



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΠΟΛΙΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΔΠΜΣ: Επιστήμη και Τεχνολογία

Υδατικών Πόρων

Μεταπτυχιακή Εργασία:

**Καλλιέργεια των πράσινων μακροαλγών
Ulva lactuca και *Ulvaria fusca* για την
παραγωγή βιοκαυσίμων**

Γαλανίδης Χ.Στέφανος

Αθήνα, Ιούνιος 2011

Επιβλέπων καθηγητής: Δ. Μαμάης

Στα νεογέννητα ανιψάκια μου

Μάτα-Nehir και Οδυσσέα

Ευχαριστίες

Πρώτα απ' όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Δ. Μαμάη για την συνεχή καθοδήγηση και βοήθεια του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της διπλωματική εργασίας. Η άψογη συνεργασία μεταξύ του τμήματος Περιβαλλοντικής Τεχνολογίας και Ενέργειας του Πολυτεχνείου της Κοπεγχάγης και του ΔΠΜΣ «Επιστήμη και τεχνολογία υδατικών πόρων» του ΕΜΠ μου επέτρεψαν τη διεξαγωγή μέρους αυτής της εργασίας στην πρωτεύουσα της Δανίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Ι. Αγγελιδάκη η οποία ήταν η συνεπιβλέπουσα καθηγήτρια και η οποία μου έδωσε τη δυνατότητα να εκμεταλλευτώ τις υπεσύγχρονες εργαστηριακές εγκαταστάσεις του τμήματος περιβαλλοντικής τεχνολογίας στο τεχνικό πανεπιστήμιο της Δανίας και δημιούργησε ένα αρμονικό κλίμα συνεργασίας με το τεχνικό και επιστημονικό προσωπικό.

Εν συνεχεία θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του γραφείου Erasmus που με βοήθησε να κάνω τις πρώτες επαφές με το DTU και να λάβω την υποτροφία, χωρίς την οποία το ταξίδι αλλά και η αποπεράτωση αυτής της εργασίας θα ήταν εξαιρετικά δύσκολα.

Τέλος η βαθύτερη ευγνωμοσύνη μου πηγαίνει στην οικογένεια μου για την στήριξη τους και την πίστη τους σε μένα σε όλα τα χρόνια των σπουδών μου, στα αδέρφια μου που είναι πάντα δίπλα μου, και τους γονείς μου που μου έδωσαν τη δυνατότητα να σπουδάσω στο εξωτερικό και παράλληλα να τα περάσω τέλεια!

Περίληψη

Η *Ulva lactuca* και η *Ulvaria fusca* είναι δύο είδη πράσινων μακροαλγών που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Αυτά τα είδη έχουν υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης (0.21 d^{-1}) και υψηλή παραγωγή βιομάζας (10 φορές υψηλότερη από το καλαμπόκι), χαρακτηριστικά τα οποία τα καθιστούν κατάλληλα για καλλιέργεια. Δεν χρειάζονται αγροτική γη ούτε γλυκό νερό για την ανάπτυξη τους και αυτό τα κάνει πολύ ανταγωνιστικά απέναντι σε συμβατικές αγροτικές καλλιέργειες. Αυτά τα πράσινα μακροάλγη θα μπορούσαν να κατηγοριοποιηθούν ως αυτοτροφικοί φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί. Χρειάζονται κατάλληλες συνθήκες φωτός και θερμοκρασίας ώστε να μεγιστοποιηθεί η ανάπτυξη τους, και φυσικά προσλαμβάνουν CO_2 το οποίο βρίσκεται στο υδάτινο ενδιαίτημα τους και το χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή ενέργειας στη μορφή απλών υδατανθράκων. Το βασικό περιοριστικό θρεπτικό συστατικό για την ανάπτυξη τους είναι το άζωτο είτε με τη μορφή νιτρικών (NO_3) είτε με τη μορφή αμμωνίας (NH_4). Σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία η οποία έλαβε χώρα κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας, ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης επιτευχθεί όταν το θρεπτικό διάλυμα για την καλλιέργεια ήταν εμπλουτισμένο με νιτρικά στην περίπτωση της *Ulva lactuca* και όταν το θρεπτικό διάλυμα ήταν εμπλουτισμένο με αμμωνία στην περίπτωση της *Ulvaria fusca*. Η *Ulvaria fusca* παρουσίασε περίπου 30% χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με την *Ulva lactuca* όταν καλλιεργήθηκαν με το ίδιο θρεπτικό διάλυμα.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για να διερευνηθεί η επίδραση βακτηρίων και διατόμων κατά την καλλιέργεια, αλλά έδειξαν ότι η προσθήκη αντιβιοτικών και GeO_2 να μεν εξάλειψαν την παρουσία βακτηρίων και διατόμων αλλά επίσης αναχαίτισαν την ανάπτυξη των μακροαλγών. Εξ' αιτίας αυτού η προεπεξεργασία των μακροαλγών με αντιβιοτικά και GeO_2 κρίθηκε ακατάλληλη και απορρίφθηκε.

Η πιθανότητα να χρησιμοποιηθεί χωνεμένη κοπριά από χοίρους (ΧΧΚ) ως πηγή θρεπτικών ερευνήθηκε, και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η *Ulva lactuca* και η *Ulvaria fusca* μπόρεσαν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό διάλυμα εμπλουτισμένο με ΧΧΚ με

ρυθμούς ανάπτυξης 27-29% χαμηλότερους ($0.16d^{-1}$) από τον μέγιστο που επιτευχθεί για το κάθε είδος. Συνδυασμοί διήθησης, φυγοκέντρωσης, προσθήκης υπεροξειδίου του υδρογόνου και αυτόκαυστου δοκιμάστηκαν για την προ-επεξεργασία της ΧΧΚ πριν από την καλλιέργεια αλλά μείωσαν το επίπεδο του αζώτου κάτω από τα όρια ανίχνευσης και έτσι προ-επεξεργασία της ΧΧΚ δεν κρίθηκε απαραίτητη.

Η *Ulva lactuca* και η *Ulvaria fusca* επίσης χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή τροφής για αναερόβια θερμοφιλή χώνευση με ΧΧΚ ως υπόστρωμα. Τα δείγματα των αλγών είχαν κοπεί σε μικρά κομματάκια, και μισά από τα φύλλα είχαν πλυθεί με γλυκό νερό ενώ τα άλλα μισά αφέθηκαν με το επιφανειακό θαλασσινό νερό ούτως ώστε να διερευνηθεί η επίδραση του θαλασσινού αλατιού στην αναερόβια χώνευση. Η μέση παραγωγή μεθανίου που επιτεύχθηκε ήταν $187 \text{ mL CH}_4 / \text{gVS}$ και $214 \text{ mL CH}_4 / \text{gVS}$ για την *Ulva lactuca* και την *Ulvaria fusca* αντίστοιχα και ήταν 21-29% υψηλότερη όταν τα φύλλα των αλγών είχαν πλυθεί πριν από τη χώνευση ($P < 0.05$). Τα επίπεδα Na^+ , K^+ δεν ξεπέρασαν το 1g/L και το επιφανειακό αλάτι δεν φάνηκε να είναι ο λόγος αυτής της ανισότητας.

Επιπλέον τα *Ulva* sp. περιέχουν υψηλό ποσοστό υδατανθράκων (>50%) το οποίο τα καθιστά κατάλληλα κυτταρινική ζύμωση αιθανόλης. Ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή της αιθανόλης μετά την ενζυματική υδρόλυση των αλεσμένων δειγμάτων και η επίδραση αλκαλικής προ-επεξεργασίας διερευνήθηκε σε σχέση με τη δυνητική παραγωγή αιθανόλης.

Abstract

Ulva lactuca and *Ulvaria fusca* are two species of green marine macroalgae that are particularly interesting for biofuels production. These species have high growth rates (0.21 d^{-1}) and high biomass yields (10x corn) which makes them suitable for cultivation. They do not need agricultural land nor fresh water for their growth and that makes them very competitive against agricultural land crops. These green macroalgae are autotrophic photosynthetic organisms. They require light and suitable temperature conditions to maximize their growth and they capture CO_2 from their natural habitat as carbon source for the production of energy in the form of sugars. The basic nutrient source for their growth is nitrogen either in the form of NO_3 or in the form of NH_4 . According to the experimental work conducted in this study the maximum growth rate was achieved when culture medium enriched with NO_3 (F/2) was used in the case of *Ulva lactuca* and when culture medium enriched with NH_4 was used in the case of *Ulvaria fusca* cultivation. *Ulvaria fusca* had approximately 30% lower growth rate than *Ulva lactuca* when the same culture medium was used.

Tests were performed to investigate the effect of bacteria and diatoms during the cultivation process but they showed that addition of antibiotics and GeO_2 eliminated bacteria and diatoms but they also inhibited the growth of the macroalgae. Thus pre-treatment of the macroalgae before the cultivation was excluded.

The possibility of using digested pig manure (DPM) as nutrient source for the cultivation of the two aforementioned species was investigated and it turned out that *Ulva lactuca* and *Ulvaria fusca* can grow in culture medium enriched with DPM with growth rates ~27% lower than the maximum achieved for each species (0.16 d^{-1}). Filtration, centrifugation, addition of hydrogen peroxide and autoclave were combined to pre-treat the DPM before the cultivation but they reduced the nitrogen level under detection limits and so pre-treatment of the DPM was unnecessary.

There are two categories of products that can be derived from macroalgae. Energy products and non-energy products. In this study anaerobic digestion and the production

of biogas as well as ethanol fermentation and the production of ethanol were investigated. Biodiesel was not an option for these green macroalgal species since they contained very low amounts of lipids which are necessary for biodiesel production. Furthermore a review over the non-energy products from *Ulva* spp. was conducted and showed that there are very useful and interesting polymers that can be extracted, and of course that these algae can be used as food supplements as well.

Ulva lactuca and *Ulvaria fusca* were used as substrate for anaerobic thermophilic digestion with DPM as inoculum. The samples were macerated, and half of the algal fronds were washed with fresh water and the other half were left with the superficial sea water in order to investigate the effect of sea salt in the anaerobic digestion. The average methane yield achieved was 187 mL CH₄/ gVS and 214 mL CH₄/ gVS for *Ulva lactuca* and *Ulvaria fusca* respectively and it was 21-29% higher when the algal fronds were washed before the inoculation (P<0.05). The Na⁺, K⁺ levels did not exceed 1g/L and sea salt did not seem to be the cause of this disparity.

A disadvantage of anaerobic digestion of macroalgae compared to for instance terrestrial energy crops is the high water content of algae.

In the present study the TS and VS content of *U. lactuca* and *U. fusca* were 3.57% / 2.95% and 5.37% / 4.87%, respectively, which will not allow a high loading rate in a continuously fed system at 15–18 days hydraulic retention time. In addition, the weight specific methane yield of *U. lactuca* and *U. fusca* was low (6 m³ t⁻¹ and 10 m³ t⁻¹ respectively) due to the high water content. Therefore in their raw form, *U. lactuca* and *U. fusca* cannot be used to boost the methane yield of manure based biogas plants like industrial waste is used today (Angelidaki and Ellegaard, 2003).

Furthermore *Ulva* spp. contains a high amount of carbohydrates (>60 DW%) making them suitable for cellulosic ethanol fermentation. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* was used for ethanol fermentation after the enzymatic hydrolysis of the macerated macroalgal species and the effect of alkaline pre-treatment was also investigated in

regard to the potential ethanol production. During fermentation of biomass to ethanol carbon dioxide is released but the growth of the new biomass to maintain a supply of feedstock requires carbon dioxide as well (i.e. plants use CO₂ to synthesize cellulose during photosynthesis cycle). Thus, ethanol represents a closed carbon dioxide cycle and no net CO₂ is added to the atmosphere, making ethanol an environmentally beneficial energy source when produced in this way (Wyman and Hinman 1990; Chandel et al. 2007).

Although *U. lactuca* and *U. fusca* have a high content of polysaccharides a large fraction of these sugars are pentoses. These two algal species contain also high amounts of rhamnose and a small amount of xylose which are both pentoses. In consequence the ethanol production did not reflect the overall potential of these macroalgae and a more suitable microorganism or a two-step fermentation could give higher results than the ones obtained.

Alkaline/Oxidative pre-treatment did not increase the ethanol production even though it increased the sugar yield slightly. It can be enounced that this pre-treatment method was not suitable for the green macroalgae that were tested. It decreased the ethanol production by 57% and 135% for *U.lactuca* and *U.fusca* respectively.

The largest and most interesting family of polysaccharides found in *Ulva spp.* is known as Ulvan and it has been researched for its potential uses and activities.

The recent interest for ulvan arises from its unique physicochemical, rheological, and biological properties that are beginning to be described. Its unusual chemical composition and regular structure combining uronic acids, sulfate groups, and rare sugars, such as rhamnose and iduronic acid, are starting to be unraveled.

Ulvan's potential activities are summarized below:

- Anticoagulant activities (heparin like)
- Antioxidant activities
- Antihyperlipidemic activities
- Antitumoral activities
- Plant defense elicitor
- Gelling properties
- Plant nitrogen uptake improvement

The study was based on the idea of an integrated biorefinery research concept according to which the algae go through the cultivation phase first and then the biomass is utilized as substrate either for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation or anaerobic digestion. Emphasis was given to the recycling of the products of each step thus reducing the need for fertilizers or extra carbon and maximizing the growth of the algae. Also the idea of incorporating algal biomass (e.g. from green tides) in biogas treatment plants in conjunction with organic waste was researched. The effluent digested manure/sludge can then be treated and utilized as fertilizer for further cultivation of the algal cultures.

Finally the new biomass can be re-introduced to the system and so on.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<u>1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</u>	<u>17</u>
1.1 ΣΤΟΧΟΙ	24
1.2 ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ.....	25
1.3 ΔΙΑΡΘΡΩΣΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	27
<u>2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΛΓΩΝ.....</u>	<u>29</u>
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	31
2.1 ΓΕΝΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ	31
2.1.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	33
2.1.2 ΈΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΕΩΝ	34
<i>ΕΞΑΛΕΙΨΗ ΔΙΑΤΟΜΩΝ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....</i>	<i>34</i>
2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	37
2.2.1 ΣΤΟΧΟΙ.....	37
2.2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ.....	38
2.2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ.....	41
2.2.4 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ.....	42
2.2.5 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ.....	43
2.2.6 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ	49
2.3 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	51
2.3.1 ΦΑΣΗ 1 – ΈΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΕΩΝ.....	51
2.3.2 ΦΑΣΗ 2 – ΠΗΓΕΣ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ	54
2.3.3 ΦΑΣΗ 3 – ΧΚΧ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ.....	59
2.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	63
<u>3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΩΝ.....</u>	<u>65</u>
3.1 ΓΕΝΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ.....	67
3.1.1 ΆΛΓΗ ΚΑΙ ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ	68
3.1.2 ΒΙΟΑΕΡΙΟ.....	69
3.1.3 ΒΙΟ-ΑΛΚΟΟΛΕΣ.....	70
3.1.4 ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ.....	72
3.1.5 ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΧΩΝΕΥΣΗ	73
3.1.6 ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ.....	83

3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	95
3.2.1 ΥΠΟΘΕΣΕΙΣ	95
3.2.2 ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ	95
3.2.3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	96
3.2.4 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ	105
3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	111
3.3.1 TS/VS/COD	111
3.3.2 ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕΘΑΝΙΟΥ	112
3.3.3 ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕΘΑΝΙΟΥ	113
3.3.4 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ	121
3.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	125

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΠΡΟΪΟΝΤΑ, ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ 127

4.1 ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΑΠΟ ΜΑΚΡΟΑΛΓΗ	129
4.1.1 ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΑΠΟ ΜΑΚΡΟΑΛΓΗ	129
4.1.2 ΜΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΑΠΟ ΜΑΚΡΟΑΛΓΗ	131
4.1.3 ΜΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ <i>ULVA SP.</i>	134
4.2 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	139
4.3 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	143

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... 145

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α..... 153

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β..... 183

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Δημοφιλέστερα είδη καλλιεργούμενων μακροαλγών παγκοσμίως για το 2000 (FAO 2003)....	21
Πίνακας 2: Αντιβιοτικά μείγματα από τους Provasoli (1958) και Tatewaki et al. (1989). Οι ποσότητες προστίθενται σε 10 mL dH ₂ O.....	35
Πίνακας 3.....	38
Πίνακας 4.....	39
Πίνακας 5.....	41
Πίνακας 6 Συσχέτιση επιφάνειας-βάρους.....	47
Πίνακας 7 Μέσοι ρυθμοί ανάπτυξης στα πειράματα εξάλειψης επιμολύνσεων.....	52
Πίνακας 8 Μέσοι ρυθμοί ανάπτυξης των <i>U.lactuca</i> και <i>U.fusca</i> που καλλιεργήθηκαν κάτω από διαφορές πηγές θρεπτικών.....	57
Πίνακας 9 Μέσοι ρυθμοί ανάπτυξης της <i>Ulva lactuca</i> που έχει καλλιεργηθεί με διαφορετικές συγκεντρώσεις ΧΚΧ και NH ₄	59
Πίνακας 10 Τυπική σύσταση βιοαερίου.....	70
Πίνακας 11 Χαρακτηριστικά και δυναμικό βιοαερίου για διάφορα οργανικά υλικά κατάλληλα προς αναερόβια χώνευση (I. Angelidakí).....	81
Πίνακας 12 Χημική σύσταση των <i>Ulva lactuca</i> και <i>Ulvaria fusca</i>	97
Πίνακας 13 % VS στην <i>Ulva lactuca</i> και την <i>Ulvaria fusca</i>	106
Πίνακας 14 Απαιτούμενοι όγκοι για οργανική φόρτιση 1 gVS/L.....	106
Πίνακας 15 Απαιτούμενοι όγκοι για οργανικοί φόρτιση 2 gVS/L.....	107
Πίνακας 16 Απαιτούμενοι όγκοι για οργανική φόρτιση 4 gVS/L.....	107
Πίνακας 17 Πειραματικός σχεδιασμός για την ενζυματική υδρόλυση και την αλκοολική ζύμωση μόνο για την <i>Ulva lactuca</i> . Ποσότητες συστατικών που προστέθηκαν στις φιάλες.....	109
Πίνακας 18 %TS και %VS στις <i>Ulva lactuca</i> και <i>Ulvaria fusca</i>	112
Πίνακας 19 Θεωρητική παραγωγή μεθανίου από τις <i>Ulva lactuca</i> και <i>Ulvaria fusca</i>	112
Πίνακας 20 Μέση παραγωγή μεθανίου.....	118
Πίνακας 21 Επεξεργασίες και παραγόμενα καύσιμα από μακροάλγη.....	129
Πίνακας 22 Είδη μακροαλγών και κατανάλωση ως τρόφιμα.....	132

1 Κεφάλαιο: Εισαγωγή

Τα μακροσκοπικά θαλάσσια άλγη (γνωστά και ως φύκη) αποτελούν ένα σημαντικό φυσικό πόρο για τους ωκεανούς. Τα μακροάλγη είναι σημαντικές τροφές για ζώα και ανθρώπους, αλλά και λίπασμα για άλλα φυτά καθώς επίσης και πηγή για διάφορες χημικές ουσίες (Lembj and waaland 1988, Sahoo 2000). Τα μακροάλγη κερδίζουν έδαφος σε νέα πειραματικά συστήματα βιοτεχνολογικής έρευνας (Sahoo et al. 2002) και σαν ένα αναπόσπαστο κομμάτι ενός ολοκληρωμένου συστήματος υδατοκαλλιέργειας (Chopin et al. 2001, Troell et al. 2003, Neori et al. 2004). Όλοι χρησιμοποιούμε προϊόντα από φύκη στην καθημερινή μας ζωή με τον ένα ή τον άλλο τρόπο. Για παράδειγμα, κάποιοι πολυσακχαρίτες χρησιμοποιούνται σε οδοντόκρεμες, σαπούνια, σαμπουάν, καλλυντικά, γάλα, παγωτό, κρέας, επεξεργασμένες τροφές και σε πολλά άλλα προϊόντα. Σε πολλές ασιατικές χώρες όπως η Ιαπωνία, η Κίνα, η Κορέα και άλλες τα μακροάλγη είναι κύρια διατροφικά προϊόντα.

Η έναρξη της εντατικής καλλιέργειας μακροαλγών χρονολογείται από το 17^ο αιώνα όταν στην Ιαπωνία η προμήθεια του δημοφιλούς Nori (κόκκινο άλγος με λογχοειδή φύλλα) δεν μπορούσε να φτάσει τα καλύψει τα αυξανόμενα επίπεδα της ζήτησης. Το Nori, *Porphyra yezoensis*, χρησιμοποιείται στην Ιαπωνία εδώ και τουλάχιστον 2000 χρόνια ως βασική πηγή τροφής και πολλά άλλα είδη για ιατρικές θεραπείες. Η ζήτηση των παραγόμενων μακροαλγών αυξήθηκε και με την ανάπτυξη νέων τεχνικών καλλιέργειας μετά το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο. Η καλλιέργεια του Nori τώρα κατέχει την πρώτη θέση στη θαλάσσια βιομηχανία της Ιαπωνίας. Σε σύνολο 350000 τόνοι καλλιεργούνται ετησίως με συνολική αξία 1 δισεκατομμύριο US \$.

Στην Κίνα η καλλιέργεια μακροαλγών καθιερώθηκε την δεκαετία του 1950. Το πρώτο είδος που καλλιεργήθηκε ήταν το *Laminaria japonica*, και η παραγωγή του αυξήθηκε απο 62 τόνους το 1952 σε μια παρούσα συγκομιδή που ανέρχεται σε 3.5 εκατομμύρια τόνους. Σε βιομηχανική κλίμακα η καλλιέργεια μακροαλγών είναι περιορισμένη σε ασιατικές χώρες. Τα μακροάλγη κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούνται ως τρόφιμο, ωστόσο στις Φιλιππίνες, στην Ταϊβάν και σε μερικές χώρες της Αφρικής τα μακροάλγη καλλιεργούνται για την παραγωγή carrageen και αργού άγαρ. Τα είδη με παγκόσμια

σημασία στη βιομηχανία τροφίμων συμπεριλαμβάνουν το *Nori* (μωβ θαλάσσιο λαχανικό) και μερικά διαφορετικά είδη φυκιών όπως τα *Laminaria sp.* και *Undaria sp.*

Παραδοσιακά, τα μακροάλγη συλλέγονταν από φυσικά αποθέματα ή άγριους πληθυσμούς. Ωστόσο, αυτοί οι πόροι εξαντλούνταν λόγω υπερβολικής εκμετάλλευσης γι' αυτό νέες τεχνικές καλλιέργειας έχουν αναπτυχθεί (Critchley and Ohno 1998). Σήμερα, οι τεχνικές καλλιέργειας μακροαλγών είναι τυποποιημένες και οικονομικές. Πολλοί παράγοντες, όπως η μορφολογία και η ικανότητα αναγέννησης του βλαστού, η σύνθετη αλληλεπίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας, της θερμοκρασίας, των θρεπτικών συστατικών καθώς επίσης και της κίνησης του νερού είναι υπεύθυνοι για την επιτυχία μιας καλλιέργειας μεγάλης κλίμακας.

Παρόλο που η καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας σε ανοιχτή θάλασσα κάποιων ειδών έχει ήδη πραγματοποιηθεί σε πολλές ασιατικές χώρες, άλλα είδη έχουν καλλιεργηθεί σε δεξαμενές και γούρνες. Για παράδειγμα, το είδος *Chondrus crispus* έχει καλλιεργηθεί κυρίως στον Καναδά και στην Πορτογαλία. Το είδος *Gracilaria sp.* έχει καλλιεργηθεί σε δεξαμενές και αυλάκια στο Ισραήλ και σε μικρές τεχνητές λίμνες στην Ταϊβάν και στην Ταϊλάνδη. Καλλιέργεια σε μικρές λίμνες κάποιων μακροαλγών έχει δοκιμαστεί στη Φλόριντα και σε άλλα μέρη του κόσμου, αλλά χωρίς επιτυχία. Τα επίφυτα, τα παράσιτα και οι υψηλές απαιτήσεις σε θρεπτικά δημιουργήσαν προβλήματα. Η καλλιέργεια σε δεξαμενές γενικά δεν είναι δημοφιλής ούτε ιδιαίτερα επιτυχής, κυρίως για οικονομικούς λόγους (Neogi et al. 2004).

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 50 ετών, περίπου 100 είδη μακροαλγών έχουν καλλιεργηθεί σε φάρμες, αλλά μόνο μία δωδεκάδα από αυτά είναι εμπορεύσιμα. Ο πίνακας 1 δίνει πληροφορίες για την παραγωγή των πιο δημοφιλών από αυτά. Αρκετές χώρες έχουν εμπλακεί στην καλλιέργεια μακροαλγών, αλλά η Κίνα, η Κορέα, η Ιαπωνία και οι Φιλιππίνες είναι οι ηγέτες. Στην παρούσα εργασία η μεθοδολογία της καλλιέργειας των ειδών *Ulva lactuca* και *Ulvaria fusca* θα περιγραφούν και θα συζητηθούν.

Πίνακας 1: Δημοφιλέστερα είδη καλλιεργούμενων μακροαλγών παγκοσμίως για το 2000 (FAO 2003)			
Είδος	Αξία (10⁶ U.S.\$)	Ακατέργαστο υλικό (τόνοι)	U.S.\$ ανά τόνο
<i>Laminaria</i>	2811	4580000	613
<i>Porphyra</i>	1118	1011000	1105
<i>Undaria</i>	149	311105	480
<i>Eucheuma and Kappaphycus</i>	46	628576	73
<i>Gracilaria</i>	11	12510	879
Σύνολο	4632	5972737	

Τα μακροάλγη έχουν πολλές άλλες δυνητικές χρήσεις, εκτός από την καλλιέργεια για κατανάλωση ως τρόφιμα. Βιοκαύσιμα μπορούν να παραχθούν από την βιομάζα των αλγών όπως βιοαέριο, βιοαιθανόλη και βιοντίζελ, και άλλα προϊόντα πολύ χρήσιμα για την καθημερινή μας ζωή. Στο κεφάλαιο 3 υπάρχει μια αναλυτική περιγραφή των βιοκαυσίμων από άλγη και στο κεφάλαιο 4 παρουσιάζεται ένα ευρύ φάσμα προϊόντων που εξάγονται από άλγη.

Χρησιμοποιώντας βιοαέριο πολλά πλεονεκτήματα προκύπτουν. Στη βόρεια Αμερική, η χρήση βιοαερίου θα μπορούσε να παράξει αρκετή ηλεκτρική ενέργεια για να καλύψει το 3% των ηλεκτρικών δαπανών της ηπείρου. Επιπλέον, η χρήση βιοαερίου μπορεί δυνητικά να βοηθήσει στη μείωση της κλιματικής αλλαγής. Συνήθως, η κοπριά η οποία αφήνεται να αποσυντεθεί απελευθερώνει δύο κύρια αέρια που συμβάλλουν στην παγκόσμια κλιματική αλλαγή: διοξείδιο του αζώτου και μεθάνιο. Το διοξείδιο του αζώτου θερμαίνει την ατμόσφαιρα 310 φορές περισσότερο από το διοξείδιο του άνθρακα και το μεθάνιο 21 φορές περισσότερο από το διοξείδιο του άνθρακα. Μετατρέποντας τη κοπριά από αγελάδες σε βιοαέριο μέσω αναερόβιας χώνευσης, τα εκατομμύρια των αγελάδων που βρίσκονται στις ΗΠΑ θα μπορούσαν να παράξουν 100*10⁹ KWh ηλεκτρικού ρεύματος, αρκετές για να ηλεκτροδοτήσουν εκατομμύρια

νοικοκυριά. Μια αγελάδα μπορεί να παράξει ημερησίως κοπριά που αντιστοιχεί σε 3KWh ηλεκτρικού ρεύματος, ενώ μόνο 2.4 KWh χρειάζονται για να ηλεκτροδοτήσουν μια λάμπα 100 KW για μία μέρα. Επιπλέον, μετατρέποντας την κοπριά από αγελάδες σε βιοαέριο αντί να αφήνεται να αποσυντεθεί, θα ήταν δυνατόν να μειωθούν τα αέρια του θερμοκηπίου κατά 99 εκατομμύρια τόνους ή 4% (Webber, Michael E and Amanda D Cuellar, 2009).

Τα 30 εκατομμύρια αγροτικά νοικοκυριά στην Κίνα έχουν χωνευτές απολαμβάνουν 12 οφέλη: γλιτώνουν ορυκτά καύσιμα, γλιτώνουν χρόνο συλλογής ξυλείας, προστατεύουν τα δάση, χρησιμοποιούν υπολείμματα σοδειάς για ζωτροφή αντί για καύσιμα, γλιτώνουν χρήματα, γλιτώνουν χρόνο μαγειρέματος, βελτιώνουν τις συνθήκες υγιεινής, παράγουν λίπασμα υψηλής ποιότητας, επιτρέπουν την τοπική παραγωγή ηλεκτρικού ρεύματος, βελτιώνουν το αγροτικό επίπεδο ζωής και μειώνουν τη ρύπανση αέρα και υδάτων (Regina Gregory).



Εικόνα 1 Πράσινη παλίρροια κατά τη διάρκεια των Ολυμπιακών αγώνων στην ακτή Qingdao, Κίνα.

Τα τελευταία χρόνια, αρκετά σχέδια κλασματοποίησης και επεξεργασίας βιομάζας έχουν συσταθεί ως μία λύση για καθαρή, αποδοτική και οικονομικά εφικτή

χρησιμοποίηση λιγνοκυτταρινικών υλικών όπως υπολείμματα από σοδειές, ξύλο και άλγη. Το σύγχρονο 'βιοδιυλιστήριο' όπως ένα διυλιστήριο πετρελαίου είναι μία μονάδα που επεξεργάζεται οργανικά υλικά για να παράξει ένα ευρύ φάσμα προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων συστατικών υψηλής αξίας, καύσιμα μεταφοράς και απευθείας ενέργεια (Ragauskas et al., 2006). Εφόσον η τρέχουσα τιμή των πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αιθανόλης εκτιμάται ότι θα αυξηθεί, τα λιγνοκυτταρινικά υλικά παραμένουν ως η μόνη βιώσιμη επιλογή για τη χρήση τους ως ανανεώσιμες πρώτες ύλες για την παραγωγή αιθανόλης. Υπάρχουν τεράστιες ποσότητες μακροαλγών που αφήνονται στις ακτές να αποσυντεθούν κάθε χρόνο μετά από πράσινες παλίρροιες, οι οποίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη χαμηλής αξίας για την παραγωγή αιθανόλης. Παρά τις σημαντικές τεχνολογικές εξελίξεις στην παραγωγή αιθανόλης από λιγνοκυτταρινικές πρώτες ύλες τις τελευταίες δεκαετίες, η τιμή της αιθανόλης δεύτερης γενιάς είναι ακόμα υψηλή και κυμαίνεται γύρω στα \$2.65 ανά γαλόνι (Kumar et al., 2009). Αυτή η υψηλή τιμή είναι εξαιτίας τεχνολογικών εμποδίων σε διάφορα βήματα της επεξεργασίας.

Τα μακροάλγη μπορούν να μετατραπούν σε μια μεγάλη ποικιλία πολυμερών υψηλής αξίας και σε ενεργειακά και χημικά προϊόντα. Τα πολυμερή που εξάγονται από τα άλγη έχουν ένα ευρύ φάσμα βιομηχανικών χρήσεων σε καλλυντικά, προϊόντα προσωπικής φροντίδας, βερνίκια και χρώματα με μια παγκόσμια αγορά χιλιάδων τόνων (Deswarte et al., 2006, 2007). Με επιπλέον μείωση του κόστους των ενζύμων της υδρόλυσης, και σύγχρονη τεχνολογία ολοκληρωμένης επεξεργασίας για νέες μονάδες παραγωγής αιθανόλης, η αιθανόλη δεύτερης γενιάς θα μπορέσει να ανταγωνιστεί τη βενζίνη σε μεγάλη κλίμακα στο μέλλον χωρίς επιδοτήσεις. Η αιθανόλη που προέρχεται από βιομάζα είναι από τα λίγα υγρά καύσιμα που δεν συμβάλλουν στα αέρια του θερμοκηπίου. Η μείωση της ρύπανσης από αέρια θερμοκηπίου είναι το βασικό πλεονέκτημα της μετατροπής βιομάζας σε αιθανόλη (Chandel et al. 2007). Ερευνητικές προσπάθειες είναι ακόμα σε εξέλιξη. Εύρεση νέων μικροοργανισμών (γενετικά τροποποιημένων ή μη) με μεγαλύτερη ανοχή στην αιθανόλη και μεγαλύτερη

παραγωγικότητα θα δημιουργήσει τη βάση για μελλοντική εμπορική ανάπτυξη της παραγωγής αιθανόλης από λιγνοκυτταρινικά υλικά (Talebnia et al. 2010).

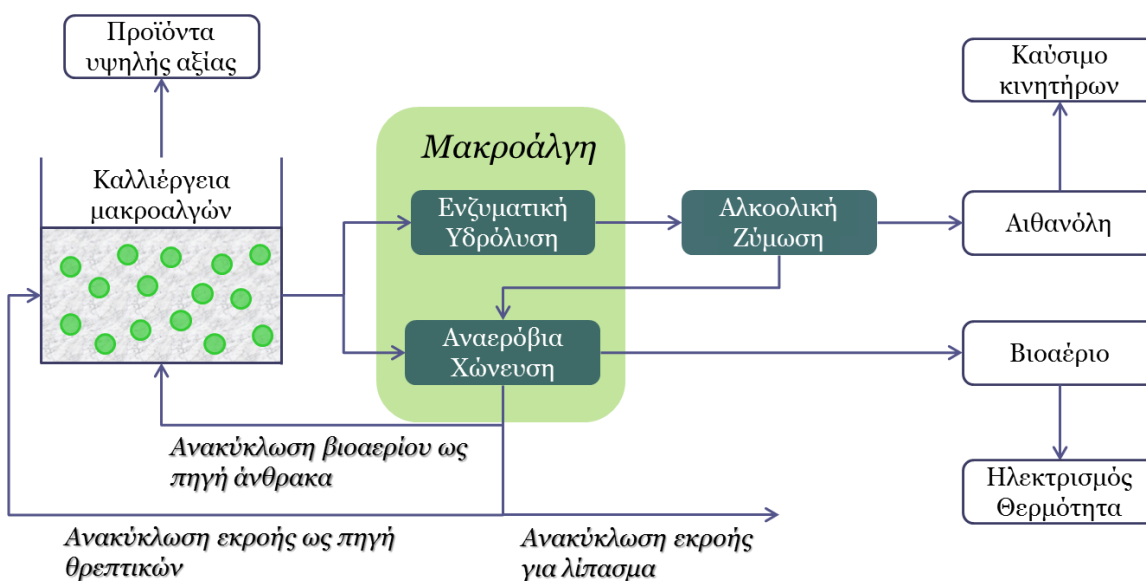
1.1 Στόχοι

Οι στόχοι αυτής της εργασίας είναι:

- Να εξεταστεί το δυναμικό των *Ulva lactuca* και *Ulvaria fusca* ως κυτταρινικά υποστρώματα για την παραγωγή αιθανόλης
- Να διερευνηθεί η επίδραση της προεπεξεργασίας στην αποδοτικότητα των ακόλουθων βημάτων της επεξεργασίας παραγωγής της αιθανόλης (ενζυματική υδρόλυση/σακχαροποίηση και ζύμωση)
- Να προσδιοριστεί το δυναμικό παραγωγής μεθανίου *Ulva lactuca* και *Ulvaria fusca*, και να διερευνηθεί η επίδραση του επιφανειακού αλατιού που βρίσκεται στα φύλλα των αλγών, κατά την αναερόβια χώνευση.
- Να μελετηθεί η απόκριση στην ανάπτυξη της *Ulva sp.* όταν έχει προηγηθεί προεπεξεργασία με αντιβιοτικά και GeO_2 για την εξάλειψη βακτηρίων και διατόμων.
- Να επιτευχθεί ο υψηλότερος δυνατός ρυθμός ανάπτυξης των *Ulva lactuca* και *Ulvaria fusca*, τα οποία έχουν καλλιεργηθεί με διαφορετικά καθεστώτα θρεπτικών.
- Να διερευνηθεί η πιθανότητα χρήσης χωνεμένης κοπριάς από χοίρους (ΧΚΧ) ως πηγή θρεπτικών για την καλλιέργεια των *Ulva lactuca* και *Ulvaria fusca*.
- Να γίνει μια ανασκόπηση στην ποικιλία των διαφόρων ενεργειακών και μη-ενεργειακών προϊόντων που μπορούν να εξαχθούν από τη βιομάζα των πράσινων μακροαλγών *Ulva lactuca* και *Ulvaria fusca*.

1.2 Ερευνητική μελέτη και πειραματική προσέγγιση

Τα πράσινα μακροάλη *Ulva lactuca* και *Ulvaria fusca* που ευδοκούν στη Δανία και στη Γροιλανδία αντίστοιχα, ερευνήθηκαν ως προς την απόκριση τους σε καλλιέργεια εργαστηριακής κλίμακας, ως προς τη σύνθεση τους και το δυναμικό παραγωγής βιοκαυσίμων. Αυτά τα θαλάσσια άλη είναι πλούσια σε πολυσακχαρίδια, χρήσιμα σε πολλά καθημερινά προϊόντα, καθώς επίσης και δυνητικές πηγές βιοκαυσίμων όπως το βιοαέριο και η βιοαιθανόλη. Ο σχετικά υψηλός ρυθμός ανάπτυξής τους τα καθιστά ως ένα καλό υποψήφιο για καλλιέργεια βιομηχανικής κλίμακας εφόσον σχεδιαστεί ένα ολοκληρωμένο σχέδιο κλασματοποίησης και επεξεργασίας βιομάζας τέτοιο ώστε τα λειτουργικά κόστη να διατηρούνται στο ελάχιστο, μέσω της επαναχρησιμοποίησης των προϊόντων της κάθε διεργασίας (Εικόνα 2).



Εικόνα 2 Ολοκληρωμένο σχέδιο κλασματοποίησης και επεξεργασίας μακροαλγών

Η πειραματική προσέγγιση που ακολουθήθηκε κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας μπορεί να χωριστεί σε 4 μέρη:

1. Χαρακτηρισμός των υλικών και των υποστρωμάτων

Σε αυτό το μέρος πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τον προσδιορισμό των ολικών και πτητικών στερεών (TS/VS) που περιέχονταν στα άλγη και στην χωνεμένη κοπριά από χοίρους (ΧΚΧ). Επίσης πραγματοποιήθηκαν πειράματα ολικού και ελεύθερου Kjeldahl αζώτου σε συνδυασμό με έτοιμα αντιδραστήρια για τον προσδιορισμό των επιπέδων νιτρικών και αμμωνίας τόσο στα διαλύματα θρεπτικών που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια όσο και στα άλγη και στη ΧΚΧ. Επίσης πειράματα υδρόλυσης πραγματοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του περιεχομένου των υδατανθράκων στα μακροάλγη.

2. Καλλιέργεια των *Ulva lactuca* και *Ulvaria fusca*

Τρία διαφορετικά πειράματα καλλιέργειας εκτελέστηκαν, καθένα από τα οποία διήρκεσε από 12 έως 20 ημέρες, κάτω από διαφορετικές συνθήκες για την παρακολούθηση της ανάπτυξης των μακροαλγών *Ulva lactuca* και *Ulvaria fusca*. Τεχνητό και φυσικό θαλασσινό νερό, σταθερές συνθήκες φωτισμού και διαφορετικές πηγές θρεπτικών χρησιμοποιήθηκαν κατά την καλλιέργεια. Επιπροσθέτως, διερευνήθηκε η χρήση της ΧΚΧ σε διάφορες συγκεντρώσεις ως κατάλληλη πηγή θρεπτικών για την ανάπτυξη των μακροαλγών.

3. Αναερόβια Χώνευση των πράσινων μακροαλγών

Πειράματα για τον προσδιορισμό του δυναμικού παραγωγής μεθανίου πραγματοποιήθηκαν κάτω από θερμοφίλες αναερόβιες συνθήκες με ΧΚΧ ως πηγή βιομάζας και αλεσμένα άλγη ως υπόστρωμα. 42 φιάλες/αντιδραστήρες λειτουργούσαν παράλληλα οι οποίες περιείχαν πλυμένα και μη δείγματα από *Ulva lactuca* και *Ulvaria fusca*, ούτως ώστε να διερευνηθεί η επιρροή του αλατιού στην αναερόβια χώνευση. Όλα τα πειράματα εκτελέστηκαν σε συνθήκες 'batch' με τροφοδοσία μόνο στην αρχή της χώνευσης, με τρεις διαφορετικές οργανικές φορτίσεις για λόγους σύγκρισης.

4. Αλκοολική Ζύμωση

Και τα δύο είδη πράσινων μακροαλγών που εξετάστηκαν αποτελούνται κυρίως από κυτταρίνη και ημικυτταρίνη. Το υψηλό ποσοστό υδατανθράκων (>60% ξ.β.) που περιέχουν τα καθιστά καλούς υποψήφιους για αλκοολική ζύμωση της κυτταρινικών ενώσεων. Πειράματα ενζυματικής υδρόλυσης και αλκοολικής ζύμωσης από το μύκητα *S.Cerevisiae* πραγματοποιήθηκαν ώστε να προσδιοριστεί το περιεχόμενο των δειγμάτων σε σάκχαρα και να εκτιμηθεί το δυναμικό παραγωγής αιθανόλης.

1.3 Διάρθρωση εργασίας

Η παρούσα εργασία χωρίζεται σε τέσσερα κύρια κεφάλαια.

Το **Κεφάλαιο 1** είναι μία εισαγωγή στο θέμα της καλλιέργειας αλγών και της χρήσης τους ως πηγή βιομάζας. Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται μια γενική επισκόπηση της παρούσας κατάστασης των μακροαλγών σε παγκόσμιο επίπεδο. Επιπλέον περιγράφονται οι στόχοι και η πειραματική προσέγγιση της εργασίας.

Το **Κεφάλαιο 2** επικεντρώνεται στην διαδικασία της καλλιέργειας των χλωρόφυτων *Ulva lactuca* και *Ulvaria fusca*. Σε αυτό το κεφάλαιο μελετήθηκαν οι παράμετροι που επηρεάζουν την ανάπτυξη των αλγών, όπως τα διαλύματα και η πηγή θρεπτικών των υδατοκαλλιεργειών, η ένταση της ακτινοβολίας κ.α. ώστε να μεγιστοποιηθεί η ανάπτυξη τους. Επιπλέον μελετήθηκαν η πιθανότητα χρήσης ΧΚΧ για τον εμπλουτισμό της υδατοκαλλιέργειας με θρεπτικά, η ανάγκη προεπεξεργασίας και η βέλτιστη δοσολογία.

Το **Κεφάλαιο 3** περιγράφει τα πιο κοινά βιοκαύσιμα που χρησιμοποιούνται σήμερα, και επικεντρώνεται στις διαθέσιμες τεχνολογίες για την παραγωγή βιοκαυσίμων από άλγη. Λέξεις κλειδιά όπως βιοαέριο, βιοαιθανόλη, αναερόβια χώνευση, αλκοολική ζύμωση συζητώνται εκτενώς. Επίσης παρουσιάζεται η πειραματική δουλειά και τα

αποτελέσματα για την παραγωγή βιοαερίου και βιοαιθανόλης από τα πράσινα μακροάλη *U.lactuca* και *U.fusca* καθώς και η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε. Η ανασταλτική επίδραση του επιφανειακού αλατιού, παρόντος στα φύλλα των αλγών, κατά την αναερόβια χώνευση μελετάται. Επιπλέον διερευνήθηκε η αναγκαιότητα και η επίδραση αλκαλικής προεπεξεργασίας πριν από τη ενζυματική υδρόλυση και την αλκοολική ζύμωση των αλγών.

Το **Κεφάλαιο 4** κάνει μια σύντομη ανασκόπηση στα πιθανά προϊόντα που μπορούν να εξαχθούν από τα μακροάλη, και πιο συγκεκριμένα από το είδος *Ulva sp.* Το κεφάλαιο αυτό περιγράφει ένα ολοκληρωμένη λύση σύμφωνα με την οποία τα άλη που παράγονται από την υδατοκαλλιέργεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εξαγωγή προϊόντων υψηλής αξίας και εν συνεχεία ως οργανικό υλικό για αναερόβια χώνευση. Ακολούθως η εκρέουσα ιλύς μπορεί να επεξεργαστεί και μαζί με το βιοαέριο να εισαχθεί ως πηγή θρεπτικών και διοξειδίου του άνθρακα για περαιτέρω καλλιέργεια αλγών , καταλήγοντας σε ένα βιώσιμο σύστημα. Επιπλέον, σε αυτό το κεφάλαιο τα συμπεράσματα όλης της εργασίας παρουσιάζονται και συζητώνται προτάσεις για μελλοντική μελέτη.

2 Κεφάλαιο: Καλλιέργεια Αλγών

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

2.1 Γενικό πλαίσιο

Πρόσφατα η παραγωγή εναλλακτικών καυσίμων από μη-αμυλούχα βιομάζα έχει κατευθύνει την προσοχή στη χρήση θαλάσσιων αλγών, συμπεριλαμβανομένων των μακροαλγών, ως πηγές βιομάζας για την παραγωγή βιοκαυσίμων (Knauf and Moniruzzaman 2004). Η ταχεία ανάπτυξη της *U. lactuca* έχει αποδοθεί στους υψηλούς φωτοσυνθετικούς ρυθμούς και στην μεγάλη ικανότητα πρόσληψης άνθρακα και αζώτου (Magnusson et al. 1996; Naldi and Wheeler 2002; Sand-Jensen 1988). Τα μακροάλγη έχουν επίσης προταθεί ως πηγή βιομάζας για την παραγωγή λειτουργικών συστατικών για τρόφιμα, φαρμακευτικά σκευάσματα και καλλυντικά (Bodin- Dubigeon et al. 1997; Cumashi et al. 2007; Bixler 1996; De Roeck-Holtzhauer 1991). Το είδος *Ulva* *sp.* είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε σπάνια πολυσακχαρίδια του κυτταρικού τοιχώματος, όπως το Ulvan, και θεωρείται ως μια σημαντική πηγή διατροφικών φυτικών ινών, κυρίως διαλυτών (Lahaye 1991; Lahaye and Axelos 1993). Η *Ulva lactuca* είναι επίσης καλή πηγή βιταμινών A, B2, B12 και C, και πλούσια σε γ-τοκοφερόλη η οποία περιέχει βιταμίνη E. Επίσης το εκχύλισμα από την *U. Lactuca* έχει δείξει αντιοξειδωτικές, αντι-μικροβιακές και αντί-ιικές ιδιότητες σε διάφορες in vitro χημικές αναλύσεις (Ivanova et al. 1994; Abd El-Baky et al. 2008; Ortiz et al. 2006).

Έχει αποδειχτεί παλαιότερα, ότι η *U. Lactuca* είναι κατάλληλη για καλλιέργεια κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες (Vermaat and Sand-Jensen 1987; Lee 2000; Sato et al. 2006). Για το λόγο αυτό, η καλλιέργεια της *U. Lactuca* σε δεξαμενές λαμβάνει αυξημένη προσοχή είτε για την παραγωγή ακατέργαστης βιομάζας είτε για την παραγωγή βιολογικά ενεργών συστατικών (Hiraoka and Oka 2008). Ωστόσο, αναγκαία προϋπόθεση για την επιτυχημένη εκμετάλλευση της καλλιεργημένης *U. Lactuca* σε εμπορικές εφαρμογές είναι η βελτιστοποίηση των ρυθμών ανάπτυξης και της καθαρής

εσοδείας. Συνεπώς αυτό απαιτεί τόσο βαθιά κατανόηση της επιρροής διαφόρων θρεπτικών αλλά και μια ακριβή μεθοδολογία για τη μέτρηση της ανάπτυξης των αλγών.

Η *Ulva lactuca* συναντάται συχνά σε πέτρες και προσκολλημένη σε άλλα άλγη σε παραλιακές περιοχές του Ηνωμένου Βασιλείου, στις ακτές της Γαλλίας, στις Κάτω Χώρες και στο βορρά μέχρι τη Δανία. Ευδοκίμει ιδιαιτέρως σε περιοχές όπου τα θρεπτικά είναι άφθονα. Μια τέτοια περίπτωση είναι αυτή στις ακτές της Βρετάνης, όπου τα υψηλά επίπεδα νιτρικών από την έντονη γεωργική δραστηριότητα στην περιοχή εξέρευσαν στη θάλασσα. Το αποτέλεσμα ήταν ότι μεγάλες ποσότητες *U. lactuca* κατέκλυσαν τις ακτές, όπου η αποσύνθεση τους είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεθανίου, υδρόθειου και άλλων αερίων. Οι περιβαλλοντολόγοι απέδωσαν την ευθύνη στην υπερβολική χρήση λιπασμάτων και στις υψηλές εκκρίσεις νιτρικών από την κοπριά χοίρων και πουλερικών.

Η αμμωνία και τα νιτρικά είναι οι βασικές πηγές θρεπτικών για τα μακροάλγη στο φυσικό τους ενδιαίτημα και χρησιμοποιούνται ως βασική τροφή σε ολοκληρωμένα συστήματα υδατοκαλλιέργειας (Coperlino et al. 2008). Αρκετά πειράματα έχουν πραγματοποιηθεί σε διάφορα είδη μακροαλγών για να διερευνηθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ της απορρόφησης νιτρικών και αμμωνίας. Η χρήση της αμμωνίας και των νιτρικών διαφέρει ανάμεσα στα διάφορα είδη μακροαλγών, και η αφομοίωση αυτών των συστατικών επηρεάζει την ανάπτυξη τους. Έχει παρατηρηθεί ότι η παρουσία αμμωνίας αναχαιτίζει την απορρόφηση νιτρικών, και έτσι η απορρόφηση αμμωνίας υπερίσχυσε έναντι των νιτρικών όταν δείγματα από *U. lactuca* εκτέθηκαν σε συνδυασμό και των δύο ενώσεων του αζώτου (Thomas and Harrison 1987). Ωστόσο, αυτές οι αλληλεπιδράσεις έχουν συζητηθεί μόνο σε σχέση με το ρυθμό απορρόφησης αζώτου και η κατανόηση της επιρροής αυτών των αλληλεπιδράσεων στο ρυθμό ανάπτυξης των *U. lactuca* και *U. fusca*, είναι ακόμα περιορισμένη. Η πιο συνήθης μέθοδος για τον προσδιορισμό του ρυθμού ανάπτυξης και της παραγωγής βιομάζας σε συστήματα μακροαλγών περιλαμβάνει τη μέτρηση του αρχικού και του τελικού

μεγέθους και βάρους των δειγμάτων. Αυτό απαιτεί απομάκρυνση της επιφανειακής υγρασίας είτε με μαλακό πανί είτε με φυγοκέντρωση.

2.1.1 Διαδικασία της Καλλιέργειας

Ένα ευρύ φάσμα από τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για την καλλιέργεια μακροαλγών, ανάλογα με το είδος, τον κύκλο ζωής, και άλλους γεωγραφικούς και βιολογικούς παράγοντες. Γενικά, κομμάτια από ενήλικα φυτά, νεαροί βλαστοί ή σπόρια φυτεύονται είτε σε σχοινιά είτε σε άλλα υποστρώματα και τα άλγη μεγαλώνουν στη θάλασσα. Εξαιτίας του περίπλοκου κύκλου ζωής πολλών μακροαλγών, η λεπτομερειακή γνώση τόσο της βιολογίας όσο και της ιστορίας του κάθε άλγους είναι κρίσιμη, ειδικότερα στα πρώτα στάδια ανάπτυξης.

Η καλλιέργεια μακροαλγών σε εσωτερικό χώρο, σε εργαστηριακή κλίμακα, είναι αρκετά διαφορετική από αυτή στη θάλασσα και αρκετοί παράγοντες πρέπει να ληφθούν υπόψη. Προκειμένου να προσομοιωθούν οι κατάλληλες συνθήκες, οι ακόλουθες μεταβλητές πρέπει να ελεγχθούν και να βελτιστοποιηθούν:

- Αλατότητα
- Ένταση Φωτός
- Συγκέντρωση Θρεπτικών
- Κυκλοφορία Νερού
- Αερισμός / CO₂
- Θερμοκρασία
- pH

Κάποιες από τις παραπάνω παραμέτρους κρατήθηκαν σταθερές (θερμοκρασία, ένταση φωτός, pH κ.α.) και κάποιες άλλες χρησιμοποιήθηκαν ως μεταβλητές, όπως οι πηγές θρεπτικών ώστε να επιτευχθούν τα οι βέλτιστοι ρυθμοί ανάπτυξης για τα εξεταζόμενα άλγη. Σε ένα ευτροφικό περιβάλλον, αυτά τα μακροάλγη είναι εκτεθειμένα σε

διαφορετικά θρεπτικά, συμπεριλαμβανομένων διαφορετικών και κυμαινόμενων πηγών αζώτου. Η κατανόηση μας ως προς την επιρροή των διαφόρων συνθηκών στην απορρόφηση αζώτου και στην ανάπτυξη των *U.lactuca* και *U. fusca* είναι περιορισμένη. Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκε ο ρυθμός ανάπτυξης αυτών των αλγών τα οποία εκτέθηκαν σε διαφορετικές πηγές αζώτου, όπως η αμμωνία, τα νιτρικά και η ΧΚΧ (περιέχει κυρίως αμμωνία). Τα αποτελέσματα έδειξαν διαφορικές αυξήσεις της επιφάνειας των αλγών σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με τη μορφή αζώτου που χρησιμοποιήθηκε.

2.1.2 Έλεγχος Επιμόλυνσεων

Εξάλειψη διατόμων και βακτηρίων από υδατοκαλλιέργειες

Η εγκατάσταση υδατοκαλλιεργειών ξεκινά κατά προτίμηση με την απομόνωση αναπαραγωγικών κυττάρων, αλλά ορισμένες φορές άλλοι οργανισμοί μολύνουν τα δοχεία ή τις δεξαμενές. Τα πρωτόζωα, οι μύκητες και τα διάτομα είναι οι πιο κοινά μολυντές, και μερικές φορές μπορούν να μεγαλώσουν πιο γρήγορα από τα επιθυμητά άλγη. Είναι πολύ δύσκολο να εξαλείψει κανείς αυτούς του οργανισμούς. Συγκεκριμένα, η επιμόλυνση από πρωτόζωα ή μύκητες εμποδίζει την ανάπτυξη των αλγών, παρά το γεγονός ότι κάποια αντιβιοτικά μπορούν να αναχαιτίσουν τον πολλαπλασιασμό τους για μικρό χρονικό διάστημα. Η επιμόλυνση από διάτομα μπορεί να αντιμετωπισθεί με την προσθήκη GeO_2 , το οποίο αναχαιτίζει τη δράση του πυριτικού κυτταρικού τοιχώματος των διατόμων (Lewin 1966, McLachlan et al. 1971, Chapman 1973). Ο Tatewaki και ο Mizuno (1979) έδειξαν ότι $2.5\text{-}5 \text{ mg L}^{-1} \text{ GeO}_2$ στο διάλυμα αναχαιτίζει την ανάπτυξη καφέ αλγών, αλλά δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των πράσινων και των κόκκινων αλγών. Πρότειναν η μέγιστη συγκέντρωση GeO_2 να μην ξεπερνάει το 1 mg L^{-1} στην περίπτωση των καφέ αλγών, επειδή τα διάτομα μπορούν να αζαλειφθούν σε συγκεντρώσεις $1\text{-}5 \text{ mg L}^{-1} \text{ GeO}_2$ (Markham and Hagmeier 1982).

Για την εξάλειψη ή την αναχαίτιση των βακτηρίων, αντιβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί μεμονωμένα ή σε συνδυασμό (Πίνακας 2) (Spencer 1952, Provasoli 1958, Tatewaki and Provasoli 1964). Παρόλο που η πενικιλίνη, η στρεπτομυκίνη και η χλωραμφενικόλη είχαν αρχικά χρησιμοποιηθεί από τους πρωτοπόρους, πρόσφατα η γενταμικίνη χρησιμοποιείται στη θέση της χλωραμφενικόλης. Το αντιβιοτικό μείγμα αποστειρώνεται και φιλτράρεται (0.22μm), 1 mL τοποθετείται σε σωληνάκια τα οποία αποθηκεύονται στους -20°C. Ωστόσο πρέπει να δοθεί προσοχή στη χρήση των αντιβιοτικών διότι μπορεί να επηρεάσουν και την ανάπτυξη των αλγών, και γι' αυτό αυτή η προεπεξεργασία πρέπει να ελαχιστοποιηθεί (μόνο λίγες ημέρες).

Πίνακας 2: Αντιβιοτικά μείγματα από τους Provasoli (1958) και Tatewaki et al. (1989). Οι ποσότητες προστίθενται σε 10 mL dH₂O.

<i>Antibiotic</i>	<i>Provasoli</i>	<i>Tatewaki et al.</i>
Potassium penicillin G	120.000 U	100.000 U
Chloramphenicol	500 μg	1 mg
Polymyxin B sulfate	500 μg	
Neomycin	600 μg	
Streptomycin sulfate		250 mg
Polymyxin B sulfate		25.000 U

2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

2.2.1 Στόχοι

Τρία ξεχωριστά πειράματα καλλιέργειας εκτελέστηκαν, το πρώτο διήρκησε 21 ημέρες και χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο πιθανών επιμολύνσεων, το δεύτερο διήρκησε 11 ημέρες και χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ανάπτυξης των αλγών με τη χρήση NaNO_3 , NH_4Cl και ΧΚΧ ως πηγές αζώτου, και το τρίτο διήρκησε 16 ημέρες και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των βέλτιστης συγκέντρωσης ΧΚΧ στο διάλυμα.

Κατά την πρώτη φάση ο στόχος ήταν να διερευνηθεί αν τα βακτήρια και τα διάτομα επηρεάζουν την απορρόφηση θρεπτικών των αλγών. Αντιβιοτικό μείγμα (Tatewaki et al.) και GeO_2 χρησιμοποιήθηκαν μεμονωμένα και σε συνδυασμό για την προεπεξεργασία των αλγών σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Κατά τη δεύτερη φάση των πειραμάτων το αντικείμενο ήταν να βρεθεί εάν η ΧΚΧ είναι κατάλληλη πηγή θρεπτικών για την καλλιέργεια των μακροαλγών. Αρχικά η ΧΚΧ εξετάστηκε ως προς τα επίπεδα αμμωνίας και νιτρικών. Kjeldahl πειράματα εκτελέστηκαν και έδειξαν ότι η ΧΚΧ είναι πλούσια σε αμμωνία (2.735 g L^{-1}) (Παράρτημα Α).

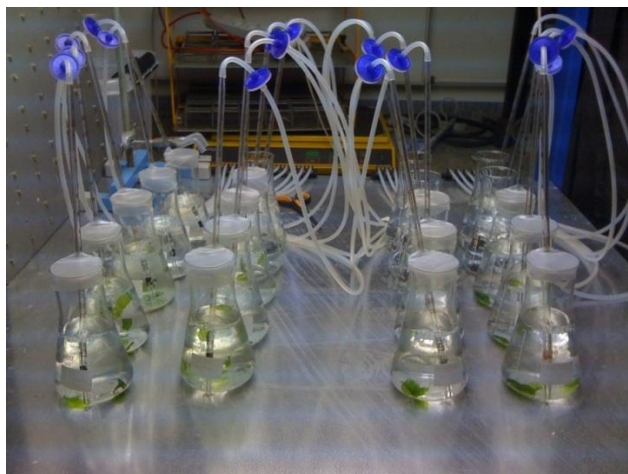
Κατά την τρίτη φάση ο στόχος ήταν να εκτιμηθεί η βέλτιστη αραιώση της ΧΚΧ ώστε να μεγιστοποιηθεί ο ρυθμός ανάπτυξης. Παράλληλα εκτελέστηκαν πειράματα με αμμωνία ως πηγή αζώτου για λόγους σύγκρισης. Τρεις αραιώσεις χρησιμοποιήθηκαν, 1:150, 1:200 and 1:250 και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις αμμωνίας χρησιμοποιήθηκαν στις φιάλες ελέγχου.

2.2.2 Πειραματικός Σχεδιασμός

Τα πειράματα της καλλιέργειας χωρίστηκαν σε 3 φάσεις.

Κατά τη διάρκεια της πρώτης φάσης το ζητούμενο ήταν να διερευνηθεί εάν τα βακτήρια και τα διάτομα επηρεάζουν την απορρόφηση θρεπτικών και την ανάπτυξη των μακροαλγών. Αντιβιοτικό μείγμα κατά Tatewaki et al. χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με GeO_2 σε διάφορες συγκεντρώσεις για την προεπεξεργασία των αλγών. Τέσσερις διαφορετικές περιπτώσεις προεπεξεργασίας διερευνήθηκαν όπως φαίνεται στον Πίνακα 3. Σε αυτή τη φάση των πειραμάτων καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε μόνο *Ulva lactuca*. Αφού τα δείγματα πέρασαν από προεπεξεργασία, κόπηκαν σε μικρούς δίσκους (1.8cm διάμετρος) και τοποθετήθηκαν στις φιάλες καλλιέργειας. Πέντε δίσκοι τοποθετήθηκαν σε κάθε μια από τις 12 φιάλες. Η ένταση του φωτός ήταν σταθερή στα 48 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ με συνεχή ακτινοβολία 24 ώρες ημερησίως. Σε αυτή τη φάση καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν 300mL διαλύματος θαλασσινού νερού εμπλουτισμένου με NaNO_3 ως πηγή αζώτου(F/2). Η δόση του F/2 ήταν 0.1 g/L η οποία αντιστοιχεί σε 12.35 mg/L N- NO_3 . Η καλλιέργεια διήρκησε 21 ημέρες.

Πίνακας 3	Καλλιέργεια - Επιμόλυνση			
Δείγμα	No GeO_2 - No Antib	GeO_2 – No Antib	GeO_2 -1/2 dose Antib	GeO_2 -Full dose Antib
<i>Ulva lactuca</i> (15°C)	3 x αντίγραφα	3 x αντίγραφα	3 x αντίγραφα	3 x αντίγραφα



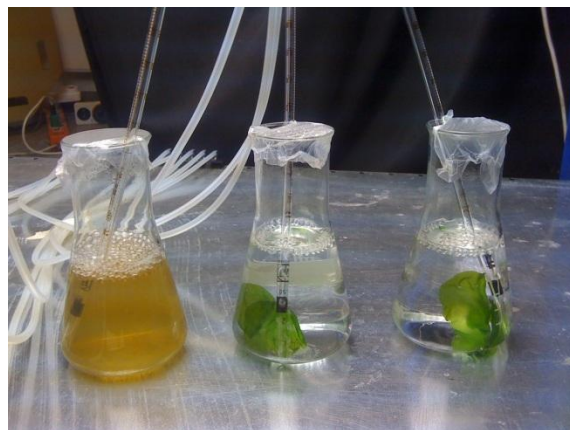
Εικόνα 3 Πειραματική διάταξη φιαλών καλλιέργειας

Κατά τη δεύτερη φάση των πειραμάτων ο στόχος ήταν να βρεθεί αν η ΧΚΧ είναι κατάλληλη ως πηγή θρεπτικών για την καλλιέργεια των μακροαλγών. Πειράματα Kjeldahl εκτελέστηκαν και έδειξαν ότι η ΧΚΧ είναι πλούσια σε αμμωνία (2.735 g L^{-1}) (Παράρτημα Α). Για λόγους σύγκρισης χρησιμοποιήθηκαν παράλληλα 6 φιάλες με διάλυμα εμπλουτισμένο με αμμωνία και 6 φιάλες με διάλυμα εμπλουτισμένο με νιτρικά. Για κάθε διάλυμα και κάθε είδος άλγους (*U. lactuca* και *U. fusca*) χρησιμοποιήθηκαν 3 πανομοιότυπα αντίγραφα και σε κάθε φιάλη τοποθετήθηκαν 3 δίσκοι (Πίνακας 4). Οι συνθήκες φωτισμού παρέμειναν ίδιες όπως στην πρώτη φάση αλλά σε αυτή τη φάση χρησιμοποιήθηκε φυσικό και όχι τεχνητό θαλασσινό νερό. Η δόση αζώτου σε όλες τις φιάλες ήταν $12.35 \text{ mg/L N-NO}_3$ ή $12.35 \text{ mg/L N-NH}_4$. Στην περίπτωση της ΧΚΧ για να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση αζώτου ($12.35 \text{ mg/L N-NH}_4$) έπρεπε να γίνει αραιώση 200 φορές. Η περίοδος καλλιέργειας ήταν 11 ημέρες.

Πίνακας 4	Πηγή θρεπτικών			
	Δείγμα	F/2 (NO_3)	ΧΚΧ	NH_4
<i>Ulva lactuca</i> (15°C)	3 x αντίγραφα	3 x αντίγραφα	3 x αντίγραφα	3 x αντίγραφα
<i>Ulvaria fusca</i> (15°C)	3 x αντίγραφα	3 x αντίγραφα	3 x αντίγραφα	3 x αντίγραφα

Στην τρίτη φάση της καλλιέργειας το αντικείμενο ήταν να εκτιμηθεί η καλύτερη αραιώση και η ανάγκη για πιθανή προεπεξεργασία της ΧΚΧ ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστος ρυθμός ανάπτυξης. Παράλληλα για λόγους σύγκρισης χρησιμοποιήθηκαν φιάλες με διάλυμα εμπλουτισμένο με αμμωνία. Τρεις αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν, 1:150, 1:200 and 1:250 και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις NH_4 χρησιμοποιήθηκαν στις φιάλες ελέγχου. Σε σύνολο χρησιμοποιήθηκαν 9 φιάλες με φυσικό θαλασσινό νερό (ΦΘΝ) και αμμωνία και άλλες 9 φιάλες με ΦΘΝ και ΧΚΧ ως πηγή αζώτου (Πίνακας 6). Ο λόγος που τοποθετήθηκε NH_4Cl στις φιάλες ελέγχου είναι ότι μετά από εκτεταμένο έλεγχο φάνηκε ότι η ΧΚΧ περιέχει κυρίως NH_4 και πολύ χαμηλά επίπεδα NO_3 . Πιο συγκεκριμένα ελήφθησαν δείγματα από αναερόβια χωνεμένη κοπριά από χοίρους, στη συνέχεια αραιώθηκαν 20 φορές και στο τέλος διηθήθηκαν. Ακολούθως κιτ δοκιμών Merck χρησιμοποιήθηκαν για να υπολογιστούν τα επίπεδα νιτρικών και αμμωνίας στα διάφορα διαλύματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρχαν περίπου 80 mg/l NO_3 και 820 mg/l NH_4 που είναι σχεδόν 10 φορές υψηλότερη (Παράρτημα Α). Σε αυτή τη φάση χρησιμοποιήθηκε μόνο *Ulna lactuca* και τρεις δίσκοι τοποθετήθηκαν σε κάθε φιάλη. Οι συνθήκες φωτισμού παρέμειναν σταθερές όπως και στη φάση 1 και 2 και η διάρκεια της καλλιέργειας ήταν 16 ημέρες.

Προεπεξεργασία της ΧΚΧ πραγματοποιήθηκε για να ελαχιστοποιηθεί το χρώμα του διαλύματος καλλιέργειας και να μεγιστοποιηθεί η διείσδυση του φωτός και ακολούθως η φωτοσυνθετική ικανότητα των αλγών. Διήθηση και φυγοκέντρηση μεμονωμένα αλλά και σε συνδυασμό δοκιμάστηκαν και τα αποτελέσματα δεν ήταν ιδιαίτερα αισιόδοξα. Το χρώμα δεν μειώθηκε και η συγκέντρωση της αμμωνίας στην ΧΚΧ μειώθηκε στο 50% της αρχικής τιμής του (2.735g/l NH_4). Επιπλέον εκτελέστηκε επεξεργασία με υπεροξείδιο του υδρογόνου συνδυασμένο με αυτόκαυστο στα δείγματα που είχαν ήδη διηθηθεί και φυγοκεντρηθεί, και στην περίπτωση αυτή το χρώμα αφαιρέθηκε αλλά ταυτόχρονα η συγκέντρωση της αμμωνίας έπεσε κάτω από τα επίπεδα ανίχνευσης (Παράρτημα Α). Συνεπώς αποφασίστηκε ότι στα πειράματα καλλιέργειας, προεπεξεργασία της ΧΚΧ δεν ήταν θεμιτή.



Εικόνα 4 Φιάλες Καλλιέργειας με διάφορα διαλύματα
(από αριστερά προς τα δεξιά: XKX, NH₄, NO₃)

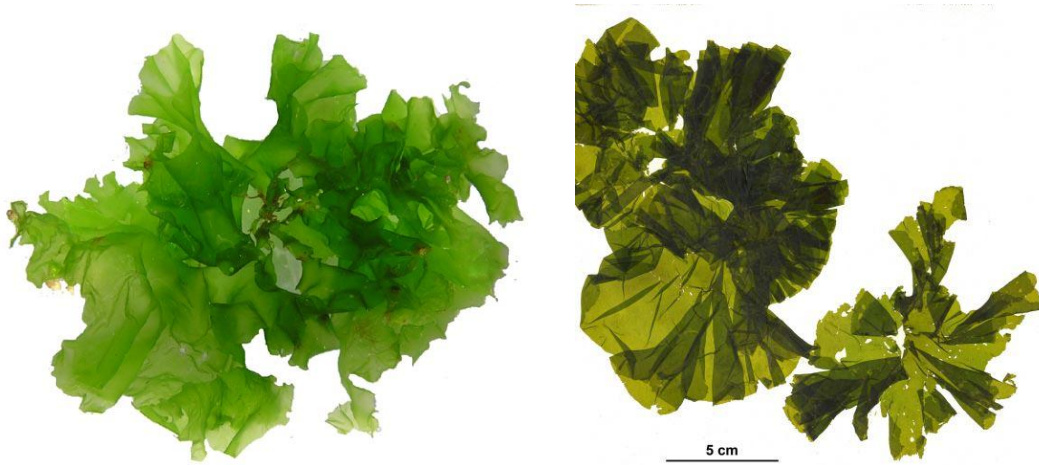
Πίνακας 5	Καλλιέργεια <i>Ulva lactuca</i> με XKX και NH ₄					
Δείγμα	XKX			NH ₄ (mg/l N-NH ₄)		
	1:150	1:200	1:250	14.18	10.64	8.51
<i>Ulva lactuca</i> (15°C)	3 x αντίγραφα	3 x αντίγραφα	3 x αντίγραφα	3 x αντίγραφα	3 x αντίγραφα	3 x αντίγραφα

2.2.3 Μέθοδοι και Υλικά

Σχετικά με το είδος Ulva sp.

Ελεγχόμενη καλλιέργεια θαλάσσιων πράσινων μακροαλγών όπως τα είδη *Ulva lactuca* και *Ulvaria fusca*, μελετώνται για την παραγωγή βιοκαυσίμων, προϊόντων υψηλής αξίας και λειτουργικών συστατικών τροφίμων. Η *Ulva lactuca* είναι ένα σημαντικό μακροάλγος για την θαλάσσια οικολογία. Τα φύλλα της είναι λεπτά και επίπεδα και τα περιθώρια των φύλλων κάπως σγουρά. Μπορεί να φτάσει τα 18cm σε μήκος, αν και συνήθως πολύ λιγότερο, και μέχρι 30cm σε πλάτος. Το φύλλο αποτελείται από δύο στρώσεις κυττάρων, είναι μαλακά και διάφανα, και μεγαλώνουν προσκολλημένα με

ένα μαστίγιο πάνω σε πέτρες. Από πράσινο έως σκούρο πράσινο σε χρώμα, αυτό το είδος χλωρόφυτων αποτελείται από δύο στιβάδες ακανόνιστα διατεταγμένων κυττάρων όπως φαίνεται στην Εικόνα 5. Η *Ulvaria* είναι παρόμοια με την *Ulva* αλλά αντί για δύο στιβάδες έχει μια στιβάδα κυττάρων και είναι πιο σκούρα σε χρώμα.



Εικόνα 5 Φρέσκα φύλλα από *Ulva lactuca* και *Ulvaria fusca*

2.2.4 Δειγματοληψία και συνθήκες συντήρησης

Φρέσκα φύλλα από *Ulva lactuca* συλλέχθηκαν από τις ακτές της περιοχής Ninå, βόρεια της Κοπεγχάγης, Δανία και δείγματα από *Ulvaria fusca*, συλλέχθηκαν και αποστάλθηκαν άμεσα από την περιοχή Hummannaq της Γροιλανδίας, όπου ξεβράζονταν στην ακτή μετά την καλοκαιρινή άνθηση. Μετά την άφιξη τους στο εργαστήριο, τα φύλλα των μακροαλγών μεταφέρονταν σε δοχεία 15-20L γεμισμένα με φυσικό θαλασσινό νερό. Η συγκέντρωση θαλασσινού αλατιού ήταν 13ppt και 35ppt για την *U. lactuca* και την *U. fusca* αντίστοιχα, αναπαριστώντας το φυσικό τους περιβάλλον. Το διάλυμα με το φυσικό θαλασσινό νερό είχε pH ίσο με 8.2 και αλατότητα 13ppt όπως μετρήθηκε από αγωγιμόμετρο χειρός (Cond 315i, WTW,

Germany). Τα φύλλα σε μερικές περιπτώσεις έμειναν στα δοχεία συντήρησης για αρκετές εβδομάδες πριν τη μεταφορά τους σε φιάλες 300mL για να ξεκινήσει η καλλιέργεια. Τα δοχεία συντήρησης με την *U. lactuca* και την *U. fusca* τοποθετήθηκαν σε δωμάτια κλιματισμού με σταθερή θερμοκρασία 20°C και 15°C αντίστοιχα. Επίσης τα δοχεία αερίζονταν συνεχώς και το νερό και τα θρεπτικά ανανεώνονταν κάθε δύο εβδομάδες.

Στην συνέχεια δίσκοι διαμέτρου 1.8cm καλλιεργήθηκαν για 12-14 ημέρες σε φιάλες με τεχνητό ή φυσικό θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με άζωτο σε δύο διαφορετικές μορφές, NH_4Cl , NaNO_3 και ΧΚΧ (περιέχει NH_4) για να μελετηθεί η ανάπτυξη των αλγών. Χάρακας και ζυγός ακριβείας χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του μεγέθους και του βάρους των δίσκων. Με τον τρόπο αυτό εξετάστηκε η κινητική ανάπτυξης των δίσκων.

2.2.5 Αναλυτικές διαδικασίες

Εξάλειψη διατόμων

Περιστασιακά αερομεταφερόμενοι ή υδρομεταφερόμενοι μολυντές προσβάλουν μακροπρόθεσμες καλλιέργειες. Για να αποφευχθεί μια ακούσια μόλυνση από διάτομα, 1-2 σταγόνες διαλύματος GeO_2 προστίθεται ανά 100mL διαλύματος καλλιέργειας. Δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια δυσμενής αντίδραση στην ανάπτυξη των περισσότερων αλγών από αυτό, ωστόσο, οι Markham and Hagmeier (1982) και οι Tatewaki and Mizuno (1979) έχουν αναφέρει αναχαίτιση της ανάπτυξης κάποιων αλγών λόγω του GeO_2 . Για την προετοιμασία 100mL διαλύματος διοξειδίου του γερμανίου ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), προσθέτουμε 100 mg GeO_2 σε 50 mL 1N NaOH. Το GeO_2 μπορεί να χρειασθεί 25-20 λεπτά μέχρι να διαλυθεί πλήρως με συχνή ανάδευση. Αν κριθεί απαραίτητο ζεσταίνουμε ελαφρά και το αφήνουμε να κρυώσει. Στην συνέχεια το pH πρέπει να προσαρμοστεί στο 7.8-8.2 με την προσθήκη 1N H_2SO_4 σταγόνα, σταγόνα. Συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό μέχρι ο όγκος να φτάσει τα 100 mL. Αυτό μπορεί

να αποθηκευτεί σε γυάλινα μπουκαλάκια στους 4°C. Αυτή η μέθοδος προετοιμασίας είναι διαφορετική από αυτή που περιγράφουν άλλοι μελετητές (π.χ. Lewin 1966) διότι αντικαθιστά το HCl με H₂SO₄ (Robert A. Andersen et al. 2005).

Φωτισμός

Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας οι δίσκοι των *U. lactuca* και *U. fusca* φωτίζονταν με 10 παράλληλους λαμπτήρες φθορισμού (L36W/640 Cool White, Osram— Germany) οι οποίες είχαν τοποθετηθεί 60cm πάνω από την κορυφή των φιαλών καλλιέργειας. Η ακτινοβολία ήταν συνεχής 24 ώρες την ημέρα και η ένταση σταθερή στα 48 μmol photons m⁻² s⁻¹ όπως μετρήθηκε από φωτόμετρο χειρός (LI-COR Biosciences, USA).

Διαλύματα καλλιέργειας

Στην περίπτωση όπου NaNO₃ χρησιμοποιήθηκε ως πηγή αζώτου, το διάλυμα της καλλιέργειας βασίστηκε στην συνταγή F/2 του Guillard (Παράρτημα Α), αγορασμένο από την Varicon Aqua Solutions. Όταν NH₄Cl χρησιμοποιήθηκε ως πηγή αζώτου, μια τροποποιημένη έκδοση της συνταγής WC των Guillard and Lorenzen 1972 χρησιμοποιήθηκε για το διάλυμα της καλλιέργειας (Παράρτημα Α). Θαλασσινό αλάτι (Instant Ocean) προστέθηκε σε νερό βρύσης για να προετοιμαστεί τεχνητό θαλασσινό νερό. Τα επίπεδα αλατότητας ήταν 13ppt και 35ppt για την *Ulva lactuca* και την *Ulvaria fusca* αντίστοιχα. Η συγκέντρωση του αζώτου είτε με τη μορφή αμμωνίας είτε με τη μορφή νιτρικών ήταν 12.35 mg L⁻¹ μέσα στο διάλυμα της καλλιέργειας.



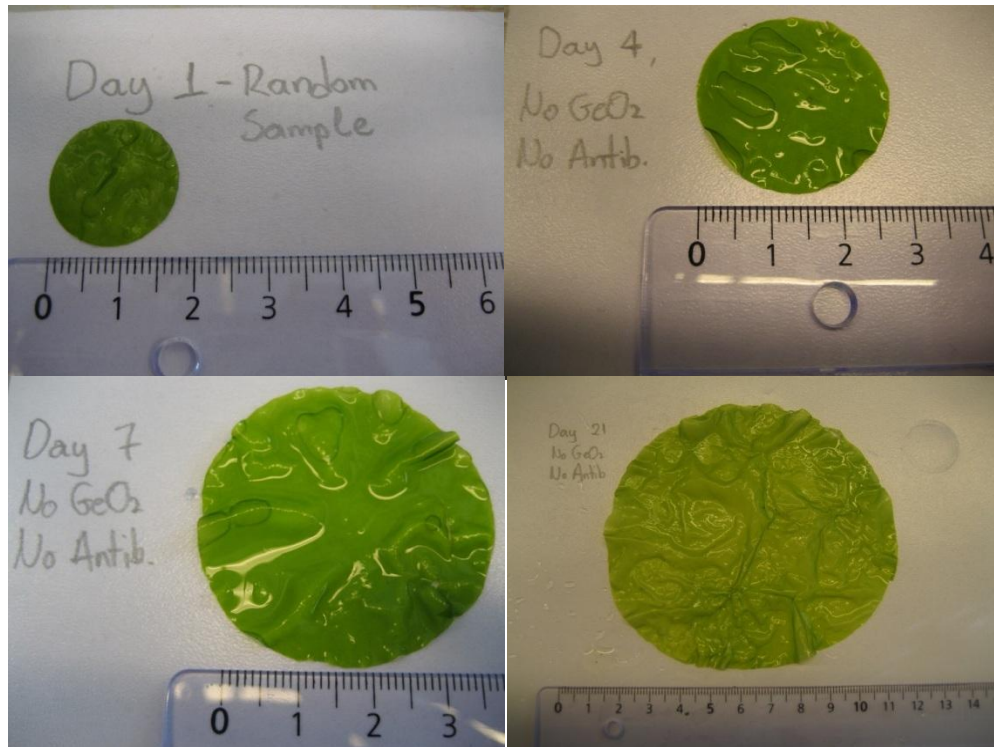
Εικόνα 6 Προετοιμασία των διαλυμάτων καλλιέργειας

pH

Το pH μετριόταν χρησιμοποιώντας ένα ψηφιακό pH-μετρό (PHM210) διαβαθμισμένο ανά 0.1 μονάδα, το οποίο εμπεριέχει αντιστάθμιση λόγω θερμοκρασίας σύμφωνα με τα Standard Methods (ALPHA 1999). Πριν από κάθε χρήση το pH-μετρό βαθμονομούνταν στη θερμοκρασία δείγματος με έτοιμους ρυθμιστές (pH=4.7). Ο αισθητήρας φυλασσόταν σε διάλυμα 3M KCl πριν και μετά τη χρήση του.

Προσδιορισμός μεγέθους

Φρέσκα και υγιή φύλλα συλλέγονταν από τις δεξαμενές αποθήκευσης, εν συνεχεία ένας σωλήνας με αιχμηρά άκρα χρησιμοποιούνταν για να κοπούν τυχαίοι δίσκοι διαμέτρου 1.8cm από διάφορα φύλλα. Όλοι οι δίσκοι μετρούνταν με χάρακα και ζυγό ακριβείας πριν τοποθετηθούν στις φιάλες καλλιέργειας (Εικόνα 7). Πέντε δίσκοι τοποθετούνταν σε κάθε φιάλη. Η διάμετρος των δίσκων μετρούνταν σε εκατοστά χρησιμοποιώντας συμβατικό χάρακα διαβαθμισμένο σε 0.1cm. Εφόσον τα οι δίσκοι ήταν κυκλικοί η επιφανειακή τους ανάπτυξη μπορεί να μετρηθεί με απλή γεωμετρία.
 $A = D^2/4$ όπου A=Επιφάνεια and D=Διάμετρος



Εικόνα 7 Δίσκοι από *Ulva lactuca* που καλλιεργήθηκαν σε φιάλες με διάλυμα F/2 (NO₃)

Προσδιορισμός Βιομάζας

Η βιομάζα των δίσκων μετρούνταν σε γραμμάρια χρησιμοποιώντας έναν αναλυτικό ζυγό Sartorius (Model CP224S, BIE & BERNTSEN AS) με αναγνωσιμότητα 0.1mg. Οι δίσκοι μετρούνταν πρώτα με χάρακα και στη συνέχεια τοποθετούνταν πάνω σε απορροφητικό χαρτί και η επιφανειακή υγρασία αφαιρούνταν πιέζοντας απαλά και από τις δύο μεριές. Αμέσως μετά τα φύλλα τοποθετούνταν πάνω στη ζυγαριά για προσδιορισμό του βάρους. Το βάρος τους μετριόταν κάθε 2-3 ημέρες κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας.

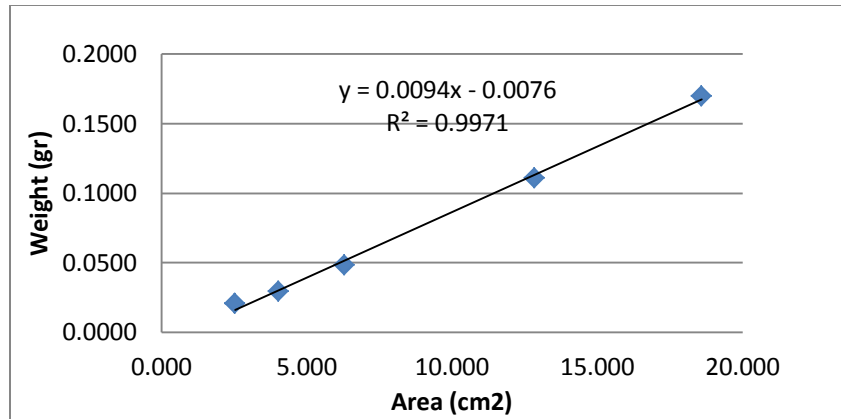
Συσχέτιση Επιφάνειας-Βάρους

Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της επιφάνειας και του βάρους των δίσκων όπως φαίνεται και στην Εικόνα 8. Η απομάκρυνση της υγρασίας από την επιφάνεια των

δίσκων μπορεί να διαταράξει την ανάπτυξη των δίσκων και σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να αποβεί ακόμα και μοιραία αν παραμείνουν έξω από το νερό για παρατεταμένο χρονικό διάστημα. Έτσι ένας εναλλακτικός τρόπος για τον προσδιορισμό του βάρους είναι η μέτρηση του μεγέθους των δίσκων και η αναγωγή του σε δεδομένα βάρους. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος δεν χρησιμοποιήθηκε κυρίως διότι μετά από μερικές ημέρες καλλιέργειας το σχήμα των δίσκων δεν παρέμενε απολύτως κυκλικό και η ακριβής μέτρηση της επιφάνειας δεν ήταν εφικτή, χωρίς φωτογραφικές μεθόδους ή μεθόδους σάρωσης. Σύμφωνα με τους Marcel Tutor Ale et al. (2010) οι μέθοδοι σάρωσης είναι αποτελεσματικές και ακριβείς όσον αφορά στη μετατροπή δεδομένων επιφάνειας σε βάρος σε δίσκους από *Ulna lactuca*. Αλλά χωρίς τον κατάλληλο εξοπλισμό και το αντίστοιχο λογισμικό μπορεί να αποδειχθούν πολύ χρονοβόρες και γι' αυτό το λόγο δεν χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία.

Πίνακας 6 Συσχέτιση επιφάνειας-βάρους

Ημέρες	Μέση διάμετρος (cm)	Μέση επιφάνεια (cm²)	Μέσο βάρος (g)
1	1.80	2.545	0.0209
4	2.27	4.035	0.0293
7	2.83	6.305	0.0481
12	4.04	12.847	0.1108
16	4.87	18.602	0.1699



Εικόνα 8 Συσχέτιση μεταξύ επιφάνειας και βάρους σε δίσκους *Ulva lactuca*

Ολικό Kjeldahl Άζωτο, Αμμωνία και Νιτρικά

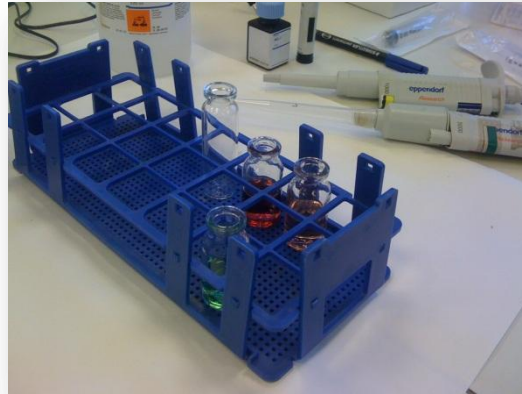
Στην αρχή αλλά και κατά τη διάρκεια κάθε φάσης καλλιέργειας, εκτελέστηκαν πειράματα για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων αμμωνίας ή/και νιτρικών στα διαλύματα καλλιέργειας. Για τον προσδιορισμό της αμμωνίας και των νιτρικών, χρησιμοποιήθηκαν εργαστηριακά κιτ δοκιμών (Merck, Germany) καθώς επίσης και ταινίες δοκιμών Quantofix[®] (Macherey-Nage, Germany) (Εικόνα 10).

Στη δεύτερη και στην τρίτη φάση των πειραμάτων καλλιέργειας, ΧΚΧ χρησιμοποιήθηκε ως πηγή θρεπτικών. Τα πειράματα έδειξαν ότι η ΧΚΧ είναι πλούσια σε NH_4 αλλά περιέχει πολύ μικρές ποσότητες NO_3 (Παράρτημα Α). Για τον προσδιορισμό της αμμωνίας στη ΧΚΧ πραγματοποιήθηκαν πειράματα Kjeldahl αζώτου (TKN) για υψηλότερη ακρίβεια (Παράρτημα Α).

Το TKN υπολογίστηκε από δείγματα 3g νωπών αλγών χρησιμοποιώντας 2 Kjeltabs και συμπυκνωμένο θειικό οξύ. Στη συνέχεια τα δείγματα χωνεύονταν σε υψηλή θερμοκρασία (150°C για 2 ώρες και 300°C για 1 ώρα). Τα δείγματα αφήνονταν να κρυώσουν και στη συνέχεια περίσσεια υδροξειδίου του νατρίου προστίθετο και η σχηματιζόμενη αμμωνία συγκεντρωνόταν μέσα σε διάλυμα βορικού οξέως μετά από απόσταξη (Εικόνα 9). Στη συνέχεια η ποσότητα της αμμωνίας προσδιοριζόταν με τιτλοδότηση με χρήση υδροχλωρικού οξέως (Standard Methods).



Εικόνα 9 Συσκευή TKN



Εικόνα 10 Κιτ δοκιμών NH₄ – NO₃

2.2.6 Υπολογισμοί

Ρυθμοί ανάπτυξης

Η κλίση του φυσικού λογαρίθμου της μάζας του δίσκου μετά από περίοδο t ημερών (W_t) δια την αρχική μάζα του δίσκου (W_0) προς το χρόνο δίνει τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (r) όπως φαίνεται στην εξίσωση [2.1]:

$$r(d^{-1}) = \frac{d\left[\ln\left(\frac{W_t}{W_0}\right)\right]}{dt} \quad [2.1]$$

Απόδοση παραγωγής βιομάζας

Το ποσοστό της παραγωγής βιομάζας αν ημέρα καλλιέργειας δίνεται από την εξίσωση [2.2]:

$$y \left(\% / d \right) = \left(\frac{W_t - W_0}{W_0} \right) \cdot 100 \quad [2.2]$$

όπου t είναι ο χρόνος σε ημέρες, W_0 είναι η αρχική μάζα σε g, W_t είναι η μάζα μετά από t ημέρες σε g.

Επιφάνεια

Η επιφάνεια A υπολογίστηκε με απλή γεωμετρία από την εξίσωση [2.3]:

$$A = \pi \cdot \frac{d^2}{4} \quad [2.3]$$

όπου d είναι η διάμετρος του δίσκου

Στατιστική ανάλυση

Στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε σε κάποιες ομάδες δεδομένων για τον προσδιορισμό του μέσου όρου, της τυπικής απόκλισης και του επιπέδου εμπιστοσύνης των πληθυσμών. Αυτές οι παράμετροι υπολογίστηκαν με βάση τις εξισώσεις [2.5],[2.6] και [2.7] αντίστοιχα:

$$\bar{X} = \sum_{i=1}^N X_i / N \quad [2.5]$$

$$SD = \sqrt{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2 / (N - 1)} \quad [2.6]$$

$$CI = t \cdot SD / \sqrt{N} \quad [2.7]$$

όπου X_i είναι η μετρούμενη τιμή, N είναι το μέγεθος του πληθυσμού, και t είναι η τιμή t-student για τον συγκεκριμένο πληθυσμό.

2.3 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

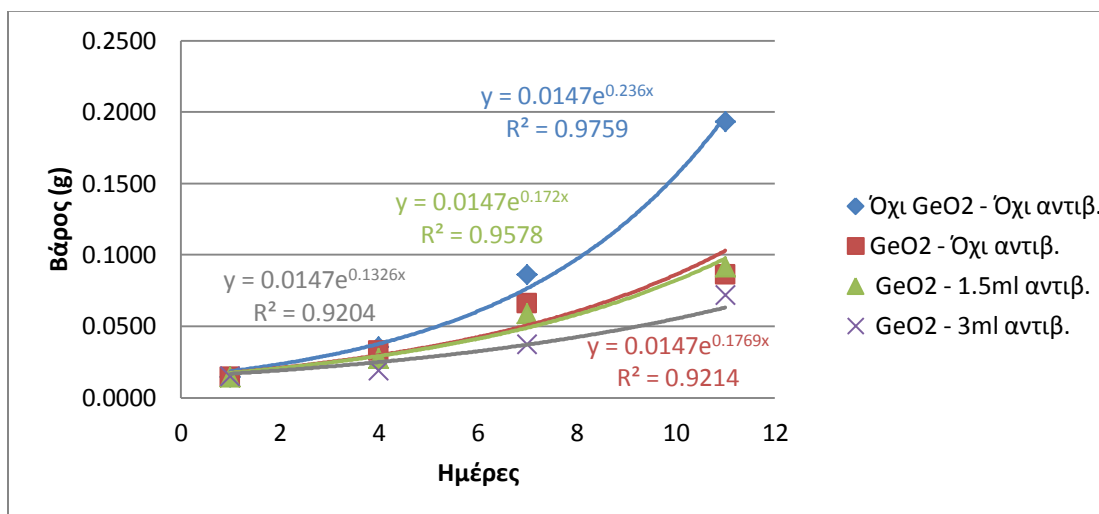
2.3.1 Φάση 1 – Έλεγχος επιμολύνσεων

Τέσσερις διαφορετικές περιπτώσεις προεπεξεργασίας δοκιμάστηκαν πριν την έναρξη της καλλιέργειας:

- 1) Όχι GeO₂ – Όχι αντιβιοτικά
- 2) GeO₂ – Όχι αντιβιοτικά
- 3) GeO₂ – Ολόκληρη δόση αντιβιοτικών
- 4) GeO₂ – Μισή δόση αντιβιοτικών

Μετά την προεπεξεργασία η οποία διήρκησε 24 ώρες κόπηκαν οι δίσκοι από τα φύλλα των αλγών και τοποθετήθηκαν μέσα στις φιάλες. Στη συνέχεια ξεκίνησε η περίοδος καλλιέργειας.

Στην συνέχεια παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης της μάζας των δίσκων της *Ulva lactuca* που καλλιεργήθηκαν με ή χωρίς προεπεξεργασία συναρτήσει του χρόνου. Όπως φαίνεται από την Εικόνα 11 οι καμπύλες προσεγγίζουν μια εκθετική αύξηση της βιομάζας.



Εικόνα 11 Καμπύλες ανάπτυξης της μάζας της *Ulva lactuca*

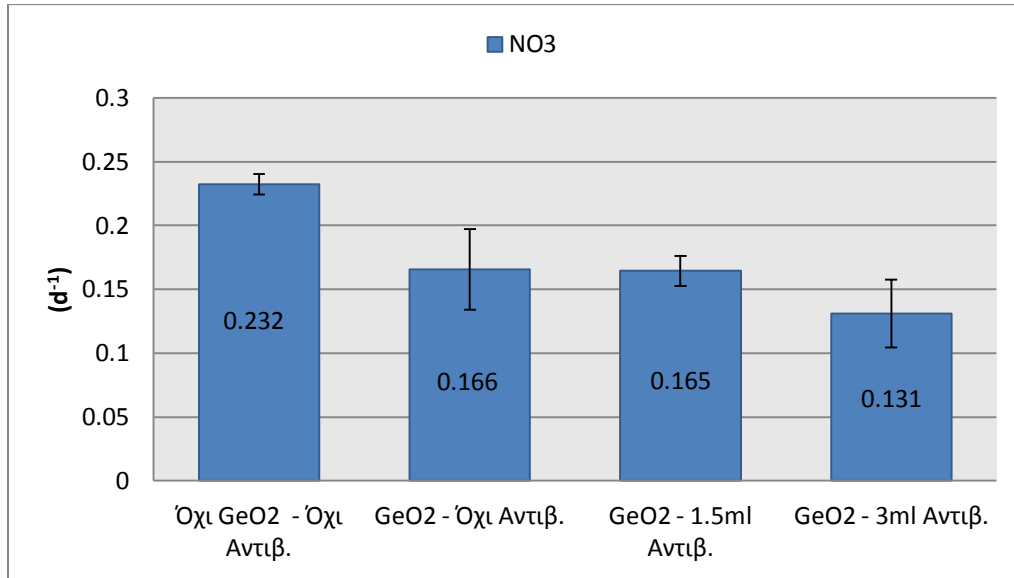
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος και το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι οι βέλτιστες συνθήκες για την καλλιέργεια της *Ulva lactuca* επετεύχθησαν στην περίπτωση όπου δεν υπήρξε προεπεξεργασία ούτε με GeO_2 ούτε με προσθήκη αντιβιοτικών ($P < 0.05$). Την ίδια συμπεριφορά παρουσίασαν όλα τα αντίγραφα της φιάλης και τα μέσοι όροι των αποτελεσμάτων φαίνονται στον Πίνακα 7 και στην Εικόνα 12.

Πίνακας 7 Μέσοι ρυθμοί ανάπτυξης στα πειράματα εξάλειψης επιμολύνσεων

Δείγμα	Μέσος ρυθμός ανάπτυξης (d^{-1})	Τυπική απόκλιση
Όχι GeO_2 Όχι Αντιβ.	0.232	0.0079
GeO_2 Όχι Αντιβ.	0.166	0.0314
GeO_2 1.5ml Αντιβ.	0.165	0.0118
GeO_2 3ml Αντιβ.	0.131	0.0265

Ο υψηλότερος ρυθμός ανάπτυξης ήταν 0.232 d^{-1} και επιτεύχθηκε στην περίπτωση όπου τα άλγη δεν είχαν υποστεί προεπεξεργασία (Πίνακας 7). Σύμφωνα με τους Tatewaki και Mizuno (1979) και τους Markham και Hagmeier (1982), το GeO_2 και τα αντιβιοτικά μπορούν να αναχαιτίσουν την ανάπτυξη των αλγών, έτσι όχι μόνο εξαλείφουν τα βακτήρια και τα διάτομα αλλά καταστρέφουν και τα κύτταρα των αλγών. Η πενικιλίνη μπλοκάρει όχι μόνο τη διαίρεση των βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των κυανοβακτηρίων, αλλά επίσης και τη διαίρεση των χλωροπλαστών, που είναι τα φωτοσυνθετικά οργάνια των πράσινων αλγών (Kasten, Britta; Reski, Ralf, 1997).

Επίσης η πενικιλίνη μπορεί να διασπάσει την πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος, προκαλώντας κυτταρική λύση.



Εικόνα 12 Σύγκριση των μέσων ρυθμών ανάπτυξης της *Ulva lactuca* στα πειράματα εξάλειψης επιμολύνσεων. Οι γραμμές σφάλματος αναπαριστούν τυπική απόκλιση.

Στην περίπτωση όπου έγινε προεπεξεργασία με GeO₂ και υψηλή δόση αντιβιοτικών μπορεί να παρατηρηθεί από την Εικόνα 12 ότι ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν 0.131 d⁻¹, ο οποίος ήταν και ο χαμηλότερος σε όλη την πρώτη φάση των πειραμάτων καλλιέργειας. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι μετά την τέταρτη ημέρα καλλιέργειας οι δίσκοι άρχισαν να αποκτούν καφέ χρώμα και να αποσυντίθενται. Ωστόσο, οι μετρήσεις συνεχίστηκαν μέχρι το τέλος της περιόδου καλλιέργειας (21 ημέρες) παρά το γεγονός ότι οι περισσότεροι δίσκοι είχαν υποστεί σοβαρή βλάβη εξ' αιτίας της βαρείας προεπεξεργασίας. Κάποιοι λίγοι δίσκοι που επιβίωσαν μεγάλωσαν πολύ γρήγορα όμως, και αυτό εξηγεί και την υψηλή τυπική απόκλιση στην περίπτωση αυτή.

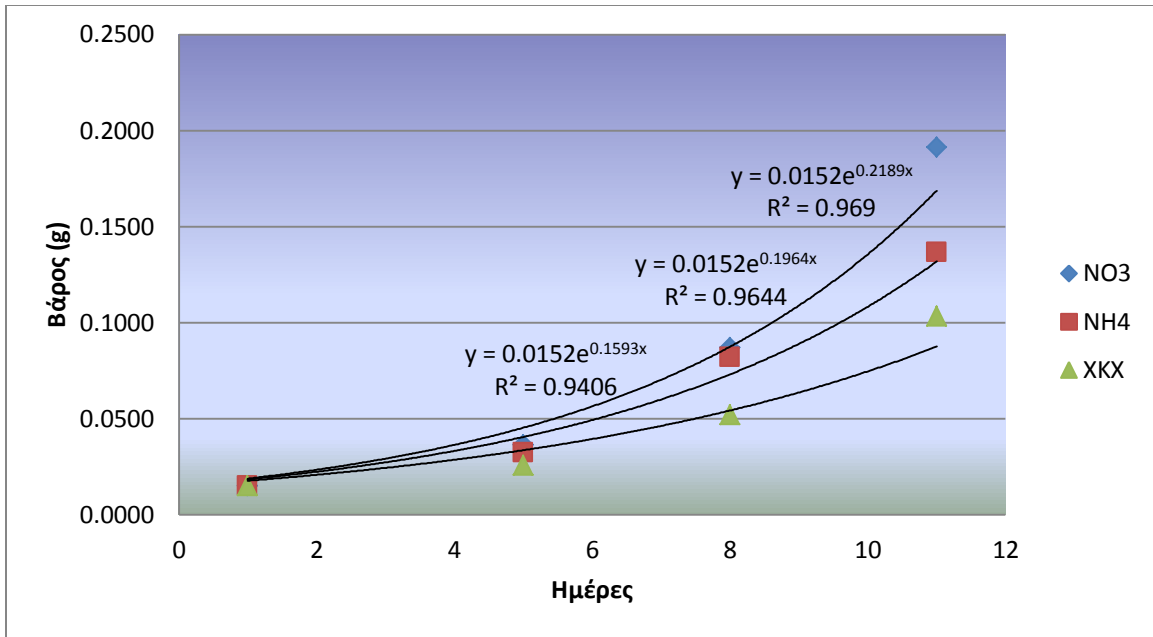
Όταν τα άλγη υπέστησαν προεπεξεργασία με GeO₂ και χαμηλή δόση ή καθόλου αντιβιοτικά οι ρυθμοί ανάπτυξης ήταν 0.165 d⁻¹ και 0.166 d⁻¹ αντίστοιχα (Εικόνα 12).

Παρά το γεγονός ότι οι δίσκοι της *Ulva lactuca* επιβίωσαν μέχρι το τέλος της περιόδου καλλιέργειας οι τιμές δείχνουν ένα σχετικά χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης.

2.3.2 Φάση 2 – Πηγές Θρεπτικών

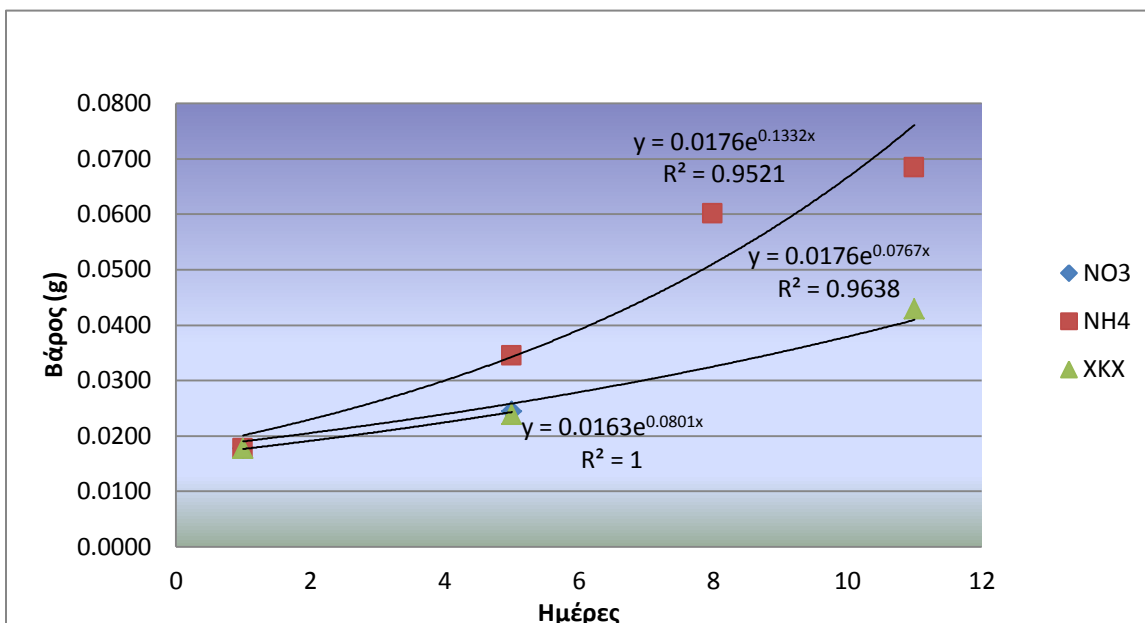
Στη δεύτερη φάση καλλιέργειας αμμωνία, νιτρικά και ΧΚΧ χρησιμοποιήθηκαν για τον εμπλουτισμό των διαλυμάτων καλλιέργειας και προέκυψε μια εκθετική αύξηση της βιομάζας στην περίπτωση της *Ulva lactuca*. Όταν χρησιμοποιήθηκαν νιτρικά η *Ulvaria fusca* δεν ανταποκρίθηκε καθόλου, ενώ στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε αμμωνία ή ΧΚΧ παρατηρήθηκαν μέτριοι ρυθμοί ανάπτυξης (Εικόνα 15).

Η Εικόνα 13 και η Εικόνα 14 παρουσιάζουν τις καμπύλες ανάπτυξης από τις μετρήσεις μάζας συναρτήσει του χρόνου από τις φιάλες που περιείχαν *U.lactuca* και *U.fusca* αντίστοιχα. Κάθε διάγραμμα δείχνει τρεις καμπύλες οι οποίες αντιστοιχούν στις τρεις διαφορετικές πηγές θρεπτικών που προστέθηκαν στα διαλύματα καλλιέργειας.



Εικόνα 13 Σύγκριση διαφορετικών πηγών θρεπτικών στην ανάπτυξη της *Ulva lactuca*

Από τα δεδομένα της Εικόνας 13, φαίνεται ότι ο υψηλότερος ρυθμός ανάπτυξης (0.2189 d^{-1}) επιτεύχθηκε όταν το διάλυμα καλλιέργειας ήταν εμπλουτισμένο με νιτρικά. Ο δεύτερος υψηλότερος ρυθμός ανάπτυξης ήταν 0.1964 d^{-1} όταν αμμωνία χρησιμοποιήθηκε σαν πηγή αζώτου, ακολουθούμενος από την τιμή 0.1593 d^{-1} για την XKX. Σύμφωνα με τους Thomas και Harrison (1987), και άλλη σχετική βιβλιογραφία (Εδάφιο 2.2) έχει δειχθεί ότι τουλάχιστον στην περίπτωση της *Ulva lactuca* ο ρυθμός απορρόφησης της αμμωνίας είναι υψηλότερος από το ρυθμό απορρόφησης των νιτρικών, ωστόσο η κατανόηση αυτών των αλληλεπιδράσεων στην ανάπτυξη των μακροαλγών είναι ακόμα περιορισμένη. Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι η *Ulva* απορροφά την αμμωνία όταν βρίσκεται σε αφθονία στο ενδιαίτημα της αλλά δεν τη χρησιμοποιεί αμέσως για την παραγωγή βιομάζας.



Εικόνα 14 Σύγκριση διαφορετικών πηγών θρεπτικών στην ανάπτυξη της *Ulvaria fusca*

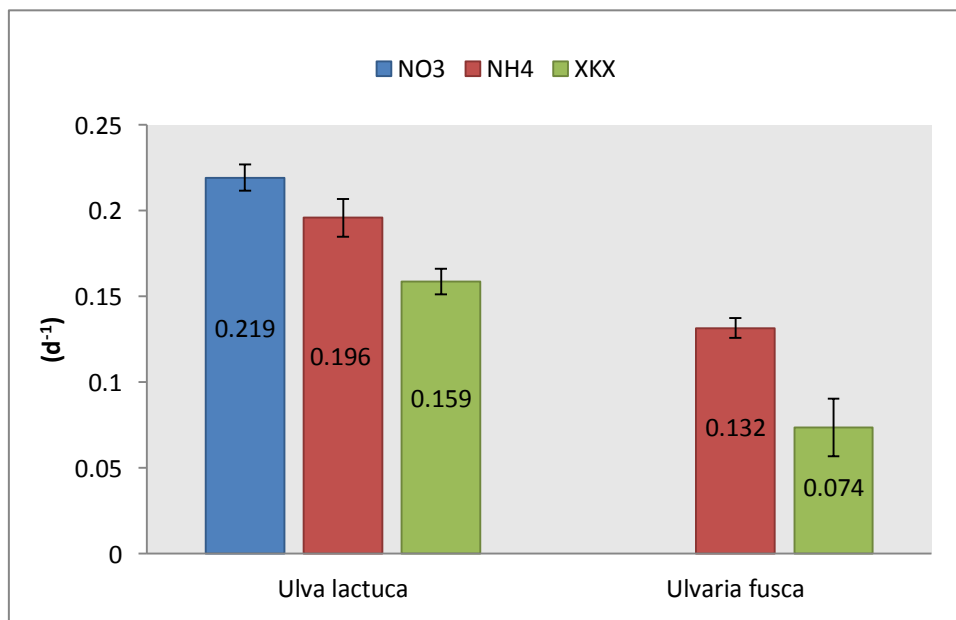
Η *Ulvaria fusca* ευδοκίμει σε πιο κρύα κλίματα (π.χ. Γροιλανδία) και προτιμά χαμηλότερες θερμοκρασίες για την ανάπτυξή της. Παρόλο που τα πειράματα διεξήχθησαν στους 10°C (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται), η *Ulvaria fusca* δεν μεγάλωσε, και έτσι η καλλιέργεια μεταφέρθηκε στους 15°C. Ακόμα και κάτω από αυτές τις συνθήκες οι ρυθμοί ανάπτυξης ήταν σχετικά χαμηλοί σε σχέση με την *Ulva lactuca*.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που φαίνονται στην Εικόνα 14, ο υψηλότερος ρυθμός ανάπτυξης ήταν 0.1332 d⁻¹ (P<0.05) και επιτεύχθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε αμμωνία ως πηγή αζώτου. Όταν χρησιμοποιήθηκε XKX ως πηγή αζώτου ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν 0.0767 d⁻¹, ο οποίος ήταν σημαντικά χαμηλότερος (P<0.05) και δείχνει ότι η *Ulvaria fusca* ανταποκρίθηκε πολύ λίγο σε αυτές τις συνθήκες.

Ο πίνακας 8 δείχνει τους μέσους ρυθμούς ανάπτυξης των *U.lactuca* και *U.fusca* τα οποία καλλιεργήθηκαν με NO₃, NH₄ ή XKX ως πηγή θρεπτικών. Προφανώς η *Ulva lactuca* μπόρεσε να προσαρμοστεί και να μεγαλώσει με πολύ μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από ότι η *Ulvaria fusca* σε όλες τις περιπτώσεις.

Πίνακας 8 Μέσοι ρυθμοί ανάπτυξης των *U.lactuca* και *U.fusca* που καλλιεργήθηκαν κάτω από διαφορετικές πηγές θρεπτικών

Δείγμα	Μέσος ρυθμός ανάπτυξης (d ⁻¹)	Τυπική απόκλιση
<i>Ulva</i> NO ₃ (F/2)	0.219	0.0077
<i>Ulva</i> NH ₄	0.196	0.0111
<i>Ulva</i> ΧΚΧ	0.159	0.0075
<i>Ulvaria</i> NH ₄	0.132	0.0059
<i>Ulvaria</i> ΧΚΧ	0.074	0.0167



Εικόνα 15 Μέσοι ρυθμοί ανάπτυξης των *U.lactuca* και *U.fusca* που καλλιεργήθηκαν κάτω από διαφορετικές πηγές θρεπτικών

Στην Εικόνα 15 φαίνεται ξεκάθαρα η υπεροχή της *Ulva lactuca* έναντι της *Ulvaria fusca* σε όλες τις περιπτώσεις, όσον αφορά στο ρυθμό ανάπτυξης ($P < 0.05$). Η σημαντική πληροφορία που μπορεί να εξαχθεί από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι ότι η ΧΚΧ αποδείχθηκε να είναι κατάλληλη πηγή θρεπτικών για την καλλιέργεια της *U.lactuca* ακόμα και αν έδωσε το χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης. Πρέπει δε να σημειωθεί ότι η τιμή 0.1587 d^{-1} δεν είναι αμελητέα, αντιθέτως είναι σχετικά υψηλή σε σύγκριση με άλλες σχετικές μελέτες (0.16 d^{-1}) (Bruhn *et al*, 2010).

2.3.3 Φάση 3 – ΧΚΧ βελτιστοποίηση

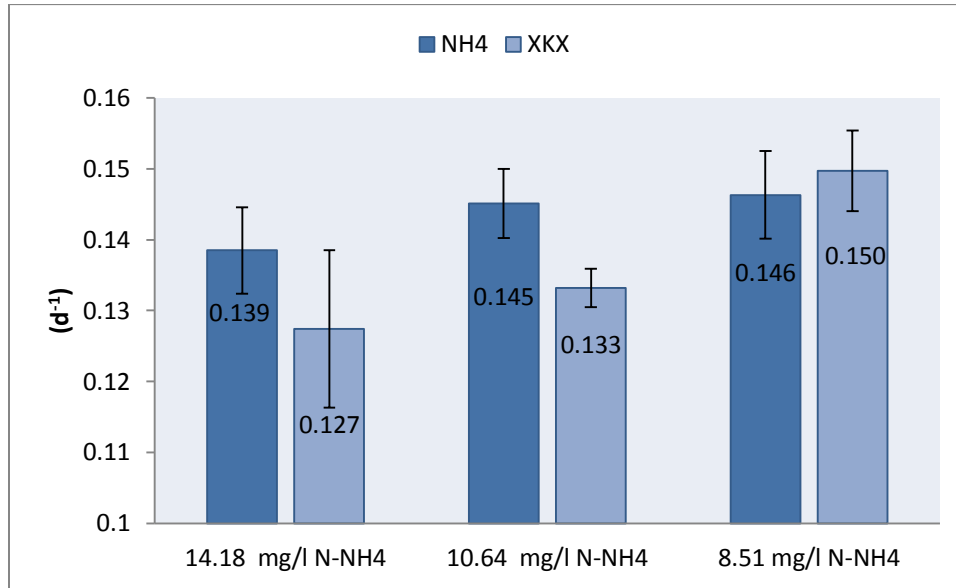
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων καλλιέργειας (Φάση 2) μπορεί να εξαχθεί ότι η ΧΚΧ θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως κατάλληλη πηγή θρεπτικών για την καλλιέργεια αλλά χρειάζεται περισσότερη έρευνα για να προσδιοριστεί κάτω από ποιες συνθήκες η ΧΚΧ δίνει τα βέλτιστα αποτελέσματα.

Πίνακας 9 Μέσοι ρυθμοί ανάπτυξης της *Ulva lactuca* που έχει καλλιεργηθεί με διαφορετικές συγκεντρώσεις ΧΚΧ και NH₄

Δείγμα	Μέσος ρυθμός ανάπτυξης (d ⁻¹)	Τυπική απόκλιση
<i>Ulva</i> NH₄ 1:150 (14.18mg N-NH ₄ /l)	0.139	0.0061
<i>Ulva</i> ΧΚΧ 1:150 (14.18mg N-NH ₄ /l)	0.127	0.0111
<i>Ulva</i> NH₄ 1:200 (10.64 mg N-NH ₄ /l)	0.145	0.0049
<i>Ulva</i> ΧΚΧ 1:200 (10.64mg N-NH ₄ /l)	0.133	0.0027
<i>Ulva</i> NH₄ 1:250 (8.51mg N-NH ₄ /l)	0.146	0.0062
<i>Ulva</i> ΧΚΧ 1:250 (8.51mg N-NH ₄ /l)	0.150	0.0057

Ο πίνακας 9 παρουσιάζει τους μέσους ρυθμούς ανάπτυξης της *Ulva lactuca* η οποία καλλιεργήθηκε με τρεις διαφορετικές αραιώσεις ΧΚΧ και τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε αμμωνία: 14.18 mg N-NH₄/l, 10.64 mg N-NH₄/l and 8.51 mg N-NH₄/l. Πρέπει να

αναφερθεί ότι στα πειράματα καλλιέργειας της Φάσης 2 η αραιώση της ΧΚΧ ήταν 1:200.



Εικόνα 16 Μέσοι ρυθμοί ανάπτυξης της *Ulva lactuca* που έχει καλλιεργηθεί με διαφορετικές συγκεντρώσεις ΧΚΧ και NH₄

Σύμφωνα με την Εικόνα 16 υπάρχει μία τάση η οποία δείχνει ότι όσο πιο υψηλή είναι η αραιώση της ΧΚΧ, τόσο πιο υψηλός ρυθμός ανάπτυξης επιτυγχάνεται. Συγκεκριμένα ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης ήταν 0.150 d⁻¹ και επιτεύχθηκε όταν το διάλυμα καλλιέργειας ήταν εμπλουτισμένο με ΧΚΧ που είχε αραιωθεί 250 φορές (P<0.05). Παρόλο που σε αυτή την περίπτωση η συγκέντρωση της αμμωνίας ήταν χαμηλότερη, η ποσότητα ήταν αρκετή για να εξασφαλίσει αφθονία καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου καλλιέργειας, και έτσι οι δίσκοι να μην έχουν ως περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη τους το άζωτο. Μια πιθανή εξήγηση για τους χαμηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης στην περίπτωση που η αραιώση της ΧΚΧ είναι πιο μικρή, είναι ότι το έντονο και σκούρο χρώμα του διαλύματος καλλιέργειας εμπόδιζε τη διείσδυση του φωτός και έτσι μειωνόταν η φωτοσυνθετική ικανότητα των αλγών. Η ΧΚΧ επίσης περιέχει φαινόλες (S. Hankins (2000), Antoine P (1997) οι οποίες θεωρούνται τοξικές και

διαβρωτικές και αν η ΧΚΧ δεν αραιωθεί αρκετά αυτές μπορεί να βλάψουν και τα κύτταρα των αλγών.

Επιπλέον, η ΧΚΧ περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις Zn, Cu και άλλων βαρέων μετάλλων (B.J. Chambers at al.). Τα βαρέα μέταλλα εμποδίζουν τη δράση διαφόρων λειτουργικών ομάδων πρωτεϊνών, εκτοπίζουν ή αντικαθιστούν άλλα ουσιώδη μέταλλα, επιφέρουν αλλαγές στη διάπλαση των κυττάρων, μετουσιώνουν ένζυμα και διαταράζουν την ακεραιότητα κυττάρων και οργανιδίων (Hall, 2002). Διάφορα βαρέα μέταλλα έχει αναφερθεί ότι επηρεάζουν τα μακροάλη διότι αλληλεπιδρούν με τα ένζυμα και αναχαιτίζουν την ομαλή τους λειτουργία (Van Assche and Clijsters, 1990). Πιο συγκεκριμένα στα μακροάλη, η τοξικότητα των βαρέων μετάλλων είναι γνωστό ότι προκαλεί για παράδειγμα : αναχαίτιση της ανάπτυξης και της φωτοσύνθεσης, μείωση του περιεχομένου σε χλωροφύλλη, επηρεάζει την αναπαραγωγή, παρεμβαίνει στη διαπερατότητα των κυττάρων, προκαλεί απώλεια ιόντων καλίου, επηρεάζει τη σύνθεση των πρωτεϊνών και προκαλεί οξειδωση και υπεροξειδωση των λιπιδίων (Sorrentino, 1979; Strömngren, 1980; Rai et al., 1981; Kremer and Markham, 1982).

Όσον αφορά στα αποτελέσματα που αναφέρονται στις φιάλες εμπλουτισμένες με αμμωνία, μπορεί κανείς να παρατηρήσει ότι οι ρυθμοί ανάπτυξης δεν είναι σημαντικά διαφορετικοί ($P < 0.05$) μεταξύ των τριών συγκεντρώσεων. Αυτό είναι ένα θετικό αποτέλεσμα από την άποψη ότι επαληθεύει ότι το γεγονός ότι δεν υπήρξε εξάντληση της αμμωνίας κατά τη διάρκεια της περιόδου καλλιέργειας και εφόσον και οι υπόλοιπες παράμετροι παρέμειναν ίδιες , οι ρυθμοί ανάπτυξης δεν θα έπρεπε να διαφέρουν.

2.4 Συμπεράσματα

Υπάρχουν αρκετά συμπεράσματα τα οποία μπορούν να εξαχθούν από τα παραπάνω πειράματα και συνοψίζονται στην συνέχεια:

1. Επίδραση Αντιβιοτικών και GeO_2

Η χρήση αντιβακτηριδιακών ουσιών όπως τα αντιβιοτικά σε χαμηλές ή υψηλές συγκεντρώσεις δεν φάνηκε να αυξάνει την ανάπτυξη των αλγών. Σε αντίθεση, τα αντιβιοτικά είχαν αναχαιτιστική δράση και όταν χρησιμοποιήθηκε η υψηλή δόση πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα δεν επέζησαν όλη τη διάρκεια της περιόδου καλλιέργειας. Επιπλέον, το GeO_2 αναχαιτίσει την ανάπτυξη των διατόμων και άλλων ειδών μικροαλγών αλλά παράλληλα μείωσε και τους ρυθμούς ανάπτυξης των μελετώμενων μακροαλγών. Πρέπει να σημειωθεί πάντως ότι τα αντιβιοτικά και το GeO_2 πέτυχαν το στόχο τους, να εξαλείψουν τα βακτήρια και τα δίατομα.

2. $\text{NO}_3 > \text{NH}_4 > \text{ΧΚΧ}$

Η βέλτιστη πηγή θρεπτικών κατά τη διάρκεια των πειραμάτων εργαστηριακής κλίμακας αποδείχθηκε να είναι το έτοιμο διάλυμα F/2 το οποίο είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε νιτρικά, ακολουθούμενο από το διάλυμα καλλιέργειας που ήταν εμπλουτισμένο με αμμωνία (11% χαμηλότερο). Τελευταίος αλλά όχι πολύ χαμηλός ήταν ο ρυθμός ανάπτυξης των αλγών με χρήση της ΧΚΧ, η οποία είναι πλούσια σε αμμωνία και περιέχει και μια μικρή συγκέντρωση νιτρικών. Η *U.lactuca* αναπτύχθηκε με ΧΚΧ ως πηγή θρεπτικών με ρυθμό ανάπτυξης περίπου 27% χαμηλότερο από τον μέγιστο που επιτεύχθηκε.

3. Βελτιστοποίηση ΧΚΧ

Διήθηση, φυγοκέντρωση, προσθήκη H_2O_2 συνδυασμένο με υψηλές θερμοκρασίες (120°C), χρησιμοποιήθηκαν μεμονωμένα και σε συνδυασμό για την προεπεξεργασία της ΧΚΧ αλλά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι μέθοδοι

αυτές μείωναν τα επίπεδα της αμμωνίας κάτω από τα όρια ανίχνευσης. Επιπλέον, υψηλές συγκεντρώσεις ΧΚΧ (1:150) στο διάλυμα καλλιέργειας αναχαιτίζουν την ανάπτυξη των μακροαλγών εξ' αιτίας των βαρέων μετάλλων (Cu, Zn) και της παρουσίας φαινολών οι οποίες είναι τοξικές για ζωντανούς οργανισμούς. Έτσι υψηλότερες αραιώσεις (1:250) έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα ανάπτυξης, συγκρίσιμα με αυτά που επιτεύχθηκαν στα φιάλες που ήταν εμπλουτισμένες με αμμωνία.

4. Η *Ulvaria fusca* αποδείχθηκε πολύ δυσκολότερο να καλλιεργηθεί και δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστούν οι κατάλληλες συνθήκες για τη μεγιστοποίηση της ανάπτυξης αυτού του είδους σε αυτή τη μελέτη. Η *Ulvaria fusca* δεν μεγάλωσε καθόλου στο διάλυμα καλλιέργειας που ήταν εμπλουτισμένο με νιτρικά. Από τη άλλη όμως, αποκτήθηκαν πιο ενθαρρυντικά αποτελέσματα στις περιπτώσεις όπου το διάλυμα καλλιέργειας ήταν εμπλουτισμένο με αμμωνία ή ΧΚΧ αλλά ήταν 33% και 55% χαμηλότερα από αυτά που πέτυχε η *Ulva lactuca*, αντίστοιχα.
5. Η *U. lactuca*, η *U. fusca* και άλλα είδη θαλασσίων μακροαλγών είναι ικανά να συσσωρεύσουν και να αποθηκεύσουν θρεπτικά (P, NH_4^+ , NO_3^-), τα οποία μπορεί να είναι περιοριστικοί παράγοντες σε πολλές περιπτώσεις. Αυτό σημαίνει ότι αυτά τα είδη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παράδειγμα, για περαιτέρω επεξεργασία λυμάτων (τριτοβάθμια) σε περίπτωση που η εκροή αποβάλλεται σε ευαίσθητο αποδέκτη.
6. Οι υψηλοί ρυθμοί ανάπτυξης (έως 0.22 d^{-1}) καθιστούν το είδος *Ulva lactuca* κατάλληλο για καλλιέργεια για διάφορες χρήσεις. Ένα ολοκληρωμένο σχέδιο κλασματοποίησης, καλλιέργειας και επεξεργασίας αλγών μπορεί να προμηθεύσει τρόφιμα, χημικά (υδροκολλοειδή), καλλυντικά, λιπάσματα και διάφορες μορφές ενέργειας, όλα προερχόμενα από τη βιομάζα των αλγών που παρήχθη μέσω της καλλιέργειας τους.

3 Κεφάλαιο: Παραγωγή Βιοκαυσίμων

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

3.1 Γενικό Πλαίσιο

Τα βιοκαύσιμα αποτελούνται από ένα ευρύ φάσμα καυσίμων τα οποία όλα προέρχονται με τον ένα ή τον άλλο τρόπο από βιομάζα. Ο όρος καλύπτει στερεή βιομάζα, υγρά καύσιμα και διάφορα αέρια. Τα βιοκαύσιμα κερδίζουν αυξημένη δημόσια και επιστημονική προσοχή, προερχόμενη από παράγοντες όπως η αύξηση της τιμής του πετρελαίου, η ανάγκη για ενεργειακή ασφάλεια, και φυσικά οι ανησυχίες για τις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου από τα στερεά καύσιμα.

Η υψηλή τιμή του πετρελαίου, η ανταγωνιστική ζήτηση μεταξύ τροφών και άλλων πηγών βιοκαυσίμων και η παγκόσμια κρίση στα τρόφιμα έχουν προκαλέσει ενδιαφέρον στην καλλιέργεια αλγών για την παραγωγή ελαίων, βιοντίζελ, βιοαιθανόλης, βιομεθανίου, βιοβουτανίου και άλλων βιοκαυσίμων, χρησιμοποιώντας γη η οποία δεν είναι κατάλληλη για γεωργία. Ανάμεσα στα ελκυστικά χαρακτηριστικά των καυσίμων που προέρχονται από άλγη μπορούν να συμπεριληφθούν τα ακόλουθα:

- Δεν επηρεάζουν τις πηγές γλυκού νερού
- Μπορούν να αναπτυχθούν χρησιμοποιώντας λύματα ή θαλασσινό νερό
- Είναι βιοδιασπάσιμα και σχετικά ακίνδυνα αν υπάρξει διαρροή στο περιβάλλον

Τα άλγη κοστίζουν περισσότερο ανά μονάδα μάζας, λόγω του υψηλού αρχικού και λειτουργικού κόστους, αλλά μπορούν θεωρητικά να παράξουν 10 με 100 φορές περισσότερη ενέργεια ανά μονάδα επιφάνειας από άλλες πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοκαυσίμων δεύτερης γενιάς. Μια πιθανή πηγή θρεπτικών είναι η εκροή από επεξεργασμένα λύματα ή η εκροή από γεωργικές καλλιέργειες τα οποία αποτελούν σημαντικούς ρυπαντές. Ωστόσο, τα λύματα δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως τροφή για τα άλγη απ' ευθείας και πρέπει πρώτα να γίνει επεξεργασία αυτών μέσω αναερόβιας χώνευσης. Εάν τα λύματα δεν είναι

επεξεργασμένα πριν έρθουν σε επαφή με τα άλγη, θα μολύνουν τα άλγη και πιθανότατα θα σκοτώσουν κάποια από αυτά. Σε εγκαταστάσεις βιοαερίου, τα οργανικά λύματα μετατρέπονται σε ένα μείγμα από διοξείδιο του άνθρακα, μεθάνιο και οργανικό λίπασμα. Το οργανικό λίπασμα το οποίο βγαίνει από τον χωνευτή είναι υγρό και κατάλληλο για την ανάπτυξη αλγών αλλά πρέπει πρώτα να αραιωθεί και να αποστειρωθεί.

3.1.1 Άλγη και βιοκαύσιμα

Τα καύσιμα από άλγη είναι επίσης γνωστά και ως βιοκαύσιμα τρίτης γενιάς. Τα βιοκαύσιμα τρίτης γενιάς είναι μια εναλλακτική ως προς τα ορυκτά καύσιμα και χρησιμοποιούν άλγη ως πηγή άνθρακα. Αρκετές εταιρίες και κρατικές υπηρεσίες χρηματοδοτούν προσπάθειες για τη μείωση του αρχικού κεφαλαίου και του λειτουργικού κόστους και να καταστήσουν την παραγωγή βιοκαυσίμων από άλγη εμπορικά εφικτή.

Τα άλγη είναι πρώτη ύλη που χρειάζεται λίγη αρχική ποσότητα για μεγάλη απόδοση παραγωγή βιοκαυσίμου. Με βάση εργαστηριακά πειράματα, έχειδειχθεί ότι τα άλγη μπορούν να παράξουν έως και 30 φορές περισσότερη ενέργεια αν εκτάριο σε σύγκριση με γεωργικές καλλιέργειες όπως η σόγια (T. Hamilton, 2010), αλλά αυτό δεν έχει πραγματοποιηθεί σε μεγάλη κλίμακα. Ένα πλεονέκτημα πολλών βιοκαυσίμων σε σχέση με τα άλλα είδη καυσίμων είναι ότι είναι βιοδιασπάσιμα, και σχετικά ακίνδυνα ως προς το περιβάλλον σε περίπτωση διαρροής. Η παραγωγή βιοκαυσίμων από άλγη δεν μειώνει το ατμοσφαιρικό διοξείδιο του άνθρακα, διότι το CO₂ που απορροφάται από τα άλγη για την ανάπτυξη τους επιστρέφει στην ατμόσφαιρα όταν καίγονται. Όμως μπορούν δυνητικά να μειώσουν την εισαγωγή νέου CO₂ με την εκτόπιση των ορυκτών υδρογονανθράκων.

3.1.2 Βιοαέριο

Το βιοαέριο αναφέρεται στο αέριο που παράγεται από τη βιολογική διάσπαση οργανικής ύλης απουσία οξυγόνου. Το βιοαέριο παράγεται μέσω αναερόβιας χώνευσης ή ζύμωσης βιοδιασπάσιμων υλικών όπως βιομάζα, κοπριά, αστικά ή βιομηχανικά λύματα, κυτταρινούχα φυτά και ενεργειακά γεωργικά προϊόντα. Αυτό το είδος βιοαερίου αποτελείται κυρίως από μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα. Τα αέρια μεθάνιο, υδρογόνο και μονοξείδιο του άνθρακα μπορούν να καούν ή να οξειδωθούν παρουσία οξυγόνου. Ο ατμοσφαιρικός αέρας περιέχει 21% οξυγόνο. Αυτό η απελευθέρωση ενέργειας επιτρέπει στο βιοαέριο να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο.

Εφαρμογές

Το βιοαέριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας ή για την παραγωγή θερμικής ενέργειας και εν συνεχεία η ενέργεια αυτή να χρησιμοποιηθεί για την θέρμανση του χωνευτή, για μαγείρεμα, για θέρμανση νερού ή άλλων χώρων. Εάν συμπιεστεί μπορεί να αντικαταστήσει το συμπιεσμένο φυσικό αέριο που χρησιμοποιείται και στα αυτοκίνητα, όπου μπορεί να προμηθεύσει μια μηχανή εσωτερική καύσης και είναι πολύ πιο αποτελεσματικό στον εκτοπισμό του διοξειδίου του άνθρακα.

Το μεθάνιο που βρίσκεται μέσα στο βιοαέριο μπορεί να συμπυκνωθεί στα ίδια επίπεδα με το φυσικό αέριο (το οποίο πρέπει να περάσει από διαδικασία καθαρισμού), και να μετατραπεί σε βιομεθάνιο. Εάν το τοπικό δίκτυο το επιτρέπει, ο παραγωγός του βιοαερίου μπορεί να το διανείμει μέσω του δικτύου στους καταναλωτές. Το αέριο πρέπει να είναι πολύ καθαρό πριν εισέλθει στους σωλήνες, και πρέπει να έχει την κατάλληλη σύσταση για να μπορεί να μπει στο δίκτυο διανομής. Το διοξείδιο του άνθρακα, το νερό, το υδρόθειο και τα σωματίδια πρέπει να απομακρυνθούν εάν είναι παρόντα. Εάν το βιοαέριο είναι συγκεντρωμένο και συμπιεσμένο τότε μπορεί να

χρησιμοποιηθεί και σε οχήματα για μετακινήσεις. Το συμπιεσμένο βιοαέριο χρησιμοποιείται ευρέως στη Σουηδία, την Ελβετία και τη Γερμανία. Ένα τρένο που κινείται με βιοαέριο βρίσκεται σε λειτουργία στην Σουηδία από το 2005 (Svensk Biogas AB).

Σύσταση

Η σύσταση του βιοαερίου (Πίνακας 10) ποικίλλει ανάλογα με τη διαδικασία της αναερόβιας χώνευσης. Το βιοαέριο από ΧΥΤΑ έχει συνήθως συγκεντρώσεις μεθανίου περίπου 50%. Προηγμένες τεχνολογίες επεξεργασίας αποβλήτων μπορούν να πετύχουν συγκεντρώσεις μεθανίου έως και 75%. Όταν παράγεται το βιοαέριο περιέχει επίσης υδρατμούς, ο όγκος των οποίων είναι ανάλογος της θερμοκρασίας του χωνευτή.

Πίνακας 10 Τυπική σύσταση βιοαερίου

Συστατικό	Χημικός τύπος	%
Μεθάνιο	CH ₄	50-75
Διοξείδιο του άνθρακα	CO ₂	25-50
Άζωτο	N ₂	0-10
Υδρογόνο	H ₂	0-1
Υδρόθειο	H ₂ S	0-3
Οξυγόνο	O ₂	0-0

3.1.3 Βιο-αλκοόλες

Βιολογικά παραγόμενες αλκοόλες, και πιο συχνά βιοαιθανόλη, και πιο σπάνια προπανόλη και βουτανόλη, παράγονται από τη δράση μικροοργανισμών και ενζύμων μέσω ζύμωσης σακχάρων ή αμύλου ή κυτταρίνης. Η βιοβουτανόλη θα μπορούσε να παρέχει ένα άμεσο αντικαταστατό για τη βενζίνη, διότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί

άμεσα από μια μηχανή βενζίνης, όπως η βιοντίζελ μπορεί να χρησιμοποιηθεί από μηχανές ντίζελ.

Η βιοαιθανόλη είναι μία αλκοόλη που παράγεται από τη ζύμωση σακχάρων προερχόμενων κυρίως από σακχαρώδη ή αμυλούχα φυτά. Με την ανάπτυξη πιο προηγμένων τεχνολογιών, η κυτταρινική βιομάζα, όπως τα δέντρα και το γρασίδι, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν σαν πρώτη ύλη για την παραγωγή αιθανόλης. Η αιθανόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν καύσιμο για οχήματα στην καθαρή της μορφή, αλλά συνήθως χρησιμοποιείται ως πρόσθετο της βενζίνης για να αυξήσει τον αριθμό οκτανίων και να βελτιώσει τις εκπομπές ρύπων.

Η αιθανόλη είναι το πιο σύνηθες βιοκαύσιμο παγκοσμίως, και ειδικότερα στη Βραζιλία. Οι βιοαλκοόλες παράγονται από τη ζύμωση σακχάρων που προέρχονται από σιτάρι, καλαμπόκι, σακχαρότευτλα, μελάσες και από άλλα υλικά από τα οποία φτιάχνονται αλκοολούχα ποτά όπως η πατάτα και τα υπολείμματα φρούτων. Οι μέθοδοι παραγωγής αιθανόλης που χρησιμοποιούνται είναι η ενζυματική υδρόλυση (για την απελευθέρωση σακχάρων), η ζύμωση των σακχάρων, η απόσταξη και η ξήρανση. Η διαδικασία της απόσταξης χρειάζεται σημαντική ενέργεια για θέρμανση.

Εφαρμογές

Η αιθανόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μηχανές εσωτερική καύσης σαν υποκατάστατο της βενζίνης, αλλά μπορεί να αναμειχθεί και με τη βενζίνη σε οποιοδήποτε ποσοστό. Οι περισσότερες μηχανές αυτοκινήτων σήμερα μπορούν να λειτουργήσουν με μείγμα βενζίνης που περιέχει μέχρι και 15% αιθανόλη. Η αιθανόλη έχει μικρότερη «ενεργειακή πυκνότητα» από την βενζίνη το οποίο σημαίνει ότι χρειάζεται μεγαλύτερη μάζα για την ίδια παραγωγή έργου. Ένα πλεονέκτημα της αιθανόλης ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) είναι ότι έχει υψηλότερο αριθμό οκτανίων το οποίο επιτρέπει αύξηση του βαθμού συμπίεσης με αποτέλεσμα πιο αυξημένη θερμική αποδοτικότητα. Σε περιοχές με υψηλό υψόμετρο, κάποιες πολιτείες έχουν καταστήσει υποχρεωτική τη

μίξη βενζίνης με αιθανόλη ως χειμερινό οξειδωτικό για να μειώσουν τις εκπομπές ρύπων.

Κυτταρινική Αιθανόλη

Για την παραγωγή κυτταρινικής αιθανόλης χρησιμοποιούνται μη βρώσιμες πρώτες ύλες ή απορρίμματα και έτσι δεν εκτρέπεται η τροφή από την ανθρώπινη ή ζωική τροφική αλυσίδα. Η λιγνοκυτταρίνη είναι η ουσία που δίνει την ξυλώδη υπόσταση στα φυτά και στα δέντρα. Αυτή η ουσία είναι άφθονη και ποικίλη, και σε μερικές περιπτώσεις (π.χ. φλούδες εσπεριδοειδών ή πριονίδι) αποτελεί από μόνη της ένα σημαντικό πρόβλημα διάθεσης.

Η παραγωγή κυτταρινικής αιθανόλης είναι ένα δύσκολο τεχνικά πρόβλημα προς επίλυση. Στη φύση τα μηρυκαστικά ζώα όπως τα πρόβατα τρώνε γρασίδι και στη συνέχεια χρησιμοποιούν αργές ενζυματικές διαδικασίες κατά τη χώνευση για να το διασπάσουν σε απλά σάκχαρα και κατ' επέκταση σε γλυκόζη. Σε εργαστήρια παραγωγής κυτταρινικής αιθανόλης, έχουν αναπτυχθεί διάφορες πειραματικές μέθοδοι οι οποίες επιτελούν την ίδια διαδικασία όπως στη φύση, και στη συνέχεια τα σάκχαρα που απελευθερώνονται υφίστανται αλκοολική ζύμωση για την παραγωγή αιθανόλης.

3.1.4 Βιοντίζελ

Η βιοντίζελ παράγεται από φυτικά έλαια, ζωικά λίπη ή ανακυκλωμένα λιπαντικά. Η βιοντίζελ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο για οχήματα στην καθαρή της μορφή, αλλά χρησιμοποιείται συνήθως ως πρόσθετο για να μειώσει τα επίπεδα σωματιδίων, μονοξειδίου του άνθρακα, και υδρογονανθράκων σε ντιζελοκίνητα οχήματα. Η βιοντίζελ παράγεται από λάδια και λίπη χρησιμοποιώντας μετεστεροποίηση και είναι το πιο κοινό βιοκαύσιμο στην Ευρώπη.

3.1.5 Αναερόβια Χώνευση

Το βιοαέριο μπορεί να παραχθεί χρησιμοποιώντας αναερόβιους χωνευτές. Αυτές οι εγκαταστάσεις μπορούν να τροφοδοτηθούν με ενεργειακά προϊόντα όπως τα υπολείμματα αραβοσίτου ή βιοδιασπάσιμα απόβλητα όπως η βιολογική ιλύς και τα απόβλητα τροφίμων. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, μια αεροστεγής δεξαμενή μετατρέπει αυτά τα απόβλητα σε μεθάνιο παράγοντας έτσι ανανεώσιμη ενέργεια η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για θέρμανση, ηλεκτρισμό και άλλες λειτουργίες που χρησιμοποιούν παραλλαγές μια μηχανής εσωτερική καύσης. Υπάρχουν δυο βασικές διαδικασίες: η μεσόφιλική και η θερμοφιλική χώνευση.

Η αναερόβια χώνευση περιλαμβάνει τη διάσπαση οργανικού υλικού από τη συντονισμένη δράση μια μεγάλης ποικιλίας μικροοργανισμών απουσία οξυγόνου. Η συνολική διαδικασία αποτελείται από μια σύνθετη σειρά αντιδράσεων (εξ.[3.1]-[3.8]), το σύνολο της οποίας είναι μία ζύμωση, η οποία μετατρέπει ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων που έχουν άτομα άνθρακα με διάφορους βαθμούς οξειδωσης, σε μόρια ενός άνθρακα στην πιο οξειδωμένη (CO_2) και στην πιο ανοιγμένη (CH_4) μορφή. Μικρές ποσότητες αζώτου, υδρογόνου, αμμωνίας και υδρόθειου (συνήθως λιγότερο από 1% του συνολικού όγκου του αερίου) παράγονται επίσης.

Η παραγωγή βιοαερίου είναι μια φυσική διαδικασία η οποία λαμβάνει χώρα σε ποικίλα αναερόβια περιβάλλοντα όπως το εντερικό σύστημα ανθρώπων και ζώων, ιζήματα λιμνών ή θαλάσσια, στη βιολογική ιλύ, σε ορυζώνες, σε κορεσμένα εδάφη και σε περιοχές θερμών ηφαιστειακών πηγών. Σήμερα η διαδικασία παραγωγής βιοαερίου έχει εφαρμοστεί από τον άνθρωπο στο πεδίο της επεξεργασίας λυμάτων και αποβλήτων και συνήθως συνδυάζεται με ανάκτηση ενέργειας.

Δύο λόγοι καθιστούν αυτή τη διαδικασία ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα:

- Ο υψηλός βαθμός μείωσης του οργανικού υλικού επιτυγχάνεται με μικρή αύξηση της βακτηριακής βιομάζας, σε σύγκριση με την αερόβια διαδικασία

- Η παραγωγή βιοαερίου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία διαφόρων μορφών ενέργειας (θερμότητα και ηλεκτρισμός).

Η αναερόβια χώνευση είναι γνωστή και έχει χρησιμοποιηθεί εδώ και πολλά χρόνια, αλλά κυρίως μετά την αύξηση του κόστους ενέργειας τη δεκαετία του '70, η διαδικασία έλαβε ανανεωμένο ενδιαφέρον εξ' αιτίας της προοπτικής εύρεσης εναλλακτικών πηγών ενέργειας ώστε να μειωθεί η εξάρτηση από τα ορυκτά καύσιμα. Παρόλο που οι τιμές των ορυκτών καυσίμων έπεσαν το 1985, το ενδιαφέρον για την παραγωγή βιοαερίου συνεχίζει να αυξάνεται λόγω των ωφελειών της αναερόβιας χώνευσης των αποβλήτων. Επιπλέον, η βιομάζα που χρησιμοποιείται για την παραγωγή βιοαερίου είχε παραχθεί αρχικά μέσω φωτοσύνθεσης (πρόσληψη διοξειδίου του άνθρακα από την ατμόσφαιρα) και έτσι δεν προσθέτει επιπλέον διοξείδιο του άνθρακα στην ατμόσφαιρα όταν καίγεται, σε σύγκριση με την καύση ορυκτών καυσίμων.

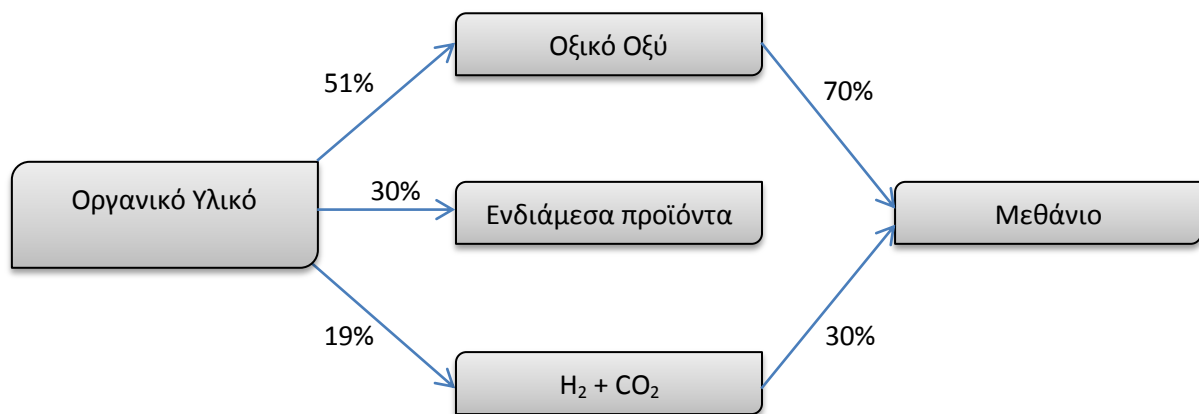
Αναερόβια Μικροβιολογία

Το γενικό μοντέλο της διάσπασης του οργανικού υλικού (πολυμερή όπως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και λίπη) κάτω από αναερόβιες συνθήκες λειτουργεί με τρεις βασικές ομάδες βακτηρίων τα οποία μαζί μετατρέπουν την οργανική ύλη σε μεθάνιο, διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Τα βακτήρια υδρολύουν τα πολυμερή σε διαλυτά ολιγομερή και μονομερή μέσω της δράσης των εξωκυτταρικών ενζύμων. Στη συνέχεια τα διαλυμένα προϊόντα λαμβάνονται από τα βακτήρια και ζυμώνονται σχηματίζοντας οξικό οξύ και άλλα λιπαρά οξέα, αλκοόλες, υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα τα οποία απελευθερώνονται στο περιβάλλον.

Οι αλυσίδες λιπαρών οξέων που είναι μεγαλύτερες από το οξικό οξύ και τις αλκοόλες, οξειδώνονται από οξεογόνα βακτήρια που παράγουν υδρογόνο, με αποτέλεσμα το σχηματισμό υδρογόνου, οξικού οξέως, μυρμηκικού οξέως και διοξειδίου του άνθρακα. Τα τελικό προϊόν από το μεταβολισμό των πολυμερών και των ενδιάμεσων προϊόντων από τα μεθανογόνα βακτήρια είναι το μεθάνιο.

Αυτό το μοντέλο τριών βημάτων για την αναερόβια χώνευση του οργανικού υλικού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να δώσει μια γενική άποψη, αλλά απλοποιεί τα πράγματα. Για ένα πιο ολοκληρωμένο μοντέλο, πρέπει να συμπεριληφθούν και άλλες ομάδες βακτηρίων οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Τα ομοοξεογόνα βακτήρια διασπούν ένα μεγάλο φάσμα ουσιών, π.χ. γλυκόζη ή H_2/CO_2 , παράγοντας οξικό οξύ ως το μόνο τελικό προϊόν. Υπάρχει επίσης μία ομάδα βακτηρίων η οποία μπορεί να αντιστρέψει τη μετατροπή των λιπαρών οξέων όταν η συγκέντρωση του υδρογόνου, του οξικού οξέως ή της αιθανόλης είναι υψηλή.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 17, το οξικό οξύ είναι η πιο σημαντική πηγή μεθανίου στο αναερόβιο περιβάλλον, δίνοντας περίπου 70% CH_4 όταν το υπόλοιπο 30% προέρχεται από το υδρογόνο και το διοξείδιο του άνθρακα. Το βασικό μέρος του οξικού οξέως και του υδρογόνου σχηματίζεται άμεσα από τη διαδικασία της αναερόβιας χώνευσης ενώ το υπόλοιπο 30% παράγεται από ενδιάμεσα προϊόντα.

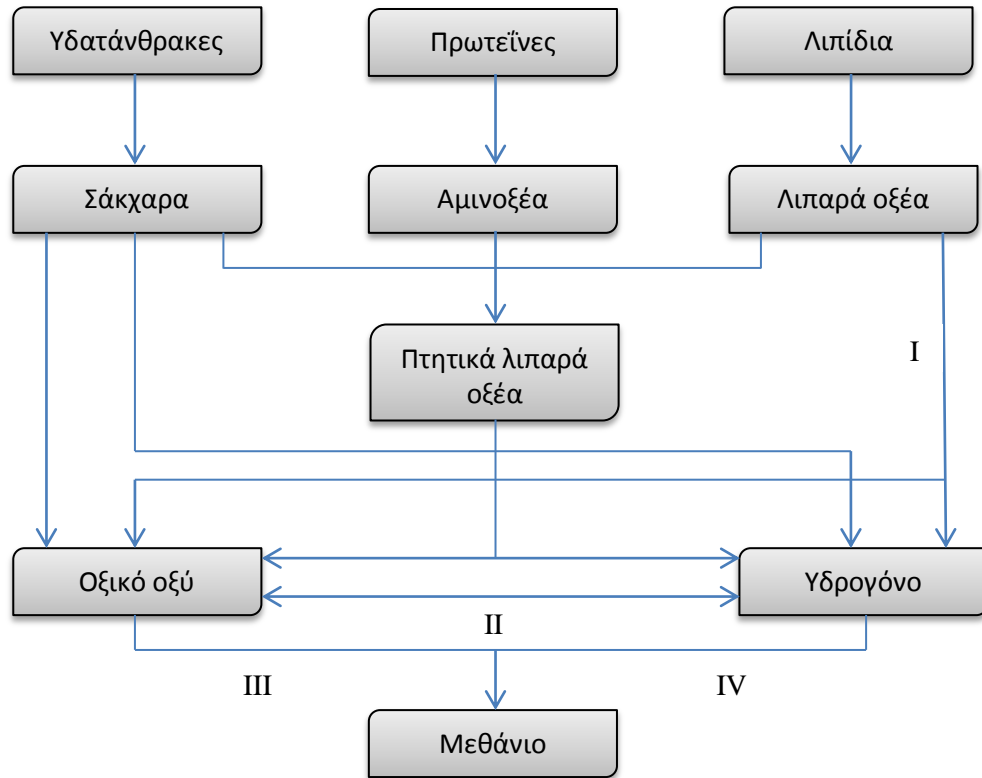


Εικόνα 17 Ροή άνθρακα στην αναερόβια χώνευση (Iirini Angelidaki and Jens Ejbye Schmidt)

Τα μονοπάτια της αναερόβιας χώνευσης

Η αναερόβια χώνευση μπορεί να οριστεί ως η διάσπαση του οργανικού υλικού από μικροοργανισμούς απουσία οξυγόνου. Τα μονοπάτια της αναερόβιας χώνευσης

παρουσιάζονται σχηματικά στην Εικόνα 18. Η συνολική διαδικασία μπορεί να χωριστεί σε 4 στάδια: Υδρόλυση, Οξεογένεση, Οξικογένεση, Μεθανογένεση.



Εικόνα 18 Μονοπάτι της αναερόβιας χώνευσης (Salminen and Rintala, 2002)

Υδρόλυση

Τα πιο σημαντικά συστατικά στην βιολογική ιλύ ή στην κοπριά είναι τα πολυμερή όπως οι υδατάνθρακες, οι πρωτεΐνες και τα λίπη. Η υδρόλυση αυτών των συστατικών σε μικρότερες μονάδες είναι το πρώτο βήμα της αναερόβιας χώνευσης.

Διαφορετικές ομάδες βακτηρίων είναι ικανές να διασπάσουν σύνθετα πολυμερή σε ολιγομερή και μονομερή εκκρίνοντας εξωκυτταρικά ένζυμα. Τα πρωτεολυτικά βακτήρια παράγουν πρωτεάσες που καταλύουν την υδρόλυση των πρωτεϊνών σε αμινοξέα, τα κυτταρινολυτικά και ξυλανολυτικά βακτήρια παράγουν κυτταρινάσες και ξυλανάσες

που διασπούν την κυτταρίνη και την ξυλάνη σε γλυκόζη και ξυλόζη αντίστοιχα, και τέλος τα λιπολυτικά βακτήρια παράγουν λιπάσες οι οποίες διασπούν τα λιπίδια σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα.

Οξεογένεση

Κατά το βήμα της οξεογένεσης τα αμινοξέα, τα σάκχαρα και η γλυκερόλη διασπώνται περαιτέρω σε πτητικά λιπαρά οξέα, υδρογόνο, διοξείδιο του άνθρακα και αλκοόλες. Η ζύμωση των αμινοξέων δημιουργεί αμμωνία ως υπο-προϊόν. Σε μια καλορυθμισμένη διαδικασία αναερόβιας χώνευσης, το κυρίως μέρος του οργανικού υλικού θα μετατραπεί απ' ευθείας από τα αναερόβια βακτήρια σε μεθανογόνα υποστρώματα (υδρογόνο, διοξείδιο του άνθρακα και οξικό οξύ). Ωστόσο, ένα σημαντικό μέρος (περίπου 30%) θα μετατραπεί σε άλλα λιπαρά οξέα και σε αλκοόλες. Αυτό το κλάσμα θα είναι μεγαλύτερη αν η διαδικασία δεν είναι ισορροπημένη π.χ. αν το δημιουργούμενο υδρογόνο δεν καταναλώνεται αρκετά γρήγορα.

Οξικογένεση

Σε αυτό το βήμα τα πτητικά λιπαρά οξέα, οι αλκοόλες και τα ουδέτερα συστατικά τα οποία είναι μεγαλύτερα από τη μεθανόλη οξειδώνονται σε οξικό οξύ, διοξείδιο του άνθρακα και υδρογόνο (Salminen and Rintala, 2002). Οι μακριές αλυσίδες λιπαρών οξέων μετατρέπονται σε οξικό οξύ μέσω β-οξειδωσης. Αυτό το βήμα θεωρείται από τη βιβλιογραφία ως το περιοριστικό στάδιο όλης της διαδικασίας (Shin et al. 2003).

Μεθανογένεση

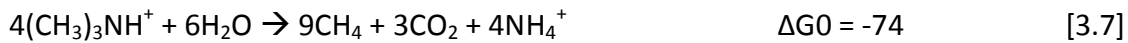
Το τελευταίο στάδιο της αναερόβιας χώνευσης είναι η μεθανογένεση. Μετά από αυτό το στάδιο, τα αρχικά συστατικά είναι πλέον ανόργανα, ή με άλλα λόγια το αρχικό

υπόστρωμα έχει μετατραπεί σε μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα. Σε πολλές περιπτώσεις το στάδιο αυτό αποτελεί το περιοριστικό σημείο όλης της διαδικασίας και δύο μεταβολικά μονοπάτια μπορούν να διακριθούν: η υδρογονοτροφική μεθανογένεση η οποία περιλαμβάνει τη μείωση του διοξειδίου του άνθρακα και η οξεοκλαστική μεθανογένεση η οποία έχει το οξικό οξύ σαν υπόστρωμα.

Ο πιο σημαντικός πρόδρομος του μεθανίου είναι το οξικό οξύ (70%) ενώ το υπόλοιπο 30% σχηματίζεται από H_2/CO_2 ή μυρμηκικό οξύ. Τα μεθανογόνα βακτήρια διαχωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες: τα οξεοκλαστικά μεθανογόνα βακτήρια, τα οποία ανήκουν στα γένη *Methanosarcina* και *Methanosaeta* (γνωστό και ως *Methanothrix*), και τα μεθανογόνα βακτήρια που καταναλώνουν υδρογόνο για τα οποία υπάρχει ένα μεγάλο εύρος από γένη. Κάποια είδη *Methanosarcina* μπορούν να μετατρέψουν υδρογόνο αλλά και οξικό οξύ. Η μεθανογένεση θεωρείται ως η κινητήρια δύναμη της αναερόβιας χώνευσης και είναι μια διαδικασία η οποία παράγει ενέργεια κάτω από κανονικές συνθήκες, σε αντίθεση με άλλες διαδικασίες που λαμβάνουν μέρος κατά τη διάρκεια της αναερόβιας χώνευσης.

Σύμφωνα με τις αντιδράσεις [3.1]-[3.8], η μεθανογένεση από μονοξείδιο του άνθρακα και υδρογόνο είναι η πιο ευνοϊκή μετατροπή, ενώ η μετατροπή οξικού οξέως σε μεθάνιο είναι η λιγότερο ευνοϊκή.





Ειδική απόδοση βιοαερίου

Η απόλυτη παραγωγή αερίου, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από μόνη της για να αξιολογηθεί εάν η διαδικασία λειτουργεί σωστά εάν η πραγματική παραγωγή αερίου δεν συσχετιστεί με την αναμενόμενη παραγωγή, π.χ. η παραγωγή βιοαερίου πρέπει να συνδεθεί με το δυναμικό παραγωγή βιοαερίου της συγκεκριμένης πρώτης ύλης που χρησιμοποιήθηκε.

Το δυναμικό παραγωγής βιοαερίου μπορεί να το συναντήσει κανείς στη βιβλιογραφία με διάφορους τρόπους. Οι πιο συνήθεις είναι:

- mL βιοαερίου / g COD που προστέθηκε
- mL βιοαερίου / g VS που προστέθηκε

όπου COD αναφέρεται στην 'χημική ζήτηση οξυγόνου' και VS στα 'πτητικά στερεά'.

Συνδυάζοντας μετρήσεις πτητικών στερεών και έχοντας γνώση του δυναμικού παραγωγής βιοαερίου της πρώτης ύλης, μπορεί να γίνει μια εκτίμηση της παραγωγής βιοαερίου και να χρησιμοποιηθεί ως κλίμακα της πραγματικής παραγωγής. Το δυναμικό παραγωγής μεθανίου κάποιου υποστρώματος είναι η συνολική παραγωγή μετά από πολύ μεγάλο χρόνο παραγωγής όπου όλα το οργανικό υλικό θα έχει καταναλωθεί και θα έχει μετατραπεί σε βιοαέριο. Για συνήθεις χρόνους παραμονής (π.χ. 15 ημέρες σε θερμοφιλή χώνευση) επιτυγχάνεται περίπου 85-90% του δυναμικού παραγωγής βιοαερίου.

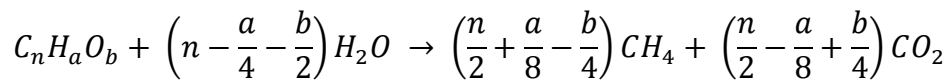
Το θεωρητικό δυναμικό παραγωγής βιοαερίου μπορεί να υπολογιστεί εάν είναι γνωστή η χημική σύσταση του υποστρώματος. Ωστόσο, πρέπει να δοθεί προσοχή στο γεγονός

ότι πολλά υποστρώματα δεν είναι πλήρως βιοδιασπάσιμα, και αυτό μπορεί να προκαλέσει υπερεκτίμηση του θεωρητικού δυναμικού.

Θεωρητικό δυναμικό βιοαερίου

Όταν οργανικό υλικό διασπάται αναερόβια, το τελικό αποτέλεσμα είναι άνθρακας στην πιο οξειδωμένη του μορφή (CO_2) και στην πιο ανοιγμένη του μορφή (CH_4), π.χ. γίνεται μεταφορά ενός ηλεκτρονίου μεταξύ των ατόμων άνθρακα. Ο λόγος μεταξύ μεθανίου και διοξειδίου του άνθρακα εξαρτάται από το βαθμό οξείδωσης του άνθρακα που βρίσκεται στο οργανικό υλικό, π.χ. όσο πιο μειωμένος ο οργανικός άνθρακας τόσο περισσότερο μεθάνιο θα παραχθεί.

Εφόσον η σύνθεση του οργανικού υλικού είναι γνωστή και όλο το υλικό μετατρέπεται σε βιοαέριο, το θεωρητικό δυναμικό βιοαερίου μπορεί να υπολογιστεί από την παρακάτω εξίσωση (Buswell):



Η εξίσωση έχει προκύψει από το ισοζύγιο άνθρακα θεωρώντας ότι όλο το οργανικό υλικό μετατράπηκε σε CH_4 και CO_2 και ότι η μόνη εξωτερική πηγή ήταν το H_2O , κάτω από αναερόβιες συνθήκες.

Η σχετική απόδοση παραγωγής μεθανίου, η οποία συνήθως εκφράζεται ως (STP) λίτρα μεθανίου ανά γραμμάριο πτητικών στερεών, μπορεί να υπολογιστεί ως εξής:

$$B_{o,th} = \frac{\left(\frac{n}{2} + \frac{a}{8} - \frac{b}{4}\right) \cdot 22.4}{12n + a + 16b} \quad \left[STP \frac{l CH_4}{g VS}\right]$$

Όπου 22.4 είναι ο όγκος ενός mole αερίου σε κανονικές συνθήκες.

Εάν η εξίσωση του Buswell συνδυαστεί με το λόγο COD/VS μια αντίστοιχη ειδική απόδοση παραγωγής μεθανίου προκύπτει βασισμένη όμως στο COD.

$$B_{o,th} = \frac{\left(\frac{n}{2} + \frac{a}{8} - \frac{b}{4}\right) \cdot 22.4}{\left(n + \frac{a}{4} - \frac{b}{2}\right) \cdot 32} \left[STP \frac{l CH_4}{g COD}\right]$$

Ο Πίνακας 11 δείχνει τη θεωρητική ειδική απόδοση παραγωγής μεθανίου και την σύνθεση βιοαερίου από διάφορα τυπικά μόρια από υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και λιπίδια (Angelidaki et al. (1999)).

Πίνακας 11 Χαρακτηριστικά και δυναμικό βιοαερίου για διάφορα οργανικά υλικά κατάλληλα προς αναερόβια χώνευση (I. Angelidaki)

Είδος Υποστρώματος	Χημική Σύσταση	COD/VS gCOD/gVS	CH ₄ STP l/gVS	CH ₄ STP l/gCOD	CH ₄ (%)
Υδατάνθρακες	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	1.19	0.415	0.35	50
Πρωτεΐνες*	C ₅ H ₇ NO ₂	1.42	0.496	0.35	50
Λιπίδια	C ₅₇ H ₁₀₄ O ₆	2.90	1.014	0.35	70
Αιθανόλη	C ₂ H ₆ O	2.09	0.730	0.35	75
Οξικό οξύ	C ₂ H ₄ O ₂	1.07	0.373	0.35	50
Προπιονικό οξύ	C ₃ H ₆ O ₂	1.51	0.530	0.35	58

*Το άζωτο μετατρέπεται σε NH₃

3.1.6 Αλκοολική Ζύμωση

Η αλκοολική ζύμωση είναι μία βιολογική διεργασία κατά την οποία απλά σάκχαρα όπως η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η σακχαρόζη μετατρέπονται σε ενέργεια από τα κύτταρα των μικροοργανισμών και ταυτόχρονα παράγουν αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα ως μεταβολικά απόβλητα. Επειδή οι μύκητες επιτελούν αυτή τη διαδικασία απουσία οξυγόνου, η αλκοολική ζύμωση θεωρείται αναερόβια. Η αλκοολική ζύμωση λαμβάνει χώρα κατά την παραγωγή αλκοολούχων ποτών, στην παρασκευή ψωμιού αλλά και στην παραγωγή αιθανόλης για καύσιμο.

Η αιθανόλη θεωρείται εδώ και χρόνια ως μια κατάλληλη εναλλακτική έναντι των ορυκτών καυσίμων είτε αυτούσια σε ειδικά διαμορφωμένες μηχανές είτε ως πρόσθετο (μέχρι 30%) σε μείγμα καυσίμου χωρίς να απαιτούνται τροποποιήσεις στις μηχανές των οχημάτων. Οι σακχαρούχες ή αμυλούχες πρώτες ύλες όπως είναι τα σακχαρότευτλα και ή τα σιτηρά είναι σήμερα οι βασικές πηγές για την παραγωγή αιθανόλης. Η Τρίτη ομάδα είναι τα λιγνοκυτταρινικά υλικά τα οποία αποτελούν τη πιο βιώσιμη επιλογή για την παραγωγή αιθανόλης. Τα λιγνοκυτταρινικά απόβλητα όπως είναι τα υπολείμματα από γεωργικές καλλιέργειες ή από τη βιομηχανία ξύλου είναι η πιο άφθονη ανανεώσιμη πηγή βιομάζας παγκοσμίως (Lin and Tanaka, 2006).



Η παραγωγή αιθανόλης από λιγνοκυτταρινικά υλικά αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια: διάσπαση της λιγνοκυτταρινικής δομής σε ένα ζυμώσιμο υποστρώμα, ζύμωση του υποστρώματος και απόσταξη του τελικού διαλύματος για να διαχωριστεί η αιθανόλη (Olsson and Hahn 1996). Υπάρχουν δύο βασικά προβλήματα τα οποία περιορίζουν τη μετατροπή των λιγνοκυτταρινικών υποστρωμάτων σε αιθανόλη.

Πρώτον, τα προεπεξεργασμένα υποστρώματα περιέχουν όχι μόνο ζυμώσιμα σάκχαρα αλλά και ένα μεγάλο εύρος άλλων ουσιών που έχουν αναχαιτιστική δράση στους μικροοργανισμούς (Palmqvist and Hahn 2000). Δεύτερον, η ημικυτταρίνη περιέχει τόσο εξόζες όσο και πεντόζες. Οι εξόζες μπορούν να ζυμωθούν εύκολα από το μύκητα *S. Cerevisiae* με γνωστές τεχνικές. Ωστόσο, αυτός ο μικροοργανισμός δεν μπορεί να ζυμώσει πεντόζες. Η παραγωγή αιθανόλης από λιγνοκυτταρινικά υποστρώματα απαιτεί μικροοργανισμούς με υψηλή παραγωγικότητα από όλα τα σάκχαρα που υπάρχουν στο υπόστρωμα καθώς επίσης και υψηλή αντοχή σε αναχαιτιστικές ουσίες, ώστε να είναι οικονομικά εφικτή (Olsson and Hahn 1996).

Πρώτες ύλες για την παραγωγή αιθανόλης

Τα σάκχαρα για την παραγωγή βιοαιθανόλης μπορούν να αποκτηθούν από διάφορες πηγές, συμπεριλαμβανομένων γεωργικών καλλιεργειών και λιγνοκυτταρινικών υλικών (π.χ. γεωργικά υπολείμματα, πριονίδι). Πάνω από το 90% της παγκόσμιας παραγωγής αιθανόλης προέρχεται από γεωργικές καλλιέργειες. Το ζαχαροκάλαμο (το οποίο περιέχει κυρίως σακχαρόζη) είναι η πρώτη ύλη που προτιμάται στη Βραζιλία, στην Ινδία και στη Νότια Αφρική, ενώ το καλαμπόκι (το οποίο περιέχει κυρίως άμυλο) προτιμάται στις ΗΠΑ και τα σακχαρότευτλα στη Γαλλία (Zaldivar et al. 2001).

Σε αντίθεση με άλλες καλλιέργειες, η χρήση λιγνοκυτταρινικών πρώτων υλών παρουσιάζει ένα μειονέκτημα εξ' αιτίας της περίπλοκης δομής τους, η οποία είναι δύσκολο να διασπαστεί. Τα λιγνοκυτταρινικά υλικά τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή αιθανόλης είναι το ξύλο, το πριονίδι, τα γεωργικά υπολείμματα, και τα αστικά στερεά λύματα. Η χημική σύσταση της πρώτης ύλης εξαρτάται από την πηγή της. Τα λιγνοκυτταρινικά υλικά αποτελούνται κυρίως από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη.

Η *κυτταρίνη* είναι ένα γραμμικό πολυμερές από μονάδες β-D-γλυκόζης. Είναι το πιο άφθονο πολυμερές στη γη και η δομή του είναι άκαμπτη με αποτέλεσμα να χρειάζεται σκληρή επεξεργασία για να διασπαστεί.

Η ημικυτταρίνη αποτελείται από γραμμικά και κλαδωτά πολυμερή όπως η L-αραβινόζη, η D-γαλακτόζη, η D-γλυκόζη, η D-μαννόζη και η D-ξυλόζη. Μεθιλομάδες ή ακετυλομάδες είναι συνδεδεμένες στην αλυσίδα άνθρακα σε διάφορους βαθμούς. Η δομή της δεν είναι κρυσταλλική και έτσι είναι πιο εύκολο να υδρολυθεί (Olsson and Hahn 1996).

Η λιγνίνη είναι το πιο άφθονο αρωματικό πολυμερές στη φύση. Είναι ένα μακρομόριο με φαινολικό χαρακτήρα, και το προϊόν αφυδάτωσης τριών μονομερών αλκοολών (λιγνόλες).

Η λιγνοκυτταρίνη χρειάζεται να περάσει ειδική επεξεργασία για να απελευθερώσει τα μονομερή σάκχαρα που περιέχει και έτσι να μπορέσει να ζυμωθεί. Η λιγνίνη δεν μπορεί να μετατραπεί σε αιθανόλη (Zaldivar et al. 2001; Sommer 1998), και έτσι τόσο η κυτταρίνη όσο και η ημικυτταρίνη πρέπει να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή αιθανόλης. Για να επιτευχθεί μέγιστη απόδοση παραγωγής αιθανόλης πρέπει να ζυμωθούν όλα τα μονοσακχαρίδια.

Όπως όλα τα φυτά, έτσι και τα άλγη έχουν κυτταρικά τοιχώματα. Τα κυτταρικά τοιχώματα των αλγών περιέχουν είτε πολυσακχαρίδια, όπως η κυτταρίνη, είτε μια ποικιλία γλυκοπρωτεϊνών είτε και τα δύο. Στην παρούσα εργασία διερευνάται το δυναμικό παραγωγής αιθανόλης από πράσινα μακροάλλη πλούσια σε υδατάνθρακες. Τα πράσινα μακροάλλη περιέχουν κυρίως κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και μικρές ποσότητες πηκτίνης, ενός δομικού πολυσακχαρίτη με πηκτικές ιδιότητες. Η ύπαρξη λιγνίνης σε άλγη δεν έχει επιβεβαιωθεί (Inderwildi, King 2009).

Μικροοργανισμοί

Υπάρχει μια έλλειψη ανθεκτικών μικροοργανισμών οι οποίοι να μπορούν να ζυμώσουν όλα τα σάκχαρα αποδοτικά (υψηλός ρυθμός παραγωγής και υψηλή απόδοση παραγωγής), τόσο τις εξόζες όσο και τις πεντόζες, οι οποίες απελευθερώνονται κατά

την προεπεξεργασία και την υδρόλυση. Όσον αφορά στη βιομηχανική παραγωγή αιθανόλης, ο ιδανικός μικροοργανισμός θα πρέπει να έχει (Talebnia et al. 2010):

- Ευρύ φάσμα υποστρωμάτων
- Υψηλή παραγωγικότητα αιθανόλης
- Αντοχή σε αναχαιτιστικούς παράγοντες και σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης
- Κυτταρινολυτικές ιδιότητες
- Δυνατότητα ζύμωσης σε υψηλές θερμοκρασίες.

Αρκετοί μικροοργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων και μυκήτων, έχει αναφερθεί ότι μπορούν να ζυμώσουν λιγνοκυτταρινικά υλικά και να παράξουν αιθανόλη. Ανάμεσα σε αυτά, τα *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, *S. cerevisiae* και *Pichia stipitis* είναι τα πιο σχετικά (Claassen et al. 1999; Talebnia et al. 2010; Girio et al. 2010). Αυτοί οι μικροοργανισμοί έχουν διαφορετικά φυσικά χαρακτηριστικά τα οποία μπορούν να θεωρηθούν είτε σαν πλεονεκτήματα είτε σαν μειονεκτήματα.

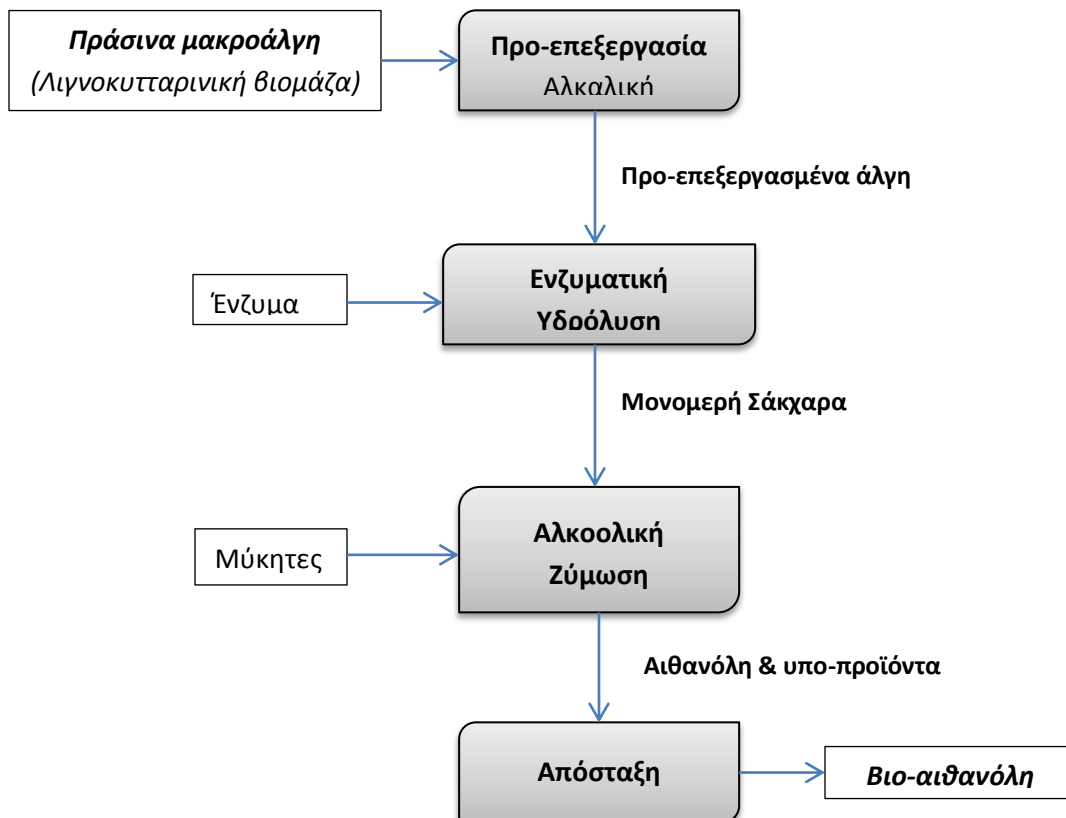
Ο μύκητας *S. cerevisiae* είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος μικροοργανισμός σε βιομηχανικές ζυμώσεις. Έως τώρα η παραγωγή αιθανόλης από τον *S. cerevisiae* δεν μπορεί να συγκριθεί με άλλους μύκητες ή βακτήρια (Claassen et al. 1999; Talebnia et al. 2010). Θεωρείται γενικά ως ασφαλής επιλογή και μπορεί να ζυμώσει αποδοτικά απλές εξόζες (π.χ. D-γλυκόζη, D-μαννόζη και D-γαλοκτόζη), φτάνοντας συγκεντρώσεις αιθανόλης στο διάλυμα μέχρι και 20% (v/v). Επιπλέον, ο μύκητας *S. Cerevisiae* έχει σχετικά καλή αντοχή απέναντι σε αναχαιτιστές που προέρχονται από λιγνοκυτταρινικά υποστρώματα και στην οσμωτική πίεση. Επίσης ο ρυθμός παραγωγής αιθανόλης δεν μειώνεται σημαντικά σε συγκεντρώσεις αιθανόλης πάνω από 10% (v/v). Το βασικό του μειονέκτημα είναι η έλλειψη της φυσικής του ικανότητας να χρησιμοποιεί πεντόζες (Girio et al. 2010). Για να υπερνικηθεί αυτό το εμπόδιο, έχουν αναπτυχθεί γενετικά τροποποιημένοι *S. Cerevisiae* ικανοί να ζυμώσουν τόσο εξόζες όσο και πεντόζες (Karthumaa et al. 2007). Ωστόσο μερικά γένη *S. Cerevisiae* παρουσίασαν χαμηλή

παραγωγικότητα όσον αφορά στη μετατροπή ξυλόζης σε αιθανόλη (Watanabe et al. 2007).

Τεχνολογία παραγωγής αιθανόλης

Η μετατροπή λιγνοκυτταρινικού υλικού σε αιθανόλη αποτελείται από τέσσερις βασικές διαδικασίες:

- Προ-επεξεργασία
- Υδρόλυση
- Ζύμωση
- Διαχωρισμός/Απόσταξη



Εικόνα 19 Μετατροπή λιγνοκυτταρινικής βιομάζας σε αιθανόλη

Μέθοδοι υδρόλυσης και ζύμωσης

Η ενζυματική υδρόλυση και η διαδικασία της ζύμωσης μπορούν να πραγματοποιηθούν χρησιμοποιώντας διαφορετικές στρατηγικές:

- Ξεχωριστή υδρόλυση και ζύμωση
- Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση
- Απευθείας μικροβιακή μετατροπή

Στην ξεχωριστή υδρόλυση και ζύμωση οι διαδικασίες λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικά δοχεία κάτω από βέλτιστες συνθήκες, ωστόσο, αναχαίτιση της δραστηριότητας των ενζύμων λόγω τελικού προϊόντος και προβλήματα επιμολύνσεων έχουν σχετιστεί με αυτή μέθοδο. Για να αποφευχθούν αυτά τα προβλήματα αναπτύχθηκε η μέθοδος της ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης σε ένα δοχείο. Τα σάκχαρα που απελευθερώνονται κατά την υδρόλυση ζυμώνονται άμεσα παράγοντας αιθανόλη. Αυτή η προσέγγιση δίνει υψηλότερη απόδοση παραγωγής αιθανόλης, μειώνει τον κίνδυνο επιμολύνσεων, απαιτεί μικρότερο χρόνο ζύμωσης και χρειάζεται λιγότερα ένζυμα επειδή δεν υπάρχει τόσο μεγάλη αναχαίτιση από το τελικό προϊόν (Lin and Tanaka 2006; Zaldivar et al. 2001; Chandel et al. 2007).

Ωστόσο κάποια μειονεκτήματα προκύπτουν:

- Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί οι οποίοι μετατρέπουν κυτταρινικά υλικά δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν ξυλόζη
- Η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση έχει χαμηλούς ρυθμούς υδρόλυσης και έτσι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανικό επίπεδο
- Είναι απαραίτητο τα ένζυμα και οι μύκητες να είναι συμβατοί όσον αφορά στο pH και στην θερμοκρασία

Οι περισσότεροι μύκητες έχουν μία βέλτιστη θερμοκρασία γύρω στους 30–35 °C ενώ τα υδρολυτικά ένζυμα παρουσιάζουν βέλτιστη δραστηριότητα στους 50 °C (Kadar et al., 2004). Παρά τα προαναφερθέντα προβλήματα η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και

ζύμωση προτιμάται λόγω του μικρότερου κόστους και του μικρότερου χρόνου επεξεργασίας (Chandel et al. 2007).

Η απευθείας μικροβιακή μετατροπή είναι μια μέθοδος μετατροπής κυτταρινικής βιομάζας σε αιθανόλη στην οποία τόσο η αιθανόλη όσο και τα απαραίτητα ένζυμα παράγονται από έναν μικροοργανισμό. Αυτή η προσέγγιση δεν θεωρείται σαν βιώσιμη εναλλακτική. Αυτό συμβαίνει εξ' αιτίας του γεγονότος ότι δεν υπάρχει ένας ανθεκτικός μικροοργανισμός ο οποίος να παράγει τα κατάλληλα ένζυμα και να έχει υψηλή απόδοση παραγωγή αιθανόλης ταυτόχρονα (Chandel et al. 2007).

Προεπεξεργασία

Τα λιγνοκυτταρινικά υλικά δεν διασπώνται εύκολα από τους μικροοργανισμούς. Ένα στάδιο προεπεξεργασίας είναι απαραίτητο για να διαχωριστεί η λιγνίνη από την κυτταρίνη ώστε να αυξηθεί η ταχύτητα και η απόδοση της υδρόλυσης διαφόρων πολυσακχαριδίων σε μονομερή σάκχαρα (Sommer 1998; Chandel et al. 2007). Διάφορες μέθοδοι προεπεξεργασίας έχουν αναπτυχθεί και εφαρμόσκει για την λιγνοκυτταρινική βιομάζα. Η συνολική αποδοτικότητα της μεθόδου προεπεξεργασίας σχετίζεται με την καλή ισορροπία μεταξύ χαμηλής δημιουργίας αναχαιτιστών και καλή διάσπαση του υποστρώματος. Οι προεπεξεργασίες κατηγοριοποιούνται σε φυσικές, φυσικο-χημικές, χημικές και βιολογικές. Οι εφαρμοσμένες μέθοδοι συνήθως χρησιμοποιούν ένα συνδυασμό διαφορετικών διαδικασιών, όπως μηχανική, θερμική και χημική ώστε να επιτύχουν υψηλή απελευθέρωση σακχάρων, χαμηλή παραγωγή τοξικών ουσιών, και χαμηλή κατανάλωση ενέργειας. Όπως συνοψίζεται από τον Lynd (1996), υπάρχουν αρκετές επιλογές προεπεξεργασίας: αλκαλική, με έκρηξη ατμού, υγρή οξειδωση, με οργανικούς διαλύτες και με ζεστό νερό.

Η προεπεξεργασία παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή αιθανόλης από λιγνοκυτταρινικά υλικά. Ο σκοπός είναι να αυξηθεί η επιφάνεια και το πορώδες του υποστρώματος, και να διασπαστεί η κρυσταλλική δομή του κυτταρινικού υλικού. Έως

τώρα δεν έχει βρεθεί μία και μοναδική μέθοδος προεπεξεργασίας που να μπορεί να επιτύχει όλα τα παραπάνω, και έτσι χρησιμοποιούνται συνδυασμοί. Ποικίλα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα σχετίζονται με κάθε μέθοδο προεπεξεργασίας. Οι μικρότεροι χρόνοι παραμονής (επιθυμητό) συνήθως συνοδεύονται από υψηλότερες θερμοκρασίες (ανεπιθύμητο). Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου προεπεξεργασίας έγκειται σε κάποιους τεχνολογικούς παράγοντες όπως η ισορροπία ενέργειας, η υψηλή οργανική φόρτιση και η ελαχιστοποίηση της χρήσης χημικών αλλά και σε κάποιους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Εφόσον η προεπεξεργασία έχει τεράστια σημασία για την απόδοση και την οικονομικότητα των επακόλουθων σταδίων, η τελική απόφαση πρέπει να παρθεί με βάση την συνολική διαδικασία.

Παρακάτω, γίνεται μία ανασκόπηση των μεθόδων προεπεξεργασίας που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία.

Φυσική

Το πρώτο βήμα στη χρήση πρώτης ύλης για την παραγωγή αιθανόλης είναι η μείωση του μεγέθους μέσω άλεσης το οποίο βελτιώνει την απόδοση των ακόλουθων διαδικασιών. Ωστόσο, η χρήση πολύ μικρών σωματιδίων μπορεί να μην είναι επιθυμητή εξ' αιτίας της υψηλής κατανάλωσης ενέργειας κατά τη φάση του αλέσματος. Το αρχικό και το τελικό μέγεθος των σωματιδίων, το περιεχόμενο υγρασίας και οι ιδιότητες του υλικού είναι ανάμεσα στις μεταβλητές που επηρεάζουν τόσο την κατανάλωση ενέργειας όσο και την αποδοτικότητα των επόμενων βημάτων. Μικρότερο μέγεθος σωματιδίων και υψηλότερο περιεχόμενο υγρασίας οδηγούν σε υψηλότερη κατανάλωση ενέργειας.

Χημική

Η χημική προεπεξεργασία χρησιμοποιεί διάφορα χημικά όπως οξέα, βάσεις και οξειδωτικούς παράγοντες π.χ. υπεροξείδια και όζον. Ανάμεσα σε αυτές τις μεθόδους, η προεπεξεργασία με αραιό οξύ (H_2SO_4) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος. Ανάλογα με τον τύπο των χημικών που χρησιμοποιούνται, η προεπεξεργασία μπορεί να έχει διαφορετική επιρροή στα λιγνοκυτταρινικά δομικά στοιχεία. Η αλκαλική προεπεξεργασία, η οζονόλυση, η υγρή οξείδωση και η χρήση υπεροξειδίων είναι πιο αποτελεσματικές για την αφαίρεση λιγνίνης ενώ η προεπεξεργασία με αραιό οξύ είναι πιο αποδοτική για τη διάλυση της ημικυτταρίνης (Galbe and Zacchi, 2002; Sanchez and Cardona, 2008; Tomas-Pejo et al., 2008).

Αλκαλική

Η αλκαλική επεξεργασία βασίζεται στη χρήση αραιωμένων βάσεων για τη διάσπαση λιγνοκυτταρινικών υλικών. Τα υδροξείδια του νατρίου, του καλίου, του ασβεστίου και του αμμωνίου είναι κατάλληλες βάσεις, ενώ το υδροξείδιο του νατρίου είναι αυτό που έχει μελετηθεί περισσότερο (Kumar et al., 2009). Η αλκαλική προεπεξεργασία χρησιμοποιεί χαμηλότερες θερμοκρασίες και πιέσεις από άλλες τεχνολογίες προεπεξεργασίας (Mosier et al., 2005). Η αποδοτικότητα της μεθόδου εξαρτάται από το περιεχόμενο λιγνίνης της βιομάζας, και έτσι είναι κατάλληλη για γεωργικά υπολείμματα όπως το άχυρο (Sanchez and Cardona, 2008; Sun and Cheng, 2002). Η αλκαλική προεπεξεργασία μπορεί να βελτιώσει πολύ τη διάσπαση της κυτταρίνης και η καταστροφή των σακχάρων είναι μικρότερη από ότι στην όξινη προεπεξεργασία, αλλά η διαδικασία παρεμποδίζεται λόγω του υψηλού κόστους των βάσεων.

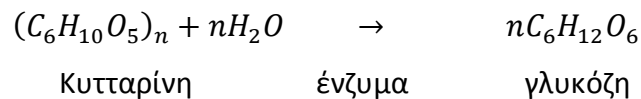
Υδρόλυση

Η μέθοδοι υδρόλυσης που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι η όξινη και η ενζυματική. Υπάρχουν δύο τύποι όξινης υδρόλυσης: η υδρόλυση με αραιό οξύ (η οποία πραγματοποιείται σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης και ο χρόνος αντίδρασης είναι στο εύρος των δευτερολέπτων ή λεπτών) και η υδρόλυση με οξύ (η

οποία εκτελείται σε χαμηλές θερμοκρασίες, υψηλές συγκεντρώσεις θειικού οξέως και χαμηλές πιέσεις και ο χρόνος αντίδρασης είναι μεγαλύτερος από ότι στη μέθοδο με αραιό οξύ).

Η υδρόλυση με τα κατάλληλα ένζυμα είναι η πιο αποδοτική μέθοδος για την απελευθέρωση απλών σακχάρων από κυτταρινικά υποστρώματα. Η υδρόλυση της κυτταρίνης καταλύεται από ένα είδος ενζύμων που ονομάζονται κυτταρινάσες. Αυτά τα ένζυμα μπορούν να παραχθούν από μύκητες όπως οι *Trichoderma reesei* και *A.niger* και από βακτήρια όπως το *Clostridium cellulovorans* (Arai et al., 2006). Η έρευνα για εμπορική παραγωγή κυτταρινάσης έχει επικεντρωθεί στους μύκητες αφού η πλειοψηφία των σχετικών βακτηρίων έχει πολύ μικρούς ρυθμούς ανάπτυξης. Η ενζυματική υδρόλυση μπορεί να επηρεαστεί από το υπόστρωμα, από τη συγκέντρωση των τελικών προϊόντων, την δραστηριότητα των ενζύμων και τις συνθήκες αντίδρασης. Επιπλέον, η προεπεξεργασία των κυτταρινικών υλικών και οι συνθήκες υδρόλυσης όπως το pH και η θερμοκρασία είναι ανάμεσα στους παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυματική υδρόλυση. Τα περισσότερα ένζυμα δείχνουν βέλτιστη δραστηριότητα σε θερμοκρασία και pH στο εύρος of 45–55 °C και 4–5, αντίστοιχα (Galbe and Zacchi, 2002).

Η αντίδραση της ενζυματικής υδρόλυσης, σακχαροποίησης, μπορεί να απλοποιηθεί ως εξής:



Ζύμωση

Η εκροή η οποία περιέχει απλά σάκχαρα σε διασπάσιμη μορφή η οποία αποκτάται μετά από την υδρόλυση χρησιμοποιείται για αλκοολική ζύμωση. Αυτό το βήμα μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με διακοπτόμενη είτε με συνεχή τροφοδοσία. Η πιο

κατάλληλη επιλογή εξαρτάται από τις κινητικές ιδιότητες των μικροοργανισμών και το είδος του λιγνοκυτταρινικού υποστρώματος αλλά και από οικονομικά ζητήματα (Chandel et al. 2007).

Ζύμωση με διακοπτόμενη τροφοδοσία

Στις μέρες μας, η ζύμωση με διακοπτόμενη τροφοδοσία χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά στην βιομηχανία παραγωγής αιθανόλης. Σε αυτή τη μέθοδο, υπάρχει υψηλή αρχική συγκέντρωση υποστρώματος και υψηλή συγκέντρωση τελικού προϊόντος (Olsson and Hahn 1996). Αυτή η μέθοδος ζύμωσης μειονεκτεί σε θερμοφιλες συνθήκες εξ 'αιτίας της χαμηλής ανοχής σε υπόστρωμα και συγκέντρωση αιθανόλης (Sommer 1998). Η ζύμωση με διακοπτόμενη τροφοδοσία χαρακτηρίζεται από χαμηλή παραγωγικότητα, ευέλικτη λειτουργία, εύκολο έλεγχο της διαδικασίας και από έντονη εργασία (Chandel et al. 2007).

Η στοιχειομετρική αντίδραση της μετατροπής γλυκόζης σε αιθανόλη είναι:



Διαχωρισμός-Απόσταξη

Η ανάκτηση της αιθανόλης επιτυγχάνεται συνήθως με απόσταξη. Η αιθανολογόνια διαδικασία επιτρέπει την απομάκρυνση και την ανάκτηση της αιθανόλης εφαρμόζοντας ήπιο κενό αέρος, το οποίο διευκολύνει τη συνεχή απόσταξη σε αντίθεση με την παραδοσιακή απόσταξη (Taylor et al. 2009). Για να μειωθεί η ενεργειακή κατανάλωση κατά το στάδιο της απόσταξης και να είναι πιο οικονομική η όλη διαδικασία, η συγκέντρωση της αιθανόλης στο τελικό διάλυμα θα πρέπει να είναι πάνω από 5% (v/v) (Georgieva et al. 2007).

3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.2.1 Υποθέσεις

Οι υποθέσεις οι οποίες έγιναν σε αυτό το κεφάλαιο συνοψίζονται παρακάτω:

1. Υψηλές συγκεντρώσεις θαλασσινού αλατιού θεωρείται ότι αναχαιτίζουν την παραγωγή βιοαερίου.
2. Το μέγιστο δυνητικό παραγωγής βιοαερίου επιτυγχάνεται όταν οι αντιδραστήρες ελέγχου φτάσουν την θεωρητική παραγωγή τους.
3. Η φυσική προ-επεξεργασία (κόψιμο, άλεση) των αλγών διευκολύνει την ενζυματική και μικροβιακή δράση.
4. Η ενζυματική υδρόλυση απελευθερώνει μονομερή ζυμώσιμα σάκχαρα.
5. Ο μύκητας *S. cerevisiae* επιτελεί ζύμωση της γλυκόζης με υψηλή παραγωγή αιθανόλης.

3.2.2 Αντικείμενο και στόχοι

Οι στόχοι αυτού του κεφαλαίου συμπεριλαμβάνουν την ποσοτικοποίηση του δυνητικού παραγωγής βιοαερίου και βιοαιθανόλης από τα πράσινα μακροάλγη *Ulva lactuca* και *Ulvaria fusca*. Επιπλέον, μελετάται η πιθανή αναχαιτίση της μεθανογένεσης, από το αλάτι που περιέχεται στο θαλασσινό νερό. Ως επιπλέον στόχος θεωρείται ο προσδιορισμός της επίδρασης της χημικής προ-επεξεργασίας στην παραγωγή αιθανόλης από τα άλγη.

3.2.3 Υλικά και Μέθοδοι

Σε αυτό το εδάφιο, περιγράφονται τα υλικά και τα υποστρώματα καθώς και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση της πειραματικής δουλειάς. Πρέπει να σημειωθεί ότι όλα τα πειράματα εκτελέστηκαν σε τρία πανομοιότυπα αντίτυπα, εκτός και αν αναφέρεται διαφορετικά.

Χαρακτηρισμός των *Ulva sp.* και *Ulvaria sp.*

Για να αποκτηθούν θεωρητικές τιμές του δυναμικού παραγωγής βιοαερίου και βιοαιθανόλης από τα μελετώμενα είδη πράσινων αλγών διάφορες παράμετροι πρέπει να είναι γνωστές. Είναι πολύ σημαντικό να υπάρχει μια εκτίμηση της χημικής σύστασης, της χημικής απαίτησης οξυγόνου για την οξείδωση του οργανικού φορτίου καθώς και το περιεχόμενο και ολικά και πτητικά στερεά πριν από τον σχεδιασμό των πειραμάτων.

Τα δεδομένα στον πίνακα 12 παρουσιάζουν μία εκτίμηση του περιεχομένου σε πρωτεΐνες, λίπη, υδατάνθρακες και τέφρα στα είδη *Ulva sp.* και *Ulvaria sp.* (Márcia de Pádua et al. 2004).

Πίνακας 12 Χημική σύσταση των *Ulva lactuca* και *Ulvaria fusca*

	<i>Ulva sp.</i>	<i>Ulvaria sp.</i>
% ξυρό βάρος	15	15
% πρωτεΐνες (επί ξ.β.)	13-18	6-10
% λίπη (επί ξ.β.)	0.3-2	0.9-3.3
% υδατάνθρακες (επί ξ.β.)	53-65	47-72
Ulvan	8-29	
- Ξυλόζη (% του ulvan)C5	3.5	
- Ραμνόζη (% του ulvan) 6- <i>deoxy-hexose</i>	22.6	
- Γλυκορονικό Οξύ (% του ulvan)*C6	17.5	
- Ιντουρονικό Οξύ (% του ulvan) C6	4.7	
- Γαλακτόζη (% του ulvan)C6	3.9	
Άμυλο	0.9-4.5	
MJ/kg	15	
Τέφρα (% επί ξ.β.)	12-20	17-31

Μπορεί να παρατηρηθεί ότι και τα δύο είδη έχουν παρόμοια σύσταση. Περιέχουν υψηλό ποσοστό υδατανθράκων και πολύ χαμηλή ποσότητα λιπών.

Πειραματικός προσδιορισμός COD

Η χημική απαίτηση οξυγόνου (COD) χρησιμοποιείται ως μέτρηση του ισοδύναμου οξυγόνου της οργανικής ύλης ενός δείγματος που επιδέχεται οξείδωση από ένα δυνατό χημικό οξειδωτικό παράγοντα. Κατά την οξείδωση 90-95% της οργανικής ύλης οξειδώνεται, ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται.

Το οξειδωτικό που προτιμάται για τον προσδιορισμό του COD είναι το διχρώμιο του καλίου, εξ' αιτίας της ανώτερης οξειδωτικής του δυνατότητας, του βαθμού δυνατότητας εφαρμογής σε ευρεία ποικιλία δειγμάτων και της ευκολίας χειρισμού. Οι διαφορές μέθοδοι προσδιορισμού του COD έχουν αναπτυχθεί για αναλύσεις νερού και υγρών αποβλήτων. Ωστόσο, όταν αναλύονται δείγματα όπως είναι η κοπριά παρεμβολές από άλλους παράγοντες μπορούν να προκύψουν. Επιπλέον, τα δείγματα

πρέπει να είναι καλά ομογενοποιημένα και αραιωμένα, διότι τα γεωργικά και τα οικιακά λύματα περιέχουν πολύ υψηλότερο οργανικό φορτίο από τα συνήθη υγρά λύματα.



Εικόνα 20 Συσκευή χώνευσης COD

Πειραματικός προσδιορισμός TS/VS

Σύμφωνα με τον πίνακα 19 η θεωρητική παραγωγή του μεθανίου μπορεί να υπολογιστεί εφόσον η σύσταση των δειγμάτων είναι γνωστή και η συγκέντρωση των πτητικών στερεών έχει προσδιοριστεί. Φύλλα από *U.lactuca* και *U.fusca* κόπηκαν σε μικρά σωματίδια <2mm, και 3 δείγματα από το κάθε είδος μεταφέρθηκαν σε φούρνο ξήρανσης (Mettler) στους 105°C για 24 ώρες. Μετά την ξήρανση των δειγμάτων ακολούθησε η μέτρηση τους και μετά μεταφέρθηκαν σε κλίβανο στους 550°C για 6 ώρες (Εικόνα 21). Τα στερεά που χάθηκαν μετά την ανάφλεξη έδωσαν μία εκτίμηση του οργανικού υλικού που υπήρχε στα δείγματα. Τα δείγματα μετριούνταν σε γραμμάρια χρησιμοποιώντας ένα αναλυτικό ζυγό ακριβείας Sartorius (Model CP224S, BIE & BERNTSEN AS) με αναγνωσιμότητα 0.1mg.



Εικόνα 21 Φούρνος ξήρανσης 103°C και κλίβανος 550°C για τον προσδιορισμό των TS/VS.

Προσδιορισμός περιεχομένου CH₄

Αέρια Χρωματογραφία

Το περιεχόμενο μεθανίου στο υπερκείμενο αέριο των αντιδραστηρίων της αναερόβιας χώνευσης προσδιορίζεται με ανάλυση αέριας χρωματογραφίας. Η αέρια χρωματογραφία (GC) είναι μια αναλυτική τεχνική για την ανάλυση της συγκέντρωσης χημικών ενώσεων συγκεκριμένων ρευστών που μπορούν να εξατμιστούν κατά την αποσύνθεσή τους. Σε μια ανάλυση GC, ένας γνωστός όγκος ρευστού εμβολιάζεται στην είσοδο (κεφαλή) της συσκευής ενός μεταλλικού σωλήνα (κολώνα) χρησιμοποιώντας μια μικροσύριγγα. Καθώς το φέρον αέριο (μη ενεργό N₂) παρασύρει τα μόρια του αερίου μέσα στην κολώνα, αυτά προσροφώνται από ένα μικροσκοπικό στρώμα πολυμερούς το οποίο βρίσκεται στα τείχη της κολώνας (στατική φάση). Ο ρυθμός με τον οποίο τα μόρια παρέρχονται από την κολώνα εξαρτάται από τη δύναμη της αντίδρασης, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από τη φύση των μορίων και των υλικών. Καθώς κάθε είδος μορίου έχει διαφορετικό ρυθμό διέλευσης και προσρόφησης, τα διάφορα συστατικά του ρευστού διαχωρίζονται καθώς διέρχονται

από την κολώνα και φτάνουν στο τέλος σε διαφορετικούς χρόνους (χρόνοι παραμονής). Άλλες παράμετροι που επηρεάζουν τους χρόνους παραμονής είναι η παροχή του φέροντος αερίου και η θερμοκρασία. Ένας ανιχνευτής χρησιμοποιείται στην έξοδο από την κολώνα για τον έλεγχο της εκροής, και έτσι ο χρόνος στον οποίο κάθε συστατικό βγήκε και η ποσότητα αυτού μπορούν να προσδιοριστούν. Γενικά, οι ουσίες αναγνωρίζονται από τη σειρά με την οποία βγαίνουν από την κολώνα και από το χρόνο παραμονής.



Εικόνα 22 Αέριος χρωματογράφος Shimadzu

Εξοπλισμός-Λογισμικό

Ο αέριος χρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη (Shimadzu, GC-14A) (Εικόνα 22) ήταν εξοπλισμένος με ένα ανιχνευτή ιοντίζουσας φλόγας, ο οποίος είναι άριστος για την ανίχνευση μεθανίου στο άζωτο. Το φέρον αέριο (άζωτο) δεν ανιχνεύεται επειδή μόνο οργανικά υλικά όπως το μεθάνιο ιοντίζονται. Τα ιόντα δημιουργούνται με πυρόλυση των εξεταζόμενων ενώσεων χρησιμοποιώντας φλόγα

αέρα-υδρογόνου. Τα ιόντα έλκονται στην πλάκα συλλογής (ηλεκτρόδιο), και αφού χτυπήσουν δημιουργούν τάση. Τα τελικά δεδομένα τάσης φαίνονται στην εικόνα του υπολογιστή σε ένα διάγραμμα το οποίο έχει χρόνο στον οριζόντιο άξονα και τάση στον κατακόρυφο. Το λογισμικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα GC Real time analysis και GC Postrun Analysis.

Διαδικασία

Απ' ευθείας δειγματοληψία από το υπερκείμενο αέριο εκτελούνταν με σύριγγα η οποία ήταν εξοπλισμένη με σύστημα "Luar Lock". Ο όγκος του δείγματος ήταν 0.2ml. Δύο αέρια ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία καμπύλης βαθμονόμησης τα οποία περιείχαν [30% N₂, 30% CO₂, 40% CH₄] και [85% N₂, 5% CO₂, 5% CH₄, 5% H₂] αντίστοιχα. Αυτή η καμπύλη βαθμονόμησης χρησιμοποιούνταν για τον προσδιορισμό του % μεθανίου στα δείγματα.

Προσδιορισμός σακχάρων, οργανικών οξέων και αιθανόλης

Υπόστρωμα

Προ-επεξεργασμένα *Ulva lactuca* και *Ulvaria fusca* χρησιμοποιήθηκαν σαν υπόστρωμα. Τα άλγη υπέστησαν φυσική προ-επεξεργασία (άλωση) και χημική προ-επεξεργασία (αλκαλική) πριν από αυτές τις μετρήσεις.

Μικροοργανισμοί

Σε αυτή την εργασία ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε για τη ζύμωση ήταν ο μύκητας *Saccharomyces Cerevisiae* (CBS 8066)

Ο *Saccharomyces Cerevisiae* καλλιεργήθηκε στους 37°C σε κωνικές φιάλες 250ml που περιείχαν 100ml διάλλειμα καλλιέργειας το οποίο αποτελούνταν από 2.5ml διαλύματος 150g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1.5ml διαλύματος 140.5 g/l KH_2PO_4 ; 0.5 ml διαλύματος 75 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.5 ml διαλύματος 100 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 95 ml διαλύματος 50 mM κιτρικού οξέος (pH=4.8). Το διάλυμα αυτό εμπλουτίστηκε με 0.5g εκχυλίσματος μαγιάς. Το μείγμα αποστειρωνόταν στους 120°C για 20 λεπτά.

Εξοπλισμός

Τα σάκχαρα και η αιθανόλη στη βιομάζα προσδιορίζονταν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε ένα χρωματογράφο Hewlet Packard Agilent 1100 (Εικόνα 23). Τα δείγματα που συλλέγονταν , στη συνέχεια περνούσαν από φυγοκέντρηση στις 13400 rpm για 10 λεπτά σε φυγόκεντρο Eppendorf minispin. Το υπερκείμενο μεταφερόταν σε νέο δοχείο και στη συνέχεια μεταφερόταν στον καταψύκτη στους -18°C για να διασφαλιστεί η ποιότητα μέχρι την στιγμή της ανάλυσης. Πριν τη μέτρηση, τα δείγματα υφίσταντο φυγοκέντρηση άλλη μία φορά, διήθηση μέσα από φίλτρα 0.45 μm Sartorius Minisart SRP 15, και μεταφέρονταν σε γυάλινα φιαλίδια GC. Τα συστατικά διαχωρίζονταν σε μία κολώνα BioRad Aminex HPLC-78H (300 x 7.8 mm) χρησιμοποιώντας 4 mM H_2SO_4 σαν κινητή φάση με παροχή 0.6 ml/min at 64°C and pH=3. Τα σάκχαρα, τα οξέα και η αιθανόλη ανιχνεύονταν με ένα ανιχνευτή Refractive Index (RI).



Εικόνα 23 Συσκευή HPLC

Υπολογισμοί

$CH_4(\%) = (\text{εμβαδό δείγματος βιοαερίου}) / (\text{εμβαδό δείγματος ελέγχου}) * 40\%$

Απόδοση

Η απόδοση προϊόντος ανά μονάδα υποστρώματος υπολογίζεται όπως φαίνεται στην παρακάτω εξίσωση:

$$Y_p \left(\frac{mol}{mol} \right) = \frac{n_{f,p}}{n_{i,s} - n_{f,s}}$$

όπου Y_p είναι η απόδοση ($mol_{\text{product}}/mol_{\text{substrate}}$), $n_{f,p}$ είναι η τελική ποσότητα προϊόντος (mol), $n_{i,s}$ είναι η αρχική ποσότητα υποστρώματος (mol), and $n_{f,s}$ είναι η τελική ποσότητα υποστρώματος (mol).

Στατιστική ανάλυση

Στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε σε κάποιες ομάδες δεδομένων για τον προσδιορισμό του μέσου όρου, της τυπικής απόκλισης και του επιπέδου εμπιστοσύνης των πληθυσμών. Αυτές οι παράμετροι υπολογίστηκαν με βάση τις εξισώσεις [2.5],[2.6] και [2.7] αντίστοιχα:

$$\bar{X} = \sum_{i=1}^N X_i / N \quad [2.5]$$

$$SD = \sqrt{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2 / (N - 1)} \quad [2.6]$$

$$CI = t \cdot SD / \sqrt{N} \quad [2.7]$$

όπου X_i είναι η μετρούμενη τιμή, N είναι το μέγεθος του πληθυσμού, και t είναι η τιμή t-student για τον συγκεκριμένο πληθυσμό.

3.2.4 Σχεδιασμός Πειραμάτων

Δυναμικό Παραγωγής Μεθανίου

Πειράματα με διακοπτόμενη τροφοδοσία εκτελέστηκαν για τον προσδιορισμό του δυναμικού παραγωγής βιοαερίου στα δυο είδη πράσινων μακροφυκών *Ulva lactuca* και *Ulvaria fusca*. Σε σύνολο 42 φιάλες όγκου 550ml χρησιμοποιήθηκαν, οι οποίες περιείχαν χωνεμένη κοπριά χοίρων (ΧΚΧ) ως πηγή βιομάζας. Αλεσμένα άλγη αραιωμένα με απιονισμένο νερό χρησιμοποιούνταν ως υπόστρωμα. Τα δείγματα ήταν χωρισμένα σε δύο κατηγορίες για να διερευνηθεί εάν το αλάτι αναχαιτίζει την διαδικασία της αναερόβιας χώνευσης: 1) πλυμένα (τα φύλλα των αλγών ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό για να αφαιρεθεί το επιφανειακό αλάτι 2) άπλυτα (τα φύλλα των αλγών δεν ξεπλύθηκαν πριν την άλεση και αραιώση τους). Τρεις πανομοιότυπες φιάλες χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δείγμα με τα ίδια χαρακτηριστικά. Επιπλέον, τρεις πανομοιότυπες φιάλες οι οποίες περιείχαν μόνο ΧΚΧ χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του δυναμικού μόνο της ΧΚΧ, και 3 πανομοιότυπα που περιείχαν Avicel χρησιμοποιήθηκαν σαν αντιδραστήρες ελέγχου. (Το Avicel είναι μικροκρυσταλλική κυτταρίνη η οποία διασπάται εύκολα από τους μεθανογόνους μικροοργανισμούς και το δυναμικό παραγωγής βιοαερίου του είναι γνωστό).



Εικόνα 24 Αντιδραστήρες που περιέχουν ΧΚΧ ως πηγή βιομάζας και *Ulva lactuca* ως πηγή οργανικού άνθρακα.

Τρεις διαφορετικές οργανικές φορτίσεις χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δείγμα, 1g VS/l, 2g VS/l, and 4g VS/l, και στο τέλος της διαδικασίας συγκρίνονταν ώστε να αποκτηθεί ένα στατιστικά αποδεκτό αποτέλεσμα. Οι ακριβείς ποσότητες αλγών που προστέθηκαν σε κάθε φιάλη υπολογίστηκαν με βάση τη συγκέντρωση των VS του κάθε δείγματος (Πίνακας 13).

Πίνακας 13 % VS στην *Ulva lactuca* και την *Ulvaria fusca*

a/a	Sample	VS(g/g) of wet sample
1	Ulva Fresh	2.59%
2	Ulva Salt	2.50%
3	Ulvaria Fresh	3.02%
4	Ulvaria Salt	2.53%

Ο επακριβής όγκος της κάθε φιάλης ήταν 547ml από τα οποία 200ml περιείχαν τον υγρό όγκο του δείγματος και τα υπόλοιπα 347ml χρησιμοποιούνταν ως υπερκείμενος χώρος αποθήκευσης του παραγόμενου βιοαερίου. Στους παρακάτω πίνακες (14-15-16) φαίνονται οι ακριβείς ποσότητες βιομάζας, υποστρώματος και νερού που προστέθηκαν στην κάθε φιάλη.

Πίνακας 14 Απαιτούμενοι όγκοι για οργανική φόρτιση 1 gVS/L

Organic Loading = 1 g VS/L				
a/a	Sample	Wet Sample needed (g)	Water (ml)	Manure (ml)
1	Ulva Fresh	7.7220	32.28	160
2	Ulva Salt	8.0000	32.00	160
3	Ulvaria Fresh	6.6225	33.38	160
4	Ulvaria Salt	7.9051	32.09	160

Πίνακας 15 Απαιτούμενοι όγκοι για οργανικοί φόρτιση 2 gVS/L

Organic Loading = 2 g VS/L				
a/a	Sample	Wet Sample needed (g)	Water (ml)	Manure (ml)
1	Ulva Fresh	15.4440	24.56	160
2	Ulva Salt	16.0000	24.00	160
3	Ulvaria Fresh	13.2450	26.75	160
4	Ulvaria Salt	15.8103	24.19	160

Πίνακας 16 Απαιτούμενοι όγκοι για οργανική φόρτιση 4 gVS/L

Organic Loading = 4 g VS/L				
a/a	Sample	Wet Sample needed (g)	Water (ml)	Manure (ml)
1	Ulva Fresh	30.8880	9.11	160
2	Ulva Salt	32.0000	8.00	160
3	Ulvaria Fresh	26.4901	13.51	160
4	Ulvaria Salt	31.6206	8.38	160

Μετά τον εμβολιασμό, αέριο άζωτο προστέθηκε στις φιάλες ώστε να επιτευχθούν αναερόβιες συνθήκες και στη συνέχεια οι φιάλες κλείστηκαν ερμητικά με λαστιχένια αεροστεγή καπάκια. Τέλος όλες οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα κάτω από θερμοφίλες συνθήκες (56°C) για 34 ημέρες και η αναερόβια χώνευση ξεκίνησε. Συστηματικές μετρήσεις λαμβάνονταν, πιο συχνά στην αρχή της διαδικασίας και μια φορά την εβδομάδα όταν η χώνευση είχε σχεδόν ολοκληρωθεί.

Παραγωγή Αιθανόλης

Σε σύνολο 12 φιάλες χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη πειραματική διαδικασία:

- 3 φιάλες με προ-επεξεργασμένη *Ulva lactuca*
- 3 φιάλες με ανεπεξέργαστη *Ulva lactuca*
- 3 φιάλες με προ-επεξεργασμένη *Ulvaria fusca*
- 3 φιάλες με ανεπεξέργαστη *Ulvaria fusca*

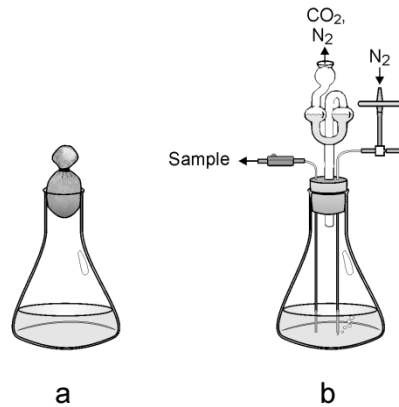
Η προεπεξεργασία χωρίστηκε σε φυσική και χημική. Αρχικά τα άλγη αλέστηκαν (σωματίδια <2mm) και 5g προστέθηκαν σε κάθε φιάλη μαζί με 95ml απιονισμένο νερό. Στην συνέχεια προστέθηκαν 0.5g Mg_2SO_4 (1 g/L) και 2.5ml H_2O_2 (1% V/V) σε κάθε φιάλη και το pH προσαρμόστηκε στο 11.5 με την προσθήκη βάσεως 0.5 M NaOH. Εν συνεχεία οι φιάλες ανακινήθηκαν σε 120rpm και παρέμειναν σε θερμοκρασία 50°C για 24 ώρες πριν από το βήμα της υδρόλυσης.

Ξεχωριστή Υδρόλυση και Ζύμωση

Η πειραματική εργασία αποτελείται από 2 διαδικασίες: την ενζυματική υδρόλυση των προεπεξεργασμένων αλγών και την αλκοολική ζύμωση για την παραγωγή αιθανόλης στη συνέχεια. Η κάθε σειρά πειραμάτων διήρκησε 3 ημέρες σε σύνολο: μια για την ενζυματική υδρόλυση και δύο για την αλκοολική ζύμωση. Κωνικές φιάλες με βαμβακερά πώματα ή λαστιχένια καπάκια εφοδιασμένα με σωληνάκια χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε διαδικασία αντίστοιχα (Εικόνα 25).

Ενζυματική Υδρόλυση

Διάλυμα 50mM κιτρικού οξέος (pH=4.8) προστέθηκε στην κάθε κωνική φιάλη. Εν συνεχεία τα ακόλουθα κυτταρινολυτικά ένζυμα προστέθηκαν σε κάθε φιάλη για την εκτέλεση της ενζυματικής υδρόλυσης: 3ml Celluclast και 1.5ml β -Glucosidase. Επίσης προστέθηκαν τα προ-επεξεργασμένα άλγη (Πίνακας 17). Οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα με συνεχή ανακίνηση στους 50°C και 120rpm για 24 ώρες. Υγρά δείγματα (2ml) λαμβάνονταν τακτικά από τις φιάλες και αποθηκεύονταν σε καταψύκτη μέχρι να πραγματοποιηθούν οι αναλύσεις.



Εικόνα 25 Πειραματική διάταξη
 α) ενζυματική υδρόλυση β) αλκοολική ζύμωση

Πίνακας 17 Πειραματικός σχεδιασμός για την ενζυματική υδρόλυση και την αλκοολική ζύμωση μόνο για την *Ulva lactuca*. Ποσότητες συστατικών που προστέθηκαν στις φιάλες

Αριθμός Φιάλης	Διαδικασία	Δείγμα (g)	Διάλυμα κίτρικού οξέος (ml)	Ένζυμα (ml)	Συνολικός όγκος(ml)	Μύκητες (ml)	Μέταλλα (ml)	Εκχύλισμα μαγιάς (g)
1-3	Ενζυματική υδρόλυση ανεπεξεργαστής <i>Ulva lactuca</i>	5	~93	2	100	-	-	-
4-6	Ενζυματική υδρόλυση προ-επεξεργασμένης <i>Ulva lactuca</i>	5	~93	2	100	-	-	-
1-3	Αλκοολική ζύμωση ανεπεξεργαστής <i>Ulva lactuca</i>	-	-	-	-	3	5	0.5
4-6	Αλκοολική ζύμωση προ-επεξεργασμένης <i>Ulva lactuca</i>	-	-	-	-	3	5	0.5

Αλκοολική Ζύμωση

Οι φιάλες μετά το πέρας της φάσης της ενζυματική υδρόλυσης αφαιρούνταν από τον επωαστήρα και γινόταν πρόσθεση των ακολούθων διαλυμάτων μετάλλων:

2.5ml διαλύματος 150g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1.5ml διαλύματος 140.5 g/l KH_2PO_4 ; 0.5 ml διαλύματος 75 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.5 ml διαλύματος 100 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και 95 ml διάλυμα κιτρικού οξέος και 0.5g of εκχύλισμα μαγιάς. Για να πραγματοποιηθεί η αλκοολική ζύμωση, 3ml από αποικία μυκήτων προστέθηκαν σε κάθε φιάλη. Πριν την επώαση, αέριο άζωτο προστέθηκε στις φιάλες για την δημιουργία αναερόβιων συνθηκών. Τα δείγμα στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα με συνεχή ανακίνηση στους 37°C και 120rpm για 48 ώρες. Υγρά δείγματα (2ml) συλλέγονταν τακτικά από κάθε φιάλη και αποθηκεύονταν σε καταψύκτη.

3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.3.1 TS/VS/COD

Ο προσδιορισμός των COD και VS είναι απλός αλλά υπόκειται σε αρκετά σφάλματα επειδή:

- Δεν υπάρχουν αντιπροσωπευτικά δείγματα
- Υπάρχει ανακρίβεια στη μέθοδο/ανάλυση

Τα δείγματα χρειάστηκε να αραιωθούν 100 φορές για τον προσδιορισμό του COD, ο οποίος είναι ιδιαίτερα ανακριβής αν το δείγμα είναι ετερογενές. Επίσης ο προσδιορισμός των VS υποεκτιμά το περιεχόμενο του δείγματος σε οργανικό υλικό, καθώς κάποια πτητικά στερεά εξατμίζονται ήδη από τη φάση προσδιορισμού των TS. Αποτελέσματα από τα πειράματα COD μπορούν να βρεθούν στο Παράρτημα Β αλλά επειδή τα δείγματα ήταν αδύνατο να ομογενοποιηθούν πλήρως λόγω της φύσης του υλικού τα αποτελέσματα δίνουν μία λανθασμένη εντύπωση του δυναμικού παραγωγής βιοαερίου.

Ο Πίνακας 18 δείχνει τις συγκεντρώσεις ολικών και πτητικών στερεών στα *Ulna sp.* και *Ulnaria sp.* για πλυμένα και άπλυτα δείγματα.

Πίνακας 18 %TS και %VS στις *Ulna lactuca* και *Ulnaria fusca*

a/a	Δείγμα	TS μέσο (%)	VS μέσο (%)
1	<i>Ulnaria fusca</i> άπλυτη	6.87%	5.57%
2			
3			
4	<i>Ulnaria fusca</i> πλυμένη	5.37%	4.87%
5			
6			
7	<i>Ulna lactuca</i> άπλυτη	4.60%	3.27%
8			
9			
10	<i>Ulna lactuca</i> πλυμένη	3.57%	2.95%
11			
12			

3.3.2 Θεωρητική Παραγωγή Μεθανίου

Σύμφωνα με τις παραπάνω τιμές και τον Πίνακα 11 (I. Angelidaki) η θεωρητική παραγωγή μεθανίου από τις *Ulna lactuca* και *Ulnaria fusca* μπορεί να υπολογιστεί όπως φαίνεται στον Πίνακα 19.

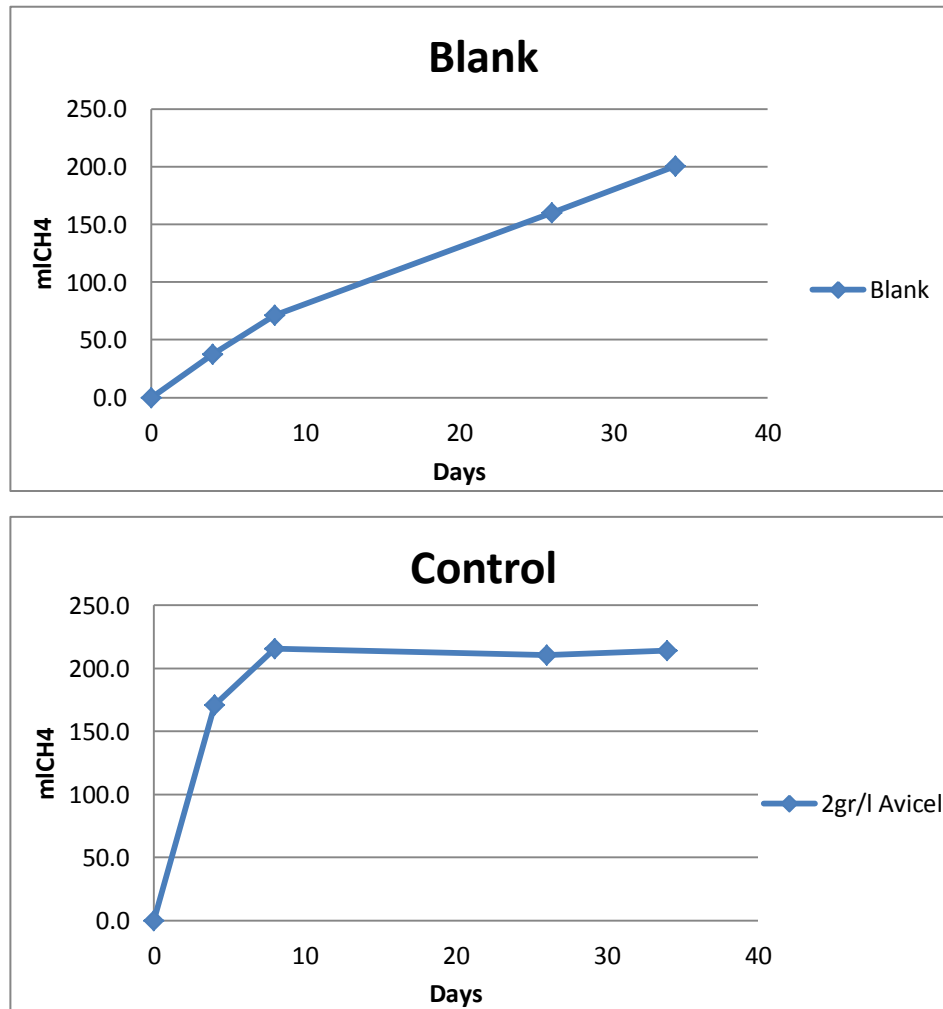
Πίνακας 19 Θεωρητική παραγωγή μεθανίου από τις *Ulna lactuca* και *Ulnaria fusca*

<i>Ulna lactuca</i>	1g VS contains :	(ICH ₄ /g VS)
Carbohydrates	77%	0.415
Lipids	1%	1.014
Proteins	22%	0.496
	1g VS produces:	0.440
<i>Ulnaria fusca</i>	1g VS contains :	(ICH ₄ /g VS)
Carbohydrates	84%	0.415
Lipids	3%	1.014
Proteins	14%	0.496
	1g VS produces:	0.442

3.3.3 Πραγματική Παραγωγή Μεθανίου

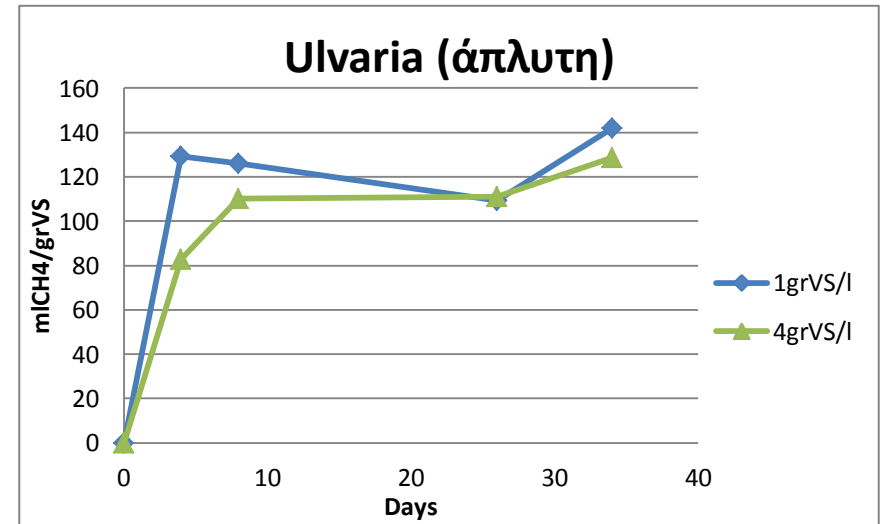
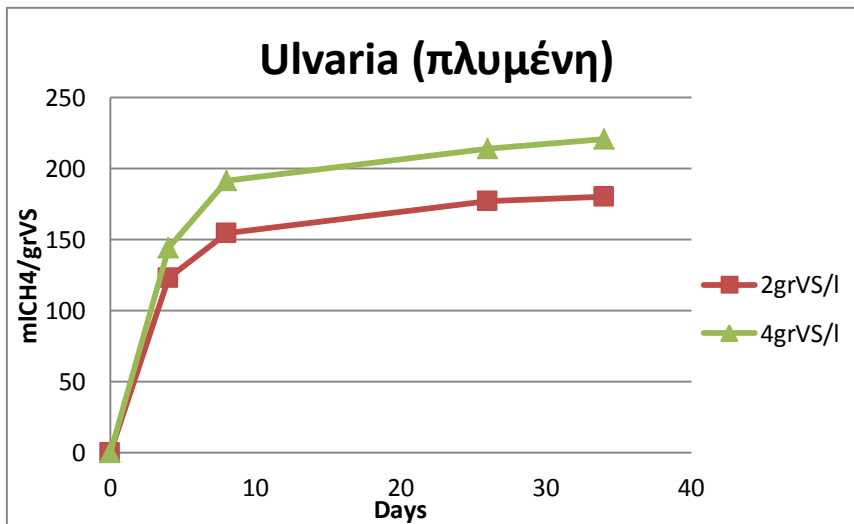
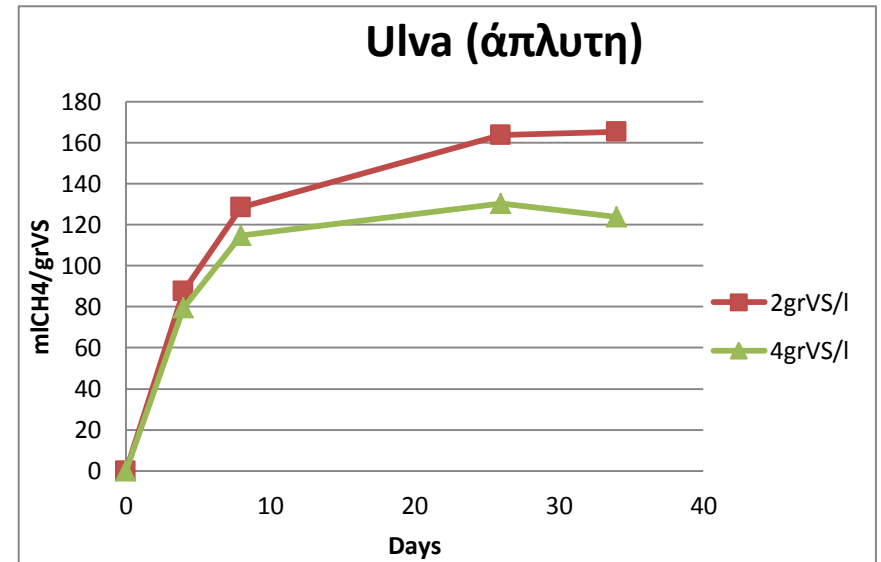
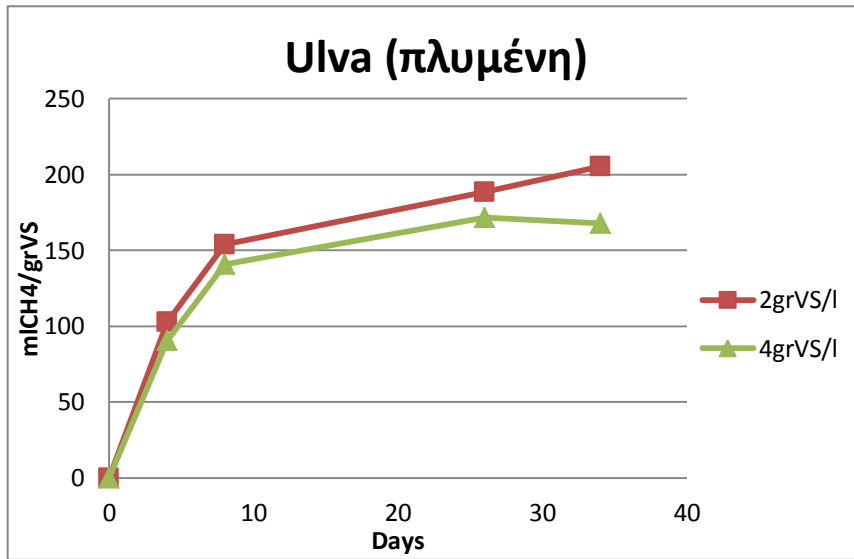
Πειράματα για τον προσδιορισμό του πραγματικού δυναμικό παραγωγής βιοαερίου πραγματοποιήθηκαν και για τα δύο είδη αλγών. Όλα τα δείγματα ήταν αλεσμένα και ήταν είτε πλυμένα είτε άπλυτα για να προσδιοριστεί η επιρροή του επιφανειακού αλατιού που βρισκόταν στα φύλλα των αλγών, κατά την αναερόβια χώνευση. Τρεις οργανικές φορτίσεις χρησιμοποιήθηκαν 1gVS/l, 2gVS/l, και 4gVS/l , για λόγους σύγκρισης και ακρίβειας των αποτελεσμάτων.

Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων



Εικόνα 26 Απόλυτη παραγωγή μεθανίου στις φιάλες blank και σχετική παραγωγή μεθανίου στις φιάλες ελέγχου (control)

Το blank αναφέρεται στους αντιδραστήρες που περιέχουν μόνο ΧΚΧ και το control αναφέρεται στις φιάλες που περιέχουν ΧΚΧ ως πηγή μικροοργανισμών και Avicel ως πηγή τροφής. Το Avicel είναι το εμπορικό όνομα της μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης που έχει υδρολυθεί εν μέρει με οξύ, και είναι στη μορφή σκόνης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα το Avicel έφτασε τη μέγιστο δυναμικό παραγωγής βιοαερίου στην πρώτη εβδομάδα της χώνευσης, το οποίο επιβεβαιώνει την δραστηριότητα της βακτηριακής βιομάζας.



Εικόνα 27 Μέση παραγωγή μεθανίου στους αντιδραστήρες που περιείχαν πλυμένα και άπλυτα δείγματα από *U. lactuca* και *U. fusca*

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω διαγράμματα η χώνευση διήρκησε 34 ημέρες, μέχρι η παραγωγή βιοαερίου να σταθεροποιηθεί. Η παραγωγή βιοαερίου στην αρχή ήταν γρήγορη, καθώς η εύκολα βιοδιασπάσιμη οργανική ύλη καταναλώθηκε πρώτη, και στη συνέχεια ο ρυθμός της διαδικασίας μειωνόταν σταδιακά αφού μέσα στους αντιδραστήρες παρέμειναν τα δύσκολα βιοδιασπάσιμα κλάσματα του οργανικού υλικού. Η παρουσία θαλασσινού νερού επηρέασε αρνητικά τη μεθανογένεση σε όλες τις περιπτώσεις ($P < 0.05$). Στα πλυμένα δείγματα υπήρξε μια μείωση στα ολικά στερεά της τάξης του 21-23% κυρίως διότι ξεπλύθηκαν και κάποια ανόργανα συστατικά όπως σωματίδια άμμου. Παράλληλα όμως υπήρξε και μια μείωση των πτητικών στερεών της τάξης του 10-13% στα πλυμένα δείγματα. Παρά το γεγονός ότι το πλύσιμο μείωσε το οργανικό φορτίο, τα πλυμένα δείγματα παρουσίασαν υψηλότερη παραγωγή βιοαερίου ανά γραμμάριο πτητικών στερεών. Αυτό καταδεικνύει ότι είναι πιθανό το αίτιο της αναχαίτισης της μεθανογένεσης να είναι το επιφανειακό αλάτι από την επιφάνεια των φύλλων.

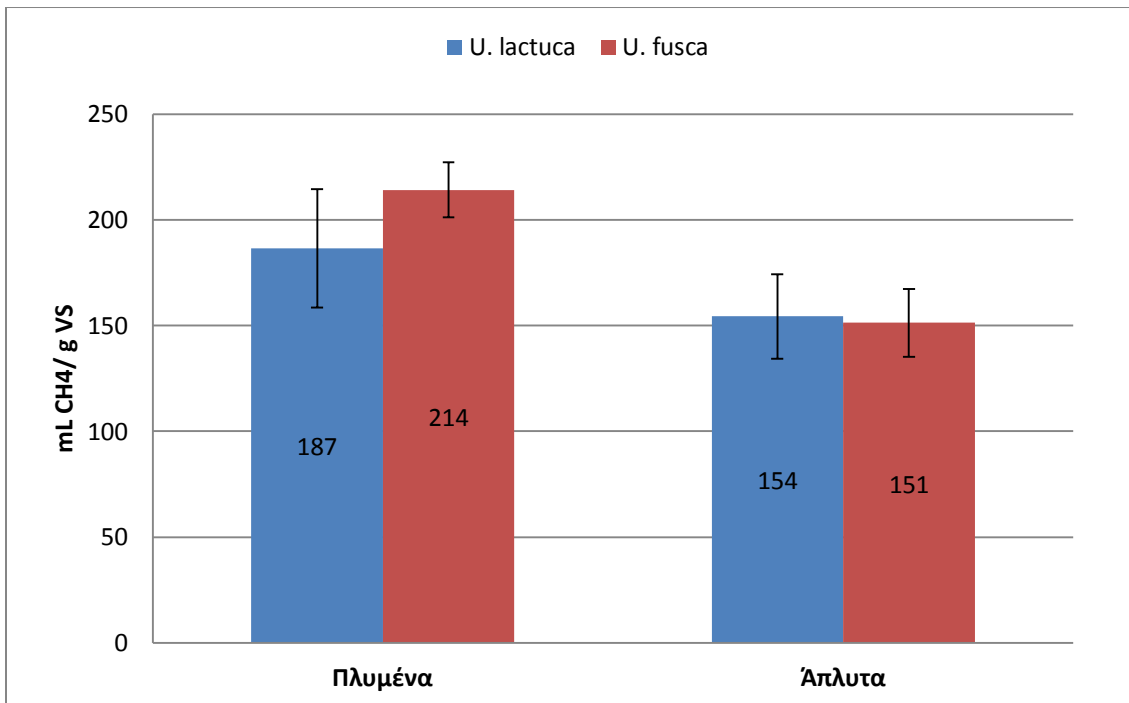
Υψηλά επίπεδα αλατιού προκαλούν αφυδάτωση στα βακτηριδιακά κύτταρα λόγω οσμωτικής πίεσης (de Baere et al., 1984; Yerkes et al., 1997). Τα ελαφρά ιόντα μετάλλων συμπεριλαμβανομένων των ιόντων νατρίου, καλίου, ασβεστίου, και μαγνησίου είναι παρόντα στην εισροή των αναερόβιων χωνευτών. Μπορούν να απελευθερωθούν από τη διάσπαση του οργανικού υλικού (διάφορες πηγές βιομάζας), ή να προστεθούν σαν χημικά για την ρύθμιση της λειτουργίας και του pH (Grady et al., 1999), είτε σε αυτή την περίπτωση να προστεθούν μέσω της εισροής (άλατα που περιέχονται στο θαλασσινό νερό). Είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη της μικροβιακής βιομάζας και συνεπακόλουθα επηρεάζουν το ρυθμό ανάπτυξης όπως και τα άλλα θρεπτικά. Ενώ μικρές συγκεντρώσεις διεγείρουν την μικροβιακή ανάπτυξη, υψηλές ποσότητες μειώνουν την ανάπτυξη, και υπερβολικές συγκεντρώσεις μπορούν να προκαλέσουν σοβαρή αναχαίτιση και τοξικότητα (Soto et al., 1993).

Ωστόσο, αυτή η ένδειξη αποδείχθηκε εσφαλμένη μετά από πειράματα που διεξήχθησαν για τον προσδιορισμό των επιπέδων νατρίου και καλίου που υπήρχαν

στους αντιδραστήρες. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα (Παράρτημα Β) οι συγκεντρώσεις αυτών των ιόντων δεν ξεπέρασαν ποτέ τα 1.5 g/L, η οποία είναι πολύ χαμηλή για να προκαλέσει αναχαίτιση των μεθανογόνων βακτηρίων (Fang, Boe and Angelidaki 2010).

Πίνακας 20 Μέση παραγωγή μεθανίου

Δείγμα	Μέση παραγωγή μεθανίου (mL CH ₄ / gVS)	Τυπική απόκλιση
<i>U. lactuca</i> πλυμένη	187	28
<i>U. lactuca</i> άπλυτη	154	20
<i>U. fusca</i> πλυμένη	214	13
<i>U. fusca</i> άπλυτη	151	16



Εικόνα 28 Μέση Παραγωγή Μεθανίου

Στον Πίνακα 20 και στην Εικόνα 28 φαίνονται τα συνολικά αποτελέσματα. Στην περίπτωση της *Ulva lactuca*, παρατηρήθηκε μια αύξηση της τάξης του 21% όταν τα δείγματα ήταν πλυμένα, και στην περίπτωση της *Ulvaria fusca* αυτή η αύξηση ήταν της τάξης του 29% ($P < 0.05$). Το μεθάνιο που παράχθηκε αντιπροσωπεύει το 42% και το 48% της θεωρητικής τιμής για την *U.lactuca* και την *U.fusca* αντίστοιχα. Αυτό συμβαίνει πιθανότατα εξ' αιτίας υπερεκτίμησης των θεωρητικών τιμών, αφού παρόμοια δυναμικά παραγωγής μεθανίου από αυτά τα είδη αλγών έχουν δημοσιευτεί και από άλλες πηγές (A. Bruhn et al. 2010).

3.3.4 Παραγωγή Αιθανόλης

Θεωρητική Παραγωγή Αιθανόλης

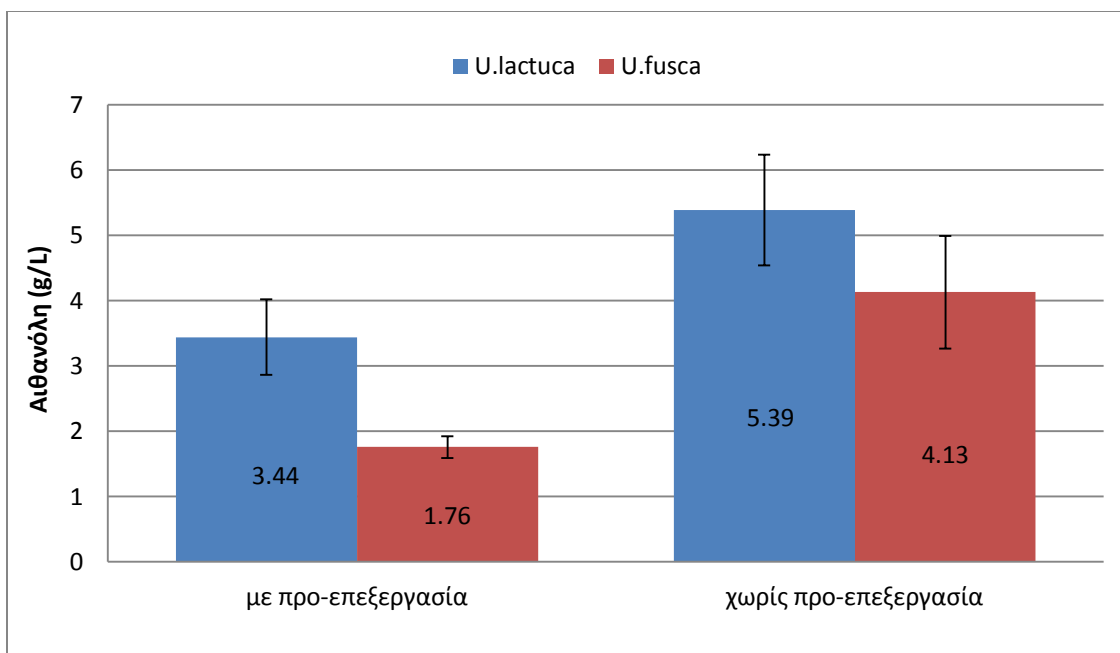
Στα άλγη *Ulva lactuca* και *Ulvaria fusca* περίπου 50% από τα σάκχαρα είναι εξόζες και το υπόλοιπο 50% είναι πεντόζες. Οι πιο συνηθισμένες εξόζες σε αυτά τα πράσινα μακροάλγη είναι η γλυκόζη, η γαλακτόζη, το γλουκουρονικό οξύ και το ιδουρονικό οξύ. Από την άλλη οι πιο συνήθεις πεντόζες είναι η ξυλόζη, η ραμνόζη και η αραβινόζη (Isa et al. 2009).

Δυστυχώς ο μύκητας *S. cerevisiae* έχει ένα βασικό μειονέκτημα, την έλλειψη της φυσικής ικανότητας να χρησιμοποιεί πεντόζες (Girio et al. 2010). Ο *S. cerevisiae* κάτω από αναερόβιες συνθήκες, μεταβολίζει τη γλυκόζη σε αιθανόλη κυρίως μέσω του μεταβολικού μονοπατιού Embden-Meyerhof. Η συνολική αντίδραση έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή 2 moles αιθανόλης για κάθε mole γλυκόζης που καταναλώνεται. Υποθέτοντας ότι ένα mole αιθανόλης ζυγίζει 46g και ένα mole γλυκόζης ή άλλης παρόμοιας εξόζης ζυγίζει περίπου 180g κατά μέσο όρο τότε η θεωρητική παραγωγή αιθανόλης θα είναι:

$$Y_{p/s} = 0.51 \frac{g \text{ ethanol}}{g \text{ hexose}}$$

Συγκεντρώσεις Αιθανόλης

Στην περίπτωση της *Ulva lactuca*, υπήρχαν πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης στο διάλυμα της ζύμωσης (1.5g/L) και καταναλώθηκε όλη μέσα στο διάστημα των 48 ωρών που κράτησε η αλκοολική ζύμωση. Από την άλλη οι μετρήσεις έδειξαν ότι δεν υπήρχε καθόλου γλυκόζη στα δείγματα της *U. fusca* (Παράρτημα Β) και έτσι φαίνεται ότι η αιθανόλη παράχθηκε από άλλες εξόζες και γι' αυτό η απόδοση μετράται σε γραμμάριο αιθανόλης ανά γραμμάριο εξόζης.



Εικόνα 29 Συγκέντρωση αιθανόλης στο τελικό διάλυμα της ζύμωσης σε προ-επεξεργασμένα και μη *U.lactuca* και *U.fusca*.

Τα δείγματα που είχαν υποστεί προ-επεξεργασία με H_2O_2 και $NaOH$ παρουσίασαν χαμηλότερη παραγωγή αιθανόλης από αυτά που δεν πέρασαν προ-επεξεργασία. Πιο συγκεκριμένα στην περίπτωση της *Ulva lactuca* η συγκέντρωση αιθανόλης ήταν 57% υψηλότερη όταν δεν υπήρξε προ-επεξεργασία και στην περίπτωση της *Ulvaria fusca* η διαφορά αυτή ήταν ακόμα υψηλότερη και έφτασε το 135% (Εικόνα 29). Φαίνεται λοιπόν ότι αλκαλική/οξειδωτική προ-επεξεργασία δεν ήταν κατάλληλη για αυτό το κυτταρινικό υπόστρωμα καθώς αναχαίτισε την παραγωγή αιθανόλης, πιθανόν λόγω της παραγωγής κάποιων τοξικών ή άλλων ουσιών που αντέδρασαν αργότερα στην διαδικασία, είτε γιατί οξείδωσαν σε υπερβολικό βαθμό τα σάκχαρα.

Μπορεί επίσης να σημειωθεί ότι η *Ulva lactuca* παρουσίασε 95% υψηλότερη παραγωγή αιθανόλης από ότι η *Ulvaria fusca* όταν τα δείγματα υπέστησαν προ-επεξεργασία και 30% υψηλότερη παραγωγή αιθανόλης όταν τα δείγματα δεν υπέστησαν προ-επεξεργασία. Δυστυχώς δεν ήταν εφικτό να υπολογιστεί το πρακτικό

δυναμικό παραγωγής αιθανόλης με βάση την κατανάλωση σακχάρων, διότι οι μετρήσεις σακχάρων δεν ήταν καθόλου ακριβείς λόγω τεχνικών προβλημάτων.

3.4 Συμπεράσματα

Από την πειραματική δουλειά η οποία έλαβε χώρα σε αυτό το κεφάλαιο προέκυψαν κάποια συμπεράσματα και αναφέρονται παρακάτω:

1. Ένα μειονέκτημα της αναερόβιας χώνευσης πράσινων μακροαλγών σε σύγκριση με γεωργικές καλλιέργειες για την παραγωγή βιοενέργειας είναι το υψηλό περιεχόμενο νερού στα άλγη. Σε αυτή τη μελέτη το περιεχόμενο ολικών και πτητικών στερεών των *U. lactuca* και *U. fusca* ήταν 3.57% / 2.95% και 5.37% / 4.87%, αντίστοιχα, το οποίο δεν επιτρέπει υψηλή οργανική φόρτιση σε ένα σύστημα συνεχούς τροφοδοσίας με χρόνο παραμονής 15-18 ημέρες. Επιπλέον, η ειδική παραγωγή μεθανίου των *U. lactuca* και *U. fusca* ήταν χαμηλή ($6 \text{ m}^3 \text{ t}^{-1}$ and $10 \text{ m}^3 \text{ t}^{-1}$ αντίστοιχα) εξ' αιτίας του υψηλού περιεχομένου σε νερό. Έτσι στην ανεπεξέργαστη μορφή τους οι *U. lactuca* και *U. fusca* δεν μπορούν να αυξήσουν την παραγωγή μεθανίου σε εγκαταστάσεις παραγωγής βιοαερίου που χρησιμοποιούν κοπριά και αστικά/βιομηχανικά λύματα (Angelidaki and Ellegaard, 2003).
2. Η παραγωγή μεθανίου των *U. lactuca* και *U. fusca* ήταν 21% και 29% υψηλότερη αντίστοιχα, όταν το επιφανειακό θαλασσινό αλάτι είχε ξεπλυθεί από τα δείγματα. Ωστόσο η αναχίτιση δεν προκλήθηκε από το επίπεδο του αλατιού διότι οι μετρήσεις των Na^+ και K^+ έδωσαν πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στα δείγματα από τους αντιδραστήρες.
3. Παρόλο που η *U. lactuca* και η *U. fusca* έχουν υψηλό περιεχόμενο σε υδατάνθρακες (>60% ξ.β.) ένα μεγάλο κομμάτι από αυτά τα σάκχαρα είναι

πεντόζες. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων παραγωγής αιθανόλης χρησιμοποιήθηκε ο μύκητας *S. Cerevisiae* για να ζυμώσει τη γλυκόζη σε αιθανόλη. Αλλά αυτά τα δύο είδη αλγών περιέχουν επίσης υψηλές ποσότητες ραμνόζης και μικρότερες ποσότητες ξυλόζης που είναι και οι δύο πεντόζες. Κατά συνέπεια η παραγωγή αιθανόλης δεν αντιπροσωπεύει το συνολικό δυναμικό αυτών των μακροαλγών και ένας πιο κατάλληλος μικροοργανισμός θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ή θα πρέπει να πραγματοποιηθεί ζύμωση δύο βημάτων για να επιτευχθούν υψηλότερες παραγωγές.

4. Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης βιομάζας σε αιθανόλη, απελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα διοξείδιο του άνθρακα. Ωστόσο τα άλγη για να αναπτυχθούν απαιτούν διοξείδιο του άνθρακα επίσης (π.χ. τα φυτά χρειάζονται CO₂ για να συνθέσουν γλυκόζη/κυτταρίνη κατά τη φάση φωτοσύνθεσης). Έτσι η παραγωγή αιθανόλης σαν διαδικασία είναι ένας κλειστός κύκλος και δεν επιβαρύνει την ατμόσφαιρα με επιπλέον CO₂, καθιστώντας την αιθανόλη ως μια πηγή ενέργειας περιβαλλοντικά φιλική εάν παραχθεί με αυτό τον τρόπο (Wyman and Hinman 1990; Chandel et al. 2007).
5. Η αλκαλική/οξειδωτική προ-επεξεργασία δεν αύξησε την παραγωγή αιθανόλης παρά το γεγονός ότι αύξησε λίγο την απελευθέρωση σακχάρων. Έτσι προκύπτει ότι αυτή η μέθοδος προ-επεξεργασίας ήταν ακατάλληλη για τα πράσινα μακροάλγη που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα μείωσε την παραγωγή αιθανόλης κατά 57% και 135% στις *U.lactuca* και *U.fusca* αντίστοιχα.

4 Κεφάλαιο: Προϊόντα, Γενικά Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές

4.1 Προϊόντα από Μακροάλγη

Διάφορα τελικά προϊόντα μπορούν να προκύψουν χρησιμοποιώντας τα μακροάλγη σαν πρώτη ύλη. Αυτά τα προϊόντα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε ενεργειακά και μη-ενεργειακά όπως φαίνεται στην Εικόνα 30.



Εικόνα 30 Μακροάλγη και τελικά προϊόντα

4.1.1 Ενεργειακά Προϊόντα από Μακροάλγη

Υπάρχουν διάφορα μονοπάτια μέσω των οποίων μπορούν να παραχθούν βιοκαύσιμα και παρουσιάζονται στον Πίνακα 21.

Πίνακας 21 Επεξεργασίες και παραγόμενα καύσιμα από μακροάλγη

Source	Process	Fuel
<i>Macroalgae</i>	Anaerobic Digestion	Methane
	Fermentation	Ethanol
	Transesterification	Biodiesel
	Pyrolysis/Gasification	Hydrocarbons & derivatives

Μεθάνιο

Μελέτη τεχνικής και οικονομική σκοπιμότητας παραγωγής μεθανίου από θαλάσσια βιομάζα πραγματοποιήθηκε από το 1968 έως το 1990 με τη χρηματοδότηση του αμερικάνικου ναυτικού, της αμερικανικής ένωσης αερίου, του Ινστιτούτου έρευνας αερίου και του αμερικανικού υπουργείου ενέργειας, και αξιολογήθηκε από τον Chynoweth (2002). Η μελέτη συνέκρινε τη χρήση διαφόρων μορφών βιομάζας (θαλάσσια άλγη, ξύλο και χορτάρι, αστικά στερεά λύματα) ως ενεργειακά είδη προς καλλιέργεια, και συμπέρανε ότι η θαλάσσια βιομάζα προσφέρει την υψηλότερη απόδοση. Οι ρυθμοί ανάπτυξης των θαλασσίων αλγών ξεπέρασαν τα γεωργικά φυτά, ωστόσο, η ανάπτυξη συχνά περιορίζεται από την διαθεσιμότητα θρεπτικών. Επάρκεια θρεπτικών για καλλιέργεια στην ανοιχτή θάλασσα μπορεί να επιτευχθεί με συνεχή άντληση αλλά αυτή η εναλλακτική είναι πολύ δαπανηρή, και έτσι η καλλιέργεια αλγών κοντά στην ακτή με παροχή θρεπτικών από ανακύκλωση λυμάτων είναι μια καλύτερη λύση (Chynoweth 2002). Η παραγωγή μεθανίου από βιομάζα μακροαλγών με βάση μελέτη του Chynoweth (2002) είναι εφικτή θεωρώντας παραγωγή $11 \text{ dry t} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{y}^{-1}$ (βάσει δεδομένων από παραγωγούς).

Αιθανόλη

Η παραγωγή αιθανόλης από μακροάλη θεωρείται ως μια ελπιδοφόρα εναλλακτική σε σχέση με τις καλλιέργειες τροφίμων για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Διάφορα είδη μακροαλγών έχουν προταθεί ως υποψήφιας πηγές αιθανόλης, συμπεριλαμβανομένων των *Gracilaria* sp. και *Ulva* sp. (Hanisak 2008), καθώς επίσης αποικίες ωκεανών μεγαλύτερων ειδών (Adams et al. 2008, Kraan 2008). Η τεχνολογία μετατροπής αιθανόλης από μακροάλη υπάρχει ήδη και αντικατάσταση γεωργικής βιομάζας από θαλάσσια δεν είναι δύσκολη (Adams et al. 2008).

Το περιεχόμενο κυτταρίνης στην *Ulva* sp. είναι 10-20% του ξυρού βάρους ενώ η *Laminaria* sp. έχει περίπου 60% ξ.β. σάκχαρα κατάλληλα για αλκοολική ζύμωση.

4.1.2 Μη Ενεργειακά Προϊόντα από Μακροάλη

Η παγκόσμια αγορά των μη ενεργειακών προϊόντων από μακροάλη υπολογίζεται ότι φθάνει τα US\$ 5.5-6 δις το χρόνο (McHugh 2003; Pulz and Gross 2004). US\$ 5 δις προέρχονται από τη βιομηχανία τροφίμων, εκ των οποίων το 1 δις είναι από τα “Nori”, ένα προϊόν υψηλής αξίας που κοστίζει 16.000 δολάρια ανά τόνο, και επιπλέον 600 εκατομμύρια δολάρια προέρχονται από υδροκολλοειδή που εκχυλίζονται από τα κυτταρικά τοιχώματα των μακροαλών (Anders et al. 2007).

Τα είδη των θαλάσσιων μακροαλών που χρησιμοποιούνται κυρίως στη βιομηχανία αυτή τη στιγμή, ανήκουν στις κατηγορίες Ροδόφυτα και Φεόφυτα , και περίπου 7.5-8 εκατομμύρια τόνοι αλών θερίζονται κάθε χρόνο.

Τα διάφορα μη-ενεργειακά προϊόντα που αποκτώνται από μακροάλη περιγράφονται παρακάτω:

Τρόφιμα

Η χρήση αλών ως πηγή τροφής είμαι μια συνήθεια που ξεκινά από τον 4^ο αιώνα μ.Χ. στην Ιαπωνία και από τον 6^ο αιώνα μ.Χ. στην Κίνα. Αυτές οι δύο χώρες μαζί με την Κορέα είναι οι μεγαλύτεροι καταναλωτές αλών ως τρόφιμο. Ωστόσο, καθώς πολλοί άνθρωποι μετανάστευσαν σε άλλα μέρη του κόσμου, η ζήτηση αλών για τροφή του ακολούθησε για παράδειγμα σε διάφορα σημεία των ΗΠΑ και της Νοτίου Αμερικής. Η αυξανόμενη ζήτηση τα τελευταία 50 χρόνια ξεπέρασε την ικανότητα προμήθειας από φυσικά αποθέματα. Μελέτη του κύκλου ζωής αυτών των αλών οδήγησε στην ανάπτυξη βιομηχανίας καλλιέργειας που στις μέρες μας καλύπτει πάνω από 90% της ζήτησης της αγοράς. Στην Ιρλανδία, στην Ισλανδία και στη Βόρεια Σκωτία (Καναδάς) ένα διαφορετικό είδος αλών τρώγεται παραδοσιακά, και η αγορά γύρω από αυτό αναπτύσσεται. Κάποιοι κυβερνητικοί και εμπορικοί οργανισμοί στη Γαλλία προωθούν τα άλη για χρήση οικιστική ή σε εστιατόρια με επιτυχία. Μια ανεπίσημη αγορά

υπάρχει από παράκτιους κατοίκους σε μερικές αναπτυσσόμενες χώρες όπου υπάρχει παράδοση στη χρήση αλγών ως λαχανικό σε σαλάτες.

Τα ακόλουθα είδη (Πίνακας 22) έχουν χρησιμοποιηθεί στην Ευρώπη για ανθρώπινη κατανάλωση είτε παραδοσιακά είτε πιο πρόσφατα.

Πίνακας 22 Είδη μακροαλγών και κατανάλωση ως τρόφιμα

Μακροάλη	Είδος τροφίμου
<i>Palmaria palmate</i>	Τρώγεται ωμό, ξηρό ή σε σκόνη
<i>Laminaria sp.</i>	Τρώγεται φρέσκο, ξηρό ή τουρσί
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Χρησιμοποιείται ως υγιεινή τροφή
<i>Fucus vesiculosus</i>	Βράζεται και πίνεται σαν υγιεινό ποτό
<i>Ulva lactuca</i>	Προστίθεται σε σούπες και σαλάτες
<i>Porphyra</i>	Βράζεται-κόβεται και μπαίνει στο ψωμί

Λιπάσματα

Λιπάσματα από άλγη χρησιμοποιούνται τουλάχιστον από τον 19^ο αιώνα. Αρχικά χρησιμοποιούνταν από παράκτιους κατοίκους, οι οποίοι συνέλλεγαν κυρίως μεγάλα καφέ άλγη και τα έθαβαν μέσα στο χώμα της περιοχής. Το υψηλό ποσοστό φυτικών ινών που περιέχουν τα άλγη λειτουργεί ως φυσικό συντηρητικό του χώματος. Επίσης βοηθά στην διατήρηση της υγρασίας. Το περιεχόμενο σε μέταλλα και άλλα ιχνοστοιχεία που περιέχονται στα άλγη λειτουργεί επίσης σαν λίπασμα. Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα αναπτύχθηκε μια μικρή βιομηχανία βασισμένη σε ξηρά και αλεσμένα άλγη αλλά σταδιακά παρήκμασε με την έλευση των συνθετικών χημικών λιπασμάτων. Σήμερα, με την αυξανόμενη απήχηση των οργανικών καλλιεργειών, έχει υπάρξει μερική αναβίωση αυτής της βιομηχανίας, αλλά ακόμα όχι σε μεγάλη κλίμακα. Τα

συνδυασμένα κόστη ξήρανσης και μεταφοράς έχουν περιορίσει τη χρήση τους σε ζεστά κλίματα όπου οι αγοραστές βρίσκονται σε πιο κοντινή απόσταση από την ακτή.

Η αναπτυσσόμενη περιοχή όσον αφορά στα λιπάσματα από άλγη βρίσκεται στην παραγωγή υγρών εκχυλισμάτων. Αυτά μπορούν να παραχθούν σε συγκεντρωμένη μορφή και να αραιωθούν από το χρήστη. Αυτά τα λιπάσματα μπορούν είτε να εφαρμοστούν απ' ευθείας στα φυτά είτε να εμπλουτίσουν το νερό του ποτίσματος. Σήμερα, υπάρχει ευρεία αναγνώριση της χρησιμότητας αυτών των προϊόντων και ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον από την κοινότητα των αγροτών βιολογικών καλλιεργειών εξ' αιτίας της αποτελεσματικότητάς τους στην παραγωγή λαχανικών και κάποιων φρούτων.

Τα λιπάσματα από άλγη περιέχουν ορμόνες που προωθούν την ανάπτυξη και εμπεριέχουν άζωτο, φώσφορο και κάλιο που είναι απαραίτητα για τα φυτά. Αυτά τα λιπάσματα είναι υδατοδιαλυτά και αποτελούνται μόνο από φυσικά στοιχεία και έτσι δεν βλάπτουν το χώμα.

Υδροκολλοειδή

Διάφορα κόκκινα και καφέ άλγη χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τριών υδροκολλοειδών που ονομάζονται: Agar, Alginate, Carrageen. Το υδροκολλοειδές είναι μια μη-κρυσταλλική ουσία με πολύ μεγάλα μόρια και η οποία διαλύεται στο νερό και δίνει ένα πυκνό (παχύρευστο) διάλυμα. Αυτές οι τρεις ουσίες είναι υδατοδιαλυτοί υδατάνθρακες που χρησιμοποιούνται για την πήξη διαλυμάτων, τη δημιουργία gel, για τη σταθεροποίηση προϊόντων, όπως το παγωτό (αναχαιτίζουν τη δημιουργία κρυστάλλων και έτσι το παγωτό έχει πιο κρεμώδη υφή). Αυτά τα υδροκολλοειδή βρίσκονται είτε στα κυτταρικά τοιχώματα είτε μέσα στα κύτταρα λειτουργώντας σαν αποθήκες υλικών. Είναι χαρακτηριστικό των θαλασσιών αλγών ότι περιέχουν αφθονία θειικών πολυσακχαριδίων στα κυτταρικά τους τοιχώματα.

Τα *alginates* είναι πολυμερή που χρησιμοποιούνται κυρίως στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων σαν σταθεροποιητές για γαλακτώματα και κρέμες, π.χ. παγωτό, μαρμελάδα, κρέμα, λοσιόν, οδοντόκρεμα ή επικάλυψη χαπιών. Τα *carrageenan* είναι γραμμικές γαλακτάνες που εκχυλίζονται από τα κυτταρικά τοιχώματα κόκκινων αλγών με ζεστό νερό. Επίσης χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, υφασμάτων και φαρμάκων και χρησιμοποιούνται σαν σταθεροποιητές. Τα *agars* χρησιμοποιούνται κυρίως σε εφαρμογές τροφίμων και σε βακτηριολογικές και βιοτεχνολογικές χρήσεις.

Καλλυντικά

Αλεσμένα ή άλγη σε σκόνη, όπως και φυκοκολλοειδή χρησιμοποιούνται στην παρασκευή καλλυντικών προϊόντων όπως σαπούνια, σαμπουάν, πούδρες, κρέμες και σπρέι. Πολλές φορές το περιεχόμενο των προϊόντων αυτών σε άλγη είναι πολύ μικρό ακόμα και όταν επισημαίνεται στη συσκευασία για την προώθηση του προϊόντος.

Ποικιλία αλγών συμμετέχει στην βιομηχανία αλγών. Ανάμεσα στα καφέ άλγη, το πιο δημοφιλές είναι η *Laminaria sp.* αν και τα *Fucus vesiculosus* και *Ascophyllum nodosum* χρησιμοποιούνται επίσης. Τα *Chondrus crispus*, *Mastocarpus stellatus* και *Porphyra sp.* είναι κάποια από τα είδη κόκκινων αλγών που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία καλλυντικών ως συστατικά. Συνολικά όμως οι ποσότητες αλγών που χρησιμοποιούνται σε αυτό τον τομέα είναι πολύ μικρές.

4.1.3 Μη ενεργειακά προϊόντα από την *Ulva sp.*

Τα *Chlorophyta* είναι πολύ κοινά άλγη παγκοσμίως. Τα δύο βασικά γένη είναι η *Ulva* και η *Enteromorpha* και είναι τόσο γνωστά διότι συλλέγονται και καλλιεργούνται ως τρόφιμο αλλά και διότι σχετίζονται με προβλήματα ευτροφισμού σε παραθαλάσσια οικοσυστήματα (Morand, P. Briand, X. Bot. Mar. 1996) και με επιμολύνσεις κλειστών καλλιεργειών άλλων αλγών (Buschmann, A. H. Gomez, P. Hydrobiologia 1993). Η

οπορτουμιστική τους δυνατότητα να μεγαλώνουν τα καθιστούν ως καλούς υποψηφίους για την ανακύκλωση υδάτων σε ολοκληρωμένα συστήματα υδατοκαλλιέργειας και αγροτικών εκροών (Cohen, I. Neogi, A. Bot. Mar. 1991), αλλά το μεγαλύτερο μέρος της παραγόμενης βιομάζας έχει πολύ μικρή αξία. Τα άλγη που συλλέγονται εισάγονται σε κομπόστ ή απορρίπτονται παρά το γεγονός ότι η μετατροπή τους σε βιοαέριο είναι εφικτή (Moran et al. 1997). Με το σημερινό ενδιαφέρον σε νέες ανανεώσιμες πηγές χημικών και πολυμερών, η ανεκμετάλλευτη βιομάζα αντιπροσωπεύει μια πιθανή πηγή προς έρευνα. Ανάμεσα στα πολυμερή που συντίθενται από αυτά τα άλγη, τα πολυσακχαρίδια των κυτταρικών τοιχωμάτων αντιπροσωπεύουν περίπου το 38-54% της ξηρής μάζας των αλγών (Lahaye et al. 1997). Αυτά εμπεριέχουν τέσσερις οικογένειες πολυσακχαριδίων στην *Ulva sp.*: δύο μεγάλες, το υδατοδιαλυτό ιλναν, και την αδιάλυτη κυτταρίνη, και δύο μικρές, το xyloglucan και το glucuronan. Οι περισσότερες ερευνητικές εργασίες που έγιναν έχουν επικεντρώσει το ενδιαφέρον τους στο ιλναν καθώς παρουσιάζει διάφορα φυσικοχημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά με δυνητικό ενδιαφέρον σε εφαρμογές τροφίμων, φαρμακευτικών, χημικές και γεωργικές.

Χημεία του Ιλναν

Το όνομα ιλναν προέρχεται από τους πρωτότυπους όρους *ulvin* και *ulvacin* που εισήχθησαν από τον Kylin σε σχέση με τα διάφορα κλάσματα των πολυσακχαριδίων της *Ulva lactuca*. Πλέον χρησιμοποιείται όταν θέλει κάποιος να αναφερθεί στα πολυσακχαρίδια κάποιων αλγών από την οικογένεια των *Ulva spp.* και *Enteromorpha spp.* Η εκχύλιση επιτυγχάνεται γενικά από διαλύματα νερού σε θερμοκρασία 80–90 °C που περιέχουν κάποιο δισθενές κατιόν (Yamamoto M. 1980). Η απόδοση κυμαίνεται από 8% έως 29% επί του ξηρού βάρους του άλγους, ανάλογα με την τεχνική εκχύλισης και καθαρισμού. Η ανάκτηση του ιλναν γενικά γίνεται με καθίζηση προσθέτοντας μια αλκοόλη.

Σύνθεση

Οι πρώτοι οι οποίοι μελέτησαν τη σύσταση του υλvan ήταν οι Brading et al., McKinnel και Percival και βρήκαν ότι τα βασικά συστατικά του είναι τα θειικά, η ραμνόζη, η ξυλόζη και το γλουκουρονικό οξύ. Η ραμνόζη (17-45% ξ.β.), η ξυλόζη (2-12% ξ.β.), η γλυκόζη (0.5-6.5% ξ.β.), τα ουρονικά οξέα (6.5-19% ξ.β.) και τα θειικά οξέα (16-23% ξ.β.) έχουν αναφερθεί επανειλημμένα από τότε, αλλά μόνο μετά από την ερευνητική δουλειά των Quemener et al. αναγνωρίστηκε το ιδουρονικό οξύ (1-9% ξ.β.) ως συστατικός υδατάνθρακας του υλvan. Μεταβλητές ποσότητες μανόζης και γαλακτόζης έχουν επίσης αναφερθεί, αλλά το αν ανήκουν στο υλvan αμφισβητείται διότι αποτελούν ένα ευδιάκριτο ουδέτερο κλάσμα στο *U. mutabilis* (Bryhni, E. Phycologia 1978). Η αραβινόζη έχει αναφερθεί ότι βρίσκεται στο υλvan που βρισκόταν σε *Ulva lactuca* που συλλέχθηκε από την Αίγυπτο (Gosselin, C. C.; Holt, A.; Lowe, P. A. J. Chem. Soc. 1964).

Οι διαφοροποίηση στη σύνθεση των σακχάρων μπορεί να έχει μεθοδολογική, ταξινομική ή και οικοφυσιολογική προέλευση. Σήμερα, είναι δύσκολο να προσδιοριστεί η σύνθεση του υλvan επειδή ο αλντοβιουρονικός δεσμός αντιστέκεται στην υδρόλυση με οξέα και το ιδουρονικό οξύ καταστρέφεται μερικώς από την υδρόλυση (Conrad, E. Biochem. J. 1980). Για να ξεπεραστούν αυτά τα εμπόδια, μια χημικο-ενζυματική μέθοδος διάσπασης προτάθηκε για να βελτιστοποιήσει την ανάκτηση όλων των δομικών σακχάρων. Απαρτίζεται από μια ελαφριά υδρόλυση με οξύ να διασπάσει το υλvan σε αλντοβιουρονικό οξύ. Ο δισακχαρίτης στη συνέχεια διασπάται περαιτέρω από μια β-d-γλουκουρονιδάση σε γλουκουρονικό οξύ και ραμνόζη. Η όξινη επεξεργασία απελευθερώνει επίσης όλες τις θειικές ομάδες από το υλvan. Τα τελικά ουδέτερα σάκχαρα και τα ουρονικά οξέα μπορούν στη συνέχεια να αναγνωριστούν και να ποσοτικοποιηθούν με υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) (Quemener, B.; Lahaye, M.; Bobin Dubigeon, C. J. Appl. Phycol. 1997).

Πιθανές Χρήσεις του *Ulvan*

Οι μοναδικές χημικές και φυσικο-χημικές ιδιότητες του *ulvan* καθιστούν αυτή την οικογένεια πολυσακχαριδίων ελκυστικούς υποψήφιους για πρωτότυπα λειτουργικά και βιολογικά ενεργά πολυμερή για τρόφιμα, φαρμακευτικά, χημικά και γεωργικά προϊόντα. Με βάση την ασυνήθιστη χημική σύσταση του *ulvan*, η βιομάζα αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν πηγή σπάνιων σακχάρων, προδρόμων για τη σύνθεση χημικών υψηλής ποιότητας. Η ραμνόζη για παράδειγμα είναι ένα από τα σπάνια σάκχαρα στη φύση και χρησιμοποιείται για τη σύνθεση αρώματος (Wong C. H. et al. 1983), ενώ είναι επίσης και βασικό δομικό στοιχείο διαφόρων αντιγόνων που αναγνωρίζονται από τα πολλά θηλαστικά (Condaminet et al. 1997). Το *ulvan* είναι επίσης πηγή ιδουρονικού οξέος, ενός άλλου σπάνιου σακχάρου που είναι απαραίτητο για τη σύνθεση ηπαρίνης και έχει αντιθρομβωτικές ιδιότητες (Duchaussoy et al. 1999). Σήμερα το ιδουρονικό οξύ συντίθεται τεχνητά σε αρκετά στάδια τα οποία θα μπορούσαν να αποφευχθούν εάν υπάρχει μια φυσική πηγή (Hinou et al. 1999).

Εκτός από τα μονομερή, τα ολιγομερή που υπάρχουν στο *ulvan* θα μπορούσαν να βρουν εφαρμογή συνδεδεμένη με τις βιολογικές τους ιδιότητες. Διάφορες ερευνητικές εργασίες έδειξαν ότι το *ulvan* και οι πολυσακχαρίτες του έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες, ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα και έχουν και αντιπηκτικές ιδιότητες (Mao et al. 2006). Το *ulvan* επίσης έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες και μειώνει την ηπατοτοξικότητα με βάση πειράματα που έγιναν σε ποντίκια (Qi et al. 2006).

Διάφορες μελέτες αντιμετωπίζουν το *ulvan* πιο συγκεκριμένα ως διατροφικό συμπλήρωμα από την *Ulva sp.* γνωστή και ως 'θαλάσσιο μαρούλι'. Ως μέλος των πολυσακχαριδίων του κυτταρικού τοιχώματος, το *ulvan* δεν διασπάται από τα ανθρώπινα ενδογενή ένζυμα και κατηγοριοποιείται ως φυτική ίνα (Lahaye et al. 1997). Περιορίζει την αποσύνθεση άλλων φυτικών ινών από την ανθρώπινη εντερική χλωρίδα και έτσι συνεισφέρει στην κατακράτηση νερού από τις φυτικές ίνες (Bobin-Dubigeon et al. 1997). Αυτά τα χαρακτηριστικά είναι τυπικά των φυτικών ινών οι οποίες βοηθούν στην πρόληψη δυσλειτουργιών του εντερικού συστήματος. Το *ulvan* επίσης ρυθμίζει το

μεταβολισμό των λιπών. Αυξάνει την HDL καλή χοληστερόλη και μειώνει τα επίπεδα της LDL κακής χοληστερόλης και των τρι-γλυκεριδίων τα οποία θεωρούνται σημαντικοί παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα (Yu et al. 2003).

Ωστόσο, έχει ενδιαφέρον το γεγονός ότι πολύ λίγη βιβλιογραφία είναι αφιερωμένη στις αγροτικές χρήσεις του ulvan. Εκτός από κομπόστ, η αφύπνιση του συστήματος άμυνας των φυτών και της ανάπτυξης τους δεν έχει μελετηθεί. Εκχύλισμα από ulvan έδειξε ότι αφυπνίζει το αμυντικό σύστημα του *Medicago truncatula*, και το ulvan προστάτευσε το φυτό από τον παθογόνο μύκητα *Colletrichum trifolii* (Cluzet et al. 2004). Άλλες πρόσφατες μελέτες αφορούν το ρυθμό απορρόφησης του αζώτου και την αντίσταση σε ασθένειες από τα φυτά που έχουν λιπανθεί με ulvan (Briand et al. 2005).

Ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό του ulvan είναι η δυνατότητα του να δημιουργεί gel. Οι McKinnel και Percival ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν το σχηματισμό ενός ισχυρού gel από εκχύλισμα από *Ulva lactuca*. Αργότερα ο Haug ανακάλυψε ότι βορικό οξύ, ιόντα ασβεστίου και pH ανάμεσα σε 7.5-8 χρειάστηκε για το σχηματισμό gel από εκχύλισμα από *Ulva lactuca*. Η μοναδική αυτή ιδιότητα του ulvan να δημιουργεί gel, προσφέρει πιθανές λύσεις όταν η υφή πρέπει να ελέγχεται με ακρίβεια από κατιόντα, pH, ή θερμοκρασία.

4.2 Γενικά Συμπεράσματα

Μερικά γενικά συμπεράσματα σχετικά με τα πλεονεκτήματα της καλλιέργειας των πράσινων μακροαλγών *Ulva lactuca* και *Ulvaria fusca* και της ενσωμάτωσής τους σε εγκαταστάσεις βιοκαυσίμων αναφέρονται παρακάτω:

1. *Ulvan* και προϊόντα

Το πρόσφατο ενδιαφέρον ως προς το *ulvan* ξεκίνησε λόγω των φυσικοχημικών και βιολογικών του ιδιοτήτων που μόλις ξεκίνησαν να περιγράφονται. Η ασυνήθιστη χημική του σύσταση και η δομή του που συνδυάζουν ουρονικά οξέα, θειικές ομάδες και σπάνια σάκχαρα, όπως η ραμνόζη και το ιδουρονικό οξύ μόλις αποκαλύφθηκαν.

Οι δυνητικές δραστηριότητες του *ulvan* συνοψίζονται παρακάτω:

- Αντιπηκτικές ιδιότητες
- Αντιοξειδωτικές ιδιότητες
- Αντικαρκινικές ιδιότητες
- Αφυπνίζει το αμυντικό σύστημα
- Δημιουργεί gel
- Βελτιώνει την απορρόφηση αζώτου

2. Υψηλή απορρόφηση θρεπτικών

Η *Ulva lactuca* και άλλα πράσινα άλγη έχουν την ιδιότητα να απορροφούν και να αποθηκεύουν θρεπτικά όπως NO_3 , NH_4 , και PO_4 είτε για δημιουργία βιομάζας είτε για να τα χρησιμοποιήσουν μελλοντικά. Αυτό μπορεί κανείς να το εκμεταλλευτεί ώστε να μειώσει τις ανεπιθύμητες συγκεντρώσεις θρεπτικών σε υγρά λύματα ή σαν ένα επιπλέον βήμα επεξεργασίας (3^α) σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων.

3. Όχι γεωργική γη – Όχι γλυκό νερό

Η *Ulva* sp. μπορεί να καλλιεργηθεί σε ανοικτή θάλασσα, είτε σε δεξαμενές με θαλασσινό νερό και έτσι δεν ανταγωνίζεται με άλλες γεωργικές καλλιέργειες για τη διαθεσιμότητα γης. Αυτό καθιστά τα μακροάλγη μοναδική λύση για χώρες που έχουν μικρή επιφάνεια αλλά περικλείονται από θάλασσα. Επιπλέον, τα μακροάλγη δεν χρειάζονται γλυκό νερό σε αντίθεση με τις υπόλοιπες γεωργικές καλλιέργειες και αυτό τους δίνει ένα ακόμα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα.

4. Υψηλό περιεχόμενο σε υδατάνθρακες/σάκχαρα

Η *Ulva* sp. αποτελείται σε μεγάλο μέρος από υδατάνθρακες οι οποίοι την καθιστούν μια καλή πρώτη ύλη για την παραγωγή κυτταρινικής αιθανόλης. Εκτός από τους μονοσακχαρίτες και τους ολιγοσακχαρίτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή προϊόντων υψηλής αξίας, τα υπόλοιπα σάκχαρα μπορούν να περάσουν από αλκοολική ζύμωση και έτσι να παραχθεί αιθανόλη.

5. Δέσμευση CO₂ κατά την καλλιέργεια

Όπως συμβαίνει και με το φυτοπλαγκτόν, έτσι και τα μακροάλγη μπορούν να δεσμεύσουν διοξείδιο του άνθρακα καθώς μεγαλώνουν. Η *Ulva* sp. είναι ένας φωτοσυνθετικός οργανισμός που χρειάζεται CO₂ για την κατασκευή νέας βιομάζας και για άλλες μεταβολικές δραστηριότητες. Η καλλιέργεια της *Ulva* sp. εκτός από μία βιώσιμη πηγή βιομάζας βοηθά επίσης και στη μείωση των εκπομπών του CO₂.

6. Υψηλή παραγωγή και υψηλός ρυθμός ανάπτυξης σε σχέση με άλλες βιομάζες
Η παραγωγική ικανότητα της *Ulva sp.* είναι στο εύρος των 50-75 τόνων ανά έτος ανά στρέμμα, περίπου 10 φορές υψηλότερη από αυτή του καλαμποκιού. Ο ρυθμός ανάπτυξης είναι επίσης σχετικά υψηλός, καθιστώντας έτσι την *Ulva sp.* ανταγωνιστική σε σχέση με άλλα μακροάλγη.

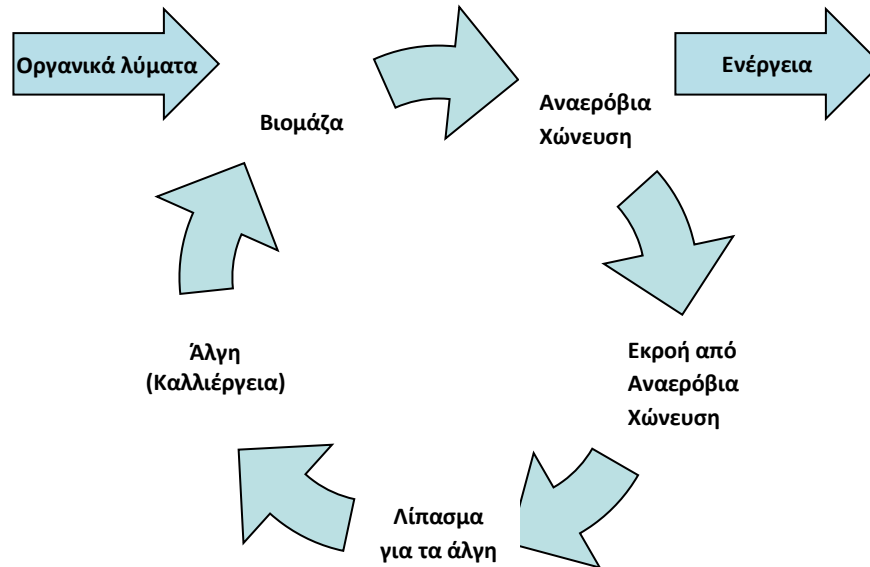
7. Πράσινες Παλίρροιες και ένταξη σε μονάδες επεξεργασίας
Υπάρχουν κάποιες εποχές του χρόνου όπου συμβαίνει πολύ έντονη άνθηση και μεγάλες ποσότητες μπλε-πράσινων αλγών (συμπεριλαμβανομένων των *U.lactuca* και *U. fusca*) συσσωρεύονται στις ακτές προκαλώντας τοπική περιβαλλοντική όχληση καθώς αποσυντίθενται. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να αντιμετωπιστεί αν αυτά τα άλγη συλλεχθούν και ενσωματωθούν σαν πηγή βιομάζας σε τοπικές εγκαταστάσεις παραγωγής βιοαερίου, χωρίς επιπλέον κόστος.

8. Ανακύκλωση της κοπριάς και της βιομάζας των αλγών
Σύμφωνα με την πειραματική δουλειά αυτής και άλλων μελετών φαίνεται ότι η ΧΚΧ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή θρεπτικών για την καλλιέργεια των πράσινων μακροαλγών *Ulva lactuca* και *Ulvaria fusca*. Επιπλέον, αυτά τα πράσινα μακροάλγη μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν υπόστρωμα για την παραγωγή βιοαερίου κάτω από αναερόβιες συνθήκες.

4.3 Μελλοντικές Προοπτικές

- Είναι απαραίτητη η έρευνα για την εύρεση αποτελεσματικής προ-επεξεργασίας αυτού του κυτταρινικού υλικού για την βελτίωση της ανάκτησης σακχάρων και την αποφυγή δημιουργίας αναχαιτιστών κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Πλάνα συνεργασίας και επένδυσης πρέπει να συνδυαστούν με στόχο την αύξηση της αποτελεσματικότητας της υδρόλυσης και της μείωσης του κόστους των ενζύμων. Βελτιστοποίηση της διαδικασίας της ζύμωσης πρέπει να επιτευχθεί, μέσω της αναγνώρισης και της χρήσης μικροοργανισμών (γενετικά τροποποιημένων ή μη) οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιήσουν τόσο εξόζες όσο και πεντόζες με υψηλή αντοχή στη συγκέντρωση αναχαιτιστών, υποστρώματος, και προϊόντος (π.χ. αιθανόλη) αλλά και υψηλή παραγωγική ικανότητα αιθανόλης.
- Περαιτέρω μελέτη της δομικής ιδιομορφίας του ινvan χρειάζεται σε σχέση με τις λειτουργικές του ιδιότητες και χρήσεις. Πιο συγκεκριμένα οι μηχανισμοί οι οποίοι ελέγχουν τη δημιουργία του gel παραμένουν ανεξιχνίαστοι και χωρίς αμφιβολία θα συνεισφέρουν στην ανάπτυξη πολλών χρήσεων αυτής της άφθονης ανανεώσιμης βιομάζας. Ένα μελλοντικό θέμα έρευνας θα μπορούσε να είναι η απομόνωση των χρήσιμων πολυμερών από το μελετώμενο είδος αλγών και στη συνέχεια η ζύμωση των σακχάρων που απομένουν για την παραγωγή αιθανόλης.
- Ένα βιώσιμο σύστημα θα μπορούσε να τεθεί σε εφαρμογή σύμφωνα με το οποίο τα άλγη μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν πηγή βιομάζας σε συνδυασμό με οργανικά λύματα σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων και παραγωγής βιοαερίου. Η εκρέουσα χωνεμένη κοπριά μπορεί να επεξεργαστεί περαιτέρω και να χρησιμοποιηθεί σαν λίπασμα για περεταίρω καλλιέργεια των αλγών.

Τέλος η νέα βιομάζα από τα άγη μπορεί να επανεισαχθεί στο σύστημα κ.ο.κ. Η Εικόνα 31 παρουσιάζει σχηματικά ένα τέτοιο σύστημα.



Εικόνα 31 Βιώσιμο σύστημα όπου χρησιμοποιούνται βιομάζα από άγη και οργανικά λύματα

Τέλος θα μπορούσε να μελετηθεί η εισαγωγή του παραγόμενου βιοαερίου από την αναερόβια χώνευση μέσα στο διάλυμα/νερό όπου καλλιεργούνται τα άγη. Τα άγη δεσμεύουν CO_2 ώστε να καλύψουν τις ανάγκες τους σε άνθρακα. Το συμβατικό βιοαέριο περιέχει περίπου 50% διοξείδιο του άνθρακα. Τα άγη μπορούν να δεσμεύσουν ένα μέρος αυτού καταλήγοντας σε ένα πιο καθαρό αέριο με μεγαλύτερη συγκέντρωση μεθανίου.

5 Βιβλιογραφία

Albersheim P. "The primary cell wall. In Plant Biochemistry" 3rd Edition, pp 225-274. Academic Press, New York (1976)

Antoine P, Taillieu X, Thonart P. "The degradation of L-tyrosine to phenol and benzoate in pig manure : The role of 4-hydroxy-benzoate." (1997)

Besada V, Andrade JM, Schultze F, Gonzalez JJ "Heavy metals in edible seaweeds commercialised for human consumption". (2009)

Bruhn Annete , Dahl Jonas, Bangs Nielsen Henrik, Nikolaisen Lars, Rasmussen Michael Bo , Markager Stiig , Olesen Birgit, Arias Carlos, Daugbjerg Jensen Peter "Bioenergy potential of Ulva lactuca: Biomass yield, methane production and combustion." Aarhus University, National Environmental Research Institute, Denmark. (2010)

Chambers B J, Nicholson F A, Soloman D R, Unwin R J. "Heavy metal loadings from animal manures to agricultural land in England and Wales"

Chandel, Anuj Kumar, Chan Es, Ravinder Rudravaram, M Lakshmi Narasu, Venkateswar Rao, Pogaku Ravindra. "Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal". (2007)

Claassen P A A, Van Lier J B, Lopez Contreras A M, Van Niel E W J, Sijtsma L, Stams A J M, De Vries S S, Weusthuis R A. "Utilization of biomass for the supply of energy carriers". (1999)

Chen Ye, Cheng Jay J, Creamer Kurt S. "Inhibition of anaerobic digestion process: A review". Department of Biological and Agricultural Engineering, North Carolina State University. (2007)

Christensen H F, Sand-Jensen K. "Growth rate and carbon affinity of *Ulva lactuca* under controlled levels of carbon, pH and oxygen". (1990)

Demirbas A. "Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review". (2009).

Feijoo Gumersindo, Soto Manuel, Mhdez Ramh and Lema Juan M. "Sodium inhibition in the anaerobic digestion process: Antagonism and adaptation phenomena". (1994)

Fleurence J, LeCoeur C, Mabeau S, Maurice M, Landrein A. "Comparison of different extractive procedures for proteins from the edible seaweeds *Ulva rigida* and *Ulva rotundata*". (1995)

Fortes M D, Luning K, "Growth rates of North Sea macroalgae in relation to temperature, irradiance and photoperiod". (1980)

Georgieva Tania I, Mikkelsen Marie J, Ahring Birgitte K. "High ethanol tolerance of the thermophilic anaerobic ethanol producer *Thermoanaerobacter* BG1L1." (2007)

Girio F M, Fonseca C, Carvalheiro F, Duarte L C, Marques S. "Bioresource technology hemicelluloses for fuel ethanol: A review." (2010)

Hankins S, Sutton A, Patterson J, Adeola L, Richert B, Heber A, Kelly D, Kephart K, Mumma R, and Bogus E. "Reduction of Odorous Sulfide and Phenolic Compounds in Pig Manure Through Diet Modification". Department of Animal Sciences, Purdue University, and Pennsylvania State University. (2000)

Hartman Eviana "A Promising Oil Alternative: Algae Energy". Washington. (2008)

Inderwildi Oliver R, King David A. "Quo Vadis Biofuels". (2009)

Karakashev Dimitar, Belinda Anne, Angelidaki Irini. "Anaerobic biotechnological approaches for production of liquid energy carriers from biomass." (2007)

Keestra et al. "The structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components". (1973)

Kuligowski Ksawery, Poulsen Tjalfe G., Stoholm Peder, Pind Niels, Laursen Jens. "Nutrients and heavy metals distribution in thermally treated pig manure". Nantes, France. (2008)

Lahaye M and Robic A. "Structure and Functional Properties of Ulvan, a Polysaccharide from Green Seaweeds". INRA, Nantes, France. (2007)

[.http://pubs.acs.org/doi/citedby/10.1021/bm061185q](http://pubs.acs.org/doi/citedby/10.1021/bm061185q)

Lahaye Marc, Brunel Magali, Bonnin Estelle. "Fine chemical structure analysis of oligosaccharides produced by an ulvan-lyase degradation of the water-soluble cell-wall polysaccharides from *Ulva* sp. (Ulvales, Chlorophyta)" Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire de Biochimie et Technologie des Glucides. (1997)

Løvstad Holdt Susan & Kraan Stefan "Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation". (2010)

Lynd Lee R. "Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, Economics, the Environment and Policy." (1996)

Lundberg Peter, Weich Raer G, Jensen Paul, and Vogel Hans J. "Phosphorus-31 and Nitrogen-14 NMR Studies of the Uptake of Phosphorus and Nitrogen Compounds in the Marine Macroalgae *Ulva lactuca*." (1988)

Lynd Lee R. "Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, Economics, the Environment and Policy." (1996)

Lyngby Jens Erik, Mortensen Sverre and Ahrensberg Nick "Bio assessment Techniques for Monitoring of Eutrophication and Nutrient Limitation in Coastal Ecosystems". VKI Institute for the Water Environment, Denmark. (1999)

Magnusson Gunilla, Larsson Christler and Axelsson Lennart. "Effects of high CO₂ treatment on nitrate and ammonium uptake by *Ulva lactuca* grown in different nutrient regimes". Dept. of Marine Botany, University of Goteborg, Sweden. (1996)

Mendoza Huaitalla, Gallmann, Zheng , Liu. "Composition of pig manures and wastewaters under the gan qing fen system in China". (2009)

Msuya F, Neori A. "Effect of water aeration and nutrient load level on biomass yield, N uptake and protein content of the seaweed *Ulva lactuca* cultured in seawater tanks". (2008)

Olsson Lisbeth Bärbel Hahn-Hägerdal. "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production." (1996)

O'Sullivan Laurie, Murphy Brian, McLoughlin Peter, Duggan Patrick, Peadar G. Lawlor , Hughes Helen and Gardiner Gillian E. "Prebiotics from Marine Macroalgae for Human and Animal Health Applications". (2010)

Pádua Márcia, Growoski Fontoura Paulo Sérgio and Mathias Alvaro Luiz. "Chemical Composition of *Ulvaria oxysperma* (Kützinger) Bliding, *Ulva lactuca* (Linnaeus) and *Ulva fasciata* (Delile)." Universidade Federal do Paraná, Brazil. (2004)

Richards B. "In situ methane enrichment in methanogenic energy crop digesters". (1994)

Richards B, Cummings R, White T, Jewell W. "Methods for kinetic analysis of methane fermentation in high solids biomass digesters". (1991)

Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, and Crocker D. "Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP)". (2008)

Somerville Chris "Development of Cellulosic Biofuels". U.S. Dept. of Agriculture. (2008)

Sommer P. "Conversion of hemicellulose and D-xylose into ethanol by the use of thermophilic anaerobic bacteria." Ph.D Thesis, Technical University of Denmark. (1998)

Talebnia Farid, Karakashev Dimitar, Angelidaki Irini. "Bioresource technology production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation." (2010)

Taylor Mark P, Eley Kirsten L, Martin Steve, Tuffin Marla I, Burton Stephanie G, Cowan Donald A. "Thermophilic ethanogenesis: future prospects for second generation bioethanol production." (2009)

Tower P, Wetzel J, Lombard X. "New Landfill Gas Treatment Technology Dramatically Lowers Energy Production Costs". (2006)

Tutor Ale Marcel , Dalgaard Mikkelsen Jørn & Meyer Anne S. "Differential growth response of *Ulva lactuca* to ammonium and nitrate assimilation". (2010)

Webber Michael E and Cuellar Amanda D "Cow Power. In the News: Short News Items of Interest to the Scientific Community." (2008)

Yu Qiming, Matheickal Jose T., Yin Pinghe and Kaewsarn Pairat. "Heavy metal uptake capacities of common marine macro algal biomass". School of Environmental Engineering, Griffith University, Australia. (1998)

Zaldivar J J, Olsson Nielsen L. "Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration." (2001)

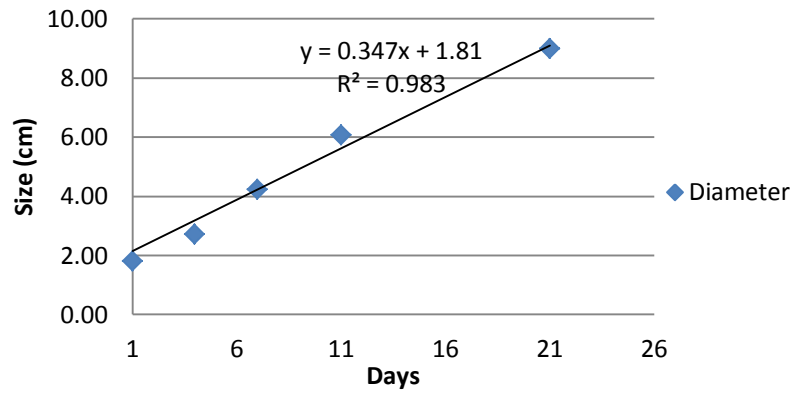
Παράρτημα Α

Contamination Control - Cultivation

Table A.1. Weight measurements. No antibiotics pre-treatment- No GeO₂

a/a	Sample	Weight (g) Day 1	Average Weight (g) Day 1	Weight (g) Day 4	Average Weight (g) Day 4	Weight (g) Day 7	Average Weight (g) Day 7	Weight (g) Day 11	Average Weight (g) Day 11	Specific Growth rate (d ⁻¹)
1	No GeO₂ No Antib. (1)	0.0153	0.0142	0.0385	0.0378	0.0760	0.0820	0.1306	0.1484	0.2246
2		0.0133		0.0399		0.0900		0.1182		
3		0.0150		0.0351		0.0703		0.1380		
4		0.0135		0.0362		0.0750		0.1983		
5		0.0141		0.0392		0.0988		0.1570		
6	No GeO₂ No Antib. (2)	0.0150	0.0142	0.0433	0.0353	0.0902	0.0858	0.2141	0.1930	0.2321
7		0.0135		0.0402		0.0821		0.2032		
8		0.0141		0.0380		0.0850		0.0502		
9		0.0142		0.0304		0.0287		0.0710		
10		0.0141		0.0244		0.0439		0.1617		
11	No GeO₂ No Antib. (3)	0.0153	0.0153	0.0376	0.0371	0.0580	0.0918	0.1605	0.1832	0.2403
12		0.0133		0.0326		0.0896		0.1654		
13		0.0161		0.0465		0.0853		0.2146		
14		0.0154		0.0371		0.1067		0.1923		
15		0.0162		0.0319		0.0857		0.0711		

Size Growth of *U.lactuca*



Growth rates of *U.lactuca*

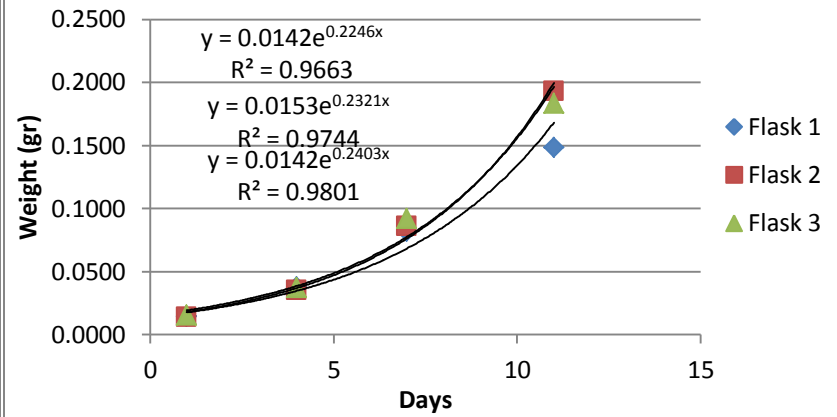
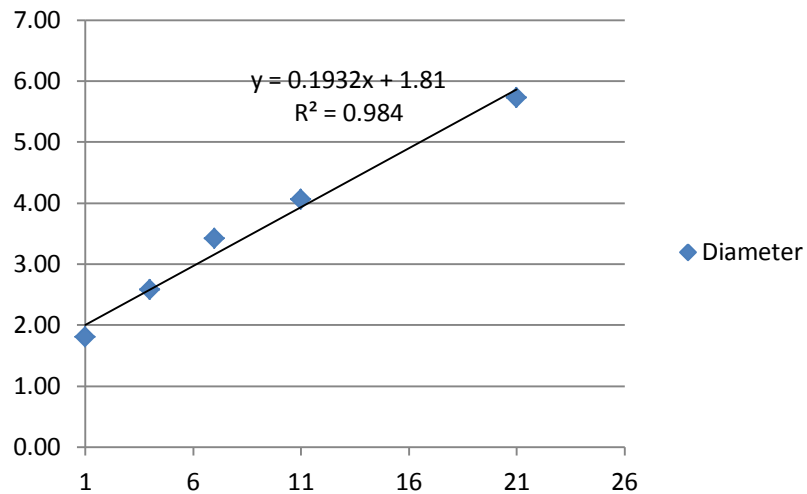


Table A.2. Weight measurements. No antibiotics pre-treatment- GeO₂

a/a	Sample	Weight (g) Day 1	Average Weight (g) Day 1	Weight (g) Day 4	Average Weight (g) Day 4	Weight (g) Day 7	Average Weight (g) Day 7	Weight (g) Day 11	Average Weight (g) Day 11	Specific Growth rate (d ⁻¹)
1	GeO₂ No Antib. (1)*	0.0153	0.0142	0.0344	0.0291	0.0578	0.0431	0.0519	0.0487	0.1294
2		0.0133		0.0259		0.0321		0.0437		
3		0.0150		0.0283		0.0467		0.0565		
4		0.0135		0.0327		0.0359		0.0406		
5		0.0141		0.0242		0.0430		0.0508		
6	GeO₂ No Antib. (2)	0.0150	0.0142	0.0333	0.0328	0.0856	0.0657	0.0904	0.0860	0.1812
7		0.0135		0.0339		0.0555		0.0719		
8		0.0141		0.0352		0.0672		0.1011		
9		0.0142		0.0313		0.0485		0.0850		
10		0.0141		0.0301		0.0615		0.0818		
11	GeO₂ No Antib. (3)	0.0153	0.0153	0.0363	0.0323	0.0287	0.0846	0.1342	0.1358	0.2084
12		0.0133		0.0391		0.0802		0.1263		
13		0.0161		0.0418		0.0935		0.1469		
14		0.0154		0.0211		0.0801		0.0313		
15		0.0162		0.0234		0.0270		0.0262		

Size Growth of *U.lactuca*



Growth rates of *U.lactuca*

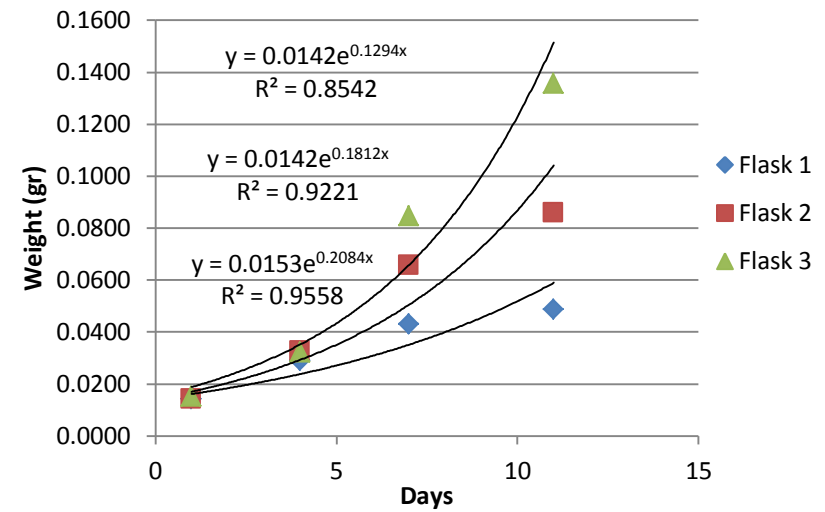
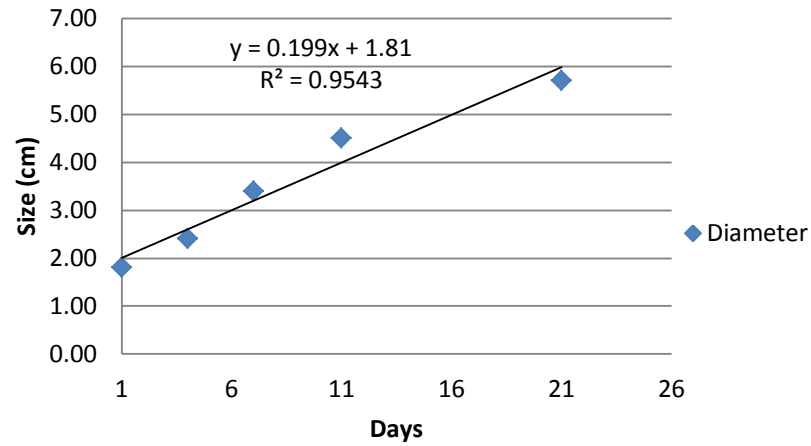


Table A.3. Weight measurements. 1.5ml antibiotics pre-treatment- GeO₂

a/a	Sample	Weight (g) Day 1	Average Weight (g) Day 1	Weight (g) Day 4	Average Weight (g) Day 4	Weight (g) Day 7	Average Weight (g) Day 7	Weight (g) Day 11	Average Weight (g) Day 11	Specific Growth rate (d ⁻¹)
1	GeO₂ 1.5ml Antib. (1)*	0.0153	0.0142	0.0187	0.0179	0.0450	0.0385	0.0672	0.1020	0.1583
2		0.0133		0.0174		0.0385		0.1404		
3		0.0150		0.0205		0.0283		0.0569		
4		0.0135		0.0183		0.0376		0.0948		
5		0.0141		0.0146		0.0431		0.1056		
6	GeO₂ 1.5ml Antib. (2)	0.0150	0.0142	0.0288	0.0271	0.0622	0.0587	0.0988	0.0912	0.1763
7		0.0135		0.0266		0.0561		0.0953		
8		0.0141		0.0258		0.0634		0.0897		
9		0.0142		0.0280		0.0522		0.0892		
10		0.0141		0.0261		0.0595		0.0830		
11	GeO₂ 1.5ml Antib. (3)	0.0153	0.0153	0.0301	0.0264	0.0780	0.0696	0.0737	0.0782	0.1643
12		0.0133		0.0245		0.0646		0.0846		
13		0.0161		0.0203		0.0534		0.0865		
14		0.0154		0.0262		0.0775		0.0830		
15		0.0162		0.0309		0.0744		0.0633		

Size growth of *U.lactuca*



Growth rates of *U.lactuca*

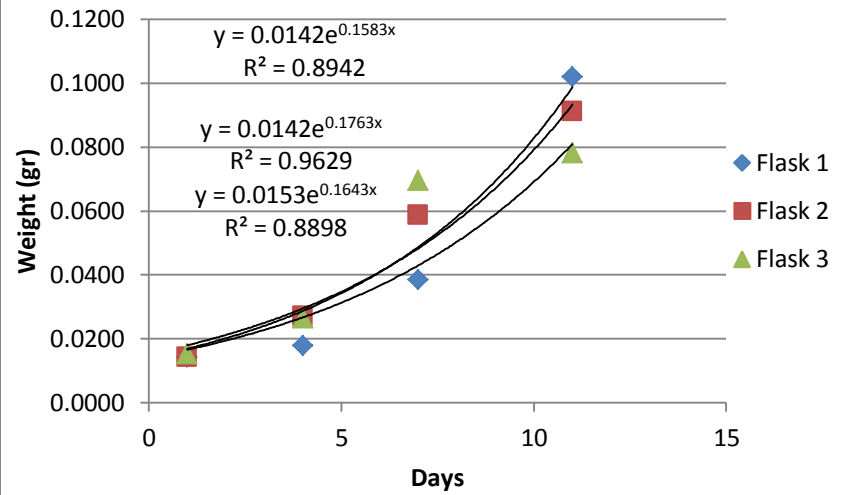
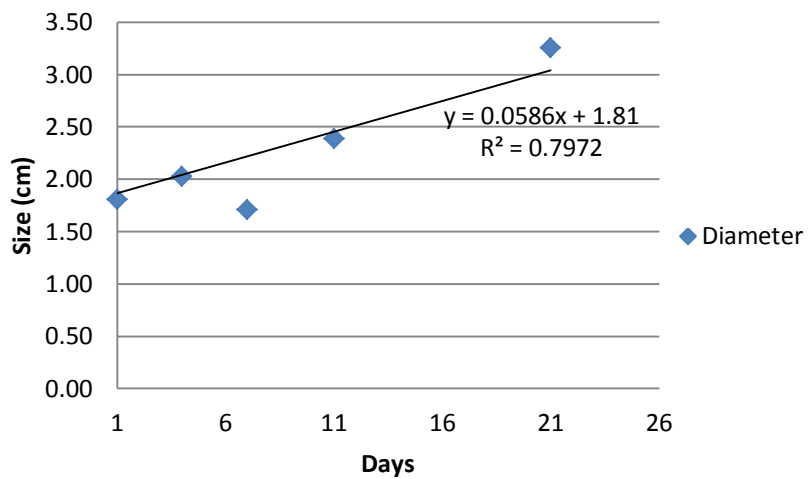


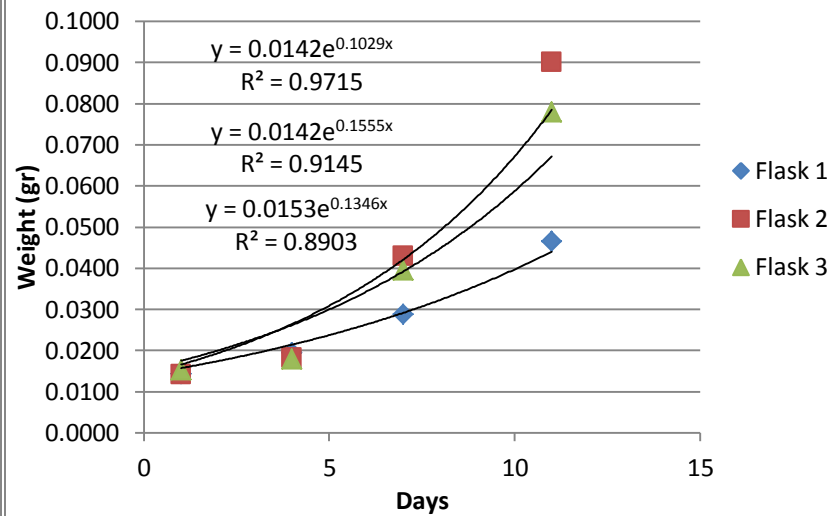
Table A.4. Weight measurements. 1.5ml antibiotics pre-treatment- GeO₂

a/a	Sample	Weight (g) Day 1	Average Weight (g) Day 1	Weight (g) Day 4	Average Weight (g) Day 4	Weight (g) Day 7	Average Weight (g) Day 7	Weight (g) Day 11	Average Weight (g) Day 11	Specific Growth rate (d ⁻¹)
1	GeO₂ 3ml Antib. (1)*	0.0153	0.0142	0.0272	0.0195	0.0345	0.0288	0.0733	0.0464	0.1029
2		0.0133		0.0185		0.0375		0.0450		
3		0.0150		0.0156		0.0183		0.0484		
4		0.0135		0.0148		0.0280		0.0216		
5		0.0141		0.0212		0.0256		0.0439		
6	GeO₂ 3ml Antib. (2)	0.0150	0.0142	0.0191	0.0182	0.0843	0.0430	0.2001	0.0901	0.1555
7		0.0135		0.0195		0.0585		0.1795		
8		0.0141		0.0177		0.0200		0.0235		
9		0.0142		0.0197		0.0291		0.0311		
10		0.0141		0.0151		0.0231		0.0161		
11	GeO₂ 3ml Antib. (3)	0.0153	0.0153	0.0172	0.0179	0.0605	0.0395	0.1917	0.0780	0.1346
12		0.0133		0.0171		0.0635		0.1177		
13		0.0161		0.0174		0.0205		0.0208		
14		0.0154		0.0183		0.0320		0.0351		
15		0.0162		0.0193		0.0210		0.0245		

Size growth of *U.lactuca*



Growth rates of *U.lactuca*

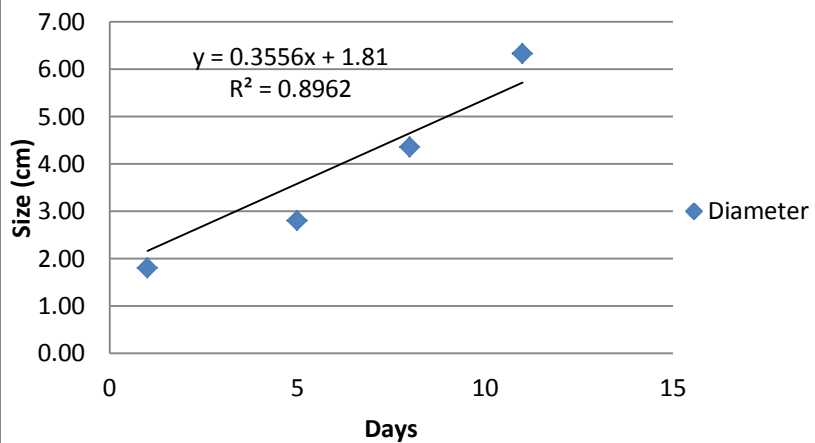


Nutrient Source – Cultivation

Table A.5. Weight measurements – NO₃ culture medium – *Ulva lactuca*

a/a	Sample	Weight (g) Day1	Average Weight (g) Day 1	Weight (g) Day 5	Average Weight (g) Day 5	Weight (g) Day 8	Average Weight (g) Day 8	Weight (g) Day 11	Average Weight (g) Day 11	Specific Growth rate (d ⁻¹)
1	<i>Ulva</i> NO ₃ (F/2)	0.0160	0.0155	0.0333	0.0338	0.0944	0.0916	0.2031	0.1815	0.2141
2		0.0161		0.0344		0.0892		0.1736		
3		0.0145		0.0338		0.0912		0.1678		
4		0.0146	0.0152	0.0384	0.0368	0.0857	0.0858	0.1784	0.1803	0.2155
5		0.0147		0.0397		0.0808		0.1812		
6		0.0162		0.0322		0.0909		0.1814		
7		0.0147	0.0150	0.0385	0.0388	0.0850	0.0833	0.2010	0.2222	0.228
8		0.0148		0.0400		0.0801		0.2434		
9		0.0154		0.0378		0.0848				

Size growth of *U.lactuca*



Growth rates of *U.lactuca*

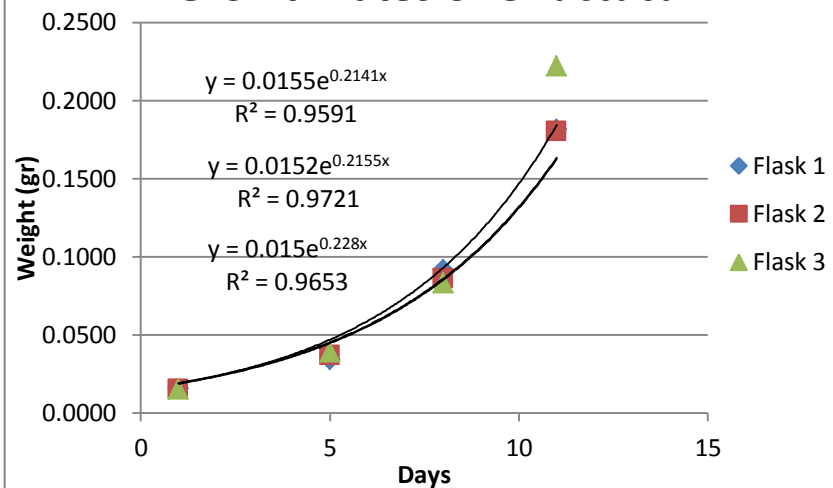


Table A.6. Weight measurements – NH₄ culture medium – *Ulva lactuca*

a/a	Sample	Weight (g) Day1	Average Weight (g) Day 1	Weight (g) Day 5	Average Weight (g) Day 5	Weight (g) Day 8	Average Weight (g) Day 8	Weight (g) Day 11	Average Weight (g) Day 11	Specific Growth rate (d ⁻¹)
1	<i>Ulva</i> NH4	0.0160	0.0155	0.0326	0.0308	0.0793	0.0726	0.1222	0.1239	0.1832
2		0.0161		0.0328		0.0687		0.1302		
3		0.0145		0.0271		0.0697		0.1194		
4		0.0146	0.0152	0.0356	0.0314	0.1126	0.0875	0.1757	0.1428	0.2004
5		0.0147		0.0306		0.0705		0.1355		
6		0.0162		0.0280		0.0795		0.1173		
7		0.0147	0.0150	0.0461	0.0353	0.0851	0.0851	0.1448	0.1437	0.2039
8		0.0148		0.0333		0.0934		0.1566		
9		0.0154		0.0265		0.0768		0.1297		

Table A.7. Weight measurements – NH₄ culture medium – *Ulvaria fusca*

a/a	Sample	Weight (g) Day1	Average Weight (g) Day 1	Weight (g) Day 5	Average Weight (g) Day 5	Weight (g) Day 8	Average Weight (g) Day 8	Weight (g) Day 11	Average Weight (g) Day 11	Specific Growth rate (d ⁻¹)
1	<i>Ulvaria</i> NH4	0.0182	0.0182	0.0354	0.0344	0.0585	0.0576	0.0688	0.0651	0.1252
2		0.0164		0.0367		0.0676		0.0555		
3		0.0199		0.0310		0.0467		0.0710		
4		0.0172	0.0176	0.0287	0.0314	0.0570	0.0625	0.0717	0.0687	0.1328
5		0.0186		0.0336		0.0683		0.0623		
6		0.0170		0.0320		0.0621		0.0722		
7		0.0186	0.0175	0.0373	0.0374	0.0600	0.0568	0.0834	0.0728	0.1369
8		0.0179		0.0392		0.0535		0.0622		
9		0.0159		0.0356						

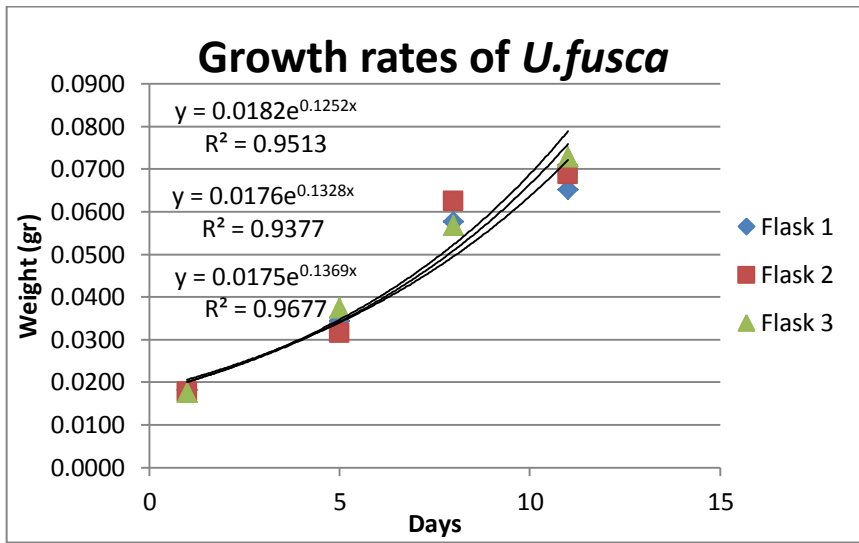
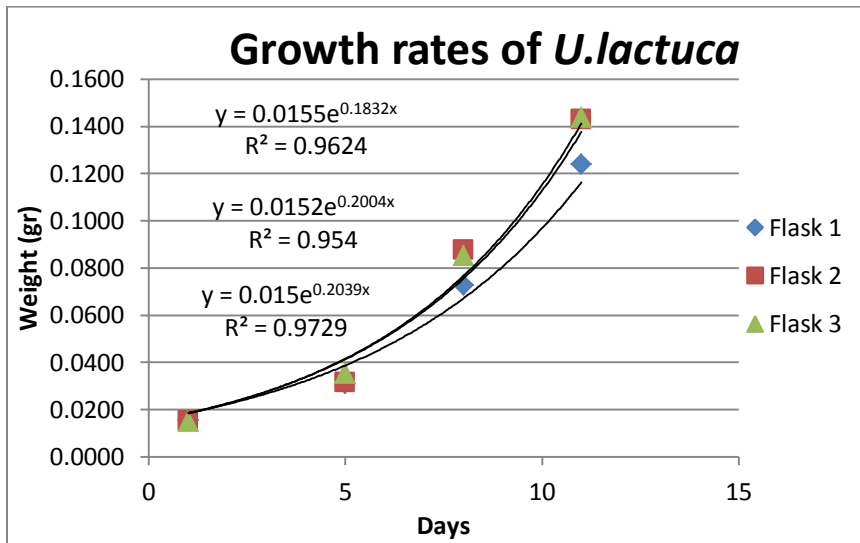
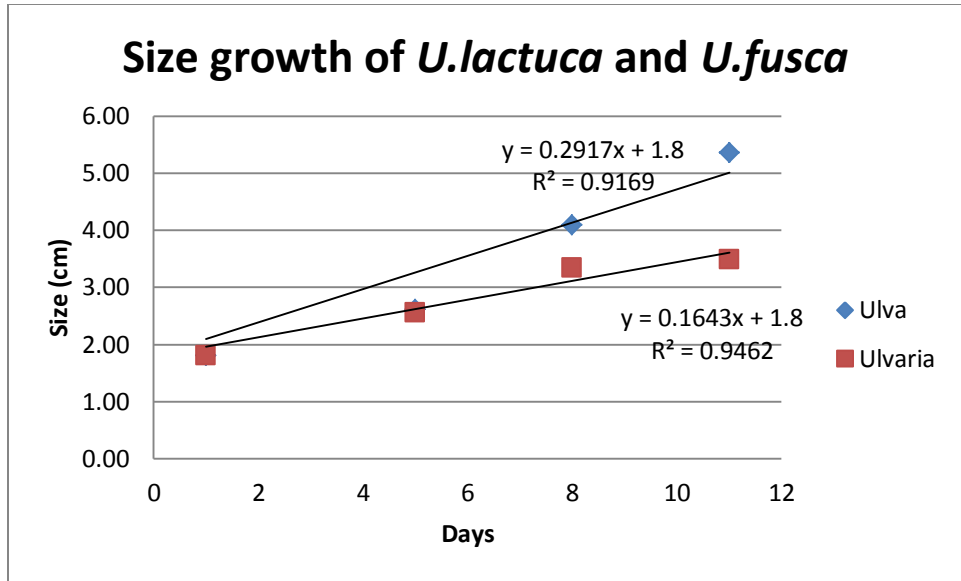


Table A.8. Weight measurements – Manure culture medium – *Ulva lactuca*

a/a	Sample	Weight (g) Day1	Average Weight (g) Day 1	Weight (g) Day 5	Average Weight (g) Day 5	Weight (g) Day 8	Average Weight (g) Day 8	Weight (g) Day 11	Average Weight (g) Day 11	Specific Growth rate (d ⁻¹)
1	Ulva manure	0.0160	0.0155	0.0286	0.0249	0.0538	0.0556	0.0845	0.0914	0.1522
2		0.0161		0.0234		0.0661		0.1088		
3		0.0145		0.0226		0.0470		0.0810		
4		0.0146	0.0152	0.0230	0.0258	0.0620	0.0495	0.1136	0.1031	0.1571
5		0.0147		0.0265		0.0440		0.1095		
6		0.0162		0.0280		0.0424		0.0862		
7		0.0147	0.0150	0.0252	0.0269	0.0585	0.0512	0.1326	0.1156	0.1669
8		0.0148		0.0247		0.0430		0.1216		
9		0.0154		0.0309		0.0521		0.0925		

Table A.9. Weight measurements – Manure culture medium – *Ulvaria fusca*

a/a	Sample	Weight (g) Day1	Average Weight (g) Day 1	Weight (g) Day 5	Average Weight (g) Day 5	Weight (g) Day 8	Average Weight (g) Day 8	Weight (g) Day 11	Average Weight (g) Day 11	Specific Growth rate (d ⁻¹)
1	Ulvaria manure	0.0182	0.0182	0.0242	0.0225			0.0555	0.0560	0.0914
2		0.0164		0.0234		0.0579				
3		0.0199		0.0200		0.0547				
4		0.0172	0.0176	0.0288	0.0254			0.0324	0.0324	0.0581
5		0.0186		0.0237		0.0333				
6		0.0170		0.0236		0.0315				
7		0.0186	0.0175	0.0244	0.0233			0.0410	0.0400	0.0716
8		0.0179		0.0261		0.0442				
9		0.0159		0.0194		0.0349				

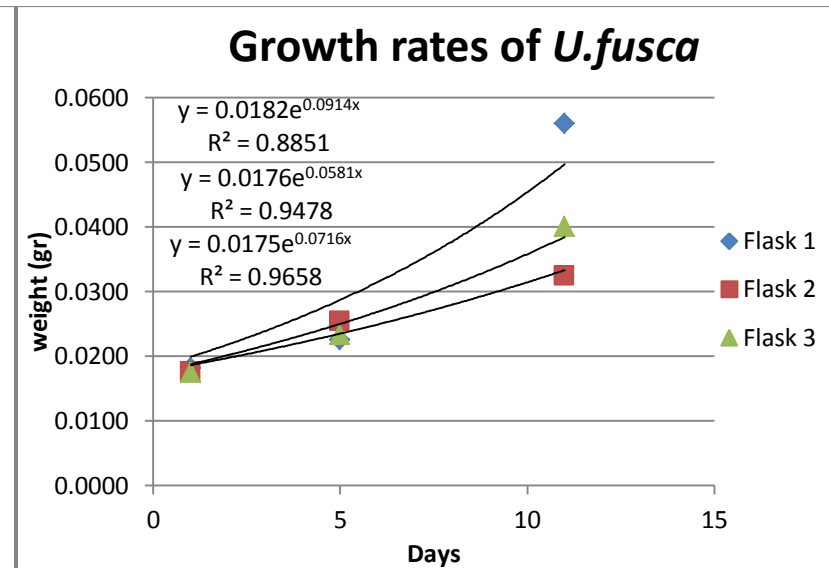
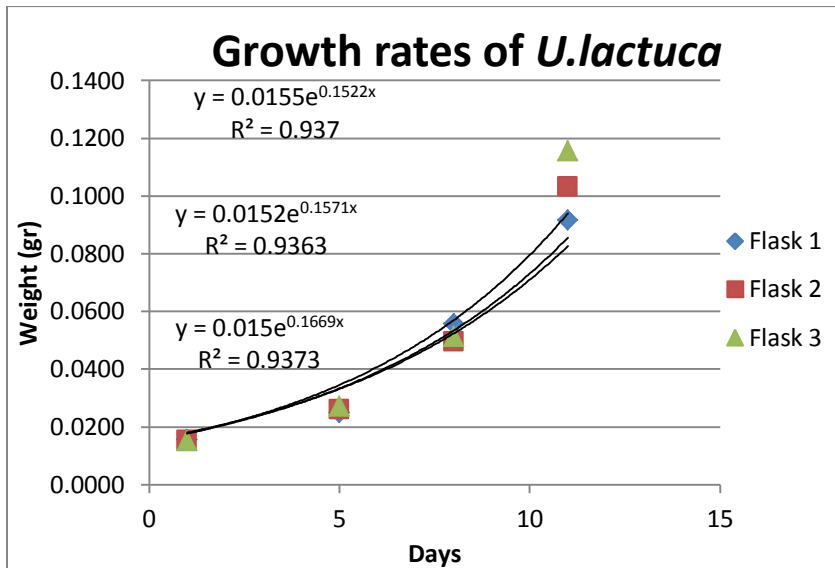
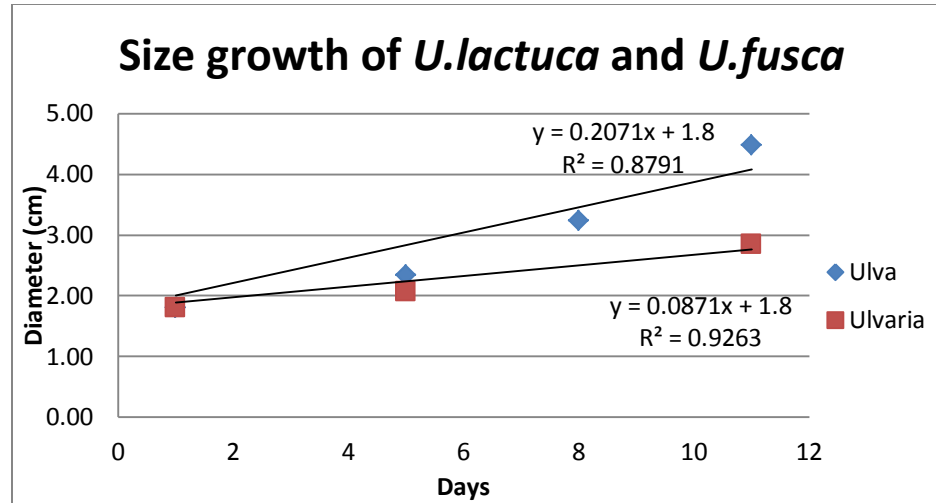


Table A.10. Weight measurements – NH₄ culture medium 1:150 – *Ulva lactuca*

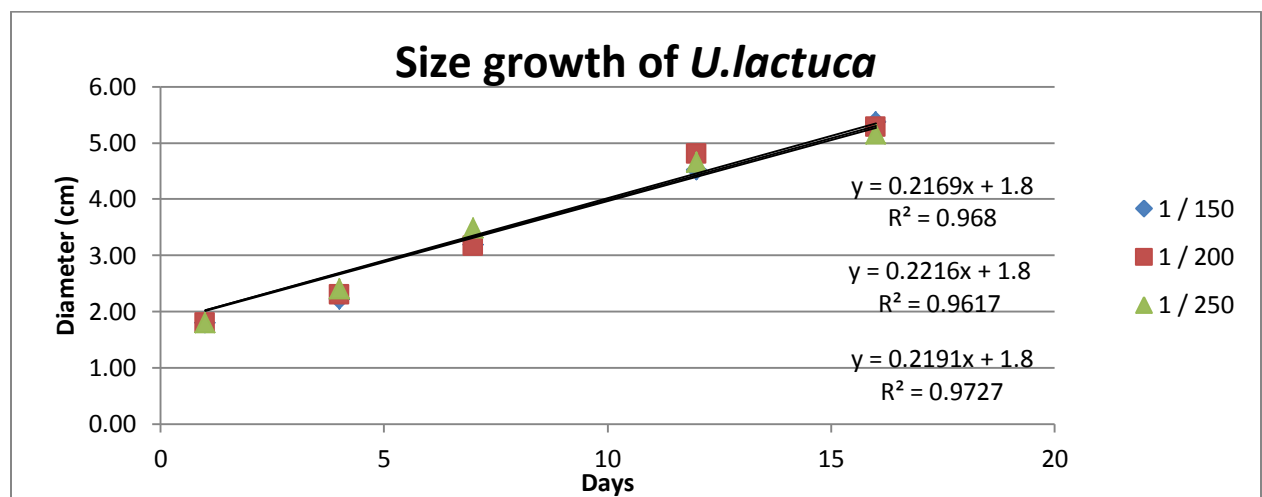
a/a	Sample	Weight (g) Day 1	Average Weight (g) Day 1	Weight (g) Day 4	Average Weight (g) Day 4	Weight (g) Day 7	Average Weight (g) Day 7	Weight (g) Day 12	Average Weight (g) Day 12	Specific Growth rate (d ⁻¹)
1	<i>Ulva</i> NH ₄ 1:150 (14.18mg N-NH ₄ /l)	0.0223	0.0216	0.0249	0.0267	0.0708	0.0581	0.1307	0.1285	0.1389
2		0.0224		0.0241		0.0547		0.1363		
3		0.0201		0.0312		0.0487		0.1184		
4		0.0206	0.0210	0.0285	0.0278	0.0556	0.0549	0.1129	0.1105	0.1323
5		0.0215		0.0258		0.0580		0.1105		
6		0.0210		0.0292		0.0511		0.1082		
7		0.0201	0.0209	0.0328	0.0276	0.0635	0.0635	0.1447	0.1247	0.1444
8		0.0221		0.0260		0.0542		0.1026		
9		0.0205		0.0241		0.0728		0.1267		

Table A.11. Weight measurements – NH₄ culture medium 1:200 – *Ulva lactuca*

a/a	Sample	Weight (g) Day 1	Average Weight (g) Day 1	Weight (g) Day 4	Average Weight (g) Day 4	Weight (g) Day 7	Average Weight (g) Day 7	Weight (g) Day 12	Average Weight (g) Day 12	Specific Growth rate (d ⁻¹)
1	<i>Ulva</i> NH ₄ 1:200 (10.64 mg N-NH ₄ /l)	0.0223	0.0216	0.0214	0.0210	0.0724	0.0693	0.1540	0.1316	0.1416
2		0.0224		0.0219		0.0668		0.1164		
3		0.0201		0.0196		0.0686		0.1245		
4		0.0206	0.0210	0.0340	0.0332	0.0440	0.0427	0.0812	0.0781	0.1074
5		0.0215		0.0373		0.0414		0.0736		
6		0.0210		0.0283		0.0428		0.0794		
7		0.0201	0.0209	0.0371	0.0351	0.0759	0.0706	0.1123	0.1164	0.1486
8		0.0221		0.0321		0.0625		0.1231		
9		0.0205		0.0361		0.0735		0.1137		

Table A.12. Weight measurements – NH₄ culture medium 1:250 – *Ulva lactuca*

a/a	Sample	Weight (g) Day 1	Average Weight (g) Day 1	Weight (g) Day 4	Average Weight (g) Day 4	Weight (g) Day 7	Average Weight (g) Day 7	Weight (g) Day 12	Average Weight (g) Day 12	Specific Growth rate (d ⁻¹)
1	<i>Ulva</i> NH ₄ 1:250 (8.51mg N-NH ₄ /l)	0.0223	0.0216	0.0292	0.0329	0.0736	0.0745	0.1311	0.1338	0.1535
2		0.0224		0.0332		0.0825		0.1505		
3		0.0201		0.0363		0.0674		0.1198		
4		0.0206	0.0210	0.0318	0.0356	0.0593	0.0631	0.1110	0.1132	0.143
5		0.0215		0.0372		0.0628		0.1249		
6		0.0210		0.0377		0.0672		0.1037		
7		0.0201	0.0209	0.0329	0.0328	0.0668	0.0652	0.1047	0.1120	0.1425
8		0.0221		0.0303		0.0643		0.1125		
9		0.0205		0.0352		0.0646		0.1188		



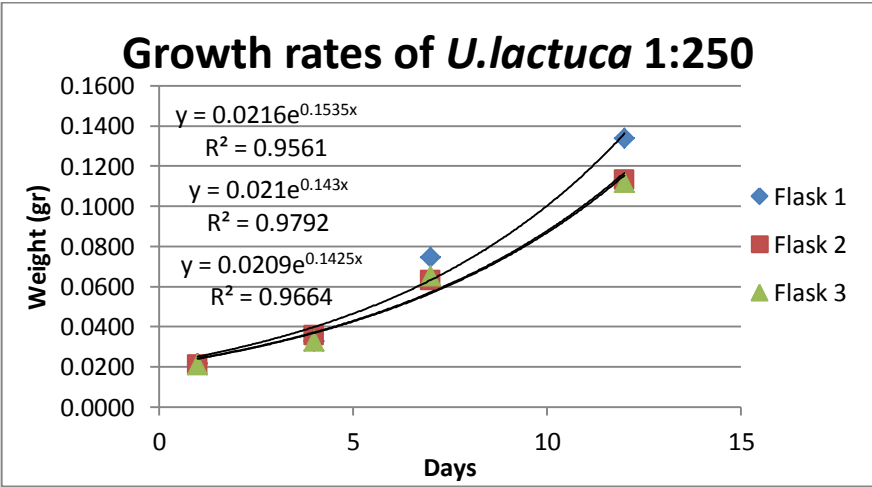
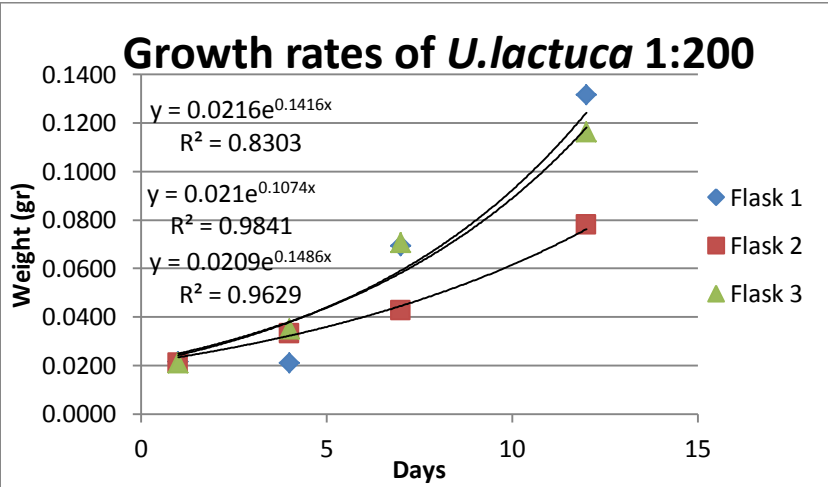
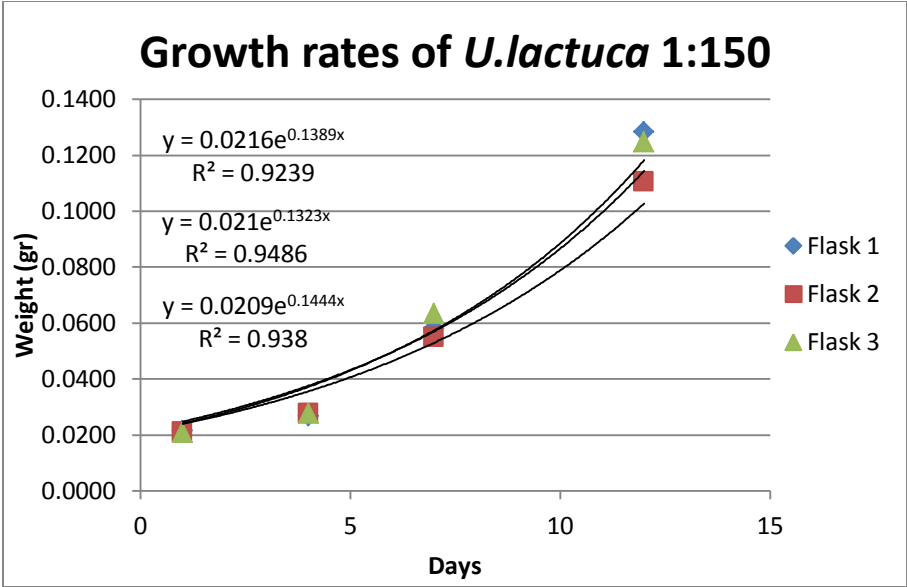


Table A.13. Weight measurements – Manure culture medium 1:150 – *Ulva lactuca*

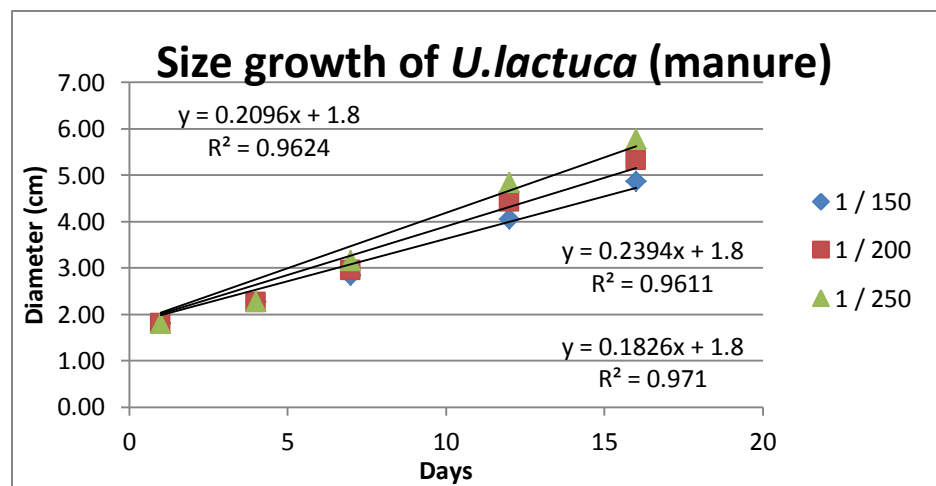
a/a	Sample	Weight (g) Day 1	Average Weight (g) Day 1	Weight (g) Day 4	Average Weight (g) Day 4	Weight (g) Day 7	Average Weight (g) Day 7	Weight (g) Day 12	Average Weight (g) Day 12	Specific Growth rate (d ⁻¹)
1	Ulva manure 1:150 (14.18mg N-NH ₄ /l)	0.0223	0.0216	0.0319	0.0293	0.0462	0.0503	0.1000	0.0977	0.1202
2		0.0224		0.0289		0.0476		0.1196		
3		0.0201		0.0270		0.0572		0.0735		
4		0.0206	0.0210	0.0351	0.0294	0.0565	0.0468	0.1248	0.1368	
5		0.0215		0.0290		0.0473		0.1712		
6		0.0210		0.0240		0.0366		0.1144		
7		0.0201	0.0209	0.0292	0.0292	0.0478	0.0472	0.0864	0.0978	
8		0.0221		0.0252		0.0453		0.1064		
9		0.0205		0.0332		0.0486		0.1005		

Table A.14. Weight measurements – Manure culture medium 1:200 – *Ulva lactuca*

a/a	Sample	Weight (g) Day 1	Average Weight (g) Day 1	Weight (g) Day 4	Average Weight (g) Day 4	Weight (g) Day 7	Average Weight (g) Day 7	Weight (g) Day 12	Average Weight (g) Day 12	Specific Growth rate (d ⁻¹)
1	Ulva manure 1:200 (10.64mg N-NH ₄ /l)	0.0223	0.0216	0.0270	0.0285	0.0564	0.0498	0.1418	0.1184	0.1304
2		0.0224		0.0308		0.0490		0.1092		
3		0.0201		0.0278		0.0440		0.1042		
4		0.0206	0.0210	0.0308	0.0279	0.0547	0.0505	0.1282	0.1182	
5		0.0215		0.0280		0.0483		0.0991		
6		0.0210		0.0250		0.0484		0.1274		
7		0.0201	0.0209	0.0316	0.0301	0.0514	0.0505	0.1127	0.1190	
8		0.0221		0.0291		0.0526		0.1204		
9		0.0205		0.0295		0.0475		0.1238		

Table A.15. Weight measurements – Manure culture medium 1:250 – *Ulva lactuca*

a/a	Sample	Weight (g) Day 1	Average Weight (g) Day 1	Weight (g) Day 4	Average Weight (g) Day 4	Weight (g) Day 7	Average Weight (g) Day 7	Weight (g) Day 12	Average Weight (g) Day 12	Specific Growth rate (d ⁻¹)
1	<i>Ulva</i> manure 1:250 (8.51mg N-NH ₄ /l)	0.0223	0.0216	0.0400	0.0325	0.0499	0.0464	0.1690	0.1725	0.152
2		0.0224		0.0303		0.0409		0.1907		
3		0.0201		0.0272		0.0484		0.1577		
4		0.0206	0.0210	0.0314	0.0307	0.0590	0.0668	0.1305	0.1155	
5		0.0215		0.0302		0.0759		0.1250		
6		0.0210		0.0304		0.0654		0.0909		
7		0.0201	0.0209	0.0301	0.0269	0.0576	0.0590	0.1473	0.1550	
8		0.0221		0.0255		0.0609		0.1644		
9		0.0205		0.0251		0.0585		0.1534		



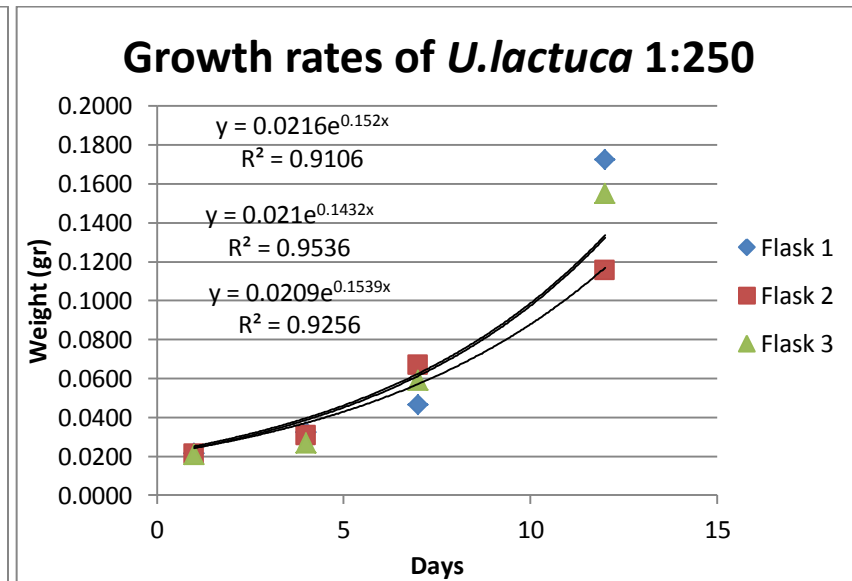
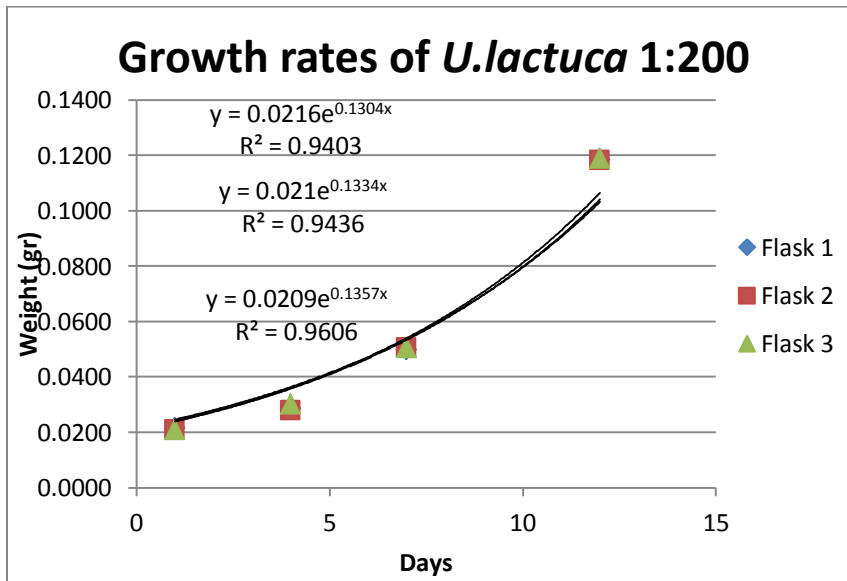
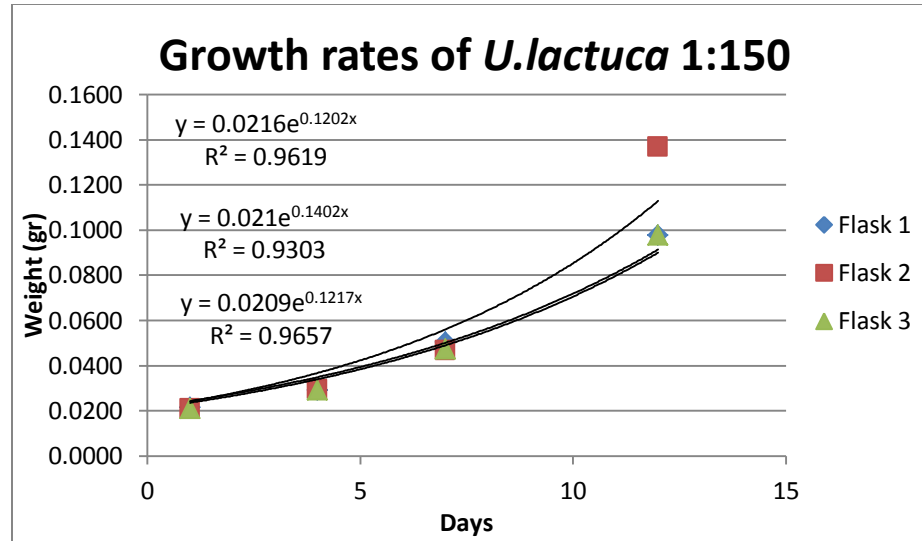


Table A.16. TS and VS of chopped, washed and non-washed *Ulva lactuca* and *Ulvaria fusca*

a/a	Sample	empty cup (g)	cup & wet sample (g)	cup & dry sample (g)	cup & ash (g)	TS (%)	TS average (%)	VS (%) of dry sample	VS average of dry sample (%)	Watercontent (%)	Watercontent average (%)	VS of wet sample (%)	VS average of wet sample (%)	Ash (%) wet sample	Ash average (%) wet sample
1	<i>Ulvaria fusca</i> salt	13.7196	23.1579	14.1967	13.8060	5.05%	6.87%	81.89%	81.25%	94.95%	93.13%	4.14%	5.57%	0.92%	1.29%
2		13.7300	21.3652	14.3180	13.8410	7.70%		81.12%		92.30%		6.25%		1.45%	
3		14.3694	21.4105	14.9220	14.4758	7.85%		80.75%		92.15%		6.34%		1.51%	
4	<i>Ulvaria fusca</i> fresh	27.3989	34.5569	27.7824	27.4324	5.36%	5.37%	91.26%	90.82%	94.64%	94.63%	4.89%	4.87%	0.47%	0.49%
5		14.3704	21.4650	14.7473	14.4050	5.31%		90.82%		94.69%		4.82%		0.49%	
6		13.9536	20.7775	14.3240	13.9893	5.43%		90.36%		94.57%		4.90%		0.52%	
7	<i>Ulva lactuca</i> salt	20.5771	28.1322	20.9299	20.6786	4.67%	4.60%	71.23%	71.10%	95.33%	95.40%	3.33%	3.27%	1.34%	1.33%
8		22.9370	30.6790	23.2967	23.0398	4.65%		71.42%		95.35%		3.32%		1.33%	
9		20.4970	29.1806	20.8865	20.6113	4.49%		70.65%		95.51%		3.17%		1.32%	
10	<i>Ulva lactuca</i> fresh	14.1914	21.9232	14.4823	14.2369	3.76%	3.57%	84.36%	82.64%	96.24%	96.43%	3.17%	2.95%	0.59%	0.62%
11		12.0053	19.5507	12.2741	12.0555	3.56%		81.32%		96.44%		2.90%		0.67%	
12		12.1914	18.0893	12.3914	12.2269	3.39%		82.25%		96.61%		2.79%		0.60%	

Table A.17. Total Kjeldahl Nitrogen in *Ulva lactuca* and *Ulvaria fusca*

a/a	Sample	Weight (g)	HCl (ml)	N (g/kg)	Average N	St.Dev
1	<i>Ulva Fresh</i>	3.06	1.40	0.641	0.627	0.069
2		3.25	1.28	0.552		
3		3.10	1.52	0.687		
4	<i>Ulva Salt</i>	3.25	1.46	0.629	0.609	0.029
5		3.60	1.48	0.576		
6		3.15	1.40	0.623		
7	<i>Ulvaria Fresh</i>	3.27	2.64	1.131	1.139	0.007
8		3.11	2.54	1.144		
9		3.09	2.52	1.143		
10	<i>Ulvaria Salt</i>	3.19	3.50	1.537	1.529	0.011
11		3.03	3.28	1.517		
12		3.16	3.46	1.534		

	Sample (ml)	HCl (ml)	N (mg/l)	Average N
Control	4.00	3.52	1.233	1.226
	4.00	3.48	1.219	
	4.00	3.50	1.226	

Table A.18. Total Kjeldahl Nitrogen in manure

a/a	Sample	Sample Volume (ml)	HCl (ml)	N (g/l)	Average N (g/l)	St.Dev
1	Control	2.50	2.10	1.177	1.102	0.068
2		2.50	1.94	1.087		
3		2.50	1.86	1.042		
4	Manure	2.50	4.66	2.611	2.735	0.151
5		2.50	5.18	2.903		
6		2.50	4.80	2.690		

Table A.19. Total Kjeldahl Nitrogen in filtered, pre-treated manure

a/a	Sample	Centrifugation (rpm)	H ₂ O ₂ (ml/l)	Sample Volume (ml)	HCl (ml)	N (g/l)	Average N (g/l)	St.Dev
1	Manure	3500	1	3.00	0.06	0.028	0.028	0.000
2		3500	1	3.00	0.06	0.028		
3		3500	1	3.00	0.06	0.028		
4	Manure	13500	1	3.00	0.06	0.028	0.028	0.000
5		13500	1	3.00	0.06	0.028		
6		13500	1	3.00	0.06	0.028		
7	Control	-	-	2.50	2.24	1.255	1.289	0.016
8		-	-	2.50	2.28	1.278		
9		-	-	2.50	2.32	1.300		

Table A.20. NO₃ and NH₄ test kits

Sample	NO ₃ -N (mg/l)	NH ₄ -N (mg/l)
Manure	84	820
F/2	8.73	0

NH₄ culture medium (WC modified)

To prepare 1 L of medium the following solutions are used:

- 1 mL of each of the following stock solutions : A,B,C,D,E,F,G,H

The solutions are diluted in Milli-Q water

Stock solution A: -15g/L NH₄Cl

Stock solution B: -12g/L MgCl₂, 6H₂O

Stock solution C: -18 g/L CaCl₂, 7H₂O

Stock solution D: -15 g/L MgSO₄, 7H₂O

Stock solution E: -1.60 g/L KH₂PO₄

Stock solution F: -0.064 g/L FeCl₃, 6H₂O

-0.10 g/L Na₂EDTA, 2H₂O

Stock solution G: -0.185 g/L H₃BO₃

-0.415 g/L MnCl₂, 4H₂O

-0.003 g/L ZnCl₂

-0.0015 g/L CoCl₂, 6H₂O

- 0.00001 g/L CuCl₂, 2H₂O

-0.007 g/L Na₂MoO₄, 2H₂O

Stock solution H: -50 g/L NaHCO₃

All the stock solutions are dissolved in Milli-Q water.

Παράρτημα Β

COD TEST 7/10/2010

Dilution x100 -> 0.5ml:50ml

High range : 100-600 mg/l

Sample volume

(ml)= 3.5

Formulas used:	$COD(mg/l) = (a-b) * M(FAS) * 8000 / (ml \text{ sample})$ $M(FAS) = (1.00ml) * 6MK_2Cr_2O_7 / (ml \text{ FAS})$
----------------	--

FAS: Ferrous Ammonium Sulfate

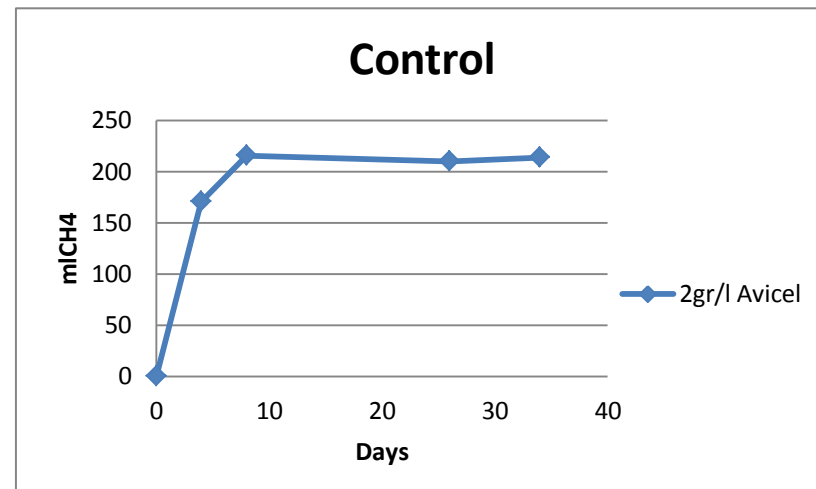
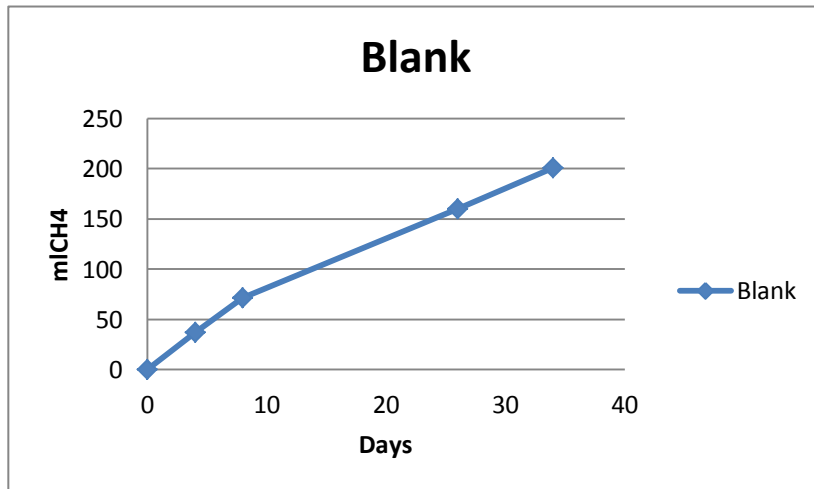
a/a	Sample	FAS(ml)	Average (ml)	Standard deviation	COD(mg/l)	COD(g/l) x100
1	Blank	8.82	8.80	0.02	-	-
2		8.8				
3		8.78				
4	Control (500mg/l)	2.18	2.25	0.07	487	48.71
5		2.25				
6		2.32				
7	Ulva salt	6.24	6.13	0.13	198	19.83
8		6.17				
9		5.99				
10	Ulva fresh	7.48	7.43	0.05	102	10.21
11		7.42				
12		7.38				
13	Ulvaria salt	3.63	3.74	0.09	377	37.65
14		3.81				
15		3.77				
16	Ulvaria fresh	4.73	4.01	0.11	357	35.66
17		4.08				
18		3.93				

a/a	Sample	FAS(ml)	Average (ml)	Standard deviation	M(FAS)
1	FAS	3.16	3.14	0.04	0.0325
2		3.11			

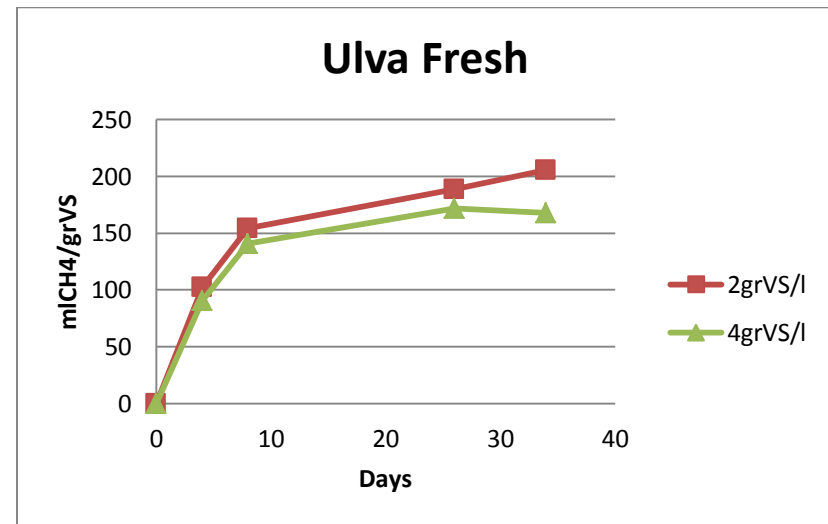
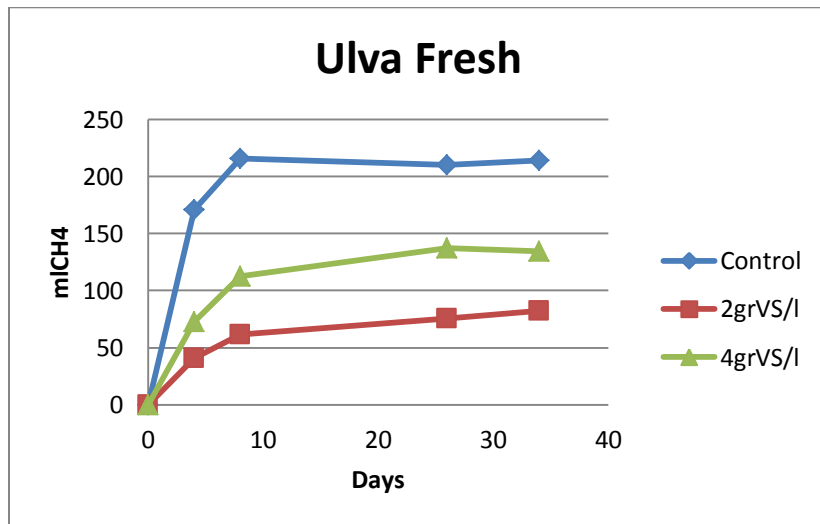
Biological Methane Potential of *U.lactuca* and *U. fusca*

Sample	Ret. Time	Absolute Production
	(Days)	(ml CH ₄)
Blank (manure)	0	0
	4	37
	8	71
	26	160
	34	201

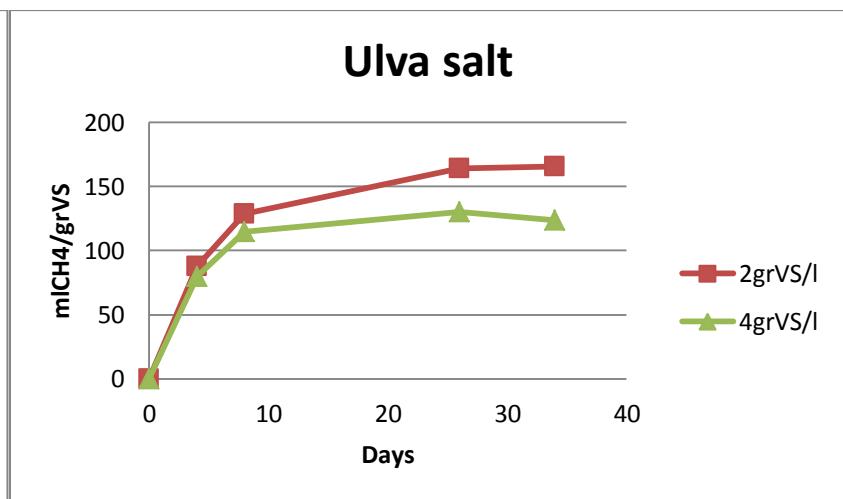
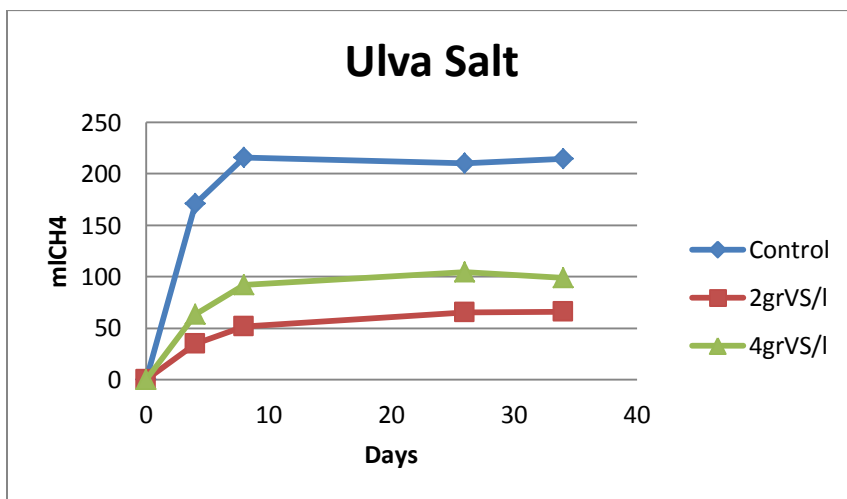
Sample	Ret. Time	Absolute Production
	(Days)	(ml CH ₄)
Control (Avicel)	0	0
	4	171
	8	216
	26	210
	34	214



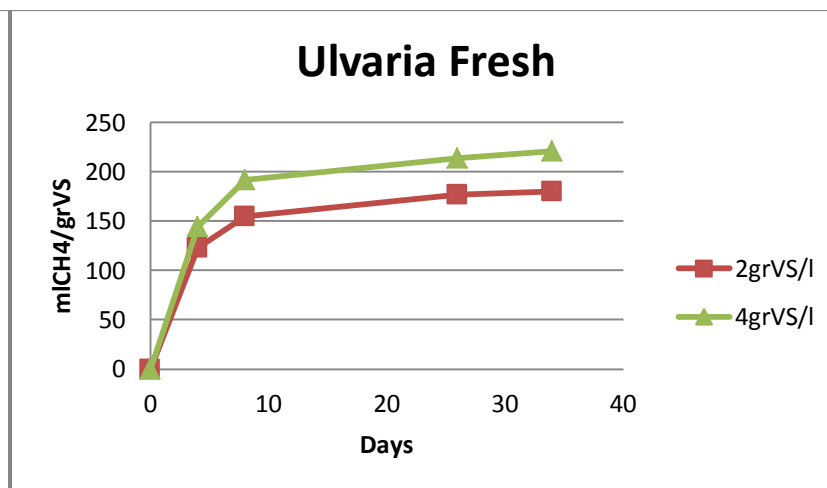
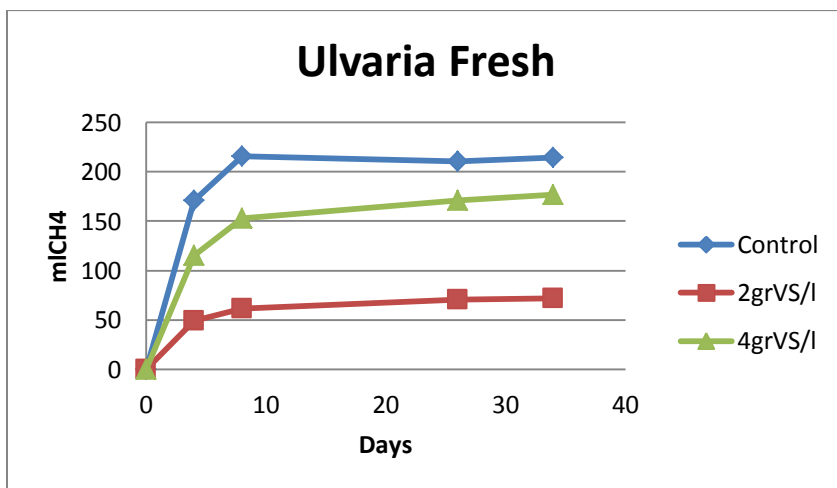
Sample	Organic Loading = 2gVS/l			Organic Loading = 4gVS/l		average 187
	Ret. Time	Absolute Production	Specific Production	Absolute Production	Specific Production	
	(Days)	(ml CH4)	(ml CH4/ g VS)	(ml CH4)	(ml CH4/ g VS)	st.dev 26
Ulva Fresh	0	0	0	0	0	
	4	41	103	73	91	
	8	62	154	113	141	
	26	75	189	137	172	
	34	82	205	134	168	



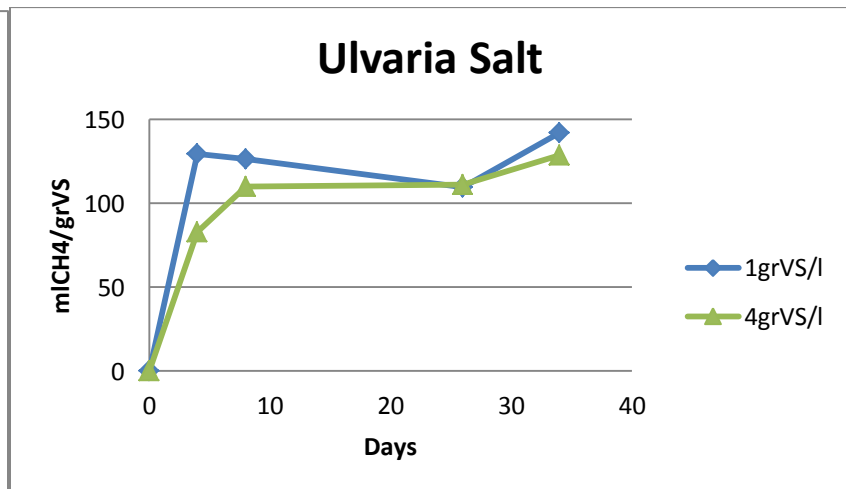
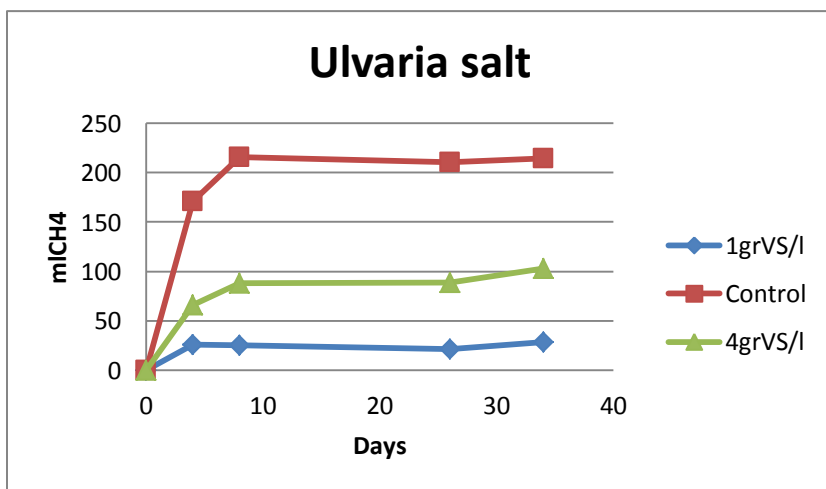
Sample	Ret. Time (Days)	Organic Loading = 2gVS/l		Organic Loading = 4gVS/l		average 145
		Absolute Production (ml CH4)	Specific Production (ml CH4/ g VS)	Absolute Production (ml CH4)	Specific Production (ml CH4/ g VS)	
Ulva Salt	0	0	0	0	0	st.dev 29
	4	35	88	64	80	
	8	51	129	92	115	
	26	66	164	104	130	
	34	66	165	99	124	



Sample	Organic Loading = 2gVS/l			Organic Loading = 4gVS/l		average 200
	Ret. Time	Absolute Production	Specific Production	Absolute Production	Specific Production	
	(Days)	(ml CH ₄)	(ml CH ₄ / g VS)	(ml CH ₄)	(ml CH ₄ / g VS)	st.dev 29
Ulvaria Fresh	0	0	0	0	0	
	4	49	123	115	144	
	8	62	155	153	191	
	26	71	177	171	214	
	34	72	180	177	221	



Sample	Organic Loading = 1gVS/l			Organic Loading = 4gVS/l		average 135
	Ret. Time	Absolute Production	Specific Production	Absolute Production	Specific Production	
	(Days)	(ml CH4)	(ml CH4/ g VS)	(ml CH4)	(ml CH4/ g VS)	st.dev 9
Ulvaria Salt	0	0	0	0	0	
	4	26	129	66	83	
	8	25	126	88	110	
	26	22	109	89	111	
	34	28	142	103	129	



Sodium analysis Na

31/3/2011

Dilution
1:500

a/a	Bottle No	Sample	Conc. (mg/L)	Na (g/L)	Av. Na (g/L)
1	1	<i>Blank</i>	0.939	0.470	0.457
2	2		0.918	0.459	
3	3		0.885	0.443	
4	16	<i>Ulvaria salt 1gVS/l</i>	0.887	0.444	0.411
5	17		0.841	0.421	
6	18		0.740	0.370	
7	19	<i>Ulva fresh 2gVS/l</i>	0.926	0.463	0.376
8	20		0.667	0.334	
9	21		0.665	0.333	
10	22	<i>Ulva salt 2gVS/l</i>	0.783	0.392	0.423
11	23		0.898	0.449	
12	24		0.858	0.429	
13	25	<i>Ulvaria fresh 2gVS/l</i>	0.811	0.406	0.444
14	26		0.944	0.472	
15	27		0.910	0.455	
16	31	<i>Ulva fresh 4gVS/l</i>	0.859	0.430	0.453
17	32		0.920	0.460	
18	33		0.939	0.470	
19	34	<i>Ulva salt 4gVS/l</i>	0.893	0.447	0.497
20	35		0.983	0.492	
21	36		1.108	0.554	
22	37	<i>Ulvaria fresh 4gVS/l</i>	0.859	0.430	0.434
23	38		0.937	0.469	
24	39		0.809	0.405	
25	40	<i>Ulvaria salt 4gVS/l</i>	0.904	0.452	0.498
26	41		1.029	0.515	
27	42		1.056	0.528	
28	Blank	<i>water</i>	0.164	0.082	0.089
29	Blank		0.191	0.096	

Potassium analysis K

31/3/2011

Dilution
1:500

a/a	Bottle No	Sample	Conc. (mg/L)	K (g/L)	Av. K (g/L)
1	1	Blank	0.866	0.433	0.413
2	2		0.794	0.397	
3	3		0.817	0.409	
4	16	Ulvaria salt 1gVS/l	0.633	0.317	0.286
5	17		0.562	0.281	
6	18		0.519	0.260	
7	19	Ulva fresh 2gVS/l	0.678	0.339	0.296
8	20		0.535	0.268	
9	21		0.564	0.282	
10	22	Ulva salt 2gVS/l	0.669	0.335	0.382
11	23		0.850	0.425	
12	24		0.773	0.387	
13	25	Ulvaria fresh 2gVS/l	0.722	0.361	0.368
14	26		0.765	0.383	
15	27		0.721	0.361	
16	31	Ulva fresh 4gVS/l	0.880	0.440	0.407
17	32		0.793	0.397	
18	33		0.769	0.385	
19	34	Ulva salt 4gVS/l	0.764	0.382	0.382
20	35		0.782	0.391	
21	36		0.748	0.374	
22	37	Ulvaria fresh 4gVS/l	0.800	0.400	0.370
23	38		0.759	0.380	
24	39		0.658	0.329	
25	40	Ulvaria salt 4gVS/l	0.743	0.372	0.364
26	41		0.740	0.370	
27	42		0.698	0.349	

Ulva lactuca w/ pre-treatment			
a/a	Sample	Concentration	g/L
3.1	3/2/2011 18:30	0.00	0.00
3.2		0.00	
3.3		0.00	
4.1	4/2/2011 11:30	0.00	2.01
4.2		2.88	
4.3		2.60	
5.1	4/2/2011 16:30	0.50	1.85
5.2		1.40	
5.3		3.14	
6.1	5/2/2011 18:30	1.08	3.44
6.2		3.53	
6.3		2.71	

Ulvaria fusca w/ pre-treatment			
a/a	Sample	Concentration	g/L
3.4	3/2/2011 18:30	0.00	0.00
3.5		0.00	
3.6		0.00	
4.4	4/2/2011 11:30	0.67	1.22
4.5		0.87	
4.6		1.79	
5.4	4/2/2011 16:30	1.48	1.76
5.5		1.72	
5.6		0.51	
6.4	5/2/2011 18:30	1.71	1.11
6.5		0.73	
6.6		0.58	

Ulva lactuca w/o pre-treatment			
a/a	Sample	Concentration	g/L
3/1	8/2/2011 17:30	0.00	0.00
3/2		0.00	
3/3		0.00	
4/1	9/2/2011 10:30	3.73	3.30
4/2		3.73	
4/3		1.53	
5/1	9/2/2011 17:15	3.94	3.20
5/2		0.57	
5/3		1.89	
6/1	10/2/2011 11:00	0.49	3.70
6/2		2.56	
6/3		4.17	
7/1	10/2/2011 19:00	0.98	5.39
7/2		4.30	
7/3		5.50	

Ulvaria fusca w/o pre-treatment			
a/a	Sample	Concentration	g/L
3/4	8/2/2011 17:30	0.00	0.00
3/5		0.00	
3/6		0.00	
4/4	9/2/2011 10:30	2.96	4.13
4/5		3.62	
4/6		4.67	
5/4	9/2/2011 17:15	4.62	3.29
5/5		1.97	
5/6		2.38	
6/4	10/2/2011 11:00	4.23	2.39
6/5		0.75	
6/6		1.53	
7/4	10/2/2011 19:00	1.87	3.35
7/5		4.32	
7/6		2.95	