίου διότι υπάρχει ακόμη διαθέσιμο οξυγόνο. Κατά τη δεύτερη εναλλαγή ανοιχτών σε κλειστά συστήματα και αντίστροφα τη 14η ημέρα το ολικό φαινολικό φορτίο φαίνεται είτε να έχει φθάσει ήδη σε μηδενικά επίπεδα (Εικόνα 30.Β) είτε να προσεγγίζει μηδενικά επίπεδα (Εικόνα 30.Α).



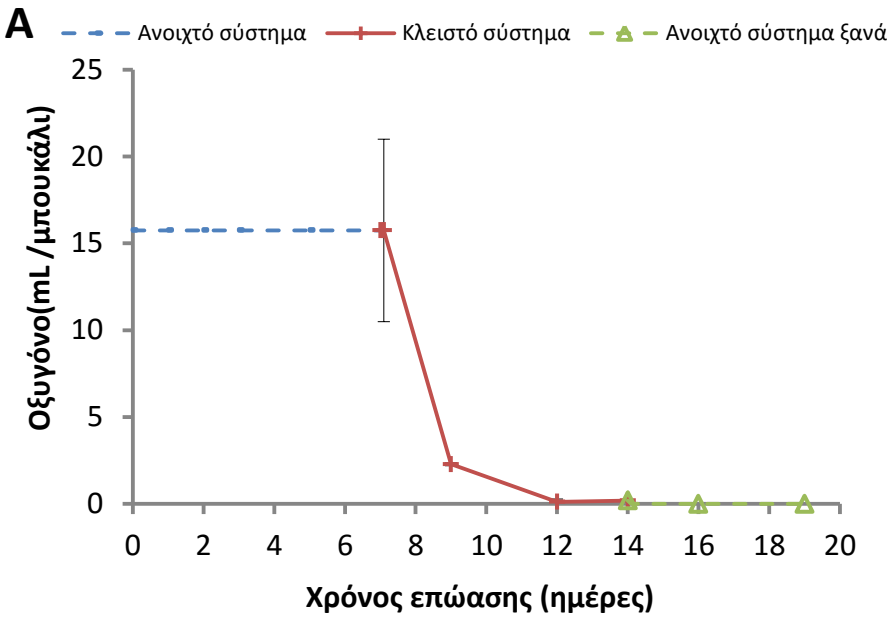
Εικόνα 30. *Κινητική ολικού φαινολικού φορτίου μίγματος κατσίγαρου κατά την επώαση : Α σε κλειστό στη συνέχεια ανοιχτό και πάλι κλειστό σύστημα και Β σε ανοιχτό στη συνέχεια κλειστό και πάλι ανοιχτό σύστημα.*

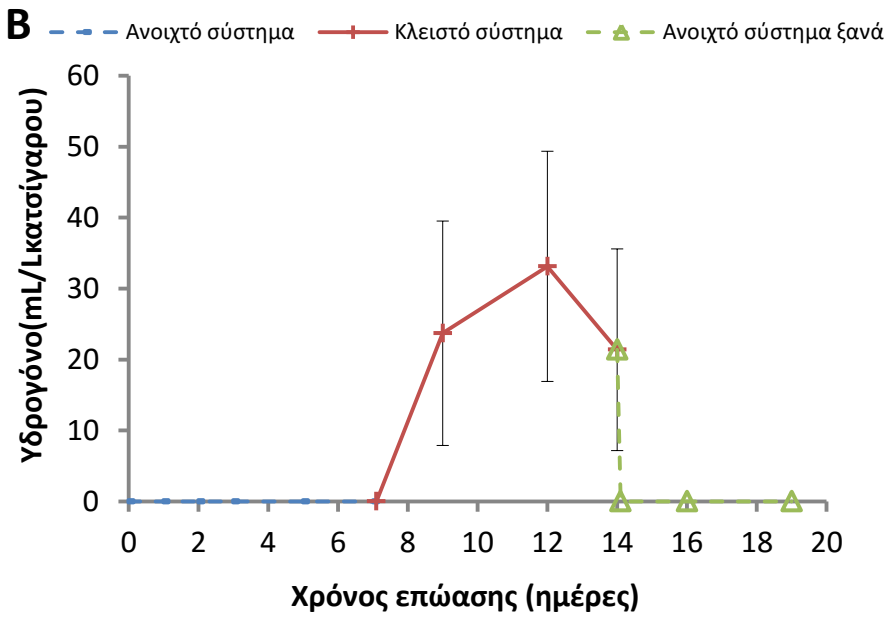


Εικόνα 31. *(A) Κινητική κατανάλωσης O_2 και (B) παραγωγής H_2 του μίγματος κατσίγαρου κατά την εναλλαγή κλειστών με ανοιχτά και πάλι κλειστά συστήματα.*

Η καταγραφή της κατανάλωσης του οξυγόνου (Εικόνα 31.A) και της παραγωγής του υδρογόνου (Εικόνα 31.B) κατά την ανάλλαγη κλειστών με ανοιχτά και πάλι κλειστά συστήματα έδειξε ότι η παραγωγή υδρογόνου ξεκινά αμέσως μετά την κατανάλωση του οξυγόνου. Η ποσότητα υδρογόνου που παρήχθη έφθασε τα 240 mL/L κατσίγαρου. Μετά τη 14 ημέρα που γίνεται εναλλαγή του ανοιχτού συστήματος σε κλειστό ξανά παρατηρείται ότι παρόλο που δημιουργούνται οι απαραίτητες συνθήκες υποξίας (Εικόνα 31.A) η παραγωγή

υδρογόνου είναι σημαντικά μικρότερη (Εικόνα 31.Β). Αξίζει να σημειωθεί ότι η μειωμένη παραγωγή υδρογόνου που παρατηρείται μετά τη 14 ημέρα επώασης συνδυάζεται με πολύ χαμηλά επίπεδα ολικού φαινολικού φορτίου (εικόνα 30.Α).





Εικόνα 32. (Α) Κινητική κατανάλωσης O_2 και (Β) παραγωγής H_2 του μίγματος κατσίγαρου κατά την εναλλαγή ανοιχτών με κλειστά και πάλι ανοιχτά συστήματα.

Στα παραπάνω διαγράμματα (Εικόνα 32) φαίνεται η κατανάλωση του οξυγόνου (Εικόνα 32.Α) και η παραγωγή του υδρογόνου (Εικόνα 32.Β) κατά την εναλλαγή ανοιχτών με κλειστά και πάλι ανοιχτά συστήματα. Η παραγωγή υδρογόνου ξεκινά αμέσως μετά την

κατανάλωση του οξυγόνου. Ωστόσο η εναλλαγή ανοιχτών με κλειστά συστήματα είχε σαν αποτέλεσμα μειωμένη παραγωγή υδρογόνου (Εικόνα 32.Β) (που φθάνει το 33 mL/L κατσίγαρου) κάτι το οποίο πιθανώς να συνδέεται με το γεγονός ότι το ολικό φαινολικό φορτίο την 7η ήμερα, τη στιγμή που το ανοιχτό σύστημα γίνεται κλειστό έχει φθάσει σε χαμηλά επίπεδα (Εικόνα 30.Β).

Όλα αυτά υποστηρίζουν την αρχική υπόθεση εργασίας αυτής της ερευνητικής προσπάθειας, ότι η βιοαποικοδόμηση του τοξικού φαινολικού φορτίου του κατσίγαρου μπορεί να συνδυαστεί με την φωτοσυνθετική διαδικασία παραγωγής H_2, όπου οι φαινολικές ενώσεις παίζουν το ρόλο του «καυσίμου» για αυτή την διαδικασία, σύμφωνα με τον μηχανισμό που ανέδειξαν οι Papazi et al. (2012).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι γνωστό από πρόσφατες δημοσιεύσεις του Εργαστηρίου μας, ότι η βιοδιάσπαση των φαινολικών ενώσεων από τα μικροφύκη είναι μια εξαρτώμενη από το φώς βιοενεργητική διαδικασία που επηρεάζεται από τις συνθήκες ανάπτυξης, ιδιαίτερα από το επίπεδο της εξωγενούς παρεχόμενης ενέργειας ως οργανικού άνθρακα ή φωτός για την φωτοσυνθετική παραγωγή ενέργειας [Papazi and Kotzabasis 2007, 2008; Papazi et al. 2012; Papazi and Kotzabasis 2013] . Στα πλαίσια μίας καλλιέργειας μικροφυκών παρουσιάζεται ένα ενεργειακό ισοζύγιο, μεταξύ ανάπτυξης του χλωροφύκους και τοξικότητας της βιοδιασπώμενης ένωσης. Εάν η ένωση είναι πολύ τοξική τότε το μικροφύκος αποδίδει το μεγαλύτερο μέρος της διαθέσιμης ενέργειάς του στη βιοαποικοδόμηση και απλώς συντηρεί την ανάπτυξη (άμεση αποτοξικοποίηση). Όμως, όταν η φαινολική ένωση δεν εμφανίζει έντονη τοξικότητα, τότε το μικροφύκος αποδίδει ένα μικρότερο μέρος του ενεργειακού του αποθέματος (έως και καθόλου) στην βιοαποικοδόμηση και επενδύει όλα τα ενεργειακά του αποθέματα στην ανάπτυξή του. Με αυτό τον τρόπο μέσα σε λίγες ώρες/μέρες έχουμε ραγδαία αύξηση του αριθμού των κυττάρων στην καλλιέργεια και έτσι κάθε κύτταρο έχει πια να αντιμετωπίσει ένα πολύ μικρότερο αριθμό μορίων της ξενοβιωτικής ένωσης, που μπορεί πολύ πιο εύκολα σε μία δεύτερη φάση να την βιοαποικοδομήσει (έμμεση αποτοξικοποίηση) [Papazi et al., 2012; Papazi and Kotzabasis 2013]. Όλα τα παραπάνω δείχνουν σαφώς ότι τα μικροφύκη είναι μικρές και «έξυπνες βιοενεργητικές μηχανές››, που έχουν την ικανότητα να ‹‹υπολογίζουν›› συνεχώς τα αποθέματα ενέργειάς τους αλλά και την απαιτούμενη ενέργεια για την διάσπαση του ξενοβιώτη χρησιμοποιώντας την πιο συμφέρουσα ενεργειακά στρατηγική βιοαποικοδόμησης [Papazi and Kotzabasis 2007, 2008, 2013; Papazi et al., 2012] .

Οι Papazi and Kotzabasis (2013) έδειξαν ότι το πρώτο βήμα της βιοαποικοδόμησης των διχλωροφαινολών από το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus* είναι η αναγωγή τους. Η ανηγμένη μορφή των 2,3-, 2,5- και 3,4-διχλωροφαινολών, βάσει του οξειδοαναγωγικού τους δυναμικού, μπορεί να ενσωματωθεί στην αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, στη θέση της ουμπικινόνης, επάγοντας μεγάλη αναπνευστική δραστηριότητα (επαγωγή κυτοχρωμικού και εναλλακτικού μονοπατιού των μιτοχονδρίων – καθώς και της χλωροαναπνοής που εδράζει στο χλωροπλάστη) και κατ' επέκταση να δημιουργήσει συνθήκες ανοξίας (σε ένα κλειστό σύστημα) μέσα σε διάστημα λιγότερο από 24 ώρες. Παράλληλα η ανηγμένη μορφή των συγκεκριμένων διχλωροφαινολών ενσωματώνεται και στη φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων πριν από τη δεξαμενή της

πλαστοκινόνης (PQ), τροφοδοτώντας με ηλεκτρόνια - ως δότης ηλεκτρονίων - το PSI, παρεμποδίζοντας ολοκληρωτικά την ενεργότητα του PSII και κατ' επέκταση την παραγωγή O_2. Η μοναδική συγκυρία της συνδυαστικής δράσης ανοξίας και αποκλειστικής ενεργοποίησης του PSI, επάγει την υδρογενάση και την παραγωγή μεγάλων σε σύγκριση με τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα, H_2 [Papazi, et al. 2012]. Πρόκειται για μία βιοενεργητική στρατηγική του χλωροφύκους για τη βιοαποικοδόμηση των εν λόγω διχλωροφαινολών που δημιουργεί τις μοναδικές εκείνες συνθήκες που επιτρέπουν μία «πράσινη» βιοαποικοδόμηση τοξικών ενώσεων με την ταυτόχρονη παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων βιο-υδρογόνου (H_2) για περαιτέρω βιοτεχνολογική εκμετάλλευση.

Με δεδομένο ότι τα υγρά απόβλητα ελαιουργείων (κατσίγαρος) περιέχουν εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων (βλ. πίνακα 4), οι οποίες ουσιαστικά καθορίζουν και την τοξικότητα του κατσίγαρου, η αρχική ιδέα αυτής της εργασίας (σε αντίθεση με όλες τις προσπάθειες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα για την αποτοξικοποίηση του κατσίγαρου) ήταν να ελέγξουμε αν θα μπορούσαν οι εν λόγω φαινολικές ενώσεις του κατσίγαρου να βιοαποικοδομηθούν από το χλωροφύκος Scenedesmus obliquus, παίρνοντας υπόψη τη βιοενεργητική στρατηγική του να αποικοδομεί φαινολικές ενώσεις, όπως αναδείχθηκε από τους Papazi and Kotzabasis (2007, 2008). Ταυτόχρονα στα πλαίσια της υπόθεσης εργασίας που θέλαμε να ελέγξουμε ήταν να χρησιμοποιήσουμε την πιθανή βιοαποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων του κατσίγαρου από το χλωροφύκος ως «καύσιμο» για την παροχέτευση ηλεκτρονίων μέσω της φωτοσυνθετικής ροής ηλεκτρονίων στην υδρογενάση για την παραγωγή μοριακού υδρογόνου, σύμφωνα με τον μηχανισμό που περιέγραψαν πρόσφατα οι Papazi et al. (2012). Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνήσει ποιες είναι εκείνες οι συνθήκες που είναι δυνατόν να επιτρέψουν στα μικροφύκη (αναφερόμενοι ιδιαίτερα στο μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus*) την καλύτερη δυνατή αποικοδόμηση του συνόλου των φαινολικών ενώσεων στον κατσίγαρο και κατά συνέπεια την αποτοξικοποίησή του σε συνδυασμό με την παραγωγή μεγάλης ποσότητας μοριακού υδρογόνου χρησιμοποιώντας ως «καύσιμο» το φαινολικό φορτίο του ίδιου του κατσίγαρου.

Για να αποκλειστεί η τυχαιότητα του αποτελέσματος, η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε μεμονωμένα δείγματα κατσίγαρου από 14 διαφορετικά ελαιοτριβεία του Ελλαδικού χώρου, όπου παρά τις όποιες διαφοροποιήσεις μεταξύ τους, ανέδειξαν ξεκάθαρα κάποια γενικά συμπεράσματα που αφορούν όλα τα δείγματα κατσίγαρου, σχετικά με την αποικοδόμηση του ολικού φαινολικού φορτίου και με την παραγωγή μοριακού υδρογόνου (H_2).Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι

μπορούμε να πετύχουμε σαφώς μεγαλύτερα ποσοστά αποικοδόμησης του ολικού φαινολικού φορτίου στον κατσίγαρο (εικόνα 21) και παραγωγή μοριακού υδρογόνου (Εικόνες 22 και 25) παρουσία του μονοκύτταρου χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus* συγκριτικά με τον αντίστοιχο χειρισμό απουσία του χλωροφύκους, αλλά και το ότι το pH αποτελεί ένα πολύ σημαντικό παράγοντα τόσο στην αποικοδόμηση του ολικού φαινολικού φορτίου όσο και στην παραγωγή μοριακού υδρογόνου (Εικόνα 23). Όταν το όξινο pH (pH 4-5,5), που επικρατεί σε όλους τους κατσίγαρους που ελέγξαμε, διαμορφωθεί στο pH 6,5 τότε σε κλειστά συστήματα παρατηρούμε σημαντικά επίπεδα παραγωγής μοριακού υδρογόνου αλλά και μεγαλύτερα ποσοστά αποικοδόμησης του ολικού φαινολικού φορτίου του κατσίγαρου (Εικόνες 24 και 25).Με την παρούσα εργασία δείξαμε ξεκάθαρα ότι οι δύο διαδικασίες (παραγωγή H_2 και βιοαποικοδόμηση του τοξικού φαινολικού φορτίου) είναι ανταγωνιστικές καθώς η μεν αποικοδόμηση του ολικού φαινολικού φορτίου χρειάζεται την παρουσία οξυγόνου (λόγω της συμμετοχής (μονο)οξυγενασών στα βιοχημικά μονοπάτια βιοαποικοδόμησης των φαινολικών)) [Van Schie and Young, 2000; Semple and Cain, 1996], η δε παραγωγή μοριακού υδρογόνου για να ξεκινήσει χρειάζεται την επικράτηση συνθηκών ανοξίας [Papazi, et al. 2012]. Ένας από τους στόχους της παρούσας εργασίας ήταν να προτείνει ένα μοντέλο διαχείρισης του κατσίγαρου που να συνδυάζει τη βιοαποικοδόμηση του ολικού φαινολικού φορτίου του κατσίγαρου (αποτοξικοποίηση κατσίγαρου) με τη συνεχή παραγωγή εναλλακτικής μορφής ενέργειας όπως το μοριακό υδρογόνο (H_2) με τη μικρότερη δυνατή παρέμβαση.

Πειραματικές σειρές με κατσίγαρο που επωάστηκε σε κλειστά, αλλά και σε ανοικτά συστήματα έδειξαν ξεκάθαρα, ότι η βιοαποικοδόμηση του ολικού φαινολικού φορτίου σε ανοικτά συστήματα (παρουσία οξυγόνου) είναι πλήρης (100% αποικοδόμηση του ολικού φαινολικού φορτίου) ήδη την 7η ημέρα επώασης, παρουσία, αλλά και απουσία του μονοκύτταρου χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus* (Εικόνες 26,27). Όσον αφορά την παραγωγή υδρογόνου έχουμε μόνο στα κλειστά συστήματα και μάλιστα παρατηρήσαμε ότι το pH φαίνεται να επηρεάζει καθοριστικά την διαδικασία της παραγωγής υδρογόνου με το pH 6,5 να εξασφαλίζει τα υψηλότερα επίπεδα παραγωγής (εικόνα 28.Β). Στο χειρισμό απουσία του μονοκύτταρου χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus* η παραγωγή μοριακού υδρογόνου ήταν ίδια ή και μεγαλύτερη από την αντίστοιχη παρουσία του μονοκύτταρου χλωροφύκους (εικόνα 28). Οι αναπάντεχες αποδόσεις των χειρισμών κατσίγαρου χωρίς την προσθήκη μικροφυκών, μπορούν να εξηγηθούν μόνο με την ύπαρξη συγκεκριμένης χλωρίδας (χλωροφύκη, κυανοφύκη, βακτήρια, …) στον κατσίγαρο που παραμένει ανενεργός λόγω κυρίως του όξινου pH του κατσίγαρου. Μόλις διαφοροποιήσουμε το pH του

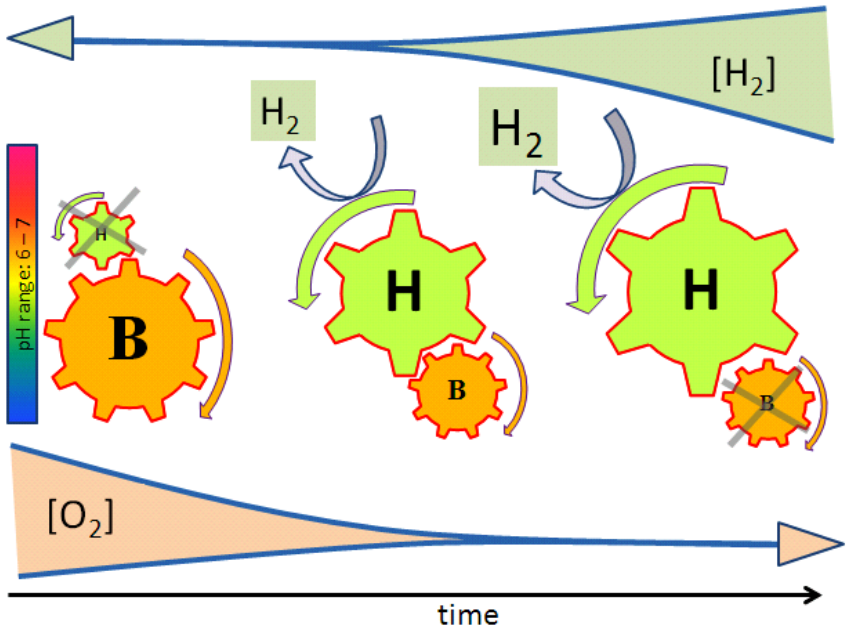
κατσίγαρου προς το ουδέτερο (pH:6,5), φαίνεται να ενεργοποιείται έντονα ο μεταβολισμός των εν λόγω οργανισμών (λόγω και του υψηλού οργανικού φορτίου του κατσίγαρου) επάγοντας τη βιοαποικοδόμηση των τοξικών φαινολικών ενώσεων και σε κλειστά συστήματα αυτός ο μεταβολισμός εγκαθιδρύει γρήγορα ανοξικές συνθήκες και επάγει την παραγωγή H_2. Η εξωγενής προσθήκη του χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus* συμβάλει σε αυτή τη διαδικασία, αλλά δεν είναι και απαραίτητη! Μάλιστα η αρνητική του συμβολή στην παραγωγή H_2, οφείλεται στο ότι οι χειρισμοί κατσίγαρου με το μικροφύκος παρουσιάζουν μεγαλύτερη φωτοσυνθετική δραστηριότητα (και ως εκ τούτου και παραγωγή O_2) καθυστερώντας την εγκαθίδρυση ανοξικών συνθηκών που είναι απαραίτητες για την παραγωγή H_2.

Για να επιβεβαιωθεί η παραπάνω αποδοχή, επαναλήφθηκε η ίδια πειραματική σειρά με αποστειρωμένο κατσίγαρο (κατσίγαρο με νεκρούς τους μικροοργανισμούς του) και τα αποτελέσματα έδειξαν ξεκάθαρα μηδενική βιοαποικοδόμηση του φαινολικού φορτίου, αλλά και μηδενική παραγωγή H_2, οπότε γίνεται σαφές ότι τόσο η αποικοδόμηση του τοξικού φαινολικού φορτίου, όσο και η παραγωγή H_2 είναι αποτέλεσμα του μεταβολισμού της μικροχλωρίδας του κατσίγαρου (Εικόνα 29).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα φαίνεται ότι δεν έχει τόσο σημασία η επιλογή του οργανισμού, όσο η επιλογή των κατάλληλων εκείνων συνθηκών που θα αλλάξουν το βιοενεργητικό ισοζύγιο και θα επιτρέψουν την ενεργοποίηση των απαραίτητων μεταβολικών μηχανισμών για τη βιοαποικοδόμηση των τοξικών ενώσεων και την παραγωγή H_2, κάτι το οποίο συμφωνεί με την αρχική υπόθεση εργασίας και τις αντίστοιχες βιβλιογραφικές αναφορές [Papazi and Kotzabasis, 2007; Papazi and Kotzabasis, 2008; Papazi et al., 2012; Papazi and Kotzabasis, 2013] .

Φαίνεται ότι η μικροχλωρίδα που φέρει ο κατσίγαρος είναι ικανή κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες να παράξει μοριακό υδρογόνο και να αποτοξικοποιήσει το φαινολικό φορτίο του. Ωστόσο παρόλο που η παρακολούθηση των μικροβιακών κοινοτήτων είναι μία από τις πιο θεμελιώδεις εργασίες για να κατανοήσουμε οποιαδήποτε διαδικασία βιολογικής αποκατάστασης, μόνο λίγες μελέτες με επίκεντρο τον προσδιορισμό της μικροχλωρίδας του κατσίγαρου έχουν διεξαχθεί [Ntougias et al., 2013]. Η αλληλούχιση του γονιδιώματος των μικροοργανισμών που εμπλέκονται στη αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων στον κατσίγαρο αλλά και όσων μπορούν να παράξουν μοριακό υδρογόνο μπορεί να μας δώσει μια καλύτερη εικόνα για τα μεταβολικά τους χαρακτηριστικά, την εξέλιξη τους αλλά και για τις πιθανές αλληλεπιδράσεις τους.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας το επίπεδο του οξυγόνου φαίνεται να είναι το κλειδί στον συνδυασμό της αποικοδόμησης του ολικού φαινολικού φορτίου στον κατσίγαρο και της παραγωγής μοριακού υδρογόνου, με τις δύο διαδικασίες να είναι ανταγωνιστικές. Η αποικοδόμηση του ολικού φαινολικού φορτίου στο κλειστό σύστημα συμβαίνει τη πρώτη ημέρα επώασης (εικόνα 26) όπου υπάρχει διαθέσιμο οξυγόνο στο σύστημα ενώ η παραγωγή υδρογόνου ξεκινάει αργότερα τη στιγμή που έχουν επικρατήσει συνθήκες υποξίας. Η ανταγωνιστική σχέση των δύο διαδικασιών φαίνεται σχηματικά στην εικόνα 33. Σύμφωνα με τα παραπάνω οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι οι δύο διαδικασίες δε μπορούν να γίνονται ταυτόχρονα και πως η απόδοσή τους είναι καλύτερη όταν εναλλάσσονται.



Εικόνα 33. *Γραφική απεικόνιση ανταγωνιστικής σχέσης μεταξύ αποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων και παραγωγής μοριακού υδρογόνου. Β: Βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων, Η: Φωτοσυνθετικός μηχανισμός παραγωγής υδρογόνου.*

Τα αποτελέσματα από την εναλλαγή των συστημάτων και συγκεκριμένα η εναλλαγή ανοιχτών με κλειστά συστήματα έδειξε μειωμένη παραγωγή υδρογόνου (εικόνα 32.Β) δεδομένου ότι τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή που κλείνει το σύστημα, το ολικό φαινολικό φορτίο βρίσκεται ήδη λόγω βιοαποικοδόμησης σε πολύ χαμηλά επίπεδα (Εικόνα 30.Β) κάτι το οποίο μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η παραγωγή του υδρογόνου πρέπει να προηγείται της αποικοδόμησης του ολικού φαινολικού φορτίου, επειδή η παρουσία φαινολικών ενώσεων είναι ζωτικής σημασίας για την παραγωγή μοριακού υδρογόνου

καθώς σε ανοξικές συνθήκες μπορούν να αποτελέσουν τον κύριο ηλεκτρονιοδότη στη φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων η οποία με τη σειρά της τα οδηγεί στην υδρογενάση για την παραγωγή H_2 [Papazi et al. 2012].

Η διαχείριση των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα για τις χώρες της Μεσογείου οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 95% της παραγωγής ελαιολάδου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φαίνεται πως το ίδιο το πρόβλημα ουσιαστικά μας δίνει και τη λύση. Η μικροχλωρίδα που διαθέτει ο κατσίγαρος (σε όλες τις δειγματοληψίες που κάναμε από διαφορετικά ελαιουργεία ανά την Ελλάδα) μπορεί στις κατάλληλες συνθήκες να παράξει μοριακό υδρογόνο εκμεταλλευόμενη το τοξικό φορτίο των φαινολικών ενώσεων και στη συνέχεια να βιοαποικοδομήσει πλήρως τις φανολικές ενώσεις στις οποίες οφείλονται πολλές από τις ανεπιθύμητες ιδιότητες του. Έτσι εξασφαλίζοντας την εναλλαγή των κατάλληλων συνθηκών (ρύθμιση pH, κλειστό ή ανοικτό σύστημα, κλπ), η ίδια η μικροχλωρίδα του κατσίγαρου μπορεί να αποτοξικοποιήσει τον κατσίγαρο και να παράξει μοριακό υδρογόνο το όποιο στο μέλλον πρόκειται να παίξει σημαντικό ρόλο στην εφαρμογή της βιώσιμης παραγωγής ενέργειας ιδιαίτερα όταν παράγεται από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας και από χαμηλών ενεργειακών απαιτήσεων διεργασίες όπως αυτές που παρουσιάζονται στη παρούσα εργασία.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δίνουν για πρώτη φορά την άμεση δυνατότητα χρήσης μίας μεθόδου πλήρους αποτοξικοποίησης του κατσίγαρου στον τόπο παραγωγής του (στο κάθε ελαιοτριβείο), με ταυτόχρονη παραγωγή μεγάλης ποσότητας υδρογόνου που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί επίσης άμεσα ως πηγή ενέργειας. Εκτός από την περιβαλλοντική συμβατότητα της μεθόδου, αλλά και τη βιωσιμότητα μίας τέτοιας εφαρμογής στα πλαίσια μίας πράσινης βιοτεχνολογικής προσέγγισης, η σχέση κόστους/κέρδους διαφαίνεται να είναι ιδιαίτερα δελεαστική και εγγυάται την ευρεία χρήση της στο μεσογειακό χώρο και ιδιαίτερα εδώ στην Κρήτη στο άμεσο μέλλον.

Συμπεράσματα

- Το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* είναι σε θέσει να βιοαποικοδομήσει το τοξικό φαινολικό φορτίο του κατσίγαρου και να παράξει υδρογόνο.
- Η αύξηση του pH του Κατσίγαρου (με ή χωρίς την προσθήκη του μικροφύκους) σε τιμές ίσες ή μεγαλύτερες από το pH:6,5, ενεργοποιεί το μεταβολισμό της μικροχλωρίδας που φέρει ο κατσίγαρος με αποτέλεσμα και να βιοαποικοδομήσει πλήρως μέσα σε λίγες ημέρες το φαινολικό φορτίο του (αποτοξικοποίηση κατσίγαρου) και να παράξει μοριακό υδρογόνο (H_2).

- Η βιοαποικοδόμηση των φαινολικών και η παραγωγή υδρογόνου από τη μικροχλωρίδα του κατσίγαρου είναι δύο ανταγωνιστικές διαδικασίες. Η μεν πρώτη απαιτεί οξυγόνο (ανοικτά συστήματα) ή δε δεύτερη ανοξικές συνθήκες (κλειστά συστήματα).
- Η παραγωγή του υδρογόνου, που λαμβάνει χώρα σε κλειστό σύστημα, πρέπει να προηγείται της αποικοδόμησης του ολικού φαινολικού φορτίου, επειδή η παρουσία φαινολικών ενώσεων είναι ζωτικής σημασίας για την παραγωγή μοριακού υδρογόνου καθώς σε ανοξικές συνθήκες μπορούν να αποτελέσουν τον κύριο ηλεκτρονιοδότη στη φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων η οποία με τη σειρά της τα οδηγεί στην υδρογενάση για την παραγωγή H_2.
- Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δίνουν για πρώτη φορά την άμεση δυνατότητα χρήσης μίας μεθόδου πλήρους αποτοξικοποίησης του κατσίγαρου στον τόπο παραγωγής του (στο κάθε ελαιοτριβείο), με ταυτόχρονη παραγωγή μεγάλης ποσότητας υδρογόνου που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί επίσης άμεσα ως πηγή ενέργειας. Εκτός από την περιβαλλοντική συμβατότητα της μεθόδου, αλλά και τη βιωσιμότητα μίας τέτοιας εφαρμογής στα πλαίσια μίας πράσινης βιοτεχνολογικής προσέγγισης, η σχέση κόστους/κέρδους διαφαίνεται να είναι ιδιαίτερα δελεαστική και εγγυάται την ευρεία χρήση της στο μεσογειακό χώρο και ιδιαίτερα εδώ στην Κρήτη στο άμεσο μέλλον.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aaronson S., Berner T., Dubinsky Z. *(1980). Algal biomass: Production and Use. Shelef, G. Soeder, C.J. (ed.) Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. p.575-601 ISBN: 0444802428.*

Aggelis G., Iconomou D., Christou M., Bocas D., Kotzailias S., Christou G., Tsagou V., Papnikolaou S. (2003). *Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using Pleurotus ostreatus in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. Water Research 37(16): 3897-3904.*

Aktas E.S., Imre S., Ersoy L. *(2001). Characterization and lime treatment of olive mill wastewater. Water Research 35 (9): 2336-2340.*

Aliotta G., Fiorentino A., Oliva A., Temussi F. (2002). *Olive oil mill wastewater: Isolation of polyphenols and their phytotoxicity in vitro. Allelopathy Journal 9(1): 9-17.*

Al-Malah K., Azzam M.O.J., Abulai N.I. (2000). *Olive mills effluent (OME) wastewater post-treatment using activated clay. Separ. Purif. Technol. 20: 225-234.*

Angelidaki I., Ahring B.K. (1997). *Codigestion of olive mill wastewaters with manure, household waste or sewage sludge. Biodegradation 8: 221-226.*

Benitez F.J., Beltran-Heredia J., Torregrosa J., Acero J.L. *(1997)b. Aerobic degradation of olive mill wastewaters. Applied Microbiology and Biotechnology 47: 185-188.*

Benitez F.J., Beltran-Heredia J., Torregrosa J., Acero J.L. *(1999). Treatment of olive mill wastewaters by ozonation, aerobic degradation and the combination of both treatments. J. Chem. Technol. Biotechnol. 74: 639-646.*

Ben Sassi A., Boularbah A., Jaouad A., Walker G., Boussaid A. *(2006). A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco. Process Biochemistry 41(1): 74-78.*

Bianchi G.(2003). Lipids and phenols in table olives. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 105: 229-242.

Bishop L., Senger H. (1971). *Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of Scenedesmus.* San Pietro, A. (ed.) *Methods in Enzymology*. Academic Press. p.130–143 ISBN: 978-0-12-803048-6.

Boskou G., Salta F., Chrysostomoy S., Mylona A., Chiou A., Andrikopoulos N., *Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. Food Chemistry 94: 558-564*

Butler G.L., Deason T.R., O'Kelley J.C. (1975). *Loss of five pesticides from cultures of twenty-one planktonic algae.* Bulletin of Environmental Contamination Toxicology 13(2): 149-152.

Capasso R., Cristinzio G., Evidente A., Scognamiglio F. *(1992). Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste waters. Phytochemistry 31(12): 4125-4128.*

Catalanotti C, Yang W. M.C. Posewitz, and A.R. Grossman. *(2013). Fermentation metabolism and its evolution in algae. Frontiers in plant science, 4(May): 150.*

Chiou, Nikolaos K. Andrikopoulos. *(2006). Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. Food Chemistry 94: 558–564.*

Daassi D., Lozano-Sanchez J., Borras-Linares I., Belbahri L., Woodward S., Zouari-Mechichi H., Mechichi T., Nasri M., Segura-Carretero A. (2014). *Olive oil mill wastewaters: Phenolic content characterization during degradation by Coriolopsis gallica.* Chemosphere 113: 62-70.

Diaz E. (2004). *Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility.* International Microbiology 7(3): 173-180.

D´ Annibale A., Casa R., Pierucceti F., Ricci M., Marabottini R. (2004). *Lentinula edodes removes phenols from olive – mill wastewater: impact on durum wheat (Triticim durum Desf.) germinability.* Chemosphere 54(7): 887-894.

De Marco E., Savarese M., Paduano A., Sacchi R. (2007). *Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. Food Chemistry 104: 858-867.*

Ellis B.E. (1977). *Degradation of phenolic compounds by fresh-water algae.* Plant Science Letters 8(3): 213-216.

Eroglu E., Gunduz U., Yucel M., Turker L., Eroglu I. *(2004). Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source. Int J Hydrogen Energy 29: 163-171.*

Fadil K., Chahlaoui A., Ouahbi A., Zaid A., Borja R. (2003). *Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry.* International Biodeterioration and Biodegradation 51(1): 37-41.

Fiesta 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): 101-106.

Florin, L., Tsokoglou, a & Happe, T. *(2001). A novel type of iron hydrogenase in the green alga Scenedesmus obliquus is linked to the photosynthetic electron transport chain. The Journal of biological chemistry, 276(9): 6125–32.*

Gaffron, H. & Rubin, J. *(1942). Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. The Journal of general physiology, 26(2): 219–40.*

Giannes A., Diamadopoulos E., Ninolakis M. *(2003). Electrochemical treatment of olive oil mill wastewater using a Ti/Ta/Pt/Ir electrode. Proc. 3rd Int. Conf. on Oxidation technologies for Water and Wastewater treatment pp. 527-530.*

Graham N., Jiang C.C., Li X.Z., Jiang J.Q., Ma J. (2004). *The influence of pH on the degradation of phenol and chlorophenols by potassium ferrate.* Chemosphere 56(10): 949-56.

Happe T., Naber JD. *(1993). Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga Chlamydomonas reinhardtii. Eur J Biochem 214: 475-481.*

Hemschemeier A, Melis A, Happe T. *(2009.) Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae. Photosynthesis Research 102 (2):523-540.*

James M.O., Fouts J.R., Bend J.R. (1977). *Xenobiotic metabolizing enzymes in marine fish* Kahn. Springer US, Plenum Press, New York 171–189 ISBN: 978-1-4684-2870-4.

Jankevicius K., Pakal-Nis R., Baranauskiene A., Juknevicius L., Jankaviciute G. (1992). *Effects of petroleum products polluting the Baltic Sea upon vital activity of plankton and the role of hydrobacteria as self-cleaning factor in water.* Ekologia 4: 35–52.

Janssen D.B., Dinkla I.J., Poelarends G.J., Terpstra P. (2005). *Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities.* Environmental Microbiology 7(12): 1868-1882.

Jarboui R., Sellami F., Kharroubi A., Gharsallah N., Ammar E. (2008). *Olive mill wastewater stabilization in open-air ponds: Impact on clay–sandy soil.* Bioresource Technology 99(16): 7699–7708.

Jiang L., Ruan Q., Li R., Li T. (2012). *Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of Acinetobacter sp. BS8Y.* Journal of Basic Microbiology 53(3): 224-230.

Karpouzas D.G., Ntougias S., Iskidou E., Rousidou C., Papadopoulou K.K., Zervakis G.I., Ehaliotis C. *(2010). Olive mill wastewater affects the structure of soil bacterial communities. Applied Soil Ecology 45(2): 101-111.*

Kestioglou K., Yonar T., Azbar N. *(2005). Feasibility of physiochemical treatment and advanced oxidation processes (AOPs) as ameans of pre-treatment of olive mill effluent (OME). Process Biochemistry 40: 2409-2416.*

Klekner V., Kosaric N. (1992). *Degradation of phenols by algae.* Environmental Technology 13(5): 493-501.

Kobayashi H., Rittmann B.E. (1982). *Microbial removal of hazardous organic compounds.* Environmental Science and Technology 16(3): 170-183.

Kotronarou N., Méndez M. (2003). *IMPEL Olive Oil Project.* European Union Network for the Implementation and Enforcement of Environmental Law.

Kotsou M., Mari I., Lasaridi K., Chatzipavlidis I., Balis C., Kyriacou A. (2004). *The effect of olive oil mill wastewater (OMW) on soil microbial communities and suppressiveness against Rhizoctonia solani.* Applied Soil Ecology 26(2): 113-121.

Leouifoudi I., Zyad A., Amechrouq A., Oukerrou M.A., Mouse H.A., Mbarki M. *(2014). Identification and characterisation of phenolic compounds extracted from Moroccan olive mill wastewater. Food Science and Technology 34(2): 249-257.*

Linares A., Caba J.M., Ligero F., De la Rubia T., Martinez J. (2003). *Detoxification of semisolid olive-mill wastes and pine-chip mixtures using Phanerochaete flavido-alba.* Chemosphere 51(9): 887-891.

Lipthay J., Barkay T., SÖrensen S. *(2001).Enhanced degradation of phenoxyacetic acid in soil by horizontal transfer of the tfdA gene encoding a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dioxygenase. FEMS Microbiology Ecology 35: 75-84.*

Logothetis K., Dakanali S., Ioannidis N., Kotzabasis K. (2004). *The impact of high CO2 concentration on the structure and function of the photosynthetic apparatus and the role of polyamines.* Journal of Plant Physiology 161(6): 715-724.

Mahmoud M., Janssen M., Haboub N., Nassour A., Lennartz B. (2010). *The impact of olive mill wastewater application on flow and transport properties in soils.* Soil and Tillage Research 107(1): 36-41.

Margesin R., Fonteyne P.A., Redl B. (2005). *Low-temperature biodegradation of high amounts of phenol by Rhodococcus spp. and basidiomycetous yeasts.* Research in Microbiology 156(1): 68-75.

Marques I.P., Teixeira A., Rodrigues L. *(1998). Anaerobic treatment of olive mill wastewater with diggested piggery effluent. Water Environ. Res. 70: 1056-1061.*

Melis, A. & Happe, T. (2001). *Hydrogen Production . Green Algae as a Source of Energy. Plant physiology, 127: 740–748.*

Meloa J.S., Kholib S., Patwardhanb A.W., D'Souza S.F. (2005). *Effect of oxygen transfer limitations in phenol biodegradation.* Process Biochemistry 40(2): 625-628.

Niaounakis M., Halvadakis C.P. (2006). *Olive Processing Waste Management,* Literature Review and Patent Survey 2nd Edition Pergamon ISBN: 0-08-044851-8.

Ntougias S., Bourtzis K. and Tsiamis G. *(2013). The Microbiology of Olive Mill Wastes. Review Article BioMed Research International Volume 2013, Article ID 784591, 16 pages* http://dx.doi.org/10.1155/2013/784591.

Oswald W., Gotaas H. (1957). *Photosynthesis in sewage treatment.* Transactions of the American Society of Civil Engineers 122: 73-105.

Papazi A., Assimakopoulos K., Kotzabasis K. (2012). *Bioenergetic strategy for the biodegradation of p-cresol by the unicellular green alga Scenedesmus obliquus.* PLoS One 7: e51852.

Papazi A., Gjindali A., Kastanaki E., Assimakopoulos K., Stamatakis K., Kotzabasis K. *(2014). Potassium deficiency, a "smart" cellular switch for sustained high yield hydrogen production by the green alga Scenedesmus obliquus. International journal of Hydrogen Energy 39: 19452-19464.*

Papazi A., Kotzabasis K. (2007). *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(4): 706-716.

Papazi A., Kotzabasis K. (2008). *Inductive and resonance effects of substituents adjust the microalgal biodegradation of toxical phenolic compounds.* Journal of Biotechnology 135(4): 366-373.

Papazi A., Kotzabasis K. (2013). *''Rational'' Management of Dichlorophenols Biodegradation by the Microalga Scenedesmus obliquus.* PLoS One 8: e61682.

Paraskeva C.A., Papadakis V.G., Tsarouchia E., Kanellopoulou D.G., Koutsoukos P.G. (2007). Membrane processing for olive mill wastewater fractionation. Desalination 213: 218-229.

Paredes C., Cegarra J., Bernal M.P., Roig A. *(2003). Use of olive mill wastewater for composting of organic wastes and the effect of the compost on plant yield and soil properties. Proc 2nd Eur Bioremediation Conf. Chania, pp. 563-566.*

Pinto G. Pollio A., Previtera L., Temussi F. (2002). *Biodegradation of Phenols by microalgae.* Biotechnology Letters 24(24): 2047-2051.

Potoglou D., Kouzeli-Katsiri A., Haralambopoulos D. *(2004).* Solar distillation of olive mill wastewater. Renew Energy 29: 569-579.

Rivas J.F., Beltran F.J., Gimeno O., Acedo B. *(2001). Wet air oxidation of wastewater from olive oil mills. Chem. Eng. Techno.l 24: 415-421.*

Roig A., Cayuela M.L., Sanchez-Monedero M.A. *(2006). An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. Waste Management 26: 960-969.*

Saez L., Perez J., Martinez J. (1992). *Low molecular weight phenolics attenuation during simulated treatment of wastewaters from olive oil mills in evaporation ponds.* Water Research 26(9): 1261-1266.

Sampedro I., Romero C., Ocampo J.A., Brenes M., Garcia I. *(2004). Removal of Monomeric Phenols in Dry Mill Olive Residue by Saprobic Fungi. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(14): 4487-4492.*

Sarika R., Kalogerakis N., Mantzavinos D. *(2005). Treatment of olive mill effluents, Part II: Complete removal of solids by direct flocculation with polyelectrolytes. Environmental International 31(2): 297-304.*

Semple K.T and R.B. Cain. *(1996). Biodegradation of phenols by the alga Ochromonas danica. Appl Environ. Microbiol. 62(4): 1265–1273. PMCID: PMC167892.*

Senger H., Brinkmann G. (1986). *Protochlorophyll(ide) accumulation and degradation in the dark and photoconversion to chlorophyll in the light in pigment mutant C-2A' of Scenedesmus obliquus. Physiologia Plantarum 68(1): 119-124.*

Singleton V.L., Rossi J.A. (1965). *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. American Journal of Enology and Viticulture 16(3): 144-158.

Tikoo V., Scragg A.H., Shales S.W. (1997). *Degradation of pentachlorophenol by microalgae.* Journal of Chemical Technology and Biotechnology 68(4): 425-431.

Tsagaraki, E., Lazarides, H. N. and Petrotos, K. B. (2006). *˝Olive Mill Wastewater Treatment˝. In: Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry, Springer US edition:133-157.*

Van Schie PM, Young LY. (2000). *Biodegradation of Phenol: Mechanisms and Applications. Bioremediation Journal 4: 1-18.*

Visioli, F., Vinceri, F. F. and Galli, C. *(1995) .˝Waste water from olive oil production are rich in natural antioxidants˝, Experimentia, 51: 32-34.*

Vlyssides A.G., Loizides M., Karlis P.K. *(2004). Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. Journal of Cleaner Production 12: 603-611.*

Warshawsky D., Cody T., Radike M., Reilman R., Schumann B., La Dow K., Schneider J. (1995). *Biotransformation of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light.* Chemico-Biological Interactions 97(2): 131-148.

Warshawsky D., Radike M., Jayasimhulu K., Cody, T. (1988). *Metabolism of benzo(a)pyrene by a dioxygenase enzyme system of the freshwater green alga Selenastrum capricornutum.* Biochemical and Biophysical Research Communications 152(2): 540-544.

Zervakis G., Balis C. (1996). *Bioremediation of olive oil mill wastes through the production of fungal biomass.* Royse D.J. *Mushroom Biology and Mushroom Products.* Pennsylvania State University p.311-323. ISBN: 1-883956-01-3.

Βορεάδου Α., (1993). *'Επιπτώσεις Υγρών Αποβλήτων των Ελαιουργείων στα οικοσυστήματα των τρεχούμενων νερών της Κρήτης'. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης- Τμήμα Βιολογίας, Ηράκλειο.*

Δερβίσης Σ. (2004). *Αποικοδόμηση Αποβλήτων των Διφασικών Ελαιουργείων Χρησιμοποιώντας Υπέρηχους και Συγκριτική Ανάλυση Αποβλήτων Ελαιουργείων με τις Μεθόδους Χημειοφωταύγειας και Folin-Ciocalteu.* Διπλωματική Εργασία, Χανιά Κρήτης.

Κουσέρη Ε. (2008). *Συνεισφορά εντός κοίτης αποθέσεων κατσίγαρου στην ποιότητα του ποταμού Ευρώτα.* Διπλωματική Εργασία, Χανιά Κρήτης.

Λοϊζίδης Μ. (2009). *Επεξεργασία υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη μέθοδο της συγχουμοποίησής τους με πυρηνόξυλο.* Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα.

Μπαλατσούρας Γ. Δ. *(1997). Το Ελαιόδενδρο. Πελεκάνος p.409 ISBN: 960-400-060-8.*

Μπλίκα Π. (2009). *Βιοτεχνολογικές Μέθοδοι Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου.* Διδακτορική Διατριβή, Πάτρα.

Οιχαλιώτης Κ. και Ζερβάκης Γ. *(1999). ΄΄Τα απόβλητα και παραπροϊόντα των ελαιοτριβείων δύο και τριών φάσεων: Μια αξιολόγηση της υφιστάμενης κατάστασης΄΄, Ελιά & Ελαιόλαδο, 14: 52-59.*

Πατώνη Μ. (2010). *Μελέτη αναερόβιας βιοαποδόμησης υγρών αποβλήτων υψηλού COD με ηλεκτρολυτική προεπεξεργασία.* Διδακτορική Διατριβή, Χανιά Κρήτης.