



**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΟΣ



ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΣΤΗΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»

ΚΑΠΠΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΑΛΕΞΙΟΣ Α.Μ. 18006

Πτυχιούχου Τεχνολόγου Γεωπόνου

ΕΥΛΟΠΙΝΑΚΑ ΧΡΥΣΑΝΘΗ Α.Μ. 18014

Πτυχιούχου Γεωπόνου, Επιστήμονα Τροφίμων

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ

ΧΩΝΕΥΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ»



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ – ΣΙΝΔΟΣ

ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2020

ΚΑΙΠΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΑΛΕΞΙΟΣ

ΕΥΛΟΠΙΝΑΚΑ ΧΡΥΣΑΝΘΗ

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ
ΧΩΝΕΥΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Υποβλήθηκε στην σχολή Γεωτεχνικών επιστημών

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Ημερομηνία Προφορικής Εξέτασης:

Εξεταστική Επιτροπή

Καθηγητής: Π. Σαμαράς, Επιβλέπων

Καθηγητής:

Καθηγητής:

© Κάππος Παναγιώτης Αλέξιος & Ξυλοπινάκα Χρυσάνθη

© Διεθνές Πανεπιστήμιο Ελλάδος

Τίτλος Μεταπτυχιακής Διατριβής: «ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ
ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΧΩΝΕΥΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ»

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανθρώπινη δραστηριότητα στον σύγχρονο κόσμο, σε παραλληλισμό με την αύξηση του πληθυσμού του πλανήτη και την εκβιομηχάνιση, οδήγησαν σε περιβαλλοντικά προβλήματα που χρήζουν άμεσης αντιμετώπισης. Τα υγρά απόβλητα που παράγονται από τις αγροτικές και κτηνοτροφικές δραστηριότητες και κυρίως από τη βιομηχανική παραγωγική διαδικασία επιφορτίζουν το περιβάλλον και τους υδάτινους αποδέκτες με μεγάλες συγκεντρώσεις οργανικών και ανόργανων στοιχείων και αζωτούχων ενώσεων. Συνεπώς, η μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος και των επιπτώσεων στην ζωή των έμβιων όντων απαιτεί μέτρα τόσο για τον περιορισμό της διάθεσης υγρών αποβλήτων στα οικοσυστήματα, όσο και για την ανάπτυξη κατάλληλων τεχνικών για τη μείωση του οργανικού και ανόργανου φορτίου των αποβλήτων.

Οι συμβατικές τεχνικές για την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων επικεντρώνονται κυρίως στην απομάκρυνση του οργανικού φορτίου, ενώ τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες για την απομάκρυνση των θρεπτικών συστατικών, δηλαδή ενώσεων αζώτου και φωσφόρου, από τις εκροές. Ωστόσο, οι διεργασίες που εφαρμόζονται για την επεξεργασία αποβλήτων με υψηλή περιεκτικότητα σε άζωτο συνήθως παρουσιάζουν υψηλό κόστος και απαιτούν τη συνεχή παρακολούθηση και έλεγχο της λειτουργίας από κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό. Επιπλέον, οι τεχνικές αυτές συνήθως αποσκοπούν στην απομάκρυνση των ενώσεων του αζώτου με μορφή αερίου, με αποτέλεσμα την απώλεια αυτού του θρεπτικού συστατικού που θα μπορούσε να αξιοποιηθεί σε άλλες εφαρμογές.

Τις τελευταίες δεκαετίες, κερδίζει ολοένα και περισσότερο έδαφος η επεξεργασία των υγρών αποβλήτων που έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε άζωτο, με αξιοποίηση μικροφυκών, τα οποία είναι υδρόβιοι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί που, μέσω της μεταβολικής τους δραστηριότητας, απομακρύνουν θρεπτικά συστατικά των υγρών αποβλήτων που επιδρούν δυσμενώς στο περιβάλλον. Παράλληλα, η καλλιέργεια μικροφυκών δίνει τη δυνατότητα παραγωγής βιομάζας, η οποία θεωρείται ανανεώσιμη πηγή για την παραγωγή άλλων χρήσιμων προϊόντων.

Στη παρούσα διπλωματική διατριβή μελετήθηκε η επεξεργασία ενός ρεύματος υγρών αποβλήτων με υψηλή περιεκτικότητα σε άζωτο: πρόκειται για το υπόλειμμα από την αναερόβια επεξεργασία αγροκτηνοτροφικών αποβλήτων, η διαχείριση του οποίου ακριβώς λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε άζωτο αποτελεί ένα σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα. Ανάλογα με την τροφοδοσία του αναερόβιου αντιδραστήρα, η συγκέντρωση σε άζωτο μπορεί να ξεπερνά τα 5 g/L. Για την επεξεργασία αυτού του ρεύματος αξιοποιήθηκε η μεταβολική δράση φωτοσυνθετικών μικροφυκών του γένους *Chlorella*. Η διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε σε εργαστηριακή κλίμακα, με εφαρμογή κατάλληλων συνθηκών φωτισμού και αερισμού των δειγμάτων, με στόχο των προσδιορισμό των βέλτιστων παραμέτρων λειτουργίας για την ανάπτυξη των μικροφυκών και την αξιοποίηση του περιεχόμενου στα απόβλητα αζώτου με παραγωγή βιομάζας.

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση της τιμής pH των δειγμάτων ως προς την αποδοτική επεξεργασία τους, όπως αυτή συνίσταται από τη μείωση του αμμωνιακού φορτίου και των υπολοίπων θρεπτικών συστατικών (φώσφορος) και οργανικών ενώσεων (χημικά απαιτούμενο οξυγόνο). Η παροχή αερισμού για την ανάδευση των δειγμάτων είχε ως συνέπεια τη σταδιακή αύξηση του pH στην αλκαλική περιοχή. Σταθεροποίηση της τιμής στο επιθυμητό εύρος 7,0 έως 8,0 έλαβε χώρα με παροχή αερίου διοξειδίου του άνθρακα. Υπό τις βέλτιστες συνθήκες παρατηρήθηκε μείωση του αμμωνιακού αζώτου κατά 63%,

Επιπλέον, εξετάστηκε η επίδραση του στελέχους των μικροφυκών στην αποτελεσματική επεξεργασία του υγρού υπολείμματος αναερόβιας χώνευσης. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη του γένους *Chlorella*, τα *Chlorella sorokiniana* και *Chlorella vulgaris*, τα οποία παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά στην ανάπτυξη, τις θρεπτικές προτιμήσεις και τη μορφολογία τους. Με τη χρήση του στελέχους *Chlorella sorokiniana* το ποσοστό απομάκρυνσης του αμμωνιακού αζώτου έφτασε κατά μέγιστο το 66%, ενώ με το στέλεχος *Chlorella vulgaris* η μέγιστη απομάκρυνση αμμωνιακών ιόντων ήταν 53%.

Τέλος, διερευνήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του δείγματος στην ταχύτητα ανάπτυξης των μικροφυκών και την απομάκρυνση του αζώτου με την καταγραφή της απόκρισης των στελεχών σε τρεις διαφορετικές αραιώσεις του αποβλήτου, 1,85, 3,65 και 7,3%. Από τα πειράματα αυτά παρατηρήθηκε ότι στη

συγκέντρωση 7,3% επετεύχθη μέγιστη μείωση του αμμωνιακού φορτίου κατά 82%, στη συγκέντρωση 3,65% κατά 89% και στη συγκέντρωση 1,85% κατά 100%.

Ως συμπέρασμα από την εργασία αυτή προέκυψε ότι η επεξεργασία με μικροφύκη μπορεί να αποτελέσει μια ελκυστική τεχνική για την απομάκρυνση του αζώτου από ρεύματα αποβλήτων με υψηλή περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά. Μια τέτοια τεχνική παρουσιάζει πολυποίκιλα οφέλη εκτός από την επεξεργασία των αποβλήτων που κυρίως σχετίζονται με την ανάκτηση και όχι την απομάκρυνση του στοιχείου και την αξιοποίησή του υπό τη μορφή της παραγόμενης βιομάζας μικροφυκών.

ABSTRACT

Human activity in the modern world, alongside with the global population growth and the industrialization, led to environmental problems that need to be immediately addressed. Wastewaters that are produced by agricultural and livestock production activities and especially by the industrial production process, burden the environment and aquatic recipients with high amounts of organic and inorganic elements and nitrogenous compounds. Therefore, reduction of environmental pollution and the effects on the living species require measures to limit the disposal of wastewaters to ecosystems, as well as the development of specified techniques for reducing the organic and inorganic load of wastewaters.

Conventional techniques for wastewater treatment mainly focus on removing the organic load, while recently efforts have been made on the removal of nutrients, such as nitrogenous and phosphorus compounds from the effluents. However, processes applied to the treatment of wastewater with a high nitrogen concentration usually costly and require continuous monitoring and control of the operation by properly trained staff. In addition, these techniques aim at removing the nitrogenous compounds in gas form, resulting in the loss of this nutrient that it could be utilized in other applications.

In the last decades, the process that is gaining more and more ground is the treatment of wastewaters with high amounts of nitrogen using microalgae. Microalgae are aquatic photosynthetic microorganisms that, through their metabolic activity, remove nutrients from wastewaters that affect the environment. At the same time, the cultivation of microalgae gives the opportunity for the production of biomass, which is considered a renewable source for the production of other useful products.

In the present dissertation, the treatment of a stream of wastewaters with high nitrogen content was studied. This is the residue from the anaerobic treatment of livestock farming wastewater, the management of which is a major environmental problem because of its high nitrogen content. Depending on the anaerobic reactor supply, the nitrogen concentration may exceed 5 g/l. The metabolic activity of photosynthetic microalgae *Chlorella ssp.* was utilized for the treatment of this wastewater sample. The experimental procedure was performed on a laboratory

scale, under specified lighting and environmental conditions of the samples, in order to determine the optimal operating parameters for the growth of microalgae and utilization of nitrogen content in the wastewater with simultaneous production of biomass production.

Initially, the effect of the pH value of the samples on their efficient treatment was studied, by monitoring the reduction of ammonia load and other nutrients (phosphorus) and organic compounds (COD). During air supply to the samples for sufficient mixing a gradual increase of the pH was observed to the alkaline region. The stabilization of pH to the range between 7.0 to 8.0 took place with the supply of carbon dioxide gas. Under optimal conditions, a reduction of ammonium nitrogen by 63% was observed.

Furthermore, the effect of the microalgae strain on the effective treatment of the liquid anaerobic digestion residue was studied. For this reason, two strains of *Chlorella spp.* were used, i.e. *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella vulgaris*, which have common characteristics in their growth, nutritional preferences and morphology. By using the strain *Chlorella sorokiniana* the removal rate of ammonium nitrogen reached a maximum of 66%, while with the strain *Chlorella vulgaris* the maximum removal of ammonium ions was 53%.

Ultimately, the effect of sample concentration on the growth rate of microalgae and nitrogen removal was studied by monitoring the response of the strains to three different dilutions of wastewater, 1.85, 3.65 and 7.3%. It was observed that at the concentration of 7.3% the maximum reduction of ammonium load achieved was 82%, at the concentration 3.65% the nitrogen reduction was 89% and finally at the concentration 1.85% there was 100% nitrogen removal.

The conclusion of this dissertation is that wastewater treatment by microalgae can be an attractive technique for removing nitrogen from wastewater streams with a high nutrient concentration. Such a technique presents multidisciplinary benefits in addition to wastewater treatment, mainly related to the recovery and not just the removal of the nutrient and its utilization in the form of the produced biomass of microalgae.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iv
ABSTRACT	vii
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	2
1.1 Αρνητικές επιπτώσεις του αζώτου και του άνθρακα στο περιβάλλον	4
1.2 Τύποι υγρών αποβλήτων και χαρακτηριστικά τους	5
1.2.1 Αστικά λύματα	5
1.2.2 Γεωργικά υγρά απόβλητα	6
1.2.3 Βιομηχανικά υγρά απόβλητα	6
1.3 Μέθοδοι απομάκρυνσης του αζώτου από τα υγρά απόβλητα	8
1.3.1 Μέθοδος Νιτροποίησης - Απονιτροποίησης	8
1.3.2 Μέθοδος συσσώρευσης νιτρώδους	8
1.3.3 Μέθοδος αυτοτροφικής αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας (ANAMMOX)	9
1.3.4 Μέθοδος της Απονιτροποίησης της οξείδωσης του αμμωνίου (DEAMOX)	9
1.3.5 Μέθοδος της πλήρους αυτοτροφικής απομάκρυνση αζώτου (CANON)	10
1.3.6 Μέθοδος της βιολογικής επεξεργασίας υγρών αποβλήτων με μικροφύκη	10
1.4 Χημική σύσταση των αποβλήτων και επίπτωση στην τελική επεξεργασία	13
1.4.1 Αναλογίες C/N και C/P	13
1.4.2 Αναλογία N/P	14
1.5 Τα μικροφύκη	16
1.5.1 Ιστορική αναδρομή.....	16
1.5.2 Οι ιδιότητες των μικροφυκών.....	18
1.5.3 Χαρακτηριστικά ανατομίας και φυσιολογίας των μικροφυκών.....	19
1.5.4 Χρήσεις των μικροφυκών και ανασταλτικοί παράγοντες	21
1.5.5 Η επιλογή στελεχών <i>Chlorella spp.</i>	24
1.5.6 Τα στελέχη <i>Chlorella sorokiniana</i> και <i>Chlorella vulgaris</i>	24
1.5.7 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών	25
1.6 Η καλλιέργεια των μικροφυκών	30
2. ΣΤΟΧΟΙ	36
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	39
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ.....	39
3.1 Αντιδραστήρια.....	39

3.2	Εργαστηριακά υλικά.....	44
3.3	Κατεργασία αποβλήτου.....	48
3.4	Περιγραφή πειραματικών μετρήσεων.....	49
3.4.1	Μέτρηση pH.....	51
3.4.2	Μέτρηση οπτικής πυκνότητας.....	52
3.4.3	Μέτρηση κυτταρικής βιομάζας μικροφυκών.....	53
3.4.4	Παρατήρηση και καταμέτρηση κυττάρων μικροφυκών με μικροσκόπηση.....	53
3.5	Στήσιμο πειραματικής διάταξης.....	56
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	58
4.1	Επίδραση του pH στην επεξεργασία του αποβλήτου.....	58
4.2	Επίδραση των στελεχών <i>Chlorella sorokiniana</i> και <i>Chlorella vulgaris</i> στην επεξεργασία του αποβλήτου.....	76
4.3	Επίδραση της συγκέντρωσης του αποβλήτου στην απόδοση των μικροφυκών.....	90
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	104
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	107

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η υπερβολική συσσώρευση αζώτου και φωσφόρου στο περιβάλλον δημιουργεί περιβαλλοντικά προβλήματα και διαταραχές στην ισορροπία μεταξύ των οργανισμών. Η αναζήτηση μιας οικολογικής λύσης για την αποφυγή αυτής της συσσώρευσης καθίσταται αναγκαία προκειμένου να επανέλθει η οικολογική ισορροπία στα χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα.

Μια μέθοδος επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων για την απομάκρυνση των αζωτούχων ενώσεων προκειμένου να μην καταλήξουν να επιβαρύνουν τον υδροφόρο ορίζοντα είναι η επεξεργασία με τη χρήση καλλιέργειας μικροφυκών. Ο στόχος αυτής της εργασίας ήταν να προσδιοριστεί η δυνατότητα απομάκρυνσης του αζώτου από ένα υπόλειμμα με υψηλή περιεκτικότητα σε ενώσεις του αζώτου με χρήση δύο στελεχών μικροφυκών, τα *Chlorella sorokiniana* και *Chlorella vulgaris*, και ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών για την ανάπτυξή τους.

Στη πρώτη ενότητα της παρούσας διπλωματικής διατριβής αναλύονται οι διαφορετικοί τύποι των υγρών αποβλήτων και οι χαρακτηριστικές συγκεντρώσεις των θρεπτικών συστατικών τους, τα περιβαλλοντικά ζητήματα που προκύπτουν από την συσσώρευση αζώτου και άνθρακα, όπως επίσης και οι μέθοδοι απομάκρυνσης του αζώτου των υγρών αποβλήτων. Επιπρόσθετα, παρατίθενται στοιχεία για τις ιδιότητες των μικροφυκών, οι παράμετροι που επηρεάζουν την ανάπτυξή τους, αλλά και τα συστήματα καλλιέργειας των μικροφυκών σε βιομηχανική κλίμακα.

Στη δεύτερη ενότητα περιγράφονται οι αναλύσεις που διεξήχθησαν στο πειραματικό μέρος της εργασίας αυτής, με αναφορά στα αντιδραστήρια και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις των συγκεντρώσεων των θρεπτικών συστατικών του υγρού υπολείμματος αναερόβιας χώνευσης ($\text{NH}_4 - \text{N}$, $\text{NO}_3 - \text{N}$, $\text{PO}_4 - \text{P}$, COD), της τιμής pH, της οπτικής πυκνότητας και του αριθμού κυττάρων της καλλιέργειας μικροφυκών.

Στην τρίτη ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραματικών μετρήσεων με τη μορφή διαγραμμάτων γραμμής – διασποράς, καθώς και η επεξήγησή τους. Τα αποτελέσματα εντάσσονται σε τρεις υποενότητες που αφορούν τις παραμέτρους που μελετήθηκαν όσον αφορά την αποτελεσματική επεξεργασία του υγρού υπολείμματος αναερόβιας χώνευσης και συγκεκριμένα την επίδραση του pH,

του χρησιμοποιούμενου στελέχους μικροφυκών και της συγκέντρωσης του υπό μελέτη αποβλήτου.

Στη τέταρτη και τελευταία ενότητα γίνεται η συζήτηση των προαναφερθέντων πειραματικών αποτελεσμάτων και παρουσιάζονται τα τελικά συμπεράσματα της διπλωματικής διατριβής.

1.1 Αρνητικές επιπτώσεις του αζώτου και του άνθρακα στο περιβάλλον

Οι ανθρώπινες δραστηριότητες από την αστικοποίηση, τη γεωργία και την εκβιομηχάνιση έχουν επηρεάσει δυσμενώς το περιβάλλον. Αυτές οι ανθρωπογενείς δραστηριότητες συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στις εισροές του αζώτου και του φωσφόρου στα υδάτινα οικοσυστήματα.

Ο ευτροφισμός έχει παρουσιαστεί ως ένα από τα πιο δύσκολα περιβαλλοντικά προβλήματα σε παγκόσμια κλίμακα, προκαλώντας μια ανεπιθύμητη διαταραχή στην ισορροπία των οργανισμών που ζουν σ' αυτά και στη ποιότητα του νερού.

Ένα άλλο περιβαλλοντικό πρόβλημα είναι το φαινόμενο του θερμοκηπίου. Οι αυξανόμενες τάσεις που είναι εμφανείς στην υπερθέρμανση του πλανήτη και οι επιπτώσεις τους έχουν δημιουργήσει την ανάγκη για πιο αποδοτικές και περιβαλλοντικά ορθές τεχνολογίες για την δέσμευση του άνθρακα. Πιο συγκεκριμένα, το ατμοσφαιρικό διοξείδιο του άνθρακα είναι υπεύθυνο σε ποσοστό 20% για το φαινόμενο του θερμοκηπίου σε παγκόσμια κλίμακα. Επιπλέον, το φαινόμενο του θερμοκηπίου εντείνεται από ανθρωπογενείς δραστηριότητες, όπως η αγροτική δραστηριότητα που είναι μια από τις κύριες αιτίες των πρόσφατων και αναμενόμενων περιβαλλοντικών καταστροφών. Εκτός από το υποξείδιο του αζώτου, το μεθάνιο και άλλα φθοριούχα αέρια, το διοξείδιο του άνθρακα είναι τα κύρια συστατικά των αερίων του θερμοκηπίου.

Μια υποσχόμενη τεχνολογία προκύπτει ότι είναι η βιολογική δέσμευση του διοξειδίου του άνθρακα από μικροφύκη, λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων που παρέχουν σε σχέση με τα ψηλότερα φυτά και λόγω της γονιμοποίησης τους στον ωκεανό (Guldhe et al., 2017).

1.2 Τύποι υγρών αποβλήτων και χαρακτηριστικά τους

Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι υγρών αποβλήτων που ξεχωρίζουν λόγω των μοναδικών φυσικών και χημικών ιδιοτήτων τους. Η συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών, το pH, η θερμοκρασία, το χρώμα, οι τοξικές ουσίες (όπως βαρέα μέταλλα, αλδεϋδικές και φαινολικές ενώσεις) μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την ανάπτυξη των μικροφυκών, τα ποσοστά ανάκτησης θρεπτικών συστατικών και την παραγωγικότητα της βιομάζας τους (Li et al., 2019).

Οι τύποι των υγρών αποβλήτων κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με την πηγή προέλευσής τους (*Σχήμα 1.1*) και περιγράφονται παρακάτω.

1.2.1 Αστικά λύματα

Τα αστικά λύματα είναι ένα μείγμα βιομηχανικών (5 - 20%) και οικιακών υγρών αποβλήτων, όπου το ποσοστό του μείγματος εξαρτάται από τις τοπικές δραστηριότητες. Τα τυπικά συστατικά των αστικών λυμάτων περιλαμβάνουν οργανικές ύλες, βιοδιασπώμενο COD, θρεπτικά συστατικά όπως το άζωτο (N) και ο φώσφορος (P), μέταλλα, ανόργανα υλικά και παθογόνους μικροοργανισμούς.

Τα περισσότερα αστικά λύματα είναι πλούσια σε συστατικά όπως η αμμωνία (NH₃), αμμωνιακά (NH₄ - N) και φωσφορικά άλατα (PO₄), όπως επίσης και οργανικές ενώσεις. Περιέχουν επίσης μια ποικιλία ανόργανων στοιχείων, συμπεριλαμβανομένων και πιθανών τοξικών στοιχείων, όπως το αρσενικό (As), το κάδμιο (Cd), το χρώμιο (Cr), ο χαλκός (Cu), ο υδράργυρος (Hg), ο ψευδάργυρος (Zn), κ.λπ. (Guldhe et al., 2017).

Τα αστικά λύματα και οι διεργασίες που χρησιμοποιούνται για απομάκρυνση των θρεπτικών συστατικών τους μπορούν να ταξινομηθούν ως εξής:

- ❖ Πρωτογενή/ Ακατέργαστα λύματα, τα οποία είναι αστικά υγρά απόβλητα πριν από την πρωτογενή καθίζηση.
- ❖ Δευτερογενή λύματα, τα οποία είναι λύματα μετά από επεξεργασία με ενεργοποιημένη ιλύ (λάσπη) στην δεξαμενή αερισμού.
- ❖ Συμπύκνωμα, το οποίο είναι υποπροϊόν της αφυδάτωσης της ιλύος και περιέχει υψηλές ποσότητες θρεπτικών συστατικών.

Το θρεπτικό προφίλ ποικίλει σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών τύπων αστικών λυμάτων, γεγονός που θα οδηγούσε σε μεγάλες διαφορές στην απομάκρυνση των θρεπτικών τους συστατικών με τις διαφορετικές εφαρμοζόμενες πρακτικές.

1.2.2 Γεωργικά υγρά απόβλητα

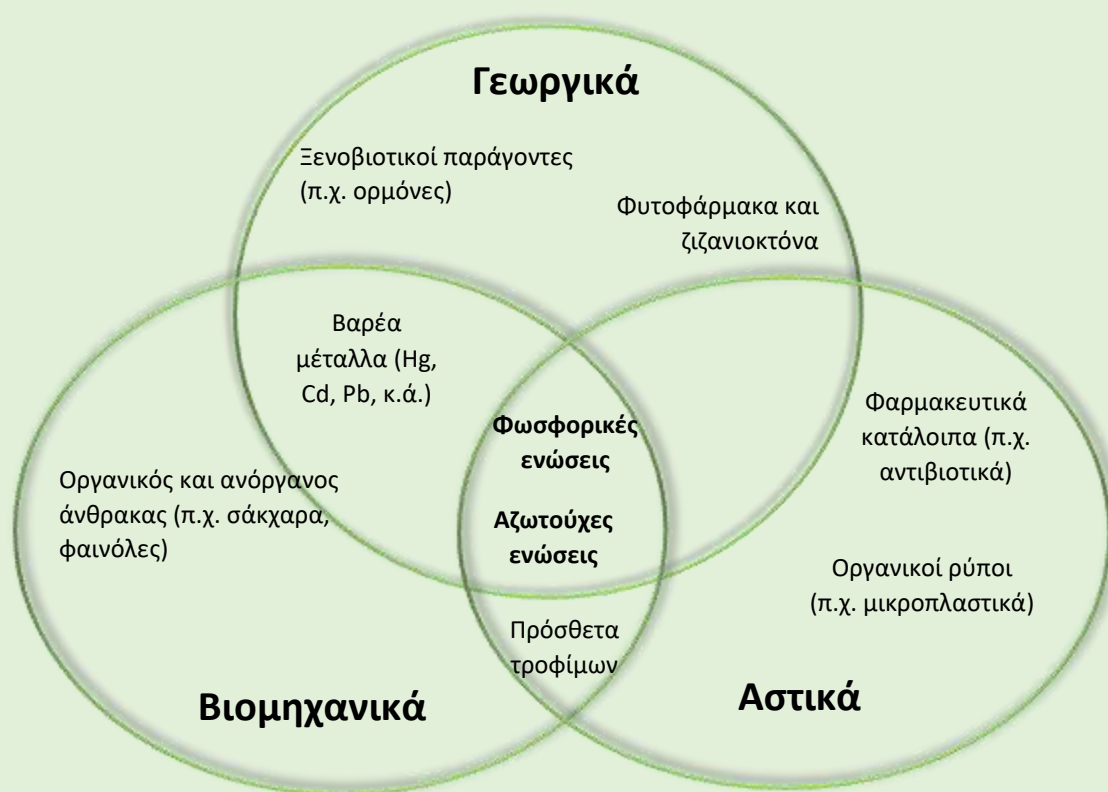
Η γεωργία είναι μία από τις σημαντικότερες παραγωγικές διαδικασίες παγκοσμίως που παράγει μια ποικιλία υγρών αποβλήτων πλούσια σε θρεπτικά συστατικά, όπως το άζωτο και ο φώσφορος. Η πλειοψηφία των συστατικών στα γεωργικά υγρά απόβλητα αποτελείται από ζωικές απεκκρίσεις (κοπριά), στελέχη φυτών, κορμούς, φύλλα, κ.ά.. Τα απόβλητα των χοίρων και των πουλερικών μπορεί να είναι περισσότερα ρυπογόνα προς το περιβάλλον λόγω της υψηλής οργανικής ύλης από άποψη του βιοχημικά απαιτούμενου οξυγόνου (BOD) σε σύγκριση με άλλα υγρά απόβλητα ζωικής προέλευσης (Li et al., 2019).

Η γενική πρακτική της επεξεργασίας γεωργικού υπολείμματος είναι η αναερόβια χώνευση (anaerobic digestion, AD). Δεδομένου ότι η διαδικασία της αναερόβιας χώνευσης σταθεροποιεί την οργανική ύλη, η πλειοψηφία του οργανικού άνθρακα μετατρέπεται σε μεθάνιο (CH₄) κατά την διάρκεια της διαδικασίας, αφήνοντας το άζωτο και τον φώσφορο στην εκροή, επομένως προκύπτει ένα υπόλειμμα αναερόβιας πέψης με υψηλή περιεκτικότητα θρεπτικών συστατικών σε αναλογίες: Ολικό άζωτο (TN) → 63 - 4165 mg/L, Ολικός φώσφορος (TP) → 14 - 1195 mg/L, Αναλογία αζώτου/ φωσφόρου (N/P) 2:8 και Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD) → 3500 - 4000 mg/L.

1.2.3 Βιομηχανικά υγρά απόβλητα

Η σύνθεση των υγρών αποβλήτων περιλαμβάνει μια σειρά θρεπτικών συστατικών όπως το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD), το βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD), αμμωνιακά ιόντα (NH₄ - N), ολικό άζωτο (TN), ολικό φώσφορο (TP) και εξαρτάται άμεσα από τον τύπο της βιομηχανίας. Τα υγρά απόβλητα από βιομηχανίες τροφίμων (food wastewater) είναι πλούσια σε συστατικά όπως άζωτο, φώσφορο, ασβέστιο (Ca), σίδηρο (Fe), αργίλιο (Al) και ολικό οργανικό άνθρακα (TOC).

Ωστόσο, τα βιομηχανικά υγρά απόβλητα μπορεί να περιέχουν χαμηλές ή υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων και άλλες τοξικές ουσίες. Επιπλέον, εκτός από τα μέταλλα και τα μεταλλοειδή, στα βιομηχανικά υγρά απόβλητα παρουσιάζονται και μεταλλικά νανοσωματίδια (NPs). Πιο συγκεκριμένα, ανασταλτικές επιδράσεις των κοινών μεταλλικών νανοσωματιδίων (TiO_2 , ZnO , CeO_2 , NiO , BaTiO_3 , Y_2O_3 , Al_2O_3 , Ag και Pt) έχουν αναφερθεί στην εφαρμογή διαφορετικών μεθόδων απομάκρυνσης θρεπτικών συστατικών από το υγρό υπόλειμμα αναερόβιας χώνευσης (Guldhe et al., 2017).



Σχήμα 1.1 Κατηγορίες υγρών αποβλήτων και βασικότεροι ρύποι τους.

(Wollmann et al., 2019)

1.3 Μέθοδοι απομάκρυνσης του αζώτου από τα υγρά απόβλητα

1.3.1 Μέθοδος νιτροποίησης – απονιτροποίησης

Η διαδικασία της νιτροποίησης – απονιτροποίησης είναι η τυπική μέθοδος για την απομάκρυνση των αζωτούχων ενώσεων από τα υγρά απόβλητα. Σ' αυτή τη διαδικασία, τα αυτοτροφικά βακτήρια μέσω της αερόβιας οξείδωσης μετατρέπουν την αμμωνία (NH_3) σε νιτρώδη ($\text{NO}_2 - \text{N}$) και στη συνέχεια σε νιτρικά άλατα ($\text{NO}_3 - \text{N}$). Τα νιτροποιητικά βακτήρια λαμβάνουν την απαιτούμενη ενέργεια από την οξείδωση των αζωτούχων ενώσεων. Στο επόμενο στάδιο, τα ετεροτροφικά βακτήρια μετατρέπουν τα νιτρικά σε νιτρώδη, υποξείδια του αζώτου, μονοξείδια του αζώτου και τέλος σε αέριο άζωτο (N_2), οδηγώντας στην απονιτροποίηση. Ωστόσο, ορισμένα ενδιάμεσα προϊόντα, όπως το υποξείδιο του αζώτου (N_2O) έχουν ανεπιθύμητα αποτελέσματα και κατατάσσονται μεταξύ των αερίων του θερμοκηπίου.

Δεδομένου ότι υπάρχει μεγάλος ανταγωνισμός μεταξύ των μικροοργανισμών για κατανάλωση των οργανικών ενώσεων, η αναλογία του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD) με το άζωτο είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την απομάκρυνση του βιολογικού αζώτου. Επιπλέον, με την αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνεται η διαδικασία της απονιτροποίησης, ενώ αντίθετα επιβραδύνεται η διαδικασία της νιτροποίησης (Moghaddam et al., 2013).

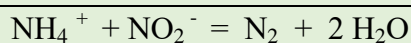
1.3.2 Μέθοδος συσσώρευσης νιτρώδους

Στην μέθοδο συσσώρευσης νιτρώδους, η διαδικασία νιτροποίησης διακόπτεται πριν από την οξείδωση των νιτρώδων σε νιτρικά και κατά την διαδικασία της απονιτροποίησης το νιτρικό άλας μειώνεται άμεσα. Κατά συνέπεια, εφόσον δε παράγεται νιτρικό άλας, η ποσότητα οξυγόνου που επρόκειτο να καταναλωθεί θα μειωθεί αυτομάτως, ενώ παράλληλα στη διαδικασία της απονιτροποίησης οι ανάγκες για οργανικές ενώσεις είναι λιγότερες (Moghaddam et al., 2013).

1.3.3 Μέθοδος αυτοτροφικής αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας (ANAMMOX)

Δεδομένου ότι η παρουσία πηγής άνθρακα είναι υποχρεωτική, η συμβατική απομάκρυνση του αζώτου με την μέθοδο της νιτροποίησης – απονιτροποίησης είναι κοστοβόρα για υγρά απόβλητα με χαμηλά επίπεδα COD. Για να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα αναπτύχθηκε η μέθοδος ANAMMOX, στην οποία το αμμώνιο οξειδώνεται άμεσα σε άζωτο από αναερόβια οξειδωτικά βακτήρια αμμωνίας.

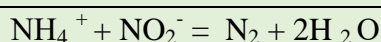
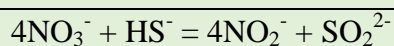
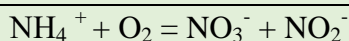
Ο συνδυασμός νιτροποίησης με την μέθοδο ANAMMOX περιορίζει την κατανάλωση οξυγόνου στον βιοαντιδραστήρα και αφαιρεί την ανάγκη για επιπλέον πηγή άνθρακα. Γενικά, αυτή η διαδικασία δε χρειάζεται πηγή άνθρακα και επιπλέον δεν παράγει ιλύ, με αποτέλεσμα να εξοικονομείται μεγάλη ποσότητα ενέργειας και οξυγόνου σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους.



(Moghaddam et al., 2013)

1.3.4 Μέθοδος της απονιτροποίησης της οξείδωσης του αμμωνίου (DEAMOX)

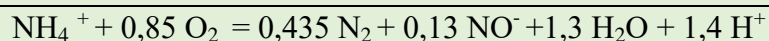
Η διαδικασία της απονιτροποίησης της οξείδωσης του αμμωνίου (DEAMOX) βασίζεται στην διαδικασία ANAMMOX. Πιο συγκεκριμένα, τα σουλφίδια SO_2^{4-} χρησιμοποιούνται για να μετατρέψουν τα νιτρώδη σε νιτρικά άλατα, τα παραγόμενα νιτρικά άλατα στην διαδικασία ANAMMOX σύμφωνα με την παρακάτω ακολουθία αντιδράσεων:



(Moghaddam et al., 2013)

1.3.5 Μέθοδος της πλήρους αυτοτροφικής απομάκρυνσης αζώτου (CANON)

Η μέθοδος CANON είναι παρόμοια μέθοδος με την ANAMMOX, ωστόσο η μέθοδος CANON μπορεί να συμβεί σε ένα στάδιο αεροβικής μεθόδου, όπως φαίνεται με την ακόλουθη αντίδραση:



(Moghaddam et al., 2013)

1.3.6 Μέθοδος της βιολογικής επεξεργασίας υγρών αποβλήτων με μικροφύκη

Οργανικά και ανόργανα κατάλοιπα από τα διάφορων ειδών υγρά απόβλητα (αστικά, βιομηχανικά και γεωργικά) επηρεάζουν δυσμενώς τον υδροφόρο ορίζοντα με άμεση επίπτωση στην υγεία του ανθρώπου. Για το λόγο αυτό, η ανάπτυξη αποδοτικών μεθόδων επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων είναι ιδιαίτερα σημαντική. Η παραγωγή βιομάζας μικροφυκών χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα υγρά απόβλητα προσφέρει τη δυνατότητα ανακύκλωσης των καταλοίπων των αποβλήτων και την αξιοποίησή τους με νέα μορφή και χρησιμότητα.

Η ρύπανση του υδροφόρου ορίζοντα με την διάθεση διαφορετικής προέλευσης υγρών αποβλήτων στο νερό, τα οποία περιέχουν επιβαρυντικές ουσίες οργανικής και ανόργανης φύσης όπως νιτρικά, αμμωνιακά και φωσφορικά ιόντα, βαρέα μέταλλα και αυξημένο φορτίο άνθρακα, επηρεάζει δυσμενώς τη τροφική αλυσίδα και επομένως άμεσα στην ανθρώπινη ζωή. Άλλες μέθοδοι επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων επικεντρώνονται στη μείωση των αιωρούμενων στερεών με μηχανικό τρόπο, κοστοβόρα απομάκρυνση των αζωτούχων ενώσεων, αλλά και τη μείωση του οργανικού τους φορτίου, όπως αυτό καθορίζεται από το βιολογικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD).

Η μέθοδος της βιοαποικοδόμησης κατά την οποία διασπώνται οργανικές και ανόργανες ενώσεις, όπως αζωτούχες και φωσφορικές ενώσεις, συνεισφέρει πολύ στην αποφυγή του φαινομένου του ευτροφισμού των υδάτινων πόρων του πλανήτη. Χάρη στη μεταβολική ικανότητα των μικροφυκών, αυτά αποτελούν μια ελπιδοφόρα βιολογική μέθοδος επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων. Προσπάθειες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων για αποδοτική μείωση της συγκέντρωσης ανόργανου αζώτου και

φωσφόρου με τη χρήση μικροφυκών έχουν μελετηθεί από το 1950 κι έπειτα. Η χρήση των μικροφυκών στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων συνδυάζεται με τεχνολογικές μεθόδους, όπως τη χρήση φωτοβιοαντιδραστήρων (Wollmann et al., 2019).

Πέρα από τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα των μικροφυκών, κάποια στελέχη έχουν την ικανότητα χημειοετεροτροφικού και μικτού τρόπου μεταβολισμού, όπως βρέθηκε στο στέλεχος *Chlorella vulgaris*.

Οι συνηθέστερες εγκαταστάσεις επεξεργασίας αστικών και γεωργικών υγρών αποβλήτων με τη βοήθεια μικροφυκών διεξάγονται σε εξωτερικό χώρο, σε συνηθισμένες τιμές pH και θερμοκρασίας. Ωστόσο, οι συνθήκες αυτές μπορούν να μεταβληθούν, ιδιαίτερα σε βιομηχανικά υγρά απόβλητα στα οποία η θερμοκρασία μπορεί να υπερβεί τους 40° C ή να είναι χαμηλότερη των 15° C και η οξύτητα να είναι εντός μεγάλου εύρους (τιμές pH από 2,0 έως 9,0). Στις συνθήκες αυτές, αποδοτικότερη είναι η δράση ανθεκτικών στελεχών μικροφυκών, όπως θερμοφιλα, ψυχρόφιλα ή οξεόφιλα.

Το στέλεχος *Chlorella sorokiniana*, ένα θερμοφιλο στέλεχος, παρουσιάζει αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης μέσω φωτοσύνθεσης σε θερμοκρασίες έως και 43° C. Παράλληλα, επιδεικνύει ιδιαίτερη ικανότητα μείωσης της συγκέντρωσης των αζωτούχων και φωσφορικών ενώσεων. Τα κύτταρα της *Chlorella sorokiniana*, επιπλέον, μπορούν να συσσωρεύσουν μεγάλες ποσότητες πολύτιμων βιοπροϊόντων, όπως πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα και λουτεΐνη, κάνοντας έτσι τη παραγόμενη βιομάζα πολύ καλή πηγή για παραγωγή ζωοτροφών ή βιοκαυσίμων (Wollmann et al., 2019).

Τα απόβλητα από αγροτικές και κτηνοτροφικές δραστηριότητες λόγω του υψηλού οργανικού τους φορτίου υφίστανται αρχικά ένα στάδιο επεξεργασίας με αναερόβια χώνευση. Κατά το στάδιο αυτό παράγεται βιοαέριο, ενώ προκύπτει ένα υπόλειμμα στο οποίο μεταφέρονται όλες οι ενώσεις που δε διασπώνται κατά την αναερόβια χώνευση.

Η άμεση επεξεργασία, ιδίως αγροτικών αποβλήτων, με μικροφύκη αποτελεί μια πρακτική που μπορεί να εφαρμοστεί σε περιπτώσεις όπου δεν υπάρχει υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό φορτίο. Προκλήσεις που σχετίζονται με την καλλιέργεια των μικροφυκών στα γεωργικά υγρά απόβλητα αφορούν:

- 1) Σημαντικά υψηλές ή χαμηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών συστατικών που θα μπορούσαν να αναστείλουν την ανάπτυξη των μικροφυκών, π.χ. οι συγκεντρώσεις του ολικού αζώτου και του ολικού φωσφόρου.
- 2) Μη διαθέσιμος άνθρακας για την αφομοίωσή του από τα μικροφύκη, καθώς ένα μεγάλο ποσοστό του άνθρακα είναι δεσμευμένο σε αδιάλυτες οργανικές ενώσεις.
- 3) Η υψηλή θολερότητα των υγρών αποβλήτων που εμποδίζει την διείσδυση του φωτός κατά την διάρκεια της φωτοτροφικής καλλιέργειας των μικροφυκών.
- 4) Η οποιαδήποτε αύξηση της χρήσης φυτοφαρμάκων, εντομοκτόνων, αντιβιοτικών και άλλων τοξικών ενώσεων στη αγροτική διαδικασία, η οποία αναμένεται να επηρεάσει την ανάπτυξη των μικροφυκών (Guldhe et al., 2017).

1.4 Χημική σύσταση των αποβλήτων και επίπτωση στην τελική επεξεργασία

1.4.1 Αναλογίες C/N και C/P

Οι αναλογίες άνθρακα προς άζωτο και άζωτο προς φώσφορο ποικίλλουν ανάλογα με τον τύπο των υγρών αποβλήτων, ωστόσο οι συγκεντρώσεις των θρεπτικών αυτών συστατικών στα γεωργικά απόβλητα υπερβαίνουν τις ενδεδειγμένες τυπικές αναλογίες για την αποτελεσματική ανάπτυξη των μικροφυκών.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα μικροφύκη λαμβάνουν διοξείδιο του άνθρακα μέσω του αερισμού του υποστρώματος στο οποίο αναπτύσσονται κι αυτό όταν η αναλογία C/N είναι ανεπαρκής για την ανάπτυξή τους. Επιπλέον, η ισορροπία της αναλογίας άνθρακα προς άζωτο είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος για τη προώθηση της απορρόφησης του αζώτου από τα μικροφύκη.

Αναμειγνύοντας υγρά απόβλητα χοιροτροφίας με αντίστοιχα ζυθοποιίας για την επίτευξη μιας ισορροπημένης αναλογίας άνθρακα προς φώσφορο (C/P) 7,9 ως βέλτιστη συνθήκη, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα μικροφύκη επιτυγχάνουν παραγωγικότητα της τάξης των 2,85 g/L με ποσοστά απομάκρυνσης 100%, 96%, 90% και 93% για NH₄ - N, ολικό άζωτο, ολικό φώσφορο και COD αντίστοιχα (Guldhe et al., 2017).

Διερευνώντας την διακύμανση της αναλογίας C/N (από 5 έως 20) στα υγρά απόβλητα όσον αφορά την αποδοτικότητα στην επεξεργασία τους και τη παραγωγικότητα της βιομάζας, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι χαμηλές αναλογίες 5 και 10 είναι προτιμητέες για την απομάκρυνση του COD, ενώ η αναλογία 20 θα προκαλούσε αναστολή της ανάπτυξης των μικροφυκών και της αποδοτικότητας στην απομάκρυνση των θρεπτικών συστατικών από τα υγρά απόβλητα (Li et al., 2019).

1.4.2 Αναλογία N/P

Η αναλογία αζώτου με φώσφορο ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο και τη προέλευση των υγρών αποβλήτων, καθώς τα μικροφύκη μπορούν να ρυθμίσουν/ αυξομειώσουν την αναλογία N/P στη παραγόμενη βιομάζα τους με βάση τη συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικά των υγρών αποβλήτων.

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η παραγωγικότητα της βιομάζας μειώνεται όταν η αναλογία N/P αυξάνεται. Η αναλογία N/P στη παραγόμενη βιομάζα των μικροφυκών κυμαίνεται από 4/1 έως 40/1 και το εύρος μεταξύ 6,8 - 10 αποδεικνύεται ως βέλτιστη τιμή για την ανάπτυξη μικροφυκών του γλυκού νερού για ικανοποιητική απομάκρυνση των θρεπτικών συστατικών των υγρών αποβλήτων. Θεωρείται ότι αν η αναλογία N/P είναι υψηλότερη από τη βέλτιστη τιμή τότε μπορεί να προκληθεί εξάντληση του φωσφόρου, ενώ αν η αναλογία είναι χαμηλότερη τότε προκύπτει εξάντληση του αζώτου. Επιπλέον, τόσο το άζωτο όσο και ο φώσφορος μπορούν να αποτελέσουν περιοριστικούς παράγοντες για την ανάπτυξη των μικροφυκών και η υπερφόρτωση της συγκέντρωσης των δύο αυτών στοιχείων θα μπορούσε να επηρεάσει σημαντικά τη δομή και την λειτουργία των μικροοργανισμών.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η χαμηλή περιεκτικότητα σε άζωτο στα υγρά απόβλητα περιορίζει την ικανότητα πρόσληψης φωσφόρου από τα μικροφύκη, ενώ παράλληλα αυξάνει την αναλογία υδατανθράκων και λιπιδίων στη παραγόμενη βιομάζα. Με την διοχέτευση επαρκούς αζώτου στα μικροφύκη, επομένως, μπορεί να ενισχυθεί η αποτελεσματική απορρόφηση του φωσφόρου απ' αυτά (Li et al., 2019).

Στον **Πίνακα 1.1** βρίσκονται συγκεντρωμένα στοιχεία του εύρους συγκέντρωσης των ανόργανων και οργανικών συστατικών σε διαφορετικούς τύπους υγρών αποβλήτων.

Κατηγορίες υγρών αποβλήτων	Τύποι υγρών αποβλήτων	NH ₄ - N (mg/L)	COD (mg/L)	TN (mg/L)	PO ₄ - P (mg/L)	Αναλογία C/N	Αναλογία N/P
----------------------------	-----------------------	----------------------------	------------	-----------	----------------------------	--------------	--------------

Πίνακας 1.1. Επίπεδα ανόργανων και οργανικών θρεπτικών συστατικών σε διάφορους τύπους υγρών αποβλήτων.

(Li et al., 2019)

<u>Αστικά</u>	Πρωτογενή (ακατέργαστα) υγρά απόβλητα	33,4	231,0	40,65	-	2,13	5,9
	Δευτερογενή υγρά απόβλητα (ενεργοποιημένη ιλύς)	0,33	42,2	19,1 - 49,4	-	0,83	17,0 – 53,2
	Συμπύκνωμα (φυγοκεντρημένη ιλύς)	71,8 – 85,9	2.250 - 2.390	116,1 - 132,3	-	6,42 – 7,45	0,36 – 0,62
<u>Γεωργικά</u>	Κοπριά γαλακτοπαραγωγών ζώων	1.782	38.230	3.305	-	4,33	12,42
	Χωνεμένη κοπριά γαλακτοπαραγωγών ζώων	2.232	23.760	3.456	-	2,58	13,84
	Χωνεμένη κοπριά χοίρων	1.209 – 1.481	2.746 - 4.157	1.405 – 1.519	164 - 620	0,85 – 1,16	2,21 – 7,43
<u>Βιομηχανικά</u>	Υγρά απόβλητα σφαγείων	2,2 – 193	734 – 3.560	64,8 – 327,6	-	3,24 – 8,36	1,41 – 20,98
	Υγρά απόβλητα επεξεργασίας σόγιας	52,1 -169,8	8.087 – 13.215	189,9 - 267,1	-	15,97 – 18,55	4,16 – 4,74
	Υγρά απόβλητα επεξεργασίας αμύλου	2,24	5.130	-	18,3	875	0,12
	Χωνεμένα υγρά απόβλητα αμύλου	2,87	1.340	-	21	171,4	0,14
	Υγρά απόβλητα επεξεργασίας μελάσας/ ζάχαρης	-	514.000	458	-	420,85	6,84
	Υγρά απόβλητα ζυθοποιίας	2 - 367	547 – 6.730	9 - 480	-	0,78 – 70,10	1,44 – 10,67
<u>Άλλα υγρά απόβλητα</u>	Υγρά απόβλητα υδροθερμικής υγροποίησης (HTL - AP)	4.748 - 6.295	9.060 – 15.123	5.636 – 8.136	-	1,72 – 2,33	1,93 – 18,77

1.5 Τα μικροφύκη

1.5.1 Ιστορική αναδρομή

Υπάρχουν πολλές ιστορικές αναφορές χρήσης φυκών στην ανθρώπινη διατροφή, οι παλαιότερες των οποίων τοποθετούν τη κατανάλωση των φυκών περί το 2700 π.Χ. στην Κίνα. Στην Αφρική, για αιώνες, τοπικοί πληθυσμοί στη λίμνη Chad

συνέλεξαν και χρησιμοποιούσαν σαν καθημερινή τροφή το κυανοβακτήριο σπιρουλίνα (*Arthrospira*), γνωστό στην τοπική διάλεκτο ως «dihé».

Το ουσιαστικό πέρασμα στη συστηματική καλλιέργεια των φυκών έγινε μετά την ανακάλυψη χρήσιμων ουσιών στη βιομάζα συγκεκριμένων ειδών, κυρίως μικροφυκών. Η διεύρυνση των γνώσεων για τις φυσικοχημικές και βιοδραστικές ιδιότητες αρχικά του ιωδίου και στη συνέχεια των φυκοκολλοειδών (άγαρ, αγαρόζη, αλγινικά άλατα) που παράγονται από μια ομάδα μικροφυκών, σε συνδυασμό με τις εφαρμογές των ουσιών αυτών στον δευτερογενή τομέα (μεταποίηση), συνέβαλε στην κατακόρυφη αύξηση του εμπορικού ενδιαφέροντος γι' αυτές τις ουσίες, γεγονός που είχε ως άμεσο αποτέλεσμα τη βελτίωση των μεθόδων καλλιέργειας και την ανάπτυξη νέων τεχνικών. Η εξέλιξη αυτή εκδηλώθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1940 και συνεχίζεται αυξανόμενη έως σήμερα. Καθοριστικό ρόλο στην πυροδότηση των καλλιεργειών, κυρίως των θαλάσσιων μικροφυκών από όπου και ξεκίνησαν, έπαιξε μια ανακάλυψη της Βρετανίδας φυκολόγου Kathleen Drew Baker σχετικά με τον κύκλο ζωής ενός πολύ δημοφιλούς φύκου στην Ιαπωνία, του πογί (ροδοφύκος του γένους *Porphyra*).

Η πρακτική εφαρμογή των αποτελεσμάτων αυτής της ανακάλυψης, σε συνδυασμό και με την προσθήκη ολοένα και περισσότερων ειδών στον κατάλογο των εμπορικά καλλιεργούμενων φυκών, συνέβαλλε στον διπλασιασμό της ετήσιας θαλάσσιας φυτικής παραγωγής στην Άπω Ανατολή, ενώ έβαλε αρκετές χώρες του Δυτικού κόσμου στον πειρασμό να δοκιμάσουν την τύχη τους στις καλλιέργειες μικροφυκών. Παράλληλα, την ίδια περίπου περίοδο με το πρώτο συμπόσιο «μαζικής καλλιέργειας φυκών» ξεκίνησε και η περίοδος άνθισης της καλλιέργειας των μικροφυκών. Από τότε έχουν εισαχθεί πολλές νέες τεχνικές καλλιέργειας και εκμετάλλευσης των φυκών.

Η βιομάζα των φυκών που χρησιμοποιείται στις εμπορικές εφαρμογές είτε συλλέγεται από το περιβάλλον είτε ανακτάται μέσω ελεγχόμενης διαδικασίας καλλιέργειας σε ανοικτές δεξαμενές ή ειδικούς βιοαντιδραστήρες (Γκέλης, 2015).

Μεταγενέστερες μελέτες συνεχίστηκαν μέχρι τη δεκαετία του 1980, ενώ παρουσιάστηκε αυξητική πρόοδος τα τελευταία δεκαπέντε χρόνια. Οι εξελίξεις κατά τα τελευταία δεκαπέντε χρόνια έρευνας επιτρέπουν στο εμπορικό δυναμικό των

μικροφυκών να μεταβούν από το χώρο των υδατοκαλλιεργειών στις χημικές αντιδράσεις ενός εργαστηρίου (Li et al., 2008).

1.5.2 Οι ιδιότητες των μικροφυκών

Τα φύκη είναι αναγνωρισμένα ως μία από τις αρχαιότερες μορφές ζωής. Ο όρος «algae» προέρχεται από την λατινική λέξη που σημαίνει «θαλάσσιο γρασίδι», ενώ η ελληνική λέξη για τα άλγη είναι «φύκος» και η μελέτη τους ονομάζεται φυκολογία (Τσόλχα, 2017).

Τα φύκη διακρίνονται σε δύο μεγάλες ομάδες σύμφωνα με το μέγεθός τους: **(α)** στα μικροφύκη, που δεν είναι ορατά δια γυμνού οφθαλμού και έχουν μέγεθος από 0,2 μm (πικοπλαγκτόν) έως πάνω από 200 μm που απαντούν σε ορισμένες αποικιακές μορφές κυανοβακτηρίων και **(β)** στα μακροφύκη, των οποίων το μέγεθος (κυρίως το μήκος) κυμαίνεται από λίγα χιλιοστά έως μερικές δεκάδες μέτρα, όπως οι γιγάντιες κέλπιες που φτάνουν τα 60 m.

Το βασικό ενδιαίτημα των φυκών είναι τα υδάτινα οικοσυστήματα κάθε είδους, λίμνες, ποτάμια, παράκτιες περιοχές και ωκεανοί, στα οποία ζουν είτε ως επιπλέοντες ή κολυμβητικοί οργανισμοί που αποτελούν το φυτοπλαγκτόν ή ως βενθικοί οργανισμοί προσκολλημένοι στον θαλάσσιο πυθμένα, σε βράχους ή σε άλλα υποστρώματα αβαθών υδάτων, συναποτελώντας το περίφυτο.

Η μορφολογία των φυκών είναι επίσης ποικίλη, από τα μικροσκοπικά μονήρη κύτταρα μέχρι τα γιγάντια θαλάσσια μακροφύκη. Πολλά μονοκύτταρα είδη εμφανίζονται ως κοκκοειδή φύκη που έχουν τη μορφή μικρών σφαιρών (Γκέλης, 2015).

Οι βασικότερες ομάδες μικροφυκών (φύλα ή διαιρέσεις) είναι τα Χλωροφύκη (*Chlorophyta*), τα Πρασινοφύκη (*Prasinophytes*) και τα Ετεροκοντόφυτα (*Heterokontophyta*). Επίσημα έχουν καταγραφεί πάνω από 120.000 είδη (>100.000 διάτομα), αλλά ο πραγματικός αριθμός τους είναι μάλλον κατά πολύ μεγαλύτερος (Μάρκου κ.ά., 2013).

Η *Chlorella spp.* είναι ένας πράσινος μονοκύτταρος οργανισμός που παράγει μεγάλη ποσότητα βιομάζας πλούσια σε άμυλο και λιπίδια και σε ελάχιστες συνθήκες

διαβίωσης απαιτεί προσθήκη αζώτου, φωσφόρου και άλλων δευτερευόντων θρεπτικών συστατικών, με παρουσία φωτός και παροχή διοξειδίου του άνθρακα.

Όσον αφορά τη κυριαρχία ενός συγκεκριμένου είδους μικροφυκών σε μια κοινοπραξία με άλλους μικροοργανισμούς, επιτυγχάνεται χάρη στο γεγονός ότι τα μικροφύκη προσδιορίζονται από μία υψηλότερη ανοχή προς την συγκέντρωση της σχέσης αζώτου/ αμμωνίας σε σύγκριση με άλλα είδη μικροοργανισμών στο περιβάλλον των υγρών αποβλήτων. Συγκεκριμένα, το στέλεχος *Chlorella sorokiniana* παρουσιάζει την υψηλότερη ανοχή και μπορεί να κυριαρχήσει σε έναν συνεχούς λειτουργίας φωτοβιοαντιδραστήρα μικροφυκών (Olguin, 2012).

Η πρόσληψη θρεπτικών συστατικών με βάση τα γεωργικά και βιομηχανικά απόβλητα έχει αξιολογηθεί για την παραγωγή βιομάζας, λιπιδίων, υδατανθράκων και πρωτεϊνών σε είδη *Chlorella spp.* Οι πηγές αζώτου και άνθρακα, καθώς και η διαθεσιμότητά τους, επηρεάζουν την ανάπτυξη μικροφυκών και την σύνθεση βιομάζας, πρωτεϊνών, λιπιδίων και υδατανθράκων.

1.5.3 Χαρακτηριστικά ανατομίας και φυσιολογίας των μικροφυκών

Τα κύτταρα των μικροφυκών είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί και περιέχουν τρεις τύπους οργανιδίων: **α)** πυρήνα, **β)** χλωροπλάστες και **γ)** μιτοχόνδρια.

Στον πυρήνα των κυττάρων βρίσκεται το γενετικό υλικό DNA. Οι χλωροπλάστες είναι οργανίδια όπου λαμβάνει χώρα η διαδικασία της φωτοσύνθεσης, κατά την οποία το κύτταρο συλλέγει την ενέργεια του φωτός για να μετατρέψει το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό σε σάκχαρο.

Κάθε χλωροπλάστης περιέχει πεπλατυσμένους μεμβρανικούς σάκους που ονομάζονται θυλακοειδείς σάκοι και περιέχουν φωτοσυνθετικές χρωστικές ουσίες όπως η χλωροφύλλη, τα καροτενοειδή και τις φυκοβιλιπρωτεΐνες. Στα μιτοχόνδρια γίνεται η διαδικασία της κυτταρικής αναπνοής για την παραγωγή ενέργειας.

Η φωτοσύνθεση είναι μια διαδικασία όπου η ενέργεια του φωτός μετατρέπεται σε χημική ενέργεια και το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό μετατρέπονται σε οργανικά μόρια. Οι παραπάνω διεργασίες γίνονται σχεδόν σε όλα

τα φύκη, ενώ το φαινόμενο της φωτοσύνθεσης παρατηρήθηκε αρχικά από τη μελέτη του πράσινου μικροφύκου *Chlorella spp.*

Τα χερσαία φυτά δεν είναι πολύ αποτελεσματικά στην σύλληψη της ηλιακής ενέργειας. Εκτιμήθηκε ότι η ταχύτερα αναπτυσσόμενη επίγεια καλλιέργεια μπορεί να μετατρέψει την ηλιακή ενέργεια σε ενέργεια βιομάζας με ετήσιο ρυθμό $\leq 1 \text{ w/m}^2$. Από την άλλη πλευρά, από μελέτες σχετικά με την αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας των μικροφυκών, έχει παρατηρηθεί ότι η φωτοσυνθετική αποδοτικότητά τους θα μπορούσε να είναι της τάξεως του 10 έως 20% ή και υψηλότερη (Li et al., 2008).

Τα φαινόμενα της κυτταρικής αναπνοής και της φωτοσύνθεσης είναι δύο σημαντικές διεργασίες στην ανάπτυξη των μικροφυκών, οι οποίες συμβαίνουν παράλληλα με την διοχέτευση του φωτός.

Στα κύτταρα των μικροφυκών που δέχονται ακτίνες φωτός και με παρουσία οξυγόνου λαμβάνουν χώρα τρεις διεργασίες παράλληλα:

- ★ Η πρώτη διεργασία είναι το φαινόμενο της φωτοσύνθεσης, στην οποία απελευθερώνεται οξυγόνο (O_2), ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) και NADPH, παράγοντας που είναι σε θέση να μετατρέψει το διοξείδιο του άνθρακα σε GAP (3 – φωσφορική γλυκεραλδεΐδη). Τα μόρια GAP μπορούν να μετατραπούν σε δομικά στοιχεία της βιομάζας των μικροφυκών.
- ★ Η δεύτερη διεργασία είναι η κυτταρική αναπνοή. Αυτή η διαδικασία λαμβάνει χώρα κυρίως στα μιτοχόνδρια, όπου τα μόρια NADH οξειδώνονται για να παράγουν ενέργεια με τη μορφή των μορίων ATP για τον σχηματισμό της βιομάζας και τη διατήρησή της. Στην κυτταρική αναπνοή το οξυγόνο καταναλώνεται.
- ★ Η τρίτη διεργασία ονομάζεται φωτοαναπνοή. Η δραστηριότητα της οξυγονάσης του Rubisco μπορεί να μετατρέψει το οξυγόνο (αντί για το διοξείδιο του άνθρακα) σε γλυκολικό. Με την σειρά του το γλυκολικό μετατρέπεται σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη που μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί στη βιοσύνθεση. Αυτή η διεργασία μετατροπής απαιτεί ενέργεια με τη μορφή μορίων ATP και NADPH.

Η διαδικασία της φωτοαναπνοής λαμβάνει χώρα σε υψηλές εξωκυτταρικές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή σε χαμηλές συγκεντρώσεις διοξειδίου του άνθρακα και μπορεί να παραμεληθεί όταν δεν υπάρχουν οι παραπάνω συνθήκες κατάλληλων συγκεντρώσεων (Kliphuis et al., 2010).

Η φωτοαυτοτροφική ανάπτυξη των μικροφυκών καθοδηγείται από τη παροχή φωτός. Αυτή η πηγή ενέργειας χρησιμοποιείται για την μετατροπή του ανόργανου άνθρακα σε οργανικό άνθρακα.

Η φωτοσυνθετική δραστηριότητα είναι ανάλογη με την ακτινοβολία του φωτός, ωστόσο μπορεί να παρουσιαστεί βλάβη στο φωτοσυνθετικό σύστημα των υποδοχέων, με αποτέλεσμα την αναστολή της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης και κατ' επέκταση την αναστολή ανάπτυξης των μικροφυκών (Goncalves et al., 2017).

Η ταξινόμηση του γένους *Chlorella spp.* είναι η εξής:

Τμήμα → *Chlorophyta*/ πράσινα άλγη

Τάξη → *Chlorophyceae*

Γένος → *Chlorella spp.*

1.5.4 Χρήσεις των μικροφυκών και ανασταλτικοί παράγοντες

Τα μικροφύκη θεωρούνται χρήσιμοι παράγοντες βιοαποκατάστασης στα υγρά απόβλητα αναερόβιας χώνευσης λόγω: **α)** του γρήγορου ρυθμού ανάπτυξής τους, **β)** της ισχυρής ικανότητας προσαρμοστικότητάς τους και **γ)** της ικανότητας χρήσης ανόργανων θρεπτικών συστατικών από τα υγρά απόβλητα. Τα μικροφύκη έχουν χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό αστικών και βιομηχανικών υγρών αποβλήτων.

Ομοίως, τα μικροφύκη μπορούν να μειώσουν τους ρύπους όπως το άζωτο και τον φώσφορο, αφομοιώνοντας τα θρεπτικά αυτά συστατικά από τα υγρά απόβλητα αναερόβιας χώνευσης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους (Cheng et al., 2015).

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τέσσερα γένη μικροφυκών, αναμεσά τους και η *Chlorella spp.*, παρουσίασαν υψηλή παραγωγή βιομάζας όταν καλλιεργούνται σε υγρά απόβλητα ορνιθοτροφείων, τα οποία έχουν υποστεί αναερόβια χώνευση (Kobayashi et al., 2013).

Τα μικροφύκη καλλιεργούνται για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων για γενική βιομηχανική χρήση. Τα σημαντικότερα προϊόντα είναι διάφορες χρωστικές ουσίες, όπως η χλωροφύλλη, φυκοκυανίνη, καροτενοειδή (π.χ. ασταξανθίνη, β-καροτένιο) κ.λπ.. Επίσης, μια σημαντική εφαρμογή των φυκών είναι η παραγωγή λιπασμάτων και εδαφοβελτιωτικών προϊόντων, ζωοτροφών και βιοκαυσίμων (Μάρκου κ.ά., 2013).

Τα υγρά απόβλητα περιέχουν πλήθος θρεπτικών συστατικών όπου το σημαντικότερο είναι το άζωτο, το οποίο βρίσκεται είτε με τη μορφή αμμωνίας είτε με τη μορφή ουρίας ή οργανικού αζώτου, ενώ ο φώσφορος εντοπίζεται είτε ως φωσφορικό άλας είτε ως οργανικός φώσφορος. Οι τυπικές συγκεντρώσεις αμμωνιακού αζώτου κυμαίνονται σε εύρος 20 - 40 mg/L, ενώ του φωσφόρου σε εύρος 1 - 10 mg/L, ώστε να υπάρχουν επαρκείς συγκεντρώσεις θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Ωστόσο, η αναλογία αζώτου - φωσφόρου (N/P) διαφέρει ανάλογα με τον τύπο των υγρών αποβλήτων. Παράλληλα, η εξωτερική πηγή διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) πρέπει να είναι χαμηλού κόστους και η χρήση κατεργασμένων υγρών αποβλήτων πιθανόν να απαιτήσει τη προσθήκη ποσότητας θρεπτικών συστατικών για την εύρυθμη ανάπτυξη των μικροφυκών.

Ως κύρια πηγή οργανικών ενώσεων για τα μικροφύκη είναι το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) και τα δύο πιο σημαντικά ανόργανα θρεπτικά συστατικά είναι το άζωτο (N) και ο φώσφορος (P).

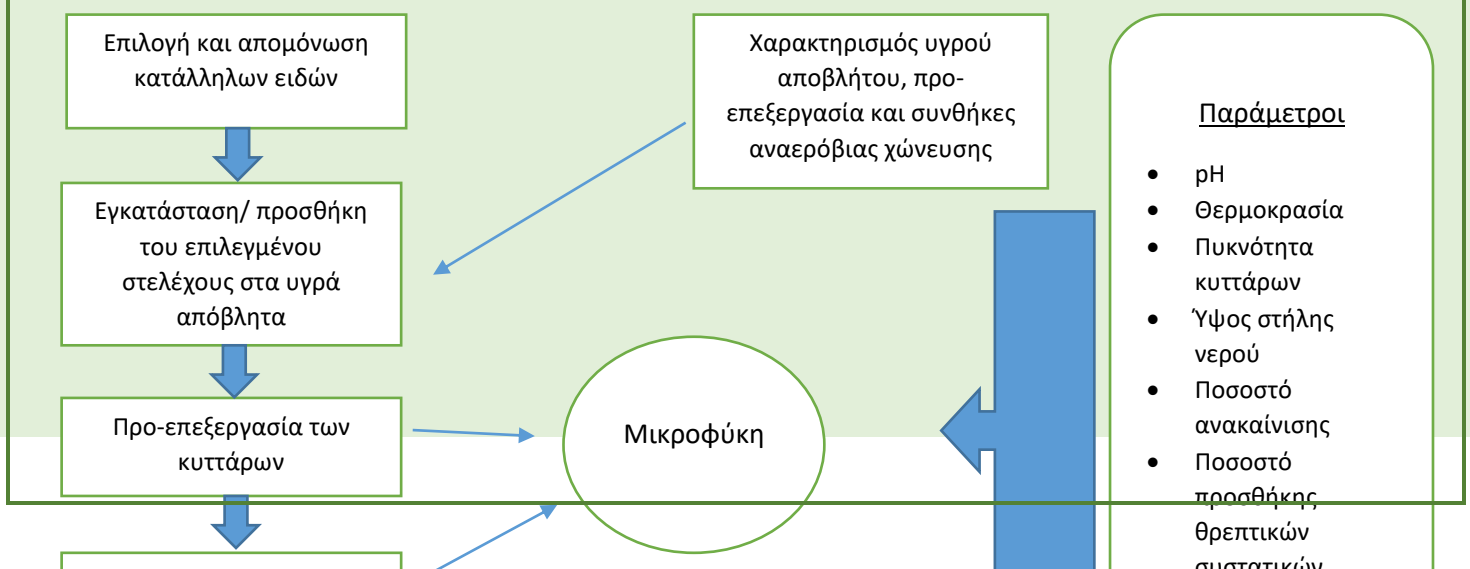
Ένα από τα πιο σημαντικά πλεονεκτήματα της χρήσης υγρών αποβλήτων αναερόβιας χώνευσης στην ανάπτυξη των μικροφυκών είναι το γεγονός ότι περιέχουν διαλυμένο CO₂ με την μορφή οξικού ανθρακικού άλατος. Στην πραγματικότητα, διάφοροι κινητικοί παράγοντες των καλλιεργημένων ειδών μικροφυκών δείχνουν ότι η χρήση εκροών/ υπολειμμάτων αναερόβιας χώνευσης παρείχε επαρκές άζωτο και

φώσφορο, καθώς και άλλα θρεπτικά συστατικά. Επιπλέον, τα αναερόβια χώνευσης υγρά απόβλητα θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως πηγές οργανικών ενώσεων για την ετεροτροφική ανάπτυξη των μικροφυκών (Olguin, 2012).

Τα γεωργικά υγρά απόβλητα είναι πλούσια σε οργανικές ύλες, άζωτο και φώσφορο, καθώς τα αγροτικά ζώα απεκκρίνουν ένα μεγάλο ποσοστό του βάρους τους. Πιο συγκεκριμένα, η κοπριά των χοίρων και των πουλερικών έχει σε πολύ μεγάλο ποσοστό βιολογικά δεσμευμένο οξυγόνο (BOD), καθώς και άζωτο και φώσφορο σε σύγκριση με άλλες κοπριές άλλων ζώων (Olguin, 2012).

Ένας πιθανός κίνδυνος που σχετίζεται με την χρήση υγρών αποβλήτων για την καλλιέργεια των μικροφυκών είναι η μόλυνση του αποβλήτου. Αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί χρησιμοποιώντας κατάλληλες τεχνολογίες προ-επεξεργασίας για την αφαίρεση ιζημάτων και την αδρανοποίηση (μέσω της αποστείρωσης) των περιεχόμενων στα υγρά απόβλητα ανεπιθύμητων μικροοργανισμών (Li et al., 2008). Τα στάδια της προ-επεξεργασίας των μικροφυκών και των υγρών αποβλήτων φαίνονται στο *Σχήμα 1.2*.

Τα αστικά λύματα περιέχουν αρκετές ενώσεις που είναι δυνητικά τοξικές για τα μικροφύκη, όπως βαρέα μέταλλα και ανθεκτικές - ανταγωνιστικές ουσίες, ειδικά όταν αυτά αναμιγνύονται με βιομηχανικά υγρά απόβλητα. Τα βαρέα μέταλλα είναι ισχυροί αναστολείς της φωτοσύνθεσης των μικροφυκών επειδή μπορούν να αντικαταστήσουν ή να μπλοκάρουν τα προσθετικά μεταλλικά άτομα στην ενεργή θέση σημαντικών ενζύμων (Olguin, 2012).



Σχήμα 1.2. Προ-επεξεργασία κυττάρων μικροφυκών και υγρών αποβλήτων αναερόβιας χώνευσης.

1.5.5 Η επιλογή στελεχών *Chlorella spp.*

Τα είδη των μικροφυκών που εφαρμόζονται για την επεξεργασία υγρών αποβλήτων αναερόβιας χώνευσης πρέπει να χαρακτηρίζονται από υψηλή ανθεκτικότητα σε μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες και σε υψηλές συγκεντρώσεις επιμολυντών με διάφορα χαρακτηριστικά.

Τα μικροφύκη του γένους *Chlorella* επιλέχθηκαν λόγω του ανθεκτικού χαρακτήρα τους σε επιβλαβείς ουσίες που υπάρχουν στο περιβάλλον. Παράλληλα, είναι ανθεκτικά στην δράση των βαρέων μετάλλων (Khalid et al., 2018).

1.5.6 Τα στελέχη *Chlorella sorokiniana* και *Chlorella vulgaris*

Τα μικροφύκη *Chlorella sorokiniana* και *Chlorella vulgaris* είναι ευπροσάρμοστα στελέχη μικροφυκών που μπορούν να αναπτυχθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις αζωτούχων ενώσεων καθώς και βαρέων μετάλλων (Cd, Mn, Cr και Zn). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι το παχύ και ισχυρό κυτταρικό τοίχωμα των μικροφυκών μπορεί να εμποδίζει την πέψη τους από άλλους μικροοργανισμούς κατά την διαδικασία της υδρόλυσης (Khalid et al., 2018).

1.5.7 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών

Με την αραιώση των υγρών αποβλήτων αναερόβιας χώνευσης υπάρχει η αύξηση της διάχυσης του φωτός στο δείγμα με τη καλλιέργεια μικροφυκών, αλλά προκύπτει το μειονέκτημα της μείωσης της διαθεσιμότητας των θρεπτικών συστατικών και συνεπώς μειώνεται ο ρυθμός πρόσληψης των συστατικών αυτών και επακόλουθα ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροφυκών. Απαιτείται η συγκέντρωση τουλάχιστον 3% διοξειδίου του άνθρακα για την αποφυγή αύξησης της τιμής του pH άνω του 8 (Åkerstrom et al., 2014).

✚ Φωτισμός

Όσον αφορά τον παράγοντα του φωτός, η διάρκεια, η ένταση και η ποιότητα του φωτός που φτάνει σε ένα κύτταρο μικροφύκους είναι καθοριστικοί παράγοντες για την ανάπτυξή του. Το φάσμα του φωτός που αξιοποιείται από τα μικροφύκη είναι μεταξύ 400 και 700 nm (φωτοσυνθετικά ενεργή ακτινοβολία - PAR).

Τα διάφορα είδη μικροφυκών περιέχουν σε διαφορετικές αναλογίες τις διάφορες φωτοσυνθετικές χρωστικές ουσίες και ως εκ τούτου αξιοποιούν λιγότερο ή περισσότερο διαφορετικά μήκη κύματος.

Γενικά, ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροφυκών αυξάνεται με την αύξηση της έντασης της ακτινοβολίας μέχρι ένα όριο. Η πηγή φωτός μπορεί να είναι είτε φυσική (ήλιος) είτε τεχνητή (λαμπτήρες), ανάλογα με τον τύπο της καλλιέργειας (Γκέλης, 2015).

✚ Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας για την ανάπτυξη των μικροφυκών μετά το φως και συνήθως έχει συνεργιστική δράση μ' αυτό. Τα περισσότερα μικροφύκη αναπτύσσονται στη περιοχή 20 - 30° C, αλλά υπάρχουν και θερμοφιλά είδη που μπορούν να αναπτυχθούν και σε θερμοκρασίες ως 50° C ή ψυχρόφιλα είδη, όπως είναι ορισμένα φαιοφύκη.

Πολλά μικροφύκη μπορούν να αντέξουν θερμοκρασίες μέχρι και 15° C χαμηλότερες από τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους, αλλά υπάρχει

πιθανότητα με μια μεταβολή της τάξης των 2 - 4° C πάνω από το βέλτιστο σημείο να υπάρξει πλήρης αναστολή της ανάπτυξής τους.

Οι χαμηλές θερμοκρασίες συχνά μειώνουν την αύξηση των μικροφυκών, καθώς επιβραδύνουν κυτταρικές διεργασίες, επάγουν περιορισμό της πρόσληψης του αζώτου ή επηρεάζουν τις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης και τη φωτοσυνθετική συσκευή.

Αντίθετα, στους φωτοβιοαντιδραστήρες ανοικτού τύπου υπάρχει κίνδυνος υπερθέρμανσης ειδικά κατά τους θερινούς μήνες και χώρες όπως η Ελλάδα, όπου η θερμοκρασία μπορεί να φτάσει μέχρι 55° C κάτω από τον ήλιο και ως εκ τούτου συνήθως υπάρχει εγκατεστημένο σύστημα ψύξης της καλλιέργειας (Γκέλης, 2015).

pH

Οι τιμές pH στις οποίες αναπτύσσονται τα περισσότερα μικροφύκη κυμαίνονται μεταξύ της περιοχής του ουδέτερου (7,0 - 7,5) και ελαφρώς αλκαλικού (8,0 - 9,0).

Το CO₂ στις τιμές pH στις οποίες αναπτύσσονται τα περισσότερα μικροφύκη βρίσκεται διαλυμένο στο νερό είτε με μορφή διττανθρακικού (HCO₃⁻) είτε με μορφή ανθρακικού ιόντος (CO₃²⁻). Τόσο κατά τη φωτοσύνθεση όσο και κατά τη μετατροπή των ανθρακικών ιόντων σε CO₂ και την δέσμευσή του, παράγονται ιόντα OH⁻ και ως εκ τούτου η τάση στις καλλιέργειες των φυκών είναι να αυξάνεται το pH.

Απότομες αλλαγές στο pH μπορεί να έχουν καταστροφικές επιπτώσεις σε μια καλλιέργεια και για αυτό το λόγο στα περισσότερα θρεπτικά μέσα χρησιμοποιείται κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα (π.χ. EDTA). Ένας άλλος τρόπος ρύθμισης του pH είναι με παροχή CO₂ το οποίο δεσμεύει ιόντα OH⁻ για την παραγωγή HCO₃⁻ ή με προσθήκη διάφορων οξέων (Γκέλης, 2015).

Απότομη αλλαγή του pH μπορεί να έχει καταστροφικές επιπτώσεις στην καλλιέργεια. Κατά την φωτοσύνθεση, το pH της καλλιέργειας έχει την τάση να αυξάνεται. Αν το pH αυξηθεί πάνω από μια τιμή τότε επέρχεται κυτταρόλυση. Το αντίθετο συμβαίνει όταν χρησιμοποιείται αμμωνία ως πηγή αζώτου, όπου κατά την πρόσληψή της από τα μικροφύκη παράγονται ιόντα H⁺, ωθώντας το pH να μειωθεί.

Μεγάλες τιμές του pH ευνοούν την στερεοποίηση και καθίζηση του φωσφόρου με ανάλογες επιπτώσεις στην εύρυθμη ανάπτυξη των μικροφυκών (Μάρκου κ.ά., 2013).

Θρεπτικά συστατικά

Προκειμένου να αυξηθούν τα μικροφύκη (όπως και τα ανώτερα φυτά), έχουν ανάγκη ένα μεγάλο εύρος ανόργανων στοιχείων, αναγκαίων για τις βασικές μεταβολικές κυτταρικές διεργασίες.

Τα κυριότερα μακροστοιχεία που είναι αναγκαία για τα μικροφύκη, πέρα από τον άνθρακα, είναι το άζωτο (N), ο φώσφορος (P), το κάλιο (K) και σε ορισμένες περιπτώσεις (π.χ. διάτομα) το πυρίτιο (Si).

Αναγκαία αλλά σε μικρότερες ποσότητες είναι τα μικροστοιχεία/ιχνοστοιχεία, όπως το θείο (S), ο σίδηρος (Fe), το μαγνήσιο (Mg), το ασβέστιο (Ca), καθώς και διάφορα άλλα μέταλλα (π.χ. μολυβδαίνιο, νικέλιο, βανάδιο, κ.λπ.) (Γκέλης, 2015).

*** Άζωτο**

Το άζωτο είναι ένα από τα βασικότερα θρεπτικά συστατικά γιατί συμμετέχει σε αρκετά σημαντικά βιοχημικά μακρομόρια (πρωτεΐνες, DNA, RNA κ.λπ.) και η παροχή του είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη των μικροφυκών.

Η περιεκτικότητα του αζώτου στην βιομάζα των μικροφυκών, ειδικά σε εκείνα που περιέχουν μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών, μπορεί να ανέλθει ακόμα και στο 10%. Το άζωτο μπορεί να προσληφθεί από διάφορες μορφές, όπως αμμωνιακό άζωτο, νιτρικό άζωτο και λιγότερο στη νιτρώδη μορφή.

Όταν το άζωτο είναι σε μοριακή μορφή διαχέεται κατευθείαν εντός των κυττάρων διαπερνώντας τις μεμβράνες. Τα μικροφύκη γενικά προτιμούν την πρόσληψη αζώτου υπό αμμωνιακή μορφή διότι δε χρειάζονται να ξοδέψουν ενέργεια, όπως χρειάζεται για τα νιτρικά τα οποία πρέπει πρώτα να αναχθούν σε αμμωνιακή μορφή. Παρόλα αυτά, η παροχή νιτρικών αλάτων έχει δείξει ότι έχει καλύτερα αποτελέσματα στην παραγωγή βιομάζας. Επιπλέον, μεγάλες συγκεντρώσεις

αμμωνίας στα υποστρώματα ανάπτυξης δρουν τοξικά και αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροφυκών.

Για την μείωση του κόστους παραγωγής χρησιμοποιώντας νιτρικά άλατα, αρκετοί ερευνητές προσπάθησαν να τα αντικαταστήσουν με φθηνότερα υλικά. Αυτό που δείχνει να έχει ενδιαφέρον για την παραγωγή μικροφυκών σε μεγάλη κλίμακα είναι η χρήση ουρίας ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$). Στην ουρία το άζωτο είναι σε οργανική μορφή και υδρολύεται προς αμμώνιο. Η ουρία πέρα από πηγή αζώτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης και ως πηγή άνθρακα. Ένα από τα μειονεκτήματα της χρήσης ουρίας είναι ότι το παραγόμενο αμμώνιο, ειδικά σε αλκαλικά υποστρώματα ανάπτυξης, διαφεύγει και χάνεται στην ατμόσφαιρα (Μάρκου κ.ά., 2013).

Σε υψηλές συγκεντρώσεις, τα μη αραιωμένα υγρά απόβλητα αναερόβιας χώνευσης αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροφυκών λόγω της υψηλής θολερότητας που περιορίζει την φωτοσύνθεση, ενώ η υψηλή περιεκτικότητα σε αμμωνία είναι τοξική για τα μικροφύκη. Για τον λόγο αυτό, οι περισσότερες μελέτες χρησιμοποιούν αραιωμένα υγρά απόβλητα αναερόβιας χώνευσης. Ωστόσο, τα αραιωμένα υγρά απόβλητα δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές που απαιτούνται υψηλότερη ικανότητα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων και μεγαλύτερος όγκος αντιδραστήρων (Cheng et al., 2015).

★ Φώσφορος

Ουσιαστικής σημασίας θρεπτικό στοιχείο για την ανάπτυξη των μικροφυκών είναι και ο φώσφορος, ο οποίος συμμετέχει ως στοιχείο σε διάφορα μακρομόρια, όπως φωσφολιπίδια, αδενοσινοτριφωσφορικό οξύ (ATP) κ.ά.. Τα μικροφύκη περιέχουν λιγότερο από 1% φώσφορο στη βιομάζα τους, παρόλα αυτά ο φώσφορος πολύ συχνά είναι περιοριστικός παράγοντας ανάπτυξης, ειδικότερα σε φυσικά περιβάλλοντα (π.χ. λίμνες).

Για την διάλυση του φωσφόρου από την μορφή αυτή απαιτούνται διάφορες μικροβιακές δραστηριότητες. Όταν ο φώσφορος είναι σε οργανική μορφή, τότε τα μικροφύκη εκκρίνουν φωσφατάσες και μ' αυτό τον τρόπο ο οργανικός φώσφορος μετατρέπεται σε ορθοφωσφορικό φώσφορο.

Οι φωσφατάσες εκκρίνονται σε μεγαλύτερο βαθμό όταν ο ορθοφωσφορικός φώσφορος είναι σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Όταν η συγκέντρωση φωσφόρου

στο περιβάλλον είναι χαμηλή, τότε τα μικροφύκη τον αποθηκεύουν σε μεγαλύτερες ποσότητες από αυτές που χρειάζονται άμεσα. Η αποθήκευση του φωσφόρου γίνεται υπό μορφή πολυφωσφορικών κόκκων και μπορεί να καλύψει τις ανάγκες δύο ή ακόμα και τριών κύκλων διαίρεσης (γενιές) (Μάρκου κ.ά., 2013).

Στον **Πίνακα 1.2** φαίνονται συγκεντρωτικά οι παράγοντες, βιοτικοί και αβιοτικοί, που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών.

Πίνακας 1.2. Βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών.

ΒΙΟΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	ΑΒΙΟΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ
Παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών (π.χ. βακτήρια, ιοί και μύκητες)	Παρουσία φωτός (σε ποσοτικό και ποιοτικό επίπεδο)
Άλλα μικροφύκη τα οποία έχουν ανταγωνιστικό ρόλο στα καλλιεργούμενα – επιθυμητά μικροφύκη	Θερμοκρασία
	pH
	Παρουσία αλατότητας και ποσοστό της
	Θρεπτικά συστατικά (σε ποσοτικό και ποιοτικό επίπεδο)
	Παρουσία τοξικών ενώσεων
	Συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου

(Goncalves et al., 2017)

Επιπλέον, τα μικροφύκη μπορεί να επηρεαστούν από τις συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η ανάπτυξή τους. Αυτές μπορεί να είναι:

- i.** Ρυθμός συγκομιδής βιομάζας
- ii.** Διοχέτευση και μεταφορά αερίων με δεδομένο τον έλεγχο του διοξειδίου του άνθρακα.
- iii.** Διαθεσιμότητα
- iv.** Ποσοστό διάτμησης του διαλύτη (Goncalves et al., 2017).

1.6 Η καλλιέργεια των μικροφυκών

Οι καλλιέργειες των μικροφυκών για την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων μπορούν να πραγματοποιηθούν σε αντιδραστήρες αιωρούμενης βιομάζας (suspended cell systems) ή σε αντιδραστήρες ακινητοποιημένης βιομάζας (immobilized cell systems).

Για μια αποτελεσματική καλλιέργεια, παράμετροι όπως το φως, η θερμοκρασία, το pH, η παροχή θρεπτικών συστατικών και ο συνδυασμός μεταξύ αυτών των παραμέτρων πρέπει να ελέγχονται προσεκτικά.

1. Τα συνεχή συστήματα εναιωρήματος αιωρούμενης βιομάζας διακρίνονται σε:

★ Κλειστά συστήματα

Οι συνεχείς καλλιέργειες σε αιώρηση είναι η πιο διαδεδομένη μορφή για την ανάπτυξη μικροφυκών. Αυτά τα συστήματα περιλαμβάνουν κλειστούς ή ανοιχτούς βιοαντιδραστήρες (Goncalves et al., 2017).

Σε μια κλειστού τύπου καλλιέργεια υπάρχει η δυνατότητα καλλιέργειας μικροφυκών παρατεταμένης διάρκειας. Στις καλλιέργειες αυτού του τύπου που ονομάζονται συνεχείς καλλιέργειες, η προγραμματισμένη σταδιακή αφαίρεση όγκου καλλιέργειας και η ταυτόχρονη προσθήκη ισόποσου όγκου θρεπτικού μέσου εξασφαλίζουν υψηλότερους ρυθμούς αύξησης και μεγαλύτερο βαθμό ασφάλειας σε ποιοτικά μεγέθη των προϊόντων της καλλιέργειας (Γκέλης, 2015).

Τα κυριότερα υποσυστήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι: **α)** το σύστημα φωτισμού, **β)** το σύστημα εμπλουτισμού με CO₂, **γ)** το σύστημα ανάδευσης, **δ)** το σύστημα απομάκρυνσης O₂ και διαχωρισμού αερίων, **ε)** το σύστημα θέρμανσης/ψύξης και **στ)** το σύστημα θρέψης.

Στις καλλιέργειες κλειστού τύπου, οι συνθήκες είναι περισσότερο ή λιγότερο ελεγχόμενες, αναλόγως αν πρόκειται για καλλιέργειες στεγασμένες ή υπαίθριες. Στις υπαίθριες καλλιέργειες οι συνθήκες δεν ελέγχονται πλήρως (ηλιακή ένταση και θερμοκρασία). Αντίθετα, στις στεγασμένες καλλιέργειες οι συνθήκες με τον ένα ή άλλο τρόπο είναι πιο ελεγχόμενες.

Οι κλειστού τύπου καλλιέργειες πραγματοποιούνται σε κλειστούς περιέκτες, τους φωτοβιοαντιδραστήρες (photobioreactors). Τα υλικά κατασκευής και τα σχήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων ποικίλουν πολύ.

Υπάρχουν φωτοβιοαντιδραστήρες επίπεδοι όπως οι ηλιακοί συλλέκτες, κατακόρυφοι ή κεκλιμένοι, κυλινδρικοί με επιμήκεις αγωγούς κατασκευασμένους από διάφορα διάφανα υλικά (γυαλί ή πλαστικό), ή ελικοειδούς μορφής. Επιπλέον, απλής κατασκευής φωτοβιοαντιδραστήρες θεωρούνται αυτοί του τύπου σακών πολυαιθυλενίου.

Κατά την φωτοσύνθεση των μικροφυκών παράγεται μοριακό οξυγόνο, το οποίο λόγω των συνθηκών εντός του φωτοβιοαντιδραστήρα διαλύεται στο υγρό

υπόστρωμα ανάπτυξης. Το διαλυμένο οξυγόνο θα πρέπει να απομακρύνεται με κατάλληλο τρόπο γιατί σε μεγάλες συγκεντρώσεις είναι ανασταλτικό της ανάπτυξης των μικροφυκών, ενώ μερικές φορές σε συνδυασμό με υψηλές εντάσεις φωτός προκαλούν φωτοοξειδωση (Μάρκου κ.ά., 2013).

Οι κλειστοί βιοαντιδραστήρες (PBRs) για την ανάπτυξη των μικροφυκών μπορεί να είναι σε πλεονεκτική θέση για τους εξής λόγους:

- i. Παράμετροι όπως το pH, η θερμοκρασία και η ανάμιξη των συγκεντρώσεων του CO₂ και του O₂ μπορούν να ελεγχθούν αυστηρά.
- ii. Η εξάτμιση και οι επιμολύνσεις μπορούν εύκολα να αποφευχθούν.
- iii. Μπορούν να επιτευχθούν υψηλότερες συγκεντρώσεις κυττάρων δηλαδή μεγαλύτερη βιομάζα (Goncalves et al., 2017).
- iv. Καλύτερη θερμική κατανομή στο υπόστρωμα καλλιέργειας.
- v. Σχετικά εύκολη εγκατάσταση σε ανοιχτό χώρο (Μάρκου κ.ά., 2013).

Τα μειονεκτήματα των βιοαντιδραστήρων κλειστού τύπου (PBRs) είναι τα εξής:

- i. Η υπερθέρμανση των καλλιεργειών και κατ' επέκταση του συστήματος.
- ii. Δυσκολίες στις εφαρμογές σε επίπεδο μεγάλης κλίμακας.
- iii. Υψηλό κατασκευαστικό κόστος.

*** Ανοιχτά συστήματα**

Τα ανοικτά συστήματα καλλιεργειών τύπου αιωρούμενης βιομάζας λαμβάνουν χώρα είτε σε φυσικούς αποδέκτες, όπως οι λίμνες, είτε σε τεχνητούς χώρους, δηλαδή σε τεχνητές λιμνοδεξαμενές (Goncalves et al., 2017).

Στις ανοικτού τύπου καλλιέργειες, ωστόσο, τα μικροφύκη είναι εκτεθειμένα στους περιβαλλοντικούς παράγοντες και συνήθως επιμολύνονται από άλλα είδη μικροφυκών ή βακτηρίων ή άλλων μικροοργανισμών.

Το σύστημα ανάδευσης των ανοικτών καλλιεργειών είναι μεγάλης σημασίας και στην ουσία αντικατοπτρίζει την εξέλιξη των διαφόρων τύπων δεξαμενών. Η

ανάδευση είναι αναγκαία γιατί εμποδίζει την συσσωμάτωση και καθίζηση των μικροφυκών, αυξάνει την αξιοποίηση του φωτός, ομογενοποιεί το υπόστρωμα καθιστώντας τα διαλυτά ανόργανα ή/και οργανικά στοιχεία πιο προσπελάσιμα για την πρόσληψή τους από τα μικροφύκη.

Ο κυριότερος τύπος ανοικτών τεχνητών δεξαμενών είναι η επιμήκης (raceway) και η κυκλική δεξαμενή. Οι αγωγοί (διάδρομοι) της επιμήκους δεξαμενής μπορούν να έχουν διάφορα σχήματα (απλοί, οφιοειδείς, με παράλληλους αγωγούς κ.λπ.) και η ανάδευσή τους γίνεται συνήθως με πτερυγωτό τροχό (paddle wheel), ενώ η κυκλική λεκάνη αναδεύεται με κινούμενο βραχίονα.

Οι επιμολύνσεις με άλλους μικροοργανισμούς αλλοιώνουν την σύσταση των καλλιεργειών και δυσχεραίνουν την εφαρμογή της μονοκαλλιέργειας. Έντονες επιμολύνσεις μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα τη μικρή παραγωγή ή και σε ορισμένες περιπτώσεις την κατάρρευση της καλλιέργειας, είτε λόγω της επικράτησης άλλων μικροοργανισμών είτε λόγω της εμφάνισης παρασιτικών ασθενειών.

Επιπλέον, σε ορισμένες τοποθεσίες, οι περίοδοι καλλιέργειας είναι περιορισμένες, λόγω έντονων εποχιακών περιβαλλοντικών διακυμάνσεων ή χαμηλών θερμοκρασιών και ηλιοφάνειας. Για τον λόγο αυτό, χώρες με μεγάλη διάρκεια και ένταση ηλιοφάνειας, όπως η Ελλάδα, έχουν πλεονέκτημα για την εγκατάσταση καλλιέργειας μικροφυκών, δεδομένου ότι η παραγωγή σε βιομάζα μπορεί να είναι ως και δέκα φορές μεγαλύτερη σε σχέση με περιοχές με μικρή διάρκεια και ένταση ηλιοφάνεια (Μάρκου κ.ά., 2013).

Τα πλεονεκτήματα των ανοικτών συστημάτων είναι τα εξής:

- i.** Το χαμηλό κόστος κατασκευής.
- ii.** Μεγαλύτερη παραγωγική ικανότητα βιομάζας.

Τα μειονεκτήματα των ανοικτών συστημάτων είναι τα εξής:

- i.** Παρουσίαση μεγαλύτερης ευαισθησίας – ευπάθειας σε μολύνσεις.
- ii.** Μικρότερη παραγωγική ικανότητα βιομάζας.
- iii.** Απομάκρυνση θρεπτικών ουσιών.
- iv.** Απώλειες νερού λόγω του φαινομένου της εξάτμισης.

- v. Κακή διοχέτευση φωτός ανά κύτταρο.
- vi. Επιρρεπή σε διάχυση του διοξειδίου του άνθρακα (Goncalves et al., 2017).
- vii. Θερμοκρασιακές μεταβολές.
- viii. Αναποτελεσματική ανάδευση του υποστρώματος (Μάρκου κ.ά., 2013).

Τα προβλήματα των ανοικτών καλλιεργειών μπορούν να αντιμετωπιστούν με την χρήση κατάλληλων συνθηκών για το είδος του μικροφύκου. Αποτελεσματικές συνθήκες είναι συνήθως οι ακραίες και εξειδικευμένες συνθήκες, όπου μόνο το επιλεχθέν στέλεχος μπορεί να αναπτυχθεί, ενώ είναι ακατάλληλες για τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς.

Επιπρόσθετα, για μια αποτελεσματική καλλιέργεια μπορεί να χρησιμοποιηθούν είδη μικροφυκών με σχετικά υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης για την επικράτηση έναντι άλλων μικροοργανισμών όπως τα μικροφύκη των γενών *Chlorella* *scenedesmus* και *phaeodactylum* (Μάρκου κ.ά., 2013).

Παραδείγματα ανοικτών και κλειστών συστημάτων καλλιέργειας μικροφυκών φαίνονται παρακάτω στα **Σχήματα 1.3** και **1.4**.



Σχήμα 1.3. Σύστημα ανοιχτού τύπου, τεχνητή λιμνοδεξαμενή (Τσιόνκη, 2013).



Σχήμα 1.4. Σύστημα κλειστού τύπου, φωτοβιοαντιδραστήρας (Alaswad et al., 2015)

2. Συστήματα ακινητοποιημένης βιομάζας (immobilized cells system)

Οι στατικές καλλιέργειες μπορεί να γίνουν σε δοκιμαστικούς σωλήνες, τρυβλία Petri, κωνικές φιάλες ή ακόμη και σε διαφανείς σάκους πολυαιθυλενίου.

Στις στατικές καλλιέργειες, η μοναδική επέμβαση είναι η περιοδική ή συνεχής ανάμιξη του θρεπτικού μέσου, που επιτυγχάνεται είτε με μηχανική ανάδευση ολόκληρου του δοχείου της καλλιέργειας είτε με την παροχή αέρα (απαλλαγμένου από σωματίδια και μικροοργανισμούς) στη βάση των δοχείων καλλιέργειας (Γκέλης, 2015).

Τα πλεονεκτήματα των συστημάτων ακινητοποιημένης βιομάζας είναι τα εξής:

- i.** Ο σχηματισμός ενός βιοφίλμ των μικροφυκών παρουσιάζει χαμηλότερες απαιτήσεις σε συνθήκες νερού.
- ii.** Η απομάκρυνση του νιτρικού αζώτου $\text{NO}_3 - \text{N}$ και του αμμωνιακού αζώτου $\text{NH}_4 - \text{N}$ μετά από 20 μέρες μπορεί να φτάσουν 95% έως 97% αντίστοιχα.
- iii.** Αποτελεσματική απομάκρυνση βαρέων μετάλλων.

Τα μειονεκτήματα των συστημάτων ακινητοποιημένης βιομάζας είναι τα εξής:

- i.** Μικρότερη ανάπτυξη των μικροφυκών.
- ii.** Υψηλό κόστος με τη μήτρα ακινητοποίησης (των κυττάρων των μικροφυκών).
- iii.** Το συγκεκριμένο σύστημα δεν επιτρέπει την κίνηση των κυττάρων είτε με φυσικές είτε με τεχνικές μεθόδους, ανεξάρτητα από τα υπάρχοντα συστατικά σε όλη την έκταση του υδάτινου διαλύματος.

Η ακινητοποίηση των κυττάρων γίνεται με παθητικό τρόπο λόγω της έμφυτης ικανότητας των μικροφυκών να προσκολληθούν σε μια συγκεκριμένη επιφάνεια με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός βιοφίλμ (Goncalves et al., 2017).

2. ΣΤΟΧΟΙ

Στη παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή μελετάται η επεξεργασία ενός υπολείμματος υγρών αποβλήτων, αγροκτηνοτροφικής προέλευσης, μετά την αναερόβια χώνευσή του σε αντιδραστήρα. Η επεξεργασία του υπολείμματος αυτού καθίσταται σημαντική για την αποφυγή περιβαλλοντικών επιπτώσεων από τη ρίψη

του στο οικοσύστημα, καθώς η εκροή αυτή περιέχει σημαντικές ποσότητες θρεπτικών συστατικών, οργανικών και ανόργανων, όπως έχει προαναφερθεί.

Στη διπλωματική αυτή εργασία, επιλέχθηκε η μέθοδος της βιολογικής επεξεργασίας του υγρού υπολείμματος αναερόβιας χώνευσης με τη χρήση στελεχών μικροφυκών του γένους *Chlorella spp.* και συγκεκριμένα με το σύστημα αιωρούμενης βιομάζας εντός γυάλινων κωνικών φιαλών. Προηγούμενες μελέτες έχουν στηριχθεί στην βιολογική επεξεργασία κυρίως αστικών και βιομηχανικών υγρών αποβλήτων με τη χρήση μικροφυκών. Η παρούσα διπλωματική, αντίθετα, επικεντρώνεται σε υγρά απόβλητα αγροκτηνοτροφικής προέλευσης λόγω της αυξημένης περιεκτικότητάς τους σε αζωτούχες ενώσεις, έναντι των βιομηχανικών και αστικών λυμάτων. Επιτυχάνοντας αποτελεσματική επεξεργασία του υγρού υπολείμματος, αναμένεται να μειωθεί σημαντικά το αμμωνιακό φορτίο του υποστρώματος λόγω του μεταβολισμού των μικροφυκών, με αποτέλεσμα να καθίσταται περισσότερο οικολογική η ρίψη του επεξεργασμένου πια αποβλήτου στα οικοσυστήματα. Παράλληλα, η καλλιέργεια μικροφυκών παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής βιομάζας, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή άλλων χρήσιμων προϊόντων (π.χ. ζωοτροφές, βιοαέριο).

Επομένως, οι στόχοι της παρούσας διπλωματικής διατριβής συνοψίζονται στα εξής:

- ✂ Πρώτος και κυριότερος στόχος είναι η όσο το δυνατόν αποδοτικότερη απομάκρυνση του αμμωνιακού φορτίου του υγρού υπολείμματος αναερόβιας χώνευσης με τη μεταβολική δράση των μικροφυκών, ώστε μετά την επεξεργασία του υπολείμματος να μη θεωρείται ρυπογόνος παράγοντας για τα υδάτινα οικοσυστήματα.
- ✂ Να επιτευχθεί ικανοποιητική μείωση της συγκέντρωσης ή/ και πλήρης απομάκρυνση των υπολοίπων θρεπτικών συστατικών του υγρού υπολείμματος, όπως είναι ο φώσφορος με τη μορφή φωσφορικών ιόντων ($PO_4 - P$) και το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD).
- ✂ Να διαπιστωθούν οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες για την αποτελεσματική αύξηση των μικροφυκών, που με τη σειρά τους θα

βοηθήσουν στην επίτευξη των δύο προαναφερθέντων στόχων. Οι συνθήκες αυτές περιλαμβάνουν τη δημιουργία κατάλληλης ατμόσφαιρας εντός του υποστρώματος, τον επαρκή φωτισμό, τη ρύθμιση και σταθεροποίηση της τιμής pH και τον καθορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης του υπολείμματος για την εύρυθμη ανάπτυξη των μικροφυκών.

- ✧ Να επιτευχθεί ικανοποιητική αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης των μικροφυκών και συγκεκριμένα των στελεχών *Chlorella sorokiniana* και *Chlorella vulgaris* υπό την παρουσία ατμοσφαιρικού αέρα και διοξειδίου του άνθρακα (CO₂). Σημαντική ένδειξη της ανάπτυξης των μικροφυκών αποτελεί η αύξηση της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας των κυττάρων και ο υψηλός μετρούμενος αριθμός κυττάρων με τη μέθοδο του αιμοκυτόμετρου.
- ✧ Να προκύψουν δεδομένα από τη πειραματική διαδικασία που να οδηγήσουν σε περαιτέρω μελέτη των μικροφυκών στο τομέα της επεξεργασίας υγρών αποβλήτων από κτηνοτροφικές και αγροτικές δραστηριότητες.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

3.1 Αντιδραστήρια

Για τη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε υγρό υπόλειμμα από αντιδραστήρια, στον οποίο έλαβε χώρα αναερόβια χώνευση μίγματος υγρών αποβλήτων αγροκτηνοτροφικής προελεύσεως. Το υγρό αυτό υπόλειμμα μετά την

αναερόβια χώνευση έχει αυξημένα κατάλοιπα αζωτούχων ενώσεων και άλλων θρεπτικών συστατικών. Το δείγμα από εδώ και καθεξής θα αναφέρεται ως «υγρό απόβλητο αναερόβιας χώνευσης».

Το υγρό απόβλητο αναερόβιας χώνευσης μετά τη παραλαβή του αποθηκεύεται εντός πλαστικών περιεκτών χωρητικότητας 1 και 5 L σε εργαστηριακό καταψύκτη θερμοκρασίας -4°C για την όσο πιο σταθερή διατήρηση των περιεχόμενων θρεπτικών του συστατικών. Περίπου δύο ώρες πριν την ανάλυσή του τοποθετούνταν εκτός ψύξης έτσι ώστε να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 22°C) για τη πλήρη και ομοιόμορφη απόψυξή του.

Για τη μέτρηση των θρεπτικών συστατικών του υγρού αποβλήτου αναερόβιας χώνευσης χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα αντιδραστήρια σε φιαλίδια (kits) σύμφωνα με τη μεθοδολογία ανάλυσης του κατασκευαστή (HACH-LANGE). Τα φιαλίδια διαθέτουν μοναδικό barcode και, κατά τη μέτρηση με το φασματοφωτόμετρο υπεριώδους - ορατού DR 2800 της εταιρείας HACH-LANGE, αναγνωρίζεται διαφορετικό μήκος κύματος (σε nm) για κάθε ανάλυση και kit.

Τα kits που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε ανάλυση περιλαμβάνουν:

1. Για τον προσδιορισμό των αμμωνιακών ιόντων ($\text{NH}_4 - \text{N}$) χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- ★ kit LCK 304 με εύρος 0,015 – 2 mg/l
- ★ kit LCK 305 με εύρος 1 – 12 mg/l
- ★ kit LCK 303 με εύρος 2 – 47 mg/l



2. Για τον προσδιορισμό των νιτρικών ιόντων ($\text{NO}_3 - \text{N}$) χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- ★ kit LCK 339 με εύρος 0,23 – 13 mg/l
- ★ kit LCK 340 με εύρος 5- 35 mg/l



3. Για τον προσδιορισμό των φωσφορικών ιόντων ($\text{PO}_4\text{-P}$) χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- ★ kit LCK 348 με εύρος 0,5 – 5 mg/l



4. Για τον προσδιορισμό του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD) χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- ★ kit LCK 314 με εύρος 15 – 150 mg/l
- ★ kit LCK 114 με εύρος 150 – 1000 mg/l
- ★ kit LCK 514 με εύρος 100 – 2000 mg/l



5. Για τον προσδιορισμό του ολικού αζώτου (Total Nitrogen) χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- ★ kit LCK 138 με εύρος 1– 16 mg/l

- ★ kit LCK 238 με εύρος 5 – 40 mg/l



Κατά τη πειραματική διαδικασία, έγινε σύγκριση των μετρήσεων των θρεπτικών συστατικών του αποβλήτου με ένα γνωστό τεχνητό υπόστρωμα, το οποίο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι εκλεκτικό για την ανάπτυξη των μικροφυκών και ειδικότερα του γένους *Chlorella*. Το τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα ονομάζεται **BG 11 (Blue Green medium)** και παρασκευάζεται από την ανάμιξη απιονισμένου νερού με ορισμένη ποσότητα διαφορετικών διαλυμάτων (εννέα στον αριθμό, οκτώ πρότυπων διαλυμάτων και ενός διαλύματος με ιχνοστοιχεία). Η ζύγιση όλων των στερεών χημικών ουσιών έγινε στον ηλεκτρονικό αναλυτικό ζυγό ακριβείας Kern (4 δεκαδικών ψηφίων), εντός καψιδίων πορσελάνης ή γυάλινων ποτηριών ζέσεως. Το απιονισμένο νερό λαμβάνεται από ιοντοανταλλακτική στήλη. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος BG 11 είναι η εξής (Stanier et al, 1971):

1. Το διάλυμα 1 παρασκευάζεται με διάλυση 75,0 g νιτρικού νατρίου (NaNO_3) της εταιρείας EMSURE® σε 500 mL απιονισμένου νερού.
2. Το διάλυμα 2 παρασκευάζεται με διάλυση 2,0 g διϋδροφωσφορικού καλίου (K_2HPO_4) της εταιρείας EMSURE® σε 500 mL απιονισμένου νερού.
3. Το διάλυμα 3 παρασκευάζεται με διάλυση 3,75 g επταένυδρου θεικού μαγνησίου ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) της εταιρείας EMSURE® σε 500 mL απιονισμένου νερού.
4. Το διάλυμα 4 παρασκευάζεται με διάλυση 1,80 g διένυδρου χλωριούχου ασβεστίου ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) της εταιρείας EMSURE® σε 500 mL απιονισμένου νερού.
5. Το διάλυμα 5 παρασκευάζεται με διάλυση 0,30 g κιτρικού οξέος της εταιρείας EMSURE® σε 500 mL απιονισμένου νερού.
6. Το διάλυμα 6 παρασκευάζεται με διάλυση 0,30 g κιτρικού σιδήρου αμμωνίου (Ammonium iron(III) citrate CP, green) σε 500 mL απιονισμένου νερού.

7. Το διάλυμα_7 παρασκευάζεται με διάλυση 0,05 g δινάτριου αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTANa₂) της εταιρείας EMSURE® σε 500 mL απιονισμένου νερού.
8. Το διάλυμα_8 παρασκευάζεται με διάλυση 1,00 g ανθρακικού νατρίου (Na₂CO₃) της εταιρείας EMSURE® σε 500 mL απιονισμένου νερού.
9. Το διάλυμα_9 είναι το διάλυμα των ιχνοστοιχείων και παρασκευάζεται με διάλυση των εξής αντιδραστηρίων εντός 1000 mL απιονισμένου νερού:
 - 2,86 g βορικού οξέος (H₃BO₃) της εταιρείας EMSURE®
 - 1,81 g τετραένυδρου χλωριούχου μαγγανίου (II) (MnCl₂•4H₂O) της εταιρείας EMSURE®
 - 0,22 g επταένυδρου θεικού ψευδαργύρου (ZnSO₄•7H₂O) της εταιρείας EMSURE®
 - 0,39 g διένυδρου μολυβδαινικού νατρίου (Na₂MoO₄•2H₂O) της εταιρείας EMSURE®
 - 0,08 g πενταένυδρου θεικού χαλκού (CuSO₄•5H₂O) της εταιρείας EMSURE®
 - 0,05 g εξαένυδρου νιτρικού κοβαλτίου (Co(NO₃)₂•6H₂O) της εταιρείας EMSURE®
10. Για τη παρασκευή ενός λίτρου (1 L) του υγρού θρεπτικού υποστρώματος BG 11 γίνεται η ανάμιξη 10 mL καθενός από τα πρότυπα διαλύματα 1 έως 8 και 1 mL του διαλύματος ιχνοστοιχείων 9 σε γυάλινη ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 1 L και προστίθεται η απαραίτητη ποσότητα απιονισμένου νερού.
11. Η ογκομετρική φιάλη με το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα αναδεύεται ελαφρά με ανακίνησή της, μέχρι τη πλήρη και ομοιόμορφη διάλυση των εννέα διαλυμάτων στο απιονισμένο νερό.
12. Το pH του υγρού θρεπτικού υποστρώματος BG 11 ρυθμίζεται στη τιμή 7,1 με τη χρήση πρότυπου διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) ή υδροχλωρικού οξέος (HCl) 1 M.
13. Μετά τη παρασκευή του, το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα διατηρείται σε θερμοκρασία 4° C και παραμένει εκτός ψυγείου μόνο κατά τη τοποθέτηση του στις φιάλες του πειράματος (με τον εμβολιασμό του με μικροφύκη).

Στη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν επίσης:

- Ρυθμιστές pH 4, 7, 10 (pH buffer solutions)
- Αιθανόλη 70% v/v



3.2 Εργαστηριακά υλικά

Τα εργαστηριακά σκεύη και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων είναι τα εξής:

- ◆ Γυάλινες κωνικές φιάλες χωρητικότητας 250 και 500 mL
- ◆ Γυάλινοι ογκομετρικοί κύλινδροι χωρητικότητας 10, 25, 250, 500 και 1000 mL
- ◆ Γυάλινα ποτήρια ζέσεως χωρητικότητας 50, 250, 500 και 1000 mL
- ◆ Υδροβολείς για απιονισμένο νερό και αιθανόλη

- ◆ Πλαστικά φιαλίδια falcon χωρητικότητας 14 και 50 mL
- ◆ Πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου (100 μ L, 1 mL, 5 mL)
- ◆ Πιπέτες πλαστικές τύπου Pasteur
- ◆ Ακροφύσια (tips) πιπέτας (100 μ L, 1 mL, 5 mL)
- ◆ Πλάκα μέτρησης μικροοργανισμών Neubauer (αιμοκυτόμετρο)
- ◆ Θερμόμετρα διακριβωμένα
- ◆ Κυψελίδες πλαστικές
- ◆ Καψίδια πορσελάνης για ξηραντήριο
- ◆ Υποδοχέας για φίλτρα υάλου μικροϊνών (glass microfiber filter holder) (Whatman Inc.)
- ◆ Φίλτρα υάλου μικροϊνών με μέγεθος πόρων 1,5 μ m (Whatman Inc.)
- ◆ Φίλτρα διήθησης διαμέτρου 90 mm (Whatman Inc.)
- ◆ Φίλτρα σύριγγας με μέγεθος πόρων 0,45 μ m
- ◆ Σύριγγες πλαστικές μιας χρήσης (3 και 5 mL)
- ◆ Βελόνες μιας χρήσης για σύριγγες
- ◆ Λαβίδες μεταλλικές
- ◆ Σπάτουλες μεταλλικές και πλαστικές
- ◆ Διηθητικό χαρτί
- ◆ Αλουμινόφυλλο
- ◆ Γάζα
- ◆ Υδρόφοβο βαμβάκι
- ◆ Γάντια νιτριλίου

Ογκομετρικοί κύλινδροι

Κωνική φιάλη



Ποτήρι ζέσεως



Αυτόματη πιπέτα



Τίπς πιπέτας



Πιπέτες Pasteur

Neubauer πλάκα (αιμοκυτόμετρο)



Φίλτρα υάλου μικροϊνών



Υποδοχέας για φίλτρα υάλου μικροϊνών



Κυψελίδες



Σχήμα 3.1 Παραδείγματα εργαστηριακών υλικών.

Φυγόκεντρος Heraeus Christ Labofuge III



Φυγόκεντρος Gallenkamp Laboratory Centrifuge



Θερμοστάτης HACH-LANGE DR 2800



Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους - ορατού HACH-LANGE DR 2800



Πεχάμετρο
HANNA HI 8424



Σχήμα 3.2 Παραδείγματα εργαστηριακών οργάνων.

3.3 Κατεργασία αποβλήτου

Πριν την έναρξη κάθε πειράματος, προηγήθηκε κατεργασία του υγρού υπολείμματος αναερόβιας χώνευσης για την καλύτερη διαχείρισή του και τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των επιμέρους θρεπτικών του συστατικών. Πιο συγκεκριμένα:

1. Αρχικά, διευκρινίζονται οι συνθήκες διατήρησης του υγρού υπολείμματος αναερόβιας χώνευσης. Όταν παραλαμβάνεται το υγρό απόβλητο, διατηρείται σε συνθήκες κατάψυξης (-4°C) για μικρά χρονικά διαστήματα, ενώ για μακροχρόνια διατήρησή του συνίσταται η αποθήκευσή του σε χαμηλότερες θερμοκρασίες κατάψυξης (-15 έως -10°C). Πριν την κατεργασία του, είναι απαραίτητο το απόβλητο να έχει θερμοκρασία δωματίου ($21 - 25^{\circ}\text{C}$) στο σύνολό του.
2. Μετά την απόψυξή του, γίνεται επαρκής ανάδευση των πλαστικών περιεκτών που το περιέχουν, για την όσο το δυνατόν καλύτερη και πιο ομοιόμορφη κατανομή των θρεπτικών συστατικών στο σύνολό του.
3. Στη συνέχεια, γίνεται ο διαμοιρασμός του υγρού αποβλήτου σε φιαλίδια Falcon χωρητικότητας 50 mL.
4. Τα φιαλίδια Falcon, ανά τέσσερα, τοποθετούνται σε φυγόκεντρο Gallenkamp Laboratory Centrifuge και φυγοκεντρώνονται για 15 min στις 3500 - 4000 στροφές (rpm), με σκοπό τον διαχωρισμό του ιζήματος του υγρού αποβλήτου αναερόβιας χώνευσης από το υπερκείμενο υγρό. Στο υπερκείμενο υγρό περιέχονται και τα προς προσδιορισμό θρεπτικά συστατικά.
5. Μετά τη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο υγρό περνάει από τη διαδικασία της διήθησης υπό κενό με φίλτρα διήθησης διαμέτρου 90 mm (Whatman Inc.) για τον περαιτέρω διαχωρισμό του υγρού αποβλήτου αναερόβιας χώνευσης από ξένες ύλες που υπάρχουν στο ίζημα (π.χ. ίνες, χώμα, οργανικό φορτίο, κ.λπ.).
6. Το πλέον διηθημένο υγρό απόβλητο αναερόβιας χώνευσης είναι έτοιμο για αναλύσεις, με τις απαιτούμενες δεκαδικές αραιώσεις, και για τοποθέτησή του σε κωνικές φιάλες οι οποίες εμβολιάζονται με κατάλληλη ποσότητα κυττάρων των μικροφυκών.

3.4 Περιγραφή πειραματικών μετρήσεων

Οι χημικές αναλύσεις που περιγράφονται παρακάτω πραγματοποιήθηκαν τόσο στην αρχή κάθε πειράματος στο αρχικό απόβλητο (μετά την κατεργασία του, όπως αυτή αναλύθηκε παραπάνω), όσο και στο απόβλητο που είχε εμβολιαστεί με τα κύτταρα των μικροφυκών. Επιπλέον, αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν και στο «μάρτυρα» που αποτελεί το θρεπτικό υπόστρωμα BG 11 στα πειράματα της πρώτης ενότητας.

Σημαντικό είναι να αναφερθούν οι διαφορετικές χημικές αναλύσεις που έγιναν σε κάθε ένα από τα υποστρώματα.

Στο υγρό υπόλειμμα αναερόβιας χώνευσης έγιναν οι εξής χημικές αναλύσεις:

- αμμωνιακά ιόντα ($\text{NH}_4 - \text{N}$)
- φωσφορικά ιόντα ($\text{PO}_4 - \text{P}$)
- χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD)
- ολικό άζωτο (total N)

Στο θρεπτικό υπόστρωμα BG 11 έγιναν οι εξής χημικές αναλύσεις:

- φωσφορικά ιόντα ($\text{PO}_4 - \text{P}$)
- νιτρικά ιόντα ($\text{NO}_3 - \text{N}$)
- ολικό άζωτο (total N)

Στο υγρό απόβλητο, οι αζωτούχες ενώσεις βρίσκονται κυρίως με τη μορφή των αμμωνιακών ιόντων ($\text{NH}_4 - \text{N}$), ενώ αντίθετα στο θρεπτικό υπόστρωμα BG 11 βρίσκονται με τη μορφή των νιτρικών ιόντων, εξ ου και η διαφορά στις χημικές αναλύσεις των δύο υποστρωμάτων. Το ολικό άζωτο περιλαμβάνει τα νιτρικά και τα αμμωνιακά ιόντα και συνυπολογίζει και άλλες αζωτούχες ενώσεις, όπως η ουρία.

Οι χημικές αναλύσεις πραγματοποιούνταν με συγκεκριμένη χρονική αλληλουχία, ανάλογα με την ημέρα διεξαγωγής του πειράματος (κάθε πειραματικός κύκλος αποτελείται κατά μέσο όρο από 12 ημέρες), όσο και ανάλογα με την αρχική μετρούμενη τιμή κάθε στοιχείου. Για παράδειγμα, τα νιτρικά, αμμωνιακά και φωσφορικά ιόντα μετρήθηκαν ανά 2 ή 3 μέρες στη διάρκεια κάθε πειραματικού κύκλου, το χημικά απαιτούμενο άζωτο μετρήθηκε ανά 4 ή 6 μέρες στη διάρκεια κάθε πειραματικού κύκλου, ενώ το ολικό άζωτο μετρήθηκε στην αρχή κάθε πειραματικού κύκλου και σε ορισμένες περιπτώσεις στο πέρας του πειράματος.

Για την διεξαγωγή των χημικών αναλύσεων στο απόβλητο το οποίο έχει εμβολιαστεί με τα κύτταρα των μικροφυκών που αναπτύσσονται σε αυτό (δηλαδή στο υπόστρωμα του πειράματος), πρέπει να γίνει προηγουμένως κάποια διαδικασία διαχωρισμού των μικροφυκών, έτσι ώστε να μετρηθούν σωστά τα εναπομείναντα θρεπτικά συστατικά εντός του αποβλήτου. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση της ανάπτυξης των μικροφυκών στο θρεπτικό υπόστρωμα BG 11. Τα στάδια του διαχωρισμού του αποβλήτου από τα κύτταρα των μικροφυκών είναι τα εξής:

1. Αρχικά, παραλαμβάνεται ενδεδειγμένη ποσότητα υγρού από κάθε φιάλη του πειράματος. Η ποσότητα αυτή αποφασίζεται με βάση την ημέρα διεξαγωγής του πειράματος, τον απαιτούμενο αριθμό αναλύσεων και τον απαιτούμενο όγκο δείγματος για κάθε ανάλυση. Η ποσότητα αυτή (συνήθως από 2 έως 8 mL) τοποθετείται σε φιαλίδια Falcon χωρητικότητας 14 mL.
2. Τα φιαλίδια Falcon, ανά τέσσερα, τοποθετούνται στη φυγόκεντρο (Heraeus Christ Labofuge III) και φυγοκεντρούνται για 15 min στις 3500 – 4000 στροφές (rpm), με σκοπό τον διαχωρισμό του υγρού αποβλήτου από τα κύτταρα των μικροφυκών, τα οποία λόγω βάρους καθιζάνουν. Στο υπερκείμενο υγρό περιέχονται τα προς ανάλυση θρεπτικά συστατικά.
3. Μετά τη φυγοκέντριση και για περαιτέρω καθαρισμό του υπερκείμενου υγρού από τα κύτταρα των μικροφυκών, το υπερκείμενο υγρό υφίσταται φιλτράρισμα με φίλτρα υάλου μικροϊνών με μέγεθος πόρων 1,5 μm (Whatman Inc.).
4. Το υπερκείμενο υγρό περιέχει συνήθως μεγαλύτερη ποσότητα των υπό ανάλυση θρεπτικών συστατικών (σε mg/l) από αυτή που μπορούν να ανιχνεύσουν τα αυτοματοποιημένα kits αναλύσεων. Για το λόγο αυτό, το υπερκείμενο υγρό πρέπει να αραιωθεί με απιονισμένο νερό με κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις, έτσι ώστε η περιεχόμενη ποσότητα κάθε θρεπτικού συστατικού να ανιχνευτεί από το kit αντιδραστηρίων με το κατάλληλο εύρος. Εφόσον υπάρχουν αντιδραστήρια με διαφορετικά εύρη, επιλέγεται κάθε φορά αυτό με το ενδεδειγμένο εύρος. Στη συνέχεια, το αποτέλεσμα της ανάλυσης ανάγεται στην αρχική ποσότητα με τον κατάλληλο μετασχηματισμό.

Πέρα από τις χημικές αναλύσεις, έγινε η μέτρηση και καταγραφή και άλλων παραμέτρων, τόσο στο υγρό απόβλητο μεμονωμένο ή εμβολιασμένου με τα κύτταρα των μικροφυκών όσο και στο θρεπτικό υπόστρωμα BG 11. Οι παράμετροι που μετρήθηκαν είναι η τιμή του pH του αποβλήτου, τόσο κατά τη παραλαβή του όσο και κατά τη διάρκεια των πειραματικών κύκλων και η οπτική πυκνότητα που δίνει μια ένδειξη της ανάπτυξης των μικροφυκών μέσα στο απόβλητο ή το θρεπτικό υπόστρωμα BG 11. Επιπλέον, έγινε η μέτρηση της κυτταρικής βιομάζας των μικροφυκών, αλλά και η καταμέτρηση των κυττάρων των μικροφυκών μέσω μικροσκόπησης, παράμετροι που δείχνουν την πορεία ανάπτυξης των μικροφυκών εντός των υποστρωμάτων.

3.4.1 Μέτρηση pH

Το pH είναι ένας εύχρηστος τρόπος έκφρασης της συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου σε ένα υδατικό διάλυμα. Εφόσον τα υγρά απόβλητα αναερόβιας χώνευσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι υδατικά διαλύματα, κρίθηκε σημαντική η μέτρηση και καταγραφή του pH τους, τόσο στην έναρξη κάθε πειραματικού κύκλου όσο κατά την διάρκεια αυτού. Το pH των δειγμάτων επηρεάζει άμεσα τη συγκέντρωση του αζώτου υπό μορφή ιοντική (αμμωνιακών ιόντων) ή αέρια (αμμωνία).

Η μέτρηση του pH γινόταν με την χρήση πεχαμέτρου HANNA HI 8424, με ταυτόχρονη καταγραφή της θερμοκρασίας του δείγματος. Το πεχάμετρο υφίστατο βαθμονόμηση (calibration) με τα ενδεδειγμένα ρυθμιστικά των τιμών 4, 7 και 10 ανά δύο εβδομάδες.

Σημαντικό στοιχείο είναι ότι τα μικροφύκη του γένους *Chlorella spp.* που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αναπτύσσονται σε διαλύματα με pH από 5 έως 9. Ακόμα, έχει παρατηρηθεί ότι σε τιμές pH υψηλότερες από 9 η ισορροπία αλλάζει και γίνεται απομάκρυνση του αζώτου με τη μορφή αέριας αμμωνίας, η οποία λόγω της πτητικότητάς της μεταβάλλει τη συγκέντρωση του περιεχομένου στο υγρό απόβλητο αζώτου.

3.4.2 Μέτρηση οπτικής πυκνότητας

Η οπτική πυκνότητα του δείγματος αφορά την απορρόφηση ενός υδατικού διαλύματος, όταν αυτή μετριέται με τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας. Η οπτική πυκνότητα (OD – Optical Density) είναι ουσιαστικά μια παράμετρος που δείχνει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μικροφυκών στο διάλυμα (είτε αυτό είναι υγρό απόβλητο είτε το θρεπτικό υπόστρωμα BG 11). Η οπτική πυκνότητα κάθε δείγματος πρέπει να είναι τέτοια ώστε η μετρούμενη απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο να είναι εντός του εύρους 0,2 – 0,8, καθώς στις τιμές αυτές η απορρόφηση παρουσιάζει γραμμικότητα με τη συγκέντρωση (σύμφωνα με τον νόμο Lambert – Beer).

Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας έγινε σε κάθε πειραματικό κύκλο, σε διάφορα στάδια αυτού όπως:

- ★ στην αρχή κάθε πειράματος στο αραιωμένο απόβλητο,
- ★ στην αρχή κάθε πειράματος στο εμβόλιο (inoculum) μικροφυκών που χρησιμοποιείται,
- ★ στην αρχή κάθε πειράματος στο αραιωμένο απόβλητο το οποίο έχει εμβολιαστεί με τα κύτταρα των μικροφυκών,
- ★ σε συγκεκριμένες ημέρες κατά τη διάρκεια κάθε πειράματος, συνδυαστικά με άλλες χημικές αναλύσεις,
- ★ στο πέρας κάθε πειράματος και
- ★ στις ανακαλλιέργειες των κυττάρων μικροφυκών ενδιάμεσα στους πειραματικούς κύκλους.

Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας έγινε με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου υπεριώδους - ορατού HACH-LANGE DR 2800 σε μήκος κύματος 600 nm. Αρχικά, το διάλυμα από το οποίο θα ληφθεί δείγμα πρέπει να ομογενοποιηθεί πάρα πολύ καλά, έτσι ώστε να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα τα κύτταρα των μικροφυκών και τα σωματίδια του αποβλήτου. Γίνονται οι κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις στο δείγμα, τόσες ώστε η απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο να είναι εντός του εύρους 0,2 – 0,8. Το τελικό αποτέλεσμα της απορρόφησης πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό αραιώσης που έχει υποστεί το δείγμα (αν χρειάστηκε αραιώση) και βρίσκεται η οπτική πυκνότητά του.

3.4.3 Μέτρηση κυτταρικής βιομάζας μικροφυκών

Η κυτταρική βιομάζα αποτελεί μια ακόμα παράμετρο που δείχνει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μικροφυκών στο διάλυμα που μελετάμε. Η οπτική πυκνότητα σε συνδυασμό με την ξηρή κυτταρική βιομάζα δίνουν την συνολική πορεία ανάπτυξης της καλλιέργειας. Η βιομάζα προσδιορίζεται με αφαίρεση του βάρους των άδειων φίλτρων από το μικτού βάρους του φίλτρου, υπολογισμό του καθαρού βάρους της ξηρής βιομάζας και αναγωγή τιμής σε μονάδες συγκέντρωσης ξηρής βιομάζας στον όγκο του αντιδραστήρα (g/l).

Η μέτρηση της ξηρής κυτταρικής βιομάζας (Dry Cell Weight, DCW) έγινε σε κάθε πειραματικό κύκλο, σε διάφορα στάδια αυτού όπως:

- ★ στην αρχή κάθε πειράματος στις καλλιέργειες ώστε να διευκρινιστεί η πορεία ανάπτυξης του στελέχους μικροφυκών που θα χρησιμοποιείτο ως εμβόλιο (inoculum),
- ★ κατά τη διάρκεια του πειραματικού κύκλου για τον έλεγχο της πορείας ανάπτυξης των μικροφυκών στο απόβλητο, σε συνδυασμό με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας,
- ★ ενδιάμεσα στους πειραματικούς κύκλους στις ανακαλλιέργειες των κυττάρων μικροφυκών.

3.4.4 Παρατήρηση και καταμέτρηση κυττάρων μικροφυκών με μικροσκόπηση

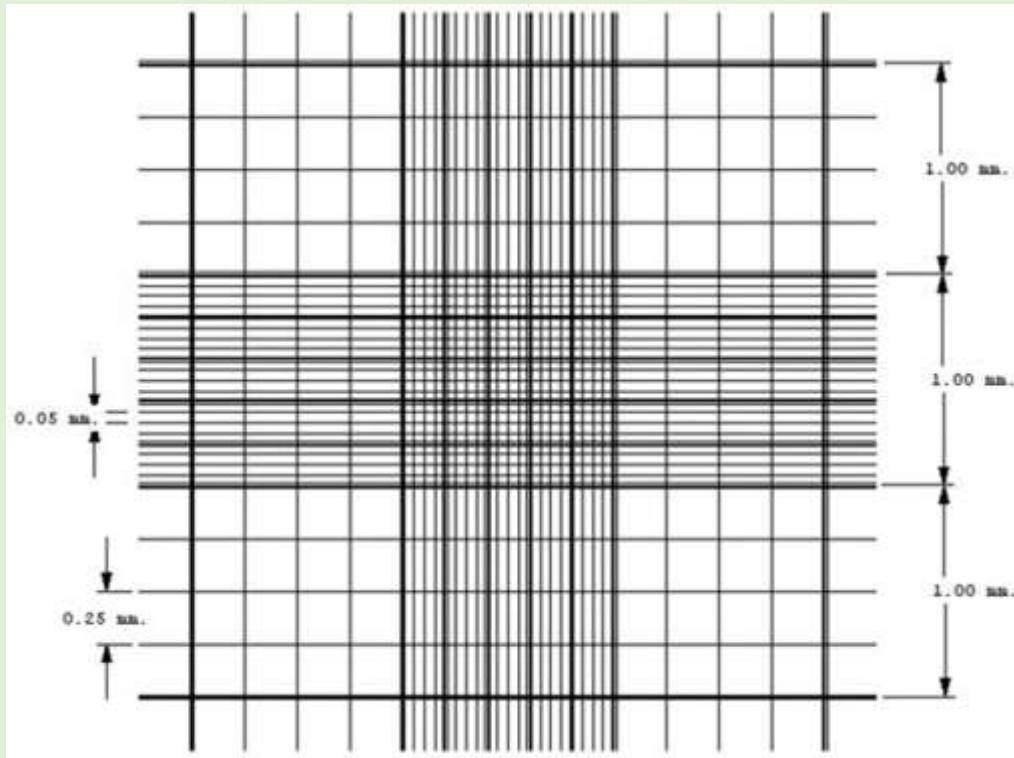
Η παρακολούθηση των δειγμάτων με οπτικό μικροσκόπιο αποτελεί μια ακόμη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε στους πειραματικούς κύκλους και έγκειται τόσο στην παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων των μικροφυκών, στην καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων με ειδική μέθοδο, αλλά και στην διερεύνηση τυχόν επιμολύνσεων που έχουν προσβάλει τα υποστρώματα και ενέχουν κινδύνους για την ανάπτυξη των μικροφυκών.

Η παρατήρηση και καταμέτρηση των κυττάρων των μικροφυκών γινόταν με την χρήση του μικροσκοπίου Zeiss Axio Lab.A1 και του φακού μεγέθυνσης 100x. Η διαδικασία αυτή λάμβανε χώρα με τη χρήση του αιμοκυτόμετρου (της πλάκας μέτρησης Neubauer), μιας επιφάνειας στο μέγεθος αντικειμενοφόρου πλάκας (30 x 70 x 4mm) φτιαγμένη από γυαλί. Η περιοχή μέτρησης αποτελείται από δύο ξεχωριστές ορθογώνιες επιφάνειες/ θάλαμοι, που σχηματίζουν το γράμμα «H» όπως φαίνεται στην **Σχήμα 3.3**.



Σχήμα 3.3 Πλάκα μέτρησης Neubauer.

Κάθε μία από τις ξεχωριστές τετραγωνισμένες επιφάνειες, έχει εμβαδόν 3mm^2 και χωρίζεται σε εννέα (9) μεγάλα τετράγωνα, το καθένα με επιφάνεια 1mm^2 . Κάθε τέτοιο μεγάλο τετράγωνο χωρίζεται σε είκοσι πέντε (25) μικρότερα τετράγωνα, περιγεγραμμένα με διπλή ή τριπλή γραμμή. Κάθε ένα από αυτά τα τετράγωνα εμπεριέχει δεκαέξι (16) μικρά τετράγωνα, περιγεγραμμένα με απλή (μονή) γραμμή. Αυτά τα πολύ μικρά τετράγωνα, τα οποία φαίνονται μόνο με τον φακό με μεγέθυνση 100x, έχουν επιφάνεια $1/400\text{mm}^2$. Όλη αυτή η διάταξη τετραγώνων διακρίνεται στην **Σχήμα 3.4**.



Σχήμα 3.4. Διάταξη τετραγώνων στη πλάκα Neubauer.

Τα κύτταρα εντός των μικρών τετραγώνων αθροίζονται και βγαίνουν συνολικά 5 αθροίσματα μεγάλων τετραγώνων. Το άθροισμα όλων αυτών, πολλαπλασιασμένο με τον συντελεστή αραιώσης του δείγματος και τον αριθμό 10.000 και όλο διαιρεμένο με τον αριθμό των μεγάλων τετραγώνων στα οποία έγινε η μέτρηση, δίνουν τη τελική συγκέντρωση κυττάρων σε ζωντανά κύτταρα ανά mL δείγματος (cells/mL).

3.5 Περιγραφή πειραματικής διαδικασίας

Η πειραματική διαδικασία που εφαρμόστηκε περιγράφεται παρακάτω.

Το υγρό απόβλητο αναερόβιας χώνευσης, μετά τη κατεργασία και την αραιώσή του, τοποθετήθηκε σε γυάλινες κωνικές φιάλες των 250 mL. Το απόβλητο εμβολιάστηκε με κύτταρα των μικροφυκών (του γένους *Chlorella* του οποίου η δράση μελετάται), αφού προηγουμένως μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων της καλλιέργειας με τη χρήση του μικροσκοπίου Zeiss Axio Lab.A1 και η οπτική της πυκνότητα. Η ποσότητα (σε mL) της προστιθέμενης καλλιέργειας των μικροφυκών προσαρμόζεται με βάση τη πυκνότητα της καλλιέργειας. Προσπάθεια έγινε να μην υπερβαίνει το αρχικό εμβόλιο κυττάρων μικροφυκών τα 20 mL, ώστε να μην αραιωθεί έντονα η σύσταση του υγρού αποβλήτου αναερόβιας χώνευσης.

Οι κωνικές φιάλες με το υγρό απόβλητο εμβολιασμένο με κύτταρα μικροφυκών κλείστηκαν στεγανά για τον όσο γίνεται περιορισμό της εξάτμισης του περιεχόμενου σ' αυτά ύδατος. Παράλληλα, πρέπει να επιτρέπεται ο αερισμός της φιάλης και η ανανέωση του υπερκείμενου αέρα της καλλιέργειας με ατμοσφαιρικό αέρα. Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε εργαστηριακό κλίβανο επώασης, του οποίου η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 23,5° C ($\pm 0,5^\circ$ C).

Για την εύρυθμη ανάπτυξη των μικροφυκών απαιτείται η παροχή ατμοσφαιρικού αέρα και διοξειδίου του άνθρακα. Ο ατμοσφαιρικός αέρας συμβάλλει στην ανάδευση του υγρού υποστρώματος, επομένως η διασπορά των κυττάρων μικροφυκών είναι ομοιόμορφη μέσα σ' αυτό. Επίσης, το διοξείδιο του άνθρακα χρησιμοποιείται ως μέσο ρύθμισης της τιμής pH των δειγμάτων, όπως αναλύεται και στην επόμενη ενότητα. Ο ατμοσφαιρικός αέρας τροφοδοτούνταν με μια αεραντλία, περνούσε από φίλτρο για την κατακράτηση υπολειμμάτων και ανεπιθύμητων μικροοργανισμών και η πίεσή του ρυθμιζόταν κατάλληλα με τη βοήθεια κατάλληλων ρυθμιστών πίεσης.

Για την ακριβή παροχή της ενδεδειγμένης ποσότητας των αερίων στις κωνικές φιάλες του εμβολιασμένου υγρού αποβλήτου, χρησιμοποιήθηκαν ροόμετρα Kytola, EK-21R. Η παροχή του ατμοσφαιρικού αέρα στα δείγματα ήταν 200 mL/min, ενώ του διοξειδίου του άνθρακα 7,2 mL/min.

Τα μικροφύκη ως φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί απαιτούν φως για τον πολλαπλασιασμό τους. Για το φωτισμό των φιαλών των δειγμάτων εντός του κλιβάνου επώασης χρησιμοποιήθηκε μεταλλική κυλινδρική διάταξη φωτισμού, έχοντας στο εσωτερικό της τοποθετημένους σε σειρά λαμπτήρες ισχύος 23 W ο καθένας, λευκού φωτός 3000 K (warm white) και έντασης 1500 lumens. Οι λαμπτήρες λειτουργούσαν με φωτοπερίοδο φωτός/σκότους ίση με 16/8 ώρες, ώστε να λαμβάνουν φως τα μικροφύκη για 16 ώρες καθημερινά και αδιάλειπτα.

Η ίδια ακριβώς διάταξη στον κλίβανο επώασης ακολουθήθηκε και για την ανάπτυξη της καλλιέργειας μικροφυκών στο τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα BG 11.

Για τη διεξαγωγή της δειγματοληψίας για τις απαιτούμενες καθημερινές αναλύσεις, οι κωνικές φιάλες των δειγμάτων απομακρύνονταν από τον κλίβανο επώασης και παράλληλα γινόταν διακοπή της παροχής διοξειδίου του άνθρακα και ατμοσφαιρικού αέρα. Οι φιάλες με τα δείγματα είναι σημαντικό να μένουν ελάχιστο χρόνο εκτός του κλιβάνου επώασης με τις βέλτιστες ρυθμιζόμενες συνθήκες, ώστε να μη διαταράσσεται ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροφυκών.

Στον **Πίνακα 3.1** βρίσκονται συγκεντρωμένα οι επιλεγμένες συνθήκες διεξαγωγής της πειραματικής διαδικασίας.

Πίνακας 3.1 Περιοχές τιμών των απαιτούμενων για τη πειραματική διαδικασία λειτουργικών παραμέτρων.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΤΙΜΗ
Παροχή αέρα	200 mL/min
Παροχή CO ₂	7,2 mL/min
Θερμοκρασία	23,5° C (± 0,5)
pH δειγμάτων	7,0 – 8,0
Φωτοπερίοδος	16/8

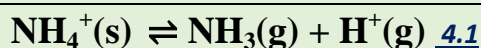
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Επίδραση του pH στην επεξεργασία του αποβλήτου

Κατά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας εξετάστηκε η σύγκριση της επεξεργασίας του αποβλήτου με τη δράση των μικροφυκών του γένους *Chlorella*, ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας το τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα BG 11, το οποίο είναι εκλεκτικό για την ανάπτυξη αυτού του γένους μικροφυκών.

Πρώτιστος στόχος της διπλωματικής αυτής είναι η μείωση του αμμωνιακού φορτίου των αποβλήτων και δευτερευόντως των υπολοίπων θρεπτικών συστατικών (φωσφορικά ιόντα και χημικά απαιτούμενο οξυγόνο) με παράλληλη αύξηση της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας των μικροφυκών, επομένως οι μεταβολές των παραπάνω στο πέρας του χρόνου υποδεικνύουν την αποτελεσματική επεξεργασία του εκάστοτε αποβλήτου με τη δράση των μικροφυκών.

Όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, τα περισσότερα μικροφύκη, συμπεριλαμβανομένων και του γένους *Chlorella*, αναπτύσσονται σε τιμές pH που κυμαίνονται μεταξύ της περιοχής του ουδέτερου (7,0 - 7,5) και ελαφρώς αλκαλικού (8,0 - 9,0). Στη περιοχή pH από 5,0 έως 9,0 η αμμωνία, που προκύπτει από την διάλυση της ουρίας στο νερό των αποβλήτων, είναι κυρίως σε μορφή ιοντική, δηλαδή ως αμμωνιακά ιόντα (NH_4^+) όπως φαίνεται στον **Πίνακα 4.1**. Αντίθετα, σε τιμές pH υψηλότερες του 9,0 (ή ακόμα και οριακά στο 8,7), η αμμωνία βρίσκεται υπό αέρια μορφή ως NH_3 και απομακρύνεται από τα υγρά απόβλητα λόγω της πτητικότητας που εμφανίζει. Η χημική αντίδραση που καθορίζει την ισορροπία αυτή είναι η εξής (**Εξίσωση 4.1**):



Πίνακας 4.1 Ποσοστό (%) μη ιονισμένης αμμωνίας σε υδατικά αζωτούχα διαλύματα, εκφρασμένα στο εύρος pH και θερμοκρασίας του παρόντος πειράματος (pH 7,0 – 8,5 και θερμοκρασία 23 – 24,3° C).

ΤΙΜΗ pH	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (° C)		
	23,0	23,5	24,3
7,0	0,491	0,509	0,527
7,1	0,617	0,640	0,663
7,2	0,776	0,804	0,833
7,3	0,975	1,01	1,05
7,4	1,22	1,27	1,31
7,5	1,54	1,59	1,65
7,6	1,93	2,00	2,07
7,7	2,41	2,50	2,59
7,8	3,02	3,13	3,24
7,9	3,77	3,90	4,04
8,0	4,70	4,87	5,03
8,1	5,85	6,05	6,25
8,2	7,25	7,50	7,75
8,3	8,96	9,25	9,56
8,4	11,0	11,4	11,7
8,5	13,5	13,9	14,4

(Florida Department of Environmental Protection, 2001)

Στον **Πίνακα 4.1** παρατηρείται η μεταβολή του ποσοστού συγκέντρωσης της αμμωνίας σε μη ιονισμένη μορφή (δηλαδή ως αέρια μορφή, NH₃), σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία και το pH του διαλύματος. Ο πίνακας αυτός εφαρμόστηκε στις συνθήκες του πειράματος της παρούσας διπλωματικής, δηλαδή για εύρος τιμών pH 7,0 έως 8,5 και για θερμοκρασία 23,0 έως 24,3° C. Όσο η τιμή του pH αλλά και η θερμοκρασία του υδατικού διαλύματος αυξάνεται, τόσο αυξάνεται εκθετικά το ποσοστό συγκέντρωσης της μη ιονισμένης αμμωνίας, η οποία και απομακρύνεται σε αέρια μορφή. Σε τιμή pH 8,5 παρατηρείται ουσιαστικά απομάκρυνση της αμμωνίας σε ποσοστό από 13,5% έως 14,4% για το προαναφερθέν στενό εύρος θερμοκρασιών, σε αντίθεση με την απομάκρυνση κατά 0,49 έως 0,52% σε pH 7,0.

Σημαντική, επομένως, είναι η παρακολούθηση και ρύθμιση του pH των δειγμάτων, ώστε να είναι σταθερό στα επίπεδα που υφίσταται η ιοντική μορφή της αμμωνίας και να μην υπερβαίνει τη κρίσιμη τιμή 9,0. Τρόποι ρύθμισης του pH είναι η χρήση ρυθμιστικού διαλύματος (π.χ. EDTA) ή οξέων που προκαλούν πτώση του pH, αλλά και μέσω προσθήκης διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) που δεσμεύει ιόντα OH⁻ για την παραγωγή HCO₃⁻.

Το CO₂ στις τιμές pH στις οποίες αναπτύσσονται τα περισσότερα μικροφύκη βρίσκεται διαλυμένο στο νερό είτε με μορφή διττανθρακικού (HCO₃⁻) είτε με μορφή ανθρακικού ιόντος (CO₃²⁻). Κατά τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης λαμβάνει χώρα δέσμευση του CO₂ από τα μικροφύκη. Ως αποτέλεσμα, σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση (**Εξίσωση 4.2**) η ισορροπία της αντίδρασης μετακινείται προς τα αριστερά για την παραγωγή του διοξειδίου του άνθρακα που θα αναπληρώσει το δεσμευμένο αέριο, με συνέπεια την κατανάλωση ιόντων υδρογόνου και την αύξηση του pH του διαλύματος.



Αρχικά, δοκιμάστηκε η τροφοδοσία των φιαλών των δειγμάτων μόνο με ατμοσφαιρικό αέρα με σταθερή παροχή 200 mL/min. Τα δείγματα αφορούν υγρό απόβλητο αναερόβιας χώνευσης συγκέντρωσης 5,5% και τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα BG 11 ίδιας συγκέντρωσης. Ο ατμοσφαιρικός αέρας συμβάλλει στην ανάδευση του υγρού, επομένως η διασπορά των κυττάρων μικροφυκών είναι

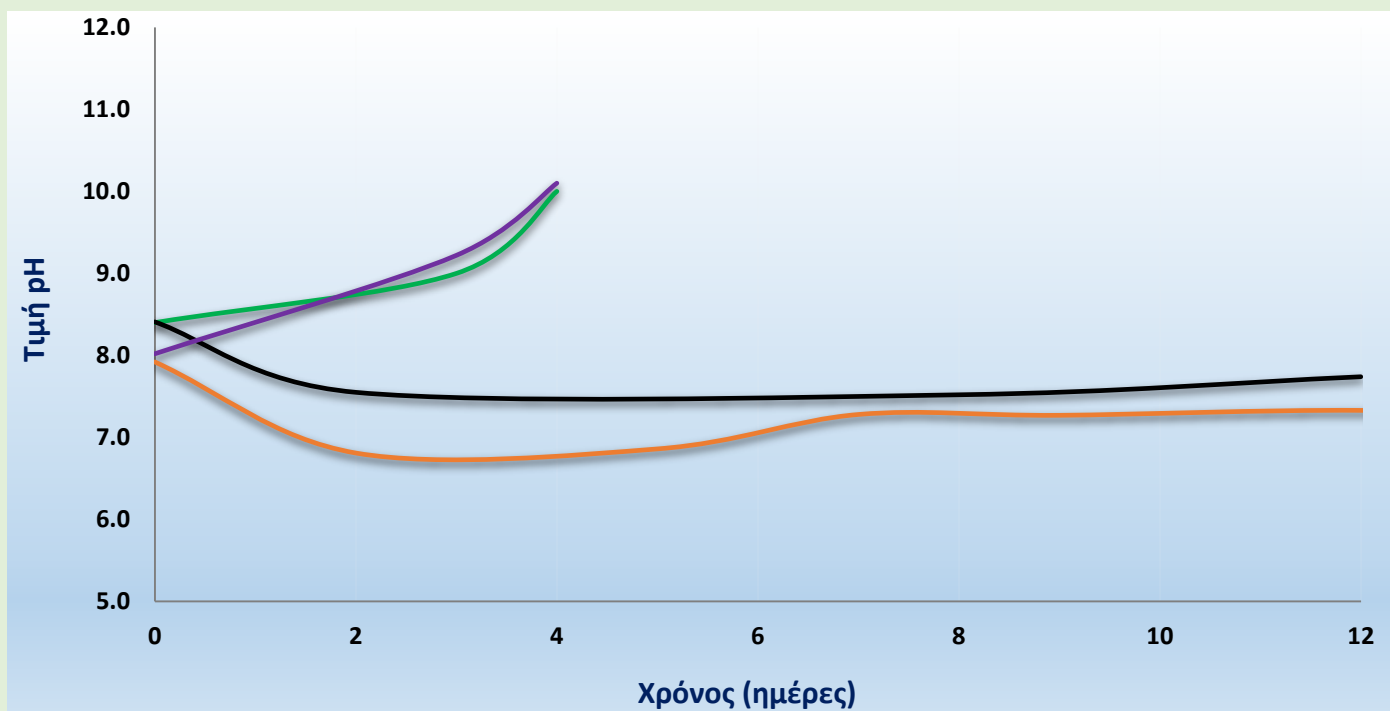
ομοιόμορφη. Ωστόσο, η προσθήκη αέρα προκαλεί την απομάκρυνση του -λιγιστού- περιεχόμενου διοξειδίου του άνθρακα στα υγρά απόβλητα, με αποτέλεσμα να παρατηρείται η αύξηση του pH εκτός των επιθυμητών ορίων σύμφωνα και με την **Εξίσωση 4.2**.

Για την διόρθωση και σταθεροποίηση της τιμής pH εντός των κατάλληλων ορίων (7,0 έως 8,5) και την διερεύνηση της επίδρασης στην αποτελεσματική επεξεργασία των αποβλήτων, δοκιμάστηκε η τροφοδοσία με διοξείδιο του άνθρακα με σταθερή παροχή 6 mL/min σε κάθε δείγμα.

Στην ενότητα αυτή ερευνήθηκε η επίδραση της τιμής pH των δειγμάτων υγρού αποβλήτου και τεχνητού θρεπτικού υποστρώματος, σε συνάρτηση με την τροφοδοσία διοξειδίου του άνθρακα, ως προς την αποδοτική επεξεργασία των αποβλήτων, όπως αυτή συνίσταται από τη μείωση του αμμωνιακού τους φορτίου και των άλλων παραμέτρων που προαναφέρθηκαν.

Για τα έντεκα (11) σχήματα που ακολουθούν στην ενότητα αυτή, η σήμανση είναι η εξής:

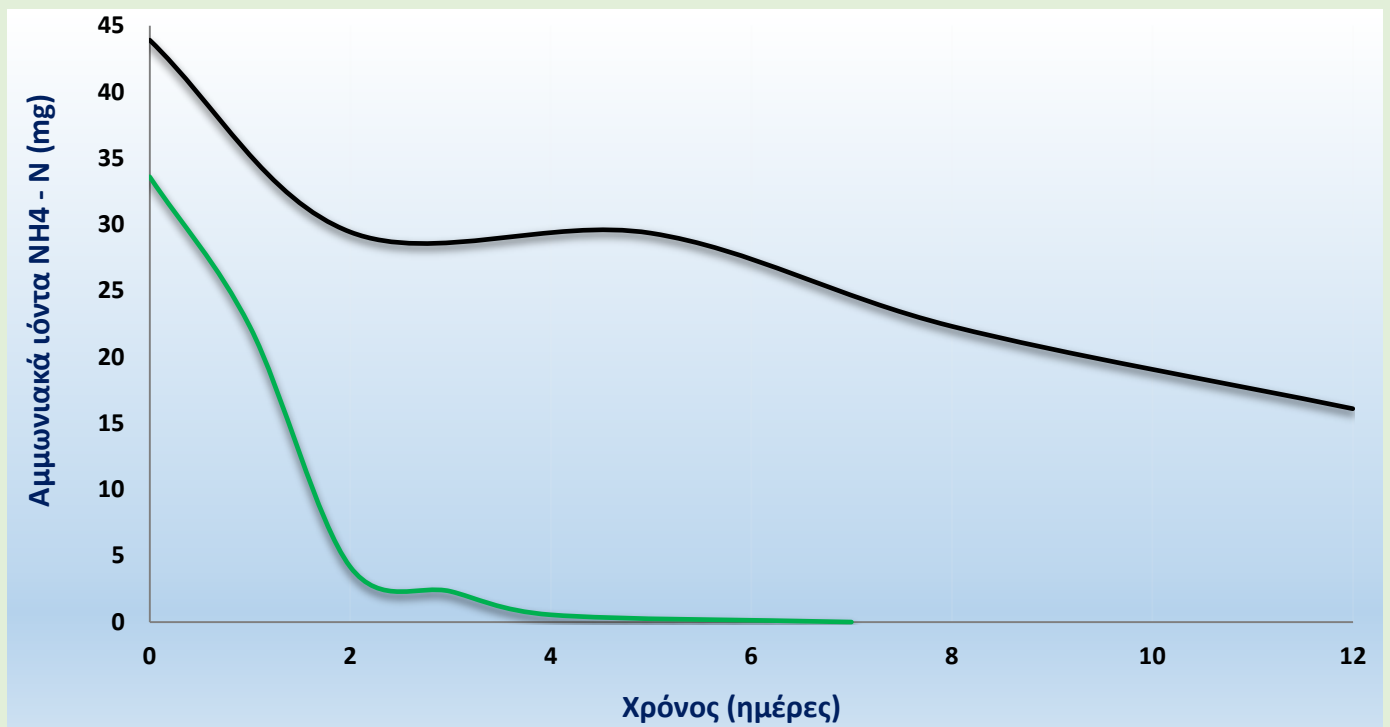
- ✚ Πράσινη γραμμή → Digestate 5,5% χωρίς παροχή διοξειδίου του άνθρακα (μόνο παροχή αέρα 200 mL/min), χωρίς ρύθμιση του pH
- ✚ Μαύρη γραμμή → Digestate 5,5% με παροχή διοξειδίου του άνθρακα (6 mL/min) και παροχή αέρα (200 mL/min), στο οποίο γίνεται ρύθμιση του pH
- ✚ Μωβ γραμμή → Τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα BG 11 5,5% χωρίς παροχή διοξειδίου του άνθρακα (μόνο παροχή αέρα 200 mL/min), χωρίς ρύθμιση του pH
- ✚ Πορτοκαλί γραμμή → Τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα BG 11 5,5% με παροχή διοξειδίου του άνθρακα (6 mL/min) και παροχή αέρα (200 mL/min), στο οποίο γίνεται ρύθμιση του pH



Σχήμα 4.1. Μεταβολή τιμής pH σε συνάρτηση με το χρόνο σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας CO₂ σε αναερόβιας χώνευσης υγρό απόβλητο και τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα BG 11.

Στο **Σχήμα 4.1** παρουσιάζεται η μεταβολή της τιμής του pH σε συνάρτηση με το χρόνο σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας διοξειδίου του άνθρακα στα δείγματα υγρού αποβλήτου αναερόβιας χώνευσης και τεχνητού θρεπτικού υποστρώματος BG 11. Παρατηρείται ότι απουσία CO₂, τόσο στο υγρό απόβλητο όσο και στο θρεπτικό υπόστρωμα BG 11 το pH από αρχική τιμή 8,0 – 8,4 φτάνει στη τιμή 10,1 στο πέρας τεσσάρων ημερών. Στη περιοχή αυτή του pH, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η αμμωνία περνάει σε αέρια μορφή και απομακρύνεται από τα δείγματα, όχι όμως λόγω του μεταβολισμού των μικροφυκών. Με τη προσθήκη CO₂ παρατηρείται σταθεροποίηση του pH με τη πάροδο δώδεκα ημερών, στο μεν υγρό απόβλητο στη περιοχή 6,8 έως 7,3, στο δε υπόστρωμα BG 11 στη τιμή 7,5.

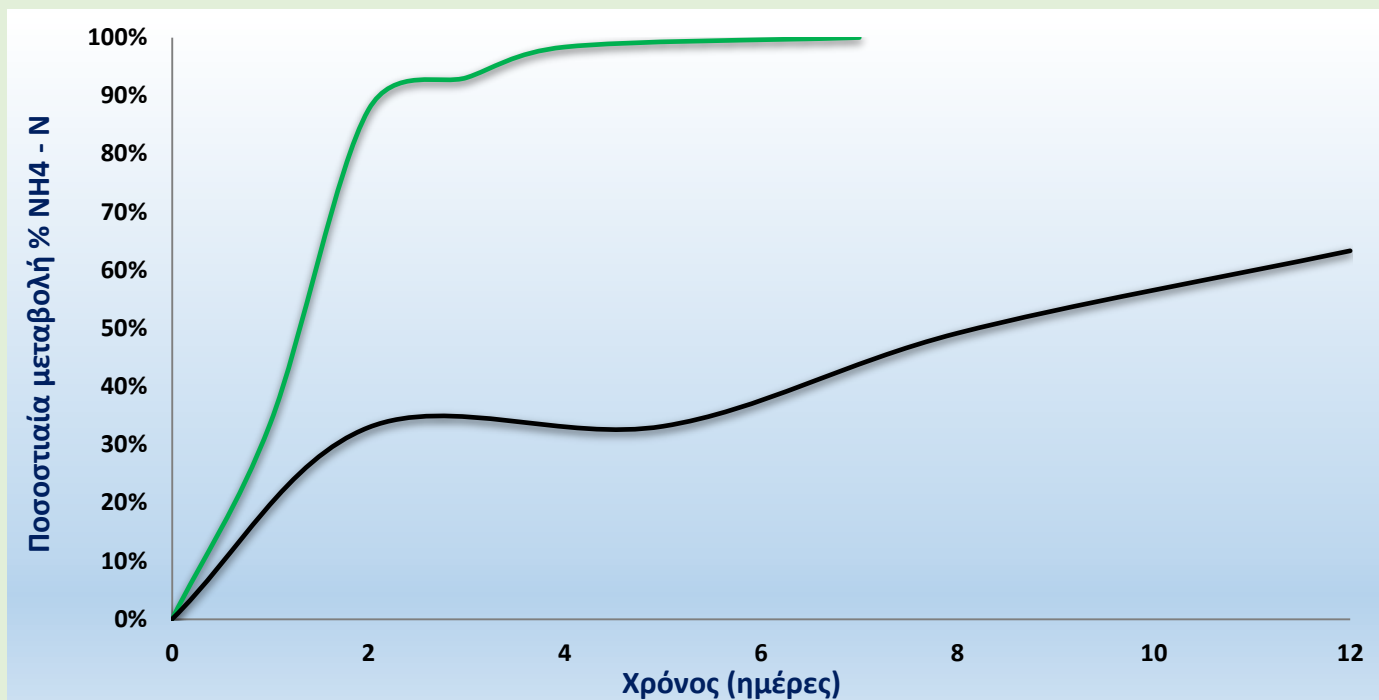
Συμπεραίνεται, επομένως, ότι η σταθερή παροχή διοξειδίου του άνθρακα εντός των δειγμάτων προκαλεί τη ρύθμιση και σταθεροποίηση του pH τους στα επιθυμητά όρια, στα οποία η αμμωνία υφίσταται με την ιοντική της μορφή και είναι εύκολα διαθέσιμη στα μικροφύκη να την μεταβολίσουν.



Σχήμα 4.2. Μεταβολή συγκέντρωσης αμμωνιακών ιόντων (σε mg) σε συνάρτηση με το χρόνο σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας CO₂ σε αναερόβιας χώνευσης υγρό απόβλητο.

Στο **Σχήμα 4.2** παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των αμμωνιακών ιόντων (NH₄ – N) σε mg σε συνάρτηση με το χρόνο σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας διοξειδίου του άνθρακα στα δείγματα υγρού αποβλήτου αναερόβιας χώνευσης. Απουσία CO₂ φαίνεται έντονη η μεταβολή της συγκέντρωσης των αμμωνιακών ιόντων, ώστε σε τέσσερις ημέρες να έχουν εξαντληθεί. Η έντονη αυτή μείωση προκύπτει μόνο από την μεταβολή του pH, το οποίο σύμφωνα με το **Σχήμα 4.1** την τέταρτη ημέρα ξεπέρασε τη τιμή 9 κι έφτασε τη τιμή 10,1, περιοχή στην οποία η αμμωνία μετατράπηκε σε αέρια μορφή και λόγω πτητικότητας απομακρύνθηκε εντελώς από τις φιάλες που περιείχαν το απόβλητο.

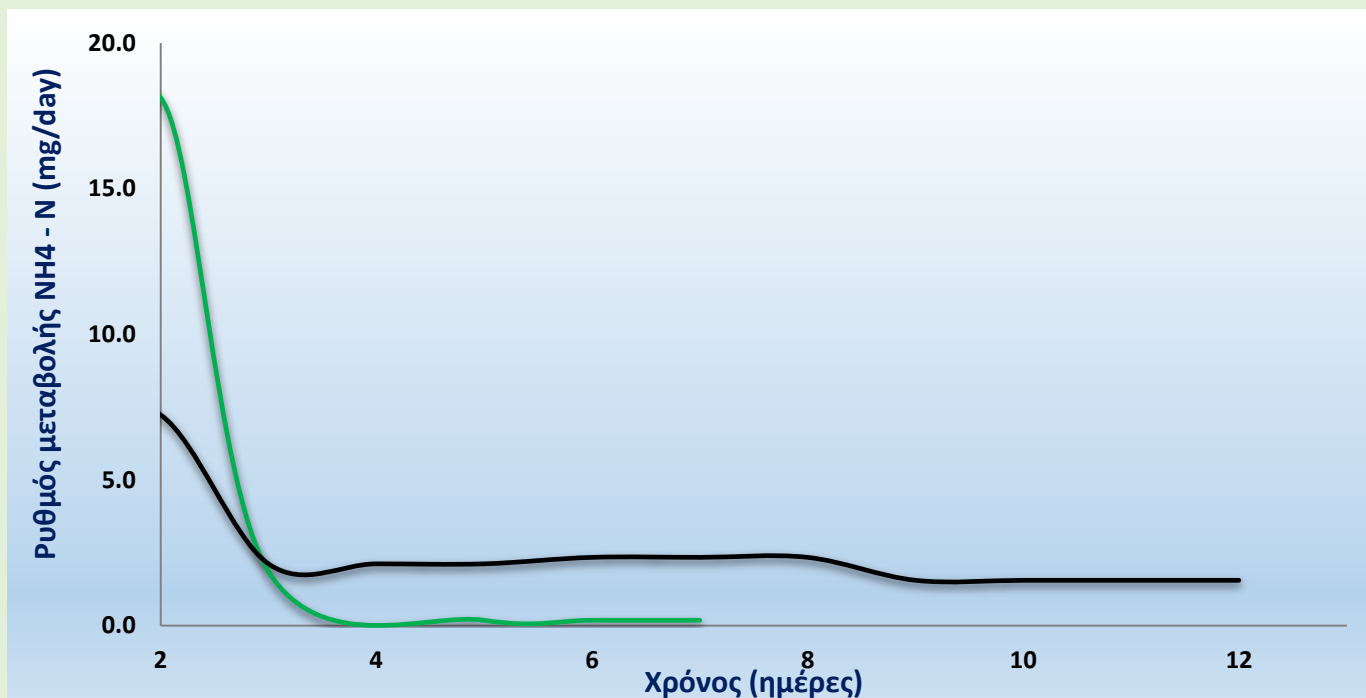
Στη περίπτωση προσθήκης CO₂ στο υγρό απόβλητο, χάρη στο οποίο η τιμή pH σταθεροποιήθηκε σε επίπεδα 6,8 έως 7,3, η συγκέντρωση των αμμωνιακών ιόντων μειώθηκε σταθερά εντός δώδεκα ημερών, λόγω μεταβολισμού τους από τα μικροφύκη του γένους *Chlorella*, και συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μείωση της τάξης των 27,8 mg.



Σχήμα 4.3. Ποσοστιαία μεταβολή συγκέντρωσης αμμωνιακών ιόντων σε συνάρτηση με το χρόνο σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας CO₂ σε αναερόβιας χώνευσης υγρό απόβλητο.

Στο **Σχήμα 4.3** παρουσιάζεται η ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης των αμμωνιακών ιόντων (NH₄ - N) σε συνάρτηση με το χρόνο σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας διοξειδίου του άνθρακα στα δείγματα υγρού αποβλήτου αναερόβιας χώνευσης. Απουσία CO₂ φαίνεται έντονη η ποσοστιαία μείωση της συγκέντρωσης των αμμωνιακών ιόντων, ώστε σε τρεις ημέρες να παρατηρείται μείωση κατά 93% και σε τέσσερις ημέρες πλήρης εξάντλησή τους. Η έντονη αυτή μείωση, όπως προαναφέρθηκε στο **Σχήμα 4.2** προκύπτει μόνο από την υπέρβαση της τιμής του pH και την απομάκρυνση της αμμωνίας σε αέρια μορφή.

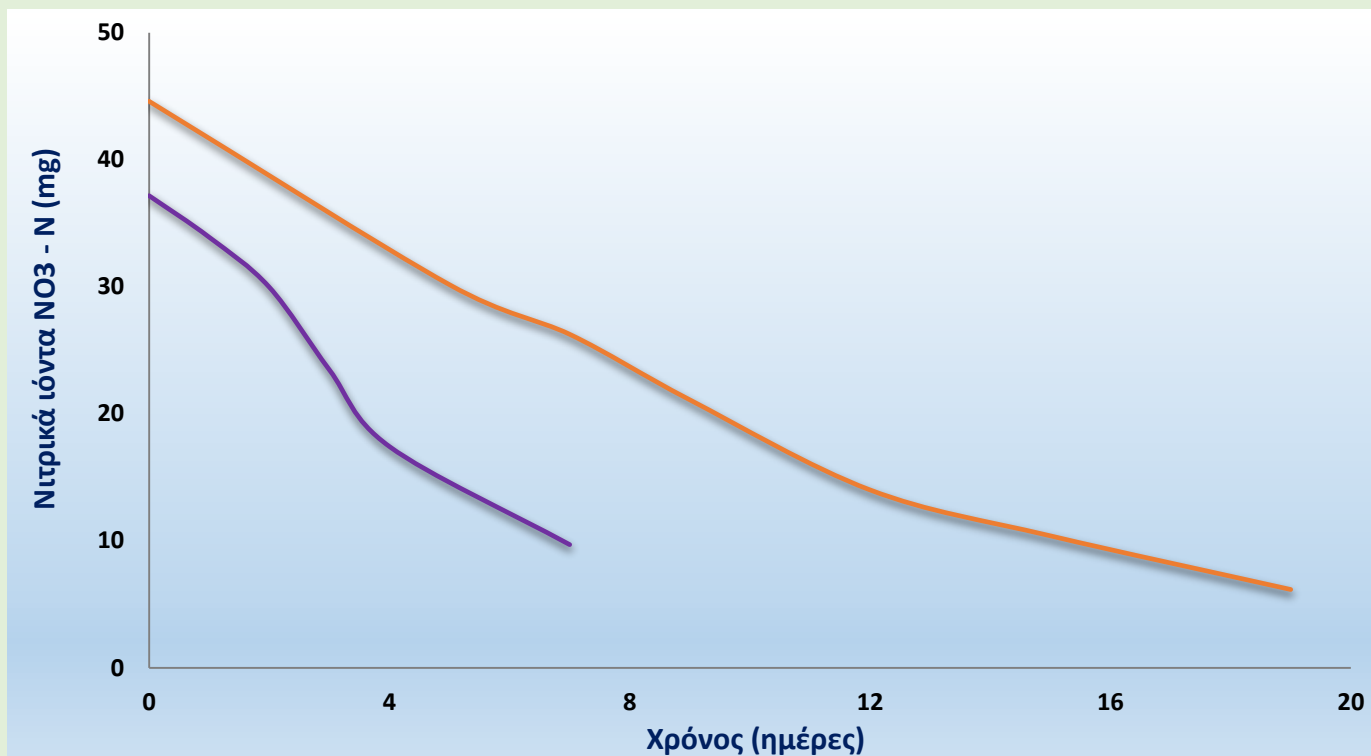
Στη περίπτωση προσθήκης CO₂ στο υγρό απόβλητο, κατά την οποία το pH δε ξεπέρασε τη τιμή 7,5, η συγκέντρωση των αμμωνιακών ιόντων παρουσιάζει σταθερή μεταβολή χάρη στη δράση των μικροφυκών του γένους *Chlorella* και συγκεκριμένα μειώθηκε κατά 63,3% εντός δώδεκα ημερών.



Σχήμα 4.4. Ρυθμός μεταβολής συγκέντρωσης αμμωνιακών ιόντων σε συνάρτηση με το χρόνο (mg/day) σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας CO₂ σε αναερόβιας χώνευσης υγρό απόβλητο.

Στο **Σχήμα 4.4** παρουσιάζεται ο ρυθμός μεταβολή της συγκέντρωσης των αμμωνιακών ιόντων (NH₄ – N) σε mg ανά ημέρα σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας διοξειδίου του άνθρακα στα δείγματα υγρού αποβλήτου αναερόβιας χώνευσης. Απουσία CO₂ φαίνεται ότι ο ρυθμός με τον οποίο μειώνονται τα αμμωνιακά ιόντα κατά τις δύο πρώτες ημέρες είναι μεγάλος, συγκεκριμένα 18,12 mg ανά ημέρα, ενώ στη πορεία μειώνεται αισθητά έως τη πλήρη εξάντληση των αμμωνιακών ιόντων από το υγρό απόβλητο. Η έντονη αυτή μείωση, όπως προαναφέρθηκε στα **Σχήματα 4.2** και **4.3** προκύπτει μόνο από την υπέρβαση της τιμής του pH και την απομάκρυνση της αμμωνίας σε αέρια μορφή.

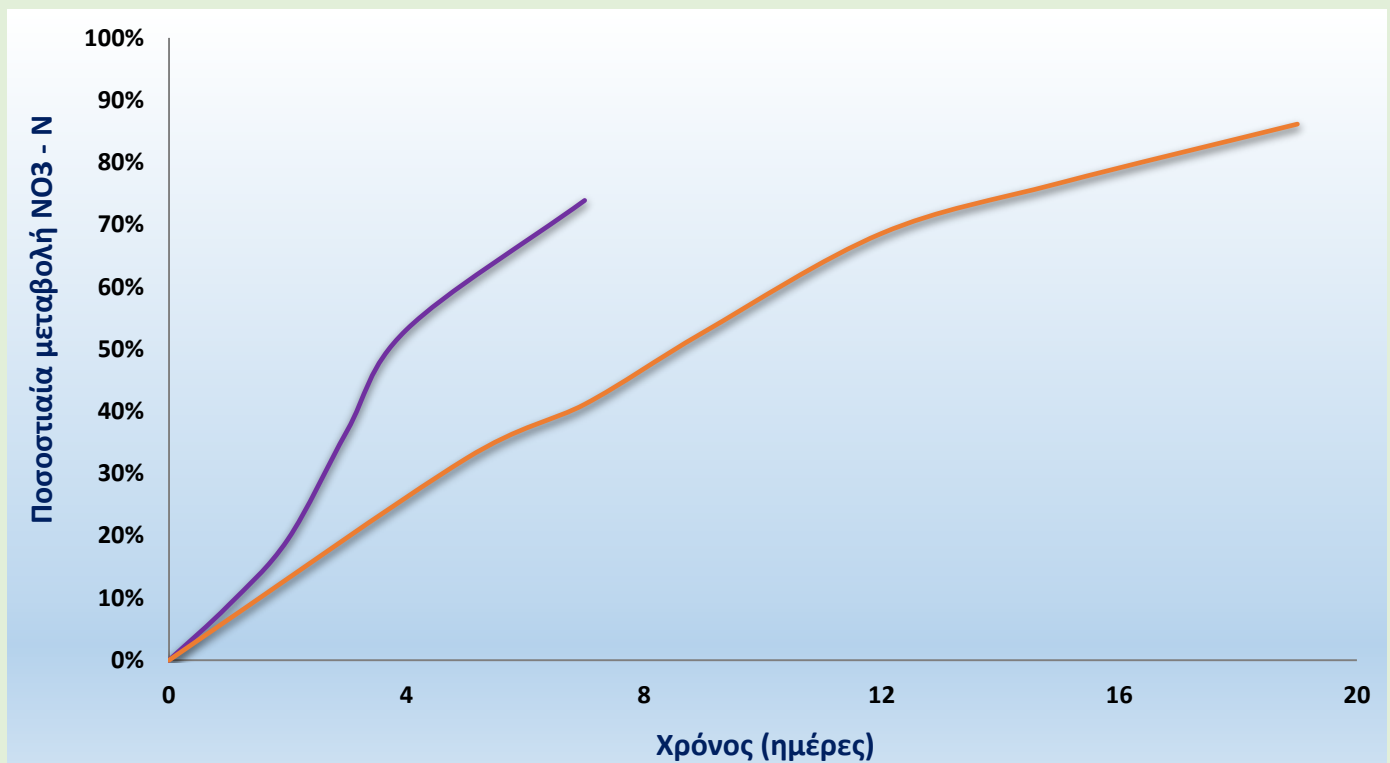
Στη περίπτωση προσθήκης CO₂ στο υγρό απόβλητο, κατά την οποία το pH ξεπέρασε τη τιμή 7,5, παρατηρείται κατά τις δύο πρώτες ημέρες ικανοποιητικός ρυθμός μείωσης των αμμωνιακών ιόντων (7,23 mg ανά ημέρα), ενώ την τρίτη ημέρα παρατηρείται επιβράδυνση και στη συνέχεια σταθερός αλλά χαμηλός ρυθμός μείωσης των αμμωνιακών ιόντων από τη δράση των μικροφυκών, της τάξης των 1,5 – 2,3 mg ανά ημέρα.



Σχήμα 4.5. Μεταβολή συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων (σε mg) σε συνάρτηση με το χρόνο σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας CO₂ σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα BG 11.

Στο **Σχήμα 4.5** παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων (NO₃ – N) σε mg σε συνάρτηση με το χρόνο σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας διοξειδίου του άνθρακα στο τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα BG 11. Να σημειωθεί ότι το τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα BG 11 περιέχει άζωτο σε μορφή νιτρικών ιόντων που μεταβολίζονται από τα μικροφύκη, παρόλα αυτά η βασικότερη μεταβολική δραστηριότητα των μικροφυκών αφορά τα αμμωνιακά ιόντα. Παρατηρείται ότι απουσία CO₂ υπάρχει έντονη πτωτική πορεία των νιτρικών ιόντων, της τάξεως των 27,48 mg μέσα σε επτά ημέρες. Η έντονη αυτή μείωση προκύπτει από τον μεταβολισμό τους από τα μικροφύκη, εφόσον στο υπόστρωμα αυτό δε βρίσκεται αμμωνία με τη μορφή αμμωνιακών ιόντων να καταναλώσουν.

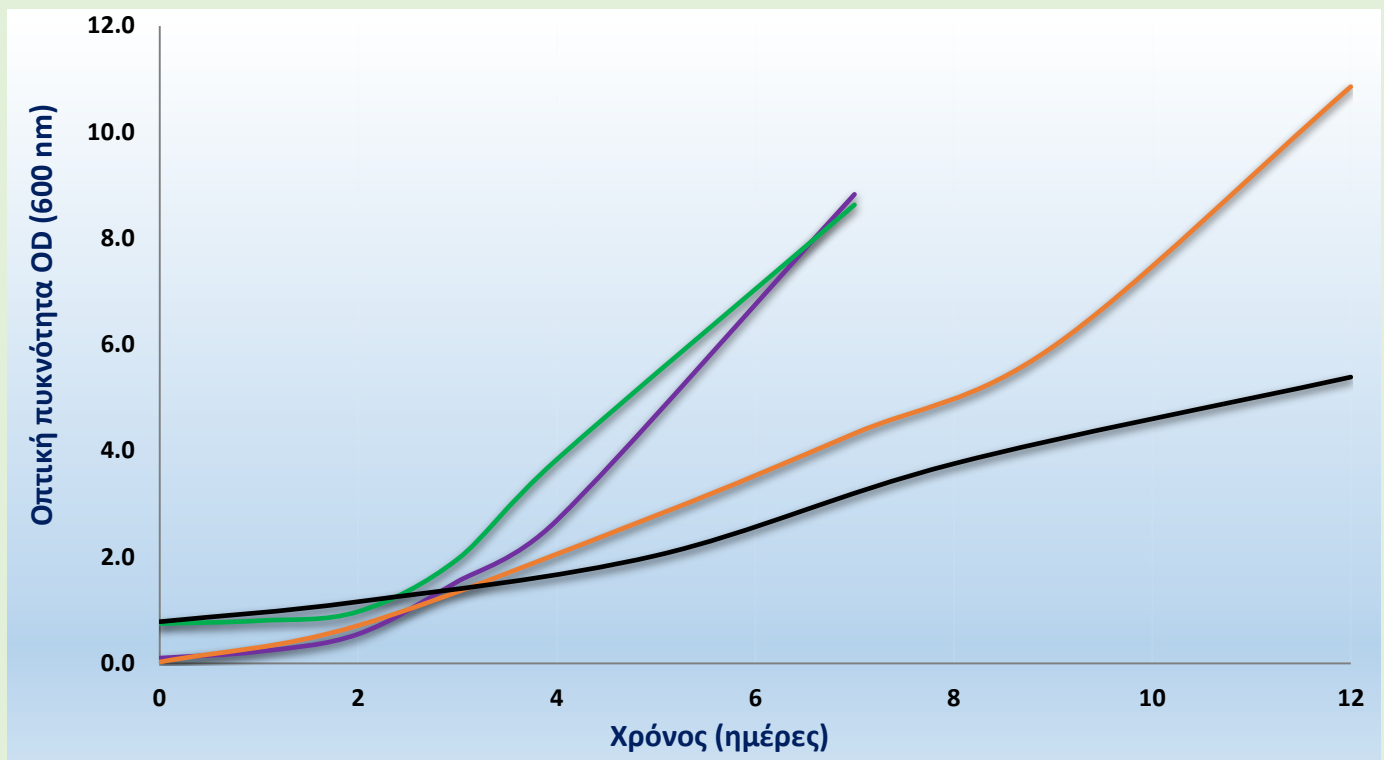
Στη περίπτωση προσθήκης CO₂ στο τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα BG 11, η συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων μειώθηκε σταθερά και σε ικανοποιητικό βαθμό εντός δεκαεννέα ημερών, λόγω μεταβολισμού τους από τα μικροφύκη του γένους *Chlorella*, και συγκεκριμένα σημειώθηκε μείωση κατά 38,44 mg.



Σχήμα 4.6. Ποσοστιαία μεταβολή συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων σε συνάρτηση με το χρόνο σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας CO₂ σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα BG 11.

Στο **Σχήμα 4.6** παρουσιάζεται η ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων (NO₃ – N) σε συνάρτηση με το χρόνο. Απουσία CO₂ φαίνεται σταθερά αυξητική η ποσοστιαία μείωση της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων, 74% μέσα σε επτά ημέρες. Η μείωση αυτή, όπως προαναφέρθηκε στο **Σχήμα 4.5** προκύπτει από τον μεταβολισμό τους από τα μικροφύκη, εφόσον στο υπόστρωμα αυτό δε βρίσκεται αμμωνία με τη μορφή αμμωνιακών ιόντων να καταναλώσουν.

Στη περίπτωση προσθήκης CO₂, η συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων παρουσιάζει σταθερή μεταβολή χάρη στη δράση των μικροφυκών του γένους *Chlorella* και συγκεκριμένα μειώθηκε κατά 86% επί του συνόλου του εντός δεκαεννέα ημερών.



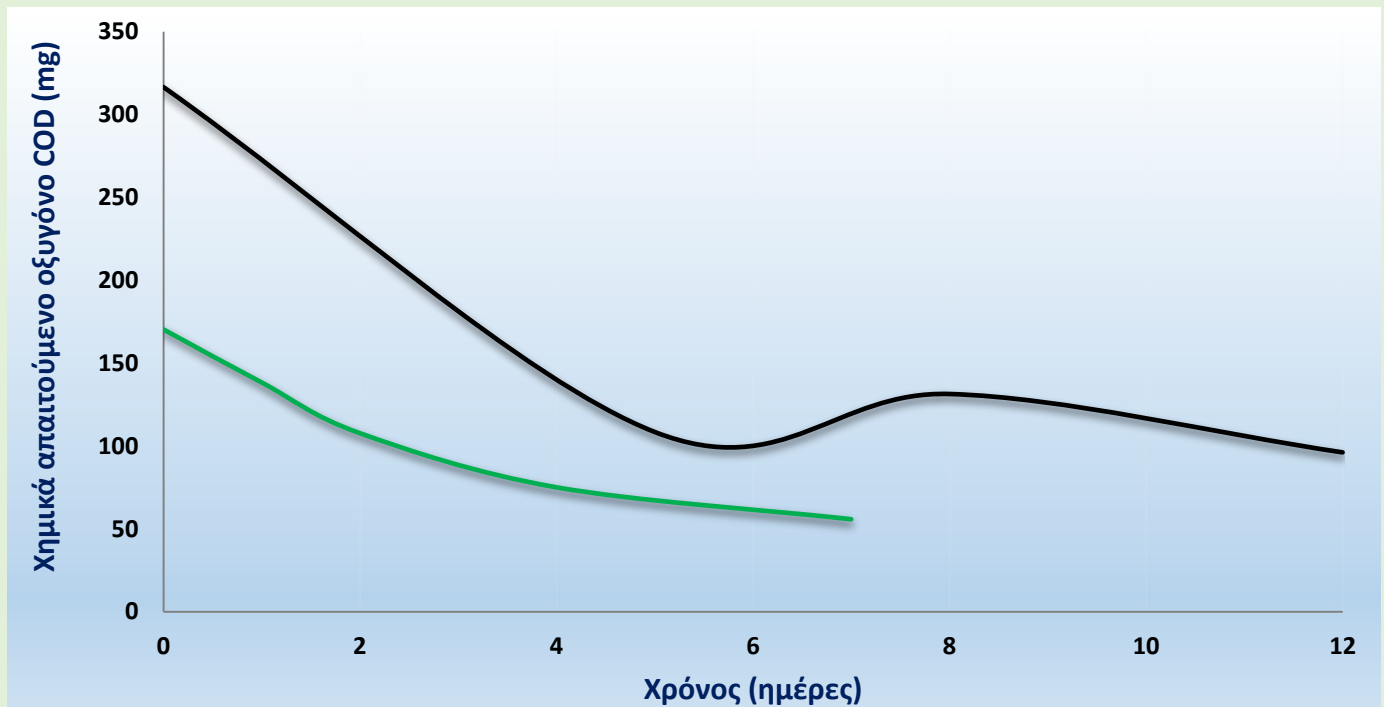
Σχήμα 4.7. Μεταβολή οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας μικροφυκών (μετρημένη στα 600 nm) σε συνάρτηση με το χρόνο σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας CO₂ σε αναερόβιας χώνευσης υγρό απόβλητο και τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα BG 11.

Στο **Σχήμα 4.7** παρουσιάζεται η μεταβολή της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας μικροφυκών, όπως αυτή μετράται σε φασματοφωτόμετρο στα 600 nm, σε συνάρτηση με το χρόνο. Παρατηρείται ότι τόσο απουσία όσο και παρουσία CO₂, τα κύτταρα του γένους *Chlorella* αναπτύσσονται επαρκώς και στο υγρό απόβλητο αλλά και στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα. Τα κύτταρα των μικροφυκών αναπτύσσονται με τον ίδιο τρόπο στα δύο είδη υποστρωμάτων κατά τις συνθήκες απουσίας παροχής CO₂ και επερχόμενης αύξησης του pH, επιτυγχάνοντας οπτική πυκνότητα της τάξεως του 8,7 κατά μέσο όρο μέσα σε επτά ημέρες. Το φαινόμενο αυτό εξηγείται κυρίως λόγω της συμπύκνωσης των δειγμάτων, στα οποία αυξήθηκε η θολερότητα λόγω απομάκρυνσης του περιεχόμενου στα δείγματα νερού. Με την εξάτμιση του περιεχόμενου στο υγρό υπόστρωμα νερού, παρατηρείται μείωση του όγκου του και συμπύκνωση των υπό διάλυση χημικών ουσιών και στερεών, όπως είναι και τα κύτταρα των μικροφυκών. Παράλληλα, η συμπύκνωση προκαλεί αύξηση του χρωματισμού του υγρού υποστρώματος από την έντονη ανάπτυξη των πράσινων

φωτοσυνθετικών μικροφυκών, με αποτέλεσμα η μετρούμενη οπτική πυκνότητα των δειγμάτων να είναι αυξημένη.

Τα κύτταρα των μικροφυκών λόγω της παροχής αέρα είχαν το έναυσμα να πολλαπλασιαστούν ως ένα βαθμό και να επιβιώσουν στις αυξημένες τιμές pH, χωρίς να μεταβολίζουν τα θρεπτικά των δύο υποστρωμάτων. Άλλωστε, στην οπτική πυκνότητα προσμετρώνται και νεκρά κύτταρα, θραυσμένα ή σε κατάσταση στατικής ανάπτυξης, γεγονός που δικαιολογείται από τα επίπεδα του pH.

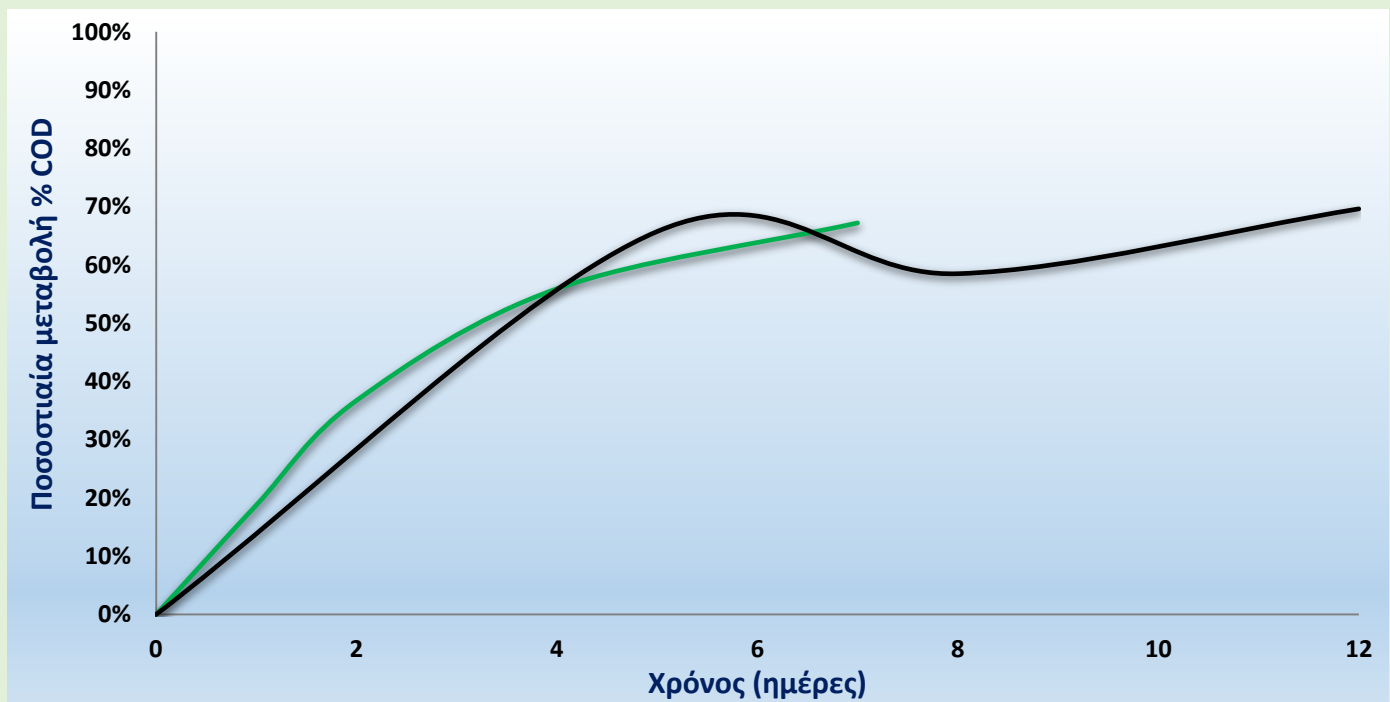
Ωστόσο, παρουσία διοξειδίου του άνθρακα παρατηρούνται διαφορές μεταξύ της τελικής οπτικής πυκνότητας (και επομένως της ανάπτυξης των μικροφυκών) στα δύο διαφορετικά υποστρώματα. Η οπτική πυκνότητα του τεχνητού θρεπτικού υποστρώματος BG 11 παρουσιάζει σε δώδεκα ημέρες αύξηση κατά 10,19, ενώ η αντίστοιχη αύξηση στο ίδιο χρονικό διάστημα για τα κύτταρα μικροφυκών που αναπτύχθηκαν στο υγρό απόβλητο είναι κατά 4,6. Η διαφορά αυτή, παρόλη την ίδια παροχή διοξειδίου του άνθρακα και τη σταθεροποίηση του pH των δύο υποστρωμάτων, μπορεί να δικαιολογηθεί από τη θολερότητα κάθε υποστρώματος. Το τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα BG 11 είναι υγρό αρχικά διάφανο (μηδενική οπτική πυκνότητα), γεγονός που επιτρέπει αβίαστα τη διέλευση του φωτός, το οποίο χρειάζονται τα μικροφύκη για να φωτοσυνθέσουν και να πολλαπλασιαστούν. Επομένως, η τελική οπτική πυκνότητα στο υπόστρωμα BG 11 υποδηλώνει εξαιρετική αύξηση των κυττάρων του στελέχους *Chlorella sorokiniana*. Αντίθετα, το υγρό απόβλητο αναερόβιας χώνευσης, λόγω του σκούρου χρώματός του, έχει αυξημένη αρχική οπτική πυκνότητα (περίπου 0,800), παρόλο που έγινε αραίωσή του σε συγκέντρωση 5,5%. Η θολερότητα του υγρού αποβλήτου δυσχεραίνει σε κάποιο βαθμό την διέλευση των φωτεινών ακτινών, επομένως τα κύτταρα των μικροφυκών έχουν μικρότερη διαθεσιμότητα σε φως για να φωτοσυνθέσουν και άρα να αναπτυχθούν με έντονο ρυθμό.



Σχήμα 4.8. Μεταβολή συγκέντρωσης χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (σε mg) σε συνάρτηση με το χρόνο σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας CO₂ σε αναερόβιας χώνευσης υγρό απόβλητο.

Στο **Σχήμα 4.8** παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD) σε mg σε συνάρτηση με το χρόνο. Απουσία CO₂ φαίνεται ικανοποιητική η μεταβολή της συγκέντρωσης του COD, καθώς μειώθηκε κατά 114,43 mg μέσα σε διάστημα επτά ημερών.

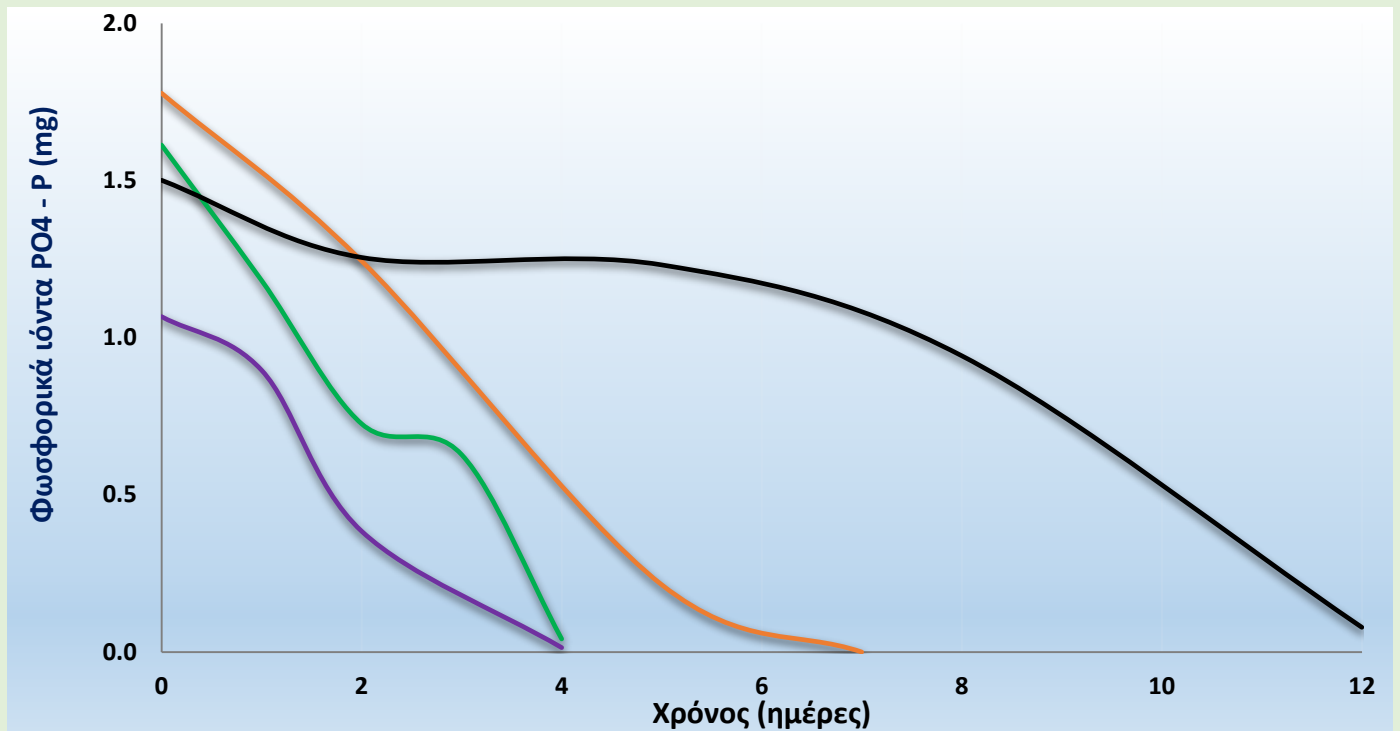
Κατά τη προσθήκη CO₂, η συγκέντρωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου μειώθηκε σταθερά τις πρώτες έξι ημέρες κατά 210 mg, ενώ για τις επόμενες έξι ημέρες παρουσίασε σχεδόν σταθερή πορεία, με μικρές διακυμάνσεις και ήπια μείωση, έως τη τελική τιμή των 96,14 mg. Τα κύτταρα της *Chlorella sorokiniana* αναπτύχθηκαν και μέσω του μεταβολισμού τους μείωσαν το COD του αποβλήτου, παράλληλα όμως η μείωση αυτή μπορεί να επιτεύχθηκε συνδυαστικά από άλλους χημικοτροφικούς μικροοργανισμούς που περιέχει το απόβλητο.



Σχήμα 4.9. Ποσοστιαία μεταβολή συγκέντρωσης χημικά απαιτούμενου οξυγόνου σε συνάρτηση με το χρόνο σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας CO₂ σε αναερόβιας χώνευσης υγρό απόβλητο.

Στο **Σχήμα 4.9** παρουσιάζεται η ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD) σε συνάρτηση με το χρόνο. Απουσία CO₂ φαίνεται ήπια αλλά σταθερή η μεταβολή της συγκέντρωσης του COD, καθώς μειώθηκε κατά 67% μέσα σε επτά ημέρες.

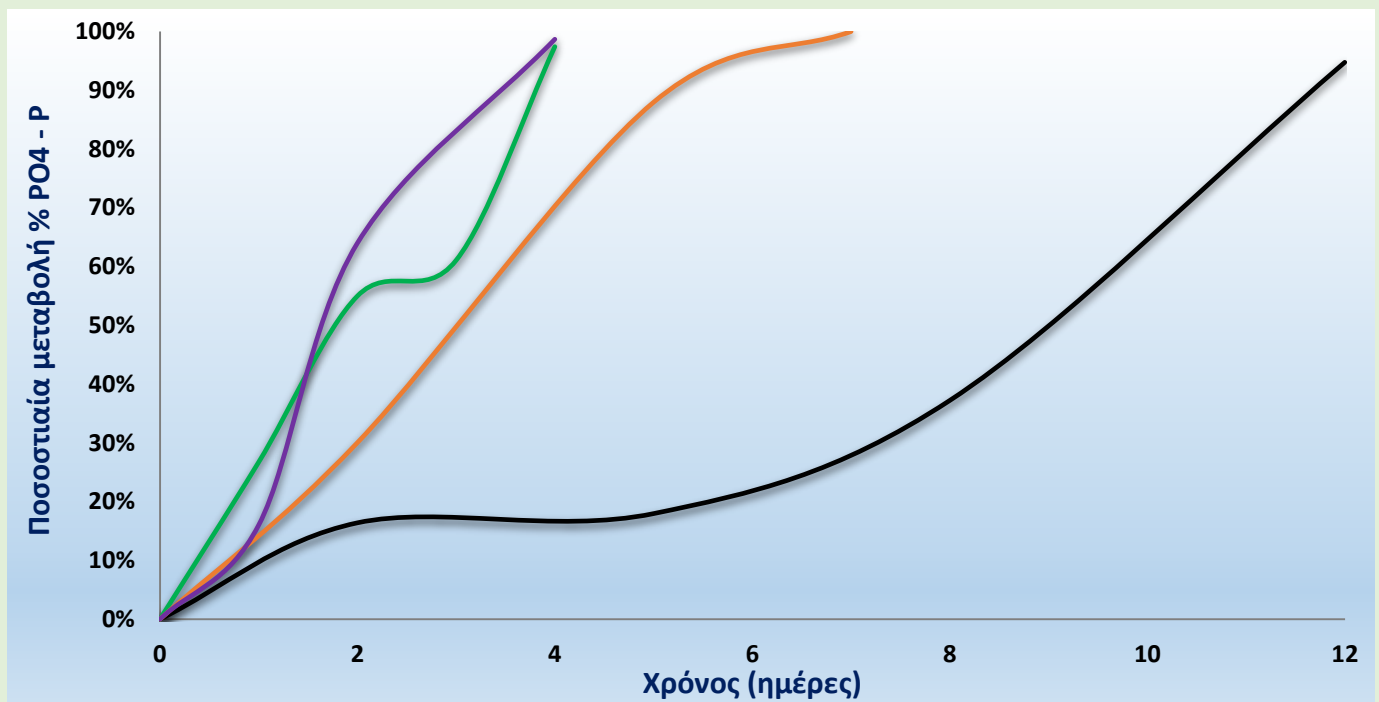
Παρουσία CO₂, η συγκέντρωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου καταναλώθηκε με σταθερό ρυθμό κατά τις πρώτες έξι ημέρες με μείωση 69%, για τις επόμενες δύο ημέρες παρουσίασε επιβράδυνση η κατανάλωσή του, ενώ μέχρι το πέρας δώδεκα ημερών παρατηρείται τελική μείωσή του κατά 70%.



Σχήμα 4.10. Μεταβολή συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων (σε mg) σε συνάρτηση με το χρόνο σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας CO₂ σε αναερόβιας χώνευσης υγρό απόβλητο και τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα BG 11.

Στο **Σχήμα 4.10** παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων (PO₄ - P) σε mg σε συνάρτηση με το χρόνο. Απουσία CO₂, στο υπόστρωμα BG 11 φαίνεται έντονη η κατανάλωση των φωσφορικών ιόντων από τα μικροφύκη, τα οποία μπορούν σε ένα βαθμό να αναπτυχθούν στο θρεπτικό υπόστρωμα ακόμα και χωρίς διοξείδιο του άνθρακα αλλά μόνο με αερισμό (όπως φάνηκε και στην οπτική πυκνότητά του στο **Σχήμα 4.7**). Συγκεκριμένα, εντός τεσσάρων ημερών τα φωσφορικά ιόντα καταναλώνονται πλήρως, παρόλα αυτά η αρχική συγκέντρωσή τους ήταν σημαντικά χαμηλότερη από τα υπόλοιπα δείγματα, γεγονός που εξηγεί τη σύντομη εξάντλησή τους. Στο υγρό απόβλητο χωρίς τη προσθήκη CO₂ παρατηρείται έντονη πτώση της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων κατά τις δύο πρώτες μέρες και συγκεκριμένα κατά 1 mg, ενώ στη συνέχεια φαίνονται μικρές διακυμάνσεις μέχρι τη τελική εξάντλησή τους.

Στη περίπτωση προσθήκης CO₂ στο τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα BG 11 παρατηρείται σταθερή πτωτική πορεία της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων και συγκεκριμένα μείωση κατά 1,78 mg μέχρι τη πλήρη εξάντλησή τους την έβδομη ημέρα της πειραματικής διαδικασίας. Στο υγρό απόβλητο αναερόβιας χώνευσης παρουσία CO₂ παρατηρείται μειωμένος ρυθμός κατανάλωσης των φωσφορικών ιόντων κατά τις πρώτες έξι ημέρες κι έπειτα μέχρι τη δωδέκατη ημέρα παρατηρείται έντονη πτωτική τάση, με αποτέλεσμα τη πλήρη κατανάλωση του συνόλου των φωσφορικών ιόντων του αποβλήτου. Η μικρή πτωτική πορεία των πρώτων έξι ημερών πιθανώς οφείλεται στη φάση προσαρμογής των κυττάρων των μικροφυκών στο υγρό απόβλητο.



Σχήμα 4.11. Ποσοστιαία μεταβολή συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων σε συνάρτηση με το χρόνο σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας CO₂ σε αναερόβιας χώνευσης υγρό απόβλητο και τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα BG 11.

Στο **Σχήμα 4.11** παρουσιάζεται η ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων (PO₄ - P) σε συνάρτηση με το χρόνο. Παρατηρείται ότι απουσία CO₂ στο υπόστρωμα BG 11 η μεταβολή των φωσφορικών ιόντων από τα μικροφύκη είναι έντονη και επιτυγχάνεται μείωσή τους κατά 99% σε τέσσερις ημέρες. Στο υγρό απόβλητο απουσία CO₂ παρατηρείται έντονη μεταβολή της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων κατά τις δύο πρώτες μέρες και συγκεκριμένα κατά 55%, ενώ στη συνέχεια με μικρή διακύμανση επιτυγχάνεται μείωσή τους κατά 97% σε τέσσερις συνολικά ημέρες.

Στη περίπτωση προσθήκης CO₂ στο τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα BG 11, παρατηρείται σταθερή πορεία μεταβολής της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων και πλήρης εξάντλησή τους μέσα σε διάστημα επτά ημερών. Στο υγρό απόβλητο παρουσία CO₂ παρατηρείται μειωμένος ρυθμός κατανάλωσης των φωσφορικών ιόντων κατά τις πρώτες έξι ημέρες κι έπειτα μέχρι τη δωδέκατη ημέρα παρατηρείται έντονη μεταβολή της ολικής τους συγκέντρωσης, με αποτέλεσμα τη μείωσή τους κατά 95% στο πέρας των δώδεκα ημερών.

Συγκεντρωτικά, παρατηρήθηκε ότι το pH των υποστρωμάτων παίζει σημαντικό ρόλο στην κατανάλωση των θρεπτικών συστατικών τους, καθώς επηρεάζει την εύρυθμη ανάπτυξη της καλλιέργειας. Απουσία ρύθμισης του pH, δηλαδή χωρίς τη τεχνητή προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα στα δείγματα, τα φωτοσυνθετικά μικροφύκη τείνουν να αναπτύσσονται αλλά με βραδύ ρυθμό, ενώ καταφέρνουν να μεταβολίσουν κάποια ποσότητα των θρεπτικών συστατικών των υποστρωμάτων. Πρόβλημα όμως παρουσιάζεται όταν το pH ξεπεράσει τη τιμή 9, καθώς τότε επηρεάζεται η συγκέντρωση των αμμωνιακών ιόντων λόγω αλλαγής της ισορροπίας της αντίδρασης και απομακρύνεται ως αμμωνία σε αέρια μορφή. Αντίθετα, διοχετεύοντας τεχνητά στα δείγματα σταθερή παροχή CO₂, ρυθμίζοντας έτσι τη τιμή του pH εντός των επιθυμητών ορίων (7,0 – 8,0), επιτυγχάνεται η παραμονή του αμμωνιακού αζώτου στα δείγματα με τη μορφή αμμωνιακών ιόντων, τα οποία είναι άμεσα προσβάσιμα στα κύτταρα του μικροφύκου *Chlorella sorokiniana* ως πηγή τροφής τους. Παράλληλα, με τη προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα, τα μικροφύκη φαίνεται να πολλαπλασιάζονται με επιταχυνόμενο και βέλτιστο ρυθμό, καθώς αξιοποιούν ως πηγή άνθρακα το CO₂, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειάς τους και να μειώνεται η συγκέντρωση όλων των θρεπτικών συστατικών των υποστρωμάτων, όπως το χημικό απαιτούμενο οξυγόνο, τα φωσφορικά ιόντα και τα νιτρικά ιόντα στη περίπτωση του θρεπτικού υποστρώματος BG 11.

Επομένως, στην υπόλοιπη πειραματική διαδικασία εφαρμόστηκε προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα εντός των δειγμάτων με σταθερή ροή 7,2 mL CO₂/min σε κάθε φιάλη δείγματος, από την πρώτη ως τη τελευταία μέρα διεξαγωγής του εκάστοτε πειράματος, για την εξασφάλιση της σταθερότητας του pH εντός των επιθυμητών ορίων.

4.2 Επίδραση των στελεχών *Chlorella sorokiniana* και *Chlorella vulgaris* στην επεξεργασία του αποβλήτου

Έπειτα από τη διερεύνηση της επίδρασης του pH στην αποτελεσματική επεξεργασία των υγρών αποβλήτων, έγινε η αναζήτηση της πιθανής επίδρασης που μπορεί να έχουν στην επεξεργασία αυτή τα ίδια τα μικροφύκη. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά στελέχη του γένους *Chlorella* και τα δείγματα αναλύθηκαν ως προς τη συγκέντρωση αμμωνιακών και φωσφορικών ιόντων και χημικά απαιτούμενου οξυγόνου σε συνάρτηση με τον χρόνο.

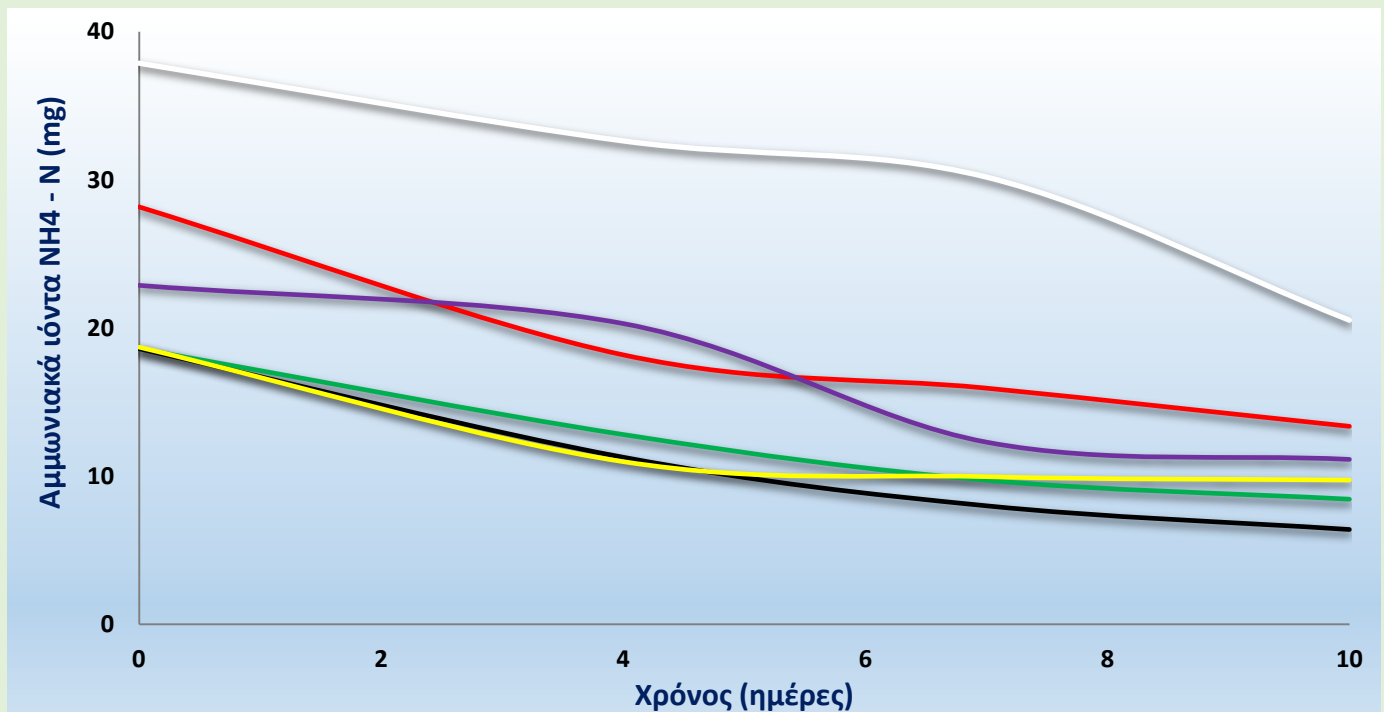
Τα μικροφύκη είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούν πηγή άνθρακα, αζώτου και άλλα θρεπτικά συστατικά, παράλληλα με την αξιοποίηση του φωτός, για να φωτοσυνθέσουν και να αναπτυχθούν. Συγκεκριμένα, τα μικροφύκη του γένους *Chlorella* επιλέχθηκαν λόγω του ανθεκτικού χαρακτήρα τους σε επιβλαβείς ουσίες που υπάρχουν στο περιβάλλον και ειδικότερα στα υγρά απόβλητα αναερόβιας χώνευσης. Παράλληλα, είναι ανθεκτικά στην δράση των βαρέων μετάλλων που πιθανόν να περιέχουν τα χρησιμοποιούμενα απόβλητα.

Το γένος *Chlorella*, μεταξύ άλλων, εμπεριέχει τα στελέχη *Chlorella sorokiniana* και *Chlorella vulgaris* με κοινά χαρακτηριστικά στην ανάπτυξή τους, τις θρεπτικές προτιμήσεις τους και την μορφολογία τους. Συνεπώς, επιλέχθηκαν τα παραπάνω δύο στελέχη με σκοπό την σύγκρισή τους ως προς την κατανάλωση των θρεπτικών συστατικών και την ανοχή τους στο συγκεκριμένο βεβαρυμμένο απόβλητο.

Για τα έξι (6) σχήματα που ακολουθούν στην ενότητα αυτή, η σήμανση είναι η εξής:

- ✚ Λευκή γραμμή → Digestate 6,5% χωρίς εμβολιασμό με μικροφύκη (blanc/ μάρτυρας) με παροχή διοξειδίου του άνθρακα 7,2 mL/min και παροχή αέρα 200 mL/min
- ✚ Πράσινη γραμμή → Digestate 3,25% με αρχικό εμβόλιο 6 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella vulgaris* με παροχή διοξειδίου του άνθρακα 7,2 mL/min και παροχή αέρα 200 mL/min
- ✚ Μαύρη γραμμή → Digestate συγκέντρωσης 3,25% με αρχικό εμβόλιο 5,5 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella sorokiniana* με παροχή διοξειδίου του άνθρακα 7,2 mL/min και παροχή αέρα 200 mL/min

- ✚ Κόκκινη γραμμή → Digestate 6,5% με αρχικό εμβόλιο 6 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella vulgaris* με παροχή διοξειδίου του άνθρακα 7,2 mL/min και παροχή αέρα 200 mL/min
- ✚ Κίτρινη γραμμή → Digestate 0,65% με αρχικό εμβόλιο 5 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella sorokiniana* με παροχή διοξειδίου του άνθρακα 7,2 mL/min και παροχή αέρα 200 mL/min
- ✚ Μωβ γραμμή → Digestate 1,3% με αρχικό εμβόλιο 5 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella sorokiniana* με παροχή διοξειδίου του άνθρακα 7,2 mL/min και παροχή αέρα 200 mL/min



Σχήμα 4.12. Μεταβολή συγκέντρωσης αμμωνιακών ιόντων (σε mg) σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσία δύο διαφορετικών στελεχών του μικροφύκου *Chlorella* σε αναερόβιας χώνευσης υγρό απόβλητο.

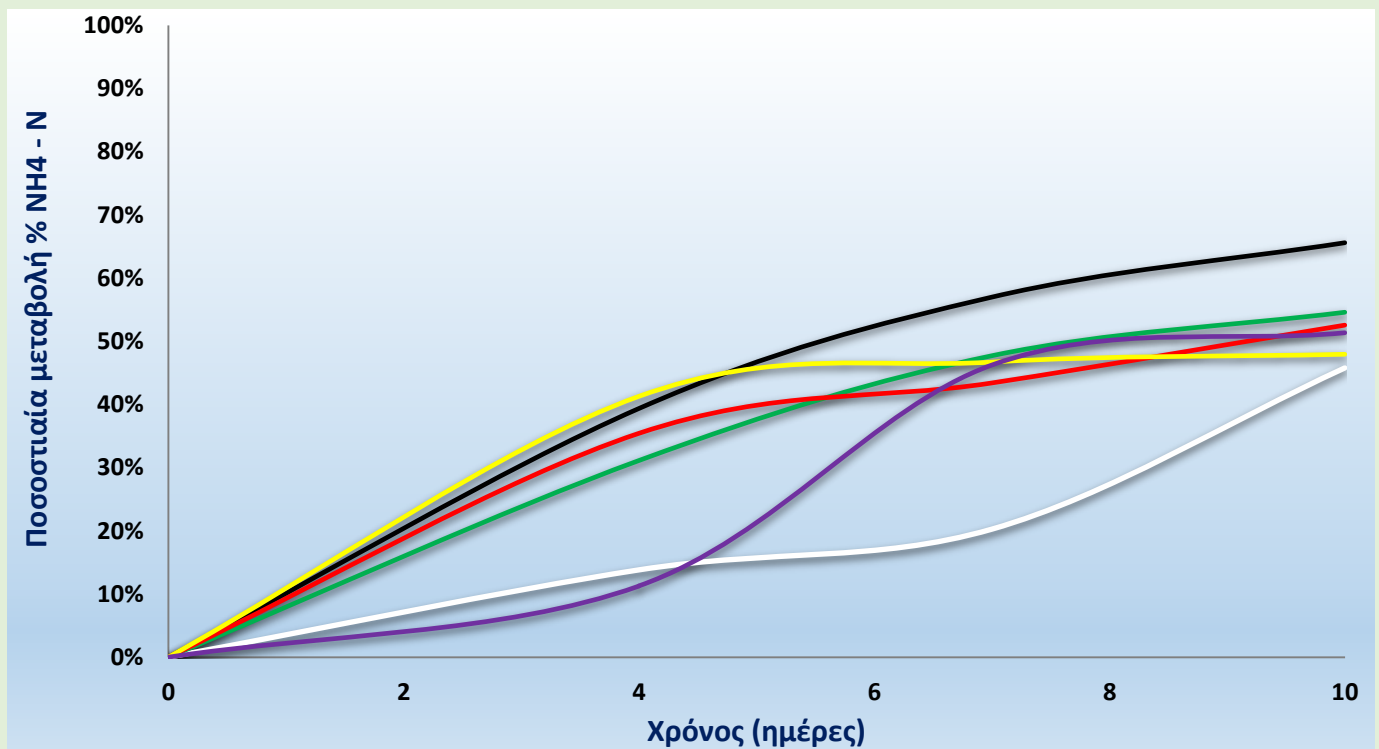
Στο **Σχήμα 4.12** παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των αμμωνιακών ιόντων ($\text{NH}_4 - \text{N}$) σε mg σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσία δύο διαφορετικών στελεχών του μικροφύκου *Chlorella*. Στο δείγμα Digestate 6,5% χωρίς εμβολιασμό με μικροφύκη (blanc) παρατηρείται ότι δεν υπάρχει μείωση των αμμωνιακών ιόντων διότι δεν υπάρχει ο μικροοργανισμός να τα καταναλώσει.

Στα δείγματα Digestate 3,25% με αρχικό εμβόλιο 6 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella vulgaris*, Digestate 3,25% με αρχικό εμβόλιο 5,5 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella sorokiniana* και Digestate 0,65% με αρχικό εμβόλιο 5 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella sorokiniana* παρατηρείται παρόμοια πτωτική πορεία των αμμωνιακών ιόντων μέχρι την έκτη ημέρα, ενώ μέχρι το πέρας του πειράματος η μεταβολή μηδενίζεται και η συγκέντρωση των αμμωνιακών ιόντων σταθεροποιείται. Η συνολική μείωση των αμμωνιακών ιόντων στα δείγματα αυτά είναι 10,25, 11,64 και 8,96 mg αντίστοιχα.

Όσον αφορά το δείγμα Digestate 6,5% με αρχικό εμβόλιο 6 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella vulgaris*, παρατηρείται ικανοποιητική μείωση της συγκέντρωσης των αμμωνιακών ιόντων του κατά τις τέσσερις πρώτες ημέρες, ενώ μέχρι το πέρας των δέκα ημερών η μεταβολή γίνεται με πολύ ήπιο ρυθμό. Η συνολική μείωση των αμμωνιακών ιόντων στο δείγμα αυτό είναι 14,8 mg.

Τέλος, το δείγμα Digestate 1,3% με αρχικό εμβόλιο 5 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella sorokiniana* παρουσιάζει σχεδόν μηδενική μεταβολή της συγκέντρωσης των αμμωνιακών ιόντων μέχρι την τέταρτη ημέρα, ενώ στη συνέχεια έως τη δέκατη ημέρα ο ρυθμός μείωσης των αμμωνιακών ιόντων είναι ήπιος αλλά ικανοποιητικός. Στο δείγμα αυτό η συνολική μείωση των αμμωνιακών ιόντων ανέρχεται στα 11,75 mg.

Από το **Σχήμα 4.12** προκύπτει το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν εμφανείς διαφορές στον ρυθμό με τον οποίο δρουν και μεταβολίζουν τα αμμωνιακά ιόντα όλων των δειγμάτων τα δύο διαφορετικά στελέχη μικροφυκών *Chlorella sorokiniana* και *Chlorella vulgaris*, ενώ στο δείγμα που δεν εμβολιάστηκε με κύτταρα κανενός στελέχους φαίνεται ξεκάθαρα η σταθερότητα της συγκέντρωσης των αμμωνιακών ιόντων.



Σχήμα 4.13. Ποσοστιαία μεταβολή συγκέντρωσης αμμωνιακών ιόντων σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσία διαφορετικών στελεχών του μικροφύκου *Chlorella* σε αναερόβιας χώνευσης υγρό απόβλητο.

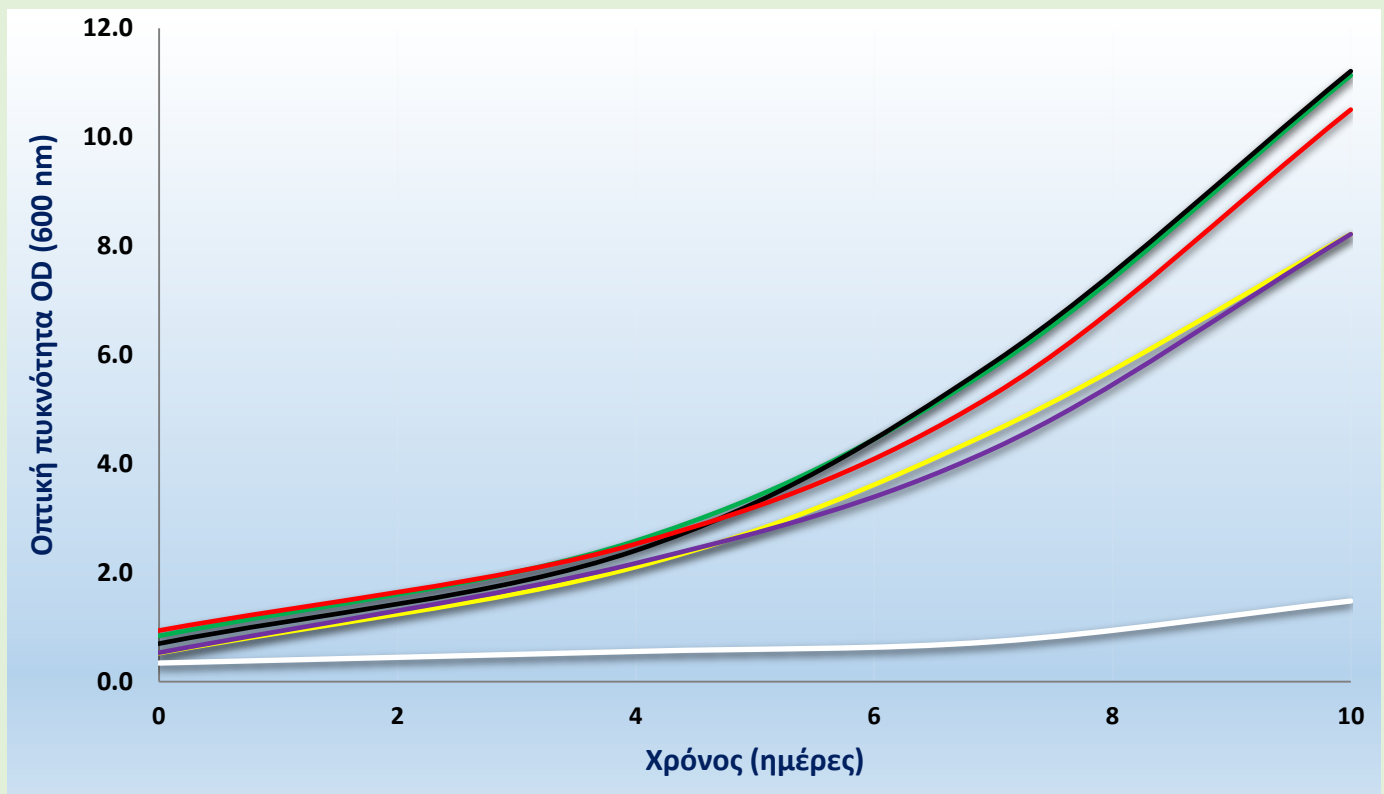
Στο **Σχήμα 4.13** παρουσιάζεται η ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης των αμμωνιακών ιόντων ($\text{NH}_4 - \text{N}$) σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσία δύο διαφορετικών στελεχών του μικροφύκου *Chlorella*. Στο δείγμα Digestate 6,5%, το οποίο δεν εμβολιάστηκε με κύτταρα μικροφυκών, παρατηρείται μειωμένη ποσοστιαία μεταβολή των αμμωνιακών ιόντων, καθώς δεν υπάρχουν μικροφύκη να μεταβολίσουν το αμμωνιακό άζωτο του δείγματος.

Το δείγμα Digestate 1,3% με αρχικό εμβόλιο 5 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella sorokiniana* παρουσιάζει σχεδόν μηδενική ποσοστιαία μεταβολή στη συγκέντρωση των αμμωνιακών ιόντων μέχρι την τέταρτη ημέρα, ενώ στο διάστημα των επόμενων τριών ημερών η συγκέντρωση μειώνεται με έντονο ρυθμό. Τέλος, δημιουργείται ένα σταθερό οριζόντιο τμήμα στη μεταβολή των αμμωνιακών ιόντων του από την έβδομη έως τη δέκατη ημέρα της πειραματικής διαδικασίας. Η συνολική ποσοστιαία μείωση των αμμωνιακών ιόντων στο δείγμα αυτό είναι 51%.

Όσον αφορά τα δείγματα Digestate 3,25% με αρχικό εμβόλιο 6 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella vulgaris*, Digestate 6,5% με αρχικό εμβόλιο 6 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella vulgaris* και Digestate 0,65% με αρχικό εμβόλιο 5 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella sorokiniana* παρουσιάζουν όμοια πορεία της ποσοστιαίας μεταβολής των αμμωνιακών τους ιόντων, με ικανοποιητικό ρυθμό έως την τέταρτη ημέρα και στη συνέχεια μέχρι τη δέκατη ημέρα παρατηρείται σταθερότητα της συγκέντρωσης του αμμωνιακού αζώτου τους. Η συνολική ποσοστιαία μείωση των αμμωνιακών ιόντων στα δείγματα αυτά είναι 55%, 53% και 48% αντίστοιχα.

Τέλος, το δείγμα Digestate 3,25% με αρχικό εμβόλιο 5,5 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella sorokiniana* σταθερή και ικανοποιητική μεταβολή της συγκέντρωσης των αμμωνιακών του ιόντων κατά τη διάρκεια των δέκα ημερών, με συνολική ποσοστιαία μείωσή τους κατά 66%, το μεγαλύτερο ποσοστό απομάκρυνσης του αμμωνιακού φορτίου όλων των δειγμάτων.

Από το **Σχήμα 4.13** προκύπτει το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν εμφανείς διαφορές στον ρυθμό με τον οποίο δρουν και μεταβολίζουν τα αμμωνιακά ιόντα όλων των δειγμάτων τα δύο διαφορετικά στελέχη μικροφυκών *Chlorella sorokiniana* και *Chlorella vulgaris*, με ένα μικρό προβάδισμα στη δράση του στελέχους *Chlorella sorokiniana* όπως παρατηρείται από τη μεταβολή στο δείγμα Digestate 3,25% που είναι εμβολιασμένο με 5,5 εκατομμύρια cells/mL του στελέχους αυτού. Στο δείγμα Digestate 6,5%, το οποίο δεν εμβολιάστηκε με κύτταρα κανενός στελέχους φαίνεται η σταθερότητα της συγκέντρωσης των αμμωνιακών ιόντων.



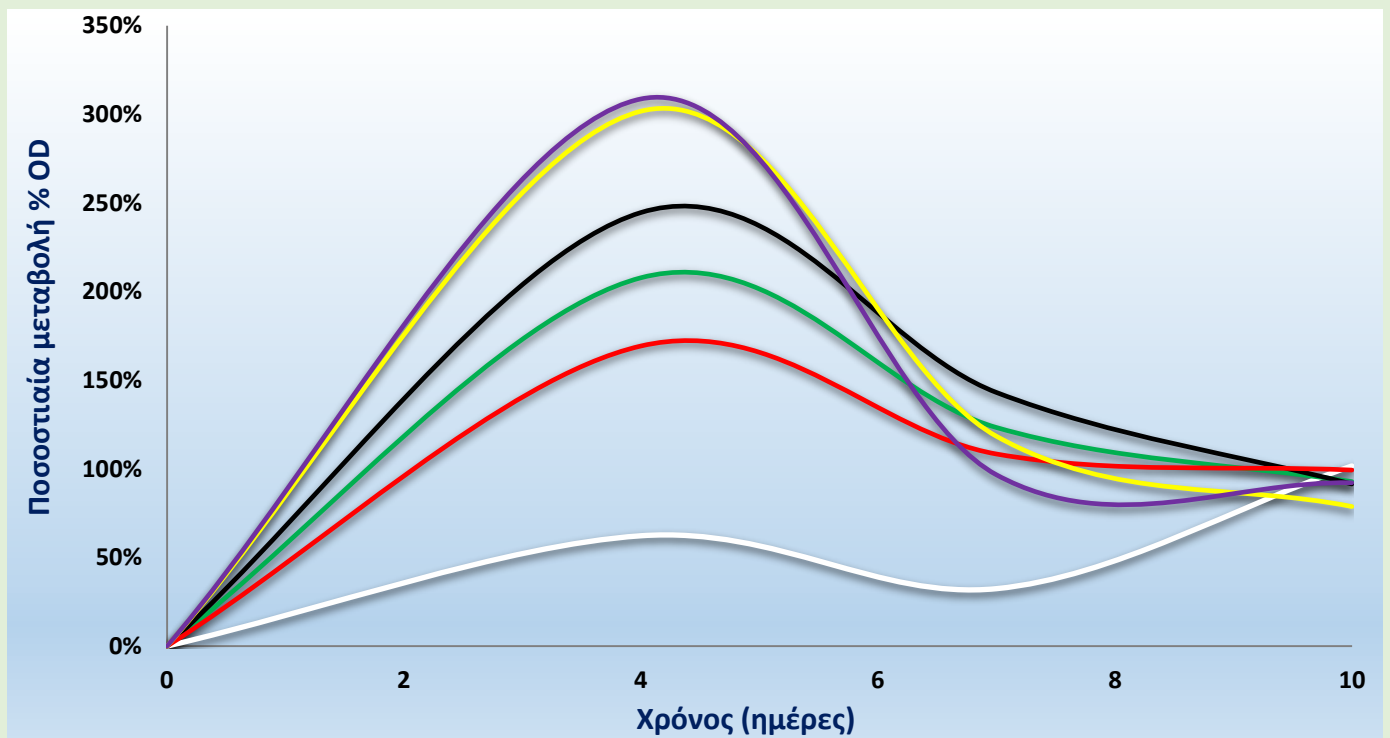
Σχήμα 4.14. Μεταβολή οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας μικροφυκών (μετρημένη στα 600 nm) σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσία δύο διαφορετικών στελεχών του μικροφύκου *Chlorella* σε αναερόβιας χώνευσης υγρό απόβλητο.

Στο **Σχήμα 4.14** παρουσιάζεται η μεταβολή της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας μικροφυκών, όπως αυτή μετράται σε φασματοφωτόμετρο στα 600 nm, σε συνάρτηση με το χρόνο. Ολοφάνερη είναι η σταθερότητα της τιμής της οπτικής πυκνότητας του δείγματος Digestate 6,5%, το οποίο δεν εμβολιάστηκε με κύτταρα μικροφυκών (blanc).

Σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα υγρών αποβλήτων που έχουν εμβολιαστεί είτε με το στέλεχος *Chlorella sorokiniana* είτε με το στέλεχος *Chlorella vulgaris*, παρατηρείται κοινή συμπεριφορά ως προς τον τρόπο αύξησης της οπτικής τους πυκνότητας που υποδηλώνει παρόμοιο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων των δύο στελεχών. Μικρές διαφορές εμφανίζονται από την έκτη έως την δέκατη ημέρα, όπου διαχωρίζονται τα δείγματα Digestate 3,25% με αρχικό εμβόλιο 6 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella vulgaris*, Digestate 3,25% με αρχικό εμβόλιο 5,5 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella sorokiniana* και Digestate 6,5% με αρχικό εμβόλιο 6 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella vulgaris*, στα

οποία επιτυγχάνεται υψηλότερη τελική τιμή της οπτικής τους πυκνότητας, έναντι των δύο υπολοίπων δειγμάτων. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο αρχικό αριθμό κυττάρων, που στα προαναφερθέντα δείγματα είναι υψηλότερος (5,5 και 6 εκατομμύρια cells/mL, οποιουδήποτε από τα δύο στελέχη), έναντι των δειγμάτων Digestate 0,65% και Digestate 1,3% στα οποία το αρχικό εμβόλιο περιείχε 5 εκατομμύρια cells/mL ενός από τα δύο στελέχη.

Από το *Σχήμα 4.14* προκύπτει το συμπέρασμα ότι η συγκέντρωση του δείγματος δεν επηρεάζει τη δράση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και των δύο στελεχών. Η παράμετρος που φαίνεται ότι συμβάλει σε υψηλότερη οπτική πυκνότητα, δηλαδή ακόμα μεγαλύτερο ποσοστό πολλαπλασιασμό των κυττάρων και των δύο στελεχών είναι ο αριθμός των κυττάρων του αρχικού εμβολίου κάθε δείγματος. Όσο περισσότερα εκατομμύρια κύτταρα ανά mL περιέχει κάθε δείγμα, τόσο μεγαλύτερη ανάπτυξη επιτυγχάνεται στη καλλιέργεια, καθώς τα κύτταρα δεν υστερούν στη φάση προσαρμογής τους στο υπόστρωμα αλλά δρουν απευθείας μεταβολίζοντας τα θρεπτικά του συστατικά και φωτοσυνθέτοντας, με αποτέλεσμα την απρόσκοπτη ανάπτυξή τους στο χρονικό διάστημα που μελετήθηκαν.



Σχήμα 4.15. Ποσοστιαία μεταβολή οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας μικροφυκών (μετρημένη στα 600 nm) σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσία δύο διαφορετικών στελεχών του μικροφύκου *Chlorella* σε αναερόβιας χώνευσης υγρό απόβλητο.

Στο **Σχήμα 4.15** παρουσιάζεται η ποσοστιαία μεταβολή της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας μικροφυκών, όπως αυτή μετράται σε φασματοφωτόμετρο στα 600 nm, σε συνάρτηση με το χρόνο. Φαίνεται πως στο δείγμα Digestate 6,5%, το οποίο δεν εμβολιάστηκε με κύτταρα μικροφυκών (blanc) υπάρχει σχεδόν μηδενική ποσοστιαία μεταβολή της τιμής της οπτικής πυκνότητάς του.

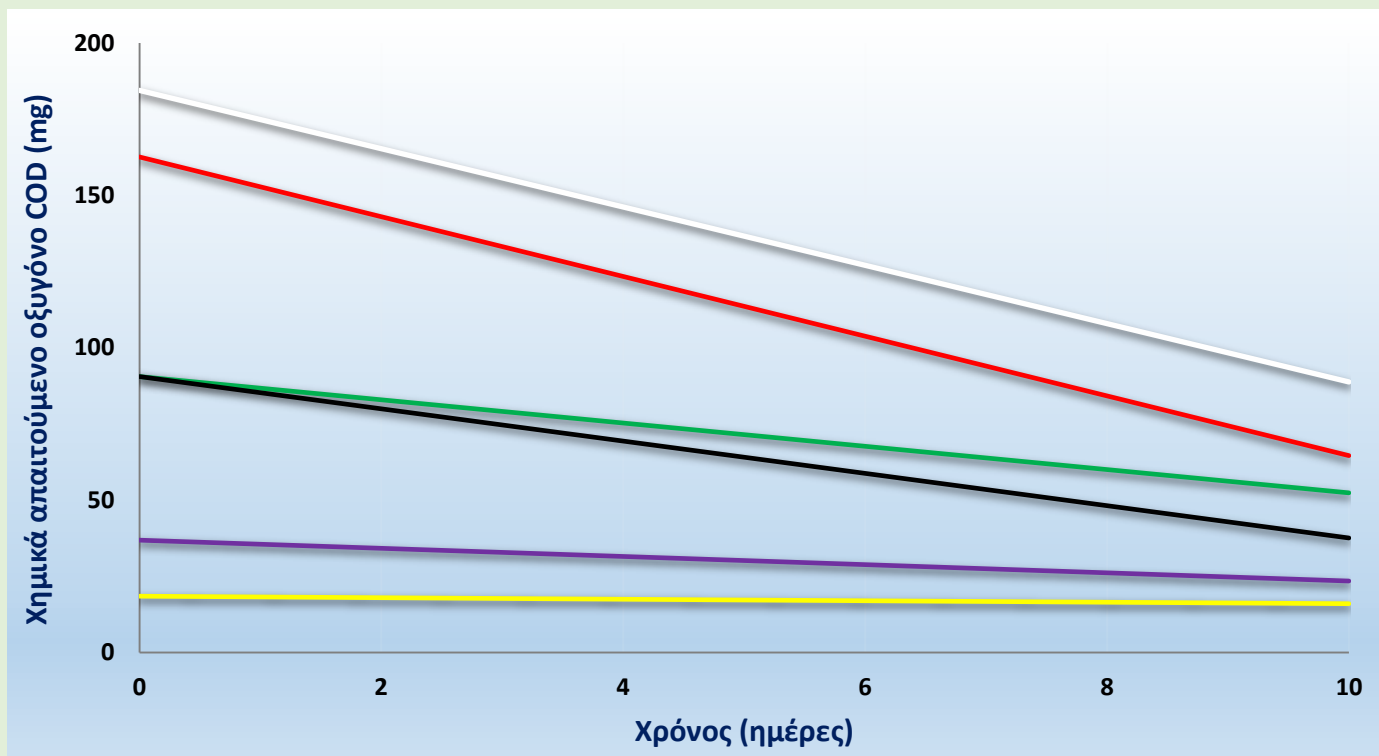
Σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα υγρών αποβλήτων που έχουν εμβολιαστεί είτε με το στέλεχος *Chlorella sorokiniana* είτε με το στέλεχος *Chlorella vulgaris*, παρατηρείται κοινή συμπεριφορά ως προς τον τρόπο ποσοστιαίας αύξησης της οπτικής τους πυκνότητας που υποδηλώνει παρόμοιο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων των δύο στελεχών. Συγκεκριμένα, παρατηρείται έντονη ποσοστιαία μεταβολή μέσα σε διάστημα τεσσάρων ημερών, με μέγιστη μεταβολή ακριβώς την τέταρτη ημέρα σε όλα τα δείγματα, ενώ στη συνέχεια μέχρι τη δέκατη ημέρα το ποσοστό της αύξησης της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων μειώνεται σταθερά,

ενώ όπως φάνηκε στο **Σχήμα 4.14** τα κύτταρα συνεχίζουν να αυξάνονται σε αριθμό και να ανεβάζουν ήπια και σταθερά την τιμή της οπτικής πυκνότητας.

Τα δείγματα Digestate 0,65% και 1,3% που έχουν εμβολιασθεί με το στελέχος *Chlorella sorokiniana* παρουσιάζουν την μεγαλύτερη ποσοστιαία μεταβολή της οπτικής τους πυκνότητας, με μέγιστη μεταβολή την τέταρτη μέρα κατά 302% και 309% αντίστοιχα. Η έντονη αυτή μεταβολή οφείλεται ιδιαίτερα στο γεγονός ότι τα δείγματα αυτά, λόγω χαμηλότερης συγκέντρωσης αποβλήτου, είχαν αρχικά μικρότερη θολερότητα έναντι των υπολοίπων δειγμάτων, με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται απρόσκοπτα τα κύτταρα της *Chlorella sorokiniana* λόγω της έντονης φωτοσυνθετικής τους δράσης.

Κατά φθίνουσα σειρά των ποσοστιαίων μεταβολών όσον αφορά την οπτική πυκνότητα είναι το δείγμα Digestate 3,25% με αρχικό εμβόλιο 5,5 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella sorokiniana* με μέγιστη μεταβολή 245%, το δείγμα Digestate 3,25% με αρχικό εμβόλιο 6 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella vulgaris* με μέγιστη μεταβολή 208% και το δείγμα Digestate 6,5% με αρχικό εμβόλιο 6 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella vulgaris* με μέγιστη μεταβολή 169%.

Από το **Σχήμα 4.15** προκύπτει το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν εμφανείς διαφορές στον ρυθμό με τον οποίο πολλαπλασιάζονται τα κύτταρα των διαφορετικών στελεχών μικροφυκών *Chlorella sorokiniana* και *Chlorella vulgaris*, όπως αυτό φαίνεται από την αύξηση της οπτικής πυκνότητας όλων των δειγμάτων. Η συγκέντρωση του εκάστοτε δείγματος δείχνει ότι επηρεάζει τη μέγιστη ποσοστιαία μεταβολή της οπτικής πυκνότητας, καθώς σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις η θολερότητα των αποβλήτων είναι περιορισμένη και η διέλευση των ακτίνων του φωτός από τη μάζα τους γίνεται αβίαστα.



Σχήμα 4.16. Μεταβολή συγκέντρωσης χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (σε mg) σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσία δύο διαφορετικών στελεχών του μικροφύκου *Chlorella* σε αναερόβιας χώνευσης υγρό απόβλητο.

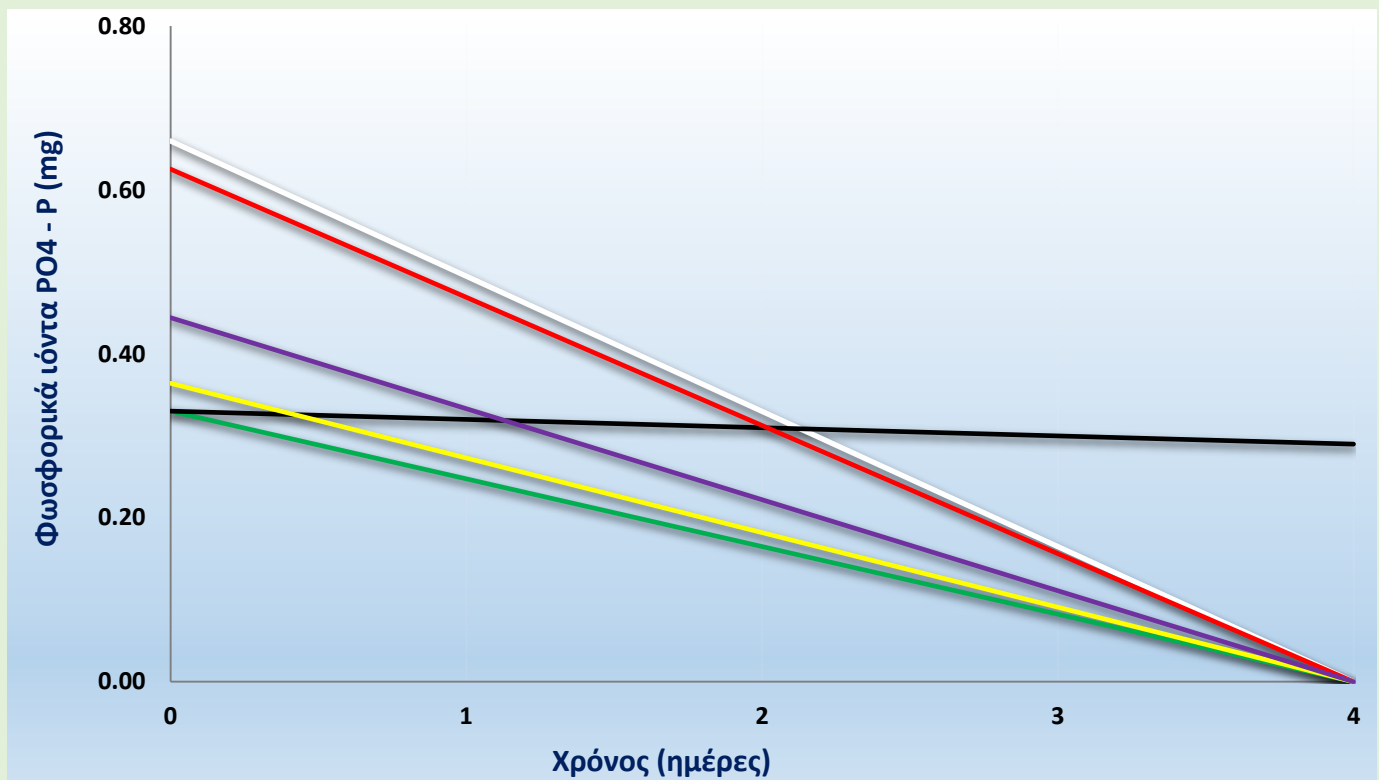
Στο **Σχήμα 4.16** παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD) σε mg σε συνάρτηση με το χρόνο. Στο δείγμα Digestate 6,5% χωρίς εμβολιασμό με μικροφύκη (blanc) παρατηρείται μείωση του COD κατά 100 mg σε διάστημα δέκα ημερών.

Το δείγμα Digestate 6,5% με αρχικό εμβόλιο 6 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella vulgaris* έχει επίσης αυξημένη αρχική συγκέντρωση COD και παρουσιάζει ικανοποιητική πτωτική πορεία, της τάξεως των 98 mg σε διάστημα δέκα ημερών λόγω της δράσης των κυττάρων στελέχους *Chlorella vulgaris*.

Όσον αφορά τα δείγματα Digestate 3,25% με αρχικό εμβόλιο 6 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella vulgaris* και Digestate 3,25% με αρχικό εμβόλιο 5,5 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella sorokiniana*, παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά όσον αφορά τη μείωση του COD, η αρχική συγκέντρωση του οποίου ήταν η μισή από αυτή των δύο προαναφερθέντων δειγμάτων. Η μείωση του COD στα δείγματα αυτά είναι 38,2 και 53 mg αντίστοιχα.

Τέλος, στα δείγματα Digestate 0,65% με αρχικό εμβόλιο 5 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella sorokiniana* και Digestate 1,3% με αρχικό εμβόλιο 5 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella sorokiniana*, Digestate 1,3% με αρχικό εμβόλιο 5 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella sorokiniana* η αρχική συγκέντρωση COD τους ήταν ιδιαίτερα χαμηλή, χαμηλότερη όλων των δειγμάτων λόγω της μικρότερης συγκέντρωσης αποβλήτου και δε παρουσίασε καμία μεταβολή παρά μόνο παρέμεινε σταθερή. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην αδυναμία των μικροφυκών να αξιοποιήσουν τόσο χαμηλές ποσότητες χημικά απαιτούμενου οξυγόνου από το υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσονται, παρόλο που όπως φάνηκε στο **Σχήμα 4.15** τα κύτταρα στα δείγματα αυτά πολλαπλασιάζονται με έντονο ρυθμό.

Από το **Σχήμα 4.16** προκύπτει το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν εμφανείς διαφορές στον ρυθμό με τον οποίο μεταβολίζουν τα κύτταρα των διαφορετικών στελεχών μικροφυκών *Chlorella sorokiniana* και *Chlorella vulgaris* το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο. Η συγκέντρωση του εκάστοτε δείγματος δείχνει ότι επηρεάζει ελαφρώς τη μεταβολή της ποσότητας του COD, καθώς στη μέγιστη συγκέντρωση αποβλήτου η αρχική ποσότητα COD είναι αυξημένη και ευκολότερα μειώσιμη από τα μικροφύκη.



Σχήμα 4.17. Μεταβολή συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων (σε mg) σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσία δύο διαφορετικών στελεχών του μικροφύκου *Chlorella* σε αναερόβιας χώνευσης υγρό απόβλητο.

Στο **Σχήμα 4.17** παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων ($\text{PO}_4 - \text{P}$) σε mg σε συνάρτηση με το χρόνο. Στο δείγμα Digestate 6,5% χωρίς εμβολιασμό με μικροφύκη (blanc) παρατηρείται μείωση των φωσφορικών ιόντων κατά 0,66 mg σε διάστημα τεσσάρων ημερών, που όμως μπορεί να αποδοθεί στο φαινόμενο της εξάτμισης του νερού του αποβλήτου που το οδηγεί σε μερική συμπύκνωση. Το δείγμα αυτό είχε και τη μεγαλύτερη αρχική συγκέντρωση φωσφορικών ιόντων απ' όλα τα προς μελέτη δείγματα.

Το δείγμα Digestate 6,5% με αρχικό εμβόλιο 6 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella vulgaris* έχει επίσης αυξημένη αρχική συγκέντρωση φωσφορικών ιόντων και παρουσιάζει πλήρη εξάντληση της συνολικής ποσότητας των 0,63 mg που περιείχε σε διάστημα τεσσάρων ημερών λόγω της δράσης των κυττάρων στελέχους *Chlorella vulgaris*.

Όσον αφορά τα δείγματα Digestate 1,3% με αρχικό εμβόλιο 5 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella sorokiniana*, Digestate 0,65% με αρχικό εμβόλιο 5 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella sorokiniana* και Digestate 3,25% με αρχικό εμβόλιο 6 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella vulgaris*, παρουσιάζουν όλα παρόμοια έντονη πτωτική πορεία στην συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων τους, με πλήρη κατανάλωσή τους από τα στελέχη των μικροφυκών. Η μείωση (πλήρης απομάκρυνση) που επήλθε στα δείγματα αυτά είναι της τάξεως των 0,44, 0,36 και 0,33 mg.

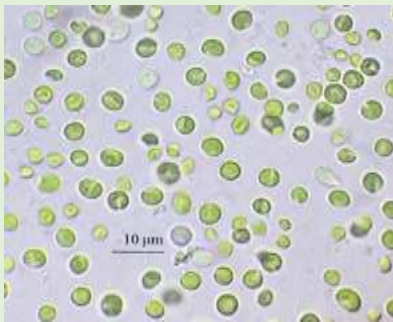
Τέλος, στο δείγμα Digestate 3,25% με αρχικό εμβόλιο 5,5 εκατομμυρίων cells/mL του στελέχους *Chlorella sorokiniana* παρατηρείται στασιμότητα της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων εντός τεσσάρων ημερών, παρόλη την ικανοποιητική ανάπτυξη της καλλιέργειας αυτή σύμφωνα με τα [Σχήματα 4.14](#) και [4.15](#). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται πιθανόν σε υστέρηση της κατανάλωσή τους από τα μικροφύκη, τα οποία προτίμησαν τη κατανάλωση αμμωνιακών ιόντων στο διάστημα αυτό, λόγω της πολύ μικρής συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων.

Από το [Σχήμα 4.17](#) προκύπτει το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν εμφανείς διαφορές στον ρυθμό με τον οποίο δρουν και μεταβολίζουν τα φωσφορικά ιόντα όλων των δειγμάτων τα δύο διαφορετικά στελέχη μικροφυκών *Chlorella sorokiniana* και *Chlorella vulgaris*.

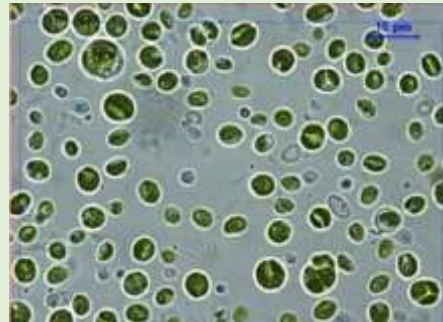
Συγκεντρωτικά, παρατηρήθηκε ότι τα δύο διαφορετικά στελέχη του γένους *Chlorella* παρουσιάζουν παρόμοιο τρόπο ανάπτυξης και δράσης στο υπόστρωμα, όπως αυτό συνίσταται στην αύξηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων και τον ρυθμό κατανάλωσης των θρεπτικών συστατικών, πρωτίστως των αμμωνιακών ιόντων. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στους εξής λόγους:

- ✓ Τα δύο στελέχη είναι στο ίδιο γενεαλογικό δέντρο και συγγενικά μεταξύ τους, δηλαδή έχουν όμοιο γενετικό υλικό, γεγονός που καθορίζει τις διαδικασίες πρόσληψης - πέψης της διατροφής τους.
- ✓ Έχουν ίδια εξωτερικά χαρακτηριστικά (π.χ. σχήμα και μέγεθος κυττάρου) ([Σχήμα 4.18](#)).

- ✓ Χρησιμοποιούν ίδιους μηχανισμούς ανάπτυξης και μεταβολισμού (φωτοσύνθεση, κυτταρική αναπνοή και φωτοκυτταρική αναπνοή) για να πέψουν την τροφή τους.
- ✓ Έχουν τις ίδιες θρεπτικές ανάγκες για να αναπτυχθούν και να αναπαραχθούν ως προς το είδος και την ποσότητα των θρεπτικών συστατικών που πρέπει να προσλάβουν.



Chlorella vulgaris



Chlorella sorokiniana

Apr 2016, Rameshprabu Ramaraj,
Yuwalee Unpaprom, Natthawud
Dussadee

<https://www.researchgate.net/figure/Chlorella-vulgaris-fig2-300505269>

Nov 2010, Chader Samira, Bouziane
Mahmah, Khaled Chetehouna, Eric
Mignolet

<https://www.researchgate.net/figure/Chlorella-sorokiniana-strain-fig1-268327027>

Σχήμα 4.18. Μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων των στελεχών *Chlorella vulgaris* και *Chlorella sorokiniana*.

Επομένως, αποφασίστηκε στην υπόλοιπη πειραματική διαδικασία να διατηρηθεί η χρήση ενός μόνο στελέχους μικροφυκών και αυτό είναι η *Chlorella sorokiniana* λόγω της μεγαλύτερης ανθεκτικότητας σε πιθανές ανασταλτικές ουσίες του αποβλήτου (π.χ. βαρέα μέταλλα) αλλά και λόγω της εύκολης προσαρμοστικότητας τους στελέχους αυτού σε μικρές μεταβολές στην οξύτητα και τη παροχή διοξειδίου του άνθρακα και οξυγόνου.

4.3 Επίδραση της συγκέντρωσης του αποβλήτου στην απόδοση των μικροφυκών

Έπειτα από τη διερεύνηση της επίδρασης του pH και του διαφορετικού στελέχους μικροφυκών στην αποτελεσματική επεξεργασία των υγρών αποβλήτων, η οποία πρωτίστως συνίσταται στην απομάκρυνση του αμμωνιακού φορτίου τους και δευτερευόντως των υπολοίπων θρεπτικών συστατικών τους, μελετήθηκε η επίδραση του ίδιου του αποβλήτου και συγκεκριμένα η συγκέντρωσή του.

Έχει ήδη διατυπωθεί στην ενότητα 3.1 ότι τα υγρά απόβλητα, λόγω της σύστασής τους, ακόμα και μετά από αναερόβια χώνευση και κατεργασία καθαρισμού του ιζήματός τους, έχουν σκούρο χρώμα που εμποδίζει την απρόσκοπτη διέλευση των φωτεινών ακτίνων που είναι απαραίτητες για τα φωτοσυνθετικά μικροφύκη. Παράλληλα, το πυκνό υγρό απόβλητο πιθανόν να περιέχει ουσίες ανασταλτικές για την ανάπτυξη των μικροφυκών του γένους *Chlorella* και ειδικότερα κάποια βαρέα μέταλλα. Όπως άλλωστε διατυπώθηκε στην ενότητα 3.2, αυτός είναι και ο λόγος της επιλογής του στελέχους *Chlorella sorokiniana*. Όλα τα παραπάνω συνιστούν την αραίωση της συγκέντρωσης του πυκνού υγρού αποβλήτου και την διερεύνηση της βέλτιστης συγκέντρωσης που οδηγεί στην πιο αποδοτική επεξεργασία του από τα μικροφύκη.

Στη φάση αυτή της πειραματικής διαδικασίας δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές αραιώσεις στο υγρό απόβλητο, το οποίο είχε υποστεί προηγουμένως αναερόβια χώνευση και κατάλληλη προκατεργασία, όπως αυτή περιγράφεται στην ενότητα 2.6. Οι συγκεντρώσεις του αποβλήτου που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

- ✓ 7,3%
- ✓ 3,65%
- ✓ 1,85%

Η αραίωση του αποβλήτου με συγκέντρωση 7,3% επιλέχθηκε ώστε να εξισωθεί η ποσότητα αμμωνιακών ιόντων του υγρού αποβλήτου με τη ποσότητα αζώτου (σε μορφή νιτρικών ιόντων) που περιέχει το τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα BG 11. Η ποσότητα αυτή είναι 247 mg/L. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι τα μικροφύκη του γένους *Chlorella* έχουν ικανοποιητική ανάπτυξη στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα BG 11 (όπως αυτό διαπιστώθηκε και στην ενότητα 3.1) και

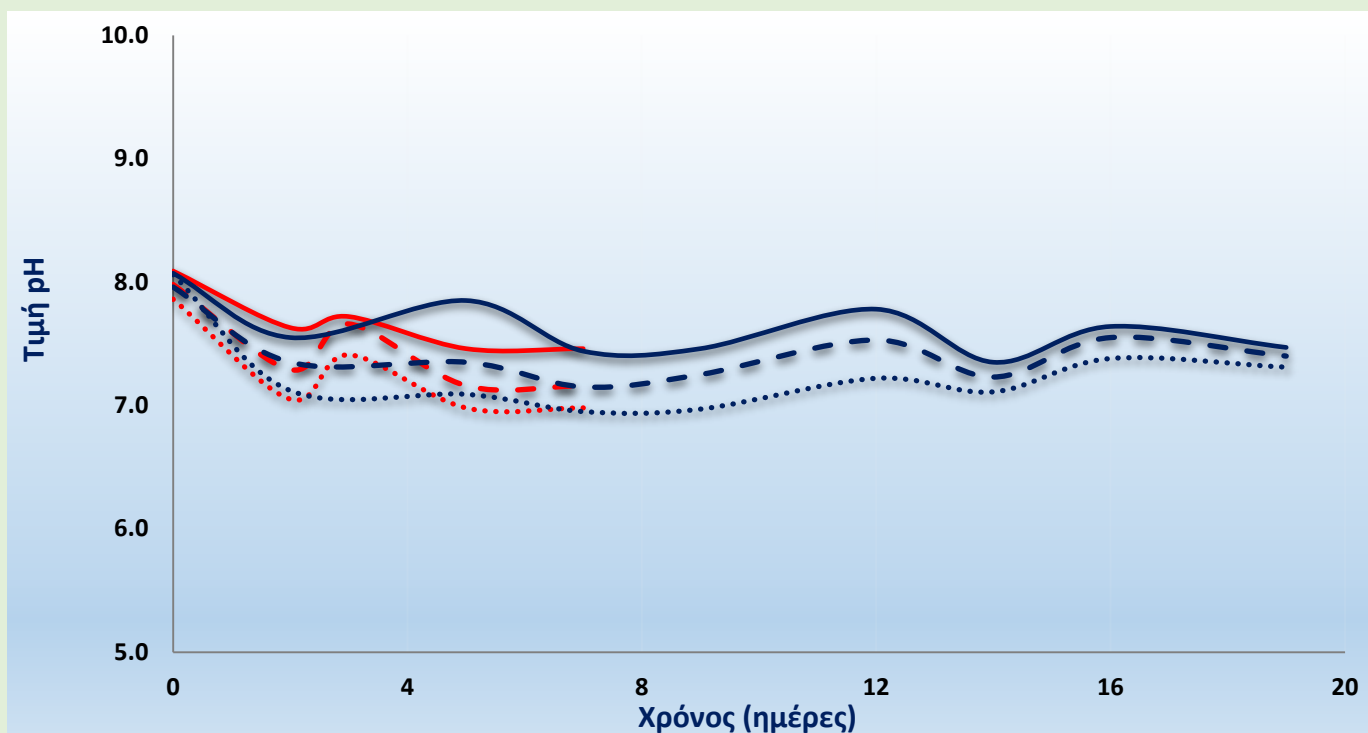
καταναλώνουν το άζωτο τόσο υπό μορφή αμμωνιακών όσο και υπό μορφή νιτρικών ιόντων. Επομένως, η προκαθορισμένη αρχική ποσότητα αμμωνιακών ιόντων των δειγμάτων δίνει ένα έναυσμα στην καλλιέργεια να δράσει και να αναπτυχθεί επαρκώς, μειώνοντας το αμμωνιακό άζωτο του αποβλήτου που είναι και ο βασικότερος στόχος της παρούσας διπλωματικής.

Η πιο χαμηλή συγκέντρωση του αποβλήτου (περισσότερο νερό και μικρότερη ποσότητα πυκνού κατεργασμένου αποβλήτου) οδηγεί σε μικρότερη αρχική οπτική πυκνότητα των δειγμάτων και μικρότερη θολερότητα, γεγονός που βοηθά την ανάπτυξη των μικροφυκών λόγω ευκολότερης διέλευσης των ακτίνων του φωτός από τη μάζα του αποβλήτου. Ακόμη, όσο το απόβλητο αραιώνεται, μπορεί να υποβοηθηθούν τα κύτταρα της *Chlorella sorokiniana* να πολλαπλασιαστούν πιο γρήγορα και απρόσκοπτα, λόγω της μειωμένης περιεκτικότητας του αραιωμένου αποβλήτου σε συστατικά ανασταλικά στην ανάπτυξη των μικροφυκών, όπως είναι κάποια μικροστοιχεία/ βαρέα μέταλλα.

Σε όλα τα δείγματα γινόταν καθημερινά η ογκομέτρησή τους με ογκομετρικούς σωλήνες για την εύρεση του όγκου του εξατμιζόμενου νερού από τη μάζα τους. Ο όγκος αυτός αναπληρωνόταν καθημερινά με αντίστοιχη ποσότητα μεταλλικού νερού, αφαιρώντας τις ποσότητες που λαμβάνονταν κατά τη δειγματοληψία. Τα δύο διαφορετικά πειράματα αφορούν τις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις αποβλήτου που προαναφέρθηκαν, με μόνη διαφορά το αρχικό εμβόλιο κυττάρων του στελέχους *Chlorella sorokiniana*. Στα πρώτα δείγματα των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων του αποβλήτου έγινε προσθήκη 3,5 εκατομμυρίων κυττάρων ανά mL υποστρώματος, ενώ στα δείγματα του δεύτερου πειράματος έγινε εμβολιασμός με 4,2 εκατομμύρια κύτταρα ανά mL υποστρώματος.

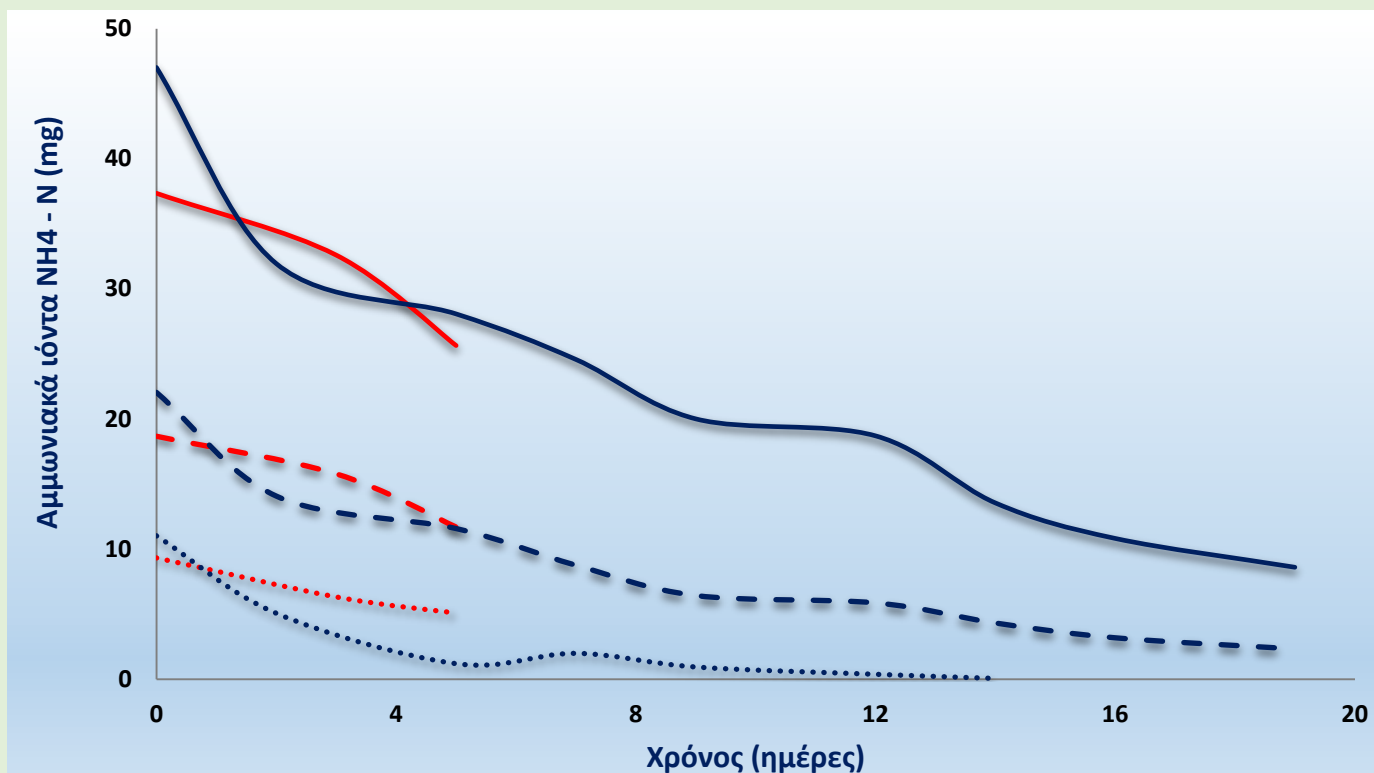
Για τα οκτώ (8) σχήματα που ακολουθούν στην ενότητα αυτή, η σήμανση είναι η εξής:

- ✚ Κόκκινη γραμμή → Digestate 7,3% με συμπλήρωση του χαμένου όγκου νερού (με παροχή διοξειδίου του άνθρακα 7,2 mL/min, παροχή αέρα 240 mL/min και αρχικό εμβόλιο 3,5 εκατομμύρια cells/mL του μικροφύκους *Chlorella sorokiniana*)
- ✚ Κόκκινη διακεκομμένη γραμμή → Digestate 3,65% με συμπλήρωση του χαμένου όγκου νερού (με παροχή διοξειδίου του άνθρακα 7,2 mL/min, παροχή αέρα 240 mL/min και αρχικό εμβόλιο 3,5 εκατομμύρια cells/mL του μικροφύκους *Chlorella sorokiniana*)
- ✚ Κόκκινη γραμμή με τελείες → Digestate 1,85% με συμπλήρωση του χαμένου όγκου νερού (με παροχή διοξειδίου του άνθρακα 7,2 mL/min, παροχή αέρα 240 mL/min και αρχικό εμβόλιο 3,5 εκατομμύρια cells/mL του μικροφύκους *Chlorella sorokiniana*)
- ✚ Μπλε γραμμή → Digestate 7,3% με συμπλήρωση του χαμένου όγκου νερού (με παροχή διοξειδίου του άνθρακα 7,2 mL/min, παροχή αέρα 240 mL/min και αρχικό εμβόλιο 4,2 εκατομμύρια cells/mL του μικροφύκους *Chlorella sorokiniana*)
- ✚ Μπλε διακεκομμένη γραμμή → Digestate 3,65% με συμπλήρωση του χαμένου όγκου νερού (με παροχή διοξειδίου του άνθρακα 7,2 mL/min, παροχή αέρα 240 mL/min και αρχικό εμβόλιο 4,2 εκατομμύρια cells/mL του μικροφύκους *Chlorella sorokiniana*)
- ✚ Μπλε γραμμή με τελείες → Digestate 1,85% με συμπλήρωση του χαμένου όγκου νερού (με παροχή διοξειδίου του άνθρακα 7,2 mL/min, παροχή αέρα 240 mL/min και αρχικό εμβόλιο 4,2 εκατομμύρια cells/mL του μικροφύκους *Chlorella sorokiniana*)



Σχήμα 4.19. Μεταβολή τιμής pH σε συνάρτηση με το χρόνο σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις υγρών αποβλήτων αναερόβιας χώνευσης.

Στο **Σχήμα 4.19** παρουσιάζεται η μεταβολή της τιμής του pH σε συνάρτηση με το χρόνο στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του υγρού αποβλήτου. Παρατηρείται ότι στα δείγματα και των τριών συγκεντρώσεων του αποβλήτου, ανεξάρτητα από τον αρχικό αριθμό κυττάρων της *Chlorella sorokiniana*, το pH διατήρησε σταθερή πορεία (με πολύ μικρές διακυμάνσεις εντός της επιθυμητής περιοχής 7,0 – 8,0). Το φαινόμενο αυτό επετεύχθη με τη σταθερή παροχή διοξειδίου του άνθρακα σε ποσότητα 7,2 mL/min, όπως ορίστηκε στην ενότητα 3.1. Το σταθερό pH διευκολύνει, όπως προαναφέρθηκε, την εύρυθμη ανάπτυξη των κυττάρων του μικροφύκου, ενώ παράλληλα διατηρεί το περιεχόμενο άζωτο του αποβλήτου υπό μορφή αμμωνιακών ιόντων



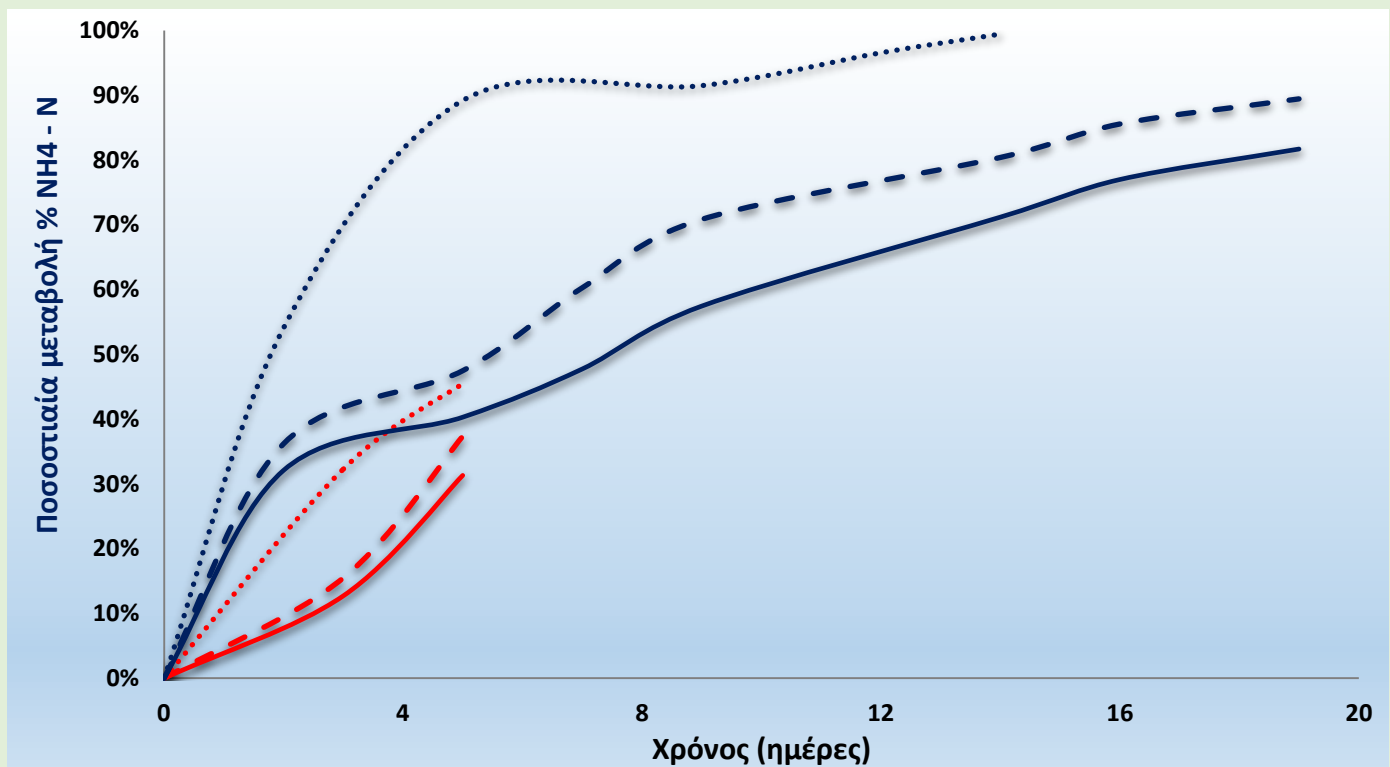
Σχήμα 4.20. Μεταβολή συγκέντρωσης αμμωνιακών ιόντων (σε mg) σε συνάρτηση με το χρόνο σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις υγρών αποβλήτων αναερόβιας χώνευσης.

Στο **Σχήμα 4.20** παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των αμμωνιακών ιόντων ($\text{NH}_4 - \text{N}$) σε mg σε συνάρτηση με το χρόνο στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του υγρού αποβλήτου. Στο δείγμα αποβλήτου με συγκέντρωση 7,3% και χαμηλότερο αρχικό εμβόλιο κυττάρων μικροφυκών, η συγκέντρωση των αμμωνιακών ιόντων παρουσιάζει ικανοποιητική πτωτική πορεία και επέρχεται μείωσή τους κατά 11,69 mg εντός πέντε ημερών. Στην ίδια συγκέντρωση με υψηλότερο αρχικό αριθμό κυττάρων, η πτωτική πορεία των αμμωνιακών ιόντων είναι ικανοποιητική με ελάχιστες διακυμάνσεις, έως τη μείωση της τάξεως των 38,43 mg σε διάστημα δεκαεννέα ημερών.

Όσον αφορά το δείγματα αποβλήτου 3,65%, η αρχική συγκέντρωση των αμμωνιακών ιόντων είναι η μισή των προηγούμενων δύο δειγμάτων που αναλύθηκαν. Στο δείγμα με τον χαμηλότερο αρχικό εμβόλιο κυττάρων μικροφυκών παρουσιάζεται σταθερή πτωτική πορεία των αμμωνιακών ιόντων με μείωσή τους κατά 7 mg εντός πέντε ημερών. Στην ίδια συγκέντρωση αποβλήτου με υψηλότερο αρχικό αριθμό

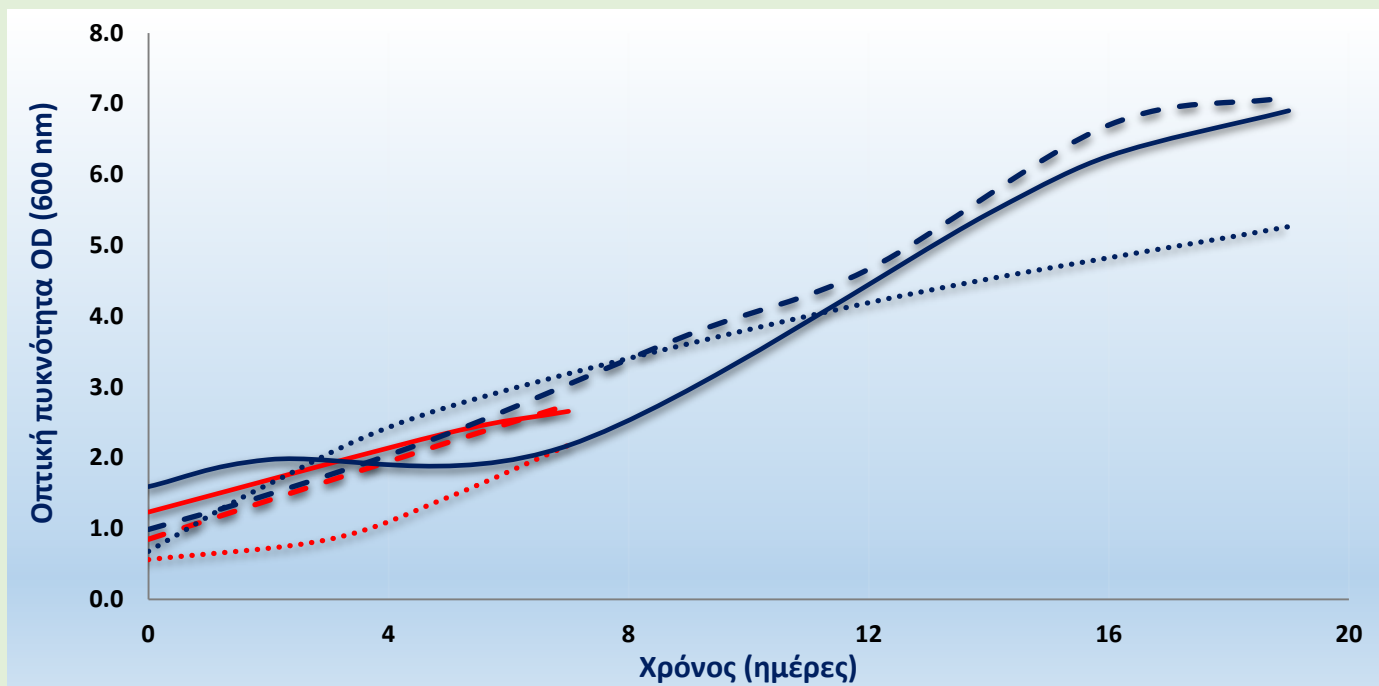
κυττάρων, η πτωτική πορεία των αμμωνιακών ιόντων είναι έντονη τις πρώτες τέσσερις ημέρες και στη συνέχεια πιο ήπια και σταθερή, με αποτέλεσμα την συνολική κατανάλωση 19,72 mg σε διάστημα δεκαεννέα ημερών.

Στο δείγματα αποβλήτου 1,85% η αρχική συγκέντρωση των αμμωνιακών ιόντων είναι η μισή των προηγούμενων δύο δειγμάτων που αναλύθηκαν και υποτετραπλάσια των δύο πρώτων δειγμάτων (της συγκέντρωσης 7,3%). Στο δείγμα με το χαμηλότερο αρχικό εμβόλιο κυττάρων μικροφυκών, η συγκέντρωση των αμμωνιακών ιόντων παρουσιάζει σχεδόν σταθερότητα και μειώνεται μόλις κατά 4,24 mg εντός πέντε ημερών. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η ποσότητα των αμμωνιακών ιόντων είναι πολύ λίγη ώστε να διατηρήσει τον αρχικό πληθυσμό των μικροφυκών και να αναπτυχθούν αυτά με έντονο ρυθμό μεταβολίζοντας το αμμωνιακό άζωτο. Στην ίδια συγκέντρωση με τον υψηλότερο αρχικό αριθμό κυττάρων, η πτωτική πορεία των αμμωνιακών ιόντων είναι ήπια αλλά ικανοποιητική, υπολογίζοντας τη χαμηλή αρχική ποσότητα των αμμωνιακών ιόντων και τα μικροφύκη τα κατανάλωσαν μέχρι την εξάντλησή τους σε διάστημα δεκαεννέα ημερών. Επομένως, ο υψηλότερος αρχικός αριθμός κυττάρων του μικροάλγους *Chlorella sorokiniana* οδηγεί σε υψηλότερη κατανάλωση, έως και εξάντληση, των αποθεμάτων αμμωνιακού αζώτου του υγρού αποβλήτου και στις τρεις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν.

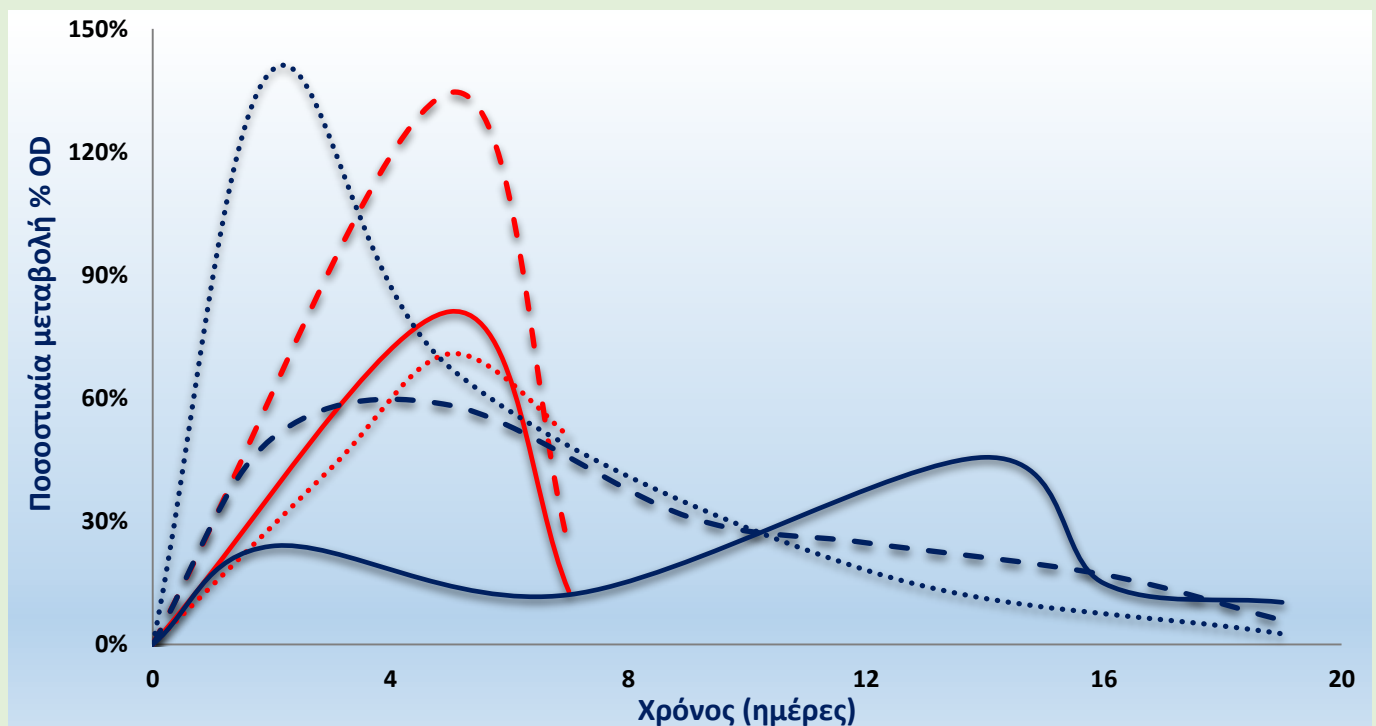


Σχήμα 4.21. Ποσοστιαία μεταβολή συγκέντρωσης αμμωνιακών ιόντων σε συνάρτηση με το χρόνο σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις υγρών αποβλήτων αναερόβιας χώνευσης.

Στο **Σχήμα 4.21** παρουσιάζεται η ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης των αμμωνιακών ιόντων ($\text{NH}_4 - \text{N}$) σε συνάρτηση με το χρόνο με αποτελέσματα παρόμοια με το **Σχήμα 4.20**. Παρατηρείται ότι και στα τρία δείγματα (οι τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις αποβλήτου) με τον χαμηλότερο αρχικό εμβόλιο κυττάρων μικροφυκών επετεύχθη χαμηλή ποσοστιαία κατανάλωση των αμμωνιακών ιόντων, με συνολική απομάκρυνση 31% στη συγκέντρωση 7,3%, 37% στη συγκέντρωση 3,65% και 47% στη συγκέντρωση 1,85% εντός πέντε ημερών.



Σχήμα 4.22. Μεταβολή οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας μικροφυκών (μετρημένη στα 600 nm) σε συνάρτηση με το χρόνο σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις υγρών αποβλήτων αναερόβιας χώνευσης.

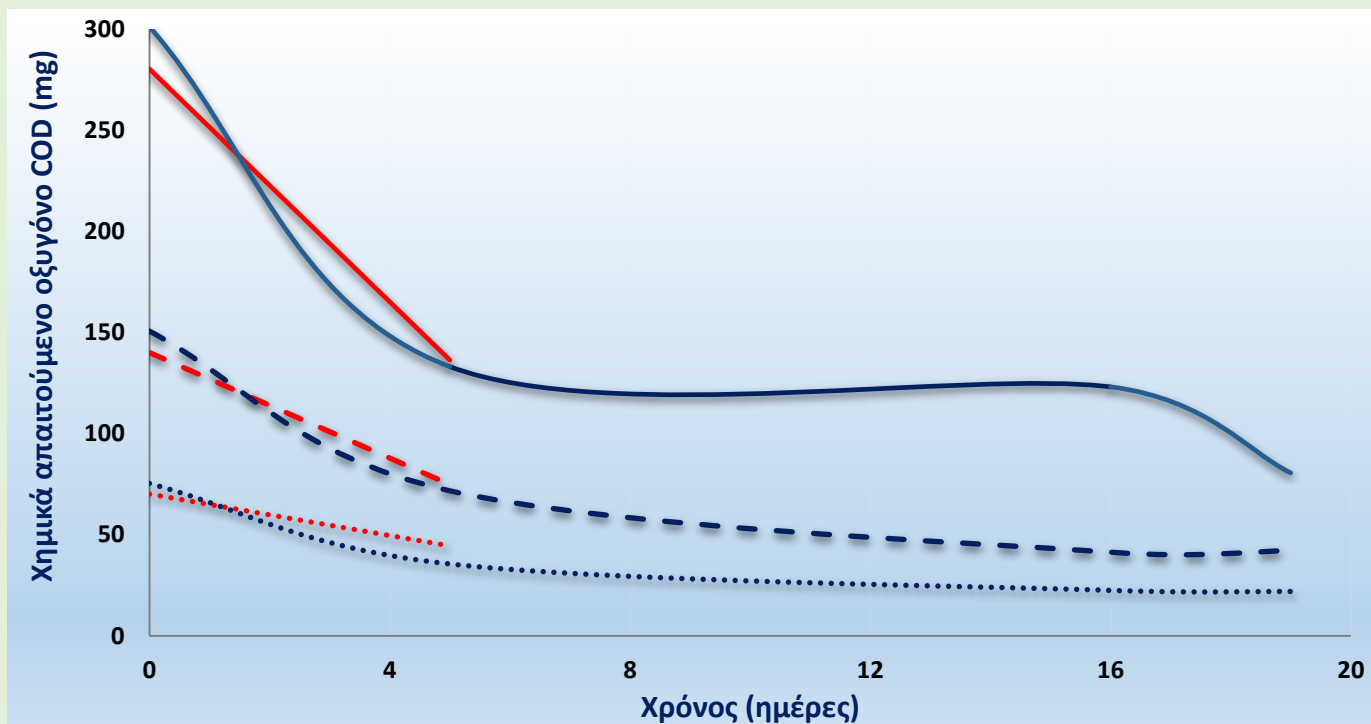


Σχήμα 4.23. Ποσοστιαία μεταβολή οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας μικροφυκών (μετρημένη στα 600 nm) σε συνάρτηση με το χρόνο σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις υγρών αποβλήτων αναερόβιας χώνευσης.

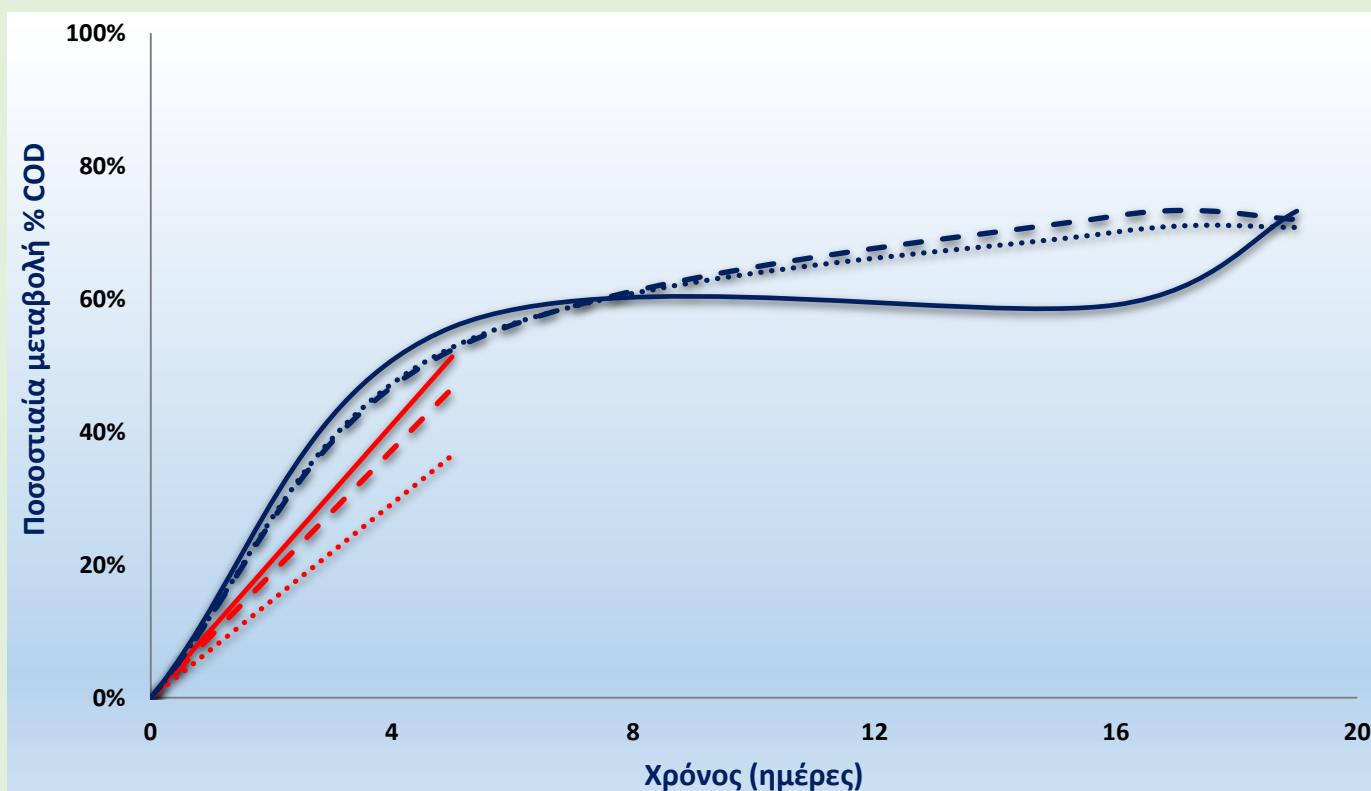
Στο **Σχήμα 4.22** παρουσιάζεται η μεταβολή της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας μικροφυκών, όπως αυτή μετράται σε φασματοφωτόμετρο στα 600 nm, σε συνάρτηση με το χρόνο, ενώ στο **Σχήμα 4.23** παρουσιάζεται η ποσοστιαία μεταβολή της οπτικής πυκνότητας. Διαπιστώνεται ότι και στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις αποβλήτου με τον χαμηλότερο αρχικό εμβόλιο κυττάρων μικροφυκών επετεύχθη μικρή μεταβολή της οπτικής τους πυκνότητας, με αύξηση κατά μέσο όρο 1,6 στο πέρας πέντε ημερών.

Στα δείγματα των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων με τον υψηλότερο αρχικό αριθμό κυττάρων παρατηρείται μεταβολή της οπτικής πυκνότητας με σταθερό αυξητικό ρυθμό, με μόνη διακύμανση τη μεταβολή των πρώτων επτά ημερών για τη συγκέντρωση 7,3%. Συγκεκριμένα, στην συγκέντρωση 7,3% επετεύχθη αύξηση της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας μικροφυκών της τάξης του 5,31, στην συγκέντρωση 3,65% αυξήθηκε κατά 6,105 και τέλος στην συγκέντρωση 1,85% επήλθε αύξηση κατά 4,588. Επομένως, ο υψηλότερος αρχικός αριθμός κυττάρων του μικροάλγους *Chlorella sorokiniana*, σε συνδυασμό με την διαφορετική συγκέντρωση αποβλήτου, οδηγεί σε υψηλότερη οπτική πυκνότητα, δηλαδή ικανοποιητική ανάπτυξη των μικροφυκών στο απόβλητο.

Η πορεία αυτή της οπτικής πυκνότητας στις διαφορετικές συγκεντρώσεις φαίνεται να παρουσιάζει διαφορές που πιθανότατα σχετίζονται με τη θολερότητα κάθε δείγματος, καθώς η συγκέντρωση 1,85% έχει διαυγέστερο και ανοιχτότερο χρώμα από τη συγκέντρωση 7,3%, γεγονός που εξηγεί την απότομη αύξηση των κυττάρων των μικροφυκών τις πρώτες ημέρες, εφόσον αυτά λάμβαναν την επαρκή ποσότητα φωτός για να φωτοσυνθέσουν και να πολλαπλασιαστούν. Η μεταγενέστερη πτώση της ποσοστιαίας μεταβολής οφείλεται στο κορεσμό του δείγματος από τα κύτταρα των μικροφυκών, τα οποία έχουν πρασινίσει τόσο το δείγμα ώστε πλέον είναι δυσκολότερο να το διαπεράσουν οι ακτίνες του φωτός.



Σχήμα 4.24. Μεταβολή συγκέντρωσης χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (σε mg) σε συνάρτηση με το χρόνο σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις υγρών αποβλήτων αναερόβιας χώνευσης.



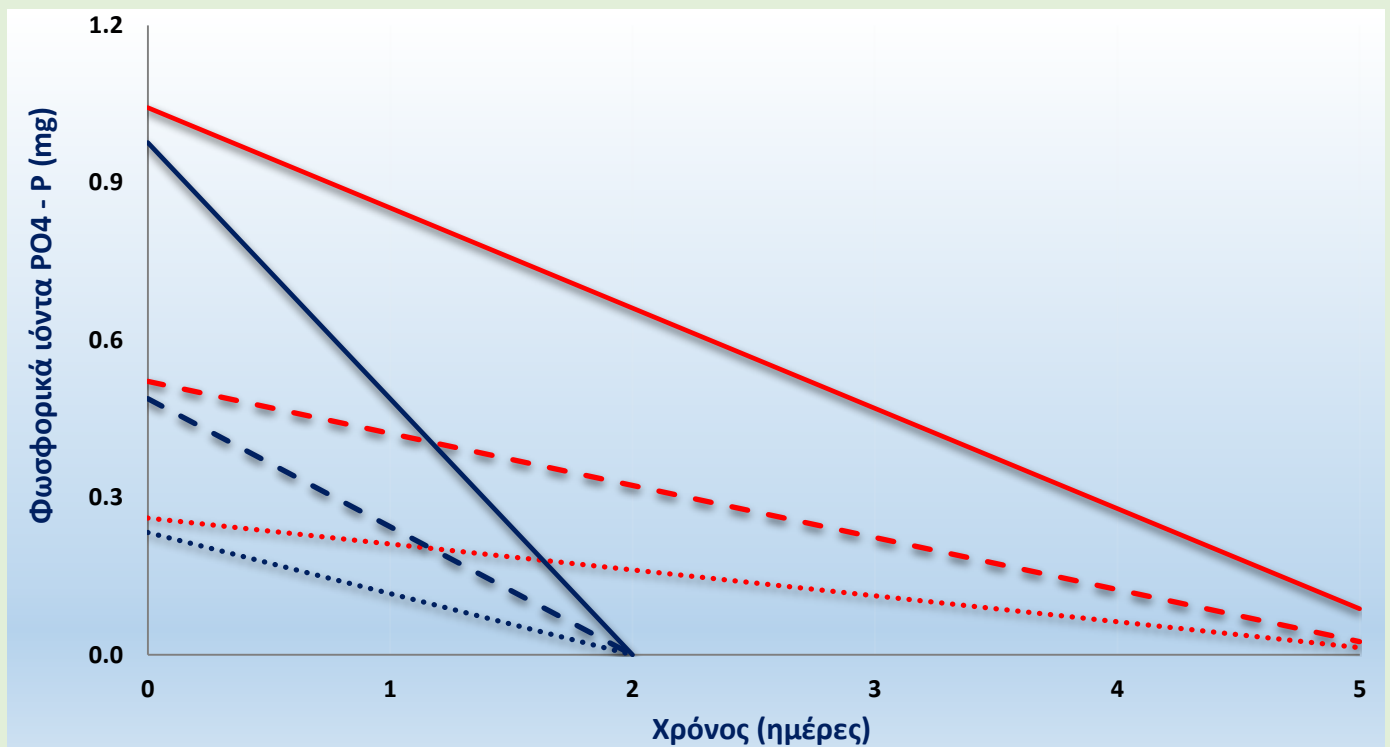
Σχήμα 4.25. Ποσοστιαία μεταβολή συγκέντρωσης χημικά απαιτούμενου οξυγόνου σε συνάρτηση με το χρόνο σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις υγρών αποβλήτων αναερόβιας χώνευσης.

Στο *Σχήμα 4.24* παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD) σε mg σε συνάρτηση με το χρόνο στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του υγρού αποβλήτου, ενώ στο *Σχήμα 4.25* παρουσιάζεται η ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD). Στο δείγμα αποβλήτου 7,3% και χαμηλότερο αρχικό εμβόλιο κυττάρων μικροφυκών, η συγκέντρωση του COD παρουσιάζει έντονη πτωτική πορεία και μειώνεται κατά 143,96 mg εντός πέντε ημερών. Στην ίδια συγκέντρωση με υψηλότερο αρχικό αριθμό κυττάρων, η πτωτική πορεία του COD είναι έντονη μέχρι τη τέταρτη ημέρα, έως την δέκατη έκτη ημέρα εμφανίζει σταθερότητα και μηδενική μεταβολή, ενώ μειώνεται ελαφρώς κατά τις τρεις τελευταίες ημέρες. Η συνολική μείωση της συγκέντρωσης στο παραπάνω δείγμα μέσα στο διάστημα των δεκαεννέα ημερών είναι 220,73 mg.

Όσον αφορά το δείγματα αποβλήτου 3,65%, η αρχική συγκέντρωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου είναι η μισή των προηγούμενων δύο δειγμάτων που αναλύθηκαν. Στο δείγμα με τον χαμηλότερο αρχικό εμβόλιο κυττάρων μικροφυκών παρουσιάζεται σταθερή και ικανοποιητική πτωτική πορεία της συγκέντρωσης του COD με μείωση κατά 65,32 mg εντός πέντε ημερών. Στην ίδια συγκέντρωση αποβλήτου με υψηλότερο αρχικό αριθμό κυττάρων, η πτωτική πορεία του COD είναι ήπια αλλά ικανοποιητική μέχρι την έκτη ημέρα, ενώ μέχρι το πέρας των δεκαεννέα ημερών εμφανίζει μηδενική μεταβολή. Η συνολική μείωση της συγκέντρωσης στο παραπάνω δείγμα μέσα στο διάστημα των δεκαεννέα ημερών είναι 108,5 mg.

Στο δείγματα αποβλήτου 1,85% η αρχική συγκέντρωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου είναι η μισή των προηγούμενων δύο δειγμάτων που αναλύθηκαν και υποτετραπλάσια των δύο πρώτων δειγμάτων (της συγκέντρωσης 7,3%). Στο δείγμα με το χαμηλότερο αρχικό εμβόλιο κυττάρων μικροφυκών, η συγκέντρωση του COD παρουσιάζει ήπια μεταβολή, με συνολική μείωση 25,59 mg σε διάστημα πέντε ημερών. Στην ίδια συγκέντρωση με τον υψηλότερο αρχικό αριθμό κυττάρων, η πτωτική πορεία του COD είναι ήπια μέχρι την τέταρτη ημέρα, ενώ μέχρι το πέρας των δεκαεννέα ημερών εμφανίζει μηδενική μεταβολή.

Φαίνεται τελικά από τα παραπάνω σχήματα ότι η μεταβολή του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου, σε όλες τις συγκεντρώσεις αποβλήτου που δοκιμάστηκαν, είναι εντονότερη κατά τις πρώτες ημέρες της πειραματικής διαδικασίας, κατά την εκθετική φάση πολλαπλασιασμού των κυττάρων της *Chlorella sorokiniana*. Μετά το πέρας κατά μέσο όρο έξι ημερών, τα κύτταρα του μικροφύκου που έχουν περάσει στη στατική φάση ανάπτυξής τους, δε μπορούν να μειώσουν περαιτέρω τη συγκέντρωση του COD, με αποτέλεσμα να παρατηρείται σταθερότητα στη τιμή του. Επιπλέον, στο παρόν σχήμα φαίνεται πως δεν υπάρχει κάποια σημαντική επίδραση της αραιώσης του αποβλήτου ή του αρχικού αριθμού κυττάρων μικροφυκών στη κατανάλωση του COD.



Σχήμα 4.26. Μεταβολή συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων (σε mg) σε συνάρτηση με το χρόνο σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις υγρών αποβλήτων αναερόβιας χώνευσης.

Στο **Σχήμα 4.26** παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων ($\text{PO}_4 - \text{P}$) σε mg σε συνάρτηση με το χρόνο στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του υγρού αποβλήτου. Στο δείγμα αποβλήτου με συγκέντρωση 7,3% και χαμηλότερο αρχικό εμβόλιο κυττάρων μικροφυκών, η συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων παρουσιάζει ικανοποιητική πτωτική πορεία και επέρχεται σχεδόν εξάντλησή τους (μείωση κατά 0,95 mg) εντός πέντε ημερών. Στην ίδια συγκέντρωση με υψηλότερο αρχικό αριθμό κυττάρων, η πτωτική πορεία των φωσφορικών ιόντων είναι έντονη με τελική απομάκρυνση των συνολικά 0,98 mg του δείγματος σε δύο ημέρες.

Όσον αφορά τα δείγματα αποβλήτου 3,65%, η αρχική συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων είναι η μισή των προηγούμενων δύο δειγμάτων που αναλύθηκαν. Στο δείγμα με τον χαμηλότερο αρχικό εμβόλιο κυττάρων μικροφυκών παρουσιάζεται ήπια και σταθερή πτωτική πορεία των φωσφορικών ιόντων και επέρχεται πλήρης εξάντλησή τους (μείωση κατά 0,51 mg) εντός πέντε ημερών. Στην ίδια συγκέντρωση αποβλήτου με υψηλότερο αρχικό αριθμό κυττάρων, η πτωτική

πορεία των φωσφορικών ιόντων είναι έντονη με τελική απομάκρυνση των συνολικά 0,49 mg του δείγματος σε δύο ημέρες.

Στο δείγματα αποβλήτου 1,85% η αρχική συγκέντρωση των φωσφορικών αμμωνιακών ιόντων είναι η μισή των προηγούμενων δύο δειγμάτων που αναλύθηκαν και υποτετραπλάσια των δύο πρώτων δειγμάτων (της συγκέντρωσης 7,3%). Στο δείγμα με το χαμηλότερο αρχικό εμβόλιο κυττάρων μικροφυκών, η συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων μειώνεται ήπια και σταθερά, μέχρις ότου εξαντληθούν πλήρως (μείωση κατά 0,25 mg) σε διάστημα πέντε ημερών. Στην ίδια συγκέντρωση με τον υψηλότερο αρχικό αριθμό κυττάρων, η μεταβολή της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων είναι έντονη με τελική απομάκρυνση των συνολικά 0,23 mg του δείγματος σε δύο ημέρες.

Φαίνεται λοιπόν ότι ο υψηλότερος αρχικός αριθμός κυττάρων του μικροάλγους *Chlorella sorokiniana*, σε όλες τις συγκεντρώσεις αποβλήτου που δοκιμάστηκαν, οδηγεί σε έντονη και γρήγορη απομάκρυνση των φωσφορικών ιόντων των δειγμάτων, ενώ αν το αρχικό εμβόλιο περιέχει λιγότερα κύτταρα η πλήρης απομάκρυνση του φωσφορικού φορτίου επιτυγχάνεται σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Επιπλέον, στο παρόν σχήμα φαίνεται πως δεν υπάρχει κάποια σημαντική επίδραση της συγκέντρωσης του αποβλήτου στη κατανάλωση των φωσφορικών ιόντων, καθώς σε όλα τα δείγματα η αρχική ποσότητα των ιόντων ήταν μικρή και εύκολα καταναλώσιμη από τα μικροφύκη, ανεξάρτητα από τη διαφορετική θολερότητα κάθε δείγματος.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των προαναφερθέντων δοκιμών κατά τη πειραματική διαδικασία, είναι δυνατό να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι τα μικροφύκη μπορούν να αξιοποιήσουν τα επιμέρους θρεπτικά συστατικά του υγρού υπολείμματος αναερόβιας χώνευσης προερχόμενο από αγροκτηνοτροφικές δραστηριότητες και να μειώσουν αποτελεσματικά το αμμωνιακό του φορτίο.

Πιο συγκεκριμένα, από τις μετρήσεις της βιομάζας των μικροφυκών, παρατηρείται ότι ακολουθήθηκε αυξητική πορεία όσον αφορά την οπτική πυκνότητα των καλλιεργειών, η οποία σχετίζεται άμεσα με την εύρυθμη ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων των μικροφυκών.

Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης των μικροφυκών (για τα στελέχη *Chlorella sorokiniana* και *Chlorella vulgaris*) επιτρέπουν την ταχεία αναπαραγωγή τους σε σύντομο χρονικό διάστημα, καθώς τα μικροφύκη αξιοποιούν ορισμένες χημικές ενώσεις του αποβλήτου, ειδικότερα τα αμμωνιακά ιόντα, με απώτερο σκοπό την πλήρη εξάντλησή τους. Η βέλτιστη θερμοκρασία κυμαίνεται από 23 έως 24° C, ενώ τα κύτταρα των μικροφυκών για να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν απαιτούν μια πηγή φωτός (ψυχρό φως) μήκους κύματος 400 - 700 nm ώστε να πραγματοποιηθεί το φαινόμενο της φωτοσύνθεσης.

Παράλληλα, για την διατήρηση του pH εντός των επιθυμητών ορίων 7,0 έως 8,0, ενδείκνυται και επιλέγεται η χορήγηση διοξειδίου του άνθρακα εντός όλων των δειγμάτων με σταθερή παροχή 7,2 mL/min, ενώ παράλληλα γίνεται διοχέτευση ατμοσφαιρικού αέρα σε ποσότητα 240 mL/min.

Όσον αφορά το υγρό απόβλητο αγροκτηνοτροφικής προέλευσης, κατά την επεξεργασία του με αναερόβια χώνευση, άλλοι μικροοργανισμοί, που ενδεχομένως να είναι είτε τοξικοί κατά των μικροφυκών είτε ανταγωνιστικοί ως προς την λήψη των θρεπτικών συστατικών του αποβλήτου, απομακρύνονται κι επομένως μπορεί να λάβει χώρα δίχως παρεμποδίσεις μια επιθυμητή ανάπτυξη και πολλαπλασιασμός των κυττάρων των μικροφυκών.

Τα μικροφύκη είναι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί και απαιτούν φως για την διενέργεια της φωτοσύνθεσης. Ωστόσο, το υγρό υπόλειμμα αναερόβιας χώνευσης λόγω της σκούρας απόχρωσής του που οφείλεται στην μεγάλη πυκνότητα σωματιδίων, δεν επιτρέπει τις ακτίνες του φωτός διαπεράσουν το εσωτερικό του ώστε να αξιοποιηθούν σε μεγάλο ποσοστό οι φωτεινές ακτίνες. Συνεπώς, πραγματοποιείται αραίωση με περιεκτικότητα υγρού υπολείμματος 7,3% ή 3,65% που καθίσταται ιδανική, αφενός για να εισέλθει φως στο δείγμα προς επεξεργασία, αφετέρου να είναι τέτοια η περιεκτικότητα ώστε να υπάρχει επάρκεια θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξη των μικροφυκών.

Από τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας, φάνηκε ότι τα στελέχη *Chlorella sorokiniana* και *Chlorella vulgaris* παρουσιάζουν παρόμοιο τρόπο ανάπτυξης και δράσης, ως προς τη μείωση των θρεπτικών συστατικών του υγρού υπολείμματος αναερόβιας χώνευσης και οδηγούν στην αποτελεσματική επεξεργασία του. Το στέλεχος *Chlorella sorokiniana* επιλέγεται ως καταλληλότερο λόγω της μεγαλύτερης ανθεκτικότητάς του σε πιθανές ανασταλτικές ουσίες του αποβλήτου (π.χ. βαρέα μέταλλα) αλλά και λόγω της εύκολης προσαρμοστικότητάς του σε μικρές μεταβολές στην οξύτητα και τη παροχή διοξειδίου του άνθρακα και οξυγόνου. Ένας ικανοποιητικός αρχικός αριθμός κυττάρων του στελέχους *Chlorella sorokiniana* είναι $4,5 \times 10^6$ cells/mL (ή 4,5 εκατομμύρια κύτταρα ανά mL) που είναι ένας ικανός αριθμός ώστε να αναπαραχθούν και να πολλαπλασιαστούν τα μικροφύκη με τον επιθυμητό ρυθμό.

Η καλλιέργεια των μικροφυκών είναι μια εναλλακτική και ανανεώσιμη πηγή ενέργειας καθώς στο κοντινό μέλλον θα απασχολήσει πολλούς επιστήμονες σε ερευνητικό και βιομηχανικό επίπεδο. Η βιομάζα των μικροφυκών μπορεί να παραχθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα για χρήσεις όπως την εισαγωγή τους στις ζωοτροφές που αφορά τον πρωτογενή τομέα, για παραγωγή βιοκαυσίμων, για παραγωγή λιπασμάτων και εδαφοβελτιωτικών προϊόντων κ.ά..

Τα πλεονεκτήματα αυτού του είδους καλλιέργειας είναι ότι δεν είναι υψηλού κόστους η ανάπτυξη και αναπαραγωγή της βιομάζας, λαμβάνει χώρα σε σύντομο χρονικό διάστημα, αξιοποιεί τα απόβλητα είτε αστικής είτε βιομηχανικής προέλευσης με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφεύγεται η ρύπανση του περιβάλλοντος από τα ίδια και η βιομάζα χαρακτηρίζεται ως μία ανανεώσιμη πηγή ενέργειας.

Προτάσεις για μελλοντικές εργασίες έγκεινται στη περαιτέρω μελέτη της επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων αγροκτηνοτροφικής προέλευσης με τη χρήση μικροφυκών, τη διερεύνηση άλλων στελεχών μικροφυκών στην αποτελεσματική επεξεργασία των αποβλήτων και την αξιοποίηση της παραγόμενης βιομάζας μικροφυκών με αποδοτικό και οικολογικό τρόπο.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **A. Hedayati Moghaddam and J. Sargolzaei** Review article: A Review Over Diverse Methods Used in Nitrogen Removal from Wastewater, *Recent Patents on Chemical Engineering* 6 (2013) p.133 – 139.
2. **Abhishek Guldhe, Sheena Kumari, Luveshan Ramanna, Prathana Ramsundar, Poonam Singh, Ismail Rawat, Faizal Bux** Review article: Prospects, recent advancements and challenges of different wastewater streams for microalgal cultivation, *Journal of Environmental Management* 203 (2017) p.299 - 315.
3. **Alaswad, Michele Dassisti, T. Prescott, Abdul Ghani Olabi** Technologies and developments of third generation biofuel production, ResearchGate, Αύγουστος 2015.
4. **Ana L. Gonçalves, José C.M. Pires, Manuel Simões, Lepabe** Review article: A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment, *Elsevier, Algal Research* 24 (2017) p.403 - 415.
5. **Anette M. Åkerstrom, Leiv M. Mortensen, Bjørn Rusten, Hans Ragnar Gislerød**, Biomass production and nutrient removal by *Chlorella* sp. as affected by sludge liquor concentration, *Journal of Environmental Management* 144 (2014) p.118 -124.
6. **Anna M. J. Kliphuis & Marcel Janssen & Evert J. van den End & Dirk E. Martens & René H. Wijffels**, Light respiration in *Chlorella sorokiniana* - *Springerlink.com*, 3 November 2010.
7. **Enrica Uggetti, Bruno Sialve, Eric Latrille, Jean-Philippe Steyer**, Anaerobic digestate as substrate for microalgae culture: The role of ammonium concentration on the microalgae productivity, *Bioresource Technology* 152 2014 p.437 - 443.
8. **Eugenia J. Olguín** Research review paper: Dual purpose microalgae–bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery, *Biotechnology Advances* 30 (2012) p.1031 - 1046.

9. **Felix Wollmann, Stefan Dietze, Jörg-Uwe Ackermann, Thomas Bley, Thomas Walther, Juliane Steingroewer, Felix Krujatz** Review article: Microalgae wastewater treatment: Biological and technological approaches, *Engineering in Life Sciences* (2019).
10. **Jun Cheng, Jiao Xu, Yun Huang, Yuyou Li, Junhu Zhou, Kefa Cen**, Growth optimisation of microalga mutant at high CO₂ concentration to purify undiluted anaerobic digestion effluent of swine manure, *Bioresource Technology* 177 (2015) p.240 - 246.
11. **Kun Li, Qiang Liu, Fan Fang, Ruihuan Luo, Qian Lu, Wenguang Zhou, Shuhao Huo, Pengfei Cheng, Junzhi Liu, Min Addy, Paul Chen, Dongjie Chen, Roger Ruan** Review article: Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review, *Bioresource Technology* 291 (2019).
12. **Marcin Zielinski, Marcin Debowski, Stanisław Szwaja, Marta Kisielewska**, Anaerobic Digestion Effluents (ADEs) Treatment Coupling with *Chlorella* sp. Microalgae Production, *Water Environment Research* February (2018) p. 155 - 163.
13. **Maria del Mar Morales-Amaral, Cintia Gómez-Serrano, F. Gabriel Acién, José M. Fernández-Sevilla, E. Molina-Grima**, Production of microalgae using centrate from anaerobic digestion as the nutrient source - *Algal Research* 9 (2015) p.297 - 305.
14. **Muneeba Khalida, Evan Johnsona, Akshat Vija, Edward J. Bouwerc, Hussnain A. Janjuab, Michael J. Betenbaugha**, Anaerobic digestion restricted to phase I for nutrient release and energy production using waste-water grown *Chlorella vulgaris* - *Chemical Engineering Journal* 352 (2018) p.756 - 764.
15. **Naoko Kobayashi, Eric A. Noel, Austin Barnes, Andrea Watson, Julian N. Rosenberg, Galen Erickson, George A. Oyler**, Characterization of three *Chlorella sorokiniana* strains in anaerobic digested effluent from cattle manure, *Bioresource Technology* 150 (2013) p.377 - 386.
16. **Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M & Cohen-Bazire G** Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* (1971) 35:171–205.

17. **Suvidha Guptaa, Sanjay B. Pawarb**, An integrated approach for microalgae cultivation using raw and anaerobic digested wastewaters from food processing industry, *Bioresource Technology*. *Bioresource Technology* 269 (2018) p.571 - 576.
18. **William A.V. Stiles, David Styles, Stephen P. Chapman, Sandra Esteves, Angela Bywater, Lynsey Melville, Alla Silkina, Ingrid Lupatsch, Claudio Fuentes Grünewald, Robert Lovitt, Tom Chaloner, Andy Bulli, Chris Morris, Carole A. Llewellync** - Review: Using microalgae in the circular economy to valorize anaerobic digestate: challenges and opportunities *Bioresource Technology* 267 (2018) p.732 - 742.
19. **Yanqun Li, Mark Horsman, Nan Wu, and Christopher Q, Nathalie Dubois-Calero** Articles: Biocatalysts and Bioreactor Design - Biofuels from Microalgae, *Biotechnol. Prog.* 24, 2008, p.815-820.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Γκέλης Σπυρίδων**, Υδατοκαλλιέργειες - Καλλιέργεια φυκών,- Τμήμα Βιολογίας ΑΠΘ-Μέρος Τρίτο, Κεφάλαιο 6, 2015.
2. **Μάρκου Γιώργος, Τζοβενής Ιωάννης, Νερατζής Ηλίας**, ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ: ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ, e-Περιοδικό Επιστήμης & Τεχνολογίας, 2013 – <http://e-jst.teiath.gr>.
3. **Τσιόνκη Ιωάννα**, Μαζική ανάπτυξη μικροφυκών υπό εργαστηριακές συνθήκες για τη χρήση τους στις υδατοκαλλιέργειες – Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία – Εθνικό Και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών Σχολή Θετικών Επιστημών - Τμήμα Βιολογίας & Τομέας Οικολογίας Και Ταξινομικής – Αθήνα 2013
4. **Τσόλχα Όλγα**, Χρήση Μικροφυκών Για Επεξεργασία Αποβλήτων Και Παραγωγή Βιοκαυσίμων – Διδακτορική Διατριβή - Πανεπιστήμιο Πατρών Πολυτεχνική Σχολή Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος Και Φυσικών Πόρων – Αγρίνιο 2017.