



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

Τμήμα  
Χημικών  
Μηχανικών

# ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΒΙΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ



ΑΘΑΝΑΣΙΑ ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ

Οκτώβριος 2023



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

Τμήμα  
Χημικών  
Μηχανικών



ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ – ΠΟΛΥΤΕΧΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

## ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΒΙΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ  
ΑΘΑΝΑΣΙΑΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΜΙΧΑΗΛ ΚΟΡΝΑΡΟΣ

ΠΑΤΡΑ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2023

1. Το σύνολο της εργασίας αποτελεί πρωτότυπο έργο, παραχθέν από τον συγγραφέα της, και δεν παραβιάζει δικαιώματα τρίτων καθ' οιονδήποτε τρόπο,
2. Εάν η εργασία περιέχει υλικό, το οποίο δεν έχει παραχθεί από τον συγγραφέα, αυτό είναι ευδιάκριτο και αναφέρεται ρητώς εντός του κειμένου της εργασίας ως προϊόν εργασίας τρίτου, σημειώνοντας με παρομοίως σαφή τρόπο τα στοιχεία ταυτοποίησής του, ενώ παράλληλα βεβαιώνεται πως στην περίπτωση χρήσης αυτούσιων γραφικών αναπαραστάσεων, εικόνων, γραφημάτων κλπ., έχει ληφθεί η χωρίς περιορισμούς άδεια του κατόχου των πνευματικών δικαιωμάτων για την συμπερίληψη και επακόλουθη δημοσίευση του υλικού αυτού.



## 1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2022 – 2023 στο εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Πανεπιστημίου Πατρών.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Μιχάλη Κορνάρο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να είμαι μέλος της εργαστηριακής του ομάδας. Επίσης, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Ειρήνη Σβεντζούρη, η οποία ήταν στο πλευρό μου οποτεδήποτε την χρειαζόμουν και με υπομονή με καθοδηγούσε κατά τη διάρκεια αυτής της χρονιάς. Ευχαριστώ ακόμα όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για τη διαρκή εκπαίδευση και εμπιστοσύνη που μου έδειξαν.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τους γονείς μου, τα αδέρφια μου και τις φίλες μου για τους οποίους προσπαθώ να είμαι η καλύτερη εκδοχή του εαυτού μου.

## 2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα πλαστικά υλικά είναι άρρηκτα συνδεδεμένα με τις ανάγκες των σύγχρονων κοινωνιών. Η χρήση ωστόσο των συμβατικών πλαστικών πετροχημικής προέλευσης είναι ανεξέλεγκτη και η συσσώρευσή τους στο περιβάλλον αναγνωρίζεται ως μία από τις πιο κρίσιμες περιβαλλοντικές προκλήσεις. Κάθε χρόνο παράγονται εκατομμύρια τόνοι πλαστικών καθιστώντας αναγκαία την εύρεση εναλλακτικών και βιώσιμων πλαστικών υλικών. Μια υποσχόμενη εναλλακτική έναντι των συμβατικών πλαστικών είναι τα βιοδιασπώμενα πολυμερή βιολογικής προέλευσης όπως οι πολυ(υδροξυ αλκανοϊκοί) εστέρες (PHAs). Αρκετές μελέτες αναφέρουν την παραγωγή PHAs από μικροφύκη και κυανοβακτήρια. Ωστόσο, η παραγωγή PHAs από φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς σε βιομηχανική κλίμακα είναι περιορισμένη εξαιτίας του υψηλού κόστους. Η αξιοποίηση των αποβλήτων ως μέσο ανάπτυξης για την καλλιέργεια των μικροφυκών μπορεί να συμβάλλει στη μείωση του κόστους παραγωγής έως 50%.

Στο πλαίσιο αυτό, αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη παραγωγής βιοδιασπώμενων βιοπλαστικών από μικροφύκη χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τη χωνεμένη ιλύ που προκύπτει από τη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα είδη *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum oleofaciens*, *Chlorella minutissima*, *Euglena gracilis* και *Chromochloris zofingiensis* για την ενδοκυτταρική συσσώρευση πολυ(3 – υδροξυβουτυρικού) εστέρα (PHB). Τα είδη αυτά καλλιεργήθηκαν μιζότροφα σε κωνικές φιάλες των 500 mL υπό ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (400  $\mu\text{mol}$  φωτονίων  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 25 °C και 0.5 L αέρα  $\text{min}^{-1}$ ), ενώ το υπόστρωμα της καλλιέργειας αποτέλεσε η αραιωμένη απορροή της αναερόβιας χώνευσης αγροκτηνοτροφικών αποβλήτων. Παράλληλα με την παραγωγή του PHB μελετάται και η βιοεξυγίανση του συγκεκριμένου αποβλήτου.

Από τα πέντε είδη μικροφυκών που καλλιεργήθηκαν φαίνεται πως όλα είναι ικανά για συσσώρευση πολυ(3 – υδροξυβουτυρικού) εστέρα. Ωστόσο, την καλύτερη και πιο πολλά υποσχόμενη ανάπτυξη παρουσίασε το είδος *Chlorella minutissima* αφού παρήγαγε την υψηλότερη συγκέντρωση βιομάζας ( $2.60 \pm 0.17 \text{ g L}^{-1}$ ), χλωροφυλλών ( $44.19 \pm 2.36 \text{ mg L}^{-1}$ ), καροτενοειδών ( $9.81 \pm 1.13 \text{ mg L}^{-1}$ ) και βιοπλαστικού ( $20.24 \pm 3.28 \text{ mg L}^{-1}$ ). Αναφορικά με τη βιοεξυγίανση του αποβλήτου, πολύ καλά αποτελέσματα παρουσίασαν τα είδη *Chlorella vulgaris*, *Chlorella minutissima*, *Chlorococcum oleofaciens* και *Euglena gracilis*. Στα τέσσερα αυτά είδη η απομάκρυνση του COD έφτασε ποσοστά της τάξης του 62%, 37%, 30% και 40%, αντίστοιχα. Το ολικό άζωτο απομακρύνθηκε από το υπόστρωμα κατά 93%, 98%, 92% και 88% για κάθε είδος, ενώ ο ολικός φώσφορος κατά 93%, 100%, 100% και 88%, αντίστοιχα. Τέλος, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα είδη, το είδος *Chromochloris zofingiensis* απέτυχε να εγκλιματιστεί στο συγκεκριμένο υπόστρωμα. Πιθανή εξήγηση ίσως να αποτελεί η υψηλή συγκέντρωση αμμωνιακού αζώτου στο υπόστρωμα της καλλιέργειας που έχει δειχθεί ότι δρα παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη του *C. zofingiensis*.

### 3. SUMMARY

Plastic materials are strongly associated with the needs of modern societies. Unfortunately, there is a rampant use of petrochemical plastics, and their accumulation in the environment is one of the most critical environmental challenges. Millions of tons of plastics are produced every year and now more than ever, there is an urgent need for alternative and sustainable plastic materials. A promising alternative to conventional plastics is biodegradable polymers of biological origin such as poly (hydroxy alkanoate) esters (PHAs). Many studies report the production of PHAs from microalgae and cyanobacteria. However, the production of PHAs from photosynthetic microorganisms on an industrial scale is still limited due to its high operational cost. The use of wastewater as a culture medium can reduce the total production cost by up to 50%.

In this context, the objective of this thesis is the production of biodegradable bioplastics from microalgae cultivated in digestate, a byproduct of the process of anaerobic digestion. More specifically, *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum oleofaciens*, *Chlorella minutissima*, *Euglena gracilis* and *Chromochloris zofingiensis* were studied for the intracellular accumulation of polyhydroxybutyrate (PHB). These species were cultivated mixotrophically under controlled environmental conditions (400  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , 25 °C and 0.5 L air  $\text{min}^{-1}$ ), while diluted digestate from the anaerobic digestion of agricultural waste was used as a substrate for the cultivation. This study not only examines the PHB production but also the bioremediation of the substrate.

All five microalgae species were capable of polyhydroxybutyrate accumulation. However, the most promising growth was observed by *Chlorella minutissima* since it produced the highest biomass ( $2.60 \pm 0.17 \text{ g L}^{-1}$ ), chlorophylls ( $44.19 \pm 2.36 \text{ mg L}^{-1}$ ), carotenoids ( $9.81 \pm 1.13 \text{ mg L}^{-1}$ ) and bioplastic ( $20.24 \pm 3.28 \text{ mg L}^{-1}$ ) concentration. Satisfying bioremediation of the substrate was observed during the cultivation of *Chlorella vulgaris*, *Chlorella minutissima*, *Chlorococcum oleofaciens* and *Euglena gracilis*. These species managed to reduce the chemical oxygen demand of their cultures by 62%, 37%, 30% and 40% respectively. At the same time, high removal of total nitrogen (93%, 98%, 92% and 88% respectively) and total phosphorus (93%, 100%, 100% and 88% respectively) were observed. Finally, *Chromochloris zofingiensis* failed to adapt to the substrate used. This might be due to the high concentration of ammonium nitrogen in the culture medium that is reported to inhibit the growth of *C. zofingiensis*.

## 4. ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

|        |                                                                    |    |
|--------|--------------------------------------------------------------------|----|
| 1.     | ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....                                                      | 1  |
| 2.     | ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....                                                     | 2  |
| 3.     | SUMMARY .....                                                      | 3  |
| 4.     | ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....                                          | 4  |
| 5.     | ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΜΒΟΛΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ.....                           | 6  |
| 6.     | ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ .....                                            | 7  |
| 7.     | ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ .....                                            | 8  |
| 8.     | ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ .....                                       | 9  |
| 9.     | ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....                                               | 10 |
| 9.1    | ΣΥΜΒΑΤΙΚΑ ΠΛΑΣΤΙΚΑ .....                                           | 10 |
| 9.1.1  | ΑΡΝΗΤΙΚΕΣ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟΡΡΙΜΜΑΤΩΝ .....              | 11 |
| 9.2    | ΒΙΟΠΛΑΣΤΙΚΑ .....                                                  | 12 |
| 9.2.1  | ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ .....                                      | 12 |
| 9.2.2  | ΠΟΛΥ(ΥΔΡΟΞΥ ΑΛΚΑΝΟΪΚΟΙ) ΕΣΤΕΡΕΣ (PHAs) .....                       | 13 |
| 9.3    | ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ.....                                                     | 18 |
| 9.3.1  | ΚΥΡΙΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ .....                          | 18 |
| 9.3.2  | ΦΑΣΕΙΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ.....                                              | 18 |
| 9.3.3  | ΕΙΔΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ .....                                            | 19 |
| 9.3.4  | ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ.....                        | 21 |
| 9.3.5  | ΤΥΠΟΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ .....                                | 24 |
| 9.4    | ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ.....                           | 26 |
| 9.4.1  | ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ .....                                      | 26 |
| 9.4.2  | ΕΙΔΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΒΙΟΠΛΑΣΤΙΚΑ .....                     | 26 |
| 9.4.3  | ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΒΙΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ.....                           | 27 |
| 9.4.4  | ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΜΑΚΩΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΒΙΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ | 28 |
| 9.5    | ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΧΩΝΕΥΣΗ.....                                             | 30 |
| 9.5.1  | ΣΤΑΔΙΑ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΔΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑΣ ΧΩΝΕΥΣΗΣ .....            | 30 |
| 9.5.2  | ΑΠΟΡΡΟΗ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑΣ ΧΩΝΕΥΣΗΣ .....                                  | 31 |
| 9.6    | ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....                                               | 34 |
| 10.    | ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ .....                                      | 35 |
| 10.1   | ΥΛΙΚΑ .....                                                        | 35 |
| 10.1.1 | <i>Chlorella vulgaris</i> .....                                    | 35 |
| 10.1.2 | <i>Chromochloris zofingiensis</i> .....                            | 35 |
| 10.1.3 | <i>Chlorococcum oleofaciens</i> .....                              | 36 |
| 10.1.4 | <i>Chlorella minutissima</i> .....                                 | 37 |
| 10.1.5 | <i>Euglena gracilis</i> .....                                      | 38 |
| 10.2   | ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....                                            | 39 |
| 10.2.1 | ΜΕΤΡΗΣΗ pH .....                                                   | 39 |

|         |                                                                        |    |
|---------|------------------------------------------------------------------------|----|
| 10.2.2  | ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΠΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ .....                                       | 39 |
| 10.2.3  | ΜΕΤΡΗΣΗ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ .....                                                | 39 |
| 10.2.4  | ΜΕΤΡΗΣΗ ΧΗΜΙΚΑ ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (Chemical Oxygen Demand, COD) 40  |    |
| 10.2.5  | ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΦΩΣΦΟΡΟΥ .....                                          | 41 |
| 10.2.6  | ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΑΖΩΤΟΥ.....                                             | 41 |
| 10.2.7  | ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΟΡΓΑΝΙΚΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ (Total Organic Carbon, TOC).....      | 42 |
| 10.2.8  | ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ (Total Solids, TS) .....                        | 42 |
| 10.2.9  | ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΑΙΩΡΟΥΜΕΝΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ (Total Suspended Solids, TSS) ..... | 43 |
| 10.2.10 | ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΟΛΥ(3 – ΥΔΡΟΞΥΒΟΥΤΥΡΙΚΟΥ) ΕΣΤΕΡΑ (PHB) .....                  | 43 |
| 10.3    | ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ .....                                              | 45 |
| 10.4    | ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΑΚΑΣΙΑ .....                                          | 46 |
| 10.4.1  | ΠΡΟΕΠΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑΣ ΑΠΟΡΡΟΗΣ.....                                 | 46 |
| 10.4.2  | ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ.....                                        | 47 |
| 10.4.3  | ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ .....                                          | 49 |
| 11.     | ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ .....                                           | 51 |
| 11.1    | ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ .....            | 51 |
| 11.1.1  | <i>Chlorella minutissima</i> .....                                     | 51 |
| 11.1.2  | <i>Chlorella vulgaris</i> .....                                        | 53 |
| 11.1.3  | <i>Chlorococcum oleofaciens</i> .....                                  | 55 |
| 11.1.4  | <i>Euglena gracilis</i> .....                                          | 57 |
| 11.1.5  | <i>Chromochloris zoofingensis</i> .....                                | 59 |
| 11.2    | ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ .....                                               | 61 |
| 11.3    | ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΠΛΑΣΤΙΚΟΥ.....                                             | 63 |
| 12.     | ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....                                                     | 65 |
| 13.     | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....                                                      | 67 |
| 13.1    | ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ .....                                                     | 67 |
| 13.2    | ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ.....                                                       | 76 |

## 5. ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΜΒΟΛΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

| Σύμβολο/ Συντομογραφία | Επεξήγηση                                       |
|------------------------|-------------------------------------------------|
| DDT                    | Διχλωρο – διφαινυλο – τριχλωροαιθάνιο           |
| PCBs                   | Πολυχλωριωμένα διφαινύλια                       |
| PMMA                   | Πολυμεθακρυλικό μεθύλιο                         |
| ATP                    | Τριφωσφορική Αδενοσίνη                          |
| PBR                    | Φωτοβιοαντιδραστήρας (photobioreactor)          |
| $T_{opt}$              | Βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μικροφύ-<br>κους |

## 6. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

|                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Πίνακας 9.1: Σύγκριση μηχανικών ιδιοτήτων των P(3HB), PP και HDPE (McAdam et al., 2020) ..                     | 15 |
| Πίνακας 9.2: Παραγωγή PHAs από μικροφύκη υπό την έλλειψη θρεπτικών συστατικών (Mastropetros et al., 2022)..... | 27 |
| Πίνακας 9.3: Συνήθειες τροφοδοσίες στην διεργασία της αναερόβιας χώνευσης.....                                 | 32 |
| Πίνακας 10.1: Σύσταση μίγματος αντιδραστηρίων για τελικό όγκο 100 mL. ....                                     | 41 |
| Πίνακας 10.2: Σύσταση αντιδραστηρίου χώνευσης. ....                                                            | 42 |
| Πίνακας 10.3: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος (buffer solution).....                                            | 42 |
| Πίνακας 10.4: Σύσταση μέσου προκαλλιέργειών ανά είδος .....                                                    | 47 |
| Πίνακας 10.5: Συνθήκες διατήρησης των προκαλλιέργειών .....                                                    | 47 |
| Πίνακας 10.6: Συνθήκες διατήρησης των καλλιέργειών .....                                                       | 49 |

## 7. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

|                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Εικόνα 9.1:</b> Τύποι πλαστικών και οι χρήσεις τους (Plastic Oceans, 2021).....                                                                                                                                                                       | 10 |
| <b>Εικόνα 9.2:</b> Απεικόνιση της κατάταξης των πλαστικών σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση (European Bioplastics, 2022) .....                                                                                                                              | 12 |
| <b>Εικόνα 9.3:</b> Επί τοις εκατό παγκόσμια παραγωγή βιοπλαστικών ανά ήπειρο (European Bioplastics, 2022). .....                                                                                                                                         | 13 |
| <b>Εικόνα 9.4:</b> Συντακτικός τύπος των PHAs. Το η αναφέρεται στον αριθμό των μεθυλενίων και το X στον αριθμό των μονομερών στην πολυμερική αλυσίδα (μέχρι 35,000) (A. K. Singh et al., 2016) ...                                                       | 14 |
| <b>Εικόνα 9.5:</b> Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων βιοαποικοδόμησης βιοπλαστικών (Suzuki et al., 2020).....                                                                                                                                           | 16 |
| <b>Εικόνα 9.6:</b> Δείγματα PHA (υμένια (A) και pellets (B)) μετά από διαφορετικές περιόδους έκθεσης σε θαλάσσιο περιβάλλον (1: 3 – PHB, 2: συμπολυμερές 3 – PHB/3 – PHV) (Volova et al., 2010) .....                                                    | 17 |
| <b>Εικόνα 9.7:</b> Μικροβιακή καμπύλη ανάπτυξης (L. Wang et al., 2015) .....                                                                                                                                                                             | 19 |
| <b>Εικόνα 9.8:</b> Σχηματική αναπαράσταση της καμπύλης ρυθμού φωτοσύνθεσης – ακτινοβολίας που απεικονίζει τις τρεις ζώνες φωτός: (1) έλλειψη, (2) κορεσμός και (3) περιορισμός (Darvehei et al., 2018) .....                                             | 22 |
| <b>Εικόνα 9.9:</b> Επίδραση της θερμοκρασίας στον ρυθμό ανάπτυξης τεσσάρων μικροφυκών (Ras et al., 2013).....                                                                                                                                            | 23 |
| <b>Εικόνα 9.10:</b> Τύποι συστημάτων καλλιέργειας μικροφυκών. (1) πλαστικοί σάκοι 300L, (2) επίπεδοι φωτοαντιδραστήρες, (3) οριζόντιοι σωληνωτοί φωτοβιοαντιδραστήρες και (4) ανοιχτή δεξαμενή τύπου raceway (Markou & Nerantzis, 2013) .....            | 25 |
| <b>Εικόνα 9.11:</b> Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της αναερόβιας χώνευσης.....                                                                                                                                                                      | 30 |
| <b>Εικόνα 10.1:</b> Το μικροφύκος <i>Chlorella vulgaris</i> (Micropia.nl) .....                                                                                                                                                                          | 35 |
| <b>Εικόνα 10.2:</b> Το μικροφύκος <i>Chromochloris zofingiensis</i> σε αυτότροφη ανάπτυξη (αριστερά) και μιξότροφη ανάπτυξη (δεξιά) (Wood et al., 2022) .....                                                                                            | 36 |
| <b>Εικόνα 10.3:</b> Το μικροφύκος <i>Chlorococcum oleofaciens</i> σε πρώιμη (A) και ώριμη (B) φάση ανάπτυξης, (C) ώριμο κύτταρο και διαφανές άχρωμο έλαιο (Y. I. Maltsev & Konovalenko, 2017) ...                                                        | 37 |
| <b>Εικόνα 10.4:</b> Το μικροφύκος <i>Chlorella minutissima</i> (CCALA).....                                                                                                                                                                              | 37 |
| <b>Εικόνα 10.5:</b> Κύτταρο του <i>Euglena gracilis</i> (Barsanti et al., 2012) .....                                                                                                                                                                    | 38 |
| <b>Εικόνα 10.6:</b> Διαλυμένες χρωστικές σε διαλύτη διμεθυλοφορμαμίδιο των μικροφυκών <i>Chlorella minutissima</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Euglena gracilis</i> , <i>Chlorococcum oleofaciens</i> και <i>Chromochloris zofingiensis</i> . ..... | 40 |
| <b>Εικόνα 10.7:</b> Φίλτρα GF/ F στους 105 °C με βιομάζα από τις προκαλλιέργειες των <i>Chlorella minutissima</i> και <i>Chlorococcum oleofaciens</i> . .....                                                                                            | 43 |
| <b>Εικόνα 10.8:</b> Αποπολυμερισμός του πολυ(3 – υδροξυβουτυρικού) εστέρα (Parodi et al., 2021) 44                                                                                                                                                       | 44 |
| <b>Εικόνα 10.9:</b> Φιαλίδια GC vials με τη φάση του χλωροφορμίου για οχτώ είδη μικροφυκών .....                                                                                                                                                         | 44 |
| <b>Εικόνα 10.10:</b> Πειραματική διάταξη συστήματος: 1) Κωνικές φιάλες καλλιέργειας μικροφυκών, 2) Αερόθερμο, 3) Θερμοστάτης, 4) Αντλίες αέρα, 5) Λαμπτήρες LED .....                                                                                    | 45 |
| <b>Εικόνα 10.11:</b> Διήθηση υπό κενό της απορροής αναερόβιας χώνευσης αγροκτηνοτροφικών αποβλήτων με φίλτρο υάλου GF/ F με μέση διάμετρο πόρων 0.7 μm. ....                                                                                             | 46 |
| <b>Εικόνα 10.12:</b> Στατικές αυτότροφες καλλιέργειες συντήρησης .....                                                                                                                                                                                   | 48 |
| <b>Εικόνα 10.13:</b> Προκαλλιέργειες των ειδών <i>Chlorella minutissima</i> (αριστερά) και <i>Euglena gracilis</i> (δεξιά).....                                                                                                                          | 48 |
| <b>Εικόνα 10.14:</b> Καλλιέργειες των (a) <i>Chromochloris zofingiensis</i> , (b) <i>Chlorella minutissima</i> (αριστερά) και <i>Euglena gracilis</i> (δεξιά), (c) <i>Euglena gracilis</i> και (d) <i>Chlorococcum oleofaciens</i> .....                 | 50 |

## 8. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

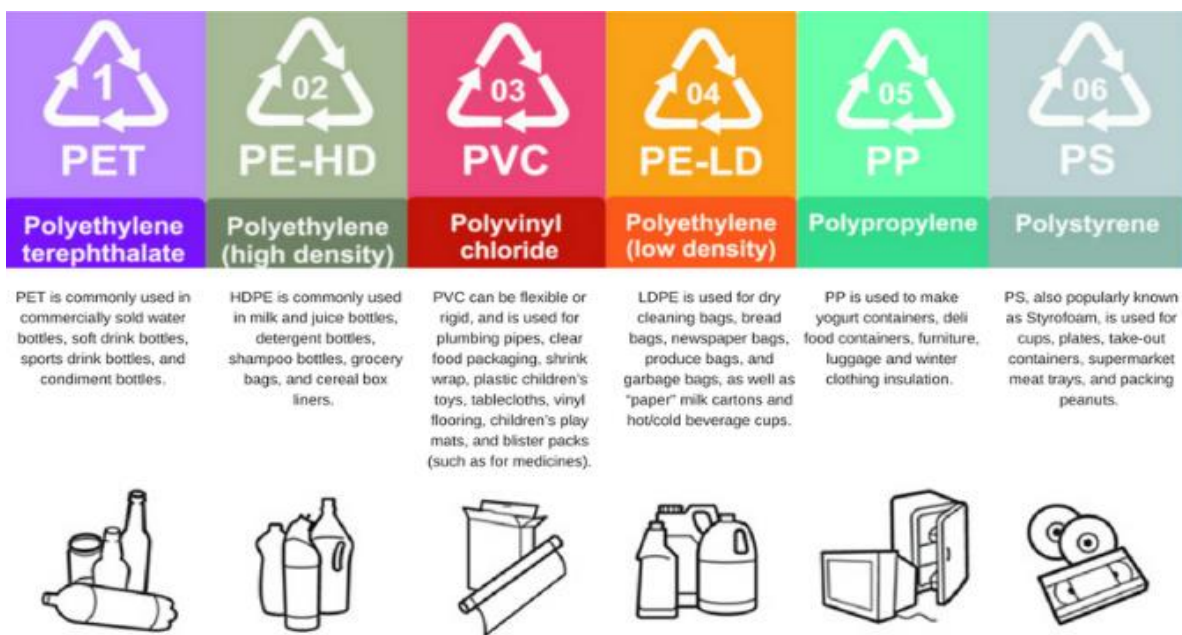
|                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Διάγραμμα 11.1:</b> Καμπύλες ανάπτυξης και απομάκρυνσης ολικού οργανικού άνθρακα, ολικού αζώτου και ολικού φωσφόρου για το είδος <i>Chlorella minutissima</i> ..... | 52 |
| <b>Διάγραμμα 11.2:</b> Καμπύλες ανάπτυξης και απομάκρυνσης COD, ολικού αζώτου και ολικού φωσφόρου για το είδος <i>Chlorella vulgaris</i> .....                         | 54 |
| <b>Διάγραμμα 11.3:</b> Καμπύλες ανάπτυξης και απομάκρυνσης COD, ολικού αζώτου και ολικού φωσφόρου για το είδος <i>Chlorococcum oleofaciens</i> .....                   | 56 |
| <b>Διάγραμμα 11.4:</b> Καμπύλες ανάπτυξης και απομάκρυνσης COD, ολικού αζώτου και ολικού φωσφόρου για το είδος <i>Euglena gracilis</i> .....                           | 58 |
| <b>Διάγραμμα 11.5:</b> Καμπύλες ανάπτυξης και απομάκρυνσης COD, ολικού αζώτου και ολικού φωσφόρου για το είδος <i>Chromochloris zofingiensis</i> .....                 | 60 |
| <b>Διάγραμμα 11.6:</b> Συγκεντρώσεις παραγόμενων χλωροφυλλών και καροτενοειδών για τα πέντε είδη μικροφυκών.....                                                       | 62 |
| <b>Διάγραμμα 11.7:</b> Συγκέντρωση παραγόμενου πολυ(3 – υδροξυβουτυρικού) εστέρα για πέντε είδη μικροφυκών.....                                                        | 64 |

## 9. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 9.1 ΣΥΜΒΑΤΙΚΑ ΠΛΑΣΤΙΚΑ

Τα συμβατικά πλαστικά πετροχημικής προέλευσης, έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της ανθρωπότητας ήδη από το 1940 και έχουν μετατραπεί στα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα υλικά παγκοσμίως, αντικαθιστώντας το γυαλί, το ξύλο, τα μέταλλα και τα κατασκευαστικά υλικά (Costa et al., 2019). Το 2021 η ετήσια παραγωγή πλαστικού παγκοσμίως έφτασε τους 391 εκατομμύρια τόνους, με την Ευρώπη να είναι υπεύθυνη για το 15% της παραγωγής αυτής, ενώ περίπου το 90% των πλαστικών παρήχθησαν από ορυκτούς πόρους (Plastics Europe, 2022).

Τα πλαστικά έχουν αναβαθμίσει την ποιότητα ζωής των ανθρώπων λόγω των πολλών προτερημάτων τους. Η ανθεκτικότητα, η δύναμη, η χαμηλή πυκνότητα και το κόστος, καθιστούν τα πλαστικά εύχρηστα υλικά (Van Eygen et al., 2017) που βρίσκουν εφαρμογές από τις αυτοκινητοβιομηχανίες και τα εξαρτήματα υπολογιστών, μέχρι την ιατρική και τις οικιακές συσκευές (Balaji et al., 2013). Οι τύποι πλαστικών που χρησιμοποιούνται συχνότερα είναι το τereφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET), το υψηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο (HDPE), το πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC), το χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο (LDPE), το πολυπροπυλένιο (PP) και το πολυστυρένιο (PS) (Plastic Oceans, 2021). Κάποιες από τις χρήσεις των πολυμερών αυτών φαίνονται στην Εικόνα 9.1.



Εικόνα 9.1: Τύποι πλαστικών και οι χρήσεις τους (Plastic Oceans, 2021).

### 9.1.1 ΑΡΝΗΤΙΚΕΣ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟΡΡΙΜΜΑΤΩΝ

Παρ' όλες όμως τις χρήσιμες εφαρμογές που βρίσκουν τα πλαστικά, χαρακτηρίζονται από μικρή διάρκεια αξιοποιήσιμης ζωής με αποτέλεσμα, μέρος αυτής της τεράστιας ετήσιας παραγωγής πλαστικών να καταλήγει ως απόβλητο. Οι τρεις πιο συνήθεις τεχνικές για τη διαχείριση των πλαστικών αποβλήτων είναι η μηχανική ανακύκλωση, η απόρριψη σε ειδικούς χώρους υγειονομικής ταφής και η καύση (N. Singh et al., 2022). Ωστόσο, και οι τρεις διεργασίες θεωρούνται προβληματικές. Από τη μία, η ανακύκλωση απαιτεί πολύ μεγάλα ποσά ενέργειας για την υλοποίησή της (Mastropetros et al., 2022), ενώ η καύση παράγει τοξικά παραπροϊόντα (CO<sub>2</sub>, διοξίνες, βαρέα μέταλλα, φουράνιο) τα οποία απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα (GREENPEACE, 2022), (Costa et al., 2019). Από την άλλη πλευρά, η απόρριψη σε χώρους υγειονομικής ταφής δεν εγγυάται την άμεση αποσύνθεση των πλαστικών, δεδομένου ότι τα μη βιοδιασπώμενα πλαστικά ενδέχεται να απαιτήσουν αρκετά χρόνια για την πλήρη διάσπασή τους (Bishop et al., 2021).

Ο συνδυασμός της τεράστιας παραγωγής πλαστικών και των μη αποτελεσματικών μεθόδων διαχείρισής τους, έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση πλαστικών απορριμμάτων στο περιβάλλον και την πρόκληση σοβαρών προβλημάτων. Τα συμβατικά πλαστικά όχι μόνο παράγονται από μη ανανεώσιμα υλικά (πετρέλαιο), αλλά τα αντίστοιχα πλαστικά απορρίμματα έχουν χαρακτηριστεί ως ένας από τους πιο επικίνδυνους ρύπους για το περιβάλλον. Αυτό οφείλεται στη χαμηλή τους ικανότητα για αποδόμηση και στην τάση τους για θρυμματισμό και παραγωγή μικροπλαστικών (Cucina et al., 2021). Τα μικροπλαστικά (< 5mm) έχουν βρεθεί σε ποικίλα περιβάλλοντα, όπως σε γλυκά και υπόγεια ύδατα, σε χιόνι και πάγο ή ακόμα και στον αέρα (Allen et al., 2022). Δυστυχώς η παρουσία τους στα φυσικά οικοσυστήματα έχει συσχετισθεί με την κατάποσή τους από τους ζωντανούς οργανισμούς και κατ' επέκταση με την πρόκληση τραυματισμών και φλεγμονών. Επίσης, μέσω της κατάποσης, διευκολύνεται η εισαγωγή περιβαλλοντικών ρύπων (χημικά πρόσθετα, βαρέα μέταλλα, οργανικά συστατικά, κυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, DDT, PCBs και παθογόνοι μικροοργανισμοί) στην τροφική αλυσίδα. Οι τοξικές επιδράσεις των μικροπλαστικών είναι γνωστές και περιλαμβάνουν διαταραχές των βιολογικών διεργασιών, γαστρεντερικές ενοχλήσεις, μεταβολές του μικροβιώματος και οξειδωτικό στρες (Bishop et al., 2021; Shruti & Kutralam-Muniasamy, 2019). Τέλος, εργαστηριακά πειράματα έχουν αποδείξει ότι τα πιο κοινά πλαστικά μπορεί να είναι μία αιτία της κλιματικής αλλαγής, καθώς παράγουν αέρια του θερμοκηπίου όταν εκτίθενται στο ηλιακό φως (Heidbreder et al., 2019).

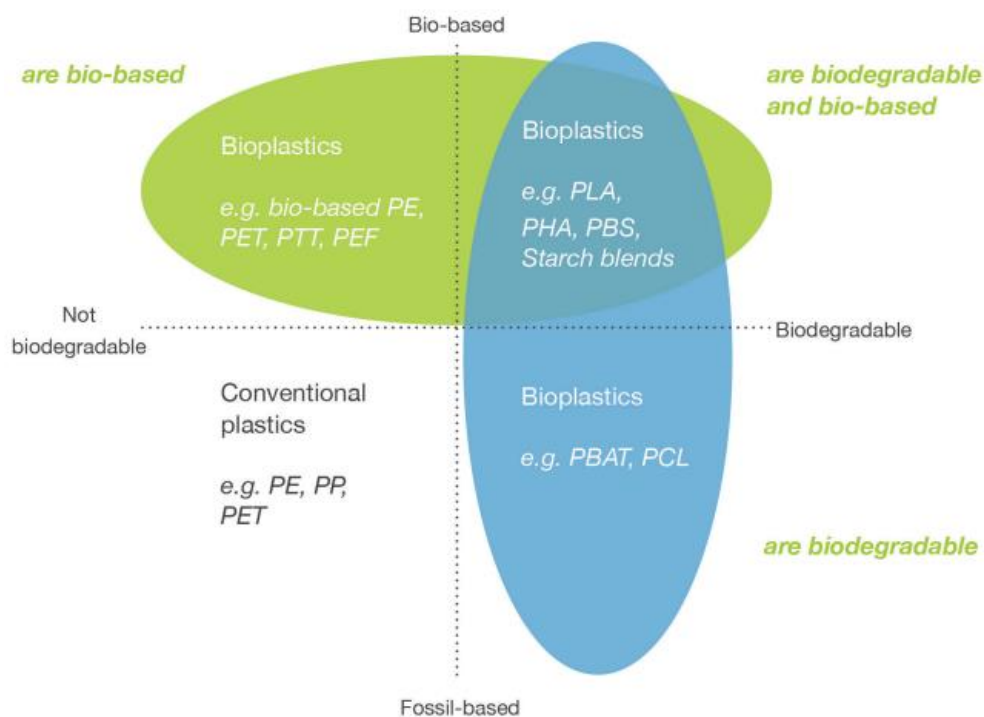
Ταυτόχρονα, η υπέρμετρη χρήση πλαστικών επηρεάζει και την υγεία του ανθρώπου. Αρχικά, το γεγονός ότι κομμάτια πλαστικού ή μικροπλαστικά είναι παρόντα σε διάφορα οικοσυστήματα, οδηγεί στο να καταλήξουν τελικά και στους ανθρώπινους ιστούς (Mastropetros et al., 2022) δημιουργώντας τοξικές συνθήκες, όπως καρκινογένεση και ενδοκρινικές διαταραχές (Talsness et al., 2009). Πολύ ενδιαφέρον παρουσιάζουν πρόσφατες έρευνες που αποδεικνύουν την ύπαρξη μικροπλαστικών σε μέρη του ανθρώπινου σώματος. Ενδεικτικά, μία έρευνα κατέδειξε την παρουσία μικροπλαστικών στον πλακούντα έξι γυναικών μέσω φασματοσκοπίας Raman (Ragusa et al., 2021), ενώ άλλη έρευνα αναγνώρισε και ποσοτικοποίησε τη μάζα πέντε πολυμερών μαζικής παραγωγής (PMMA, PP, PS, PE, PET) στο αίμα είκοσι δύο δοτών. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση των πλαστικών σωματιδίων που εντοπίστηκαν υπολογίστηκε στα 1.6 μg mL<sup>-1</sup> (Leslie et al., 2022). Τέλος, σε έρευνα που διεξήχθη στο Ιράν, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία από το πρόσωπο, τα μαλλιά, τα χέρια και το σάλιο πεντακοσίων ενηλίκων, και με οπτική μικροσκοπία και φασματοσκοπία micro – Raman, αποδείχθηκε η παρουσία μικροπλαστικών στους παραπάνω υποδοχείς (Abbasi & Turner, 2021).

## 9.2 ΒΙΟΠΛΑΣΤΙΚΑ

### 9.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση, ένα πλαστικό υλικό ορίζεται ως βιοπλαστικό είτε αν είναι βιολογικής προέλευσης, είτε αν βιοαποικοδομείται ή αν παρουσιάζει και τις δύο ιδιότητες. Αξίζει να σημειωθεί ότι η βιοαποικοδομησιμότητα δεν εξαρτάται από την πηγή προέλευσης του υλικού. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχουν βιοπλαστικά που είναι βιολογικής προέλευσης αλλά όχι βιοαποικοδομήσιμα, και αντίστροφα, υπάρχουν πετροχημικά πλαστικά που βιοαποικοδομούνται σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Με βάση λοιπόν τα παραπάνω, τα πλαστικά κατατάσσονται σε τέσσερις βασικές κατηγορίες ([European Bioplastics, 2022](#)), (Εικόνα 9.2):

1. Βιοδιασπώμενα πλαστικά βιολογικής προέλευσης, όπως το πολυγαλακτικό οξύ (PLA), οι πολυ(ύδροξυ αλκανοϊκοί) εστέρες (PHAs) ή ακόμα και το άμυλο.
2. Μη βιοδιασπώμενα πλαστικά βιολογικής προέλευσης, όπως το βιολογικής προέλευσης πολυαιθυλένιο (bio – PE) και το βιολογικής προέλευσης τереφθαλικό πολυαιθυλένιο (bio – PET).
3. Βιοδιασπώμενα πλαστικά πετροχημικής προέλευσης, όπως το τереφθαλικό αδιτικό πολυβουτλένιο (PBAT) και η πολυκαπρολακτόνη (PCL).
4. Μη βιοδιασπώμενα συμβατικά πλαστικά πετροχημικής προέλευσης, όπως το πολυαιθυλένιο (PE), το πολυπροπυλένιο (PP), το τереφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET) και το πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC).



Εικόνα 9.2: Απεικόνιση της κατάταξης των πλαστικών σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση ([European Bioplastics, 2022](#))

Την τελευταία δεκαετία, τα βιοπλαστικά αναπτύσσονται σαν ένα εναλλακτικό πολυμερές και βιώσιμο υλικό. Συγκριτικά με τα πλαστικά πετροχημικής προέλευσης, τα βιοπλαστικά παράγονται από ανανεώσιμους πόρους γεγονός που οδηγεί στη μειωμένη εξόρυξη ορυκτών πόρων και κατ' επέκταση στη μείωση των εκπομπών του θερμοκηπίου (N. Singh et al., 2022). Παράλληλα, επιτρέπουν τη μετάβαση προς μία κυκλική οικονομία, και επειδή τα περισσότερα από αυτά παράγονται από βιομάζα, μπορούν να εξασφαλίσουν χαμηλότερο ανθρακικό αποτύπωμα κατά την παραγωγή τους (Rosenboom et al., 2022).

Επομένως, το κίνητρο για τη μετάβαση σε μία εποχή βιοπλαστικών είναι η βιωσιμότητά τους συγκριτικά με τα συμβατικά πλαστικά. Το 2022 η παγκόσμια παραγωγή βιοπλαστικών έφτασε τους 2.23 εκατομμύρια τόνους, τιμή που αντιστοιχεί σε λιγότερο από το 1% της παγκόσμιας παραγωγής πλαστικών, ενώ αναμένεται η τιμή αυτή να αυξηθεί στους 6.3 εκατομμύρια τόνους το 2027 ([European Bioplastics, 2022](#)). Στην Εικόνα 9.3, φαίνεται η παγκόσμια παραγωγή βιοπλαστικών ανά ήπειρο.



Εικόνα 9.3: Επί τοις εκατό παγκόσμια παραγωγή βιοπλαστικών ανά ήπειρο ([European Bioplastics, 2022](#)).

### 9.2.2 ΠΟΛΥ(ΥΔΡΟΞΥ ΑΛΚΑΝΟΪΚΟΙ) ΕΣΤΕΡΕΣ (PHAs)

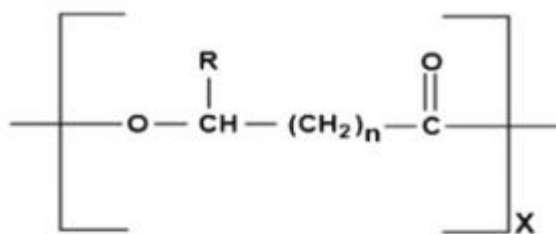
Μεταξύ των πολλών διαφορετικών ειδών βιοπλαστικών, οι πολυ(ύδροξυ αλκανοϊκοί) εστέρες (PHAs) είναι οι πιο γνωστοί. Πρόκειται για αλειφατικούς πολυεστέρες που συντίθενται από τα υδροξυαλκανοϊκά οξέα και παράγονται από μία ποικιλία βακτηρίων και μικροφυκών. Πρώτη φορά παρατηρήθηκαν το 1888 από τον Beijerinck, ο οποίος δεν μπόρεσε να ορίσει τον ρόλο τους και τη σύστασή τους (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). Το 1926 ο Γάλλος μικροβιολόγος Lemoigne, απομόνωσε ένα πολυμερές από το *Bacillus megaterium*, μέσω εκχύλισης με χλωροφόρμιο, και έδειξε ότι επρόκειτο για τον πολυ(3-υδροξυβουτυρικό) εστέρα (PHB). Από τότε που ο Lemoigne ανακάλυψε το PHB, το πολυμερές αυτό έχει προβληματίσει τους ερευνητές που ενδιαφέρονται για τις φυσικοχημικές ιδιότητές του. Οι βασικές γνώσεις για το PHB συμπεριλήφθηκαν αρχικά σε μία μελέτη των Dawes και Senior το 1973, ενώ αργότερα διαπιστώθηκε ότι το πολυμερές αυτό άνηκε στην τεράστια οικογένεια των PHAs (Balaji et al., 2013).

Αυτά τα φυσικά πολυμερή συσσωρεύονται ενδοκυτταρικά, υπό τη μορφή αδιάλυτων στο νερό κόκκων διαμέτρου 0.2 – 0.5  $\mu\text{m}$ , και λειτουργούν ως αποθήκες ενέργειας και άνθρακα. Αυτό σημαίνει ότι όταν η πηγή άνθρακα του υποστρώματος εξαντληθεί, τα μακρομόρια αποπολυμερίζονται προσφέροντας άνθρακα και ενέργεια στα κύτταρα. Τα πιο γνωστά βακτήρια που είναι παραγωγί

PHAs, δείχνουν καλύτερη παραγωγή βιοπλαστικού όταν βρίσκονται σε συνθήκες φυσιολογικού stress, δηλαδή όταν υπάρχει έλλειψη φωσφόρου και αζώτου, με παράλληλη περίσσεια άνθρακα. Σήμερα είναι γνωστά πάνω από 150 μονομερή PHAs (Vicente et al., 2023).

Τα PHAs πολυμερή συντίθενται από υδροξυαλκανοϊκά οξέα (HA), ενώ το μοριακό τους βάρος εξαρτάται από τις συνθήκες παραγωγής και μπορεί να ξεκινά από τα 50 kDa. Ανάλογα με το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας, οι πολυ(ύδροξυ αλκανοϊκοί) εστέρες κατατάσσονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: PHAs μικρής αλυσίδας (scl) με 3 – 5 άτομα άνθρακα, PHAs μεσαίας αλυσίδας (mcl) με 6 – 14 άτομα άνθρακα, και PHAs μακράς αλυσίδας (lcl) με πάνω από 15 άτομα άνθρακα (Εικόνα 9.4). Το πιο γνωστό scl – PHA είναι ο πολυ(3 – υδροξυβουτυρικός) εστέρας, (PHB) (Vicente et al., 2023).

Τα PHAs έχουν παρόμοιες ιδιότητες με τα πλαστικά πετροχημικής προέλευσης και γι' αυτό μελετώνται σε μεγάλο βαθμό προκειμένου να τα αντικαταστήσουν. Ιδιότητες όπως η βιολογική τους προέλευση, η βιοαποικοδομησιμότητα, η βιοσυμβατότητα, ο πιεζοηλεκτρισμός και η οπτική καθαρότητα τα καθιστούν αξιόλογη εναλλακτική των συμβατικών πλαστικών. Επίσης, είναι υδρόφοβα και αδιάλυτα στο νερό, αδρανή, μη τοξικά και μπορεί να είναι είτε θερμοπλαστικά, είτε ελαστομερή, ανάλογα με τη σύνθεσή τους. Τέλος, εμφανίζουν πολύ καλύτερη αντίσταση στην υπεριώδη ακτινοβολία συγκριτικά με το πολυπροπυλένιο. Φυσικά, η χημική σύσταση του μονομερούς, και κατά συνέπεια οι ιδιότητες του πολυμερούς, εξαρτώνται από το μικροβιακό είδος που χρησιμοποιείται για την παραγωγή τους, τις συνθήκες καλλιέργειας αλλά και τη μέθοδο εκχύλισης του βιοπλαστικού. Αναφορικά με τη χρήση τους, μπορούν να βρουν ευρεία εφαρμογή ως υλικά συσκευασίας και στον αγροτικό τομέα. Ακόμα, οι ιδιότητές τους τα καθιστούν εξαιρετικά υλικά και για τον βιοϊατρικό και φαρμακευτικό κλάδο (Costa et al., 2019; Możejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016).



**n = 1    R = hydrogen    Poly(3-hydroxypropionate)**

**R = methyl    Poly(3-hydroxybutyrate)**

**R = ethyl    Poly(3-hydroxyvalerate)**

**R = propyl    Poly(3-hydroxyhexanoate)**

**n = 2    R = hydrogen    Poly(4-hydroxybutyrate)**

**n = 3    R = hydrogen    Poly(5-hydroxyvalerate)**

**Εικόνα 9.4:** Συντακτικός τύπος των PHAs. Το n αναφέρεται στον αριθμό των μεθυλενίων και το X στον αριθμό των μονομερών στην πολυμερική αλυσίδα (μέχρι 35,000) (A. K. Singh et al., 2016)

### 9.2.2.1 ΠΟΛΥ(3 – ΥΔΡΟΞΥΒΟΥΤΥΡΙΚΟΣ) ΕΣΤΕΡΑΣ (PHB)

Ο πολυ(3 – υδροξυβουτυρικός) εστέρας είναι το πιο μελετημένο βιοπλαστικό από την κατηγορία των PHAs, αφού θεωρείται ικανός αντικαταστάτης των πετροχημικών πλαστικών λόγω των παρόμοιων ιδιοτήτων του με το πολυπροπυλένιο και το πολυαιθυλένιο (McAdam et al., 2020). Το μονομερές του χαρακτηρίζεται από ένα μεθύλιο ( $-CH_3$ ) στη θέση της αλκυλομάδας, και από συνολικά τέσσερις άνθρακες στην αλυσίδα του. Επομένως το PHB ανήκει στην κατηγορία των scl – PHAs (dos Santos et al., 2017). Αναφορικά με τις ιδιότητές του (Πίνακας 9.1), παρουσιάζει όλα τα θετικά στοιχεία που αναφέρθηκαν γενικά για τα PHAs (Ενότητα 9.2.2), ενώ εμφανίζει υψηλή κρυσταλλικότητα εξαιτίας της γραμμικής του δομής (Madadi et al., 2021; McAdam et al., 2020). Επίσης, διαθέτει θερμοπλαστικές ιδιότητες (dos Santos et al., 2017).

**Πίνακας 9.1:** Σύγκριση μηχανικών ιδιοτήτων των P(3HB), PP και HDPE (McAdam et al., 2020)

| ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΙΔΙΟΤΗΤΑ                    | P(3HB)    | PP        | HDPE       |
|--------------------------------------|-----------|-----------|------------|
| Θερμοκρασία τήξης (°C)               | 165 – 175 | 160 – 169 | 135        |
| Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (°C) | 5 – 9     | -20 – -5  | -130 – 100 |
| Κρυσταλλικότητα (%)                  | 50 – 60   | 43 – 58   | 60 – 80    |

Το PHB είναι ένα ημικρυσταλλικό πολυμερές, δηλαδή περιέχει μία άμορφη και μία κρυσταλλική φάση. Υπάρχουν διάφορες αναφορές για τα επίπεδα κρυσταλλικότητάς του, κάποιες από τις οποίες αναφέρουν ποσοστά της τάξης του 80%. Γενικά, όσο πιο κρυσταλλικό είναι ένα υλικό, τόσο πιο άκαμπτο και σκληρό είναι, αλλά και τόσο πιο ψαθυρό και άρα εύθραυστο. Ακόμα, το PHB είναι επιρρεπές σε θερμική διάβρωση η οποία μπορεί να αλλοιώσει τις μηχανικές ιδιότητές του (dos Santos et al., 2017; McAdam et al., 2020).

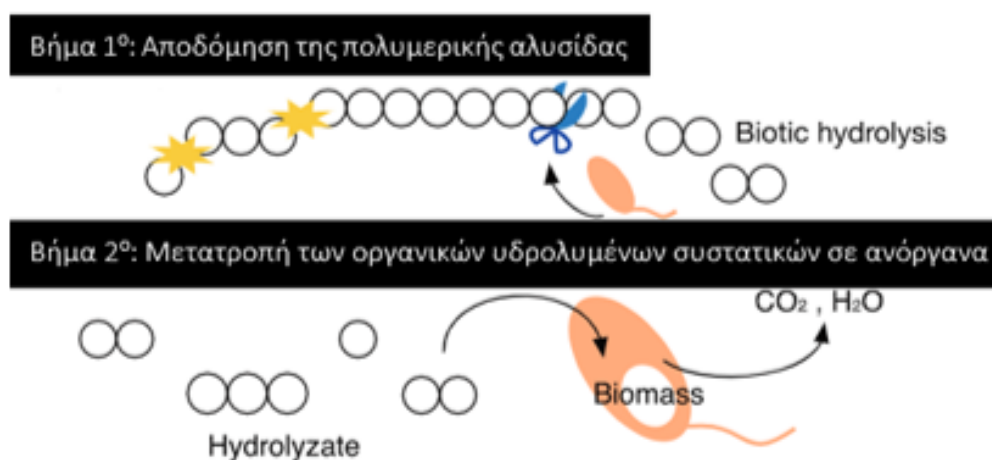
Μία πολύ συνήθης τεχνική για τη βελτίωση των ιδιοτήτων του PHB και τη μείωση του κόστους παραγωγής του είναι η μίξη του με άλλα πολυμερή. Αρχικά, το PLA μελετάται για τη μίξη του με το PHB και τη δημιουργία ενός υλικού με βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες και βιοαποικοδομησιμότητα (dos Santos et al., 2017). Το άμυλο επίσης είναι ένα πολλά υποσχόμενο φυσικό πολυμερές, που βιοδιασπάται και είναι διαθέσιμο σε μεγάλες ποσότητες. Σε έρευνα αναμίχθηκε PHB με τροποποιημένο άμυλο καλαμποκιού και παρατηρήθηκε αύξηση στη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης από 2 °C σε 37 °C, όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του αμύλου στο μίγμα (Lai et al., 2015). Ακόμα ένα υλικό που μπορεί να αναμειχθεί με το PHB είναι η λιγνίνη. Οι Lugoloobi et al., (2020) ανέφεραν ότι μίγμα λιγνίνης/PHB παρουσίασε υψηλότερη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης και ιξώδες τήγματος, αλλά και βελτιωμένη αντίσταση στην υπεριώδη ακτινοβολία και στην εφελκυστική αντοχή. Τέλος, ανάμειξη του PHB με άλλα βιοδιασπώμενα πολυμερή, όπως το PCL ή το PBAT, έχει διαπιστωθεί ότι επίσης προσδίδει βελτιωμένες ιδιότητες στο τελικό προϊόν και διευρύνει το πεδίο εφαρμογής του (V. Kumar et al., 2021; Tian & Wang, 2020).

### 9.2.2.2 ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ PHAs

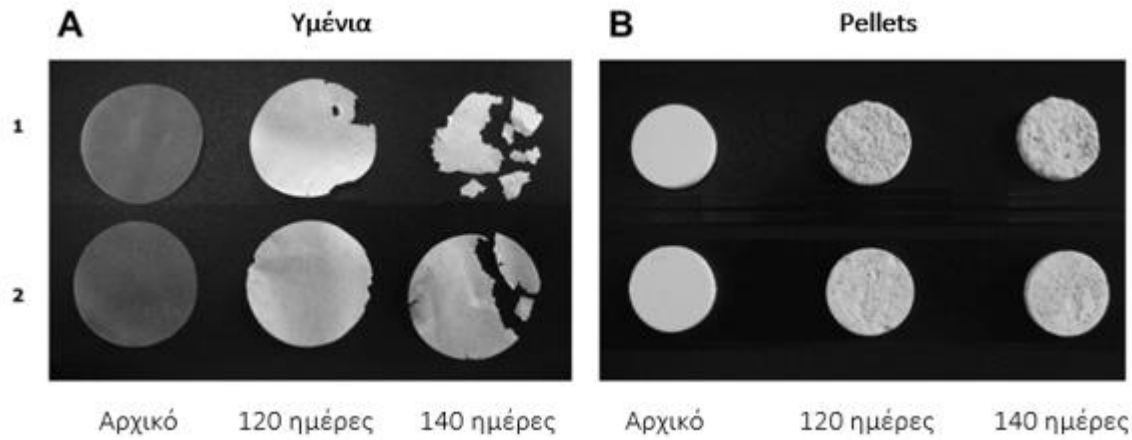
Η βιοαποικοδομησιμότητα ορίζεται ως η σταδιακή αποδόμηση ενός υλικού η οποία προκαλείται από τη βιολογική δράση συγκεκριμένων μικροοργανισμών (Biodegradation). Τα PHAs μικρής και μεσαίας αλυσίδας μπορούν να διασπαστούν από βακτήρια και μύκητες, είτε αερόβια, είτε αναερόβια. Υπό αερόβιες συνθήκες τα προϊόντα που προκύπτουν είναι διοξείδιο του άνθρακα και νερό, ενώ κατά την αναερόβια διάσπαση, τα προϊόντα είναι μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα (Costa et al.,

2019; Dalton et al., 2022). Η βιοαποδόμηση μπορεί να λάβει χώρα σε διάφορα περιβάλλοντα, από εδάφη και γλυκά νερά, μέχρι θαλάσσια οικοσυστήματα (Dalton et al., 2022; Suzuki et al., 2020).

Εφόσον τα PHAs είναι πολυμερή μεγάλου μοριακού βάρους, δε μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη. Ως αποτέλεσμα, οι μικροοργανισμοί εκκρίνουν εξωκυτταρικά ένζυμα (εστεράσες) που υδρολύουν τα PHAs στα μονομερή και ολιγομερή τους. Πλέον, αυτά τα χαμηλού μοριακού βάρους προϊόντα μπορούν να μεταβολιστούν από τους αποικοδομητές σε χρήσιμα προϊόντα, τα οποία και χρησιμοποιούν ως πηγές θρεπτικών συστατικών και άνθρακα (Numata et al., 2009). Με βάση τα παραπάνω λοιπόν, η διαδικασία της αποδόμησης είναι μία διαδικασία δύο σταδίων που περιλαμβάνει το πρώτο στάδιο της υδρόλυσης και το δεύτερο στάδιο της μετατροπής των οργανικών συστατικών σε ανόργανα (Suzuki et al., 2020), (Εικόνα 9.5). Γενικά, η διαδικασία της βιοαποικοδόμησης συμβαίνει με φυσικό τρόπο, δεν έχει κάποια εναρκτήρια αντίδραση και ξεκινάει από τη δράση των μικροοργανισμών. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοαποικοδόμηση, είναι το pH, η θερμοκρασία, το είδος των μικροβιακών πληθυσμών που είναι παρόντα και η διαθεσιμότητα σε θρεπτικά στοιχεία (Santos et al., 2018). Στην Εικόνα 9.6 φαίνεται η βιοαποδόμηση του πολυμερούς 3 – PHB και του συμπολυμερούς 3 – PHB/3 – PHV σε θαλάσσιο περιβάλλον.



Εικόνα 9.5: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων βιοαποικοδόμησης βιοπλαστικών (Suzuki et al., 2020)



**Εικόνα 9.6:** Δείγματα PHA (υμένια (A) και pellets (B)) μετά από διαφορετικές περιόδους έκθεσης σε θαλάσσιο περιβάλλον (1: 3 – PHB, 2: συμπολυμερές 3 – PHB/3 – PHV) (Volova et al., 2010)

## 9.3 ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ

### 9.3.1 ΚΥΡΙΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

Τα φύκη είναι μία μεγάλη κατηγορία μονοκύτταρων ή πολυκύτταρων, ευκαρυωτικών οργανισμών που έχουν την ικανότητα να φωτοσυνθέτουν, δεσμεύοντας το διοξείδιο του άνθρακα της ατμόσφαιρας και παράγοντας οξυγόνο ( $O_2$ ). Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το μέγεθός τους: τα μακροφύκη (macroalgae ή seaweeds), με μέγεθος μερικών εκατοστών που σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να φτάσει και τα πολλά μέτρα, και τα μικροφύκη (microalgae) το μέγεθος των οποίων είναι της τάξης των μμ. Πολλές φορές, ακόμα και τα κυανοβακτήρια θεωρείται ότι ανήκουν στην κατηγορία των μικροφυκών επειδή φωτοσυνθέτουν, παρόλο που είναι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί. Τα μικροφύκη ταξινομούνται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τη βιολογία, τη φυσιολογία και την οικολογία τους. Οι βασικότερες ομάδες είναι τα Χλωροφύκη, τα Πρασινοφύκη, τα Απτόφυτα, τα Κρυπτοφύκη, τα Δινομαστιγωτά, τα Κυανοβακτήρια και τα Ετεροκοντόφυτα, με κύριες υποδιαίρεσεις τα Χρυσοφύκη, τα Διάτομα, τα Ευστιγματοφύκη και τα Ραφιδοφύκη (Markou & Nerantzis, 2013).

Κυρίαρχη είναι η παρουσία τους στα υδατικά περιβάλλοντα, όπως στη θάλασσα και στα γλυκά νερά, αλλά μπορούν να βρεθούν ακόμα και στο έδαφος ή σε δυσμενή περιβάλλοντα όπως σε θερμοπηγές ή παγετώνες. Τα μικροφύκη που ζουν σε ύδατα ποταμών, λιμνών και ωκεανών ονομάζονται φυτοπλαγκτόν, διαμορφώνουν τη βάση της υδάτινης τροφικής αλυσίδας και παράγουν περίπου το 50% του ατμοσφαιρικού οξυγόνου στη Γη. Οι ωκεανοί συγκεκριμένα, οι οποίοι καλύπτουν το 71% της επιφάνειας του πλανήτη, φιλοξενούν περισσότερα από 5,000 είδη φυτοπλαγκτόν. Εκτιμάται πως υπάρχουν 30,000 με 1,000,000 είδη φυκών, εκ των οποίων η πλειοψηφία είναι μικροφύκη (Barsanti & Gualtieri, 2006; Markou & Nerantzis, 2013).

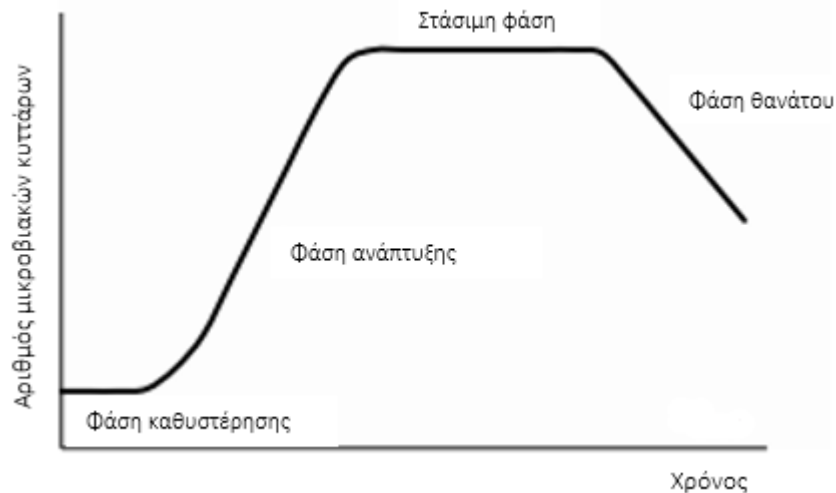
Ο κύριος λόγος που είναι επιθυμητή η καλλιέργεια μικροφυκών σε εμπορικό επίπεδο, είναι η αξιοποίηση των μεταβολικών προϊόντων που παράγουν. Μπορούν να δώσουν μία πληθώρα βιοχημικών προϊόντων υψηλής αξίας, όπως χρωστικές, λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και βιοπολυμερή (Koutra et al., 2018). Επίσης, καλλιεργούνται σε παγκόσμιο επίπεδο κυρίως ως τροφή σε υδατοκαλλιέργειες, ενώ βρίσκουν εφαρμογή στη φαρμακευτική και την κοσμητολογία (Markou & Nerantzis, 2013). Τα τελευταία χρόνια, πολύ μεγάλο ενδιαφέρον συγκεντρώνεται στην παραγωγή βιοκαυσίμων εξαιτίας της εξάντλησης των ορυκτών πόρων και της συνεχώς αυξανόμενης ανάγκης για ενέργεια. Έτσι, τα μικροφύκη μελετώνται ώστε να αποτελέσουν τη βάση της τρίτης γενιάς βιοκαυσίμων που περιλαμβάνουν το βιοντίζελ, το βιοαέριο, τη βιοεθανόλη και το βιοϋδρογόνο (Koutra et al., 2018). Τέλος, χρησιμοποιούνται και σε περιβαλλοντικές εφαρμογές, όπως στη ρύθμιση του  $CO_2$  στην ατμόσφαιρα, στην επεξεργασία λυμάτων και απονέρων, αλλά και στην εξουδετέρωση βαρέων μετάλλων όπως το αρσενικό (As), ο μόλυβδος (Pb) και ο υδράργυρος (Hg) (Kwon et al., 2017; Spain et al., 2021).

### 9.3.2 ΦΑΣΕΙΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Αν μετρηθεί η συγκέντρωση του αριθμού των κυττάρων κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας των μικροφυκών σε ένα κλειστό σύστημα παρατηρούνται τέσσερις φάσεις ανάπτυξης: η φάση καθυστέρησης, η φάση εκθετικής ανάπτυξης, η στάσιμη φάση και η φάση θανάτου.

Στην φάση καθυστέρησης το μικροβιακό είδος εγκλιματίζεται στο μέσο καλλιέργειας προσαρμόζοντας ανάλογα τον μεταβολισμό του. Στη φάση αυτή δεν παρατηρείται ανάπτυξη. Μόλις τα κύτταρα προσαρμοστούν στις συνθήκες καλλιέργειας, αρχίζουν να αναπτύσσονται εκθετικά καταναλώνοντας

τα θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος. Στη συνέχεια, τα κύτταρα εισέρχονται στη στάσιμη φάση, είτε λόγω εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών, είτε λόγω της παρουσίας κάποιου παρεμποδιστή. Τέλος, επέρχεται η φάση θανάτου κατά τη διάρκεια της οποίας παρατηρείται λύση των κυττάρων που οδηγεί στη μείωση του αριθμού τους (Λυμπεράτος & Παύλου, 2010). Η καμπύλη ανάπτυξης φαίνεται στην Εικόνα 9.7.



Εικόνα 9.7: Μικροβιακή καμπύλη ανάπτυξης (L. Wang et al., 2015)

### 9.3.3 ΕΙΔΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ

Τα μικροφύκη είναι φωτοσυνθέτοντες μικροοργανισμοί, το οποίο σημαίνει ότι για την ανάπτυξη, τη συντήρηση και τον πολλαπλασιασμό τους, αξιοποιούν το ηλιακό φως ως πηγή ενέργειας και το CO<sub>2</sub> ή κάποια άλλη ανόργανη μορφή ως πηγή άνθρακα. Ο παραπάνω μεταβολικός τύπος ονομάζεται αυτότροφος (ή φωτοαυτότροφος) και είναι η πιο κοινή οδός για όλα τα μικροφύκη (Perez-Garcia et al., 2011). Παρ' όλα αυτά, πολλά είδη μικροφυκών έχουν την ικανότητα να εξετάζουν το περιβάλλον τους και να προσαρμόζουν τον μεταβολισμό τους ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν (Rizwan et al., 2018). Έτσι, εκτός από τον αυτότροφο μεταβολισμό, διακρίνονται ακόμα δύο μεταβολικοί τύποι που μπορούν να ακολουθήσουν τα μικροφύκη για την ανάπτυξή τους: ο ετερότροφος και ο μιξότροφος. Στον ετερότροφο μεταβολισμό πηγή ενέργειας και άνθρακα είναι ο οργανικός άνθρακας (γλυκόζη, οξικό οξύ, μαλτόζη κ.α.). Στις μιξότροφες συνθήκες, οι ανάγκες σε ενέργεια μπορούν να καλυφθούν από το φως ή από οργανικές ενώσεις, ενώ ως πηγές άνθρακα χρησιμοποιούνται είτε οργανικές, είτε ανόργανες ουσίες (Markou & Nerantzis, 2013; Rizwan et al., 2018).

Έχουν διεξαχθεί διάφορες έρευνες με σκοπό να μελετηθεί η αποδοτικότητα των μεταβολικών τύπων όσον αφορά στην παραγωγή βιομάζας και χρήσιμων προϊόντων. Η αξιολόγησή τους εξαρτάται σημαντικά από παράγοντες όπως το είδος του μικροφύκου, τις περιβαλλοντικές συνθήκες, αλλά και ποιο είναι το τελικό επιθυμητό προϊόν (βιοπλαστικά, λιπίδια, χρωστικές κ.α.) (Castillo et al., 2021; Yeh & Chang, 2012). Παρόλα αυτά αξίζει να σημειωθούν κάποιες σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών μεταβολισμών.

### 9.3.3.1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΥΤΟΤΡΟΦΩΝ ΚΑΙ ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Η καλλιέργεια μικροφυκών υπό αυτότροφες συνθήκες είναι πιο οικονομική, αφού έχει ως βασικές απαιτήσεις την ηλιακή ακτινοβολία και το CO<sub>2</sub>, αλλά και επειδή το κόστος της ανόργανης πηγής άνθρακα είναι χαμηλότερο από της αντίστοιχης οργανικής πηγής. Επίσης, είναι πιο φιλική προς το περιβάλλον καθώς μπορεί να συμβάλλει στη δέσμευση του ατμοσφαιρικού CO<sub>2</sub> (Verma et al., 2020). Ενδεικτικά, έχει διαπιστωθεί πως τα είδη *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* και *Spirulina* sp. μπορούν να απομακρύνουν το CO<sub>2</sub> κατά 80%, 28% και 53% αντίστοιχα (de Morais & Costa, 2007; Sadeghizadeh et al., 2017).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, αυτότροφα μπορούν να καλλιεργηθούν όλα τα μικροφύκη αφού αυτή είναι στην πραγματικότητα η φύση τους (Castillo et al., 2021). Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι οι ετερότροφες ή μιξότροφες καλλιέργειες μπορεί να οδηγήσουν, σε ορισμένα είδη, σε μεγαλύτερη παραγωγικότητα σε βιομάζα και σε μεταβολικά προϊόντα (Abreu et al., 2022; Verma et al., 2020). Άλλα πλεονεκτήματα της ετερότροφης ανάπτυξης είναι ότι ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροφύκου, η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) που παράγεται από την παρεχόμενη πηγή ενέργειας, ο συντελεστής απόδοσης ATP (mg παραγόμενης βιομάζας ανά mg καταναλισκόμενου ATP) και η συγκέντρωση σε λιπίδια και άζωτο, είναι σημαντικά υψηλότερα απ' ότι σε αυτότροφες καλλιέργειες (Perez-Garcia et al., 2011). Κάποια μικροφύκη που μπορούν να αναπτυχθούν ετερότροφα είναι τα *Galdieria sulphuraria*, *Chlorella* spp., *Chlorella protothecoides*, *Neochloris oleoabundans*, *Nitzschia laevis* και *Cryptocodinium cohnii* (Castillo et al., 2021).

### 9.3.3.2 ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Βασικό μειονέκτημα της ετερότροφης καλλιέργειας είναι το γεγονός ότι δεν είναι δυνατό να αναπτυχθούν όλα τα μικροφύκη ετερότροφα. Η αύξηση του οικονομικού και ενεργειακού κόστους λόγω της προσθήκης οργανικού υποστρώματος, η μόλυνση και ο συναγωνισμός με άλλους μικροοργανισμούς και η παρεμπόδιση της ανάπτυξης εξαιτίας της περίσσειας υποστρώματος, είναι ακόμα κάποιοι περιορισμοί που ακολουθούν την ετερότροφη ανάπτυξη (Castillo et al., 2021; Perez-Garcia et al., 2011). Τέλος, υπάρχουν κάποιες αναφορές σχετικά με την ανικανότητα των μικροφυκών σε ετερότροφες καλλιέργειες, να παράξουν χρωστικές. Η υπόθεση αυτή, σε κάποιες περιπτώσεις, έχει διαψευστεί, όμως είναι ωφέλιμο να παρατηρείται η πορεία των χρωστικών σε μία καλλιέργεια στην περίπτωση μειωμένου φωτός ή και απουσίας του (Castillo et al., 2021; Lowrey et al., 2015).

### 9.3.3.3 ΜΙΞΟΤΡΟΦΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Μία εναλλακτική της ετερότροφης ανάπτυξης, είναι η μιξότροφη η οποία μελετάται λόγω των προτερημάτων της σε σχέση με τους άλλους τύπους μεταβολισμού. Σε αυτήν την περίπτωση συνδυάζονται τα πλεονεκτήματα του αυτότροφου και του ετερότροφου μεταβολισμού, και είναι ταυτόχρονα ενεργοί τόσο ο μηχανισμός της φωτοσύνθεσης, όσο και αυτός της αερόβιας αναπνοής (Abreu et al., 2022; Castillo et al., 2021). Σε αυτού του είδους ανάπτυξη, έχουν επίσης παρατηρηθεί υψηλές παραγωγικότητες σε βιομάζα και υψηλοί ρυθμοί ανάπτυξης. Για παράδειγμα, κατά τη μιξότροφη καλλιέργεια του *Micractinium inermum*, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα γλυκόζη, η παραγωγή βιομάζας ήταν 37.3 και 3.3 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη σε αυτότροφες και ετερότροφες συνθήκες (Abreu et al., 2022). Αντίστοιχα, σε έρευνά τους οι Verma et al., (2020) καλλιεργήσαν τα *Arthrospira platensis*, *Nannochloropsis* sp. και *Spirulina* sp. σε αυτότροφες, μιξότροφες και ετερότροφες συνθήκες. Η υψηλότερη παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της μιξότροφης καλλιέργειας και στα τρία είδη. Πιθανή εξήγηση για τις υψηλές παραγωγικότητες που παρατηρούνται στις μιξότροφες συνθήκες, είναι η παρουσία πολλαπλών πηγών ενέργειας και άνθρακα που χρησιμοποιούνται συγχρόνως από τα κύτταρα (φως, οργανικός και ανόργανος άνθρακας) (Abreu et al., 2022). Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι στη μιξότροφη καλλιέργεια λαμβάνεται συχνά η

περισσότερη βιομάζα, η προσθήκη οργανικού υποστρώματος οδηγεί και στην περίπτωση αυτή σε αύξηση του κόστους.

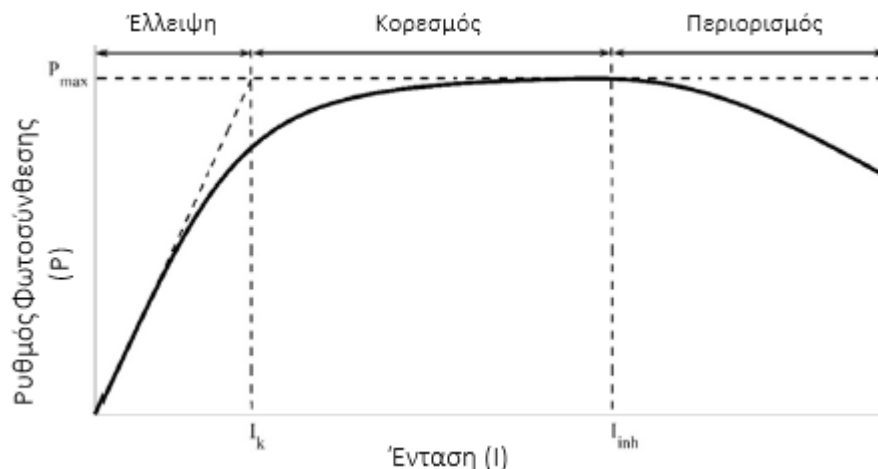
#### 9.3.4 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Οι καλλιέργειες των μικροφυκών είναι πολύπλοκα συστήματα που επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες, τόσο βιοτικούς, όσο και αβιοτικούς. Στους βιοτικούς παράγοντες περιλαμβάνονται οι ζωντανοί μικροοργανισμοί όπως βακτήρια, μύκητες και ιοί που συναγωνίζονται με τα μικροφύκη. Οι αβιοτικοί παράγοντες περιλαμβάνουν το φωτισμό, τη θερμοκρασία, το pH, την αλκαλικότητα και τα θρεπτικά συστατικά του μέσου καλλιέργειας (Costa et al., 2019; Markou & Nerantzis, 2013).

##### 9.3.4.1 ΦΩΤΙΣΜΟΣ

Τα μικροφύκη χρησιμοποιούν κάποια πηγή φωτός προκειμένου να φωτοσυνθέσουν, και επομένως είναι μία πολύ καθοριστική παράμετρος στη μοντελοποίηση ενός συστήματος καλλιέργειας. Παροχέας φωτός μπορεί να είναι είτε ο ήλιος είτε κάποια τεχνητή πηγή. Το φυσικό φως χρησιμοποιείται ευρέως στις ανοιχτού τύπου καλλιέργειες αλλά η διάχυσή του περιορίζεται στην επιφάνεια της δεξαμενής. Επίσης, η ένταση του φωτός εξαρτάται από τον κύκλο του ήλιου, τις καιρικές συνθήκες και τη γεωγραφική θέση της καλλιέργειας. Πιο ελεγχόμενες συνθήκες φωτισμού, μπορούν να επιτευχθούν με κάποια τεχνητή πηγή, όπως οι λαμπτήρες LED, η οποία συνήθως εφαρμόζεται στους φωτοβιοαντιδραστήρες (PBRs) (Costa et al., 2019; S. K. Wang et al., 2014).

Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην ένταση του φωτός που θα διοχετευθεί στην καλλιέργεια. Η ένταση επηρεάζει άμεσα τον ρυθμό φωτοσύνθεσης, την ανάπτυξη των κυττάρων και την παραγωγή των διάφορων μεταβολιτών. Η βέλτιστη τιμή της ποικίλει μεταξύ των διάφορων μικροφυκών και εξαρτάται και από το είδος του προϊόντος που είναι επιθυμητό να παραχθεί. Γενικά, ένα βέλτιστο εύρος κυμαίνεται από 62.5 έως 2,000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (S. K. Wang et al., 2014). Τα κύτταρα υφίστανται τρεις ζώνες ανάλογα με την ένταση του φωτός που δέχονται (Εικόνα 9.8): (1) κατάσταση έλλειψης φωτός, (2) κατάσταση κορεσμού και (3) κατάσταση περιορισμού (Darvehei et al., 2018). Στην πρώτη περίπτωση, ο ρυθμός φωτοσύνθεσης αυξάνεται με την ένταση της ακτινοβολίας, μέχρι να φτάσει σε μία μέγιστη τιμή, όπου τα κύτταρα έχουν πλέον κορεστεί (κατάσταση 2) και δεν παρατηρείται κάποια αλλαγή στον ρυθμό. Μετά την κατάσταση 2, και με συνεχή αύξηση της έντασης του φωτός, παρατηρείται το φαινόμενο της παρεμπόδισης όπου το φως πλέον δε λειτουργεί προς όφελος της ανάπτυξης, λόγω φωτοοξείδωσης των κυττάρων (Carvalho et al., 2011). Με βάση τις τρεις αυτές καταστάσεις, γίνεται κατανοητό ότι τόσο το χαμηλής, όσο και το υψηλής έντασης φως μπορεί να έχει περιοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη (Bernardi et al., 2014; Y. Maltsev et al., 2021).



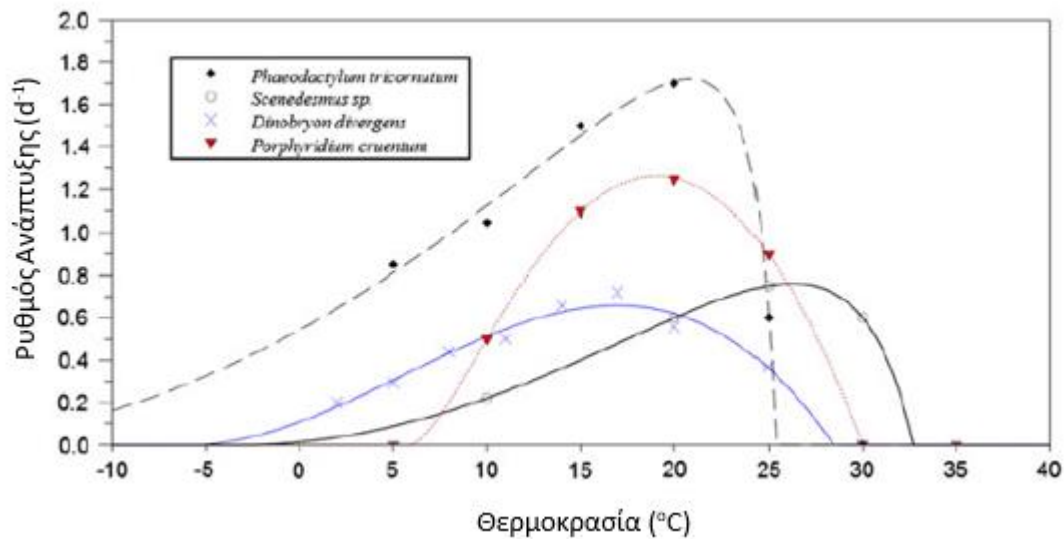
**Εικόνα 9.8:** Σχηματική αναπαράσταση της καμπύλης ρυθμού φωτοσύνθεσης – ακτινοβολίας που απεικονίζει τις τρεις ζώνες φωτός: (1) έλλειψη, (2) κορεσμός και (3) περιορισμός (Darvehei et al., 2018)

Εξίσου σημαντικό είναι και το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που εφαρμόζεται. Μόνο κάποια μήκη κύματος, μεταξύ των 400 – 700 nm (περιοχή ορατού φωτός), αξιοποιούνται από τα μικροφύκη στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης. Βέβαια, το κάθε μικροφύκος αποκρίνεται με διαφορετικό τρόπο στο μήκος κύματος ακτινοβολίας που εφαρμόζεται, ανάλογα με τις χρωστικές που περιέχει (Markou & Nerantzis, 2013; S. K. Wang et al., 2014).

#### 9.3.4.2 ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ

Ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροφυκών εξαρτάται και από τη θερμοκρασία, καθώς αυτή επηρεάζει όλες τις μεταβολικές διεργασίες και τον ρυθμό των βιολογικών αντιδράσεων (Chaisutyakorn et al., 2018; Costa et al., 2019), (Εικόνα 9.9). Γενικά, τα είδη μικροφυκών χαρακτηρίζονται από κάποια βέλτιστη θερμοκρασία. Οι ιδανικές θερμοκρασίες ανάπτυξης επιτρέπουν στα κύτταρα να φωτοσυνθέτουν χωρίς να τροποποιούν τις εγγενείς βιοχημικές ή φυσιολογικές παραμέτρους τους. Οι θερμοκρασίες στις οποίες παρατηρούνται μέγιστοι ρυθμοί ανάπτυξης, κυμαίνονται μεταξύ 20 και 25 °C για τα μεσόφιλα είδη, αλλά μπορεί να φτάσουν και τους 40 °C για τα θερμόφιλα είδη (π.χ. *Chaetoceros*, *Anacystis nidulans*), ή τους 17 °C για τα ψυχρόφιλα είδη (π.χ. *Asterionella formosa*) (Ras et al., 2013).

Κάτω από τη βέλτιστη θερμοκρασία, η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να επιδράσει θετικά στον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων. Χρησιμοποιώντας την εξίσωση Arrhenius, έχει διαπιστωθεί ότι για κάθε αύξηση 10 °C, η φωτοσυνθετική ικανότητα, η διαίρεση των κυττάρων και ο ρυθμός ανάπτυξης περίπου διπλασιάζονται, μέχρι να επιτευχθεί ακατάλληλη για τα κύτταρα θερμοκρασία (Ras et al., 2013). Μόλις ξεπεραστεί η  $T_{opt}$ , ο ρυθμός μειώνεται απότομα κάτι το οποίο μπορεί να οφείλεται στην απώλεια της λειτουργικότητας των ενζύμων και στη μετουσίωση κάποιων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη φωτοσυνθετική διαδικασία. Η εξάρτηση του ρυθμού ανάπτυξης από τη θερμοκρασία, περιγράφεται από μία καμπύλη της μορφής Gauss που γέρνει στα αριστερά και είναι χαρακτηριστική για κάθε μικροφύκος. Το θερμοκρασιακό εύρος μεταξύ της βέλτιστης θερμοκρασίας και της θερμοκρασίας θανάτου, είναι επίσης χαρακτηριστικό. Ένα στενό εύρος μπορεί να δηλώνει κάποιο είδος που είναι ευαίσθητο σε θερμοκρασιακή πίεση, ενώ ένα πλατύ εύρος μπορεί να αντιστοιχεί σε είδος που είναι ικανό να επιβιώνει σε διάφορες μεταβολές (Nalley et al., 2018; Ras et al., 2013).



Εικόνα 9.9: Επίδραση της θερμοκρασίας στον ρυθμό ανάπτυξης τεσσάρων μικροφυκών (Ras et al., 2013)

#### 9.3.4.3 pH

Το pH είναι μία επιπλέον παράμετρος που ελέγχει τον μεταβολισμό των κυττάρων και την παραγωγή και βιοχημική σύσταση της βιομάζας. Η ανάπτυξη των περισσότερων μικροφυκών έχει βρεθεί ότι ευδοκίμει σε ουδέτερα pH, όμως κάθε είδος φαίνεται ότι χαρακτηρίζεται από το δικό του βέλτιστο εύρος, το οποίο ποικίλει ανάμεσα σε 7 και 9. Επίσης, το pH επηρεάζει τη διαλυτότητα και τη διαθεσιμότητα των ιχνοστοιχείων και των θρεπτικών συστατικών στο μέσο της καλλιέργειας (Gatamaneni et al., 2018; Qiu et al., 2017).

Το pH μιας καλλιέργειας αυξάνεται σταδιακά όσο καταναλώνεται  $\text{CO}_2$  (Qiu et al., 2017). Ακόμα, μπορεί να επηρεαστεί από την παρουσία πηγής αζώτου. Για παράδειγμα, η κατανάλωση νιτρικών από το μέσο ανάπτυξης αυξάνει την τιμή του pH λόγω παραγωγής  $\text{OH}^-$ . Αντιστρόφως, η πρόσληψη αμμωνίας από τα μικροφύκη, οδηγεί σε παραγωγή  $\text{H}^+$  και άρα σε οξίνιση του περιβάλλοντος (Chiranjeevi & Mohan, 2016). Ωστόσο, ακραίες τιμές pH, προκαλούν προβλήματα στον ρυθμό ανάπτυξης των μικροφυκών. Υψηλές τιμές pH έχουν συσχετισθεί με μειωμένη απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών και ιχνοστοιχείων, γεγονός που οδηγεί σε μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης. Αντίστροφα, σε πολύ χαμηλές τιμές, λαμβάνει χώρα περιορισμός της δράσης των ενζύμων που συμμετέχουν στη φωτοσύνθεση και ταυτόχρονα, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα για μόλυνση του μέσου από άλλους μικροοργανισμούς (Gatamaneni et al., 2018).

#### 9.3.4.4 ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ

Τα ιδανικά επίπεδα αλατότητας ποικίλουν μεταξύ των διάφορων μικροφυκών, με ορισμένα είδη να αναπτύσσονται από μόνα τους σε θαλασσινά ή υφάλμυρα νερά. Η αλλαγή στην αλατότητα της καλλιέργειας μπορεί να επιδράσει αρνητικά στην ανάπτυξη και τη σύσταση των μικροφυκών εξαιτίας της ωσμωτικής πίεσης και των εναλλαγών στη διαπερατότητα των μεμβρανών των κυττάρων. Στα ανοιχτά συστήματα καλλιέργειας, η εξάτμιση του νερού και η αναπλήρωσή του είναι οι κύριοι λόγοι μεταβολών της αλατότητας (Costa et al., 2019). Παρά τη σημασία της στην καλλιέργεια κάποιου μικροφύκου, δεν έχει μελετηθεί τόσο διεξοδικά όσο άλλες παράμετροι (θερμοκρασία, φωτισμός) (Cañavate & Fernández-Díaz, 2022).

#### 9.3.4.5 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Τα μικροφύκη απαιτούν για την ανάπτυξή τους έναν αριθμό χημικών στοιχείων τα οποία είναι απαραίτητα να υπάρχουν στο μέσο καλλιέργειας υπό τη μορφή χημικών ενώσεων. Οι ενώσεις αυτές αποκαλούνται θρεπτικά συστατικά και περιλαμβάνουν τις πηγές άνθρακα, άζωτου, φωσφόρου και ορισμένων ιχνοστοιχείων. Όσον αφορά στον άνθρακα, για να πραγματοποιηθεί φωτοσύνθεση απαιτείται μία ικανοποιητική ποσότητα ανόργανου άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, μπορεί να δοθεί και στην οργανική μορφή του (σάκχαρα, οξέα ή αλκοόλες) στην περίπτωση ετερότροφης ή μιξότροφης ανάπτυξης. Ένα εξίσου σημαντικό θρεπτικό συστατικό είναι το άζωτο (N). Το άζωτο είναι το πιο καίριο συστατικό για την παραγωγή βιομάζας, μέσα στην οποία η περιεκτικότητά του μπορεί να ξεπεράσει και το 10%. Τα μικροφύκη καταναλώνουν άζωτο κυρίως υπό τη μορφή νιτρικών ( $\text{NO}_3^-$ ), ωστόσο το αμμώνιο ( $\text{NH}_4^+$ ) ή η ουρία, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν χωρίς να προκαλούν βλάβες στην καλλιέργεια. Μέσα στα κύτταρα μετατρέπεται σε οργανικά συστατικά που περιέχουν άζωτο, όπως πρωτεΐνες, ένζυμα και χλωροφύλλες. Παράλληλα, η ανάπτυξη και οι διάφορες ενδοκυτταρικές διεργασίες (όπως μεταφορά ενέργειας και σύνθεση νουκλεϊκών οξέων), υποβοηθούνται από τον φώσφορο (P), ο οποίος μπορεί να αποτελεί το 1% της βιομάζας. Τα μικροφύκη προτιμούν τα ορθοφωσφορικά ιόντα ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) ως πηγή φωσφόρου, τα οποία έπειτα συμμετέχουν στον σχηματισμό πρωτεϊνών, υδατανθράκων και φωσφολιπιδίων. Τέλος, τα μικροφύκη χρειάζονται και ορισμένα ιχνοστοιχεία όπως θείο (S), κάλιο (K), νάτριο (Na), σίδηρο (Fe), μαγνήσιο (Mg), ασβέστιο (Ca), βόριο (B), χαλκό (Cu), μαγγάνιο (Mn) και ψευδάργυρο (Zn) (Costa et al., 2019; Markou & Nerantzis, 2013; Mastropetros et al., 2022).

#### 9.3.5 ΤΥΠΟΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

Η καλλιέργεια των μικροφυκών μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ανοιχτού ή κλειστού τύπου συστήματα. Οι ανοιχτού τύπου καλλιέργειες εκμεταλλεύονται το ηλιακό φως και είναι εκτεθειμένες στο περιβάλλον. Από την άλλη, τα κλειστά συστήματα είναι αντιδραστικές διαφόρων σχημάτων (σωληνοειδείς, επίπεδοι, στήλης) που προσφέρουν καλύτερα ελεγχόμενες συνθήκες καλλιέργειας (Zuccaro et al., 2020). Παραδείγματα ανοιχτών και κλειστών καλλιεργειών φαίνονται στην Εικόνα 9.10.

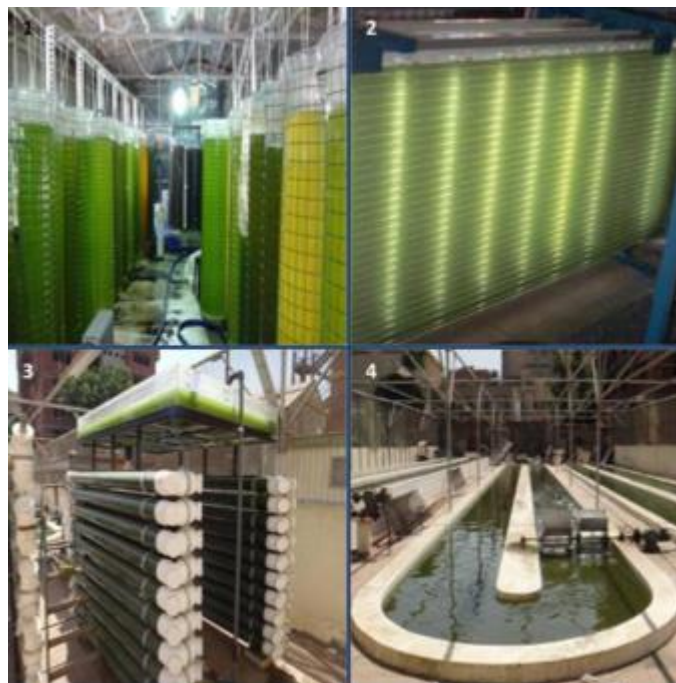
##### 9.3.5.1 ΑΝΟΙΧΤΟΥ ΤΥΠΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Μία από τις πιο κοινές μεθόδους καλλιέργειας μικροφυκών είναι τα ανοιχτά συστήματα καλλιέργειας, όπως οι ανοιχτές δεξαμενές, οι νερόλακκοι και οι λίμνες. Η πρώτη προσπάθεια να καλλιεργηθούν μικροφύκη σε μεγάλης κλίμακας σύστημα, πραγματοποιήθηκε σε ανοιχτές δεξαμενές τύπου raceway. Το βασικότερο πλεονέκτημα των ανοιχτών συστημάτων είναι ότι απαιτούν χαμηλά κόστη εγκατάστασης και λειτουργίας, ενώ έχουν σχετικά καλή δυνατότητα μαζικής καλλιέργειας μικροφυκών (Narala et al., 2016). Χαρακτηρίζονται όμως από έναν αρκετά μεγάλο αριθμό μειονεκτημάτων που τελικά καθιστά τις καλλιέργειες σε τέτοια συστήματα προβληματικές. Αρχικά, ελλοχεύει ο κίνδυνος της επιμόλυνσης της καλλιέργειας αφού τα μικροφύκη είναι εκτεθειμένα στην ατμόσφαιρα. Ως αποτέλεσμα, δύναται να αναπτυχθούν στην καλλιέργεια άλλα μικροφύκη, βακτήρια ή μικροοργανισμοί και να μην υπάρχει πλέον η έννοια της μονο-καλλιέργειας του επιθυμητού μικροφύκου. Επίσης, υπάρχει το πρόβλημα της μη αποδοτικής διάχυσης του φωτός σε όλο τον όγκο του συστήματος, η οποία μάλιστα μειώνεται όσο αυξάνεται το βάθος. Ακόμα, οι ανοιχτές καλλιέργειες εξαρτώνται άμεσα από τις τοπικές καιρικές συνθήκες, κάτι το οποίο τις καθιστά εποχιακές, ενώ εξατμίζονται μεγάλες ποσότητες νερού με αποτέλεσμα την ανάγκη για συνεχή αναπλήρωσή του, αλλά και την αύξηση της συγκέντρωσης των αλάτων. Όσον αφορά στην παραγωγή βιομάζας, έχει διαπιστωθεί

ότι η παραγωγικότητα ανά μονάδα επιφάνειας είναι μικρότερη σε σχέση με τις κλειστού τύπου καλλιέργειες, ενώ δεν είναι πάντα εφικτό να αξιοποιηθούν για την παραγωγή φαρμακευτικών και βρώσιμων προϊόντων (Markou & Nerantzis, 2013; Perez-Garcia et al., 2011).

#### 9.3.5.2 ΚΛΕΙΣΤΟΥ ΤΥΠΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Οι κλειστού τύπου καλλιέργειες λαμβάνουν χώρα σε φωτοβιοαντιδραστήρες (PBR), που κατασκευάζονται από διαφανή υλικά, όπως γυαλί ή πλαστικό (Mastropetros et al., 2022). Ο σκοπός ανάπτυξης των PBR είναι η αύξηση της παραγωγικότητας της βιομάζας. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της βελτιστοποίησης του σχήματος του αντιδραστήρα, των περιβαλλοντικών συνθηκών, της αποστείρωσης του περιβάλλοντος και των λειτουργικών παραμέτρων, όπως pH, φως και διάχυση αέρα. Τόσο η διατήρηση της καλλιέργειας στις βέλτιστες συνθήκες όσο και το γεγονός ότι οι PBRs αποτρέπουν την άμεση επαφή της καλλιέργειας με το εξωτερικό περιβάλλον, προστατεύοντάς την έτσι από επιμολύνσεις, μπορούν να οδηγήσουν στην εξάλειψη των περιορισμών που αφορούν την παραγωγή φαρμακευτικών και βρώσιμων προϊόντων από μικροφύκη (Perez-Garcia et al., 2011). Άλλα πλεονεκτήματα αποτελούν ο καλύτερος έλεγχος των συνθηκών μέσα στον αντιδραστήρα (διάχυση αέρα, ομοιόμορφη θερμική κατανομή, διάχυση φωτός), η δυσκολία εξάτμισης μεγάλων ποσοτήτων νερού, η ευκολία εγκατάστασης και οι σχετικά υψηλές αποδόσεις σε βιομάζα (Markou & Nerantzis, 2013; Mastropetros et al., 2022). Όμως, αντίστοιχα με τις ανοικτού τύπου καλλιέργειες, οι PBR χαρακτηρίζονται από κάποια μειονεκτήματα. Το βασικότερο είναι ότι για τις υποδομές και την κατασκευή τους απαιτείται μία μεγάλη αρχική επένδυση, ενώ είναι απαραίτητη και η συνεχής συντήρησή τους. Επιπλέον, σε όγκους αντιδραστήρων 50 – 100 L, παρεμποδίζεται η αποδοτική διέλευση του φωτός σε όλο το βάθος τους, πρόβλημα στο οποίο συνεισφέρει και η ανάπτυξη βιοφίλμ στα τοιχώματά του (Perez-Garcia et al., 2011).



**Εικόνα 9.10:** Τύποι συστημάτων καλλιέργειας μικροφυκών. (1) πλαστικοί σάκοι 300L, (2) επίπεδοι φωτοαντιδραστήρες, (3) οριζόντιοι σωληνωτοί φωτοβιοαντιδραστήρες και (4) ανοιχτή δεξαμενή τύπου raceway (Markou & Nerantzis, 2013)

## 9.4 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ

### 9.4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Μία βιώσιμη εναλλακτική λύση για την παραγωγή βιοπλαστικών είναι η χρήση μικροφυκών. Σε αντίθεση με τους αποκλειστικά ετερότροφους μικροοργανισμούς, όπως τα βακτήρια, τα μικροφύκη έχουν την ικανότητα να ακολουθούν διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια και να αναπτύσσονται σε διαφόρων ειδών υποστρώματα από καθαρά νερά μέχρι υγρά απόβλητα, ενώ γενικά χαρακτηρίζονται από γρήγορη ανάπτυξη (Mastropetros et al., 2022; Rahman & Miller, 2017). Επίσης, η φωτοσυνθετική τους ικανότητα τους επιτρέπει να απαιτούν μικρότερη ποσότητα θρεπτικών συστατικών σε σχέση με αντίστοιχα ετερότροφα βακτήρια, αφού μέρος της ενέργειας που χρειάζονται την λαμβάνουν από κάποια εξωτερική πηγή φωτός (Rajroot et al., 2022). Επιπλέον, τα μικροφύκη μπορούν να αναπτυχθούν δεσμεύοντας CO<sub>2</sub> από την ατμόσφαιρα συμβάλλοντας έτσι στη γενικότερη προσπάθεια απομάκρυνσης του άνθρακα από αυτήν (Rahman & Miller, 2017). Συγκεντρωτικά λοιπόν, το γεγονός ότι τα μικροφύκη μπορούν να φωτοσυνθέσουν αλλά και να προσαρμόζονται σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες, οδηγεί σε παραγωγή βιοπλαστικών με χαμηλότερο περιβαλλοντικό αποτύπωμα και κόστος σε σύγκριση με την παραγωγή τους από ετερότροφους μικροοργανισμούς.

### 9.4.2 ΕΙΔΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΒΙΟΠΛΑΣΤΙΚΑ

Περίπου 100 είδη μικροφυκών και κυανοβακτηρίων έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να παράξουν PHAs κατά την ανάπτυξή τους. Οι περισσότερες έρευνες μάλιστα στοχεύουν στην μεγιστοποίηση του παραγόμενου βιοπλαστικού μέσω μεταβολής και βελτιστοποίησης των συνθηκών καλλιέργειας του υπό μελέτη είδους (Mastropetros et al., 2022). Η συσσώρευση PHAs μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο υπό μιξότροφες, όσο και υπό αυτότροφες συνθήκες. Ωστόσο, οι έρευνες που έχουν υλοποιηθεί για την παραγωγή PHAs σε αυτότροφες καλλιέργειες έχουν δείξει ότι συνήθως η συσσώρευση βιοπλαστικών είναι μικρότερη από αυτή σε μιξότροφες συνθήκες. Ενδεικτικά, κατά την αυτότροφη ανάπτυξη των *Botryococcus braunii*, *Chlorella pyrenoidosa* και *Chlorella fusca* η συσσώρευση PHB που παρατηρήθηκε ήταν 16%, 27% και 5.5%, αντίστοιχα (Cassuriaga et al., 2018; Das et al., 2018; Kavitha et al., 2016).

Γενικά, οι σημαντικότεροι παράγοντες που ενισχύουν την ενδοκυτταρική συσσώρευση PHB είναι η παρουσία οργανικού άνθρακα στο μέσο της καλλιέργειας, ο περιορισμός ορισμένων θρεπτικών συστατικών αλλά και μετάλλων (Cu και Ni), η μείωση του χρόνου έκθεσης της καλλιέργειας στο φως και η ελεγχόμενη παροχή CO<sub>2</sub> (Mastropetros et al., 2022). Αναφορικά με τον περιορισμό του φωτός στην καλλιέργεια, αρκετές έρευνες έχουν μελετήσει την επίδραση της φωτοπερίοδου και της έντασης του φωτός στην παραγωγή PHB από μικροφύκη. Για παράδειγμα, σε μελέτη των (Cassuriaga et al., 2018), η μέγιστη συγκέντρωση PHB παρατηρήθηκε όταν η ένταση φωτός μειώθηκε από 58 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> σε 28 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, υπό την εφαρμογή κύκλου φωτός (6:18 ώρες, με τις 6 ώρες να αναφέρονται στην έκθεση στο φως). Βελτιστοποιώντας την ένταση του φωτός και τη φωτοπερίοδο ανάλογα με το είδος που καλλιεργείται και τις συνθήκες της καλλιέργειας, είναι δυνατή η ενίσχυση της παραγωγής PHAs.

Επίσης, ο περιορισμός σε κάποιο θρεπτικό συστατικό (κυρίως άζωτο ή φώσφορο) δίνει έναυσμα για την παραγωγή και συσσώρευση PHB από μικροφύκη, ενώ έχει διαπιστωθεί ότι η συγκέντρωση του βιοπλαστικού μπορεί να φτάσει και το 80% της ξηρής βιομάζας τους (Khanna & Srivastava, 2005; A. K. Singh et al., 2016). Όταν τα μικροφύκη αναπτύσσονται σε κάποιο περιβάλλον υπό την παρουσία άνθρακα και την έλλειψη θρεπτικών συστατικών, προσαρμόζουν τον μεταβολισμό τους ώστε να

παράγουν προϊόντα πλούσια σε άνθρακα (όπως τα PHAs), τα οποία λειτουργούν ως αποθήκες ενέργειας. Στη συνέχεια, όταν και η πηγή άνθρακα του υποστρώματος εξαντληθεί, τα βιοπολυμερή μπορούν να αποπολυμεριστούν και τα προϊόντα να χρησιμοποιηθούν για την κάλυψη των αναγκών των κυττάρων (Costa et al., 2019; Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). Στον Πίνακα 9.2 παρουσιάζονται κάποια είδη μικροφυκών τα οποία μπορούν να παράξουν PHAs σε συνθήκες έλλειψης αζώτου ή φωσφόρου.

**Πίνακας 9.2:** Παραγωγή PHAs από μικροφύκη υπό την έλλειψη θρεπτικών συστατικών (Mastropetros et al., 2022)

| ΕΙΔΟΣ                          | ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ                              | ΕΛΛΕΙΨΗ ΣΥΣΤΑΤΙΚΟΥ     | ΤΥΠΟΣ PHA          | ΠΑΡΑΓΩΓΗ PHA (%) |
|--------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------|--------------------|------------------|
| <i>Synechocystis</i> sp.       | Μιξότροφη                                          | Περιορισμός σε N και P | PHB                | 16.4             |
| <i>Synechococcus</i> sp.       | Μιξότροφη                                          | Περιορισμός σε P       | PHB                | 55.0             |
| <i>Synechococcus elongates</i> | Μιξότροφη, 1% σακχαρόζη                            | Περιορισμός σε N       | PHA                | 17.2             |
| <i>Synechococcus elongates</i> | Μιξότροφη, 1% φρουκτόζη                            | Περιορισμός σε P       | PHA                | 7.0              |
| <i>Nostoc muscorum</i>         | BG-11 χωρίς NO <sub>3</sub> , 0.11% οξικό ιόν      | Περιορισμός σε N       | P(3HB – co – 3 HV) | 31.4             |
| <i>Nostoc muscorum</i>         | 0.28% οξικό ιόν, 0.38% γλυκόζη, 0.30% βαλερικό οξύ | Περιορισμός σε N       | P(3HB – co – 3 HV) | 78.0             |
| <i>Spirulina platensis</i>     | 0.5% οξικό νάτριο                                  | Περιορισμός σε N       | P(3HB)             | 10.0             |
| <i>Synechocystis</i> sp.       | 0.5% οξικό νάτριο                                  | Περιορισμός σε N       | P(3HB)             | 14.0             |
| <i>Synechocystis</i> sp.       | 0.4% οξικό ιόν                                     | Περιορισμός σε P       | PHB                | 28.8             |
| <i>Synechococcus subsalsus</i> | Μιξότροφη                                          | Περιορισμός σε N       | PHA                | 16.0             |

#### 9.4.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΒΙΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ

Η ανάκτηση του συσσωρευμένου βιοπλαστικού από τα κύτταρα των μικροφυκών είναι ένα θεμελιώδες βήμα στη διαδικασία παραγωγής βιοπλαστικών, αφού επηρεάζει τα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος και το ποσοστό ανάκτησης. Το πρώτο στάδιο της ανάκτησης, περιλαμβάνει το διαχωρισμό της βιομάζας από το μέσο καλλιέργειας, ο οποίος συνήθως γίνεται με φυγοκέντρηση (McAdam et al., 2020). Το επόμενο βήμα είναι η απόκτηση του βιοπλαστικού, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί με χημικές, φυσικές ή βιολογικές μεθόδους.

Οι χημικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τη χρήση διαλυτών. Οι πιο κοινοί διαλύτες είναι τα χλωροφόρμιο, η ακετόνη, η μεθυλ – ισοβουτυλική κετόνη, το διχλωρομεθάνιο και η ισοαμυλική αλκοόλη.

Γενικά, το χλωροφόρμιο χρησιμοποιείται αρκετά συχνά και έχει διαπιστωθεί ότι μπορεί να δώσει PHB μεγάλου μοριακού βάρους. Ωστόσο, είναι αρκετά τοξικό και για το λόγο αυτό έχουν αρχίσει να μελετώνται και διαλύτες πιο φιλικόι προς το περιβάλλον, όπως το ανθρακικό προπυλένιο, το αιθανικό οξύ, ο βουτυλεστέρας και ο αιθανικός αιθυλεστέρας (Costa et al., 2019; Yashavanth et al., 2021). Ενδεικτικά, χρήση του ανθρακικού προπυλενίου ανέκτησε το 95% του παραγόμενου PHB από το *R. eutropha* με 84% καθαρότητα (Yashavanth et al., 2021).

Στις φυσικές μεθόδους περιλαμβάνονται οι μύλοι ομογενοποίησης και η χρήση υπερήχων. Στόχος τους είναι η αποσταθεροποίηση και τελικά το σπάσιμο της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών. Οι μηχανικές μέθοδοι εξαγωγής αποδίδουν καλύτερες θερμικές ιδιότητες στο πολυμερές, συγκριτικά με τις χημικές μεθόδους, ενώ είναι πιο οικονομικές και λιγότερο τοξικές. Μερικές φορές συνδυάζοντας μηχανικές και χημικές μεθόδους, επιτυγχάνεται καλύτερη ανάκτηση βιοπλαστικού (Costa et al., 2019).

Τέλος, οι βιολογικές μέθοδοι ανάκτησης είναι περίπλοκες διεργασίες που περιλαμβάνουν τη χρήση ενζύμων, όπως τις λυσοζύμες, τις νουκλεάσες και τις πρωτεάσες για την εξαγωγή του βιοπλαστικού από τα κύτταρα. Τα ένζυμα προστίθενται στην καλλιέργεια και υδρολύουν τα κύτταρα που περιέχουν PHB. Τα προτερήματα της τεχνικής αυτής είναι ότι δεν απαιτείται ακραίες συνθήκες για να λειτουργήσει, βασίζεται στην υψηλή εκλεκτικότητα των ενζύμων που υδρολύουν τις πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης και δεν επηρεάζει την ποιότητα του πολυμερούς που προκύπτει (Costa et al., 2019).

#### 9.4.4 ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΜΑΚΩΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΒΙΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ

Οι πολυ(ύδροξυ αλκανοϊκοί) εστέρες έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον ως εναλλακτική λύση απέναντι στη χρήση συμβατικών πλαστικών πετροχημικής προέλευσης, κυρίως λόγω των ελάχιστων αρνητικών επιπτώσεών τους στο περιβάλλον. Ωστόσο, το μεγαλύτερο πρόβλημα που καθιστά περιορισμένη την παραγωγή βιοπλαστικών από μικροφύκη σε βιομηχανική κλίμακα είναι το υψηλό κόστος παραγωγής τους. Το τελικό κόστος παραγωγής PHAs, εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από το κόστος του υποστρώματος που θα χρησιμοποιηθεί για την καλλιέργεια των μικροφυκών, καθώς και από τη μέθοδο που θα εφαρμοστεί για την ανάκτηση του προϊόντος. Συγκεκριμένα, οι οργανικές πηγές άνθρακα έχει βρεθεί ότι μπορεί να αποτελούν μέχρι και το 50% του συνολικού κόστους παραγωγής. Επίσης, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν οι διεργασίες ανάκτησης του βιοπλαστικού που θα επιλεγούν. Η ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική ανάκτησης με οργανικούς διαλύτες (όπως χλωροφόρμιο ή ακετόνη), είναι αρκετά κοστοβόρα εξαιτίας όχι μόνο τις τιμές των συγκεκριμένων διαλυτών, αλλά και λόγω του επιπρόσθετου κόστους για τη διαχείρισή τους όταν πλέον θα θεωρούνται απόβλητα. Άλλες μέθοδοι που εκμεταλλεύονται τη χρήση ενζύμων, είναι επίσης εξαιρετικά ακριβές (Możejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). Επιπρόσθετα, η ανάγκη διατήρησης καθαρών καλλιεργειών υπό μη αποστειρωμένες συνθήκες, κυρίως για τις ανοιχτές καλλιέργειες, και η αύξηση του ρυθμού παραγωγής, είναι προκλήσεις που θα πρέπει να ξεπεραστούν προκειμένου να γίνει εφικτή η παραγωγή PHAs σε μεγάλη κλίμακα (Troschl et al., 2017).

Μία λύση για τη μείωση του κόστους παραγωγής βιοπλαστικών από μικροφύκη είναι η καλλιέργειά τους σε απόβλητα. Οι πηγές των αποβλήτων είναι ευρέως διαθέσιμες και είναι εμπλουτισμένες με οργανικό άνθρακα και θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται τα μικροφύκη για την ανάπτυξή τους. Αυτή η προσέγγιση όχι μόνο μειώνει το συνολικό κόστος παραγωγής βιοπλαστικών, αλλά συμβάλλει και στη βιοεξυγίανση του αποβλήτου (Rubiyatno et al., 2021). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η καλλιέργεια μικροφυκών στην απορρόφηση της αναερόβιας χώνευσης. Οι μεγάλες ποσότητες χωνεμένης υλίας που παράγονται από τις μονάδες της αναερόβιας χώνευσης, καθώς και οι υψηλές

συγκεντρώσεις σε άζωτο και φώσφορο, καθιστούν την καλλιέργεια των μικροφυκών σε αυτό το μέσο μία αξιόλογη εναλλακτική για τη διαχείριση του συγκεκριμένου αποβλήτου. Παράλληλα, διευκολύνεται η μετάβαση προς μία κυκλική οικονομία μέσω της επαναχρησιμοποίησης ενός μέσου το οποίο υπό κανονικές συνθήκες θα θεωρούνταν απόβλητο (Stiles et al., 2018).

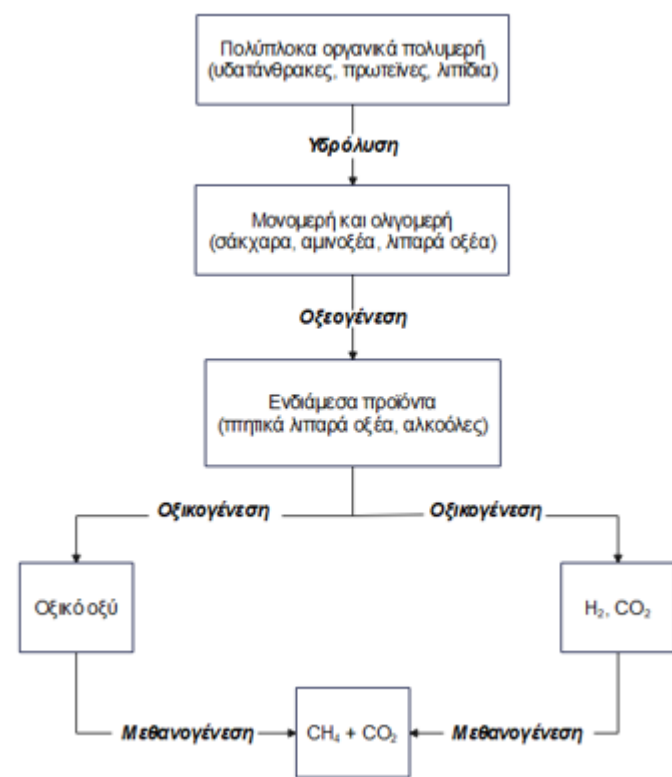
## 9.5 ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΧΩΝΕΥΣΗ

Η αναερόβια χώνευση είναι η βιολογική διεργασία μετατροπής της οργανικής ύλης σε βιοαέριο και χωνεμένη ιλύς με τη βοήθεια μεικτού μικροβιακού πληθυσμού, σε συνθήκες απουσίας οξυγόνου. Το παραγόμενο αέριο αποτελείται κυρίως από μεθάνιο ( $\text{CH}_4$ ) και διοξείδιο του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ), ενώ σε πολύ μικρές ποσότητες υπάρχουν υδρατμοί, άζωτο, υδρογόνο, αμμωνία και υδρόθειο (Nagarajan et al., 2019).

Τα τελευταία χρόνια, η εκθετική αύξηση του πληθυσμού έχει οδηγήσει σε ραγδαία αύξηση των παραγόμενων αποβλήτων. Η αναερόβια χώνευση μελετάται ως μία εναλλακτική μέθοδος διαχείρισης των αποβλήτων που περιέχουν υψηλά ποσοστά οργανικών συστατικών, ενώ παράλληλα δίνει τη δυνατότητα παραγωγής χρήσιμων προϊόντων. Για παράδειγμα το βιοαέριο μπορεί να αξιοποιηθεί προς παραγωγή ηλεκτρισμού και θερμότητας, ενώ μία κλασσική εφαρμογή της χωνεμένης ιλύος, είναι η χρήση της ως εδαφοβελτιωτικό υλικό.

### 9.5.1 ΣΤΑΔΙΑ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑΣ ΧΩΝΕΥΣΗΣ

Η αναερόβια χώνευση είναι μία διεργασία πολλαπλών σταδίων μεταξύ διαφορετικών μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί αυτοί συνεργάζονται με σκοπό να διασπάσουν πολύπλοκες ενώσεις και πολυμερή. Τα τέσσερα βασικά βήματα της αναερόβιας χώνευσης είναι η υδρόλυση, η οξεογένεση, η οξικογένεση και η μεθανογένεση (Nagarajan et al., 2019), (Εικόνα 9.11):



Εικόνα 9.11: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της αναερόβιας χώνευσης

#### 9.5.1.1 ΥΔΡΟΛΥΣΗ

Το πρώτο στάδιο είναι η υδρόλυση, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση της πολύπλοκης οργανικής ύλης σε μονομερή και олиγομερή. Εξωκυτταρικά ένζυμα (αμυλάσες, κυτταρινάσες, ξυλάσες, λιπάσες, πρωτεάσες κ.α.) υδρολύουν τα οργανικά μακρομόρια στα αντίστοιχα μονομερή τους. Οι υδατάνθρακες, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια, διασπώνται σε σάκχαρα, αμινοξέα και λιπαρά οξέα αντίστοιχα, τα οποία πλέον μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη των ζυμωτικών βακτηρίων (Nagarajan et al., 2019).

#### 9.5.1.2 ΟΞΕΟΓΕΝΕΣΗ

Το επόμενο στάδιο είναι η οξεογένεση κατά την οποία τα μονομερή που προέκυψαν στην υδρόλυση διασπώνται ακόμα περισσότερο από αναερόβια βακτήρια. Τα υδρολυμένα προϊόντα μετατρέπονται σε πτητικά λιπαρά οξέα χαμηλού μοριακού βάρους (οξικό οξύ, προπιονικό οξύ, μυρμηγκικό οξύ και γαλακτικό οξύ), αλκοόλες (αιθανόλη, μεθανόλη) και κετόνες (γλυκερίνη, ακετόνη), ενώ υπάρχει συνεχής έκλυση CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub> (Nagarajan et al., 2019).

#### 9.5.1.3 ΟΞΙΚΟΓΕΝΕΣΗ

Η οξικογένεση είναι ο μεταβολικός σύνδεσμος ανάμεσα στα προϊόντα της οξεογένεσης και στη δημιουργία του μεθανίου. Οξικογόνα βακτήρια μετατρέπουν τα βαριά οργανικά οξέα και αλκοόλες σε οξικό οξύ, διοξείδιο του άνθρακα και υδρογόνο. Η οξικογένεση είναι θερμοδυναμικά εφικτή μόνο σε χαμηλές μερικές πιέσεις υδρογόνου, κάτι το οποίο οδηγεί σε συντροφική σχέση μεταξύ των οξικογόνων βακτηρίων (τα οποία παράγουν υδρογόνο) και των μεθανογόνων βακτηρίων (τα οποία καταναλώνουν υδρογόνο). Η σχέση αυτή καθορίζει και την απόδοση στην παραγωγή του βιοαερίου (Nagarajan et al., 2019).

#### 9.5.1.4 ΜΕΘΑΝΟΓΕΝΕΣΗ

Το τελευταίο στάδιο της αναερόβιας χώνευσης, είναι η μεθανογένεση. Το στάδιο αυτό είναι αυστηρώς αναερόβιο καθώς τα μεθανογόνα αρχαία δεν μπορούν να επιβιώσουν υπό την παρουσία οξυγόνου. Το οξικό οξύ, το διοξείδιο του άνθρακα και το υδρογόνο μετατρέπονται σε μεθάνιο από δύο κατηγορίες μικροοργανισμών. Οι μεθανογόνοι οξικοκαταναλωτές καταναλώνουν το οξικό οξύ προς παραγωγή μεθανίου, ενώ οι μεθανογόνοι υδρογονοκαταναλωτές μετατρέπουν το υδρογόνο και το διοξείδιο του άνθρακα σε μεθάνιο (Uddin & Wright, 2022).

### 9.5.2 ΑΠΟΡΡΟΗ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑΣ ΧΩΝΕΥΣΗΣ

Η χωνεμένη ιλύς που προκύπτει από την αναερόβια χώνευση είναι μία υγρή, αλλά σχετικά πυκνή λάσπη, η οποία περιέχει μία σημαντική ποσότητα στερεών συστατικών. Η σύστασή της εξαρτάται από το είδος και τη σύσταση του υποστρώματος που θα οδηγηθεί προς αναερόβια χώνευση και από τις συνθήκες λειτουργίας του συστήματος (pH, θερμοκρασία, υδραυλικός χρόνος παραμονής στον αντιδραστήρα, οργανική φόρτιση). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτούσια ή να χωριστεί σε δύο κλάσματα: ένα στερεό μέρος που περιέχει τα αδιάλυτα ολικά στερεά (TS), και ένα υγρό κλάσμα που περιέχει τα περισσότερα πτητικά στερεά (VS). Στον Πίνακα 9.3, παρουσιάζονται ορισμένα από τα πιο κοινά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται ως τροφοδοσία στη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης (Chuka-ogwude et al., 2020).

**Πίνακας 9.3:** Συνήθεις τροφοδοσίες στην διεργασία της αναερόβιας χώνευσης

| ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ            | ΠΗΓΗ                                              |
|----------------------|---------------------------------------------------|
| Αγροτικά Απόβλητα    | Κοπριά ζώων                                       |
|                      | Υπολείμματα συγκομιδής                            |
|                      | Ενεργειακές καλλιέργειες                          |
| Βιομηχανικά Απόβλητα | Απόβλητα βιομηχανιών επεξεργασίας τροφίμων/ ποτών |
|                      | Απορρίμματα φαρμακευτικών εταιρειών               |
|                      | Απορρίμματα σφαγείων                              |
|                      | Απορρίμματα τυροκομείων                           |
| Αστικά Απόβλητα      | Οργανικό κλάσμα των στερεών αστικών αποβλήτων     |
|                      | Ιλύς (βιολογικών καθαρισμών)                      |
|                      | Υπολείμματα αυλών                                 |
|                      | Φαγητά από εστιατόρια/ καφετέριες                 |
|                      | Απορρίμματα των υπεραγορών                        |

#### 9.5.2.1 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΝΕΠΕΞΕΡΓΑΣΤΗΣ ΧΩΝΕΜΕΝΗΣ ΙΛΥΟΣ

Η χωνεμένη ιλύς χαρακτηρίζεται από υψηλές ποσότητες αζώτου και φωσφόρου. Η αύξηση του pH και της συγκέντρωσης αμμωνιακού αζώτου ( $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ ) κατά την αναερόβια χώνευση, ενισχύει τη ρυπογόνο δύναμη της ιλύος τόσο κατά την αποθήκευσή της, όσο και κατά τη διάθεσή της στο έδαφος. Οι βασικότερες ανησυχίες σχετικά με την απευθείας και μη ελεγχόμενη διάθεση της χωνεμένης ιλύος είναι οι εκπομπές αμμωνίας στο περιβάλλον λόγω της εξάτμισής της, η διεύθυνση νιτρικών στο έδαφος ( $\text{NO}_3^-$ ) και οι εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου ( $\text{N}_2\text{O}$ ), με ταυτόχρονες επιδράσεις στην ποιότητα του αέρα και του νερού, στην εύρυθμη λειτουργία των οικοσυστημάτων και στην ανθρώπινη υγεία (Chuka-ogwude et al., 2020).

#### 9.5.2.2 ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΧΩΝΕΜΕΝΗΣ ΙΛΥΟΣ

Κάποιες από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό της χωνεμένης ιλύος είναι:

- Αναερόβια οξείδωση αμμωνίας
- Απογύμνωση της αμμωνίας
- Αντίστροφη ώσμωση
- Κρυστάλλωση στρουβίτη
- Υδροπονία
- Καλλιέργεια μικροφυκών

Οι τεχνικές αυτές αποσκοπούν στο να μειώσουν δραστικά ή να αφαιρέσουν τελείως τα βλαβερά συστατικά της λάσπης. Η πιο συνήθης χρήση της ιλύος είναι η εφαρμογή της ως λίπασμα σε καλλιέργειες, ενώ στην περίπτωση που μετά τις διεργασίες καθαρισμού προκύψει υγρό που τείνει στο καθαρό νερό, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για άρδευση, ως πόσιμο νερό για τα ζώα και ως νερό για βιομηχανική χρήση (Chuka-ogwude et al., 2020).

Από την άλλη πλευρά, οι τεχνικές που εφαρμόζονται για τη διαχείριση του στερεού κλάσματος της χωνεμένης ιλύος, περιλαμβάνουν την κομποστοποίηση και την πυρόλυσή του. Οι ίνες και τα αδιάλυτα στερεά του στερεού κλάσματος μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν ως υλικό πλήρωσης ή ως μοριοσανίδες (Chuka-ogwude et al., 2020).

#### 9.5.2.3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΑΠΟΡΡΟΗ ΤΗΣ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑΣ ΧΩΝΕΥΣΗΣ

Μία από τις μεθόδους επεξεργασίας της χωνεμένης ιλύος είναι η καλλιέργεια μικροφυκών. Τα θρεπτικά συστατικά (άζωτο και φώσφορος) που είναι αναγκαία για την ανάπτυξη των μικροφυκών, μπορούν να βρεθούν στην υγρή απορροή της αναερόβιας χώνευσης. Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι σε κάποιες περιπτώσεις η καλλιέργεια μικροφυκών στη χωνεμένη ιλύς μπορεί να μειώσει την οργανική φόρτιση του αποβλήτου ακόμα και κατά 90% (Chuka-ogwude et al., 2020). Επομένως, η αξιοποίηση της ιλύος ως μέσο καλλιέργειας μικροφυκών, οδηγεί όχι μόνο στον καθαρισμό της και άρα στην ασφαλέστερη διάθεσή της, αλλά αποτελεί και μία πολύ οικονομική λύση, συγκριτικά με άλλα υποστρώματα (Uggetti et al., 2014).

Όσον αφορά στις δυσκολίες που φέρει η χρήση της χωνεμένης ιλύος ως υπόστρωμα ανάπτυξης μικροφυκών, οι περισσότερες έρευνες αναφέρουν τη θολερότητα ως το σημαντικότερο εμπόδιο. Η θολερότητα της χωνεμένης ιλύος οφείλεται στην ύπαρξη διαλυμένων, οργανικών ή ανόργανων συστατικών, αιωρούμενων στερεών ή ακόμα και άλλων μικροοργανισμών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναποτελεσματική διέλευση του φωτός στο σώμα της καλλιέργειας, γεγονός το οποίο οδηγεί σε παρεμπόδιση της φωτοσυνθετικής διαδικασίας και άρα σε χαμηλούς ρυθμούς ανάπτυξης και παραγωγής βιομάζας. Ακόμα ένα πρόβλημα που προκαλεί ο αυξημένος αριθμός των στερεών, είναι η πιθανότητα συσσωμάτωσης των μικροφυκών με τα στερεά, που και πάλι μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλούς ρυθμούς ανάπτυξης και δυσκολία στη διάχυση του φωτός. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση των στερεών, περιλαμβάνουν τη φυγοκέντρωση, τη διήθηση, τη προσρόφηση και την ιζηματοποίηση. Ωστόσο, η πιο διαδεδομένη μέθοδος μείωσης της θολερότητας είναι η αραίωση της ιλύος σε νερό (Chuka-ogwude et al., 2020).

Γενικά, υπάρχουν στη βιβλιογραφία διάφορες έρευνες στις οποίες έχει μελετηθεί η καλλιέργεια μικροφυκών στην υγρή απορροή της αναερόβιας χώνευσης. Ωστόσο, η περίπτωση παραγωγής βιοπλαστικών από μικροφύκη που αναπτύσσονται στη χωνεμένη ιλύ, φαίνεται ότι δεν έχει ερευνηθεί διεξοδικά. Συγκεκριμένα, μετά από βιβλιογραφική ανασκόπηση, εντοπίστηκαν ελάχιστες μελέτες με θέμα την παραγωγή βιοπλαστικών. Ενδεικτικά, η πρώτη έρευνα εξέτασε την καλλιέργεια του κυανοβακτηρίου *Synechocystis salina* στη χωνεμένη ιλύ και ανέφερε μία συγκέντρωση PHB της τάξης του 6.3% (Meixner et al., 2016). Σε δεύτερη έρευνα καλλιεργήθηκαν τα κυανοβακτήρια *Aphanothece clathrata*, *Synechococcus leopoliensis* και *Synechocystis aquatilis* σε τρία διαφορετικά μέσα, εκ των οποίων το ένα αποτελούνταν από χωνεμένη ιλύς. Τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε PHB στο μέσο με την επεξεργασμένη ιλύς, έδωσε το κυανοβακτήριο *A. clathrata* με συγκέντρωση PHB ίση με 2% (Mariotto et al., 2023). Φυσικά, αξίζει να αναφερθεί ότι και οι δύο έρευνες πραγματοποιούνται την παραγωγή βιοπλαστικού από κυανοβακτήρια και όχι από μικροφύκη.

## 9.6 ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

---

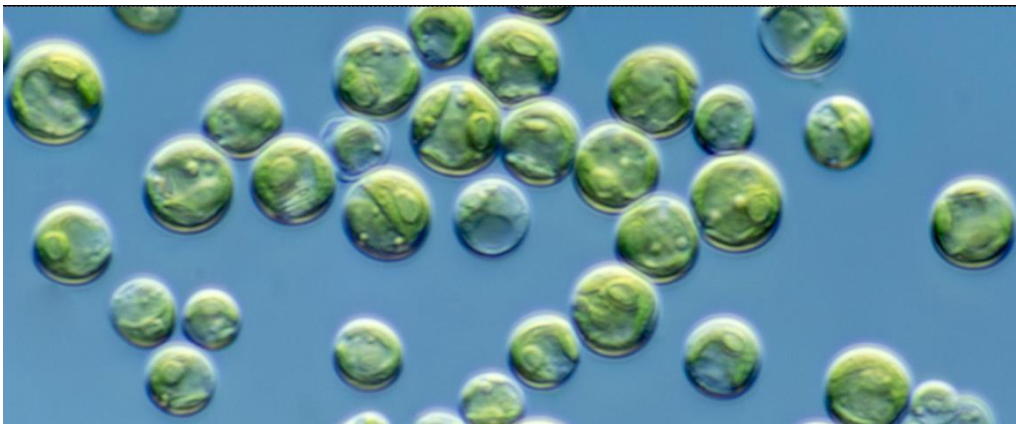
Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η μελέτη της παραγωγής βιοδιασπώμενων βιοπλαστικών από μικροφύκη. Πιο συγκεκριμένα, καλλιεργήθηκαν πέντε είδη μικροφυκών σε μιξότροφες συνθήκες (*Chlorella vulgaris*, *Chromochloris zofingiensis*, *Chlorococcum oleofaciens*, *Chlorella minutissima* και *Euglena gracilis*), ενώ το υπόστρωμα των καλλιεργειών αποτέλεσε η απορροή της αναερόβιας χώνευσης αγροκτηνοτροφικών αποβλήτων. Βασικός στόχος της εργασίας είναι η διαδικασία αξιολόγησης (screening) των πέντε παραπάνω μικροφυκών ώστε να εξετασθεί η δυνατότητα συσσώρευσης βιοπλαστικού ανά είδος στο συγκεκριμένο υπόστρωμα. Παράλληλα, με την καλλιέργεια των μικροφυκών στην απορροή της αναερόβιας χώνευσης, μελετάται η βιοεξυγιάνση του υποστρώματος από τον άνθρακα, τον φώσφορο και το άζωτο.

## 10. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

### 10.1 ΥΛΙΚΑ

#### 10.1.1 *Chlorella vulgaris*

Το μικροφύκος *Chlorella vulgaris* (Εικόνα 10.1) ανακαλύφθηκε το 1890 από τον Ολλανδό ερευνητή Martinus Willem Beijerinck. Είναι μονοκύτταρος, ευκαρυωτικός μικροοργανισμός του γένους *Chlorella*, με κύτταρα σφαιρικού σχήματος διαμέτρου 2 – 10  $\mu\text{m}$  που δεν έχουν ικανότητα κίνησης. Χαρακτηρίζεται από ταχείς ρυθμούς ανάπτυξης και από την αντίστασή του ενάντια σε σκληρές συνθήκες και εισβολείς. Μπορεί να καλλιεργηθεί αυτότροφα, ετερότροφα ή να συνδυάσει τους δύο μεταβολισμούς σε μιξότροφη ανάπτυξη. Αναφορικά με τη σύστασή του, το 42 – 58% της ξηρής βιομάζας του είναι πρωτεΐνες, το 5 – 40% είναι λιπίδια (γλυκολιπίδια, υδρογονάνθρακες, φωσφολιπίδια και μικρή ποσότητα λιπαρών οξέων), ενώ παρουσιάζει και μία ικανοποιητική ποσότητα υδατανθράκων η οποία σε συνθήκες έλλειψης αζώτου μπορεί να φτάσει και το 12 – 55% του ξηρού βάρους. Το άμυλο είναι ο πιο πολυπληθής πολυσακχαρίτης στο *Chlorella vulgaris*. Από πλευράς χρωστικών, το *Chlorella vulgaris* περιέχει κυρίως χλωροφύλλη και καροτενοειδή και επίσης αποτελείται από μεγάλο αριθμό μετάλλων και βιταμινών. Βρίσκει εφαρμογές στην παραγωγή βιοκαυσίμων, στη βιομηχανία τροφίμων ως τροφή για τους ανθρώπους και τα ζώα, στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων και σε αγροχημικές τεχνικές (Safi et al., 2014).

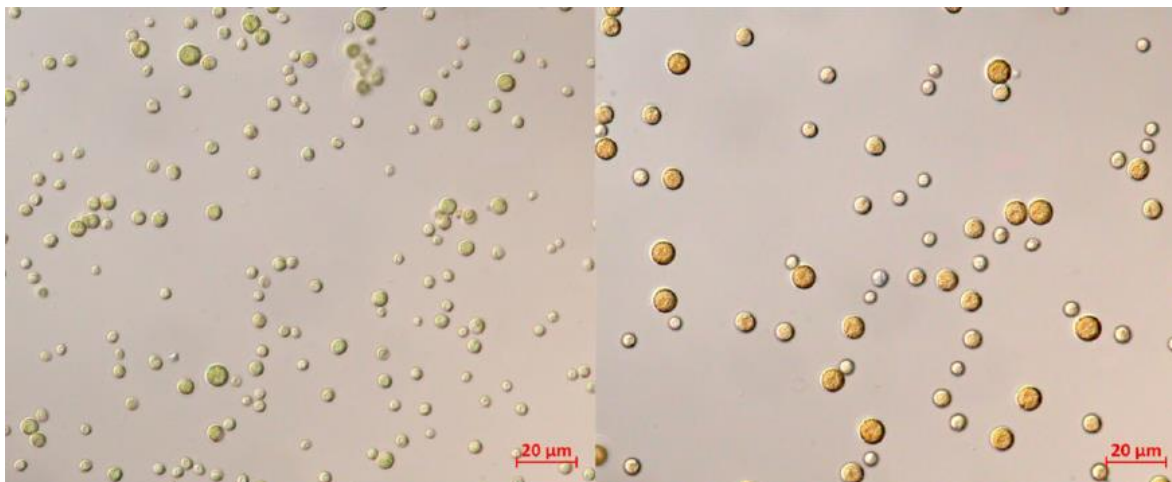


Εικόνα 10.1: Το μικροφύκος *Chlorella vulgaris* ([Micropia.nl](http://Micropia.nl))

#### 10.1.2 *Chromochloris zofingiensis*

Το μικροφύκος *Chromochloris zofingiensis* (Εικόνα 10.2) απομονώθηκε το 1934 από τον Döhnz και ανήκει στα Χλωρόφυτα. Πρόκειται για ένα μονοκύτταρο, ευκαρυωτικό μικροοργανισμό με σφαιρικά κύτταρα χωρίς μαστίγιο, διαμέτρου 2 – 15  $\mu\text{m}$ . Υπό κανονικές συνθήκες έχει πράσινο χρώμα, ωστόσο όταν αρχίσει να βρίσκεται σε συνθήκες stress, το χρώμα του γίνεται πορτοκαλί εξαιτίας της ασταξανθίνης. Μπορεί να εκμεταλλευτεί τόσο οργανικές, όσο και ανόργανες πηγές άνθρακα και άρα να καλλιεργηθεί αυτότροφα, ετερότροφα ή μιξότροφα. Αναπτύσσεται ικανοποιητικά όταν πηγή αζώτου είναι τα νιτρικά ή η ουρία, ωστόσο αν υπάρχει αμμωνία, η ανάπτυξη του *C. zofingiensis* είναι ελλιπής. Αναφορικά με τον φώσφορο έρευνες έχουν δείξει ότι δεν επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη,

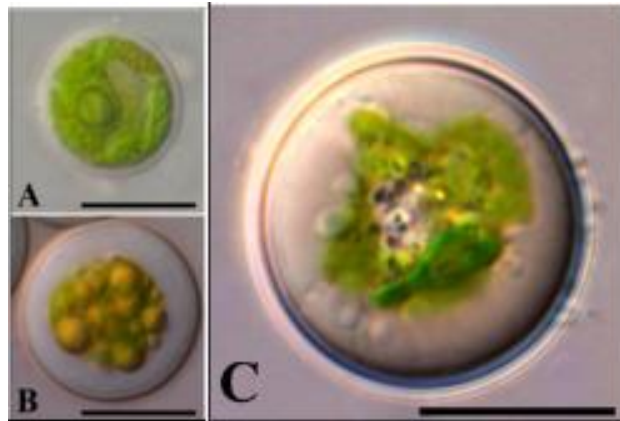
και η έλλειψή του έχει μικρή επίδραση σε αυτήν (Y. Zhang et al., 2021). Το *C. zofingiensis* είναι ένα μικροφύκος που αναφέρεται ότι μπορεί να αξιοποιηθεί σε βιο – διυλιστήρια, χωρίς όμως να έχουν γίνει λεπτομερείς έρευνες για την απόκτηση πολλαπλών προϊόντων. Οι πιο υποσχόμενες χρωστικές που παράγει είναι η ασταξανθίνη, η κανθαξανθίνη, η β-καροτίνη και η λουτεΐνη. Επίσης το συγκεκριμένο μικροφύκος έχει μελετηθεί για τη χρήση του στην παραγωγή βιοκαυσίμων και φαρμακοτροφίμων εξαιτίας της μεγάλης συγκέντρωσής του σε λιπίδια. Συγκεκριμένα, τα ολικά λιπίδια μπορούν να φτάσουν το 66% του ξηρού βάρους της βιομάζας και οι τριακυλογλυκερόλες το 40% του ξηρού βάρους (Wood et al., 2022).



**Εικόνα 10.2:** Το μικροφύκος *Chromochloris zofingiensis* σε αυτότροφη ανάπτυξη (αριστερά) και μιξότροφη ανάπτυξη (δεξιά) (Wood et al., 2022)

### 10.1.3 *Chlorococcum oleofaciens*

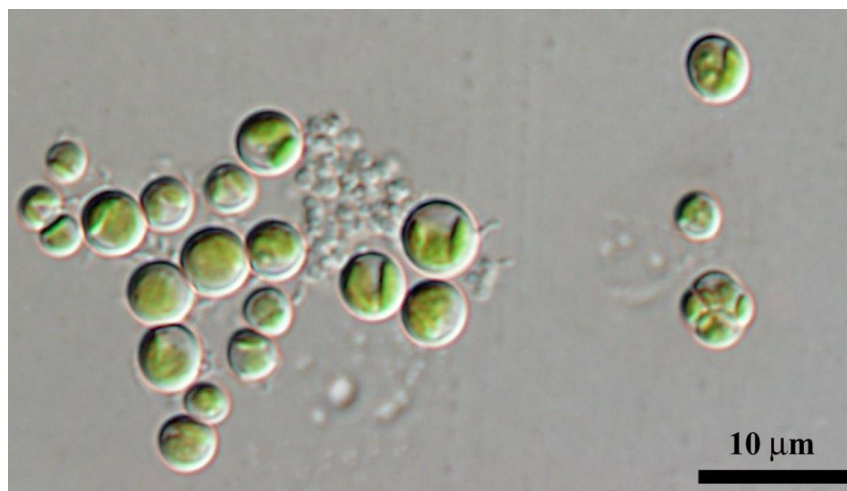
Το *Chlorococcum oleofaciens* (Εικόνα 10.3) ανήκει στο γένος *Chlorococcum* και είναι ένα μονοκύτταρο, ευκαρυωτικό μικροφύκος. Έχει κύτταρα σφαιρικού ή ελικοειδούς σχήματος με διάμετρο που εξαρτάται από τη φάση ανάπτυξης στην οποία βρίσκεται και μπορεί να φτάσει και τα 30 μm (Y. I. Maltsev & Kononov, 2017). Χαρακτηρίζεται από γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης, υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια και πολύ καλή προσαρμοστικότητα σε πληθώρα συνθηκών. Είναι ένα είδος γλυκού νερού και εξαιρετικός υποψήφιος για την παραγωγή βιοκαυσίμων εξαιτίας της ικανότητάς του να παράγει μεγάλες ποσότητες κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων (Ignatenko et al., 2019; Rayati et al., 2020).



**Εικόνα 10.3:** Το μικροφύκος *Chlorococcum oleofaciens* σε πρώιμη (A) και ώριμη (B) φάση ανάπτυξης, (C) ώριμο κύτταρο και διαφανές άχρωμο έλαιο (Y. I. Maltsev & Kononvalenko, 2017)

#### 10.1.4 *Chlorella minutissima*

Η *Chlorella minutissima* (Εικόνα 10.4) είναι ένα μονοκύτταρο, ευκαρυωτικό μικροφύκος με διάμετρο κυττάρων 2 – 5  $\mu\text{m}$  (Tang et al., 2011). Είναι ένα εύκολα καλλιεργήσιμο είδος και χαρακτηρίζεται από πολύ γρήγορους ρυθμούς ανάπτυξης. Επίσης, είναι πλούσιο σε αμινοξέα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται ευρέως σε συμπληρώματα διατροφής και στη φαρμακοβιομηχανία. Μπορεί να αναπτυχθεί σε περιβάλλοντα πλούσια σε  $\text{CO}_2$  μετριάζοντας έτσι τη συγκέντρωσή του στο περιβάλλον (Kumari et al., 2023). Το συγκεκριμένο μικροφύκος μπορεί να αναπτύσσεται αυτότροφα, ετερότροφα ή μιξότροφα ανάλογα με τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών στο μέσο καλλιέργειας, και μπορεί να παράξει ποικίλα συστατικά, όπως καροτενοειδή, αμινοξέα, πολυσακχαρίτες, πολυφαινόλες, βιταμίνες, πρωτεΐνες και ένζυμα (L. Kumar et al., 2023). Γενικά, έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες σχετικά με την αξιοποίησή του για την παραγωγή βιοκαυσίμων τρίτης γενιάς (Chakraborty et al., 2016; Chandra et al., 2019; Sharma et al., 2021).



**Εικόνα 10.4:** Το μικροφύκος *Chlorella minutissima* (CCALA)

### 10.1.5 *Euglena gracilis*

Το μικροφύκος *Euglena gracilis* (Εικόνα 10.5) είναι μονοκύτταρος μικροοργανισμός που φέρει μαστίγιο και συναντάται κυρίως σε γλυκά νερά. Μπορεί να αναπτυχθεί αυτότροφα, ετερότροφα και μιξότροφα (Zimorski et al., 2017). Έχει μία φυσική ικανότητα να ανταποκρίνεται σε μεγάλο αριθμό εξωτερικών πιέσεων, όπως ανάπτυξη σε όξινες συνθήκες και την ιονίζουσα ακτινοβολία, και έχει την ικανότητα να αφαιρεί βαρέα μέταλλα από μολυσμένα ύδατα. Εμπορικά προϊόντα που έχουν παραχθεί από το *Euglena gracilis* περιλαμβάνουν πρωτεΐνες, βιταμίνες, λιπίδια και την β-1, 3-γλυκάνη, γνωστή ως paramylon. Το paramylon είναι ένα πολύ σημαντικό συστατικό και μπορεί να αποτελέσει ακόμα και το 70 – 80% της ξηρής βιομάζας του *Euglena gracilis*. Η σημασία του έγκειται στις αντιμικροβιακές ιδιότητές του και στην ικανότητά του να ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα. Η προσθήκη paramylon στην διατροφή μπορεί να μειώσει τα επίπεδα χοληστερίνης, να ρυθμίσει τη γλυκόζη μετά από γεύματα και μετριάσει την έκλυση ινσουλίνης. Βρίσκει εφαρμογές δηλαδή στον ιατρικό και φαρμακευτικό τομέα. Τέλος, το συγκεκριμένο μικροφύκος έχει χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για το γένος *Euglena* προκειμένου να κατανοηθεί η βασική φυσιολογία και βιοχημεία του (Gissibl et al., 2019; Zheng et al., 2023).



Εικόνα 10.5: Κύτταρο του *Euglena gracilis* (Barsanti et al., 2012)

## 10.2 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 10.2.1 ΜΕΤΡΗΣΗ pH

Το pH ορίζεται ως ο αρνητικός λογάριθμος της συγκέντρωσης των οξονίων ενός διαλύματος. Η μέτρησή του γίνεται με τη χρήση ηλεκτρονικού pH-μέτρου. Στη συνέχεια το ηλεκτρόδιο του οργάνου εμβαπτίζεται στον όγκο του δείγματος που έχει ληφθεί (περίπου 10 – 15 mL). Μετά τη διαδικασία της μέτρησης, το ηλεκτρόδιο διατηρείται σε διάλυμα αποθήκευσης (KCl 3M).

### 10.2.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΠΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ

Η οπτική πυκνότητα (OD) είναι μία γρήγορη και μη καταστροφική μέθοδος μέτρησης της συγκέντρωσης της παραγόμενης βιομάζας στις καλλιέργειες των μονοκύτταρων μικροοργανισμών. Η ποσότητα του φωτός που απορροφάται από τα κύτταρα που βρίσκονται σε αιώρηση, μπορεί να συσχετισθεί με τη μάζα των κυττάρων. Αυτή η συσχέτιση είναι μία συνάρτηση ανάμεσα στο μέγεθος των κυττάρων, στο σχήμα τους και τον δείκτη διάθλασης (Griffiths et al., 2011). Για τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας, 3 mL δείγματος από την καλλιέργεια, τοποθετούνται σε πλαστική κυψελίδα και προσδιορίζεται φωτομετρικά (Cary 50 UV/ VIS, Varian) η απορρόφηση στα 550 nm.

### 10.2.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

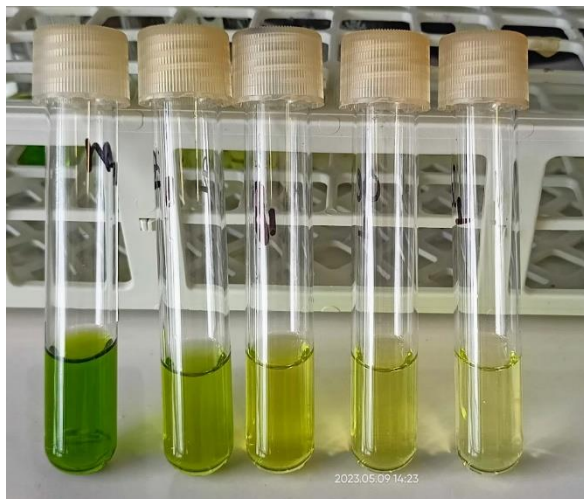
Για τη μέτρηση των χρωστικών των μικροφυκών (χλωροφύλλη α, χλωροφύλλη β και ολικά καροτενοειδή) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της εκχύλισής τους από τη νωπή βιομάζα με διαλύτη διμεθυλοφορμαμίδιο (dimethyl – formamide, DMF). Συγκεκριμένα σε γνωστή ποσότητα νωπής βιομάζας προστίθενται 4 mL DMF. Το δείγμα αναδεύεται με vortex και αφήνεται σε σκοτεινό μέρος στους 25 °C για περίπου μισή ώρα. Στη συνέχεια, το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στα 4,500 rpm προκειμένου να συλλεχθεί ο υπερκείμενος διαλύτης που περιέχει τις διαλυμένες χρωστικές (Εικόνα 10.6). Από το υπερκείμενο υγρό προσδιορίζεται φασματοσκοπικά (Varian Cary 50) η απορρόφηση σε 4 διαφορετικά μήκη κύματος (480 nm, 646.3 nm, 663.8 nm και 750 nm). Η συγκέντρωση των χρωστικών ( $C_a$  για τη συγκέντρωση της χλωροφύλλης α,  $C_b$  για τη συγκέντρωση της χλωροφύλλης β και  $C_c$  συγκέντρωση ολικών καροτενοειδών) υπολογίζεται από τις παρακάτω σχέσεις, όπου A η οπτική απορρόφηση (Porra et al., 1989; Wellburn, 1994).

$$C_a(\text{mg mL}^{-1}) = 12A_{663.8} - 3.11A_{646.3} \quad (11.1)$$

$$C_b(\text{mg mL}^{-1}) = 20.78A_{646.3} - 4.88A_{663.8} \quad (11.2)$$

$$C_{a+b}(\text{mg mL}^{-1}) = 17.67A_{646.3} + 7.12A_{663.8} \quad (11.3)$$

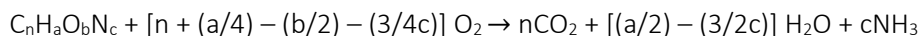
$$C_c(\text{mg mL}^{-1}) = \frac{(1000A_{480} - 1.12C_a - 34.07C_b)}{245} \quad (11.4)$$



**Εικόνα 10.6:** Διαλυμένες χρωστικές σε διαλύτη διμεθυλοφορμαμίδιο των μικροφυκών *Chlorella minutissima*, *Chlorella vulgaris*, *Euglena gracilis*, *Chlorococcum oleofaciens* και *Chromochloris zofingiensis*.

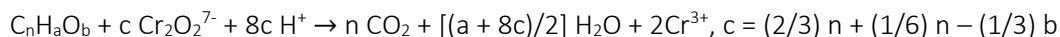
#### 10.2.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΧΗΜΙΚΑ ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (Chemical Oxygen Demand, COD)

Ως χημικά απαιτούμενο οξυγόνο ενός δείγματος ορίζεται η ισοδύναμη ποσότητα οξυγόνου ενός ισχυρού χημικού οξειδωτικού που απαιτείται για την πλήρη οξείδωση του οργανικού υλικού του δείγματος σε  $\text{CO}_2$  και  $\text{H}_2\text{O}$ . Επομένως η μέτρηση του COD πραγματοποιείται με σκοπό τον προσδιορισμό της οργανικής ισχύος του δείγματος. Η μέτρηση είναι προτιμότερο να γίνεται με τη μέθοδο των διχρωματικών ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) λόγω της μεγάλης οξειδωτικής ικανότητας, της εφαρμοσιμότητας σε ευρεία ποικιλία δειγμάτων και της απλότητας της πειραματικής διαδικασίας. Η αντίδραση οξείδωσης μιας οργανικής ένωσης φαίνεται παρακάτω. Στην περίπτωση που το δείγμα περιέχει και άζωτο, τότε παράγεται αμμωνία.



Η μέτρηση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου γίνεται με βάση τη μέθοδο που περιγράφεται στο βιβλίο «Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (edition 2012)». Αρχικά, 2 mL δείγματος τοποθετούνται σε ειδικά γυάλινα φιαλίδια. Στη συνέχεια προστίθενται 1.2 mL από το αντιδραστήριο χώνευσης (υδατικό διάλυμα  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  με  $\text{HgSO}_4$ , οξυνισμένο με  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) και 2.8 mL από τον καταλύτη ( $\text{AgSO}_4$  διαλυμένο σε πυκνό  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Τα φιαλίδια σφραγίζονται, αναδεύονται με τη χρήση vortex και οδηγούνται προς χώνευση σε φούρνο, όπου παραμένουν στους 160 °C για 30 λεπτά. Μόλις ολοκληρωθεί η χώνευση, τα φιαλίδια αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα φωτομετρούνται στα 600 nm με τη χρήση φωτομέτρου. Η μέθοδος βασίζεται στη φωτομέτρηση των ιόντων  $\text{Cr}^{3+}$  που προκύπτουν από την οξείδωση του οργανικού υλικού. Η συγκεντρώνση COD του δείγματος ( $\text{mg L}^{-1}$ ) λαμβάνεται από πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων COD.

Η αντίδραση οξείδωσης του οργανικού υλικού από τα διχρωμικά ιόντα είναι:



### 10.2.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΦΩΣΦΟΡΟΥ

Η μέτρηση του φωσφόρου πραγματοποιείται με τη μέθοδο που περιγράφεται στο βιβλίο «Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (edition 2012)».

Ο ολικός φώσφορος στα δείγματα βρίσκεται με τη μορφή:

- Ορθοφωσφορικών ιόντων ( $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ )
- Πολυφωσφορικών ιόντων ( $\text{PO}_3^{6-}$ ,  $(\text{P}_3\text{O}_{10})^{5-}$ ,  $(\text{P}_2\text{O}_7)^{4-}$ )
- Εμπεριέχεται σε οργανικές ενώσεις

Η μέθοδος στηρίζεται στη μετατροπή όλων των μορφών του φωσφόρου σε ορθοφωσφορικά ιόντα και στον προσδιορισμό αυτών. Για τη μετατροπή των πολυφωσφορικών ιόντων αρκεί η υδρόλυσή τους σε όξινες συνθήκες και σε θερμοκρασία 100 °C. Όμως η μετατροπή του οργανικού φωσφόρου σε ορθοφωσφορικά ιόντα απαιτεί χώνευση του οργανικού δείγματος. Προτιμάται η μέθοδος η οποία βασίζεται στις οξειδωτικές ιδιότητες των υπερθειικών, η οποία έχει και τη μικρότερη σχετική απόκλιση. Τα ορθοφωσφορικά ιόντα προσδιορίζονται με τη μέθοδο του ασκορβικού οξέος.

Η προετοιμασία των δειγμάτων απαιτεί την αραιώσή τους με 3D νερό αφού τα όρια ποσοτικοποίησης της μεθόδου είναι από 150 έως 1,200  $\mu\text{g}$  φωσφόρου  $\text{L}^{-1}$ . Σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνται 4 mL αραιωμένου δείγματος. Στη συνέχεια, προστίθεται 1 σταγόνα δείκτη φαινολοφθαλείνης. Στην περίπτωση που με την προσθήκη του δείκτη εμφανιστεί κόκκινο χρώμα στο δείγμα προστίθενται σταγόνες  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5N μέχρι το διάλυμα να αποχρωματιστεί (οξίνιση δείγματος). Έπειτα προστίθενται 0.04 g υπερθειικού καλίου ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) και 80  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  30%. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες κλείνονται με τα καπάκια τους και χωνεύονται στο αυτόκαυστο στους 121 °C για 90 λεπτά. Μετά τη χώνευση και αφού τα δείγματα έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται σε αυτά 1 σταγόνα δείκτη φαινολοφθαλείνης. Ακολουθεί η υπό ανάδευση προσθήκη  $\text{NaOH}$  1 N έως ότου τα δείγματα αποκτήσουν ροζ χρώμα, και μετά η εξουδετέρωση του χρώματος με 1 σταγόνα  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 N. Στη συνέχεια, διπλασιάζεται ο όγκος του δείγματος (στα 8 mL) με την προσθήκη 3D νερού. Τέλος προστίθενται 1.28 mL μείγματος αντιδραστηρίων (Πίνακας 10.1) και τα δείγματα αφήνονται για 10 λεπτά σε σκοτεινό μέρος. Μετά από 10 λεπτά και σε λιγότερο από 30 λεπτά, τα δείγματα φωτομετρούνται στα 880 nm. Η συγκέντρωση του ολικού φωσφόρου προσδιορίζεται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης της απορρόφησης στα 880 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης πρότυπων διαλυμάτων  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

**Πίνακας 10.1:** Σύσταση μίγματος αντιδραστηρίων για τελικό όγκο 100 mL.

| ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ                       | ΟΓΚΟΣ (mL) |
|---------------------------------|------------|
| $\text{H}_2\text{SO}_4$ 5N      | 50         |
| Διάλυμα αντιμονοτρυγικού καλίου | 5          |
| Διάλυμα μολυβδαινικού αμμωνίου  | 15         |
| Διάλυμα ασκορβικού οξέος        | 30         |

### 10.2.6 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΑΖΩΤΟΥ

Η μέτρηση του ολικού αζώτου (TN) είναι μία μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού του ολικού αζώτου (νιτρικό, νιτρώδη και αμμωνιακό άζωτο) ενός υγρού δείγματος με χρήση υγρής χρωματογραφίας. Αρχικά, 10 mL αραιωμένου δείγματος προστίθεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες μαζί με 5 mL αντιδραστηρίου χώνευσης (Πίνακας 10.2). Οι δοκιμαστικοί σωλήνες κλείνονται με τα καπάκια τους,

αναδεύονται με vortex και τοποθετούνται για χώνευση στο αυτόκαυστο στους 105 °C για 30 λεπτά. Μετά τη χώνευση και αφού τα δείγματα έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται σε αυτά 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος (Πίνακας 10.3). Αναδεύονται με vortex, φιλτράρονται (syringe filter, Nylon/ L, 0.22 µm) και τοποθετούνται στον αναλυτή ολικού αζώτου (TNM – 1, SHIMADZU).

*Πίνακας 10.2: Σύσταση αντιδραστηρίου χώνευσης.*

| ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ                                    | ΠΟΣΟΤΗΤΑ |
|----------------------------------------------|----------|
| H <sub>2</sub> O (3D)                        | 500 mL   |
| K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> | 10.05 g  |
| NaOH                                         | 1.50 g   |

*Πίνακας 10.3: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος (buffer solution)*

| ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ                      | ΠΟΣΟΤΗΤΑ |
|--------------------------------|----------|
| H <sub>2</sub> O (3D)          | 1 L      |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> | 61.8 g   |
| NaOH                           | 8 g      |

#### 10.2.7 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΟΡΓΑΝΙΚΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ (Total Organic Carbon, TOC)

Ο ολικός οργανικός άνθρακας (Total Organic Carbon, TOC) μετρήθηκε σε υγρά δείγματα μέσω αναλυτή TOC – VCSH (Shimadzu). Πιο αναλυτικά, ήταν δυνατή η μέτρηση του ολικού άνθρακα (Total Carbon, TC) και του ανόργανου άνθρακα (Inorganic Carbon, IC), ώστε από την διαφορά των δύο να προέκυπτε η τιμή του TOC. Το δείγμα εισάγεται απευθείας στο σωλήνα καύσης που περιέχει τον καταλύτη. Ο συνολικός άνθρακας του δείγματος οξειδώνεται στο σωλήνα καύσης και σχηματίζεται διοξείδιο του άνθρακα. Το φέρον αέριο (υπερκάθαρος αέρας) ρέει μέσα από το σωλήνα καύσης και παραλαμβάνει το διοξείδιο του άνθρακα και τα υπόλοιπα προϊόντα της καύσης τα οποία μεταφέρει σε αφυγραντή όπου απομακρύνεται η υγρασία ενώ ταυτόχρονα ψύχονται τα αέρια της καύσης. Ακολούθως το φέρον αέριο διέρχεται μέσα από μια παγίδα αλογόνων (όπου κατακρατούνται αλογόνα που ίσως περιέχει) για να καταλήξει στην κυψελίδα του ανιχνευτή NDIR (Non Sispersive Infra-Red Gas Analyzer), όπου ανιχνεύεται το διοξείδιο του άνθρακα.

#### 10.2.8 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ (Total Solids, TS)

Η μέτρηση των ολικών στερεών γίνεται με βάση τη μέθοδο του βιβλίου «Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (edition 2012)». Αρχικά, πορσελάνινες κάψες τοποθετούνται στον κλίβανο στους 550 °C για περίπου 45 λεπτά. Στη συνέχεια ζυγίζεται το καθαρό βάρος (απόβαρο) κάθε κάψας. Επίσης, ζυγίζεται γνωστή ποσότητα βιομάζας και τοποθετείται στην αντίστοιχη κάψα. Οι κάψες με τα δείγματα τοποθετούνται στον φούρνο στους 105 °C για 1 ημέρα. Με το πέρας της 1 ημέρας, οι κάψες τοποθετούνται σε ξηραντήρα και ζυγίζονται κάθε μία ξεχωριστά. Η αύξηση του βάρους της προζυγισμένης κάψας μετά την ξήρανση στους 105 °C, αντιστοιχεί στην τιμή των TS.

$$TS (g L^{-1}) = \frac{g \text{ κάψας μετά τους } 150^{\circ}C - g \text{ καθαρής κάψας}}{mL \text{ δείγματος}} \times 1000 (mL L^{-1}) \quad (11.5)$$

#### 10.2.9 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΑΙΩΡΟΥΜΕΝΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ (Total Suspended Solids, TSS)

Η μέτρηση των ολικών στερεών γίνεται με βάση τη μέθοδο του βιβλίου «Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (edition 2012)». Για τον υπολογισμό τους χρησιμοποιούνται ειδικά φίλτρα υάλου τύπου GF/F με μέση διάμετρο πόρων  $0.7 \mu m$ . Τα φίλτρα αρχικά ξεπλένονται με 3D νερό και τοποθετούνται στους  $150^{\circ}C$  για 45 λεπτά. Στη συνέχεια, τοποθετούνται στους  $550^{\circ}C$  για 15 λεπτά. Μετά τα 15 λεπτά, τοποθετούνται σε ξηραντήρα και ζυγίζονται το καθένα ξεχωριστά ώστε να ληφθεί το καθαρό τους βάρος.

Γνωστή ποσότητα δείγματος (8 mL) διηθείται υπό κενό και το φίλτρο που χρησιμοποιείται ξεπλένεται με 3D νερό. Έπειτα, το φίλτρο τοποθετείται στον φούρνο στους  $105^{\circ}C$  για περίπου 1 ημέρα (Εικόνα 10.7). Με το πέρασ της 1 ημέρας, τα φίλτρα τοποθετούνται στον ξηραντήρα και ζυγίζονται. Η αύξηση του βάρους του φίλτρου αντιστοιχεί στα ολικά αιωρούμενα στερεά.

$$TSS (g L^{-1}) = \frac{g \text{ φίλτρου μετά τους } 150^{\circ}C - g \text{ καθαρού φίλτρου}}{mL \text{ δείγματος}} \times 1000 (mL L^{-1}) \quad (11.6)$$



**Εικόνα 10.7:** Φίλτρα GF/F στους  $105^{\circ}C$  με βιομάζα από τις προκαλλιέργειες των *Chlorella minutissima* και *Chlorococcum oleofaciens*.

#### 10.2.10 ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΟΛΥ(3 – ΥΔΡΟΞΥΒΟΥΤΥΡΙΚΟΥ) ΕΣΤΕΡΑ (PHB)

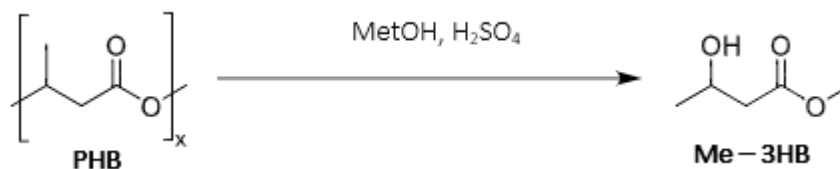
Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας της βιομάζας σε πολυ(3 – υδροξυβουτυρικό) εστέρα, ακολουθήθηκε αναλυτική μέθοδος εκχύλισης της βιομάζας με οργανικό διαλύτη, με χρήση αέριας χρωματογραφίας όπως περιγράφεται σε προηγούμενη μελέτη (Braunegg et al., 1978). Προϋπόθεση της μεθόδου είναι η εκχύλιση του PHB από τα κύτταρα, ο αποπολυμερισμός του και η μετεστεροποίησή του.

Αρχικά, η βιομάζα που έχει συλλεχθεί από τις καλλιέργειες ξηραίνεται με λυοφυλλοποίηση (freeze – drying). Έπειτα ζυγίζονται 20 - 50 mg ξηρής βιομάζας από κάθε είδος και τοποθετούνται σε φιαλίδια. Σε κάθε φιαλίδιο προστίθενται 2 mL χλωροφορμίου ( $CHCl_3$ ) και 2 mL οξινισμένης μεθανόλης (3% v/v  $H_2SO_4$  σε μεθανόλη), μαζί με  $2.5 g L^{-1}$  βενζοϊκό οξύ. Το χλωροφόρμιο προστίθεται προκειμένου να πραγματοποιηθεί λύση της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων και να διευκολυνθεί

η εκχύλιση των βιοπλαστικών από τα κύτταρα, ενώ η οξινισμένη μεθανόλη θα προκαλέσει τη μετεστεροποίηση των οξέων. Το βενζοϊκό οξύ προστίθεται στο διάλυμα της οξινισμένης μεθανόλης και αποτελεί το εσωτερικό πρότυπο του δείγματος. Τα φιαλίδια στη συνέχεια, σφραγίζονται αεροστεγώς και τοποθετούνται σε θερμαινόμενο υδατόλουτρο στους 95 °C για 4 ώρες. Κάθε 30 λεπτά τα φιαλίδια αφαιρούνται από το υδατόλουτρο και αναδεύονται με vortex. Σε αυτή τη χρονική διάρκεια επιτυγχάνεται η εκχύλιση και η μετεστεροποίηση των μονομερών του βιοπολυμερούς (Εικόνα 10.8). Μετά τις 4 ώρες και αφού τα φιαλίδια έρθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστίθεται 1 mL 3D νερού, προκειμένου να διακοπεί η διαδικασία της εστεροποίησης, και ακολουθεί ανάδευση με vortex. Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός δύο φάσεων. Η πάνω φάση αποτελείται από νερό και μεθανόλη, ενώ η κάτω φάση αποτελείται από το χλωροφόρμιο στο οποίο βρίσκεται διαλυμένος ο μεθυλεστέρας του 3 – υδροξυβουτυρικού οξέος (Me – 3HB). Η φάση του χλωροφορμίου αφαιρείται με τη χρήση γυάλινης πιπέτας Pasteur, διηθείται με φίλτρο (syringe filter, Nylon/ L, 0.22 μm) και σφραγίζεται σε ειδικό φιαλίδιο (GC vial) (Εικόνα 10.9). Το φιαλίδιο στη συνέχεια, τοποθετείται στον δίσκο του αυτόματου δειγματολήπτη του αέριου χρωματογράφου (GC – FID, Agilent Technologies 7890A).

Η στήλη διαχωρισμού του χρωματογράφου είναι τριχοειδής (DBFFAP, μήκους 30 m, εσωτερικής διαμέτρου 0.25 mm και με υμένιο πλήρωσης 0.25 μm) και ο ανιχνευτής είναι φλόγας ιονισμού (FID). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται το ήλιο (He) υψηλής καθαρότητας με ρυθμό ροής 12 mL min<sup>-1</sup>. Η φλόγα δημιουργείται από την καύση υδρογόνου με παροχή αέρα 40 mL min<sup>-1</sup>.

Η μικροσύριγγα εισάγει 10 μL του κάθε δείγματος στον θερμαινόμενο θάλαμο του χρωματογράφου ο οποίος βρίσκεται σε θερμοκρασία 250 °C. Η μέθοδος που επιλέγεται, αυξάνει τη θερμοκρασία του φούρνου στους 120 °C με ρυθμό 10 °C min<sup>-1</sup>, και έπειτα, με ρυθμό 45 °C min<sup>-1</sup>, η θερμοκρασία καταλήγει στους 250 °C. Συνολικά η μέθοδος για κάθε δείγμα διαρκεί περίπου 15 λεπτά.



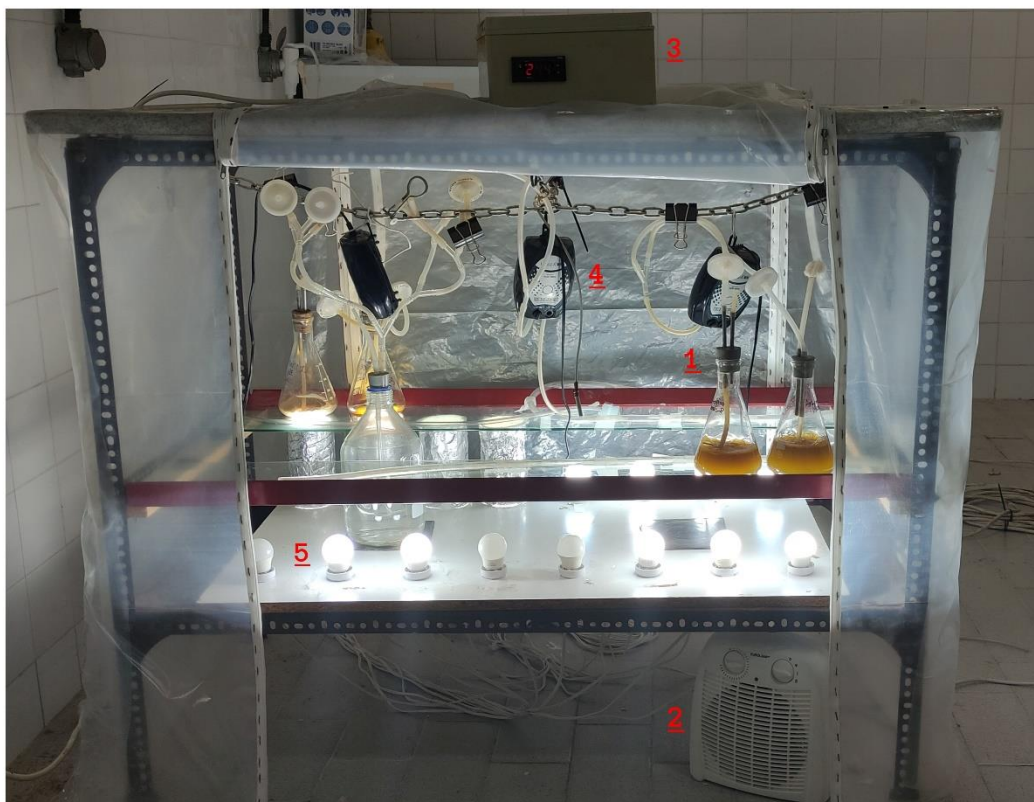
Εικόνα 10.8: Αποπολυμερισμός του πολυ(3 – υδροξυβουτυρικού) εστέρα (Parodi et al., 2021)



Εικόνα 10.9: Φιαλίδια GC vials με τη φάση του χλωροφορμίου για οχτώ είδη μικροφυκών

### 10.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ

Τα μικροφύκη καλλιεργήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 500 mL, οι οποίες σφραγίστηκαν με τάπα που περιλάμβανε προσαρμοσμένο σύστημα αερισμού. Οι καλλιέργειες διατηρούνταν σε ειδικό κλειστό χώρο υπό ελεγχόμενες συνθήκες φωτισμού, θερμοκρασίας και αερισμού. Πιο συγκεκριμένα, η παροχή λευκού φωτός γινόταν από λάμπες LED, οι οποίες ήταν τοποθετημένες στο κάτω μέρος των κωνικών φιαλών, με ισχύ φωτισμού  $400 \pm 10 \mu\text{mol φωτονίων m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , η θερμοκρασία διατηρούνταν σταθερή στους  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  με τη βοήθεια θερμοστάτη και αερόθερμου, ενώ υπήρχαν και αντλίες που εξασφάλιζαν τη συνεχή παροχή αέρα στα  $0.5 \pm 0.1 \text{ L}_{\text{αέρα}} \text{ min}^{-1}$  στις κωνικές φιάλες. Στην Εικόνα 10.10 φαίνεται η πειραματική διάταξη.



**Εικόνα 10.10:** Πειραματική διάταξη συστήματος: 1) Κωνικές φιάλες καλλιέργειας μικροφυκών, 2) Αερόθερμο, 3) Θερμοστάτης, 4) Αντλίες αέρα, 5) Λαμπτήρες LED

## 10.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΑΚΑΣΙΑ

### 10.4.1 ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑΣ ΑΠΟΡΡΟΗΣ

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη χρήση της απορροής της αναερόβιας χώνευσης ως μέσο καλλιέργειας των μικροφυκών, είναι η επεξεργασία της και συγκεκριμένα η απομάκρυνση των στερεών σωματιδίων που περιέχει. Η απορροή που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα καλλιέργειας στη μελέτη αυτή, προήλθε από την αναερόβια χώνευση αγροκτηνοτροφικών υπολειμμάτων. Αρχικά, το απόβλητο φυγοκεντρήθηκε στα 4,500 rpm (Hermle Z 366, Hermle Labortechnik GmbH). Το ίζημα που προέκυψε απορρίφθηκε, και το υπερκείμενο υγρό διηθήθηκε υπό κενό με διηθητικό χαρτί. Το διήθημα στη συνέχεια, πέρασε από δύο φάσεις διήθησης. Την πρώτη φορά, διηθήθηκε υπό κενό με φίλτρο Whatman από μικροΐνες υάλου (GF/F με διάμετρο πόρων 1.5  $\mu\text{m}$ ). Το υγρό που προέκυψε από την τελευταία διήθηση, διηθήθηκε υπό κενό με φίλτρα Whatman με διάμετρο πόρων 0.7  $\mu\text{m}$  (Εικόνα 10.11). Το τελικό διήθημα αποθηκεύτηκε στο ψυγείο στους 4 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.



**Εικόνα 10.11:** Διήθηση υπό κενό της απορροής αναερόβιας χώνευσης αγροκτηνοτροφικών αποβλήτων με φίλτρο υάλου GF/F με μέση διάμετρο πόρων 0.7  $\mu\text{m}$ .

#### 10.4.2 ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

Σκοπός των προκαλλιεργειών είναι η προετοιμασία του εμβολίου για την έναρξη των πειραμάτων. Για κάθε είδος πραγματοποιήθηκε διπλή επανάληψη του πειράματος, δηλαδή 2 κωνικές φιάλες των 500 mL. Οι προκαλλιεργείες προετοιμάστηκαν σε θάλαμο γραμμικής ροής, ο οποίος εξασφάλισε την διατήρηση αποστειρωμένου περιβάλλοντος. Οι προκαλλιεργείες όλων των μικροφυκών περιείχαν 3D νερό (λειτουργικός όγκος καλλιέργειας τα 400 mL) στο οποίο προστέθηκαν τα απαραίτητα συστατικά και ιχνοστοιχεία για την ανάπτυξή τους (Πίνακας 10.4). Στο είδος *Chlorella minutissima* προστέθηκε θαλασσινό νερό αντί για 3D νερό.

Πίνακας 10.4: Σύνθεση μέσου προκαλλιεργειών ανά είδος

| ΕΙΔΟΣ                                                                                                                                   | ΣΥΝΘΕΣΗ ΜΕΣΟΥ                       | ΠΟΣΟΤΗΤΑ/ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| <i>Chlorella vulgaris</i> ,<br><i>Chromochloris zofingiensis</i> ,<br><i>Chlorococcum oleofaciens</i> ,<br><i>Chlorella minutissima</i> | BG – 11                             | 10% του τελικού όγκου |
|                                                                                                                                         | Trace mix                           | 1% του τελικού όγκου  |
| <i>Euglena gracilis</i>                                                                                                                 | KNO <sub>3</sub>                    | 10 g L <sup>-1</sup>  |
|                                                                                                                                         | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>     | 1 g L <sup>-1</sup>   |
|                                                                                                                                         | MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O | 1 g L <sup>-1</sup>   |
|                                                                                                                                         | Yeast                               | 300 g L <sup>-1</sup> |

Μετά την προσθήκη του μέσου καλλιέργειας και των απαραίτητων ιχνοστοιχείων, ρυθμίστηκε το pH στο 7.1 με προσθήκη αραιού διαλύματος HCl 1M. Για τον εμβολιασμό των μικροφυκών χρησιμοποιήθηκαν 10 mL εμβολίου από στατικές αυτότροφες καλλιέργειες (Εικόνα 10.12). Στον Πίνακα 10.5 φαίνονται οι συνθήκες στις οποίες διατηρούνταν οι προκαλλιεργείες για περίπου 7 – 10 ημέρες (ανάλογα το είδος) ώστε η συγκέντρωση της βιομάζας να επαρκεί για την έναρξη των πειραμάτων. Όταν ολοκληρώθηκε η περίοδος των προκαλλιεργειών, η βιομάζα ανακτήθηκε και συμπυκνώθηκε με φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 4,500 rpm (Hermle Z 366, Hermle Labortechnik GmbH). Ενδεικτικά στην Εικόνα 10.13 παρουσιάζονται οι προκαλλιεργείες των ειδών *Chlorella minutissima* και *Euglena gracilis*.

Πίνακας 10.5: Συνθήκες διατήρησης των προκαλλιεργειών

| ΠΑΡΑΜΕΤΟΣ                                                 | ΤΙΜΗ      |
|-----------------------------------------------------------|-----------|
| Θερμοκρασία (°C)                                          | 25 ± 2    |
| Φωτισμός (μmol φωτονίων m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) | 100 ± 10  |
| Αερισμός (L <sub>αέρα</sub> min <sup>-1</sup> )           | 0.5 ± 0.1 |



Εικόνα 10.12: Στατικές αυτότροφες καλλιέργειες συντήρησης



Εικόνα 10.13: Προκαλλιέργειες των ειδών *Chlorella minutissima* (αριστερά) και *Euglena gracilis* (δεξιά)

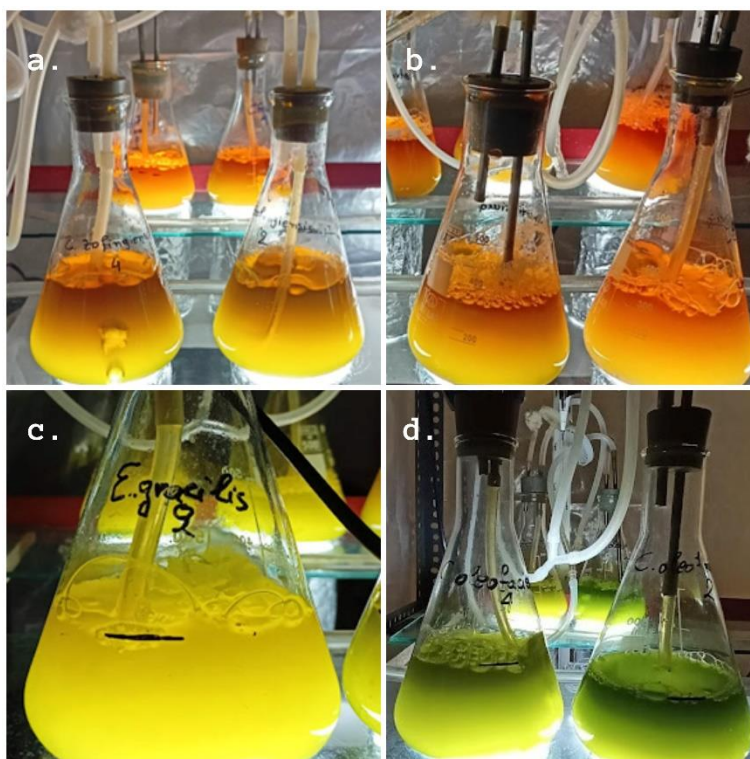
### 10.4.3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

Για την καλλιέργεια κάθε μικροφύκου πραγματοποιήθηκε διπλή επανάληψη του πειράματος σε κωνικές φιάλες των 500 mL (λειτουργικός όγκος καλλιέργειας τα 400 mL). Στις φιάλες προστέθηκαν 360 mL 3D νερό και ως υπόστρωμα ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε η επεξεργασμένη απορροή της αναερόβιας χώνευσης αγροκτηνοτροφικών αποβλήτων σε ποσοστό 10% του συνολικού όγκου της καλλιέργειας (40 mL). Στη συνέχεια, ρυθμίστηκε το pH στο 7.1 με χρήση διαλύματος οξέος, και οι κωνικές εμβολιάστηκαν με τη συμπυκνωμένη βιομάζα των προκαλλιιεργειών, ώστε η αρχική συγκέντρωσή της σε κάθε κωνική φιάλη να είναι  $0.2 \text{ g L}^{-1}$ . Στον Πίνακα 10.6 φαίνονται οι συνθήκες στις οποίες διατηρούνταν οι καλλιέργειες. Στην Εικόνα 10.14 φαίνονται διάφορα στάδια των καλλιιεργειών των μικροφυκών *Chromochloris zoofingensis*, *Chlorella minutissima*, *Euglena gracilis* και *Chlorococcum oleofaciens*.

Κατά τη διάρκεια κάθε πειράματος πραγματοποιούνταν δειγματοληψία από τις καλλιέργειες, παρακολουθούνταν η ανάπτυξη της βιομάζας και πραγματοποιούνταν αναλύσεις ([Ενότητα 10.2](#)) στα δείγματα. Το πείραμα διακόπηκε όταν η ανάπτυξη έφτασε στο τέλος της εκθετικής φάσης και άρχισε να ξεκινάει η στάσιμη φάση. Επομένως, το χρονικό διάστημα των καλλιιεργειών εξαρτάται από το είδος που καλλιιεργείται. Στο τέλος, η βιομάζα που παράχθηκε, ανακτήθηκε, συμπυκνώθηκε με φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 4,500 rpm και ξηράθηκε με τη χρήση λυοφιλοποιητή. Το υπερκείμενο υγρό που προέκυψε από τη διαδικασία αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη στους  $-18^\circ\text{C}$ .

**Πίνακας 10.6:** Συνθήκες διατήρησης των καλλιιεργειών

| ΠΑΡΑΜΕΤΟΣ                                                   | ΤΙΜΗ          |
|-------------------------------------------------------------|---------------|
| Θερμοκρασία ( $^\circ\text{C}$ )                            | $25 \pm 2$    |
| Φωτισμός ( $\mu\text{mol φωτονίων m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) | $400 \pm 10$  |
| Αερισμός ( $\text{L αέρα min}^{-1}$ )                       | $0.5 \pm 0.1$ |



Εικόνα 10.14: Καλλιέργειες των (a) *Chromochloris zoefingiensis*, (b) *Chlorella minutissima* (αριστερά) και *Euglena gracilis* (δεξιά), (c) *Euglena gracilis* και (d) *Chlorococcum oleofaciens*

## 11. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

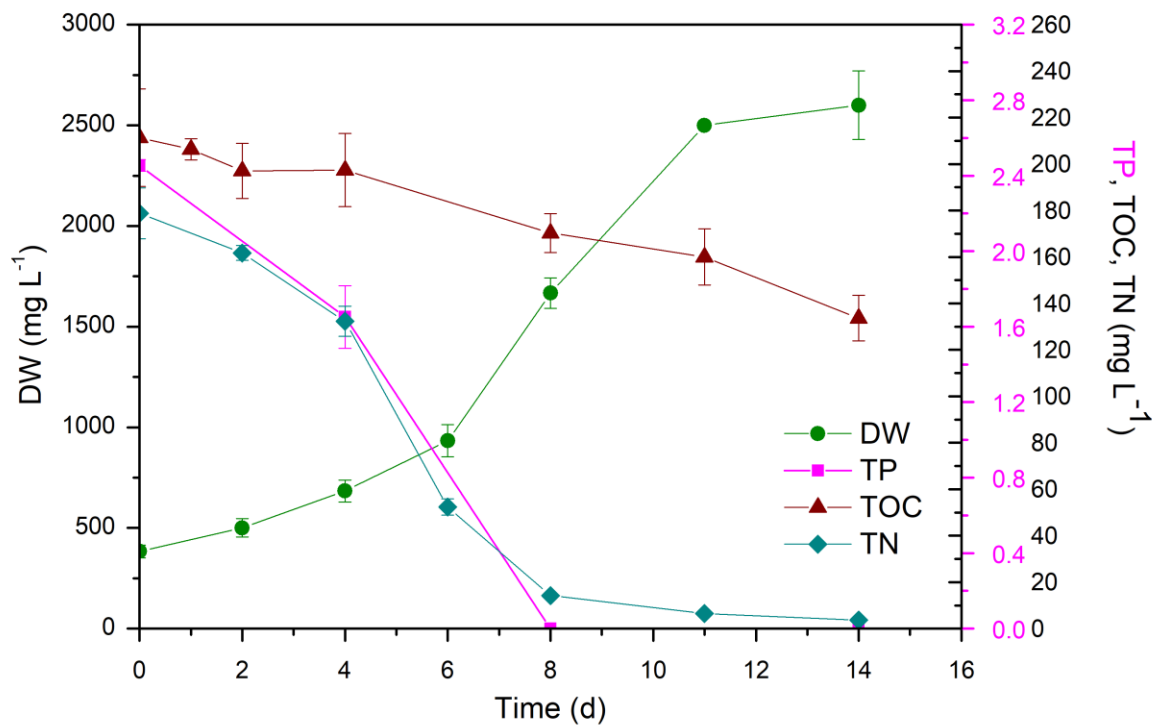
### 11.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

#### 11.1.1 *Chlorella minutissima*

Η καμπύλη ανάπτυξης του μικροφύκου *Chlorella minutissima* παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 11.1 μαζί με την πορεία απομάκρυνσης του ολικού οργανικού άνθρακα, αζώτου και φωσφόρου από το υπόστρωμα της καλλιέργειας. Από την αρχή της καλλιέργειας παρατηρήθηκε αύξηση της βιομάζας, ενώ την 6<sup>η</sup> ημέρα το είδος αυτό απέκτησε το μέγιστο ρυθμό ανάπτυξής του. Τις πρώτες τέσσερις ημέρες η ποσότητα του οργανικού άνθρακα παρέμεινε σταθερή, ενώ οι απομακρύνσεις του ολικού αζώτου και φωσφόρου στον ίδιο χρόνο ήταν 26% και 33% αντίστοιχα. Σε αυτό το διάστημα επομένως κυριάρχησε ο αυτότροφος μεταβολισμός. Μετά την 4<sup>η</sup> ημέρα άρχισε να αυξάνεται ο ρυθμός κατανάλωσης θρεπτικών συστατικών και μέχρι την 8<sup>η</sup> ημέρα είχε καταναλωθεί ολοκληρωτικά ο φώσφορος. Το μικροφύκος συνέχισε ωστόσο να αναπτύσσεται καταναλώνοντας οργανικό άνθρακα και άζωτο μέχρι την 11<sup>η</sup> ημέρα, μετά την οποία εισήλθε στη στάσιμη φάση. Η εξάντληση του αζώτου έδρασε περιοριστικά στην περεταίρω ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Συνολικά παρατηρήθηκε μία μείωση ολικού αζώτου κατά 98%, το μεγαλύτερο μέρος του οποίου καταναλώθηκε τις πρώτες 8 ημέρες, και μία μείωση ολικού οργανικού άνθρακα κατά 37%, η κατανάλωση του οποίου ξεκίνησε μετά την 4<sup>η</sup> ημέρα. Το είδος *C. minutissima* ήταν το είδος που έδωσε την υψηλότερη συγκέντρωση βιομάζας ίση με  $2.60 \pm 0.17 \text{ g L}^{-1}$ .

Οι βιβλιογραφικές συγκεντρώσεις της παραγόμενης βιομάζας του *C. minutissima* όταν καλλιεργήθηκε σε απόβλητα είναι αρκετά χαμηλότερες από την τιμή του δεδομένου πειράματος. Για παράδειγμα, σε μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα χωνεμένη ιλύς κτηνοτροφικών απορριμμάτων η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας που παρατηρήθηκε σε 12 ημέρες καλλιέργειας ήταν  $0.39 \text{ g L}^{-1}$  (M. Singh et al., 2011). Επίσης, όταν το είδος αυτό καλλιεργήθηκε σε υγρά απόβλητα που είχαν υποστεί πρωτοβάθμια επεξεργασία η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας έφτασε τα  $0.75 \text{ g L}^{-1}$  την 9<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας (Malla et al., 2015). Με βάση τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν στο *C. minutissima* στο δεδομένο πείραμα ήταν αρκετά ευνοϊκές για παραγωγή βιομάζας υψηλής συγκέντρωσης και κατ' επέκταση για την απόκτηση χρήσιμων προϊόντων.

Συγκριτικά με αντίστοιχα βιβλιογραφικά πειράματα, προκύπτει ότι το *C. minutissima* προσέφερε και πολύ καλή βιοεξυγίανση του αποβλήτου σε αρκετά σύντομο χρονικό διάστημα. Συγκεκριμένα, στην έρευνα των Malla et al., (2015) η καλλιέργεια αυτού του είδους σε υγρά απόβλητα που είχαν υποστεί πρωτοβάθμια επεξεργασία οδήγησε σε μείωση του COD και του ολικού φωσφόρου κατά 40% και 50% αντίστοιχα, ενώ σε απόβλητα τριτοβάθμιας επεξεργασίας οι αντίστοιχες απομακρύνσεις ήταν 30% και 85%. Αρκετά υψηλό ποσοστό απομάκρυνσης COD (80.5%) παρατήρησαν και οι Kumar Sharma et al., (2020) οι οποίοι καλλιεργήσαν το *C. minutissima* σε αστικά υγρά λύματα. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι στις παραπάνω μελέτες δεν έγινε προσθήκη θαλασσινού νερού στις καλλιέργειες. Αναφορικά με το ολικό άζωτο, οι M. Singh et al., (2011) παρατήρησαν μία μείωση της τάξης του 16% τις πρώτες 4 ημέρες καλλιέργειας του *C. minutissima*, ενώ στο δεδομένο πείραμα η απομάκρυνσή του, στο ίδιο χρονικό διάστημα, ήταν 26%. Οι απομακρύνσεις των θρεπτικών συστατικών στο πείραμα που εξετάστηκε είναι υψηλότερες από αντίστοιχες βιβλιογραφικές υποδηλώνοντας την καλή προσαρμογή του είδους στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.



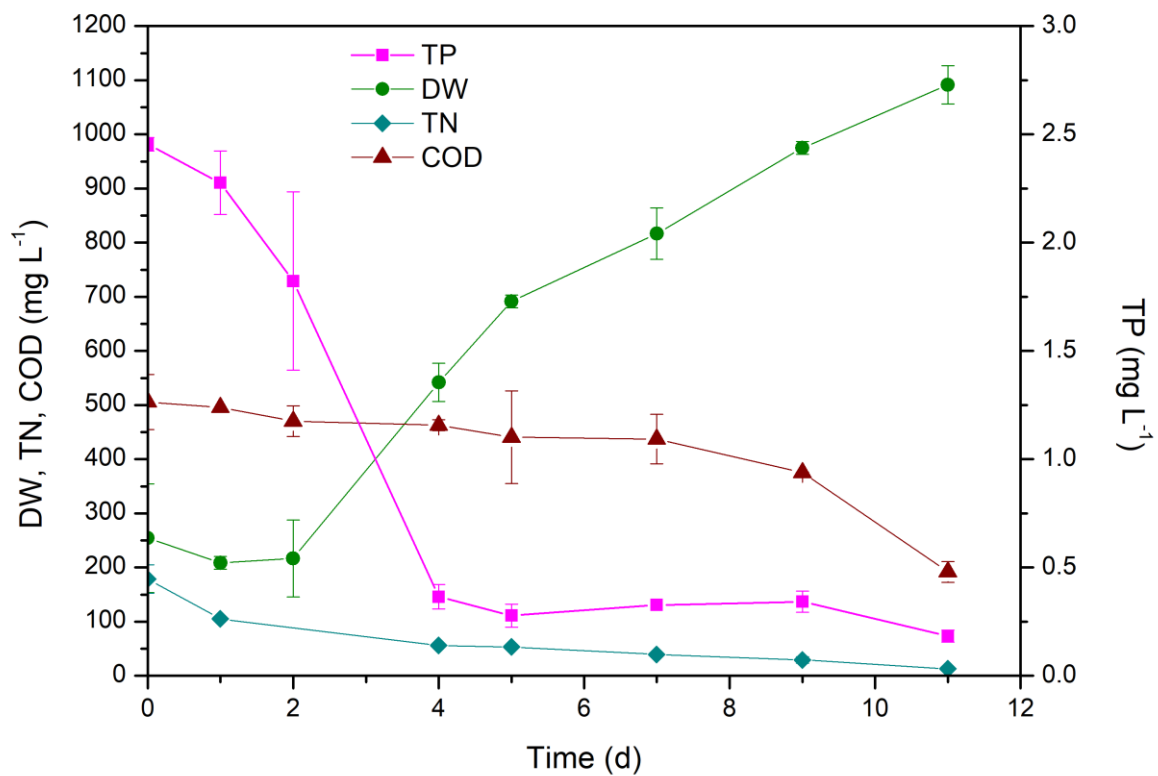
**Διάγραμμα 11.1:** Καμπύλες ανάπτυξης και απομάκρυνσης ολικού οργανικού άνθρακα, ολικού αζώτου και ολικού φωσφόρου για το είδος *Chlorella minutissima*

### 11.1.2 *Chlorella vulgaris*

Το μικροφύκος *Chlorella vulgaris* παρουσίασε ικανοποιητική ανάπτυξη (Διάγραμμα 11.2). Το συγκεκριμένο είδος προσαρμόστηκε αρκετά γρήγορα στις συνθήκες που είχαν εφαρμοστεί αφού η φάση καθυστέρησής του διήρκεσε μόνο δύο ημέρες. Μετά τη δεύτερη μέρα το μικροφύκος εισήλθε στην εκθετική φάση ανάπτυξης όπου και παρέμεινε μέχρι να διακοπεί η καλλιέργεια τη 11<sup>η</sup> ημέρα. Στο διάστημα αυτό το *C. vulgaris* κατανάλωσε το μεγαλύτερο μέρος των θρεπτικών συστατικών του υποστρώματος. Πιο συγκεκριμένα, από τη 2<sup>η</sup> έως την 4<sup>η</sup> ημέρα, καταναλώθηκε το 85% του φωσφόρου, ενώ στη συνέχεια η συγκέντρωσή του παρέμεινε σταθερή. Συνολικά καταναλώθηκε το 92% της αρχικής του ποσότητας. Η απομάκρυνση του ολικού αζώτου ξεκίνησε από την πρώτη μέρα των καλλιεργειών. Μάλιστα, όσο το *C. vulgaris* βρισκόταν σε φάση προσαρμογής, η μείωση του αζώτου στα περίπου 100 mg L<sup>-1</sup> μπορεί να αποδοθεί σε φαινόμενα απογύμνωσης που ευνοούνται σε αλκαλικό pH (Tam & Wong, 1989). Η συνολική απομάκρυνση του αζώτου έφτασε το 93%. Όσον αφορά το COD, τις πρώτες μέρες της καλλιέργειας δεν παρατηρείται σημαντική κατανάλωση υποδηλώνοντας ότι το *C. vulgaris* αναπτύχθηκε κυρίως αυτότροφα. Ωστόσο, την 7<sup>η</sup> ημέρα διακρίνεται αύξηση του ρυθμού κατανάλωσής του. Η συνολική απομάκρυνση του COD ήταν 62%. Το συγκεκριμένο είδος παρήγαγε βιομάζα συγκέντρωσης  $1.09 \pm 0.04$  g L<sup>-1</sup>.

Η τελική τιμή της συγκέντρωσης της βιομάζας δεν εμφανίζει μεγάλη διαφορά από αντίστοιχες τιμές που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία. Ενδεικτικά, οι Koutra et al., (2021) καλλιεργήσαν το *C. vulgaris* σε χωνεμένη ιλύς αγροκτηνοτροφικών αποβλήτων, με αραίωση αποβλήτου 10 % v/v, και η συγκέντρωση της βιομάζας έφτασε τα 0.86 g L<sup>-1</sup> σε 28 ημέρες καλλιέργειας. Όταν μάλιστα η καλλιέργεια ενισχύθηκε με ορό γάλακτος, η παραγωγή βιομάζας έφτασε τα 1.63 g L<sup>-1</sup> τη 19<sup>η</sup> ημέρα. Η προσθήκη ορού γάλακτος αύξησε την παραγωγή της βιομάζας μέσω της ενίσχυσης του αποβλήτου με οργανικό άνθρακα, θρεπτικά συστατικά και ιχνοστοιχεία. Επίσης, αποτέλεσε μία οικονομική λύση για την αντικατάσταση μέρους της ποσότητας νερού που απαιτούνταν για την αραίωση της καλλιέργειας. Συνεπώς, η προσθήκη κάποιας πηγής θρεπτικών συστατικών θα μπορούσε να αυξήσει τη συγκέντρωση της παραγόμενης βιομάζας.

Βιβλιογραφικά οι απομακρύνσεις του COD, του ολικού αζώτου και του ολικού φωσφόρου από το *C. vulgaris* δείχνουν ότι εξαρτώνται από το είδος του αποβλήτου που χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα, αλλά και από τις συνθήκες τις καλλιέργειας. Για παράδειγμα, στην έρευνα των Zhu et al., (2022) όταν το *C. vulgaris* καλλιεργήθηκε στην απορροή της αναερόβιας χώνευσης γαλακτοκομικών αποβλήτων επιτεύχθηκε 47.7% μείωση του COD και 30% μείωση του ολικού αζώτου. Όταν όμως η χωνεμένη ιλύς υποβλήθηκε σε απογύμνωση αμμωνίας και επεξεργασία με όζον προτού χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα καλλιέργειας, η απομάκρυνση του ολικού αζώτου αυξήθηκε στο 93%, ενώ του COD παρέμεινε σχεδόν σταθερή στο 46%. Επίσης, οι Koutra et al., (2021) παρατήρησαν τις μέγιστες απομακρύνσεις COD (92.44%), ολικού αζώτου (69.73%) και ολικού φωσφόρου (93.49%) σε διαφορετικές αραιώσεις του αποβλήτου. Γενικά το συγκεκριμένο μικροφύκος είναι ικανό για ικανοποιητική βιοεξυγίανση, η οποία μεγιστοποιείται ανάλογα με τις συνθήκες που εφαρμόζονται στο σύστημα της καλλιέργειας.

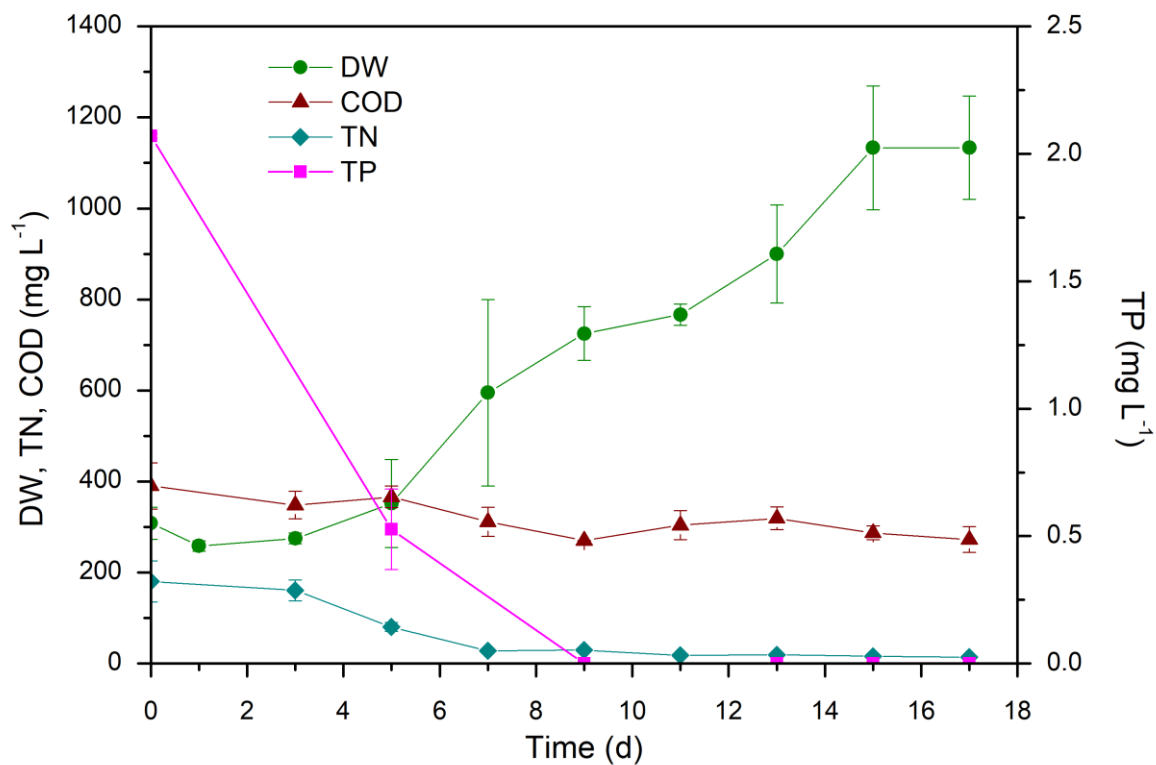


Διάγραμμα 11.2: Καμπύλες ανάπτυξης και απομάκρυνσης COD, ολικού αζώτου και ολικού φωσφόρου για το είδος *Chlorella vulgaris*

### 11.1.3 *Chlorococcum oleofaciens*

Το μικροφύκος *Chlorococcum oleofaciens* παρήγαγε βιομάζα συγκέντρωσης  $1.13 \pm 0.13 \text{ g L}^{-1}$  στις 17 ημέρες καλλιέργειάς του (Διάγραμμα 11.3). Η φάση καθυστέρησης διήρκησε περίπου 3 ημέρες μετά από τις οποίες ξεκίνησε η φάση ανάπτυξης η οποία συνοδεύτηκε και από την αρχή της κατανάλωσης του ολικού αζώτου. Η εκθετική φάση διήρκησε 12 ημέρες, διάστημα στο οποίο η συγκέντρωση του ολικού φωσφόρου μηδενίστηκε (9<sup>η</sup> ημέρα), ενώ του COD έφτασε τα  $287 \text{ mg L}^{-1}$  (15<sup>η</sup> ημέρα). Η ολική απομάκρυνση του COD ήταν 30% ενώ υψηλές απομακρύνσεις παρατηρήθηκαν τόσο για το ολικό άζωτο όσο και για το φώσφορο σε ποσοστό 92% και 100%, αντίστοιχα.

Γενικά, δεν υπάρχουν πολλές έρευνες σχετικά με την καλλιέργεια του *C. oleofaciens* στην απορρόφη της αναερόβιας χώνευσης ή σε υγρά απόβλητα. Σε μία έρευνα που το συγκεκριμένο μικροφύκος καλλιεργήθηκε για 24 ημέρες σε υγρά αστικά απόβλητα που είχαν υποστεί δευτεροβάθμια επεξεργασία, η συγκέντρωση της βιομάζας έφτασε την τιμή των  $0.92 \text{ g L}^{-1}$  (αραίωση 25% v/v), ενώ σχεδόν διπλάσια συγκέντρωση βιομάζας ( $1.97 \text{ g L}^{-1}$ ) παρατηρήθηκε σε 50% αραίωση αποβλήτου (Morsi et al., 2023). Στην αραίωση αυτή μάλιστα επιτεύχθηκαν και οι υψηλότερες απομακρύνσεις ολικού φωσφόρου (90%) και COD (92%). Πολύ χαμηλότερες ήταν οι καταναλώσεις σε 25% αραίωση του αποβλήτου (63% TP και 58% COD). Επομένως, το *C. oleofaciens* μπορεί να ανταπεξέλθει και σε υψηλότερες φορτίσεις προσφέροντας καλή βιοεξυγίανση του αποβλήτου στο οποίο καλλιεργείται. Επιπλέον, η καλλιέργεια του συγκεκριμένου μικροφύκου σε απόβλητα βιομηχανίας παραγωγής φοινικέλαιου που είχαν υποστεί αερόβια και αναερόβια επεξεργασία, οδήγησε σε 90% απομάκρυνση του ολικού φωσφόρου και 94% απομάκρυνση του ολικού αζώτου μέσα σε 6-8 ημέρες από την αρχή της καλλιέργειας (Tan et al., 2021). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στη συγκεκριμένη έρευνα τα κύτταρα του *C. oleofaciens* βρίσκονταν με τη μορφή πέλλετ μέσα στην καλλιέργεια, και οι Tan et al., (2021) αναφέρουν ότι οι αποδόσεις στην κατανάλωση θρεπτικών συστατικών είναι υψηλότερες όταν τα κύτταρα είναι ακινητοποιημένα.

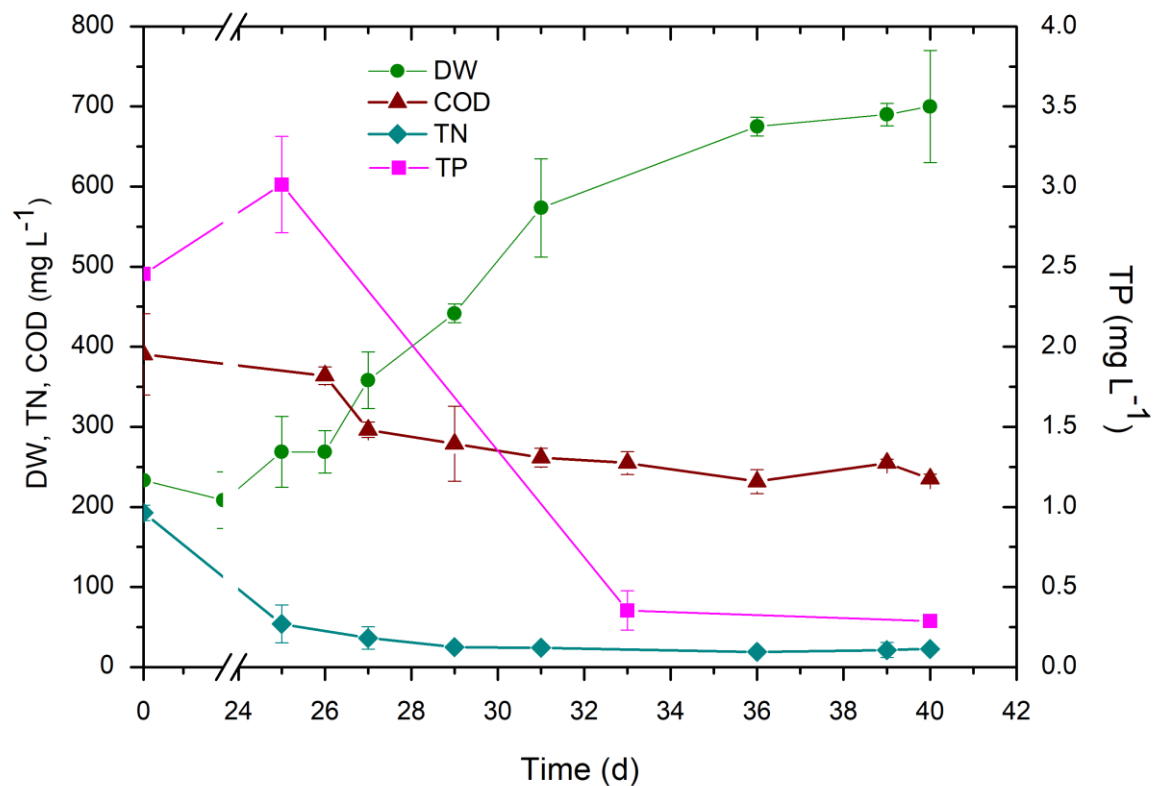


Διάγραμμα 11.3: Καμπύλες ανάπτυξης και απομάκρυνσης COD, ολικού αζώτου και ολικού φωσφόρου για το είδος *Chlorococcum oleofaciens*

#### 11.1.4 *Euglena gracilis*

Η προσαρμογή του *Euglena gracilis* στο μέσο καλλιέργειας διήρκησε 24 ημέρες όπως φαίνεται και από την καμπύλη του ξηρού του βάρους (Διάγραμμα 11.4). Σε αυτό το διάστημα δεν υπήρχε ανάπτυξη και η απομάκρυνση του ολικού αζώτου που παρατηρείται οφείλεται στην απογύμνωση της αμμωνίας του υποστρώματος (Tam & Wong, 1989). Η 25<sup>η</sup> και 26<sup>η</sup> ημέρα αντιστοιχούν στη σταδιακή έναρξη της εκθετικής ανάπτυξης του μικροφύκου στην οποία ξεκινάει και η μεταβολή στον ρυθμό απομάκρυνσης του αζώτου και του COD. Γενικά η απομάκρυνση του ολικού φωσφόρου παρουσιάστηκε πιο ραγδαία συγκριτικά με αυτές του COD και του ολικού αζώτου. Η καλλιέργεια του *E. gracilis* διακόπηκε την 40<sup>η</sup> ημέρα ενώ τα κύτταρα είχαν εισέλθει στη στάσιμη φάση τους. Στη διάρκεια της ανάπτυξης οι συγκεντρώσεις του COD, του ολικού αζώτου και του ολικού φωσφόρου ελαττώθηκαν στις τιμές 235 mg L<sup>-1</sup>, 23 mg L<sup>-1</sup> και 0.29 mg L<sup>-1</sup> αντίστοιχα, δηλαδή επιτεύχθηκαν απομακρύνσεις της τάξης του 40%, 88% και 88% αντίστοιχα. Το *E. gracilis* παρήγαγε τη βιομάζα με τη μικρότερη συγκέντρωση ( $0.7 \pm 0.07$  g L<sup>-1</sup>) στο μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Το μικροφύκος *Euglena gracilis* απαίτησε εξαιρετικά πολλές ημέρες προσαρμογής στο μέσο και στις συνθήκες καλλιέργειας προτού αρχίσει να αναπτύσσεται και να καταναλώνει τα θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος. Μετά από βιβλιογραφική ανασκόπηση προέκυψε ότι το συγκεκριμένο είδος είναι ικανό για παραγωγή παρόμοιας συγκέντρωσης βιομάζας και καλή βιοεξυγίανση αποβλήτων σε μικρότερο χρονικό διάστημα. Για παράδειγμα, οι Rubiyatno et al., (2021) καλλιέργησαν μισότροφα το *E. gracilis* σε υγρά αστικά απόβλητα ενισχυμένα με αιθανόλη για 7 ημέρες και η βιομάζα που προέκυψε είχε συγκέντρωση 0.375 g L<sup>-1</sup>. Επίσης, κατά τη διάρκεια της καλλιέργειάς του για 9 ημέρες σε υγρά αστικά απόβλητα η συγκέντρωση της βιομάζας έφτασε τα 1.24 g L<sup>-1</sup>, ενώ μέχρι την 8<sup>η</sup> ημέρα είχε επιτευχθεί 93% απομάκρυνση ολικού αζώτου και 85% απομάκρυνση ολικού φωσφόρου (Mahapatra et al., 2013). Τέλος, στην έρευνα των Yadavalli et al., (2014) η καλλιέργεια έγινε σε απόβλητα βιομηχανίας παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων σε διάστημα 9 ημερών και παρατηρήθηκε 97% απομάκρυνση του ολικού φωσφόρου και 80% απομάκρυνση του COD τόσο στο κλειστό, όσο και στο ανοιχτό σύστημα. Οι απομακρύνσεις των ανόργανων συστατικών του δεδομένου πειράματος είναι παρόμοιες με αυτές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Αντιθέτως, η απομάκρυνση του COD που επιτεύχθηκε είναι σχετικά μικρή συγκριτικά με αντίστοιχα βιβλιογραφικά πειράματα.



Διάγραμμα 11.4: Καμπύλες ανάπτυξης και απομάκρυνσης COD, ολικού αζώτου και ολικού φωσφόρου για το είδος *Euglena gracilis*

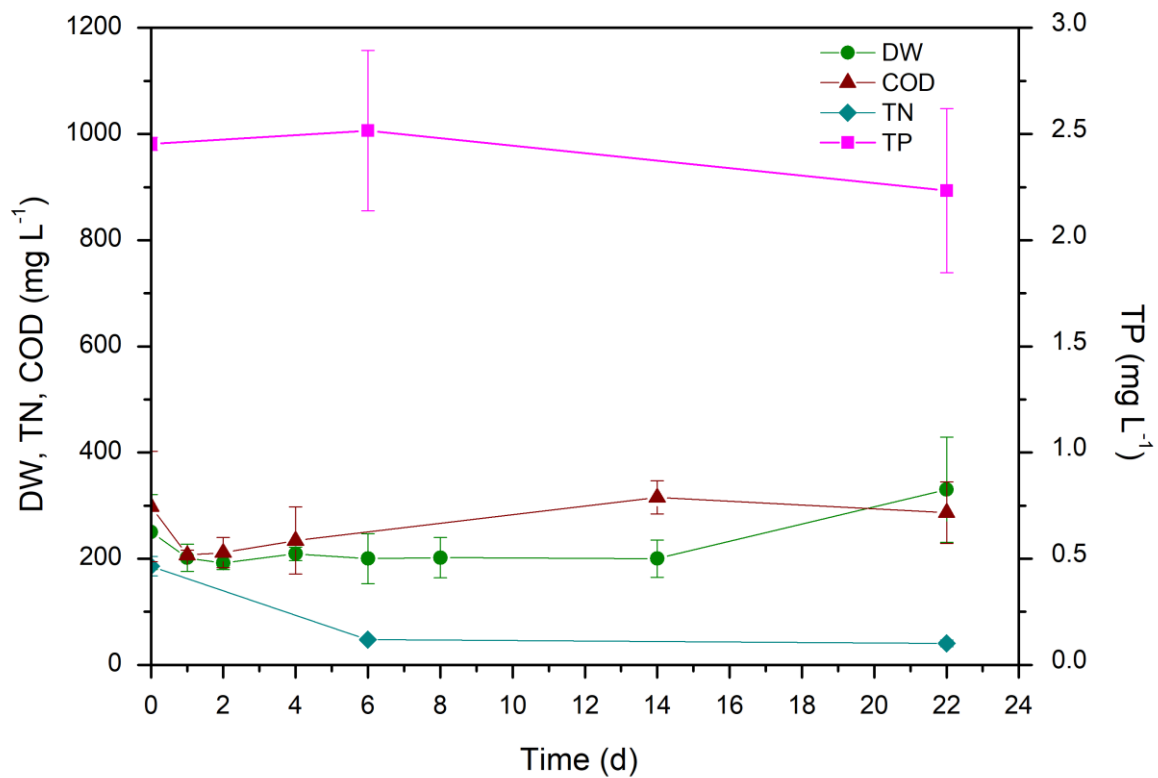
### 11.1.5 *Chromochloris zofingiensis*

Η καμπύλη του ξηρού βάρους του *C. zofingiensis* (Διάγραμμα 11.5) δείχνει πως η τελική συγκέντρωση της βιομάζας έφτασε μόλις τα  $0.33 \pm 0.09 \text{ g L}^{-1}$  (22<sup>η</sup> ημέρα). Ήδη από τις πρώτες ημέρες η καλλιέργεια του συγκεκριμένου είδους εμφανίζει προβλήματα αφού δεν παρατηρείται ούτε φάση καθυστέρησης, ούτε φάση ανάπτυξης. Η συγκέντρωση της βιομάζας παρέμεινε δηλαδή σχεδόν σταθερή κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, με μία πολύ μικρή αύξηση να διακρίνεται τις τελευταίες ημέρες. Το *C. zofingiensis* δηλαδή απέτυχε να εγκλιματιστεί στις συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας.

Σε άλλες έρευνες στις οποίες καλλιεργήθηκε το *C. zofingiensis* σε υγρά απόβλητα, τα αποτελέσματα ήταν ελάχιστα πιο ενθαρρυντικά. Ενδεικτικά, όταν καλλιεργήθηκε σε υγρά απόβλητα βιομηχανίας παραγωγής φοινικέλαιου για 28 ημέρες, η συγκέντρωση της βιομάζας έφτασε τα  $0.48 \text{ g L}^{-1}$  (Fernando et al., 2021), ενώ όταν καλλιεργήθηκε για 14 ημέρες στην απορροή της αναερόβιας χώνευσης κτηνοτροφικών αποβλήτων, η συγκέντρωσή της παραγόμενης βιομάζας έφτασε τα  $0.47 \text{ g L}^{-1}$  (Chen et al., 2021). Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας στις δύο έρευνες παρατηρήθηκε στα πειράματα με τη μεγαλύτερη αραίωση του αποβλήτου. Επομένως το *C. zofingiensis* είναι ικανό για ανάπτυξη σε κάποιο απόβλητο με πιθανό ενδεχόμενο όμως να αποτελεί η παραγωγή βιομάζας χαμηλής συγκέντρωσης. Απαραίτητη προϋπόθεση ακόμα αποτελούν οι υψηλές αραιώσεις του, ώστε τα θρεπτικά συστατικά, όπως  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ , που έχουν βρεθεί ότι επηρεάζουν αρνητικά την ανάπτυξή του (Y. Zhang et al., 2021), να βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Chen et al., 2021). Επίσης και στις δύο παραπάνω μελέτες εφαρμόστηκε φωτοπερίοδος δώδεκα ωρών στις καλλιέργειες προκειμένου να ενισχυθεί η παραγωγή βιομάζας. Μία αξιολογη πρόταση επομένως που φαίνεται αποτελεσματική, είναι η εφαρμογή κύκλου φωτός στην καλλιέργεια του *C. zofingiensis*.

Το περιβάλλον καλλιέργειας δεν ευνόησε την προσαρμογή και ανάπτυξη του *C. zofingiensis* και άρα την απορρόφηση των συστατικών του υποστρώματος προς παραγωγή βιομάζας και χρήσιμων προϊόντων (όπως χρωστικές και βιοπλαστικό). Οι απομακρύνσεις του COD, του αζώτου και του φωσφόρου παρουσιάζονται πολύ μικρές συγκριτικά και με τα υπόλοιπα είδη ( $3.88 \pm 0.57\%$ ,  $78.22 \pm 3.93\%$ ,  $9.00 \pm 1.10\%$  αντίστοιχα) και οι πορείες κατανάλωσής τους φαίνονται στο Διάγραμμα 11.5.

Στην έρευνα των Fernando et al., (2021) παρατηρήθηκαν 28.0% απομάκρυνση COD, 64.9% απομάκρυνση ολικού αζώτου και 86.7% απομάκρυνση ολικού φωσφόρου (σε 2.5% v/v αραίωση αποβλήτου). Παρόλο που οι μέγιστες απομακρύνσεις ολικού αζώτου και φωσφόρου, αλλά και η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας επιτεύχθηκαν σε 2.5% αραίωση, η υψηλότερη απομάκρυνση COD (44.8%) παρατηρήθηκε σε 5.0% αραίωση αποβλήτου, όπου το οργανικό φορτίο ήταν προφανώς υψηλότερο. Άρα η παραγωγή βιομάζας και η απομάκρυνση του COD μεγιστοποιούνται σε διαφορετικές συνθήκες. Επίσης, οι απομακρύνσεις του ολικού αζώτου και φωσφόρου στη μελέτη των Chen et al., (2021) ήταν περίπου 75% και 62% αντίστοιχα στην μικρότερη αραίωση του αποβλήτου (20% v/v). Τέλος, εξαιρετικά υψηλές απομακρύνσεις COD, ολικού αζώτου και ολικού φωσφόρου (95%, 81% και 79% αντίστοιχα) παρατηρήθηκαν όταν οι Nishshanka et al., (2022) καλλιεργήσαν το είδος αυτό σε συνθετικό μέσο με χαρακτηριστικά παρόμοια με τα απόβλητα γαλακτοκομικών προϊόντων.



Διάγραμμα 11.5: Καμπύλες ανάπτυξης και απομάκρυνσης COD, ολικού αζώτου και ολικού φωσφόρου για το είδος *Chro-mochloris zofingiensis*

## 11.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

Στο Διάγραμμα 11.6 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των παραγόμενων χλωροφυλλών και καροτενοειδών για κάθε μικροφύκος την ημέρα διακοπής της καλλιέργειάς τους. Οι χρωστικές αποτελούν χρήσιμα προϊόντα τα οποία αξιοποιούνται εμπορικά και η μελέτη της παραγωγής τους δίνει μία ένδειξη για την φωτοσυνθετική πορεία των κυττάρων. Γενικά, οι μελέτες οι οποίες εξετάζουν την καλλιέργεια των μικροφυκών σε απόβλητα με σκοπό τη παραγωγή χρωστικών είναι ελάχιστες.

Το μικροφύκος *C. minutissima* παρήγαγε τις χρωστικές με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις (χλωροφύλλες:  $44.2 \pm 2.4 \text{ mg L}^{-1}$  και καροτενοειδή:  $9.8 \pm 1.1 \text{ mg L}^{-1}$ ). Όταν το συγκεκριμένο είδος καλλιεργήθηκε σε υγρά αστικά απόβλητα που είχαν υποστεί πρωτοβάθμια επεξεργασία, η μέγιστη συγκέντρωση χλωροφυλλών που παρατηρήθηκε ήταν  $80 \text{ mg L}^{-1}$  (Malla et al., 2015). Επίσης, σε έρευνα έχει αποδειχθεί ότι η αρχική ποσότητα αζώτου στην καλλιέργεια επηρεάζει την παραγωγή χρωστικών. Συγκεκριμένα όταν το *C. minutissima* καλλιεργήθηκε στο τροποποιημένο μέσο f/2, οι μέγιστες συγκεντρώσεις χλωροφυλλών ( $160 \text{ mg L}^{-1}$ ) και καροτενοειδών ( $70 \text{ mg L}^{-1}$ ) παρατηρήθηκαν στην καλλιέργεια με τη μεγαλύτερη αρχική συγκέντρωση αζώτου (Bauer et al., 2020).

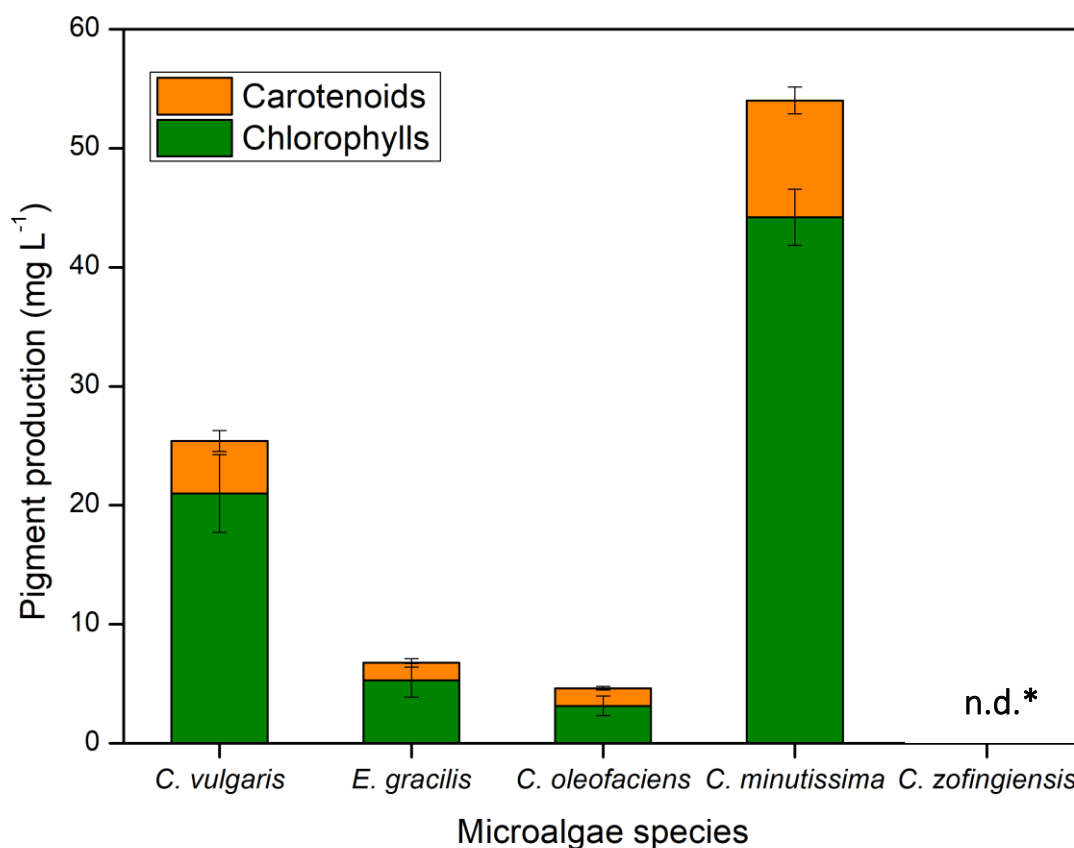
Η καλλιέργεια του *C. vulgaris* παρήγαγε χλωροφύλλες και καροτενοειδή συγκέντρωσης  $20.98 \pm 3.26 \text{ mg L}^{-1}$  και  $4.43 \pm 0.57 \text{ mg L}^{-1}$ , αντίστοιχα. Το *C. vulgaris* είναι το μικροφύκος με τη δεύτερη υψηλότερη συγκέντρωση χρωστικών μετά το *C. minutissima*. Στην έρευνα των Koutra et al., (2021), η μεγαλύτερη συγκέντρωση χλωροφυλλών και καροτενοειδών ( $58.5 \text{ mg L}^{-1}$  και  $13 \text{ mg L}^{-1}$  αντίστοιχα) παρατηρήθηκε σε 50% αραιώση του αποβλήτου ενώ ήταν ενισχυμένο με ορό γάλακτος κατά 15%.

Η συγκέντρωση των χρωστικών που παρήγαγε το *E. gracilis* είναι πολύ χαμηλότερη συγκριτικά με τα είδη *C. minutissima* και *C. vulgaris*. Συγκεκριμένα η συγκέντρωση των χλωροφυλλών έφτασε τα  $5.30 \pm 1.41 \text{ mg L}^{-1}$ , ενώ των καροτενοειδών έφτασε τα  $1.46 \pm 0.35 \text{ mg L}^{-1}$ . Οι Rubiyatno et al., (2021) αναφέρουν ότι η παραγωγή χλωροφυλλών εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα του αζώτου. Έτσι, όταν καλλιεργήσαν το *E. gracilis* σε αστικά υγρά απόβλητα η συγκέντρωση των χλωροφυλλών βρέθηκε περίπου ίση με  $3 \text{ mg L}^{-1}$ , και όταν το καλλιεργήσαν σε συνθετικό μέσο ενισχυμένο με άζωτο, βρέθηκε ίση με  $5.5 \text{ mg L}^{-1}$ . Εφόσον το συνθετικό μέσο περιείχε μεγαλύτερη ποσότητα αζώτου από τα αστικά απόβλητα, ήταν αναμενόμενο η παραγωγή χλωροφυλλών να είναι μεγαλύτερη στο συνθετικό μέσο. Επομένως αν είναι επιθυμητές οι υψηλές συγκεντρώσεις χλωροφυλλών, είναι ωφέλιμο να προτιμώνται απόβλητα με υψηλές συγκεντρώσεις σε άζωτο. Αναφορικά με τα καροτενοειδή, οι Yamane et al., (2001) καλλιεργήσαν μιξότροφα το *E. gracilis* στο τροποποιημένο μέσο Bold Basal. Στο μέσο αυτό και στις συνθήκες που εφαρμόστηκαν η συγκέντρωση των καροτενοειδών έφτασε τα  $14 \text{ mg L}^{-1}$ . Πολύ μικρότερες ήταν οι συγκεντρώσεις των καροτενοειδών όταν το μικροφύκος καλλιεργήθηκε ετερότροφα και αυτότροφα.

Το μικροφύκος *C. oleofaciens* παρήγαγε χλωροφύλλες και καροτενοειδή συγκέντρωσης  $3.15 \pm 0.83 \text{ mg L}^{-1}$  και  $1.47 \pm 0.15 \text{ mg L}^{-1}$  αντίστοιχα. Σε έρευνα των Morsi et al., (2023) όπου η καλλιέργεια έγινε σε αστικά απόβλητα, που είχαν υποστεί δευτεροβάθμια επεξεργασία, αναφέρεται ότι η μέγιστη συγκέντρωση χλωροφύλλης-α που παράχθηκε στο κατά 50% αραιωμένο απόβλητο, έφτασε περίπου τα  $16 \text{ mg L}^{-1}$ . Πολύ μεγάλη ήταν η συγκέντρωσή της και όταν το μικροφύκος καλλιεργήθηκε σε απόβλητα βιομηχανίας παραγωγής φοινικέλαιου, όπου έφτασε την τιμή των  $36 \text{ mg L}^{-1}$ . Αναφορικά με τα καροτενοειδή, αρκετές μελέτες επικεντρώνονται στην παραγωγή β-καροτένιου και δευτερευόντων καροτενοειδών από το *Chlorococcum* sp. (Laje et al., 2019; Liu & Lee, 2000; D. H. Zhang et al., 1997) και όχι στα ολικά καροτενοειδή.

Τέλος, το μικροφύκος *C. zofingiensis* δεν παρήγαγε καθόλου χρωστικές κάτι το οποίο μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι δεν αναπτύχθηκε. Η παραγωγή χρωστικών, και συγκεκριμένα των χλωροφυλλών, είναι άμεσα συνδεδεμένη με την πορεία της φωτοσύνθεσης και άρα με την ανάπτυξη των κυττάρων (Bauer et al., 2020). Βιβλιογραφικά έχει δειχθεί ότι όταν το συγκεκριμένο μικροφύκος αναπτύσσεται, είναι ικανό για συσσώρευση χλωροφυλλών και καροτενοειδών. Ενδεικτικά, στην

έρευνα των Minyuk et al., (2020) το *C. zofingiensis* καλλιεργήθηκε σε δύο τροποποιήσεις του συνθετικού Bold Basal μέσου. Στην πρώτη τροποποίηση χρησιμοποιήθηκε  $\text{NaNO}_3$  ως πηγή αζώτου και η συγκέντρωση των χλωροφυλλών και των καροτενοειδών έφτασε τα  $75.6 \text{ mg L}^{-1}$  και  $14 \text{ mg L}^{-1}$  αντίστοιχα. Στην δεύτερη τροποποίηση χρησιμοποιήθηκε ουρία και τότε οι συγκεντρώσεις των παραπάνω χρωστικών παρουσίασαν μία μείωση κατά 23% και 4.3% αντίστοιχα. Επιπλέον, στη μελέτη των Mulders et al., (2015) το *C. zofingiensis* καλλιεργήθηκε στο τροποποιημένο μέσο M-8 και η μέγιστη συγκέντρωση των χλωροφυλλών και των καροτενοειδών ήταν περίπου  $0.6 \text{ g L}^{-1}$  και  $55 \text{ mg L}^{-1}$ .



Διάγραμμα 11.6: Συγκεντρώσεις παραγόμενων χλωροφυλλών και καροτενοειδών για τα πέντε είδη μικροφυκών  
\*n.d.: not detected

### 11.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΠΛΑΣΤΙΚΟΥ

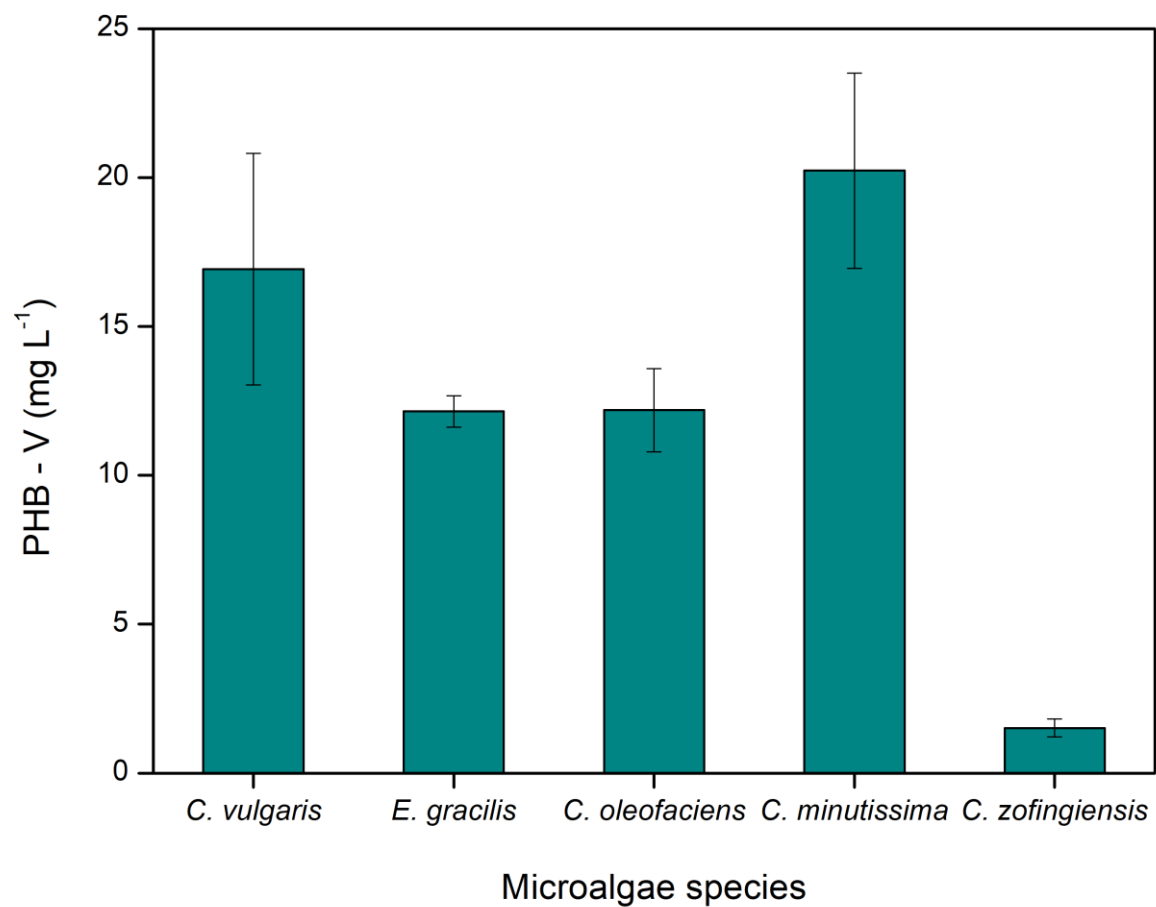
Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης πέντε ειδών μικροφυκών για την παραγωγή βιοπλαστικών έδειξαν ότι τα μικροφύκη που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη παραγωγή βιοπλαστικού είναι τα *Chlorella minutissima* και *Chlorella vulgaris*. Η συλλογή της βιομάζας πραγματοποιήθηκε στην αρχή της στάσιμης φάσης του κάθε είδους, όπου έχει αποδειχθεί ότι παρατηρείται η μέγιστη συσσώρευση πολυ(3 – υδροξυβουτυρικού) εστέρα (Asenjo & Suk, 1986). Τα τελικά αποτελέσματα φαίνονται στο Διάγραμμα 11.7.

Πιο συγκεκριμένα, η συγκέντρωση του PHB στο μικροφύκος *C. minutissima* έφτασε τα  $20.24 \pm 3.28 \text{ mg L}^{-1}$  σε διάστημα δεκατεσσάρων ημερών. Οι Costa et al., (2018) καλλιέργησαν το συγκεκριμένο είδος στο συνθετικό μέσο BG-11 τόσο σε κανονικές συνθήκες, όσο και σε συνθήκες έλλειψης αζώτου. Ωστόσο σε καμία από τις δύο περιπτώσεις το *Chlorella minutissima* δε συσσώρευσε βιοπλαστικό. Γενικά στη βιβλιογραφία δεν υπάρχει αναφορά για την παραγωγή PHB από το είδος *Chlorella minutissima*.

Αντίστοιχα, το μικροφύκος *Chlorella vulgaris* συσσώρευσε PHB συγκέντρωσης  $16.92 \pm 3.89 \text{ mg L}^{-1}$  σε διάστημα 15 ημερών. Βιβλιογραφικά υπάρχουν αναφορές για την παραγωγή PHB από το μικροφύκος *Chlorella vulgaris*. Ενδεικτικά, μιξότροφη καλλιέργειά του στο μέσο Cyanophyceae με προσθήκη όξινου ανθρακικού νατρίου ως πηγή άνθρακα, οδήγησε στη συσσώρευση PHB περιεκτικότητας 80 % w/w ( $4.88 \text{ g L}^{-1}$ ) (Selvaraj et al., 2021). Επίσης, στην έρευνα των Setyorini & Dianursanti, (2021) όπου χρησιμοποιήθηκε NaClO συγκέντρωσης 1.37 w/v για την εκχύλιση του PHB, η περιεκτικότητα του μικροφύκους σε βιοπλαστικό έφτασε τα 37.2 % w/w.

Τα μικροφύκη *E. gracilis* και *C. oleofaciens* παρήγαγαν PHB με παραπλήσιες συγκεντρώσεις ( $12.16 \pm 0.53 \text{ mg L}^{-1}$  και  $12.19 \pm 1.39 \text{ mg L}^{-1}$  αντίστοιχα). Η παραγωγή βιοπλαστικών από τα συγκεκριμένα είδη δεν έχει μελετηθεί.

Τέλος, το μικροφύκος *C. zofingiensis* παρουσίασε τη μικρότερη παραγωγή PHB ( $1.52 \pm 0.31 \text{ mg L}^{-1}$ ). Η πολύ μικρή συσσώρευση βιοπλαστικού οφείλεται στο γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του συγκεκριμένου είδους. Στη βιβλιογραφία ωστόσο, δεν υπάρχει κάποια αναφορά σχετική με την παραγωγή PHB από το *C. zofingiensis*.



Διάγραμμα 11.7: Συγκέντρωση παραγόμενου πολυ(3 – υδροξυβουτυρικού) εστέρα για πέντε είδη μικροφυκών

## 12. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αντικατάσταση των συμβατικών πλαστικών πετροχημικής προέλευσης είναι ένα αναγκαίο βήμα στην προσπάθεια μετάβασης των κοινωνιών προς τη βιωσιμότητα και μία κυκλική οικονομία. Στο πλαίσιο αυτό, στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη παραγωγής βιοπλαστικών από μικροφύκη. Συγκεκριμένα, καλλιεργήθηκαν πέντε είδη μικροφυκών εκ των οποίων και τα πέντε φάνηκε πως είναι ικανά για συσσώρευση πολύ(3 – υδροξυβουτυρικού) εστέρα. Βέβαια το *Chlorella minutissima* ήταν το είδος που παρήγαγε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση PHB, ενώ εμφάνισε και τη μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας, χλωροφυλλών και καροτενοειδών. Τα είδη *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum oleofaciens* και *Euglena gracilis* αναπτύχθηκαν ικανοποιητικά και παρήγαγαν PHB και χρωστικές με μικρότερες συγκεντρώσεις από τις αντίστοιχες του *C. minutissima*.

Ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη των ειδών χρησιμοποιήθηκε η χωνεμένη ιλύς αγροκτηνοτροφικών αποβλήτων. Απαραίτητο στάδιο για την αξιοποίησή της ωστόσο ήταν η προεπεξεργασία της ώστε να απομακρυνθούν τα μεγάλα στερεά που περιείχε, η παρουσία των οποίων θα οδηγούσε σε αναποτελεσματική διέλευση του φωτός. Στο πλαίσιο αυτό, η αραίωση του αποβλήτου με σκοπό τη μείωση της θολερότητάς του είναι ένα ακόμα βήμα που διευκολύνει την παροχή φωτός σε όλο τον όγκο της καλλιέργειας και άρα ενισχύει τη φωτοσυνθετική διαδικασία. Με την επιλογή ενός αποβλήτου ως υπόστρωμα καλλιέργειας επιτυγχάνεται όχι μόνο μείωση του συνολικού κόστους παραγωγής βιοπλαστικών, αλλά και βιοεξυγιάνσή του. Τα μικροφύκη προσλαμβάνοντας οργανικό άνθρακα και θρεπτικά συστατικά από το απόβλητο συνεισφέρουν στην απορρύπανσή του. Όλα τα είδη εκτός του *Chromochloris zofingiensis* παρουσίασαν αρκετά υψηλά ποσοστά απομάκρυνσης θρεπτικών συστατικών που κυμάνθηκαν από 88% έως 98% για το ολικό άζωτο και από 88% έως 100% για τον ολικό φώσφορο. Οι απομακρύνσεις COD κυμάνθηκαν από 4% έως 62%. Τα χαμηλά αυτά ποσοστά μπορεί να δηλώνουν ότι το οργανικό φορτίο που παραμένει στο απόβλητο είναι δύσκολα βιοαποικοδομήσιμο. Επομένως, η χωνεμένη ιλύς από τη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης μπορεί να αξιοποιηθεί ως υπόστρωμα προσφέροντας στα μικροφύκη τα θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξή τους και τη συσσώρευση χρήσιμων προϊόντων.

Όσον αφορά στην παραγωγή πολύ(3 – υδροξυβουτυρικού) εστέρα, εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι συγκεντρώσεις του παρουσιάζονται αρκετά χαμηλές σε όλα τα είδη. Επομένως, παρόλο που εξακριβώθηκε το γεγονός ότι τα είδη είναι ικανά για συσσώρευση PHB, προτείνεται η μελέτη ανάπτυξης των ειδών σε άλλα υποστρώματα ή απόβλητα, και με διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Αξίζει δηλαδή η μελέτη της μεταβολής των εξωτερικών συνθηκών ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες για τη μεγιστοποίηση της παραγωγής PHB για το κάθε είδος. Μία επιπλέον πρόταση για μελλοντική έρευνα θα ήταν η επιβολή στρες στα κύτταρα η οποία έχει δειχθεί ότι ενισχύει τη συσσώρευση βιοπλαστικού. Ο περιορισμός σε κάποιο θρεπτικό συστατικό, η εφαρμογή φωτοπεριόδου ή ακόμα και η εναλλαγή θερμοκρασιών, είναι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη συσσώρευση PHB.

Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι το μικροφύκος *C. zofingiensis* δεν αναπτύχθηκε επαρκώς. Η κατάσταση της ατελούς ανάπτυξής του φαίνεται όχι μόνο από την πορεία του ξηρού του βάρους σε συνάρτηση με το χρόνο, αλλά και από τα πολύ χαμηλά ποσοστά απομάκρυνσης των θρεπτικών συστατικών. Πιθανή εξήγηση στην προβληματική καλλιέργειά του είναι η υψηλή συγκέντρωση αμμωνιακού αζώτου στο υπόστρωμα. Ίσως επομένως να απαιτούνταν μεγαλύτερη αραίωση του αποβλήτου ή αντικατάσταση της πηγής αζώτου με μία την οποία θα αξιοποιούσε καλύτερα το συγκεκριμένο μικροφύκος.

Τέλος, η παραγωγή βιοπλαστικών από μικροφύκη είναι μία διεργασία που είναι ωφέλιμο να πραγματοποιηθεί σε μεγάλη κλίμακα εάν είναι επιθυμητή η μαζική παραγωγή βιοπλαστικών. Τροχοπέδη σε αυτή τη διαδικασία είναι το συνολικό κόστος παραγωγής. Η μείωση του συνολικού κόστους μπορεί να επιτευχθεί με εξοικονόμηση χρημάτων από επιμέρους στάδια. Για παράδειγμα, η

χρήση αποβλήτων έναντι συνθετικών μέσων καλλιέργειας είναι μία πολύ οικονομική εναλλακτική λύση. Επίσης, η εύρεση πιο οικονομικών διαλυτών για την εκχύλιση του βιοπολυμερούς θα ελαττώσει σημαντικά το συνολικό κόστος. Στο πλαίσιο αυτό, είναι αναγκαία η έρευνα και η ανάπτυξη βέλτιστων τρόπων ανάκτησης των βιοπλαστικών από τη βιομάζα, αλλά και η αντικατάσταση των οργανικών διαλυτών με άλλους πιο φιλικούς προς το περιβάλλον.

## 13. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 13.1 ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- Abbasi, S., & Turner, A. (2021). Human exposure to microplastics: A study in Iran. *Journal of Hazardous Materials*, 403, 123799. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2020.123799>
- Abreu, A. P., Morais, R. C., Teixeira, J. A., & Nunes, J. (2022). A comparison between microalgal autotrophic growth and metabolite accumulation with heterotrophic, mixotrophic and photoheterotrophic cultivation modes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 159, 112247. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2022.112247>
- Allen, S., Allen, D., Karbalaei, S., Maselli, V., & Walker, T. R. (2022). Micro(nano)plastics sources, fate, and effects: What we know after ten years of research. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 6, 100057. <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2022.100057>
- Asenjo, J. A., & Suk, J. S. (1986). Microbial Conversion of Methane into poly-β-hydroxybutyrate (PHB): Growth and intracellular product accumulation in a type II methanotroph. *Journal of Fermentation Technology*, 64(4), 271–278. [https://doi.org/10.1016/0385-6380\(86\)90118-4](https://doi.org/10.1016/0385-6380(86)90118-4)
- Balaji, S., Gopi, K., & Muthuvelan, B. (2013). A review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. *Algal Research*, 2(3), 278–285. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2013.03.002>
- Barsanti, L., Evangelista, V., Passarelli, V., Frassanito, A. M., & Gualtieri, P. (2012). Fundamental questions and concepts about photoreception and the case of *Euglena gracilis*. *Integrative Biology*, 4(1), 22–36. <https://doi.org/10.1039/C1IB00115A>
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*.
- Bauer, L. M., Rodrigues, E., & Rech, R. (2020). Potential of immobilized *Chlorella minutissima* for the production of biomass, proteins, carotenoids and fatty acids. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, 101601. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2020.101601>
- Bernardi, A., Perin, G., Sforza, E., Galvanin, F., Morosinotto, T., & Bezzo, F. (2014). An identifiable state model to describe light intensity influence on microalgae growth. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 53(16), 6738–6749. [https://doi.org/10.1021/IE500523Z/ASSET/IMAGES/IE-2014-00523Z\\_M022.GIF](https://doi.org/10.1021/IE500523Z/ASSET/IMAGES/IE-2014-00523Z_M022.GIF)
- Bishop, G., Styles, D., & Lens, P. N. L. (2021). Environmental performance comparison of bioplastics and petrochemical plastics: A review of life cycle assessment (LCA) methodological decisions. *Resources, Conservation and Recycling*, 168, 105451. <https://doi.org/10.1016/J.RESCONREC.2021.105451>
- Braunegg, G., Sonnleitner, B., & Lafferty, R. M. (1978). A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-β-hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 6(1), 29–37. <https://doi.org/10.1007/BF00500854/METRICKS>
- Cañavate, J. P., & Fernández-Díaz, C. (2022). An appraisal of the variable response of microalgal lipids to culture salinity. *Reviews in Aquaculture*, 14(1), 192–212. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12592>
- Carvalho, A. P., Silva, S. O., Baptista, J. M., & Malcata, F. X. (2011). Light requirements in microalgal photobioreactors: An overview of biophotonic aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1275–1288. <https://doi.org/10.1007/S00253-010-3047-8/FIGURES/3>
- Cassuriaga, A. P. A., Freitas, B. C. B., Morais, M. G., & Costa, J. A. V. (2018). Innovative polyhydroxybutyrate production by *Chlorella fusca* grown with pentoses. *Bioresource Technology*, 265, 456–463. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.06.026>

- Castillo, T., Ramos, D., García-Beltrán, T., Brito-Bazan, M., & Galindo, E. (2021). Mixotrophic cultivation of microalgae: An alternative to produce high-value metabolites. *Biochemical Engineering Journal*, 176, 108183. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2021.108183>
- Chaisutyakorn, P., Praiboon, J., & Kaewsuralikhit, C. (2018). The effect of temperature on growth and lipid and fatty acid composition on marine microalgae used for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 30(1), 37–45. <https://doi.org/10.1007/S10811-017-1186-3/TABLES/3>
- Chakraborty, S., Mohanty, D., Ghosh, S., & Das, D. (2016). Improvement of lipid content of *Chlorella minutissima* MCC 5 for biodiesel production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122(3), 294–300. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSC.2016.01.015>
- Chandra, R., Amit, & Ghosh, U. K. (2019). Effects of various abiotic factors on biomass growth and lipid yield of *Chlorella minutissima* for sustainable biodiesel production. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(4), 3848–3861. <https://doi.org/10.1007/S11356-018-3696-1/FIGURES/13>
- Chen, Z., Xiao, Y., Liu, T., Yuan, M., Liu, G., Fang, J., & Yang, B. (2021). Exploration of Microalgal Species for Nutrient Removal from Anaerobically Digested Swine Wastewater and Potential Lipids Production. *Microorganisms* 2021, Vol. 9, Page 2469, 9(12), 2469. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9122469>
- Chiranjeevi, P., & Mohan, S. V. (2016). Critical parametric influence on microalgae cultivation towards maximizing biomass growth with simultaneous lipid productivity. *Renewable Energy*, 98, 64–71. <https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2016.03.063>
- Chuka-ogwude, D., Ogbonna, J., & Moheimani, N. R. (2020). A review on microalgal culture to treat anaerobic digestate food waste effluent. *Algal Research*, 47, 101841. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2020.101841>
- Costa, S. S., Miranda, A. L., Andrade, B. B., Assis, D. de J., Souza, C. O., de Morais, M. G., Costa, J. A. V., & Druzian, J. I. (2018). Influence of nitrogen on growth, biomass composition, production, and properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae. *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, 552–562. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.05.064>
- Costa, S. S., Miranda, A. L., de Morais, M. G., Costa, J. A. V., & Druzian, J. I. (2019). Microalgae as source of polyhydroxyalkanoates (PHAs) — A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 536–547. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.03.099>
- Cucina, M., de Nisi, P., Tambone, F., & Adani, F. (2021). The role of waste management in reducing bioplastics' leakage into the environment: A review. *Bioresource Technology*, 337, 125459. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.125459>
- Dalton, B., Bhagabati, P., De Micco, J., Padamati, R. B., & O'Connor, K. (2022). A Review on Biological Synthesis of the Biodegradable Polymers Polyhydroxyalkanoates and the Development of Multiple Applications. *Catalysts* 2022, Vol. 12, Page 319, 12(3), 319. <https://doi.org/10.3390/CATAL12030319>
- Darvehei, P., Bahri, P. A., & Moheimani, N. R. (2018). Model development for the growth of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 97, 233–258. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2018.08.027>
- Das, S. K., Sathish, A., & Stanley, J. (2018). Production Of Biofuel And Bioplastic From *Chlorella Pyrenoidosa*. *Materials Today: Proceedings*, 5(8), 16774–16781. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2018.06.020>
- de Morais, M. G., & Costa, J. A. V. (2007). Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 129(3), 439–445. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2007.01.009>

- dos Santos, A. J., Oliveira Dalla Valentina, L. V., Hidalgo Schulz, A. A., & Tomaz Duarte, M. A. (2017). From Obtaining to Degradation of PHB:Material Properties. Part I. *Ingeniería y Ciencia*, 13(26), 269–298. <https://doi.org/10.17230/INGCIENCIA.13.26.10>
- Fernando, J. S. R., Premaratne, M., Dinalankara, D. M. S. D., Perera, G. L. N. J., & Ariyadasa, T. U. (2021). Cultivation of microalgae in palm oil mill effluent (POME) for astaxanthin production and simultaneous phycoremediation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), 105375. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2021.105375>
- Gatamaneni, B. L., Orsat, V., & Lefsrud, M. (2018). Factors Affecting Growth of Various Microalgal Species. *Https://Home.Liebertpub.Com/Ees*, 35(10), 1037–1048. <https://doi.org/10.1089/EES.2017.0521>
- Gissibl, A., Sun, A., Care, A., Nevalainen, H., & Sunna, A. (2019). Bioproducts From *Euglena gracilis*: Synthesis and Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 445605. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2019.00108>
- Griffiths, M. J., Garcin, C., van Hille, R. P., & Harrison, S. T. L. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, 85(2), 119–123. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2011.02.005>
- Heidbreder, L. M., Bablok, I., Drews, S., & Menzel, C. (2019). Tackling the plastic problem: A review on perceptions, behaviors, and interventions. In *Science of the Total Environment* (Vol. 668, pp. 1077–1093). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.437>
- Ignatenko, M. E., Yatsenko-Stepanova, T. N., & Khlopko, Y. A. (2019). Halotolerant strain of *Chlorococcum oleofaciens* from the lake Elton biosphere reserve. *Biosystems Diversity*, 27(3), 244–249. <https://doi.org/10.15421/011934>
- Kavitha, G., Kurinjimalar, C., Sivakumar, K., Palani, P., & Rengasamy, R. (2016). Biosynthesis, purification and characterization of polyhydroxybutyrate from *Botryococcus braunii* kütz. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 700–706. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.04.086>
- Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40(2), 607–619. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2004.01.053>
- Koutra, E., Economou, C. N., Tsafraikidou, P., & Kornaros, M. (2018). Bio-Based Products from Microalgae Cultivated in Digestates. *Trends in Biotechnology*, 36(8), 819–833. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2018.02.015>
- Koutra, E., Mastropetros, S. G., Ali, S. S., Tsigkou, K., & Kornaros, M. (2021). Assessing the potential of *Chlorella vulgaris* for valorization of liquid digestates from agro-industrial and municipal organic wastes in a biorefinery approach. *Journal of Cleaner Production*, 280, 124352. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2020.124352>
- Kumar, L., Mohan, L., Anand, R., & Bharadvaja, N. (2023). *Chlorella minutissima*-assisted silver nanoparticles synthesis and evaluation of its antibacterial activity. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 1, 1–10. <https://doi.org/10.1007/S43393-023-00173-4/FIGURES/5>
- Kumar Sharma, G., Ahmad Khan, S., Shrivastava, M., & Gupta, N. (2020). Bioremediation of sewage wastewater through microalgae (*Chlorella minutissima*). *Researchgate.NetGK Sharma, SA Khan, M Shrivastava, N Gupta, S Kumar, LC Malav, M Nogiya, SK DubeyIndian Journal of Agricultural Sciences*, 2020•researchgate.Net. <https://doi.org/10.56093/ijas.v90i10.107985>
- Kumar, V., Sehgal, R., & Gupta, R. (2021). Blends and composites of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and their applications. *European Polymer Journal*, 161, 110824. <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2021.110824>
- Kumari, N., Sahani, G. K., Kumar, S., Kumari, N., Sahani, G. K., & Kumar, S. (2023). *Growth of Chlorella Minutissima Microalgae from Fruit Waste Extract for Biodiesel Production*. 237–257. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-6810-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-19-6810-5_9)

- Kwon, H. K., Jeon, J. Y., & Oh, S. J. (2017). Potential for heavy metal (copper and zinc) removal from contaminated marine sediments using microalgae and light emitting diodes. *Ocean Science Journal*, 52(1), 57–66. <https://doi.org/10.1007/S12601-017-0001-Z/METRICS>
- Lai, S. M., Sun, W. W., & Don, T. M. (2015). Preparation and characterization of biodegradable polymer blends from poly(3-hydroxybutyrate)/poly(vinyl acetate)-modified corn starch. *Polymer Engineering & Science*, 55(6), 1321–1329. <https://doi.org/10.1002/PEN.24071>
- Laje, K., Seger, M., Dungan, B., Cooke, P., Polle, J., & Omar Holguin, F. (2019). Phytoene Accumulation in the Novel Microalga *Chlorococcum* sp. Using the Pigment Synthesis Inhibitor Fluridone. *Marine Drugs* 2019, Vol. 17, Page 187, 17(3), 187. <https://doi.org/10.3390/MD17030187>
- Leslie, H. A., van Velzen, M. J. M., Brandsma, S. H., Vethaak, A. D., Garcia-Vallejo, J. J., & Lamoree, M. H. (2022). Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environment International*, 163, 107199. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2022.107199>
- Liu, B. H., & Lee, Y. K. (2000). Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp. *Journal of Applied Phycology*, 12(3–5), 301–307. <https://doi.org/10.1023/A:1008185212724/METRICS>
- Lowrey, J., Brooks, M. S., & McGinn, P. J. (2015). Heterotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production in agricultural wastewaters and associated challenges—a critical review. *Journal of Applied Phycology*, 27(4), 1485–1498. <https://doi.org/10.1007/S10811-014-0459-3/TABLES/3>
- Lugolooobi, I., Li, X., Zhang, Y., Mao, Z., Wang, B., Sui, X., & Feng, X. (2020). Fabrication of lignin/poly(3-hydroxybutyrate) nanocomposites with enhanced properties via a Pickering emulsion approach. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 3078–3087. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.10.156>
- Madadi, R., Maljaee, H., Serafim, L. S., & Ventura, S. P. M. (2021). Microalgae as Contributors to Produce Biopolymers. *Marine Drugs* 2021, Vol. 19, Page 466, 19(8), 466. <https://doi.org/10.3390/MD19080466>
- Mahapatra, D. M., Chanakya, H. N., & Ramachandra, T. V. (2013). *Euglena* sp. as a suitable source of lipids for potential use as biofuel and sustainable wastewater treatment. *Journal of Applied Phycology*, 25(3), 855–865. <https://doi.org/10.1007/S10811-013-9979-5/TABLES/4>
- Malla, F. A., Khan, S. A., Rashmi, Sharma, G. K., Gupta, N., & Abraham, G. (2015). Phycoremediation potential of *Chlorella minutissima* on primary and tertiary treated wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Ecological Engineering*, 75, 343–349. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLENG.2014.11.038>
- Maltsev, Y. I., & Konovalenko, T. V. (2017). New finding of green algae with potential for algal biotechnology, *Chlorococcum oleofaciens* and its molecular investigation. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(4), 532–539. <https://doi.org/10.15421/021782>
- Maltsev, Y., Maltseva, K., Kulikovskiy, M., & Maltseva, S. (2021). Influence of Light Conditions on Microalgae Growth and Content of Lipids, Carotenoids, and Fatty Acid Composition. *Biology* 2021, Vol. 10, Page 1060, 10(10), 1060. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10101060>
- Mariotto, M., Egloff, S., Fritz, I., & Refardt, D. (2023). Cultivation of the PHB-producing cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis* in a pilot-scale open system using nitrogen from waste streams. *Algal Research*, 70. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103013>
- Markou, G., & Nerantzis, E. (2013). *Μικροφύκη: καλλιέργεια και βιομηχανικές εφαρμογές (Microalgae: cultivation and applications)*. [https://www.researchgate.net/publication/235967808\\_Mikrophyke\\_kalliergeia\\_kai\\_biomechanikes\\_epharmoges\\_Microalgae\\_cultivation\\_and\\_applications](https://www.researchgate.net/publication/235967808_Mikrophyke_kalliergeia_kai_biomechanikes_epharmoges_Microalgae_cultivation_and_applications)

- Mastropetros, S. G., Pispas, K., Zagklis, D., Ali, S. S., & Kornaros, M. (2022). Biopolymers production from microalgae and cyanobacteria cultivated in wastewater: Recent advances. *Biotechnology Advances*, 60, 107999. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2022.107999>
- McAdam, B., Fournet, M. B., McDonald, P., & Mojicevic, M. (2020). Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics. *Polymers* 2020, Vol. 12, Page 2908, 12(12), 2908. <https://doi.org/10.3390/POLYM12122908>
- Meixner, K., Fritz, I., Daffert, C., Markl, K., Fuchs, W., & Drosig, B. (2016). Processing recommendations for using low-solids digestate as nutrient solution for poly-β-hydroxybutyrate production with *Synechocystis salina*. *Journal of Biotechnology*, 240, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.023>
- Minyuk, G., Sidorov, R., & Solovchenko, A. (2020). Effect of nitrogen source on the growth, lipid, and valuable carotenoid production in the green microalga *Chromochloris zofingiensis*. *Journal of Applied Phycology*, 32(2), 923–935. <https://doi.org/10.1007/S10811-020-02060-0/FIGURES/7>
- Morsi, H. H., El-Sheekh, M. M., Eladel, H., Al-Tuwaijri, M. M., El-Sabbagh, S. M., Maher, A., & Saber, A. A. (2023). Screening the Pollution-Tolerant *Chlorococcum* sp. (Chlorophyceae) Grown in Municipal Wastewater for Simultaneous Nutrient Removal and Biodiesel Production. *Water* 2023, Vol. 15, Page 1723, 15(9), 1723. <https://doi.org/10.3390/W15091723>
- Możejko-Ciesielska, J., & Kiewisz, R. (2016). Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*, 192, 271–282. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2016.07.010>
- Mulders, K. J. M., Lamers, P. P., Wijffels, R. H., & Martens, D. E. (2015). Dynamics of biomass composition and growth during recovery of nitrogen-starved *Chromochloris zofingiensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1873–1884. <https://doi.org/10.1007/S00253-014-6181-X/TABLES/1>
- Nagarajan, D., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2019). Integration of anaerobic digestion and microalgal cultivation for digestate bioremediation and biogas upgrading. *Bioresource Technology*, 290, 121804. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.121804>
- Nalley, J. O., O'Donnell, D. R., & Litchman, E. (2018). Temperature effects on growth rates and fatty acid content in freshwater algae and cyanobacteria. *Algal Research*, 35, 500–507. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2018.09.018>
- Narala, R. R., Garg, S., Sharma, K. K., Thomas-Hall, S. R., Deme, M., Li, Y., & Schenk, P. M. (2016). Comparison of microalgae cultivation in photobioreactor, open raceway pond, and a two-stage hybrid system. *Frontiers in Energy Research*, 4(AUG), 208116. <https://doi.org/10.3389/FENRG.2016.00029/BIBTEX>
- Nishshanka, G. K. S. H., Liyanaarachchi, V. C., Premaratne, M., Ariyadasa, T. U., & Nimarshana, P. H. V. (2022). Sustainable cultivation of *Haematococcus pluvialis* and *Chromochloris zofingiensis* for the production of astaxanthin and co-products. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 100(10), 2835–2849. <https://doi.org/10.1002/CJCE.24317>
- Numata, K., Abe, H., & Iwata, T. (2009). Biodegradability of Poly(hydroxyalkanoate) Materials. *Materials* 2009, Vol. 2, Pages 1104–1126, 2(3), 1104–1126. <https://doi.org/10.3390/MA2031104>
- Parodi, A., D'Ambrosio, M., Mazzocchetti, L., Martinez, G. A., Samorì, C., Torri, C., & Galletti, P. (2021). Chemical Recycling of Polyhydroxybutyrate (PHB) into Bio-Based Solvents and Their Use in a Circular PHB Extraction. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 9(37), 12575–12583. [https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.1C03299/ASSET/IMAGES/MEDIUM/SC1C03299\\_M003.GIF](https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.1C03299/ASSET/IMAGES/MEDIUM/SC1C03299_M003.GIF)
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 45(1), 11–36. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2010.08.037>

- Porra, R. J., Thompson, W. A., & Kriedemann, P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 975(3), 384–394. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(89\)80347-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80347-0)
- Qiu, R., Gao, S., Lopez, P. A., & Ogden, K. L. (2017). Effects of pH on cell growth, lipid production and CO<sub>2</sub> addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research*, 28, 192–199. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2017.11.004>
- Ragusa, A., Svelato, A., Santacroce, C., Catalano, P., Notarstefano, V., Carnevali, O., Papa, F., Rongioletti, M. C. A., Baiocco, F., Draghi, S., D’Amore, E., Rinaldo, D., Matta, M., & Giorgini, E. (2021). Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment International*, 146, 106274. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.106274>
- Rahman, A., & Miller, C. D. (2017). Microalgae as a Source of Bioplastics. *Algal Green Chemistry: Recent Progress in Biotechnology*, 121–138. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63784-0.00006-0>
- Rajpoot, A. S., Choudhary, T., Chelladurai, H., Nath Verma, T., & Shende, V. (2022). A comprehensive review on bioplastic production from microalgae. *Materials Today: Proceedings*, 56, 171–178. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2022.01.060>
- Ras, M., Steyer, J. P., & Bernard, O. (2013). Temperature effect on microalgae: A crucial factor for outdoor production. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 12(2), 153–164. <https://doi.org/10.1007/S11157-013-9310-6/FIGURES/5>
- Rayati, M., Rajabi Islami, H., & Shamsaie Mehrgan, M. (2020). Light Intensity Improves Growth, Lipid Productivity, and Fatty Acid Profile of *Chlorococcum oleofaciens* (Chlorophyceae) for Biodiesel Production. *Bioenergy Research*, 13(4), 1235–1245. <https://doi.org/10.1007/S12155-020-10144-5/TABLES/3>
- Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S. A., Lee, K., & Rashid, N. (2018). Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 92, 394–404. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2018.04.034>
- Rosenboom, J. G., Langer, R., & Traverso, G. (2022). Bioplastics for a circular economy. *Nature Reviews Materials* 2022 7:2, 7(2), 117–137. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00407-8>
- Rubiyatno, Matsui, T., Mori, K., & Toyama, T. (2021). Paramylon production by *Euglena gracilis* via mixotrophic cultivation using sewage effluent and waste organic compounds. *Bioresource Technology Reports*, 15, 100735. <https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2021.100735>
- Sadeghizadeh, A., Farhad dad, F., Moghaddasi, L., & Rahimi, R. (2017). CO<sub>2</sub> capture from air by *Chlorella vulgaris* microalgae in an airlift photobioreactor. *Bioresource Technology*, 243, 441–447. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.06.147>
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2014.04.007>
- Santos, A. J. dos, Valentina, L. V. O. D., Schulz, A. A. H., & Duarte, M. A. T. (2018). From Obtaining to Degradation of PHB: A Literature Review. Part II. *Ingeniería y Ciencia*, 14(27), 207–228. <https://doi.org/10.17230/INGCIENCIA.14.27.9>
- Selvaraj, K., Vishvanathan, N., & Dhandapani, R. (2021). Screening, optimization and characterization of poly hydroxy butyrate from fresh water microalgal isolates. <https://doi.org/10.1080/24759651.2021.1926621>, 3(1), 139–162.

- Setyorini, A. I., & Dianursanti. (2021). Isolation and optimization of polyhydroxybutyrate from *Chlorella vulgaris* using NaClO and ultrasonication aided chemical pretreatment methods. *AIP Conference Proceedings*, 2344(1). <https://doi.org/10.1063/5.0047562/748955>
- Sharma, A. K., Sharma, A., Singh, Y., & Chen, W. H. (2021). Production of a sustainable fuel from microalgae *Chlorella minutissima* grown in a 1500 L open raceway ponds. *Biomass and Bioenergy*, 149, 106073. <https://doi.org/10.1016/j.BIOMBIOE.2021.106073>
- Shruti, V. C., & Kutralam-Muniasamy, G. (2019). Bioplastics: Missing link in the era of Microplastics. In *Science of the Total Environment* (Vol. 697). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134139>
- Singh, A. K., Sharma, L., Mallick, N., & Mala, J. (2016). Progress and challenges in producing polyhydroxyalkanoate biopolymers from cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology* 2016 29:3, 29(3), 1213–1232. <https://doi.org/10.1007/S10811-016-1006-1>
- Singh, M., Reynolds, D. L., & Das, K. C. (2011). Microalgal system for treatment of effluent from poultry litter anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 102(23), 10841–10848. <https://doi.org/10.1016/j.BIORTECH.2011.09.037>
- Singh, N., Ogunseitan, O. A., Wong, M. H., & Tang, Y. (2022). Sustainable materials alternative to petrochemical plastics pollution: A review analysis. *Sustainable Horizons*, 2, 100016. <https://doi.org/10.1016/J.HORIZ.2022.100016>
- Spain, O., Plöhn, M., & Funk, C. (2021). The cell wall of green microalgae and its role in heavy metal removal. *Physiologia Plantarum*, 173(2), 526–535. <https://doi.org/10.1111/PPL.13405>
- Stiles, W. A. V., Styles, D., Chapman, S. P., Esteves, S., Bywater, A., Melville, L., Silkina, A., Lupatsch, I., Fuentes Grünewald, C., Lovitt, R., Chaloner, T., Bull, A., Morris, C., & Llewellyn, C. A. (2018). Using microalgae in the circular economy to valorise anaerobic digestate: challenges and opportunities. In *Bioresource Technology* (Vol. 267, pp. 732–742). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.100>
- Suzuki, M., Tachibana, Y., & Kasuya, K. ichi. (2020). Biodegradability of poly(3-hydroxyalkanoate) and poly(ε-caprolactone) via biological carbon cycles in marine environments. *Polymer Journal* 2020 53:1, 53(1), 47–66. <https://doi.org/10.1038/s41428-020-00396-5>
- Talsness, C. E., Andrade, A. J. M., Kuriyama, S. N., Taylor, J. A., & Saal, F. S. V. (2009). Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2079–2096. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2008.0281>
- Tam, N. F. Y., & Wong, Y. S. (1989). Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp. *Environmental Pollution*, 58(1), 19–34. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(89\)90234-0](https://doi.org/10.1016/0269-7491(89)90234-0)
- Tan, K. A., Lalung, J., Morad, N., Ismail, N., Omar, W. M. W., Khan, M. A., Sillanpää, M., & Rafatullah, M. (2021). Post-Treatment of Palm Oil Mill Effluent Using Immobilised Green Microalgae *Chlorococcum oleofaciens*. *Sustainability* 2021, Vol. 13, Page 11562, 13(21), 11562. <https://doi.org/10.3390/SU132111562>
- Tang, H., Chen, M., Garcia, M. E. D., Abunasser, N., Ng, K. Y. S., & Salley, S. O. (2011). Culture of microalgae *Chlorella minutissima* for biodiesel feedstock production. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(10), 2280–2287. <https://doi.org/10.1002/BIT.23160>
- Tian, Y., & Wang, J. H. (2020). Polyhydroxyalkanoates for Biodegradable Mulch Films Applications. *ACS Symposium Series*, 1373, 145–160. <https://doi.org/10.1021/BK-2020-1373.CH008>
- Troschl, C., Meixner, K., & Drosch, B. (2017). Cyanobacterial PHA Production—Review of Recent Advances and a Summary of Three Years’ Working Experience Running a Pilot Plant. *Bioengineering* 2017, Vol. 4, Page 26, 4(2), 26. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING4020026>

- Uddin, M. M., & Wright, M. M. (2022). Anaerobic digestion fundamentals, challenges, and technological advances. *Physical Sciences Reviews*. <https://doi.org/10.1515/PSR-2021-0068/MACHINEREADABLECITATION/RIS>
- Uggetti, E., Sialve, B., Latrille, E., & Steyer, J. P. (2014). Anaerobic digestate as substrate for microalgae culture: The role of ammonium concentration on the microalgae productivity. *Bioresource Technology*, 152, 437–443. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.036>
- Van Eygen, E., Feketitsch, J., Laner, D., Rechberger, H., & Fellner, J. (2017). Comprehensive analysis and quantification of national plastic flows: The case of Austria. *Resources, Conservation and Recycling*, 117, 183–194. <https://doi.org/10.1016/J.RESCONREC.2016.10.017>
- Verma, R., Kumari, K. V. L. K., Srivastava, A., & Kumar, A. (2020). Photoautotrophic, mixotrophic, and heterotrophic culture media optimization for enhanced microalgae production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5), 104149. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2020.104149>
- Vicente, D., Proença, D. N., & Morais, P. V. (2023). The Role of Bacterial Polyhydroalkanoate (PHA) in a Sustainable Future: A Review on the Biological Diversity. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2023, Vol. 20, Page 2959, 20(4), 2959. <https://doi.org/10.3390/IJERPH20042959>
- Volova, T. G., Boyandin, A. N., Vasiliev, A. D., Karpov, V. A., Prudnikova, S. V., Mishukova, O. V., Boyarskikh, U. A., Filipenko, M. L., Rudnev, V. P., Bá Xuân, B., Vit Dũng, V., & Gitelson, I. I. (2010). Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in tropical coastal waters and identification of PHA-degrading bacteria. *Polymer Degradation and Stability*, 95(12), 2350–2359. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2010.08.023>
- Wang, L., Fan, D., Chen, W., & Terentjev, E. M. (2015). Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. *Scientific Reports* 2015 5:1, 5(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep15159>
- Wang, S. K., Stiles, A. R., Guo, C., & Liu, C. Z. (2014). Microalgae cultivation in photobioreactors: An overview of light characteristics. *Engineering in Life Sciences*, 14(6), 550–559. <https://doi.org/10.1002/ELSC.201300170>
- Wellburn, A. R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Wood, E. E., Ross, M. E., Jubeau, S., Montalescot, V., & Stanley, M. S. (2022). Progress towards a targeted biorefinery of *Chromochloris zofingiensis*: a review. *Biomass Conversion and Biorefinery* 2022, 1, 1–26. <https://doi.org/10.1007/S13399-022-02955-7>
- Yadavalli, R., Rao, C. S., Rao, R. S., & Potumarthi, R. (2014). Dairy effluent treatment and lipids production by *Chlorella pyrenoidosa* and *Euglena gracilis*: study on open and closed systems. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 9(3), 368–373. <https://doi.org/10.1002/APJ.1805>
- Yamane, Y. I., Utsunomiya, T., Watanabe, M., & Sasaki, K. (2001). Biomass production in mixotrophic culture of *Euglena gracilis* under acidic condition and its growth energetics. *Biotechnology Letters*, 23(15), 1223–1228. <https://doi.org/10.1023/A:1010573218863/METRICS>
- Yashavanth, P. R., Das, M., & Maiti, S. K. (2021). Recent progress and challenges in cyanobacterial autotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB), a bioplastic. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), 105379. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2021.105379>
- Yeh, K. L., & Chang, J. S. (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*, 105, 120–127. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2011.11.103>
- Zhang, D. H., Lee, Y. K., Ng, M. L., & Phang, S. M. (1997). Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum* sp. *Journal of Applied Phycology*, 9(2), 147–155. <https://doi.org/10.1023/A:1007926528388/METRICS>

- Zhang, Y., Ye, Y., Bai, F., & Liu, J. (2021). The oleaginous astaxanthin-producing alga *Chromochloris zofingiensis*: potential from production to an emerging model for studying lipid metabolism and carotenogenesis. *Biotechnology for Biofuels* 2021 14:1, 14(1), 1–37. <https://doi.org/10.1186/S13068-021-01969-Z>
- Zheng, M., Qiu, W., Chi, C., He, Y., Wang, M., Huang, J., & Chen, B. (2023). A green and efficient technology for sequential extraction of lipid and paramylon from *Euglena gracilis*. *Algal Research*, 72, 103101. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2023.103101>
- Zhu, S., Jiang, R., Qin, L., Huang, D., Yao, C., Xu, J., & Wang, Z. (2022). Integrated strategies for robust growth of *Chlorella vulgaris* on undiluted dairy farm liquid digestate and pollutant removal. *Science of The Total Environment*, 852, 158518. <https://doi.org/10.1016/J.SCI-TOTENV.2022.158518>
- Zimorski, V., Rauch, C., van Hellemond, J. J., Tielens, A. G. M., & Martin, W. F. (2017). The mitochondrion of *Euglena gracilis*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 979, 19–37. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54910-1\\_2/FIGURES/4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54910-1_2/FIGURES/4)
- Zuccaro, G., Yousuf, A., Pollio, A., & Steyer, J. P. (2020). Microalgae Cultivation Systems. *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, 11–29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00002-3>
- Λυμπεράτος, Γ., & Παύλου, Σ. (2010). *Εισαγωγή στη Βιοχημική Μηχανική*. ΤΖΙΟΛΑΣ.

## 13.2 ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

---

- [1] [Plastics - the Facts 2022 • Plastics Europe](#)
- [2] [7 Types of Plastic That Are Most Common | PlasticOceans.org](#)
- [3] [Why burning plastic won't solve the plastic crisis | Greenpeace UK](#)
- [4] [Market – European Bioplastics e.V. \(european-bioplastics.org\)](#)
- [5] [EuBP FS What are bioplastics.pdf \(european-bioplastics.org\)](#)
- [6] [Biodegradation - an overview | ScienceDirect Topics](#)
- [7] [Microbiology from A to Z explained - Micropia - Micropia](#)
- [8] [Chlorella cf. minutissima | CCALA \(cas.cz\)](#)