

**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**

Σχολή Χημικών Μηχανικών  
Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης  
Βιομηχανικών Διαδικασιών



## **ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΤΣΑΓΓΑΡΗΣ ΗΡΑΚΛΗΣ**

Επιβλέπων Καθηγητής: Δημήτρης Κέκος

**ΑΘΗΝΑ 2011**

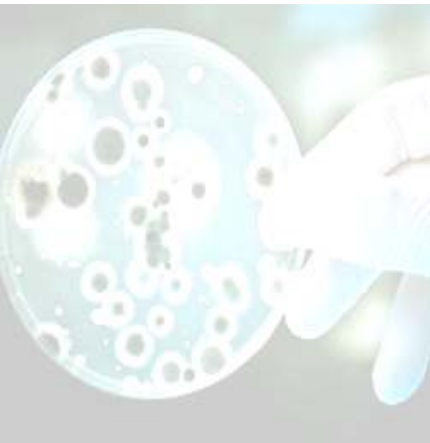


ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

Σχολή Χημικών Μηχανικών  
Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης  
Βιομηχανικών Διαδικασιών



## ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΤΣΑΓΓΑΡΗΣ ΗΡΑΚΛΗΣ

Επιβλέπων Καθηγητής: Δημήτρης Κέκος

ΑΘΗΝΑ 2011



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διπλωματική αυτή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π

Στο σημείο αυτό νιώθω την ανάγκη να όλους όσους με βοήθησαν, κατά την διάρκεια αυτής της εργασίας.

Τον Καθηγητή Ε.Μ.Π. Δημήτρη Κέκο για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου με την ανάθεση της παρούσης εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες για τη συνεργασία μας, στην επιβλέπων διδάκτωρ Rab Eniko για την πολύτιμη και ουσιαστική καθοδήγηση που μου παρείχε τις πολύτιμες συμβουλές και τη στήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Η συνεχής καθοδήγηση και στήριξη που ανιδιοτελώς μου προσέφερε αποτέλεσε βασικό θεμέλιο για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Επίσης οφείλω ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στην Διδάκτορα Μαρία Σαβίδου, η οποία με βοήθησε ιδιαίτερα σε συγκεκριμένες πειραματικές μετρήσεις και με καθοδήγησε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους Υποψήφιους Διδάκτορες και τους συμφοιτητές μου στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Ε.Μ.Π. για τη συνεργασία μας καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής της διπλωματικής μου εργασίας.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της παρούσης διπλωματικής αποτελεί η βιομετατροπή φαινολικών συνθετικών ουσιών από μικροοργανισμούς και συγκεκριμένα βακτήρια και μικροφύκη. Χρησιμοποιήθηκαν δύο θαλάσσια βακτήρια, τα οποία απομονώθηκαν στη Φαρμακευτική Σχολή, του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών τα MM001 και MM002, καθώς και το μικροφύκος *Nannocloropsis* sp. Η φαινολική ουσία που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ρεσορσινόλη.

Αρχικά μελετήθηκε η σταθερότητα της ρεσορσινόλης σε εύρος τιμών pH 5.6-7.5, απουσία ή παρουσία οξυγόνου καθώς και η σταθερότητά της κατά την αποστείρωση. Βρέθηκε ότι η ρεσορσινόλη καταστρέφεται με τη διαδικασία της αποστείρωσης.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η ανάπτυξη των δύο θαλασσιών βακτηρίων, MM001 και MM002, απουσία ρεσορσινόλης. Η μέγιστη ανάπτυξη παρατηρήθηκε μεταξύ 6<sup>ης</sup> και 7<sup>ης</sup> μέρας και για τα δύο στελέχη.

Ακολούθως διερευνήθηκε η ικανότητα των βακτηρίων να αναπτύσσονται παρουσία ρεσορσινόλης. Μελετήθηκε εύρος συγκεντρώσεων από 50-500 ppm. Διαπιστώθηκε σε όλες τις εξετασθείσες συγκεντρώσεις ρεσορσινόλης οι μέγιστες τιμές κυτταρικής ανάπτυξης είναι μικρότερες έναντι αυτών απουσία ρεσορσινόλης και μάλιστα όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της φαινολικής ουσίας μειώνεται αντίστοιχα και η παραγόμενη κυτταρική μάζα. Λόγω της σημαντικής μείωσης της ανάπτυξης για συγκεντρώσεις άνω των 200 ppm, η δυνατότητα αποικοδόμησης της ρεσορσινόλης μελετήθηκε σε εύρος συγκεντρώσεων 50-200 ppm. Παρατηρήθηκε μείωση της ρεσορσινόλης (κατά την ανάλυση δειγμάτων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης). Το ποσοστό μείωσης βρέθηκε να αυξάνεται αυξανόμενης της συγκέντρωσης της φαινολικής ουσίας. Από τα δύο στελέχη MM001 και MM002 το πρώτο αποικοδομεί την ρεσορσινόλη σε μεγαλύτερα ποσοστά.

Αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιήθηκε και για το μικροφύκος *Nannocloropsis* sp. Η μελέτη έγινε σε συνθήκες σκοταδιού αλλά και φωτός, όπου το μικροφύκος παρουσίασε καλύτερη ανάπτυξη. Απουσία φωτός τα ποσοστά αποικοδόμησης κυμάνθηκαν σε πολύ χαμηλά επίπεδα 4-12% ανάλογα με τη συγκέντρωση, ενώ παρουσία φωτός τα ποσοστά ήταν πολύ υψηλότερα (61-92%). Όμως το ισχυρό φως διασπά την ρεσορσινόλη σε ποσοστό της τάξης του 57%, όπως προέκυψε από πειράματα απουσία μικροοργανισμού.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|                       |          |
|-----------------------|----------|
| <b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....</b> | <b>5</b> |
| <b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>  | <b>7</b> |
| <b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>  | <b>9</b> |

### ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ.....</b>                  | <b>15</b> |
| 1.1 Σκοπός / Αρχή .....   | 15        |
| 1.2 Βιοαποικοδόμηση.....  | 15        |
| 1.2.1 Πειράματα Βιοαποικοδόμησης .....                          | 17        |
| 1.3 Ρύπανση Υδάτων .....  | 18        |
| 1.3.1 Ιδιότητες νερού .....                                     | 18        |
| 1.3.2 Ο κύκλος του νερού .....                                  | 19        |
| 1.3.3 Αιτίες ρύπανσης νερού .....                               | 19        |
| 1.3.4 Προστασία του νερού .....                                 | 20        |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ/RESORSINOL.....</b>           | <b>23</b> |
| 2.1 Φαινόλες.....   | 23        |
| 2.1.1 Αρωματικότητα .....                                       | 23        |
| 2.2 Ρεσορσινόλη. Ταυτότητα και φυσικές / χημικές ιδιότητες..... | 24        |
| 2.3 Αναλυτικές μέθοδοι.....                                     | 26        |
| 2.3.1 - HPLC .....  | 27        |
| 2.4 Πηγές ανθρώπινης και περιβαλλοντικής έκθεσης.....           | 28        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.4.1 Φυσικές πηγές.....                   | 28        |
| 2.4.2 Ανθρωπογενείς πηγές.....             | 29        |
| 2.5 Χρήσεις.....                           | 30        |
| 2.6 Εκπομπές στο περιβάλλον.....           | 32        |
| 2.6.1 Εκτιμώμενες παγκόσμιες εκπομπές..... | 32        |
| 2.7 Μετατροπή.....                         | 34        |
| 2.8 Συσσώρευση.....                        | 37        |
| 2.8.1 Επιπτώσεις σε οργανισμούς.....       | 38        |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ.....</b>   | <b>41</b> |
| 3.1 Βακτήρια.....                          | 41        |
| 3.2 Φύκη.....                              | 42        |
| 3.2.1 Τι είναι τα φύκη.....                | 42        |
| 3.2.2 Που αναπτύσσονται.....               | 45        |
| 3.2.3 Κύριες ομάδες φυκών.....             | 45        |
| 3.3 Μικροφύκη.....                         | 46        |
| 3.4 Χρήσεις στη βιομηχανία.....            | 48        |
| 3.5 Πειράματα μέχρι σήμερα.....            | 49        |
| 3.6 Διαθεσιμότητα Μικροφυκών.....          | 52        |
| 3.7 Nannochloropsis.....                   | 53        |
| 3.7.1 Κατηγοριοποίηση.....                 | 54        |
| 3.7.2 Ονομασία.....                        | 55        |
| 3.7.3 Ανάπτυξη.....                        | 55        |
| 3.7.4 Χρήση στον Βιολογικό καθαρισμό.....  | 60        |

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....</b>        | <b>61</b> |
| 4.1 Εισαγωγή - Σκοπός.....                             | 61        |
| 4.2 Βακτήρια.....                                      | 61        |
| 4.2.1 Υλικά Αντιδραστήρια και Μέθοδος.....             | 61        |
| 4.2.2 Δημιουργία Καλλιέργειας.....                     | 63        |
| 4.2.3 Συντήρηση Καλλιέργειας.....                      | 64        |
| 4.2.4 Παρασκευή μέσου.....                             | 65        |
| 4.3 Σχεδιασμός Πειραμάτων με βακτήρια.....             | 66        |
| 4.4 Φύκη.....  | 69        |
| 4.4.1 Υλικά Αντιδραστήρια και Μέθοδος.....             | 69        |
| Αντιδραστήρια – Συσκευές.....                          | 69        |
| Ψυγείο.....  | 70        |
| HPLC.....  | 70        |
| 4.4.2 Δημιουργία Καλλιέργειας.....                     | 70        |
| Εικόνα 4.10 Καλλιέργειες που διατηρούνταν στο φως..... | 71        |
| 4.4.3 Συντήρηση Καλλιέργειας.....                      | 72        |
| 4.5 Σχεδιασμός Πειραμάτων με φύκη.....                 | 72        |
| 4.5.1 Προσδιορισμός Καμπύλης Ανάπτυξης των Φυκών.....  | 72        |
| 4.5.2 Ποιοτικός έλεγχος Δειγμάτων.....                 | 73        |

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

|  |            |
|--|------------|
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ .....</b>  | <b>75</b>  |
| 5.1 Σταθερότητας της Ρεσορσινόλης.....   | 75         |
| 5.2 Βακτήρια .....   | 83         |
| 5.2.1 Καμπύλη Ανάπτυξης των Βακτηριών.....   | 83         |
| 5.2.2 Ποιοτικός έλεγχος – Δείγματα βακτηρίων με ρεσορσινόλη διαφορετικών συγκεντρώσεων (HPLC)..... | 86         |
| 5.3 Φύκη .....   | 113        |
| 5.3.1 Καμπύλη Ανάπτυξης του Nannocloropsis.....  | 113        |
| 5.3.2 Ποιοτικός έλεγχος – Δείγματα φυκών με ρεσορσινόλη διαφορετικών συγκεντρώσεων (HPLC).....     | 117        |
| 5.4 Τελικά Συμπεράσματα .....  | 133        |
| <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>  | <b>135</b> |

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Εξ ορισμού η βιοτεχνολογία είναι χρήση ζωντανών οργανισμών (ή προϊόντων τους) ή βιολογικών συστημάτων-αντιδράσεων για την παραγωγή αγαθών<sup>[11]</sup>.

Έτσι λοιπόν η χρήση μικροοργανισμών στην βιοτεχνολογία μεταξύ άλλων έχει ως σκοπό την βιοαποικοδόμηση ουσιών και την αποκατάσταση του περιβάλλοντος.

Οι Οργανικοί ρύποι στο υδάτινο περιβάλλον μπορούν να υποστούν βιοαποικοδόμηση από μια σειρά από φυσικούς μικροοργανισμούς, αλλά οι μελέτες έχουν επικεντρωθεί, σχεδόν αποκλειστικά, στο ρόλο των βακτηρίων<sup>[1]</sup> και των μύκητων<sup>[2]</sup> στις διαδικασίες αποικοδόμησης.

Τα φύκη παραμένουν στο περιθώριο, παρά την πανταχού παρούσα διανομή τους, τον κεντρικό τους ρόλο στην αποκατάσταση και τον κύκλο του στοιχείου άνθρακα και άλλων θρεπτικά στοιχεία, και την αναγνώριση των ετεροτροφικών ικανοτήτων τους<sup>[3]</sup>.

Οι πληροφορίες σχετικά με την σχέση μεταξύ της ετεροτροφίας των φυκών και της βιοδιάσπαση των ξενοβιοτικών ενώσεων είναι πολύ λιγότερες από ότι τις συσσωρευμένες πληροφορίες σχετικά με τα βακτήρια και τους μύκητες. Ορισμένες πληροφορίες σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτοφαρμάκων και ευκαρυωτικών φυκών συντάχθηκαν από τους Kobayashi και Rittman<sup>[4]</sup>, και δείχνουν ότι τα φύκη όχι μόνο είναι ικανά να συσσωρεύουν φυτοφάρμακα, αλλά είναι επίσης σε θέση να διασπάζουν μερικούς από αυτούς τους περιβαλλοντικούς ρύπους.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, δύο μη αναγνωρισμένα θαλάσσια βακτήρια από την ομάδα του ακτινομύκητα(MM001 και MM002) καθώς και το μικροφύκος *Nannocloropsis* sp. εξετάστηκαν σε μια προσπάθεια αξιολόγησης της χρήσης τους σε μέθοδο βιολογικής αποκατάστασης του περιβάλλοντος.



## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ

#### 1.1 Σκοπός / Αρχή

Η ιδέα πίσω από όλες τις βιολογικές μεθόδους επεξεργασίας λυμάτων, είναι η εισαγωγή σε αυτά μικροοργανισμών (κυττάρων), οι οποίοι τρέφονται με τα οργανικά υλικά των λυμάτων.

Οι μικροοργανισμοί (κύτταρα) αποικοδομούν τα οργανικά υλικά που υπάρχουν στα λύματα. Μέσα από το μεταβολισμό τους, το οργανικό υλικό μετατρέπεται σε κυτταρική μάζα, η οποία δεν είναι πλέον σε διάλυση αλλά μπορεί να καθιζάνει στον πυθμένα μιας δεξαμενής καθίζησης ή να διατηρηθεί ως βλέννα στη στερεά επιφάνεια ή στη βλάστηση του συστήματος. Το νερό βγαίνει από το σύστημα πολύ καθαρότερο από ό, τι μπήκε.

#### 1.2 Βιοαποικοδόμηση

Η βιοαποικοδόμηση ή βιοτική αποικοδόμηση είναι χημική αποικοδόμηση που γίνεται από τη δράση φυσικών μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, μύκητες ή άλγη. Κατά την βιοαποικοδόμηση παράγονται διοξείδιο του άνθρακα και/ή μεθάνιο. Αν γίνεται παρουσία οξυγόνου συμβαίνει αερόβια αποικοδόμηση ενώ χωρίς οξυγόνο ονομάζεται αναερόβια και παράγεται μεθάνιο αντί για διοξείδιο του άνθρακα. Ο ρυθμός με τον οποίο γίνεται η βιοαποικοδόμηση στο έδαφος εξαρτάται από την θερμοκρασία, τα επίπεδα της υγρασίας, το βαθμό αερισμού, την οξύτητα και τη συγκέντρωση των ίδιων των μικροοργανισμών.

Κάτω από εξαιρετικά δυσμενείς συνθήκες ο ρυθμός της βιοαποικοδόμησης μπορεί να μειωθεί και να φτάσει στο μηδέν.

Χαμηλές θερμοκρασίες παρεμποδίζουν ιδιαίτερα την αποικοδόμηση. Σε πολύ ψυχρά κλίματα ανακαλύφθηκαν ανθρώπινα απομεινάρια, που ήταν εκεί από χιλιάδες χρόνια πριν και ακόμη είναι εντυπωσιακά καλοδιατηρημένα εξαιτίας των χαμηλών θερμοκρασιών. Το 1991 βρέθηκε σε έναν παγετώνα στις Άλπεις ένα ανθρώπινο σώμα (μούμια) ηλικίας 5200 ετών, ωστόσο καλοδιατηρημένο. Οι εξαιρετικά χαμηλές θερμοκρασίες έκαναν τη φυσιολογική φθορά να σταματήσει. Μέσα από εκτεταμένες επιστημονικές έρευνες στη μούμια (τώρα λέγεται Otzi) μας δόθηκε μια νέα συναρπαστική θεώρηση της ζωής στη Νεολιθική εποχή.

Η υγρασία είναι επίσης σημαντική στο ρυθμό βιοαποικοδόμησης. Βοηθά την υδρολυτική αποικοδόμηση. Οι εφημερίδες, αν και είναι ενδεχομένως βιοδιασπώμενες όταν υπάρχει αρκετή υγρασία, δεν θα βιοαποικοδομηθούν περιβαλλοντικά σε μια χωματερή αν η υγρασία είναι ανεπαρκής. Λουκάνικα 20 ετών βρέθηκαν ανέπαφα στις χωματερές, ίσως εξαιτίας της ανεπαρκούς υγρασίας.

Ο αερισμός υποστηρίζει την οξειδωτική αποικοδόμηση και ο βαθμός αερισμού καθορίζει αν η αποικοδόμηση θα γίνει αερόβια ή αναερόβια ή και τα δύο. Αν και υπάρχουν πολλά βακτήρια που ευδοκιμούν απουσία οξυγόνου, υπάρχουν πολλά περισσότερα που θέλουν οξυγόνο. Ο ρυθμός της αποικοδόμησης μπορεί να μειωθεί ίση με μηδέν σε ένα στείρο περιβάλλον ή όταν η συγκέντρωση των μικροοργανισμών είναι πολύ χαμηλή.

Οι μικροοργανισμοί βοηθούν την αποσύνθεση της οργανικής ύλης και σε θαλάσσιο περιβάλλον. Μπορεί να υπάρχουν εκατομμύρια μικροοργανισμοί σε ένα χιλιοστόλιτρο θαλασσινού νερού ή σε ένα μικρογραμμάριο ιζήματος.

Μέσω της φυσικής αποσύνθεσης τα άτομα του άνθρακα επιστρέφουν στο οικοσύστημα και γίνονται πάλι διαθέσιμα για τα φυτά ώστε να επαναπροσληφθούν με τη διαδικασία της αποσύνθεσης. Τα ζώα με την πρόσληψη τροφής μέσω της αναπνοής, των απεκκρίσεων και της τελικής αποσύνθεσης τους είναι μέρος της ισορροπημένης ανταλλαγής άνθρακα. Αυτές οι διαδικασίες αποτελούν τον κύκλο



του άνθρακα. Η βιοαποικοδόμηση και η αβιοτική αποικοδόμηση παίζουν το ρόλο τους στην αποσύνθεση των πλαστικών.

Η βιοαποικοδόμηση γενικά θεωρείται ότι περιλαμβάνει ενζυμικές και μη ενζυμικές υδρολύσεις. Η ενζυμική αποικοδόμηση γίνεται είτε από την παρουσία εξωκυτταρικών ενζύμων στο περιβάλλον των μικροοργανισμών ή από ενδοκυτταρικά ένζυμα. Και στις δύο περιπτώσεις η πολυμερική αλυσίδα διασπάται σε μικρότερα τμήματα. Τα ένζυμα μπορεί να είναι είτε ενδοένζυμα, που σπάζουν εσωτερικούς δεσμούς μέσα στην αλυσίδα, είτε εξωένζυμα που διασπούν τις τελικές μονάδες των μονομερών διαδοχικά. Τα ενδοένζυμα σπάζουν τους δεσμούς της αλυσίδας σε τυχαίες θέσεις και αυτό συνεπάγεται την ταχεία μείωση του μοριακού βάρους. Η συνεχής διάσπαση των παραγόμενων θραυσμάτων οδηγεί σε λιγότερο άμεσες δραματικές αλλαγές στο μοριακό βάρος.

Επομένως συνολικά έχουμε: τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την βιοαποικοδόμηση, όπως η θερμοκρασία, τα επίπεδα της υγρασίας, η ατμοσφαιρική πίεση, η πίεση του οξυγόνου, η συγκέντρωση οξέων και μετάλλων και ο βαθμός έκθεσης στο φως. Επίσης έχουμε παράγοντες που σχετίζονται με τους μικροοργανισμούς και περιλαμβάνουν την συγκέντρωσή τους, το εάν αυτοί έχουν ή όχι ένζυμα τα οποία χρησιμοποιούν το πολυμερές ως υπόστρωμα, τη συγκέντρωση των ενζύμων, τη παρουσία θρεπτικών υλικών για τους μικροοργανισμούς και την παρουσία παρεμποδιστών ή ανταγωνιστών<sup>[6]</sup>.

### 1.2.1 Πειράματα Βιοαποικοδόμησης

Σε παρόμοιο πνεύμα με αυτό της παρούσης εργασίας είναι ένα πρόσφατο πείραμα που πραγματοποιήθηκε. Η επεξεργασία των υγρών αποβλήτων εργοστασίου παραγωγής ελαιολάδου, έγινε πρόσφατα με δύο ανθεκτικά στη φαινόλη φύκη, τα *Ankistrodesmus braunii* και *Scenedesmus quadricauda*. Στα αποτελέσματα εμφανίστηκε περιορισμένη μείωση της φαινόλης μετά από 5 μέρες καθαρισμού, ανεξάρτητα από την συγκέντρωση των φυκών. Δηλαδή, οι καλλιέργειες και των δύο

φυκών, που καλλιεργήθηκαν στο σκοτάδι, υποβάθμισαν πάνω από το 50% των φαινόλων χαμηλού μοριακού βάρους. Όμως οι φαινόλες δεν απομακρύνθηκαν πλήρως. Μετασχηματίστηκαν σε άλλες μη αναγνωρισμένες, αρωματικές ενώσεις.

Τα απόβλητα των ελαιουργείων που προέρχονται από την παραγωγή του ελαιόλαδου είναι ένας από τους σημαντικότερους ρύπους στις χώρες της Μεσογείου<sup>[97]</sup>. Οι αντιβακτηριδιακές και φυτοτοξικές επιδράσεις τους οφείλονται κυρίως σε φαινολικές ενώσεις<sup>[98]</sup>. Η χρήση φυκών στην αποκατάσταση λυμάτων σε βιομηχανία χαρτοπολτού και χαρτιού, τα οποία περιέχουν φαινόλες σε συγκεντρώσεις συγκρίσιμες με εκείνες που βρέθηκαν στο πείραμα, μπορεί να είναι μια πολύ αποτελεσματική μέθοδος για την απομάκρυνσή τους <sup>[99][5]</sup>.

### **1.3 Ρύπανση Υδάτων**

#### **1.3.1 Ιδιότητες νερού**

Το νερό βράζει στους 100 °C και πήζει στους 0 °C εφόσον είναι χημικώς καθαρό. Στη φύση βρίσκεται σε τρεις μορφές, υγρή, στερεά και αέρια, ενώ στην υγρή φάση έχει μεγάλο ιξώδες.

Επίσης οι χημικές ιδιότητες και ιδιαίτερα οι διαλυτικές είναι πολύ σημαντικές για το οικοσύστημα. Το νερό έχει την ικανότητα να διαλύει μεγάλη ποικιλία ουσιών. Πολλά χημικά στοιχεία και χημικές ενώσεις διαλύονται στο νερό και ορισμένες από αυτές μεταφέρονται με την επίγεια και υπόγεια κίνηση του νερού σε διάφορα σημεία της επιφάνειας της γης. Με παρόμοιο τρόπο όμως μεταφέρονται και βλαβερές ουσίες.

### 1.3.2 Ο κύκλος του νερού

Το νερό ακολουθεί έναν ορισμένο κύκλο στη φύση, εισρέει με τα κατακρημνίσματα στο έδαφος και από εκεί ένα μέρος εξατμίζεται, ένα χρησιμοποιείται από τα φυτά, ένα τμήμα συγκρατείται ως υγρασία στο έδαφος. Μέρος από το νερό των κατακρημνισμάτων ρέει στο έδαφος με κατεύθυνση προς τη θάλασσα. Τα νερά που διηθούνται στο έδαφος είτε τα εμπλουτίζουν τα υπόγεια στρώματα είτε ξαναβγαίνουν στην επιφάνεια με μορφή πηγών και τροφοδοτούν με νερό τα ρέματα. Κάθε ουσία που εμποδίζει την κανονική χρήση του ύδατος θεωρείται ότι ρυπαίνει. Εδώ παρατηρούνται αντιφάσεις διότι μια ουσία που το εμποδίζει από μια χρήση μπορεί να είναι απαραίτητη από μια άλλη χρήση. Σαν παράδειγμα αναφέρεται το χλωριούχο νάτριο. Το νερό υπάρχει παντού γύρω μας στη θάλασσα, στην ατμόσφαιρα υπό μορφή υδρατμών στο έδαφος στις λίμνες στα ποτάμια [24][25][26].

### 1.3.3 Αιτίες ρύπανσης νερού

Ευτροφισμός

Αστικά λύματα – Παθογένειες μολύνσεις

Αγροτική Ρύπανση

Βιομηχανική Ρύπανση. *Αποτελούν υγρές απορροές που σχετίζονται με την παραγωγική διαδικασία της βιομηχανίας.*

Η παραγωγή και η χρήση συνθετικών χημικών προϊόντων στη βιομηχανία έχει οδηγήσει στην είσοδο πολλών ξενοβιοτικών ουσιών στο περιβάλλον. Μια τέτοια ομάδα ξενοβιοτικών ουσιών είναι χλωροφαινόλες, οι οποίες έχουν προκαλέσει ανησυχία για το περιβάλλον λόγω της οξείας τοξικότητας και την αντοχής τους στη φθορά. Η δυστροπία των χλωροφαινολών είναι αποτέλεσμα του δεσμού άνθρακα-αλογόνου ο οποίος διασπάται με μεγάλη δυσκολία και της σταθερότητας της αρωματικής δομής τους, με αποτέλεσμα τη βιοσυσσώρευση τους στη φύση.

Ωστόσο, ένας αριθμός βακτηρίων έχει αποδειχθεί ικανός να προκαλεί την αερόβια αποικοδόμηση των μόνο-χλωροφαινόλων. Η επιτυχής εφαρμογή τέτοιων στελεχών σε συστήματα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων θα εξαλείψει τα προβλήματα που συνδέονται με τη βιοσυσσώρευση<sup>[41]</sup>.

#### 1.3.4 Προστασία του νερού

Η μέθοδος της βιολογικής αποκατάστασης (bio-remediation) αποτελεί επί αρκετές δεκαετίες μια από τις σημαντικότερες μεθόδους απορρύπανσης των εδαφών και βασίζεται στην αποδόμηση των οργανικών ουσιών και την τελική μετατροπή τους σε αβλαβείς ουσίες μέσω της δράσης μικροοργανισμών.

Πρόσφατα όμως βρήκε εφαρμογή και στην ελεγχόμενη αποδόμηση των οργανικών ρύπων των υδάτων. Η βιολογική αποδόμηση των οργανικών ενώσεων γίνεται μέσω της δράσης μικροοργανισμών (βακτηριδίων, μυκήτων, κλπ) οι οποίοι αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας τον άνθρακα ή/και την ενέργεια που απελευθερώνεται κατά τον μεταβολισμό (αποσύνθεση) των οργανικών ουσιών.

Οι μικροοργανισμοί αποσυνθέτουν τις οργανικές ενώσεις χρησιμοποιώντας ως καταλύτες κατάλληλα ένζυμα (πρωτεΐνες) τα οποία παράγουν οι ίδιοι. Το τελικό προϊόν της αποσύνθεσης των οργανικών ουσιών μέσω των μικροοργανισμών είναι ανόργανες ουσίες (διοξείδιο του άνθρακα και νερό) που συνήθως θεωρούνται λιγότερο επιβλαβείς από τις αρχικές ενώσεις, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις ατελούς αποσύνθεσης παράγονται και άλλες απλές ενώσεις όπως μεθάνιο, υδρόθειο, νιτρικά και θειικά άλατα.

Για να συντελεσθεί η αποσύνθεση των οργανικών ουσιών μέσω μικροοργανισμών απαιτούνται οι εξής προϋποθέσεις:

1. Η παρουσία κατάλληλων μικροοργανισμών, δηλαδή μικροοργανισμών που παράγουν ένζυμα κατάλληλα για τον μεταβολισμό της συγκεκριμένης οργανικής ουσίας.
2. Η παρουσία οργανικών ουσιών οι οποίες με την αποσύνθεσή τους θα παράσχουν την απαιτούμενη ενέργεια στους μικροοργανισμούς για να αναπτυχθούν.
3. Η παρουσία θρεπτικών ουσιών (nutrients), όπως το άζωτο, ο φωσφόρος, το κάλιο, το θείο κλπ. που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.
4. Η παρουσία δεκτών ηλεκτρονίων (electron acceptors), δηλαδή ατόμων ή ριζών τα οποία δέχονται τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν κατά την οξείδωση των οργανικών ουσιών.
5. Η παρουσία κατάλληλων συνθηκών για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και συγκεκριμένα: κατάλληλη υγρασία, θερμοκρασία και pH και η απουσία ορισμένων χημικών ουσιών σε συγκεντρώσεις που είναι τοξικές για τους μικροοργανισμούς (και τους καταστρέφουν).

Συνεπώς, οι τεχνολογίες βιολογικού καθαρισμού έχουν σκοπό να εξασφαλίσουν και να ενισχύσουν με ελεγχόμενο τρόπο τις ανωτέρω απαιτήσεις ώστε να συντελεσθεί η αποσύνθεση των οργανικών ουσιών που αποτελούν το ρυπαντικό φορτίο του εδάφους ή του υπόγειου νερού. Ως εκ τούτου είναι απαραίτητη αφενός μεν η κατανόηση της λειτουργίας των μηχανισμών βιολογικής αποσύνθεσης των οργανικών ουσιών, αφετέρου δε η ανάπτυξη της σχετικής τεχνολογίας ώστε με τεχνικές επεμβάσεις να διατηρούνται οι βέλτιστες συνθήκες δράσης των μικροοργανισμών<sup>[27]</sup>.

Η φαινολική ουσία που επιλέγεται να χρησιμοποιηθεί στα πειράματα είναι η ρεσορσινόλη καθώς έχει χρησιμοποιηθεί επανειλημμένα τα προηγούμενα χρόνια στα εργαστήρια με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Το έναυσμα δόθηκε από το πείραμα που αναφέρθηκε σχετικά την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων εργοστασίου παραγωγής ελαιολάδου όπου και υπήρχε ρεσορσινόλη. Τα αποτελέσματα χρήσης μικροφυκών στην επεξεργασία κρίθηκαν ικανοποιητικά και άξια προσοχής.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ/RESORSINOL

### 2.1 Φαινόλες

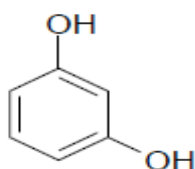
Η φαινόλη (fēnōl), με χημικό τύπο  $C_6H_5OH$ , είναι ένα άχρωμο, κρυσταλλικό στερεό που λιώνει στους περίπου 41 °C, βράζει στους 182 °C και είναι διαλυτό στην αιθανόλη, στον αιθέρα και μερικώς διαλυτό στο νερό. Μια αρωματική αλκοόλη, που παρουσιάζει αδύναμες όξινες ιδιότητες και είναι διαβρωτική και δηλητηριώδης. Αυτή η Φαινόλη μερικές φορές ονομάζεται και καρβολικό οξύ, ειδικά όταν σε διάλυμα νερού αντιδρά με ισχυρές βάσεις για το σχηματισμό αλάτων που ονομάζεται φαινολάτες. Είναι σημαντική για τη βιομηχανία στην παραγωγή ορισμένων συνθετικών ρητίνων, π.χ. βακελίτη και στη σύνθεση πολλών φάρμακων, βαφών, ζιζανιοκτόνων, εντομοκτόνων και εκρηκτικών (π.χ., πικρικό οξύ). Είναι το πιο απλό μέλος μιας κατηγορίας από υδροξυ παράγωγα βενζολίου, τα οποία περιέχουν μια ομάδα υδροξυλίου που συνδέεται με ένα βενζολικό δακτύλιο. Αυτές οι ενώσεις μπορούν να θεωρηθούν ως παράγωγα φαινόλης και γενικά λέγονται φαινόλες. <sup>[43]</sup>

#### 2.1.1 Αρωματικότητα

Στην οργανική χημεία, οι δομές ορισμένων δακτυλίων των ατόμων είναι απροσδόκητα σταθερές. Αρωματικότητα είναι μια χημική ιδιότητα όπου ο συζευγμένος δακτύλιος των ακόρεστων ομόλογων, είτε μοναχικών ζευγών, είτε κενών τροχιακών εμφανίζει σταθεροποίηση ισχυρότερη από αυτή που θα αναμενόταν από τη σταθεροποίηση της σύζευξης και μόνο. Μπορεί επίσης να θεωρηθεί ως η εκδήλωση της κυκλικής μετεγκατάστασης και του συντονισμού. <sup>[7] [8]</sup>  
<sup>[9]</sup>

**2.2 Ρεσορσινόλη. Ταυτότητα και φυσικές / χημικές ιδιότητες**

Η Ρεσορσινόλη (CAS No 108-46-3) είναι μια λευκή κρυσταλλική φαινολική ένωση με αδύναμη οσμή και γλυκόπικρη γεύση<sup>[45]</sup>. Έχει χημικό τύπο  $C_6H_6O_2$ , και η σχετική μοριακή της μάζα είναι 110,11. Το όνομα της κατά IUPAC είναι 1,3-δι-υδροξυβενζόλιο. Άλλα ονόματα της είναι 1,3-benzenediol, m-benzenediol, m-δι-υδροξυβενζόλιο, m-υδροκινόνη, 3-hydroxyphenol, και ρεσορκίνη. Η ρεσορσινόλη μπορεί να θεωρηθεί ως ένα παράγωγο της φαινόλης όπου ένα άτομο υδρογόνου αντικαθίσταται από υδρόξυλο-ομάδα στη θέση του μετά το OH. Η χημική της δομής παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.1.<sup>[10]</sup>



**Σχήμα 2.1.** Χημική δομή της Ρεσορσινόλης

Η ρεσορσινόλη υπάρχει σε τουλάχιστον δύο κρυσταλλικές τροποποιήσεις (φάσεις)<sup>[44]</sup>. Σε κανονική πίεση, η α-φάση είναι σταθερή κάτω από περίπου 71 °C, ενώ η β-φάση είναι σταθερή πάνω από τη θερμοκρασία αυτή μέχρι και το σημείο τήξης<sup>[45]</sup>. Η κρυσταλλική ρεσορσινόλη αποκτά ωχρό κόκκινο χρώμα με την παρουσία αέρα και φωτός<sup>[46]</sup> και είναι υγροσκοπική<sup>[47]</sup>.

Τα δεδομένα για την διαλυτότητα της στο νερό δείχνουν ότι η ουσία είναι σχεδόν εντελώς αναμίξιμη με το νερό. Οι τιμές pKa της είναι 9,32 και 9,81 (στους 25 °C) και δείχνουν ότι ρεσορσινόλη είναι παρούσα σχεδόν εξ ολοκλήρου σε πρωτονιωμένη μορφή σε συνθήκες περιβάλλοντος (pH 5-8). Σε pH 8, λιγότερο από το 2% της ρεσορσινόλης είναι ιονισμένο. Σε pH 5, λιγότερο από το 0,1% είναι ιονισμένο. Ρεσορσινόλη τεχνητού βαθμού, βρίσκεται διαθέσιμη με καθαρότητα τουλάχιστον 99,5% και περιέχει: φαινόλη, κατεχόλη, ο-κρεσόλη, m-/p-cresol, και 3-mercaptophenol (μέγιστη συγκέντρωση της κάθε ουσίας 0,1%) σε μορφή προσμείξεων<sup>[45]</sup>.



Οι ιδιότητες της ρεσορσινόλης συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 2.1** Φυσικές και χημικές ιδιότητες της ρεσορσινόλης

| Property  | Value/range                  | Reference                       |
|---|------------------------------|---------------------------------|
| Melting point (°C)                                      | 109–111                      | O'Neil (2001)                   |
|   | 110                          | Kirk-Othmer (1981)              |
| Boiling point (°C at 101.3 kPa)                         | 277                          | Kirk-Othmer (1981)              |
|   | 280                          | O'Neil (2001)                   |
| Density, solid (g/cm <sup>3</sup> at 20 °C)             | 1.272                        | O'Neil (2001)                   |
|   | α-phase: 1.278               | Schmiedel & Decker (2000)       |
|   | β-phase: 1.327               | Kirk-Othmer (1981)              |
| Vapour pressure (Pa at 25 °C)                           | 0.065 (extrapolated)         | Yaws (1997)                     |
|   | 0.027 (measured)             | Hoyer & Peperle (1958)          |
| Water solubility  | 717 g/l (at 25 °C)           | Yalkowsky & Dannenfelser (1992) |
|   | 141 g/100 g water (at 20 °C) | Schmiedel & Decker (2000)       |
|   | 1 g/0.9 g water              | O'Neil (2001)                   |
| Henry's law constant (dimensionless)                    | $4.96 \times 10^{-3a}$       | Staudinger & Roberts (1996)     |
|   | $4.21 \times 10^{-3a}$       | Fh-ITEM (2005b)                 |
| Log octanol/water partition coefficient (log $K_{ow}$ ) | 0.8 (measured)               | Hansch et al. (1995)            |
|   | 0.93 (measured at 20 °C)     | Beezer et al. (1980)            |
|   | 0.85 (measured at 25 °C)     | Beezer et al. (1980)            |
| Soil sorption coefficient ( $K_{oc}$ )                  | 10.36 (measured)             | Boyd (1982)                     |
| pKa <sub>1</sub> (at 25 °C)                             | 9.32                         | Serjeant & Dempsey (1979)       |
|   | 9.81                         | Lide (1995)                     |

### 2.3 Αναλυτικές μέθοδοι

Σε γενικές γραμμές, τα διυδρόξυβενζόλια (όπως η ρεσορσινόλη) μπορούν να προσδιοριστούν με αέρια χρωματογραφία με τριχοειδή στήλη καθώς και με υγρή χρωματογραφία. Ημιοσοτικός προσδιορισμός των διυδρόξυβενζολίων με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας δίνει όρια ανίχνευσης 0,008 - 4 µg, ανάλογα με το ποίο αντιδραστήριο σπρέι χρησιμοποιείται<sup>[46]</sup>. Για υψηλής απόδοσης ποσοτική ανάλυση της ρεσορσινόλης, είναι κατάλληλη η υγρή χρωματογραφία και η αέρια χρωματογραφία<sup>[48]</sup>. Οι Curtis & Ward το 1981<sup>(49)</sup> χρησιμοποίησαν την άμεση φωτομετρική μέθοδο για ανάλυση της φαινόλης που περιγράφει ο Arha και οι συνεργάτες του το 1976<sup>[50]</sup> για να μετρήσουν συγκέντρωση σε υδάτινες τοξικές δοκιμές.

**Πίνακας 2.2** Ρεσορσινόλη σε περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα.

| Sample matrix                      | Sample preparation  | Separation/<br>detection  | Limit of detection                            | References                 |
|------------------------------------|---|---|---|----------------------------|
| <b>Environmental samples</b>       |   |   |   |                            |
| Air                                | Sampler: XAD-7 OVS tube, glass fibre filter   | GC/FID  | 2 µg/sample (estimated)                       | Eide (1994); NIOSH (1998)  |
| Water                              | Filtration, extraction (methyl isobutyl ketone), derivatization (trimethylsilylation)                         | GC/FID  | 0.1 mg/l                                      | Cooper & Wheatstone (1973) |
| Water (e.g. leachate)              | Filtration (0.45 µm); extraction (diethyl ether); dissolved in acetonitrile                                   | HPLC/UV-VIS<br>HPLC/ECD   | 4.3 ng injected (UV)<br>5.4 pg injected (ECD) | Sooba et al. (1997)        |
| Water (leachate, wastewater)       | No data   | HPLC  | No data                                       | Kahru et al. (1998, 1999)  |
| Soil (water-extractable compounds) | Aqueous extract   | HPLC/ECD  | 0.002 mg/kg<br>0.0005 mg/l                    | Kahru et al. (2002)        |
| Soil (water-extractable compounds) | Aqueous extract   | HPLC  | No data                                       | Põllumaa et al. (2001)     |
| Soil                               | Centrifugation, filtration of the aqueous phase   | HPLC/UV-VIS   | ≤3 mg/l                                       | Boyd (1982)                |
| Soil (soil-plant)                  | Aqueous soil-plant mixture, filtration, centrifugation, extraction (ether), concentrate, dissolved in ethanol | Paper chromatography, TLC, GC/FID   | No data                                       | Chou & Patrick (1976)      |
| Food (ground roast barley)         | Extraction with 50% aqueous methanol; purification through column chromatography, trimethylsilylation         | GC/MS; main peaks of GC further purified by column chromatography and TLC | No data                                       | Shimizu et al. (1970)      |
| Food (molasses)                    | Fractionation; trimethylsilylation  | GC  | No data                                       | Hashizume et al. (1967)    |
| <b>Biological samples</b>          |   |   |   |                            |
| Urine, plasma                      | Extraction with diethyl ether, concentrate, trimethylsilylation (for GC/MS)                                   | HPLC/UV-VIS<br>GC/MS  | HPLC: 0.5 mg/l<br>GC/MS: 0.1 mg/l             | Yeung et al. (1981, 1983)  |

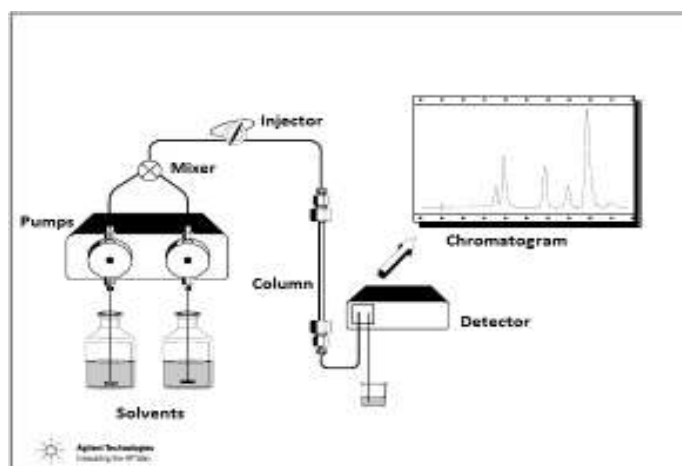
Για να δούμε τι συνέβη στη φαινολική μας ένωση μετά την υποβάθμιση της, στα πειράματα χρησιμοποιήσαμε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

### 2.3.1 - HPLC

Η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (που μερικές φορές αναφέρεται ως υψηλής πίεσης υγρή χρωματογραφία), HPLC, είναι μία χρωματογραφική τεχνική με την οποία μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μείγμα ενώσεων και χρησιμοποιείται στην βιοχημεία και την αναλυτική χημεία για να εντοπιστούν, να ποσοτικοποιηθούν και να καθαριστούν τα μεμονωμένα συστατικά του μείγματος.<sup>[48]</sup>

Η HPLC χρησιμοποιεί συνήθως διαφορετικούς τύπους στατικών φάσεων. Μία αντλία που κινεί την κινητή φάση(εις) και τις ουσίες μέσω της στήλης, και έναν ανιχνευτή για να παρέχει ένα χαρακτηριστικό χρόνο κατακράτησης για την αναλυτέα ουσία. Ο ανιχνευτής μπορεί επίσης να παρέχει πρόσθετες πληροφορίες που σχετίζονται με την ανάλυση της ουσίας, (π.χ. UV / Vis φασματοσκοπικά στοιχεία για την αναλυόμενη ουσία εαν υπάρχει). Ο αναλυτικός χρόνος παραμονής ποικίλλει ανάλογα με τη δύναμη των αλληλεπιδράσεων της με τη στατική φάση, την αναλογία/σύνθεση του διαλύτη(ών) που χρησιμοποιούνται, και την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης. Πρόκειται για μια μορφή της υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιεί μικρότερο μέγεθος στήλης, λιγότερο μέσο στο εσωτερικό της στήλης και υψηλότερες πιέσεις κινητή φάση.

Με HPLC, μια αντλία (αντί της βαρύτητας), παρέχει την υψηλότερη πίεση που απαιτείται για να μετακινηθεί η κινούμενη φάση και η ουσία μέσα από την πυκνή στήλη. Η αύξηση της πυκνότητας προκύπτει από τα σωματίδια μικρότερου μεγέθους. Αυτό επιτρέπει για ένα καλύτερο διαχωρισμό στις στήλες μικρότερου μήκους σε σύγκριση με τη συνηθισμένη χρωματογραφία στήλης.



Σχήμα 2.2. Μέρη του HPLC.

## 2.4 Πηγές ανθρώπινης και περιβαλλοντικής έκθεσης

### 2.4.1 Φυσικές πηγές

Η ρεσορσινολική ρίζα έχει βρεθεί σε ένα ευρύ φάσμα από φυσικά προϊόντα. Ειδικότερα, τα φαινολικά των φυτών, τα οποία περιέχουν συστατικά με δακτυλίους ρεσορσινόλης, είναι πανταχού παρόντα στη φύση και είναι ευρέως καταγεγραμμένα. Η ρεσορσινόλη σαν ουσία έχει βρεθεί σε φασόλια (*Vicia faba*), ανιχνεύεται ως ουσία που δημιουργεί το άρωμα στο μέλι από μανιτάρι (*Armillaria mellea*)<sup>[48]</sup>, και βρίσκεται σε εξιδρώματα των νεαρών φυτών του κίτρινου κρίνου (*Nurphar lutea*)<sup>[51]</sup>. Η ρεσορκινόλη έχει βρεθεί επίσης σε εκχυλίσματα φύλλων καπνού<sup>[48]</sup> και είναι ένα συστατικό του καπνού. Σε ότι αφορά τα παράγωγα της ρεσορσινόλης, οι ρεσορσινολικοί αιθέρες είναι συστατικά αρωμάτων και υπάρχει σημαντική βιβλιογραφία σχετικά με μακράς αλυσίδας resorcinols ALK (en) στα φυτά και βακτήρια.<sup>[48]</sup>

Η ρεσορσινόλη είναι επίσης ένα μονομερές υποπροϊόν της υποβάθμισης, οξείδωσης και της μικροβιακής αποικοδόμησης των χουμικών ουσιών. Χουμικές ουσίες είναι επίσης παρούσες σε κάρβουνα, σχιστόλιθους και ενδεχομένως άλλα ανθρακούχα ιζηματογενή βράχια. Αυτή η εμφάνιση μπορεί να εξηγήσει την ανίχνευση της ρεσορσινόλης σε λύματα της διαδικασίας μετατροπής άνθρακα μέσω θερμικής

διάσπασης<sup>[52]</sup>. Οι Chou & Patrick το 1976<sup>[53]</sup> βρήκαν ρεσορσινόλη σε ορισμένα δείγματα, ως προϊόν αποσύνθεσης των υπολειμμάτων καλαμποκιού στο χώμα.

#### 2.4.2 Ανθρωπογενείς πηγές

Η ρεσορσινόλη παράγεται εμπορικά σε όλο τον κόσμο σε λίγες μόνο εξειδικευμένες εγκαταστάσεις. Όλες αυτές οι μονάδες χρησιμοποιούν βενζόλιο, σαν την κύρια πρώτη ύλη και μόνο δύο μονοπάτια παραγωγής ακολουθούνται εμπορικά σε μεγάλη κλίμακα. Η ρεσορσινόλη παράγεται είτε μέσω σουλφούρωση του βενζολίου σε συνθήκες που ευνοούν την υποκατάσταση στη θέση meta, ακολουθούμενη από τη σύντηξη με άνυδρο καυστικό ("κλασική" διαδρομή μέσω της 1,3-benzenedisulfonic οξύ) ή μέσω hydroperoxidation του 1,3-διισοπροπυλοβενζολίου<sup>[45][48][55]</sup>. Η ρεσορσινόλη είναι επίσης, ένα υποπροϊόν της κατασκευής της μετα-αμινο φαινόλης, όπως αυτή παράγεται από το μετανιλικό οξύ (metanilic acid) λιωμένο με υδροξείδιο του νατρίου.

**Πίνακας 2.3.** Ετήσια κατανάλωση ρεσορσινόλης ανάλογα με τη χρήση του, ανά περιοχή το 2000

| Application        | Annual consumption (tonnes) |               |              |               | Total         | %          |
|--------------------|-----------------------------|---------------|--------------|---------------|---------------|------------|
|                    | Western Europe              | United States | Japan        | Other regions |               |            |
| Rubber products    | 6 480                       | 10 271        | 1 598        | 5 470         | 23 820        | 53.2       |
| Wood adhesives     | 2 700                       | 1 820         | 572          | 2 280         | 7 373         | 16.5       |
| Flame retardants   | 2 100                       | 1 222         | 250          | 500           | 4 072         | 9.1        |
| UV stabilizers     | 1 000                       | 588           | 120          | 200           | 1 908         | 4.3        |
| Dyes               | 300                         | 350           | 230          | 750           | 1 630         | 3.6        |
| Meta-amino phenols | 0                           | 0             | 1 880        | 0             | 1 880         | 4.2        |
| Hair dyes          | 150 <sup>b</sup>            | 150           | 75           | 75            | 450           | 1.0        |
| Pharmaceuticals    | 75                          | 75            | 50           | 25            | 225           | 0.5        |
| Others             | 695                         | 323           | 875          | 1 550         | 3 443         | 7.7        |
| <b>Total</b>       | <b>13 500</b>               | <b>14 799</b> | <b>5 650</b> | <b>10 850</b> | <b>44 801</b> | <b>100</b> |

Στην Ιαπωνία, η ρεσορσινόλη παράγεται σε δύο εργοστάσια (Sumitomo Chemical και Mitsui) πετροχημικών προϊόντων) με 1,3 - diisopropylbenzene. Οι Ηνωμένες Πολιτείες την παράγουν σε μια μονάδα (INDSPEC Chemical Corporation) <sup>[54]</sup> , χρησιμοποιώντας τη «κλασική» οδό μέσω του 1,3-benzenedisulfonic οξέος<sup>[45][48][55]</sup>. Την ίδια διαδικασία χρησιμοποιούσαν στην Hoechst AG (Γερμανία), παρόλο που η παραγωγή σταμάτησε το 1991<sup>[45][55]</sup>. Σύμφωνα με την CEH<sup>[55]</sup>, υπάρχουν επίσης τρεις μικρής δυναμικότητας μονάδες που βρίσκονται στην Κίνα και τέσσερις στην Ινδία. Η συνολική παγκόσμια κατανάλωση ρεσορσινόλης δίνεται ως περίπου 40.000 τόνοι το 1990<sup>[45]</sup> και 44.800 τόνους το 2000 (βλ. Πίνακα 2.3 CEH, 2001; EK, 2002), γεγονός που υποδηλώνει μια μικρή αύξηση σε σχέση με την προηγούμενη δεκαετία. Το σύνολο των εισαγωγών στη Δυτική Ευρώπη για 2000 εκτιμάται ότι είναι 14800 τόνοι, με 1100 τόνους να επανα εξάγονται και η κατανάλωση τους δίνεται ως 13500 τόνους. Η πρόβλεψη για την κατανάλωση το 2005 για τη Δυτική Ευρώπη ήταν περίπου 12700 τόνοι.

## **2.5 Χρήσεις**

Μια αναλυτική περιγραφή των χρήσεων του ρεσορσινόλης δίνεται από τον Dressler<sup>[48]</sup>. Ο μεγαλύτερος χρήστης ρεσορσινόλης είναι η βιομηχανία καουτσούκ (περίπου 50%). Η ρεσορσινόλη είναι το απαραίτητο συστατικό ενός συγκολλητικού συστήματος, μαζί με φορμαλδεΐδη και συνθετικό καουτσούκ.

Χρησιμοποιείται για την κατασκευή ελαστικών για επιβατικά αυτοκίνητα φορτηγά, off-road εξοπλισμό, και άλλα μηχανικά αγαθά ενισχυμένα με ίνες ελαστικού, όπως ζώνες μεταφοράς και οδήγησης. Η ρεσορσινόλη χρησιμοποιείται επίσης σε εφαρμογές συγκόλλησης ξύλου υψηλής ποιότητας (περίπου 25%), σε προϊόντα που έγιναν από ρητίνες ρεσορσινόλης-φορμαλδεΐδης ή των φαινολικά τροποποιημένων ρητινών ρεσορσινόλης-φορμαλδεΐδης. Η χρήση τους είναι για συνθήκες υπερβολικής ζέστης ή υγρασίας.

Η ρεσορσινόλη είναι ένα σημαντικό χημικό ενδιάμεσο στην παρασκευή ειδικών χημικών προϊόντων, όπως εξυλορεσορκινόλη, p αμινοσαλικυλικό οξύ, και ηλιακά μέσα ελέγχου για την προστασία των πλαστικών από την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία. Άλλες χρήσεις περιλαμβάνουν την κατασκευή χρωστικών ουσιών, φαρμακευτικών προϊόντων, επιβραδυντικών φλόγας, γεωργικών χημικών προϊόντων, μυκητοκτόνων, και αντιμετώπιση στο πρόβλημα βελτίωσης της μηχανικής και χημικής αντοχής των μηχανημάτων που παρασκευάζουν υφάσματα [48][55].

Παρά το γεγονός ότι έχει συγκριτικά χαμηλό βάρος, η χρήση της ρεσορσινόλης σε οξειδωτικές βαφές μαλλιών, κρέμες κατά της ακμής και φορείς peeling, είναι κατάλληλη για την έκθεση των καταναλωτών. Ένα σύνολο 150 τόνων ρεσορσινόλης χρησιμοποιήθηκε σε οξειδωτικές βαφές μαλλιών από τη βιομηχανία καλλυντικών το έτος 2000 (COLIPA έρευνα, η οποία αναφέρεται στο HCTS, 2002). Σε αυτές τις βαφές μαλλιών, η ρεσορσινόλη ρυθμίζεται σε επίπεδα 5% ή χαμηλότερα (EK, 2003b)? Στην πράξη ωστόσο, πολλοί κατασκευαστές ρίχνουν το επίπεδο της ρεσορσινόλης στις βαφές μαλλιών στο 1,25% (EK, 2002). Η ρεσορσινόλη περιορίζεται στο 0,5% στο σαμπουάν και τη λοσιόν για τα μαλλιά (EK, 2003b).

Η ρεσορσινόλη επίσης χρησιμοποιείται σε φαρμακευτικά παρασκευάσματα για την τοπική θεραπεία παθήσεων του δέρματος, όπως ακμή, σμηγματορροϊκή δερματίτιδα, έκζεμα, ψωρίαση και κονδυλώματα. Η ρεσορσινόλη είναι συνήθως παρούσα σε σκευάσματα κατά της ακμής σε μέγιστη συγκέντρωση 2%. Η συγκέντρωση της ρεσορσινόλης μπορεί να είναι πολύ υψηλότερη στο peeling, σε ορισμένες περιπτώσεις περίπου στο 50%<sup>[56][57][58][59][60]</sup>.

Η λύση του Jessner (ρεσορσινόλη σε αιθυλική αλκοόλη, 14% w/v; γαλακτικό οξύ 14%; και σαλικυλικό οξύ, 14%) χρησιμοποιείται συνήθως σε χημικό peeling. Μια εξειδικευμένη ιατρική χρήση της ρεσορσινόλης είναι το βιολογικό glues (κόλλα ζελατίνης-ρεσορσινόλης-φορμαλδεύδης) για την καρδιαγγειακή χειρουργική επέμβαση, ιδίως για επεμβάσεις αορτής<sup>[61][62][63]</sup>.

## **2.6 Εκπομπές στο περιβάλλον**

Η ρεσορσινόλη απελευθερώνεται στο περιβάλλον κατά τη διάρκεια της παραγωγής και της μεταποίησης. Επίσης, θα εκλυθεί κατά τη χρήση και την απόρριψη των καταναλωτικών και επαγγελματικών προϊόντων που την περιέχουν. Επιπλέον, η ρεσορσινόλη μπορεί να εμφανιστεί ως υποβαθμισμένο ενδιάμεσο άλλων ανθρωπογενών περιβαλλοντικών μολυσματικών παραγόντων. Για παράδειγμα, ρεσορσινόλη εντοπίστηκε ως ενδιάμεσο της αναερόβιας αποδόμησης των m-μεθοξυφαινόλων<sup>[100]</sup> και ως προϊόν ακτινοβολίας των 3-χλωροφαινόλων σε υδατικό διάλυμα<sup>[101]</sup>.

Κατά την παραγωγή, διαμόρφωση και χρήση της, η ρεσορσινόλη εκλύεται κυρίως στην υδρόσφαιρα, λόγω της χαμηλής πίεσης ατμού και της υψηλής διαλυτότητας της στο νερό. Μέσω της σκόνης μπορεί να συμβεί εκπομπή στον αέρα κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής της παραγωγής ή της βιομηχανικής χρήσης (π.χ. ως ενδιάμεση ουσία) και έχει σημασία μόνο για τους εργάτες που εκτίθενται, λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής της ρεσορσινόλης στον αέρα (έμμεση φωτοχημική αποικοδόμηση).

### **2.6.1 Εκτιμώμενες παγκόσμιες εκπομπές**

Δεν υπάρχουν μετρήσεις της ρεσορσινόλης που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της παραγωγής, χρήσης και απόρριψης της στα λύματα των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων. Έτσι, πρέπει να εκτιμούνται οι εκπομπές της κατά κύριο λόγο στην υδρόσφαιρα και την ατμόσφαιρα κατά τη διάρκεια του κύκλου της παραγωγής της και της βιομηχανικής χρήσης.

Τα εργαστήρια παρασκευής της, τα οποία είναι μόνο λίγα και ειδικευμένα, αποτελούν τις βασικές πηγές απελευθέρωσης ρεσορσινόλης. Αν και δεν υπάρχουν ποσοτικοποιήσεις, οι εκπομπές από διαδικασίες παραγωγής αναμένονται μικρότερες από 0,05% (RTF, 2002). Χρησιμοποιώντας αυτή την εκτίμηση του 0,05%



και το γεγονός ότι η ετήσια κατανάλωση είναι 44800 τόνοι, τότε το παγκόσμιο επίπεδο εκπομπών θα ήταν 22,4 τόνοι ανά έτος, με την ευρωπαϊκή συμβολή να ανέρχεται στο επίπεδο των 6,75 τόνων ανά έτος.

Ως αποτέλεσμα αυτής της εκτίμησης, οι χρήσεις στον τομέα ελαστικών και ξυλείας είναι οι πιο σημαντικές αιτίες απελευθέρωσης στον αέρα. Όσον αφορά το νερό, οι πιο σημαντικές εκπομπές αφορούν τη χρήση της ρεσορσινόλης στα μαλλιά ως χρωστική ουσία και στα φαρμακευτικά προϊόντα.

Παρά το γεγονός ότι από τη συνολική χωρητικότητα το ποσοστό χρήσης που αφορά βαφές μαλλιών, και φαρμακευτικών προϊόντων είναι μόνο το 1% και 0,5%, αντίστοιχα φαίνεται ότι αυτές οι εκπομπές είναι οι πιο επικίνδυνες. Δεδομένου ότι οι βαφές μαλλιών έχουν κατασκευαστεί σε μια κλειστή διαδικασία υπό κενό, δεν υπάρχουν απώλειες την ατμόσφαιρα. Ωστόσο, οι απώλειες σε υδατικά υγρά απόβλητα που προκύπτουν από την επεξεργασία μιας παρτίδας μπορεί να ανέλθει στο 1% λόγω του μικρού μεγέθους των παρτίδων που χρησιμοποιούνται (ΕΚ, 2002). Αυτό αντιπροσωπεύει 1,5 από τους 150 τόνους που χρησιμοποιούνται από τη βιομηχανία ετήσια στη Δυτική Ευρώπη.

Για τις φαρμακευτικές εφαρμογές, όπως οι αλοιφές, υποτίθεται ότι στη χειρότερη περίπτωση το 100% της ρεσορσινόλης (75 τόνοι για τη Δυτική Ευρώπη) φτάνει στη ροή λυμάτων, είτε άμεσα είτε από την έξοδο των εγχώριων χώρων υγειονομικής ταφής (ΕΚ, 2002). Μέθοδοι απόρριψης περιλαμβάνουν πλήρη αποτέφρωση, και αποσύνθεσης σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων.

Όλες οι διαθέσιμες πρακτικές πρέπει να αξιολογούνται προσεκτικά για την τήρηση των τοπικών ισχύοντων πολιτειακών και ομοσπονδιακών κανονισμών<sup>[48]</sup>. Ειδικά στοιχεία για την παραγωγή των αποβλήτων σε Γερμανία ή τη χρήση ως ενδιάμεσα είναι διαθέσιμα σε Bua (1993)<sup>[61]</sup>.

## **2.7 Μετατροπή**

Δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα σχετικά με τη φωτομετατροπή ρεσορσινόλης στον αέρα. Ωστόσο, η κρυσταλλική ρεσορσινόλη παίρνει ωχρό κόκκινο χρώμα στην παρουσία αέρα και φωτός (O'Neil, 2001). Δεν πρέπει να αναμένεται άμεση φωτοδιάσπαση της ρεσορσινόλης, καθώς η ουσία δεν απορροφά σε σημαντικό βαθμό το ηλιακό φως σε μήκη κύματος πάνω από 295 nm ( $\lambda_{\max} = 274 \text{ nm}$ ,  $\epsilon_{\max} = 2000 \text{ l/mol}\cdot\text{cm}^3$ <sup>[65]</sup>). Η έμμεση φωτοχημική αποικοδόμηση στον αέρα με ρίζες υδροξυλίου υπολογίστηκε μέσω του προγράμματος AOPWIN v.1.91. Τα αποτελέσματα δείχνουν χρόνο ημιζωής περίπου 2 ώρες με τη χρήση υδροξυλίου  $500000 \text{ radicals/cm}^3$  κατά μέσο όρο για 24 ώρες.<sup>[66]</sup>

Λόγω της χημικής δομής της ρεσορσινόλης, δεν είναι δυνατόν να υπολογιστεί η σταθερά του ποσοστού υδρόλυσης μέσω HYDROWIN v.1.67 (FH-ITEM, 2004). Ωστόσο, η ρεσορσινόλη δεν διαθέτει λειτουργικές ομάδες ευαίσθητες στην υδρόλυση σε συνθήκες περιβάλλοντος, έτσι δεν αναμένεται να συμβεί υδρόλυση. Σε αραιό υδατικό διάλυμα συμβαίνει φωτόλυση και φωτο-οξείδωση της ρεσορσινόλης από την αντίδραση της με το οξυγόνο<sup>[65]</sup>. Ως προϊόντα της αντίδρασης προσδιορίστηκαν το τριυδροξυβενζόλιο και το hydroxybenzoquinone.

Παρουσία όζοντος, σε υδατικό διάλυμα, η ρεσορσινόλη μπορεί να υποβαθμιστεί, μέσω πυρογαλλόλης (1,2,3-τριυδροξυβενζόλιο) και 3-hydroxybenzoquinone σε γλυοξαλικού οξύ, γλυοξάλη, οξαλικό οξύ, διοξειδίο του άνθρακα και νερό<sup>[102]</sup>. Ο Μουσαβί (1979) καθορίζει ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής για την αυτοοξείδωση της ρεσορσινόλης σε υδατικό διάλυμα στους 25 °C και pH ίσο με 9, είναι 1612 h (= 67 ημέρες).

Κατ' αναλογία με άλλες φαινολικές ενώσεις (η ρεσορσινόλη μπορεί να θεωρηθεί ως παράγωγο της φαινόλης), η ρεσορσινόλη θα πρέπει να μπορεί να αντιδράσει σε υδάτινες μάζες με ρίζες υδροξυλίου και peroxy. Για φαινόλη και υδροκινόνη, προσδιορίστηκαν ημιζωές ίσες με 100 και 20 ώρες αντίστοιχα, με χρήση ευαίσθητοποιητή ρίζες υδροξυλίου. Με ρίζες peroxy οι τιμές του χρόνου

ημιζωής έγιναν 19 και 0,2 ώρες, αντίστοιχα,<sup>[67]</sup>. Οι Shen και Lin το 2003<sup>[68]</sup> μελέτησαν την αποσύνθεση της ρεσορσινόλης με άμεση φωτόλυση σε 254 nm UV και με διαδικασία ακτινοβολίας UV υδρογόνου-υπεροξειδίου σε υδατικό διάλυμα.

Η απορρόφηση του φωτός και οι φωτολυτικές ικανότητες βρέθηκαν να εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το pH. Σε όξινο και ουδέτερο διάλυμα (pH 3-7), η ρεσορσινόλη διασπάται με υδροξυλικές ρίζες. Περίπου το 99% της συνολικής αποσύνθεσης ήταν εξαιτίας αυτής της πορείας. Άμεση φωτόλυση είχε σημασία μόνο σε τιμές του pH  $\geq$  9. Οι σχετικές μελέτες για την αξιολόγηση της βιοαποικοδόμησης συνοψίζονται στον Πίνακα 2.4. Η ρεσορσινόλη αποδείχθηκε να είναι βιοαποικοδομήσιμη υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες.

**Πίνακας 2.4.** Αερόβια και αναερόβια βιοαποικοδόμηση της Ρεσορσινόλης

| Procedure   | Inoculum/test substance  | Result  | Reference              |
|---|--|---|------------------------|
| <b>Aerobic degradation</b>  |  |   |                        |
| OECD TG 301C "Ready Biodegradability: Modified MITI Test I"                     | Activated sludge, 30 mg/l (suspended solids) per 100 mg resorcinol/l                               | 66.7% degradation after 14 days                                 | MITI (1992)            |
| OECD TG 302B "Inherent Biodegradability: Modified Zahn-Wellens Test"            | Activated sludge, adapted 1.1 g/l (dry weight) per 50–400 mg DOC/l or 200–1000 mg COD/l            | 97% degradation after 4 days                                    | Wellens (1990)         |
| Similar to OECD TG 302B "Inherent Biodegradability: Modified Zahn-Wellens Test" | Activated sludge, adapted 100 mg/l (dry matter) per 200 mg COD/l                                   | 90% after 5 days  | Pitter (1976)          |
| OECD TG 302B "Inherent Biodegradability: Modified Zahn-Wellens Test"            | Activated sludge, adapted  | >90% after 15 days  | Hoechst AG (1992)      |
| Wastewater treatment plant simulation test                                      | Initial resorcinol concentration: 138 mg/l and 500 mg/l, hydraulic retention time 3 h              | 138 mg/l: 95–100% (based on DOC)<br>500 mg/l: >60% after 5 days | Gubser (1969)          |
| <b>Anaerobic degradation</b>  |  |   |                        |
| Serum bottle test (Biochemical Methane Potential)                               | Anaerobic sludge, adapted, 500 mg resorcinol/l   | 36% degradation after 196 days <sup>a</sup>                     | Blum et al. (1986)     |
| Serum bottle test (Biochemical Methane Potential)                               | Anaerobic sludge, phenol-enriched culture, 500 mg resorcinol/l                                     | 83% after 245 days <sup>b</sup>                                 | Blum et al. (1986)     |
| Serum bottle test   | Anaerobic sludge from two municipal wastewater treatment plants, 100 ml (10% sludge) per 50 mg C/l | a. 98% degradation after 21 days<br>b. 0% after 56 days         | Horowitz et al. (1982) |
| Submerged anaerobic upflow filter and 2–10 days hydraulic retention times       | Anaerobic sludge, acetate-enriched culture, 90 mg resorcinol/l                                     | 95% degradation after 110 days of acclimation                   | Chou et al. (1979)     |

C, carbon; COD, chemical oxygen demand; DOC, dissolved organic carbon

<sup>a</sup> At concentrations of 1000 and 2000 mg/l, no degradation observed.

<sup>b</sup> At a concentration of 1000 mg/l, 4% was degraded after 245 days; no degradation was observed at 2000 mg/l.

Με βάση τα αποτελέσματα που λήφθηκαν σε δοκιμή αερόβιας βιοδιάσπασης που διεξάγεται σύμφωνα με την μέθοδο OECD TG 301 °C, η ρεσορσινόλη μπορεί να ταξινομηθεί ως ουσία εύκολα βιοαποικοδομήσιμη. Μετά από 14 ημέρες, μετρήθηκε μετατροπή 66,7% (Miti, 1992). Επιπλέον, είναι διαθέσιμες αρκετές μελέτες για την εγγενή βιοαποικοδομησιμότητα. Ποσοστά εξάλειψης  $\geq 90\%$  παρατηρήθηκαν μετά από 4-15 ημέρες (Pitter, 1976; Wellens, 1990; Hoechst AG, 1992) <sup>[69-71]</sup>.

Σε ένα τεστ προσομοίωσης αποκατάστασης των λυμάτων μιας μονάδας παραγωγής (δοκιμή τροποποίησης γερμανικών απορρυπαντικών), παρατηρήθηκαν ρυθμοί υποβάθμισης 95 και 100% με βάση μετρήσεις DOC και αρχική συγκέντρωση ρεσορσινόλης 138 mg/l και υδραυλικό χρόνο κατακράτησης 3 h. Για αρχική συγκέντρωση 500 mg/l, ο χρόνος προσαρμογής αυξάνεται. Στη συνέχεια, η αποσύνθεση είναι μεγαλύτερη του 60% (Gubser, 1969) <sup>[72]</sup>.

Η ρεσορσινόλη είναι πιθανό να βιοδιασπαστεί σε αναερόβιες συνθήκες. Ωστόσο, τα αποτελέσματα των μελετών δεν είναι συνεπή. Χρησιμοποιώντας προσαρμοσμένη αναερόβια ίλη και αρχική συγκέντρωση ρεσορσινόλης έως και 500 mg/l, καταγράφηκαν ρυθμοί υποβάθμισης 36%, 83% και 95%.

Σε συγκεντρώσεις  $\geq 1000$  mg/l δεν παρατηρήθηκε υποβάθμιση. Η δυνητική βιοαποδόμηση της ρεσορσινόλης, υπό αναερόβιες συνθήκες έχει επιβεβαιωθεί από μελέτες που χρησιμοποιούν αντιδραστήρες σταθερής κλίνης ή ζύμωσης (Tschech & Schink, 1985;<sup>[73]</sup> Latkar & Chakrabarti, 1994<sup>[74]</sup>).

Η ρεσορσινόλη σε υδάτινο περιβάλλον μπορεί να μεταβολιστεί από βακτήρια και μύκητες μέσω hydroxyhydroquinone (1,2,4- τριυδροξυβενζόλιο) και maleyl acetate σε  $\beta$ -keto adipate και μέσω hydroxyhydroquinone και ακετυλο πυροσταφυλικό μυρμηκικό, οξικό, και πυροσταφυλικό οξύ (Chapman & Ribbons, 1976; Gaal & Neujahr, 1979; Ingle et al, 1985)<sup>[75-77]</sup>

Μια άλλη δυναμική μέθοδος είναι μέσω πυρογαλλόλης (Groseclose & Ribbons, 1981)<sup>[78]</sup>. Αναερόβια αποικοδόμηση της ρεσορσινόλης καταλύεται από ρεσορσινόλη reductase και hydratase. Τα προϊόντα είναι 1,3-dioxocyclohexane, το οποίο υδρολύεται άμεσα σε 5-oxohexanoate, και 5-oxohex-2-enecarboxylate. Πιθανός να υπάρχει περαιτέρω υποβάθμιση μέσω β-οξειδωσης (Heider & Fuchs, 1997)<sup>[79]</sup>.

**Πίνακας 2.5.** Διανομή ρεσορσινόλης σε λύματα επεξεργασίας μονάδων

| Parameter                              | Value      |
|--|------------|
| Fraction directed to air by STP (%)    | $<10^{-5}$ |
| Fraction directed to water by STP (%)  | 12.6       |
| Fraction directed to sludge by STP (%) | 0.0977     |
| Fraction degraded by STP (%)           | 87.3       |
| Total removal by STP (%)               | 87.4       |

STP = sewage treatment plant; log octanol/water partition coefficient ( $K_{ow}$ ) = 0.8, dimensionless Henry's law constant (H) =  $4.21 \times 10^{-3}$ , rate constant for degradation ( $k_{bio_{STP}}$ ) = 1/h

<sup>a</sup> From Fh-ITEM (2005b).

Το ποσοστό βιοαποικοδόμησης σε μια μονάδα επεξεργασίας λυμάτων είναι ένα συντηρητικό αποτέλεσμα που απεικονίζει την χειρότερη περίπτωση. Στην πραγματικότητα, το ποσοστό υποβάθμισης θα είναι σημαντικά υψηλότερο, κάτι που υποδεικνύεται από τα αποτελέσματα της προσομοίωσης επεξεργασία των λυμάτων μονάδας (95 - 100% για μια σχετικά υψηλή συγκέντρωση 138 mg/l, Gubser, 1969)<sup>[72]</sup> που παρατίθενται στον Πίνακα 2.4.

## **2.8 Συσσωρευση**

Τα πειραματικά αποτελέσματα δοκιμών για βιοσυσσώρευση δεν είναι διαθέσιμα. Βασισμένα σε έναν συντελεστή κατανομής οκτανόλης / νερού  $<1$  και με εκτίμηση ότι το BCF είναι 3,2 ( $\log BCF = 0.5$ , BCFWIN v.2.15, FH-ITEM, 2004)<sup>[66]</sup> αναμένεται ένα χαμηλό ποσοστό βιοσυσσώρευσης.

### 2.8.1 Επιπτώσεις σε οργανισμούς

Τα αποτελέσματα σχετικά με τις επιπτώσεις της ρεσορσινόλης σε οργανισμούς έχουν ληφθεί από την έκθεση Bua 99<sup>[80]</sup> από το άρθρο «Μελέτη επιστημονικής αξιολόγησης 12 ουσιών στο πλαίσιο της λίστας προτεραιότητας των πράξεων που πρέπει να ληφθούν στην περίπτωση ενδοκρινικής διατάραξης» (ΕΚ, 2002), και από την έκθεση «USEPA HPV Challenge Program<sup>[81]</sup>». Τα δεδομένα συνοψίζονται στον Πίνακα 2.6.

Πίνακας 2.6. Τοξικότητα για φύκη

| Species  | Guideline      | Test conditions   | Result   | Reference                 |
|--|----------------|---|--|---------------------------|
| Green algae ( <i>Chlorella pyrenoidosa</i> )   | – <sup>3</sup> | 12 h light/12 h dark; 6400 lux; temperature: 21 °C; measurement of cell density via haemocytometer  | 72 h EC <sub>0</sub> = 1.1 mg/l<br>sole concentration tested | Stauber & Florence (1987) |
| Green algae ( <i>Chlorella vulgaris</i> )      | – <sup>3</sup> | Initial cell density: ~7.5 × 10 <sup>5</sup> /ml; temperature: 36.5 °C; light: 28 W/m <sup>2</sup>  | 6-h EC <sub>50</sub> = 605                                   | Kramer & Trümper (1986)   |
| Green algae ( <i>Scenedesmus quadricauda</i> ) | – <sup>3</sup> | Continuous lighting; temperature: 24 °C; pH 7.5; river water for dilution; measurement of turbidity | 96-h TTC = 60 mg/l   | Bringmann & Kühn (1959)   |

–<sup>3</sup> = No guideline study

Δεν υπάρχει διαθέσιμη καμία κατευθυντήρια γραμμή για την τοξικότητα στα υδρόβια φυτά. Ωστόσο, οι Stauber και Florence το 1987<sup>[82]</sup> έδειξαν ότι ρεσορσινόλη σε συγκέντρωση 1,1 mg/l δεν είχε καμία επίδραση στο ποσοστό κυτταρικής διαίρεσης (ρυθμός ανάπτυξης) του πράσινου μικροφύκιου του γλυκού νερού *Chlorella pyrenoidosa*. Η περίοδος ανάπτυξης ήταν 72 ώρες. Δεδομένου ότι μόνο μία συγκέντρωση είχε δοκιμαστεί, η μελέτη δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση των κινδύνων.

Οι Kramer και Trümper το 1986<sup>[83]</sup> διεξήγαγαν δοκιμές αναστολής της ανάπτυξης με *Chlorella vulgaris*. Καθόρισαν τιμή EC<sub>50</sub> 6 ωρών ίσο με 605 για συγκέντρωση 835 mg/l σε σχέση με τη βιομάζα.

Οι Bringmann και Kühn (1959)<sup>[84]</sup> παρατήρησαν κατώτατο όριο τοξικότητας, σε 96 ώρες καλλιέργειας σε συγκέντρωση 60 mg/l σε μια δοκιμή αναστολής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Στη μελέτη, δεν υπήρχαν ενδείξεις για το αν οι καλλιέργειες ήταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

Οι Stom και Roth (1981)<sup>[85]</sup> καθορίζουν, μεταξύ άλλων, ένα EC50 12 ημερών για συγκέντρωση 165 mg/l για το *Lemna minor* σε σχέση με τον πολλαπλασιασμό των φυτών.

Οι Florence και Stauber (1986)<sup>[82]</sup> δεν βρήκαν επίσης καμία σημαντική επίδραση της ρεσορσινόλης σε συγκέντρωση 1,1 mg/l στην 72 ωρών χρονική διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης του θαλάσσιου φυκιού *Nitzschia closterium*.

Σε αρκετές δοκιμές τοξικότητας των μικροοργανισμών, βρέθηκαν τιμές EC50>100 mg ρεσορσινόλης ανά λίτρο. Για παράδειγμα, οι Bringmann και Kühn (1960)<sup>[84]</sup> καθόρισαν μια χρονική διάρκεια 16 ωρών για το κατώτατο όριο τοξικότητας συγκέντρωσης (EC10) των 200 mg/l για το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* σε σχέση με αναστολή της υποβάθμισης της γλυκόζης.

Ο Schultz (1987)<sup>[86]</sup> παρατήρησε μια 48ωρη EC50 από 543 mg/l για *Tetrahymena pyriformis* (πρωτόζωα) σε μια δοκιμή αναστολής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Για την αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα *Fusarium oxysporum*, βρέθηκε μια 6-ήμερη EC50 των 1100 mg/l βρέθηκε (Soni & Bhatia, 1980)<sup>[87]</sup>





## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

### 3.1 Βακτήρια

Εξ ορισμού η βιοτεχνολογία είναι χρήση ζωντανών οργανισμών (ή προϊόντων τους) ή βιολογικών συστημάτων-αντιδράσεων για την παραγωγή αγαθών. <sup>[11]</sup>

Γενικά τα βακτήρια και οι μύκητες είναι κύριοι παράγωγοι διαφόρων ουσιών στη χερσαίο περιβάλλον. Είναι αναμενόμενη μια παρόμοια συμπεριφορά από τους οργανισμούς αυτούς και στους ωκεανούς. Και έτσι έχει αποδειχθεί. Έχουν παρατηρηθεί αντιβιοτικές, αντιακές και αντιμυκητιασικές δραστηριότητες των οργανισμών αυτών. Εκτός αυτού, έχουν αναφερθεί ιδιότητες όπως διεγερτικό της ανάπτυξης που μπορεί να είναι χρήσιμο σε μελέτες: για την επούλωση πληγών, και τις μελέτες κατά του καρκίνου.

Έτσι λοιπόν η χρήση μικροοργανισμών στην βιοτεχνολογία μεταξύ άλλων έχει ως σκοπό την παρασκευή εμβολίων και την βιο-αποικοδόμηση και αποκατάσταση του περιβάλλοντος.

Τα βακτήρια με τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, είχαν απομονωθεί από το κόκκινο είδος φυκιού *Laurencia* και στην ουσία είναι μη αναγνωρισμένο είδος.



## **3.2 Φύκη**

### **3.2.1 Τι είναι τα φύκη**

Τα φύκη (algae) είναι φωτοσυνθετικοί φυτικοί οργανισμοί που δεν έχουν βλαστούς, φύλλα, ρίζες, δεν σχηματίζουν σπέρματα, άνθη ή καρπούς όπως τα ανώτερα φυτά. Αντίθετα, έχουν πρωτόγονη οργάνωση, πολύ απλή στις κατώτερες ταξινομικά ομάδες, πιο πολύπλοκη στις ανώτερες. Σχηματίζουν σπόρια αντί σπερμάτων. Ορισμένα έχουν πολύπλοκους βιολογικούς κύκλους (κύκλους ζωής). Διαφέρουν πολύ τόσο από τα χερσαία όσο και από τα θαλάσσια Σπερματοφύτα, (αυτά που από άγνοια συχνά αποκαλούνται «φύκη»).[12]

Από πλευράς μορφολογίας υπάρχει εξαιρετική ποικιλία. Υπάρχουν απλές μονοκύτταρες μορφές, αποικιακές, μικροσκοπικές, νηματοειδείς έως πολύπλοκες διακλαδισμένες ή μη. Ορισμένα μοιάζουν με μικροσκοπικούς θάμνους, με τσαμπιά σταφυλιού, άλλα μοιάζουν με φύλλα, δίχτυ, σωλήνες, κ.ά. Τα φύκη διακρίνονται σε μικροφύκη και σε μακροφύκη. Τα μικροφύκη είναι μικροσκοπικά, αόρατα με γυμνό μάτι, όπως για παράδειγμα αυτά που συμμετέχουν στο φυτοπλαγκτό, που αποκαλούνται συλλογικά μικροφύκη. Άλλα είναι ορατά με γυμνό μάτι ή και μεγάλων διαστάσεων που φθάνουν αρκετά μέτρα μήκος όπως για παράδειγμα τα μεγάλα φαιοφύκη, συλλογικά τα αποκαλούμε μακροφύκη.

Η επίδραση των φυκών στην εξέλιξη της ζωής αλλά και της διαμόρφωσης του κλίματος στον πλανήτη είναι τεράστιας σημασίας. Τα κυανοφύκη είναι οι πρώτοι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί που αναπτύχθηκαν πάνω στη Γη και συντέλεσαν στον εμπλουτισμό της ατμόσφαιρας με οξυγόνο. Τα φύκη συμβάλλουν στην παραγωγή του 40-50% του οξυγόνου της ατμόσφαιρας.

Επιπλέον η συμβολή τους στην κατανάλωση του διοξειδίου του άνθρακα είναι καθοριστική καθώς υπολογίζεται ότι απομακρύνουν ετησίως  $2 \times 10^{12}$  kg άνθρακα έναντι  $1.4 \times 10^{12}$  kg που απομακρύνονται από τη βιόσφαιρα του εδάφους. Αποτέλεσαν την πρώτη ύλη του ορυκτού άνθρακα με τη μορφή είτε αργού πετρελαίου είτε φυσικού αερίου.

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα, τα οποία αποτελούνται από πολλά διαφορετικά είδη κοινών φυκών, έχουν οργανίδια όπως πλαστίδια, μιτοχόνδρια, πυρήνες, φορείς Golgi, και μαστίγια που ελέγχουν τις λειτουργίες του κυττάρου, επιτρέποντάς του να επιβιώσουν και να αναπαραχθούν.

Τα *Eucaryotics* κατηγοριοποιούνται σε διάφορες τάξεις που καθορίζονται κυρίως από το χρώμα τους, τον κύκλο ζωής τους και τη βασική κυτταρική δομή τους. Οι πιο σημαντικές κατηγορίες είναι τα πράσινα φύκη (*Chlorophyta*), τα κόκκινα φύκη (*Rhodophyta*) και διάτομα (*Bacillariophyta*). Τα φύκη μπορεί να είναι αυτότροφα ή ετερότροφα. Τα πρώτα απαιτούν μόνο ανόργανες ενώσεις, όπως  $\text{CO}_2$ , άλατα και μια φωτεινή πηγή ενέργειας για την ανάπτυξη τους. Για την δεύτερη περίπτωση είναι μη φωτοσυνθετικά και ως εκ τούτου απαιτούν μια εξωτερική πηγή οργανικών ενώσεων, καθώς και θρεπτικά συστατικά και ενέργεια. Μερικά φωτοσυνθετικά άλγη είναι μιξοτροπικά, δηλαδή έχουν την ικανότητα και να εκτελούν φωτοσύνθεση και να αποκτούν εξωγενείς οργανικές θρεπτικές ουσίες. Για αυτότροφα φύκη η φωτοσύνθεση αποτελεί βασικό συστατικό της επιβίωσής τους, σύμφωνα με την οποία θα μετατρέξουν την ηλιακή ακτινοβολία και το  $\text{CO}_2$  που απορροφάται από τους χλωροπλάστες σε τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και  $\text{O}_2$  δηλαδή το «νόμισμα» ενέργειας σε κυτταρικό επίπεδο, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται στην αναπνοή για την παραγωγή ενέργειας για την υποστήριξη της ανάπτυξης <sup>[40]</sup>

Η ταξινόμηση των φυκών σε ομάδες βασίζεται στους ίδιους κανόνες που χρησιμοποιούνται για την ταξινόμηση των φυτών στην ξηρά. Ομοιότητες και διαφορές σε φύκη, μύκητες και πρωτόζωα οδηγούν τους επιστήμονες στο να προτείνουν σημαντικές αλλαγές ταξινομικές, οι οποίες συνεχίζονται.

Πίνακας 3.1. Ιδιότητες των μεγαλύτερων ομάδων των φυκών<sup>[41]</sup>

| S. No | Taxonomic group                     | Chlorophyll | Carotenoids  | Biloproteins        | Storage products                       | Flagellation&Cell structure   |
|-------|-------------------------------------|-------------|--|---------------------|--|---|
| 1     | Bacillariophyta                     | a, c        | B-carotene, rarely fucoxanthin   |                     | Chrysolaminarin<br>oils                | 1 apical flagellum in male gametes:<br>cell in two halves with elaborate markings.                                      |
| 2     | Chlorophycophyta<br>(green algae)   | a, b        | $\beta$ -carotene, $\pm$ -carotene rarely carotene and lycopene, lutein. |                     | Starch, oils                           | 1,2,4 to many, equal, apical or subapical flagella.   |
| 3     | Chrysophycophyta<br>(golden algae)  | a, c        | $\beta$ -carotene, fucoxanthin   |                     | Chrysolaminarin<br>oils                | 1 or 2 unequal, apical flagella, in some, cell surface covered by characteristic scales.                                |
| 4     | Cyanobacteria<br>(blue green algae) | a, c        | $\beta$ -carotene, phycobilins   |                     |  |   |
| 5     | Phaeophycophyta<br>(brown algae)    | a, c        | $\beta$ -carotene, $\pm$ fucoxanthin, violaxanthin                       |                     | Laminarin, soluble carbohydrates, oils | 2 lateral flagella  |
| 6     | Dinophyta<br>(dinoflagellates)      | a, c        | $\beta$ -carotene, peridinin, neoperidinin, dinoxanthin, neodinoxanthin. |                     | Starch, oils                           | 2 lateral, 1 trailing, 1 girdling flagellum, in most, there is a longitudinal and transverse furrow and angular plates. |
| 7     | Rhodophycophyta<br>(red algae)      | a, rarely d | $\beta$ -carotene, zeaxanthin $\pm \beta$ carotene                       | Phycorythrin/Cyanin | Floridean starch<br>oils               | Flagella absent   |

### 3.2.2 Που αναπτύσσονται

Τα φύκη, κυρίως τα μικροσκοπικά, συναντώνται παντού. Ιδιαίτερα στα νερά, γλυκά και αλμυρά, θάλασσες, λίμνες, ποτάμια. Ορισμένα, μικροσκοπικά, έχουν προσαρμοστεί και ζουν στο έδαφος, σε βράχους, πέτρες, ξύλα, ακόμα και σε ψυχρές ή θερμές ερημικές περιοχές. Τα μεγάλων διαστάσεων φύκη βρίσκονται στη θάλασσα. Ορισμένα φαιοφύκη σχηματίζουν πραγματικά θαλάσσια δάση. Στη θάλασσα αναπτύσσονται κυρίως πάνω σε σταθερά υποστρώματα, δηλαδή σε βράχους, σε ύφαλα πλοίων κ.ά. όπου προσκολλώνται με ένα χαρακτηριστικό όργανο, το δίσκο προσκόλλησης, ή με αποφύσεις που θυμίζουν ρίζες.

Σε υδατικό περιβάλλον τα φύκη αναπτύσσονται ως βένθος, περίφυτο ή φυτοπλαγκτόν. Το βένθος απαρτίζουν φύκη τα οποία προσκολλώνται σε κάποιο υπόστρωμα και αναπτύσσονται στον πυθμένα ή τα τοιχώματα μιας υδατολεκάνης. Ως περίφυτα χαρακτηρίζονται τα φύκη τα οποία προσκολλώνται σε υδατική βλάστηση (επίφυτα στην περίπτωση που προσκολλώνται στο εξωτερικό του υδατικού φυτού και ενδόφυτο στην περίπτωση που ζουν στο εσωτερικό του). Το φυτοπλαγκτόν απαρτίζεται από φύκη τα οποία κινούνται παθητικά ή αιωρούνται στο υδάτινο μέσο. Ανάλογα με το μέγεθός του διακρίνεται σε μακροπλαγκτόν (>200 μm), μικροπλαγκτόν(20-200 μm), nanoplankton (10-20 μm), ultraplankton (2-10 μm) και picoplankton (0.2-2 μm)<sup>[88]</sup>.

### 3.2.3 Κύριες ομάδες φυκών

Κυανοφύκη ή Κυανοβακτήρια (Cyanobacteria, Cyanophyceae, Blue green algae).

Διάτομα (Bacillariophyta ή Diatomeae).

Δινοφύκη, Δινομαστιγωτά, Πυροφύκη (Dinophyceae, Dinoflagellates).

Χλωροφύκη (Chlorophyta, Chlorophyceae, Green algae).

Φαιοφύκη (Phaeophyta, Brown algae).

Ροδοφύκη (Rhodophyta, Rhodophyceae, Red algae).

### **3.3 Μικροφύκη**

Τα μικροφύκη είναι προκαρυωτικοί ή ευκαρυωτικοί φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί με μεγάλο ρυθμό ανάπτυξης που μπορούν να ζήσουν σε επίπονες συνθήκες χάρη στην μονοκυτταρική ή πολυκυτταρική τους δομή. Παραδείγματα προκαρυωτικών μικροφυκών είναι τα κυανοφύκη (Cyanophyceae) και ευκαρυωτικών τα πράσινα φύκη (Chlorophyta) και τα διάτομα (Bacillariophyta).<sup>[89][13]</sup>

Τα μικροφύκη συναντώνται σε όλα τα οικοσυστήματα του πλανήτη, υδατικά και μη, αντιπροσωπεύοντας μια μεγάλη ποικιλία ειδών που ζουν σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντολογικών συνθηκών. Εκτιμάται πως απαντώνται πάνω από 50.000 είδη, με μόνο τα 30.000 να έχουν τύχει εκτεταμένης μελέτης<sup>[90]</sup>.

Τα μικροφύκη προσαρμόζονται στο περιβάλλον με τέτοιο τρόπο ώστε να εκμεταλλεύονται στο έπακρον τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά, να τα αποθηκεύουν ή να βρίσκουν νέους τρόπους χρήσης τους. Γενικά για την ανάπτυξη τους (βιομάζα που αποτελείται από 40-50% άνθρακα) τα μικροφύκη χρειάζονται επαρκή ποσότητα πηγής άνθρακα και φωτός για τη φωτοσύνθεση<sup>[91][92]</sup>. Ωστόσο μπορούν να αναδιαμορφώσουν την εσωτερική τους δομή (π.χ. βιοχημικός και φυσιολογικός εγκλιματισμός) ή να εκκρίνουν στο περιβάλλον διάφορες ουσίες με σκοπό να απομυζήσουν κάθε διαθέσιμο θρεπτικό ή να μειώσουν την ανάπτυξη ανταγωνιστικών μικροοργανισμών<sup>[90]</sup>.

Ο μεταβολισμός των μικροφυκών μπορεί να είναι αυτοτροφικός, ετεροτροφικός, μικτοτροφικός ή φωτοετεροτροφικός, δίνοντας τους έτσι τη δυνατότητα να αλλάζουν το μεταβολικό τους μηχανισμό ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν.

Για παράδειγμα κάποιοι μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν<sup>[93]</sup>:

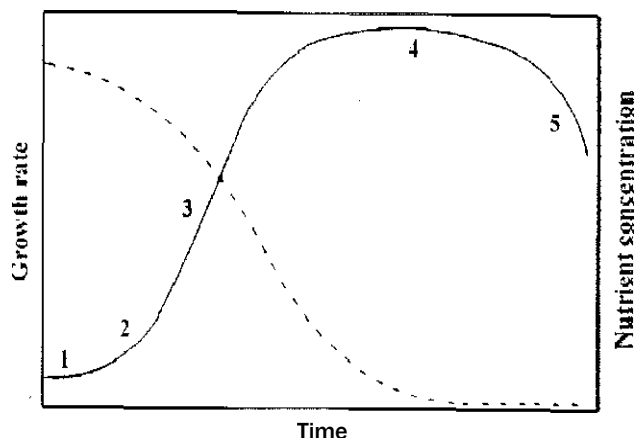
- Φωτοαυτοτροφικά χρησιμοποιώντας το φως ως μοναδική πηγή ενέργειας, που με τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης μετατρέπεται σε χημική ενέργεια.
- Χημειοετεροτροφικά όπου πηγή ενέργειας είναι μόνο οργανικές ενώσεις.
- Μικτοτροφικά όπου η κύρια πηγή ενέργειας προέρχεται από τη φωτοσύνθεση αλλά μπορούν να χρησιμοποιούν και οργανικές ενώσεις. Σε αυτή τη κατηγορία βρίσκονται και οι αμφιτροφικοί μικροοργανισμοί όπου φωτοσυνθέτουν όταν υπάρχει διαθέσιμο φως, συμπεριφέρονται δηλαδή φωτοαυτοτροφικά ή συμπεριφέρονται ετεροτροφικά ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των οργανικών ουσιών που είναι διαθέσιμες.
- Φωτοετεροτροφικά (Φωτο-οργανοτροφικά) όπου το φως είναι αναγκαίο για την αφομοίωση των οργανικών ουσιών ως πηγή άνθρακα.

Η διαφορά στο μεταβολισμό μεταξύ των φωτοετεροτροφικών και των μικτοτροφικών μικροφυκών είναι λεπτή. Το βασικό σημείο διαφοροποίησης είναι κυρίως η πηγή ενέργειας που χρησιμοποιούν για την παραγωγή των μεταβολικών τους προϊόντων. Ο μεταβολικός μηχανισμός που χρησιμοποιείται μπορεί να διακριθεί και με τις αλλαγές στο pH, το οποίο αλλάζει ανάλογα με τη στοιχειομετρία ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

Τα είδη *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Arthrospira (Spirulina) platensis* είναι παραδείγματα στελεχών που βρέθηκαν να αναπτύσσονται κάτω από φωτοαυτοτροφικές, ετεροτροφικές καθώς και μικτοτροφικές συνθήκες. Άλλα είδη όπως τα *Selenastrum capricornutum* και *Scenedesmus acutus* μπορούν να αναπτυχθούν είτε φωτοαυτοτροφικά, ή χημειοετεροτροφικά, ή φωτοετεροτροφικά<sup>[93]</sup>.

Η ανάπτυξη των μικροφυκών είναι γρήγορη αν υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες και επαρκής ποσότητα θρεπτικών συστατικών. Τυπικά τα μικροφύκη διπλασιάζουν τη βιομάζα τους μέσα σε 24 ώρες ή ακόμα μέσα σε 3.5 ώρες όταν βρίσκονται στην εκθετική φάση<sup>[93]</sup>. Στο Διάγραμμα παρουσιάζεται μια τυπική καμπύλη ανάπτυξης

μικροφυκών (συνεχής γραμμή) μαζί με τη καμπύλη κατανάλωσης θρεπτικών (διακεκομμένη γραμμή) σε καλλιέργεια batch.



**Σχήμα 3.1.** Καμπύλη ανάπτυξης μικροφυκών — Καμπύλη κατανάλωσης υποστρώματος [Mata et al, 2010]<sup>[95]</sup>

Φαίνονται καθαρά οι 5 φάσεις ανάπτυξης: (1) λανθάνουσα, (2) εκθετική, (3) γραμμική, (4) στασιμότητας, (5) θανάτου καθώς και η μείωση των θρεπτικών συστατικών τα οποία καταναλώνονται στη διάρκεια της ανάπτυξης. Σε γενικές γραμμές στην εκθετική φάση τα μικροφύκη έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, ενώ στην φάση στασιμότητας μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και γλυκογόνο.

### 3.4 Χρήσεις στη βιομηχανία

Η αξιοποίηση των μικροφυκών στην βιομηχανία γίνεται κυρίως για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Όμως πέρα από αυτό, τα μικροφύκη μπορούν να χρησιμεύσουν και για άλλους σκοπούς. Ορισμένες δυνατότητες επί του παρόντος εξετάζονται παρακάτω.

- Απομάκρυνση του CO<sub>2</sub> από τις βιομηχανικές απαερίων, μειώνοντας τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου από μια επιχείρηση ή μια μέθοδο διαδικασία παραγωγής βιοντίζελ.
- Επεξεργασία λυμάτων με απομάκρυνση των NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, κάνοντας τα φύκη να μεγαλώσουν με τη χρήση αυτών των ρύπων ως θρεπτικά συστατικά.



- Μετά την εξόρυξη πετρελαίου, η βιομάζα φυκών που προκύπτει μπορεί να μεταποιηθεί σε αιθανόλη, μεθάνιο, ζωοτροφές, ή και να χρησιμοποιηθεί ως οργανικό λίπασμα λόγω της υψηλής του αναλογίας σε N:P. Μπορεί επίσης απλά να καεί για τη παραγωγή ενέργειας (ηλεκτρισμού και θερμότητας).
- Ο συνδυασμός της ικανότητάς τους να αναπτύσσονται κάτω από αντίξοες συνθήκες, και τις μειωμένες τους ανάγκες για θρεπτικά συστατικά, μπορούν να καλλιεργηθούν σε περιοχές ακατάλληλες για γεωργική χρήση, ανεξάρτητα από τις εποχιακές αλλαγές του καιρού, έτσι ώστε να μην ανταγωνίζονται για την αρόσιμη χρήση της γης, και μπορεί να χρησιμοποιήσει υγρά απόβλητα, ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια του, δηλαδή να μην απαιτούν τη χρήση γλυκού νερού.
- Ανάλογα με τα είδη μικροφυκών, άλλες ενώσεις μπορούν επίσης να εξαχθούν, με πολύτιμες εφαρμογές σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς, που περιλαμβάνουν μια μεγάλη γκάμα χημικών προϊόντων, όπως λίπη, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, πετρέλαιο, φυσικές χρωστικές ουσίες, ζάχαρη, χρωστικές, αντιοξειδωτικά, υψηλής αξίας βιοδραστικές ενώσεις, και άλλα.
- Λόγω της ποικιλίας των βιολογικών παράγωγων υψηλής αξίας με πολλές πιθανές εμπορικές εφαρμογές, τα μικροφύκη μπορούν να φέρουν επανάσταση σε ένα μεγάλο αριθμό τομέων της βιοτεχνολογίας, συμπεριλαμβανομένων των βιοκαυσίμων, καλλυντικών, φαρμάκων, διατροφής και στα πρόσθετα τροφίμων, της υδατοκαλλιέργειας, καθώς και την πρόληψη της ρύπανσης.<sup>[38]</sup>

### **3.5 Πειράματα μέχρι σήμερα**

Στελέχη των μικροφυκών *Chlorella sp.*, *Scenedesmus obliquus* και *Spirulina maxima* εξετάστηκαν για την υποβάθμιση μερικών φαινολικών ενώσεων που απαριθμήθηκαν από την U.S. EPA ως ρύποι υψηλής προτεραιότητας. Οι τοξίνες διαλύθηκαν σε θρεπτικό μέσο με pH 7 - 7.2, χωρίς πηγή άνθρακα (εκτός από τη δοκιμή του στελέχους *Spirulina*, όπου σε αυτή την περίπτωση το διττανθρακικό

άλας νατρίου ήταν μέρος του θρεπτικού μέσου με pH 9–9,2) και προστέθηκαν τα άλγη που προετοιμάστηκαν από την καλλιέργεια batch. Η φαινόλη βρέθηκε να υποβαθμίζεται εύκολα από όλα τα δοκιμασμένα άλγη σε μια συγκέντρωση περίπου  $1000 \text{ mg l}^{-1}$ . Το 2,4 διμεθυλό-φαινόλιο βρέθηκε να μετατρέπεται από το στέλεχος *Chlorella* (ακόμη και σε μια συγκέντρωση περίπου  $1000 \text{ mg l}^{-1}$ ) σε ένα ισομερές του διμεθυλο-benzenediol το οποίο σε μερικές περιπτώσεις συσσωρεύτηκε στο θρεπτικό μέσο.

Ανάλογα με τη συγκέντρωση της βιομάζας και των τοξινών το ποσοστό υποβάθμισης άλλαξε και βρέθηκε να υπάρχει ένα βέλτιστο/άριστο της συγκέντρωσης τοξινών που προκαλεί την υποβάθμιση. Η πλήρης υποβάθμιση θα μπορούσε να επιτευχθεί με συγκεντρώσεις βιομάζας υψηλότερες από  $4 \text{ g l}^{-1}$ . Η 2,4 δινιτρο-φαινόλη σε μια συγκέντρωση περίπου  $190 \text{ mg l}^{-1}$  υποβιβάστηκε γρήγορα από το στέλεχος *Scenedesmus* μετά από μια περίοδο προσαρμογής 5 ημερών. Η 2-χλωροφαινόλη σε μια συγκέντρωση περίπου  $200 \text{ mg l}^{-1}$  υποβιβάστηκε και αφαιρέθηκε εν μέρει το χλώριο από το στέλεχος *Chlorella*. Δεν επιβεβαιώθηκε η βιοδιάσπαση της 2,4 διχλωρο-φαινόλης αλλά θα μπορούσαν να βρεθούν οι συνθήκες κάτω από τις οποίες τα άλγη μπορούν να επιζήσουν μιας υψηλότερης συγκέντρωσης της τοξίνης. Το συμπέρασμα ήταν ότι όλα τα δοκιμασμένα άλγη έχουν έναν μηχανισμό για την υποβάθμιση των φαινολικών ενώσεων.

Τα φύκη είναι μια ομάδα μικροοργανισμών τα οποία μπορούν να διαδραματίσουν έναν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της μοίρας των τοξικών ενώσεων πχ. σε απόβλητα, αλλά αυτό δεν έχει μελετηθεί ευρέως. Η έρευνα για την χρήση φυκών ως μέσο στην κατεργασία υδάτινων αποβλήτων έχει μακροχρόνια παράδοση, αλλά οι προηγούμενες μελέτες έχουν ασχοληθεί πρώτιστα με την αφαίρεση του αζώτου και του φωσφόρου από τα μη τοξικά δημοτικά ή γεωργικά απόβλητα.<sup>[30]</sup>

Τα φύκη έχουν δυνατότητες όσον αφορά την αφαίρεση των οργανικών ενώσεων το οποίο περιλαμβάνει συσσώρευση και υποβάθμιση<sup>[31]</sup> Διάφορες ενώσεις συσσωρεύονται από τα φύκη συμπεριλαμβανομένου του DDT φυτοφαρμάκων,

aldrin, dieldrin, endrin, lindane, mire ,methoxychlor, toxaphene, parathion, carbaryl, και του clordan <sup>[32, 33]</sup>. Ο μηχανισμός μπορεί να είναι η φυσική προσρόφηση καθώς η διαδικασία ήταν συνήθως εξαρτώμενη από το εάν η ένωση ήταν υδρόφοβη η όχι. Η υποβάθμιση μπορεί να είναι πλήρης προς CO<sub>2</sub>, είτε προς ένα ενδιάμεσο προϊόν, είτε ενζυμική είτε μη ενζυμική.

Η διαδικασία υποβάθμισης φαινόλων και κατεχόλης προς CO<sub>2</sub>, έχει ήδη περιγραφεί για μερικά φύκη του γλυκού νερού.<sup>[34]</sup> Επίσης έχει περιγραφεί και ο μετασχηματισμός της ναφθαλίνης σε 1 ναφθόλη από το στέλεχος *κυανοβακτήρια* και *μικροάλγη*.<sup>[35, 36]</sup> Ο Ellis <sup>[34]</sup> έχει μετρήσει την εξέλιξη του <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> από ραδιενεργά ιχνηθετημένη φαινόλη και κατεχόλη από τα άλγη του γλυκού νερού. Έχει αναφερθεί επίσης ο μετασχηματισμός του naphthalene σε 1 ναφθόλη από το στέλεχος *cyanobacteria* και *microalgae*.<sup>[35, 36]</sup> Εντούτοις, οι μηχανισμοί της υποβάθμισης των τοξικών ενώσεων από τα άλγη, και ο λόγος για τον οποίο τα άλγη εκτελούν αυτές τις αντιδράσεις και ποία είναι η έκταση της υποβάθμισης, δεν έχουν γίνει κατανοητοί.

Κατά εξέταση των φυκών για την κατεργασία υδάτινων αποβλήτων, είναι προφανές ότι απαιτούνται πιο θεμελιώδη αποτελέσματα για να αξιολογηθεί η ικανότητά τους. Κατά συνέπεια, επιλέχθηκαν τρία κοινώς ευρέως χρησιμοποιημένα άλγη, και τα εξετάστηκαν ως προς το εάν ή όχι έχουν την ικανότητα να υποβαθμίσουν την συγκέντρωση των τοξικών φαινόλων. Δεδομένου ότι η αναφερόμενη υποβάθμιση των τοξικών ενώσεων<sup>[34, 35, 36]</sup> ήταν αργή, χρησιμοποιήσαμε μεγάλες συγκεντρώσεις βιομάζας φυκών, προκειμένου να επιταχυνθεί η υποβάθμιση αυτή. Τέτοιες μεγάλες συγκεντρώσεις θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε έναν αντιδραστήρα με τα ακινητοποιημένα άλγη σε μια στερεά υποστήριξη.

Όλα τα δοκιμασμένα άλγη έχουν έναν μηχανισμό για την υποβάθμιση των φαινολικών ενώσεων. Αυτό έχει αναφερθεί προηγουμένως για τη φαινόλη και κατεχόλη από τον ερευνητή Ellis <sup>[34]</sup>. Εντούτοις, ο Ellis εφάρμοσε συγκέντρωση δύο τάξεις χαμηλότερη από αυτή που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή, που ήταν

κοντά σε θανατηφόρα συγκέντρωση.

Το πρώτο βήμα της υποβάθμισης μπορεί να είναι μια οξείδωση του δεύτερου άνθρακα στο δακτύλιο του βενζολίου για να διαμορφώσει ένα παράγωγο κατεχόλης. Όλες οι δοκιμασμένες φαινολικές ενώσεις αποδείχθηκαν να έχουν επιτεθεί από τα φωτισμένα κύτταρα αλγών, και να έχουν μετατραπεί ή/και υποβαθμιστεί εκτός από την 2,4 διχλώρο-φαινόλη. Υποκατάστατα στο βενζολικό δακτύλιο μπορούν να αυξήσουν την τοξικότητα των ενώσεων και να επηρεάζουν την αποικοδόμηση. Αυτό είναι ένα γνωστό γεγονός για τα βακτήρια <sup>[37]</sup> και είναι λογικό να αναμένονται παρόμοιες σχέσεις και για άλλους μικροοργανισμούς. Η φαινόλη υποβιβάστηκε εύκολα, οι μεθυλικές ή νιτρο ομάδες δεν είναι πιθανώς τόσο τοξικές όσο τα χλώρια. Η 2 χλωροφαινόλη υποβιβάστηκε τουλάχιστον από το στέλεχος *Chlorella* αλλά κανένα σαφές συμπέρασμα δεν μπορεί να συναχθεί σχετικά με την 2,4 διχλωρο-φαινόλη. Το στέλεχος *Scenedesmus* φάνηκε να μην υποβιβάζει τις χλωριωμένες φαινόλες στα πειράματά μας αλλά, αφ' ενός, υποβίβασε εύκολα το 2,4-DNP. Η τοξικότητα των χλωριωμένων φαινολών περιγράφηκε να αυξάνεται με τον αριθμό ατόμων χλωρίου σε ένα μόριο <sup>[38]</sup> και τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία δεδομένου ότι τα άλγη μπόρεσαν να επιζήσουν μόνο της σχετικά χαμηλής συγκέντρωσης του 2,4-DCP. Σε κάθε περίπτωση όταν συγκρίνεται με τα βακτήρια η υποβάθμιση από τα άλγη ήταν πολύ πιο αργή.

Το μίγμα και των δύο αλγών ή αλγών και βακτηρίων μπορεί να είναι μια λογική επιλογή για βιομηχανικούς σκοπούς, δεδομένου ότι τα διαφορετικά άλγη μπορούν να ενεργήσουν διαφορετικά με τις διαφορετικές ενώσεις. Κάποιος μπορεί ακόμη και να περιμένει μια συμβίωση των διαφορετικών μικροοργανισμών στην υποβάθμιση μιας τοξίνης ως ενδιάμεσα προϊόντα τα οποία μπορούν να είναι ελεύθερα στο διάλυμα.

### **3.6 Διαθεσιμότητα Μικροφυκών**

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν δημιουργηθεί μεγάλες τράπεζες καλλιεργειών με μεγαλύτερη αυτή του Πανεπιστημίου της Coimbra στην Πορτογαλία που φιλοξενεί πάνω από 4000 γένη και 1000 είδη. Τα μικροφύκη αυτά είναι διαθέσιμα για μια μεγάλη ποικιλία εφαρμογών όπως είναι η φαρμακευτική, η παραγωγή τροφίμων για τον άνθρωπο και φυσικά η παραγωγή βιοκαυσίμων.

Άλλες τράπεζες μικροφυκών είναι:

Η τράπεζα του Goettingen University στη Γερμανία (SAG), που ξεκίνησε στις αρχές του 1920 και διαθέτει περίπου 2213 στελέχη και 1273 είδη. Περίπου το 77% των στελεχών της τράπεζας του SAG είναι πράσινα φύκη και το 8% περίπου κυανοβακτήρια (61 γένη and 230 στελέχη). Κάποια από αυτά είναι κόκκινα φύκη του γλυκού νερού, ενώ κάποια άλλα είναι θαλασσινού περιβάλλοντος.

Μια άλλη γνωστή τράπεζα καλλιέργειας φυκών, είναι αυτή του πανεπιστημίου του Τέξας που ιδρύθηκε το 1953. Διαθέτει 2300 στελέχη φυκών γλυκού νερού (εδafικά πράσινα φύκη και κυανοβακτήρια), καθώς και αντιπροσώπους από τα κυριώτερα τάξα των θαλάσσιων φυκών.

Στη Ασιατική Ήπειρο, το National Institute for Environmental Studies Collection (NIES), στο Ιμπαράκι της Ιαπωνίας διαθέτει μια τράπεζα που περιλαμβάνει περίπου 2150 στελέχη, με γύρω στα 700 είδη φυκών.

Η τράπεζα φυκών CSIRO στην Αυστραλία, διαθέτει 800 περίπου στελέχη φυκών συμπεριλαμβανομένων αντιπροσωπευτικών ειδών που απομονώθηκαν τόσο από γλυκά όσο και από θαλασσινά νερά της χώρας.

Στην περίπτωση μας χρησιμοποιήθηκε το γένος μικροφυκών *Nannochloropsis* sp.

### **3.7 Nannochloropsis**

### 3.7.1 Κατηγοριοποίηση

**Αυτοκρατορία:** Ευκαρυωτικά

**Βασίλειο:** Chromista/Harosa/Heterokonta

**Συνομοταξία:** Ochrophyta

**Ζωολογική διαίρεση:** Phaeista/Limnista

**Κατηγορία:** Eustigmatophyceae

**Τάξη:** Eustigmatales

**Οικογένεια:** Monodopsidaceae



Ο *Nannochloropsis* sp. είναι heterokont άλγος. Το όνομα heterokonts πηγάζει από το άνισο μήκος των μαστίγιων, ένα κοινό χαρακτηριστικό αυτής της ομάδας. Στη φυσιολογία των φυκών υπάρχει μια «γραμμή» και η οποία ανάλογα με το χρώμα της, χωρίζει τα φύκη σε καφέ φύκη (Phaeophyta), κίτρινο-πράσινα φύκη (Xanthophyta), χρυσά φύκη (Chrysophyt), και διάτομα (Bacillariophyta). Γενικά το καφέ είναι το κυρίαρχο χρώμα τους, και προέρχεται από την υψηλή περιεκτικότητά τους σε φουκοξανθίνη, μια χρωστική ουσία φωτοσύνθεσης.<sup>[14][15][16][17][18][19]</sup>

Η κίτρινη-πράσινη άλγη αποτελείται από περίπου 600 είδη σε πάνω από 90 γένη. Τα περισσότερα είδη είναι μονοκύτταροι ή νηματοειδή και προτιμούν χερσαία ή γλυκά νερά οικοτόπων. Αν και ορισμένα είδη έχουν υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης μόνο ο *Olisthodiscus* και ο *Nannochloropsis* χρησιμοποιούνται σε κάποιο βαθμό ως ζωοτροφές στον τομέα της υδατοκαλλιέργειας.<sup>[39]</sup>

Τα φύκη έχουν αναγνωριστεί ως μία από τις αρχαιότερες μορφές ζωής. Είναι πρωτόγονα φυτά (thallophytes), δηλαδή δεν υπάρχουν ρίζες, μίσχους, φύλλα, καμία στείρα κάλυψη των κυττάρων γύρω από το αναπαραγωγικά κύτταρα και έχουν χλωροφύλλη α ως την κύρια χρωστική φωτοσυνθετική ουσία τους. Οι δομές των φυκών είναι κατά κύριο λόγο για τη μετατροπή της ενέργειας, χωρίς καμία εξέλιξη πέρα από την κυτταρική μορφή, και η ανάπτυξή τους αν και απλή τους επιτρέπει να

προσαρμόζονται στις επικρατούσες συνθήκες του περιβάλλοντος και να ευημερούν σε μακροπρόθεσμη βάση.

### 3.7.2 Ονομασία

Ο αριθμός των ονομάτων και των ειδών: Υπάρχουν 6 είδη (και infraspecific) ονομάτων στη βάση δεδομένων επί του παρόντος, εκ των οποίων 6 έχουν επισημανθεί ως ταξινομικά αποδεκτά.

Ονόματα: (το «C» δείχνει ένα όνομα που είναι σήμερα ταξινομικά αποδεκτό. Το "S" ομότυπο ή ετερότυπο συνώνυμο, το «U» υποδηλώνει όνομα αβέβαιης ταξινομικής κατάταξης, αλλά το οποίο έχει υποβληθεί σε κάποια επαλήθευση. Τέλος το «P» υποδηλώνει προκαταρκτική καταχώρηση χωρίς να έχει υποστεί κάποιου είδους έλεγχο.

*Nannochloropsis gaditana* Λ. Μ. Lubián C

*Nannochloropsis granulata* Karlson B. & Δ. Πότερ C

*Nannochloropsis limnetica* Λ. Krienitz, Δ. Hepperle, H.-B. Stich & W. Weiler C

*Nannochloropsis oceanica* Σούδας & Miyashita C

*Nannochloropsis oculata* (κρέμασμα) DJHibberd Γ – Τύπος

*Nannochloropsis salina* Δ. I. Hibberd C

### 3.7.3 Ανάπτυξη

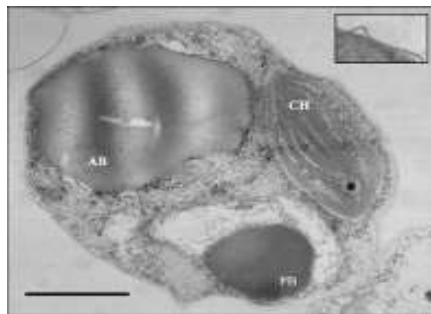
Ο *Nannochloropsis* είναι ένα γένος των φυκών που αποτελείται από 6 περίπου είδη. Το γένος στην τρέχουσα ταξινόμηση ταξινομική για πρώτη φορά καλείται με Hibberd (1981).

Τα είδη ως επί το πλείστον έγιναν γνωστά από το θαλάσσιο περιβάλλον, αλλά επίσης να εμφανίζονται σε γλυκό και υφάλμυρο νερό. Όλα τα είδη είναι μικρές, σφαίρες που δεν εκφράζουν κανένα διακριτό μορφολογικό χαρακτηριστικό, και δεν

μπορούν να διακριθούν ούτε από το φως ούτε από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Ο χαρακτηρισμός γίνεται συνήθως από rbcL γονίδια και ανάλυση ακολουθίας rDNA 18S.

Είναι διαφορετικό από άλλα σχετικά μικροφύκη στο ότι στερείται χλωροφύλλης β και γ. ο *Nannochloropsis* είναι σε θέση να δημιουργήσει σε υψηλή συγκέντρωση μια σειρά από χρωστικές ουσίες, όπως η ασταξανθίνη, ζεαξανθίνη και κανθαξανθίνης.

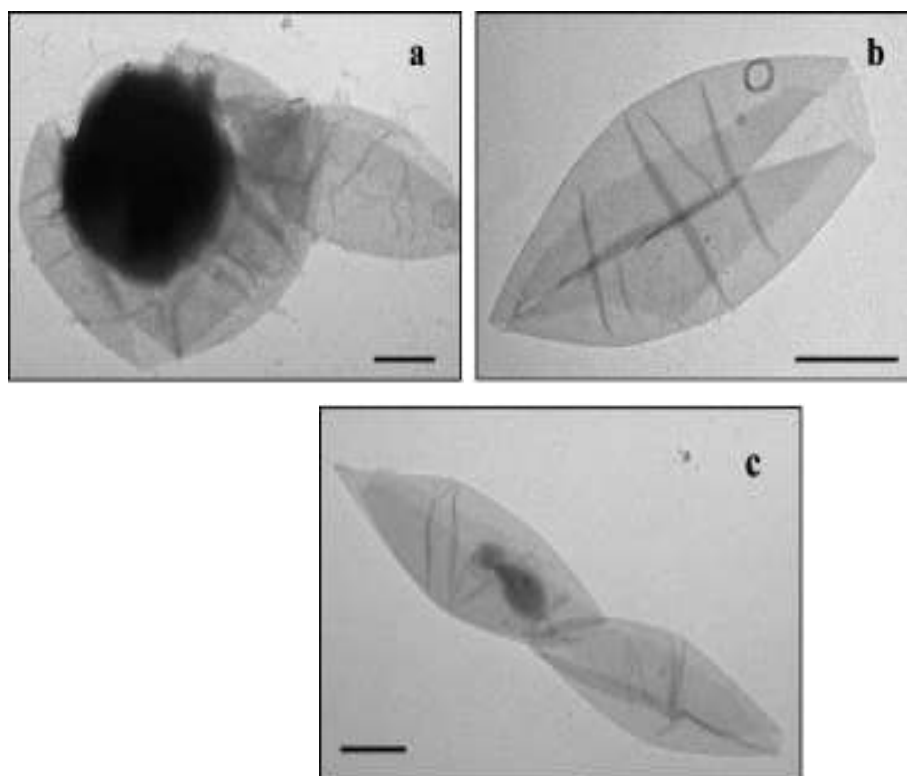
Τα φύκη έχουν μια πολύ απλή δομή. Έχουν διάμετρο περίπου 2 μm. Θεωρείται μια πολλά υποσχόμενη άλγη για βιομηχανικές εφαρμογές λόγω της ικανότητάς της να συσσωρεύει σε υψηλά επίπεδα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.



**Σχήμα 3.2.** Μετάδοση μικρογραφίας ηλεκτρονίων νεαρών κυττάρων *sp* *Nannochloropsis*. Ο χλωροπλάστης (CH) δείχνει την τυπική δομή του *Eustigmatophyceae*, με την lamellae να αποτελείται από τρία θυλακοειδή. Τόσο το σώμα συσώρευσης (AB) όσο και το χρωματισμένο σώμα (PB) είναι ορατά. Το ένθετο δείχνει το λεπτό τοίχωμα των κυττάρων που σχηματίζεται γύρω από ώριμα κύτταρα πριν από τον σχηματισμό αυτόσπορου. Bar: 1μm<sup>[41]</sup>

Μετά την διαίρεση, τα νεοσυσταθείσα αυτόσπορα τρέφονται από το κυτταρικό τοίχωμα της μητέρας (Σχ. 3.3α), το οποίο διοχετεύεται στο μέσο καλλιέργειας (Σχ. 3.3β). Το χρωματισμένο σώμα μπορεί να θεωρηθεί παγιδευμένο εντός των τειχών, καθώς αυτές οι δύο δομές ελευθερώνονται ταυτόχρονα κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των αυτόσπορων (Σχ. 3.3γ).




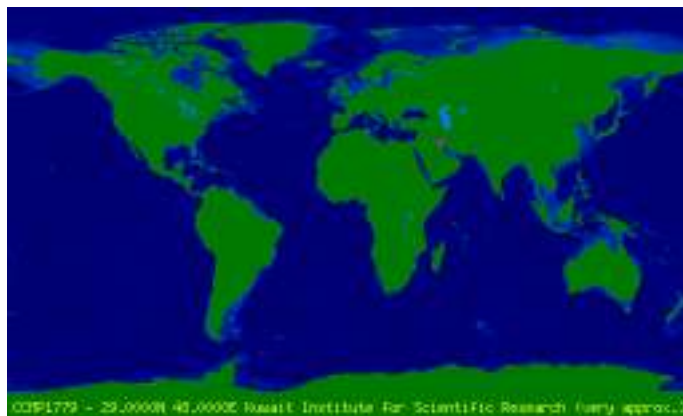


**Σχήμα 3.3.** Κυτταρικά τοιχώματα *Nannochloropsis* sp. (α, β, γ) Διαβίβαση μικρογραφίας ηλεκτρονίων. (α) Η διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος της μητέρας για την απελευθέρωση των αυτόσπορων. Bar: 1μm. (β) κενό κυτταρικό τοίχωμα της μητέρας. Bar: 1 μm. (γ) εγκλωβισμό έγχρωμο σώμα σε κυτταρικό τοίχωμα. Bar: 1μm <sup>[41]</sup>

**Πίνακας 3.2.** Πληροφορίες σχετικά με τον *Nannochloropsis* sp.

|                           |  |                             |               |
|---------------------------|--|-----------------------------|---------------|
| <b>Collected:</b>         | 1979   | <b>Isolated by:</b>         | Belcher       |
| <b>Collection Site:</b>   | 29.0000N 48.0000E<br>Kuwait Institute for<br>Scientific Research<br>(very approx.) | <b>Isolated date:</b>       | 1979          |
| <b>Ocean:</b>             | Indian   | <b>Identified by:</b>       |               |
| <b>Sea:</b>               | Arabian Sea  | <b>Deposited by:</b>        | Turner,M      |
| <b>Nearest Continent:</b> | Asia   | <b>Deposited date:</b>      | 09/25/1997    |
|                           |  | <b>Initial Axenic date:</b> | Not Available |
|                           |  | <b>Initial Axenic by:</b>   |               |

|                             |            |                               |   |
|-----------------------------|------------|-------------------------------|---|
| <b>Other Information:</b>   |            | <b>Currently Axenic:</b>      | Yes   |
| <b>Culture medium:</b>      | L1, f/2-Si | <b>Strain synonyms:</b>       | CCAP211/46  |
| <b>Temp. range at CCMP:</b> | 18-22°C    | <b>Name synonyms:</b>         |   |
| <b>Cell length:</b>         | 2 - 4 μm   | <b>Authentic/Type strain:</b> | No  |
| <b>Cell width:</b>          | 2 - 4 μm   | <b>GenBank:</b>               |   |
| <b>Bioluminescent:</b>      | No         | <b>Microscope:</b>            |  |
|                             |            | <b>Genome:</b>                | Not Available   |



**Σχήμα 3.3.** Χάρτης της θέσης του *Nannochloropsis* sp. 1779 όπου και ερευνάται <sup>[41]</sup>

Έχει υποστηριχθεί ότι η παραγωγή βιοκαυσίμων σε συνδυασμό με την επεξεργασία των λυμάτων είναι η περιοχή με την πιο πιθανή εμπορική εφαρμογή σε σύντομο χρονικό διάστημα. Παρέχει ένα μονοπάτι για την απομάκρυνση των χημικών και βιολογικών μολυσματικών παραγόντων, βαρέα μέταλλα και παθογόνους οργανισμούς από τα λύματα, ενώ ταυτόχρονα παράγει βιομάζα για την παραγωγή βιοκαυσίμων.

Η εξοικονόμηση σχετικά με τις απαιτήσεις για την αποκατάσταση των χημικών και η δυνατή ελαχιστοποίηση της χρήσης γλυκού νερού για την παραγωγή βιομάζας είναι οι κύριοι παράγοντες για την παραγωγή βιομάζας, ως μέρος της διαδικασίας επεξεργασίας των λυμάτων.

Λύματα, πλούσια σε CO<sub>2</sub> παρέχουν ένα αγωγίμο υλικό για την ανάπτυξη μικροφυκών, επειδή το CO<sub>2</sub> εξισορροπεί την αναλογία Redfield (μοριακή αναλογία του άνθρακα, του αζώτου και του φωσφόρου στο θαλάσσιο οργανική ύλη, C: N: P = 106:16:1) των λυμάτων, επιτρέποντας ταχύτερα ποσοστά παραγωγής, μειωμένα επίπεδα θρεπτικών συστατικών στα επεξεργασμένα λύματα, μειωμένο κόστος συγκομιδής και αύξηση της παραγωγής των λιπιδίων.

Ωστόσο, εγκαταστάσεις φυκών επεξεργασίας λυμάτων έχουν υψηλές απαιτήσεις σε έκταση γης για ανοικτά συστήματα λίμνης και υψηλό κόστος κεφαλαίου για τα συστήματα φώτοβιοαντιδραστήρων.

Ο *Nannochloropsis* χρησιμοποιείται κυρίως ως μια ενεργειακά πλούσια πηγή τροφής για τις προνύμφες των ψαριών και τροχόζωα. Πρόσφατα, ο *Nannochloropsis* έχει ερευνηθεί για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Επίσης το εστιατόριο "A Poniente" του El Puerto de Santa María (Cádiz, Ισπανία) χρησιμοποιεί τον *Nannochloropsis gaditana* ως ανθρώπινη τροφή.

### 3.7.4 Χρήση στον Βιολογικό καθαρισμό

Η μικροβιακή διάσπαση των αρωματικών ρύπων έχει χαρακτηριστεί επαρκώς σε μια περίοδο άνω των τριάντα ετών. Τα μικρόβια με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι τα βακτήρια και οι μύκητες. Οι φαινολικές ενώσεις είναι από τους πιο συχνά εμφανιζόμενους ρύπους των επιφανειακών υδάτων, όπως είναι τα προϊόντα αποβλήτων των πολλών βιομηχανικών δραστηριοτήτων. Η μείωση των εκπομπών τους σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων είναι συχνά ανεπαρκής, επειδή τα φαινολικά είναι ιδιαίτερα τοξικές για αναερόβια και αερόβια βακτηρίδια. Για το λόγο αυτό η δυνατότητες φαινόλικής αποτοξίνωσης των διαφόρων μικροοργανισμών, κυρίως βακτηριδίων και μυκήτων, έχουν μελετηθεί εκτενώς.

Σε γενικές γραμμές, τα φύκη που χρησιμοποιούνται πιο συχνά στην επεξεργασία των λυμάτων είναι πράσινα μονοκύτταρα ή coenobitic φύκη. Επιπλέον, έχουν προταθεί συστήματα φυκών με νηματοειδή κυανοβακτήρια για τη δευτεροβάθμια και την τριτοβάθμια επεξεργασία των λυμάτων δεδομένου ότι η εντατική ανάπτυξη των αλγών σε ανοιχτές δεξαμενές προκαλεί αύξηση του pH που μπορεί να είναι ανεκτή από κυανοβακτήρια.

Τόσο τα κυανοβακτήρια όσο και τα πράσινα φύκη είναι ευαίσθητα σε φαινολικά των οποίων η τοξικότητα σχετίζεται με τον αριθμό και την πολικότητα των υποκατάστατων στον αρωματικό δακτύλιο.

Όπως έχουμε ήδη δει σε πειράματα που περιγράφηκαν πιο πάνω τα φύκη έχουν μια δυνατότητα για την απομάκρυνση των οργανικών ενώσεων που περιλαμβάνει τη συσσώρευση και την υποβάθμιση.<sup>[42]</sup>

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

#### 4.1 Εισαγωγή - Σκοπός

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε ο ποιοτικός έλεγχος του μεταβολισμού μικροοργανισμών, βακτηρίων και φυκών για την μελέτη βιομετατροπής αρωματικών ενώσεων.

Οι προσπάθειες εστιάστηκαν στο να προσδιοριστούν ποιοτικά και ποσοτικά τα αποτελέσματα της επίδρασης της ρεσορσινόλης σε θαλάσσια βακτήρια και μικροφύκη με σκοπό αφενός την αξιολόγηση της ικανότητας τους να διασπάσουν την ουσία και αφετέρου την πιθανή χρήση τους, σε μέθοδο βιολογικής αποκατάστασης του περιβάλλοντος.

#### 4.2 Βακτήρια

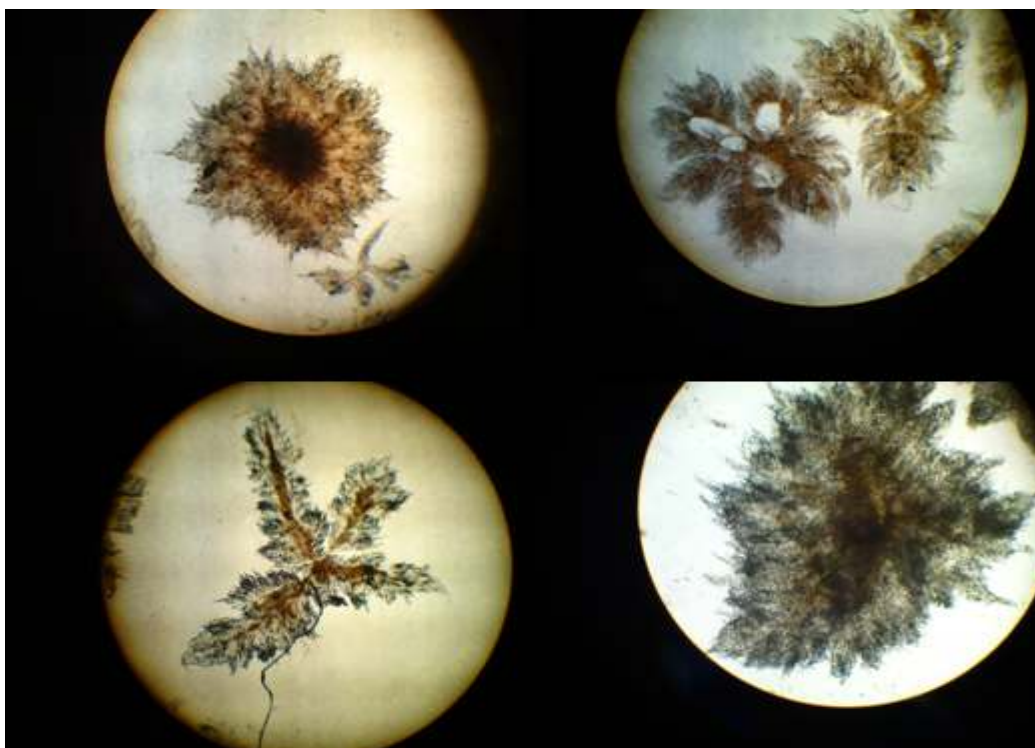
##### 4.2.1 Υλικά Αντιδραστήρια και Μέθοδος

###### - Μικροοργανισμοί

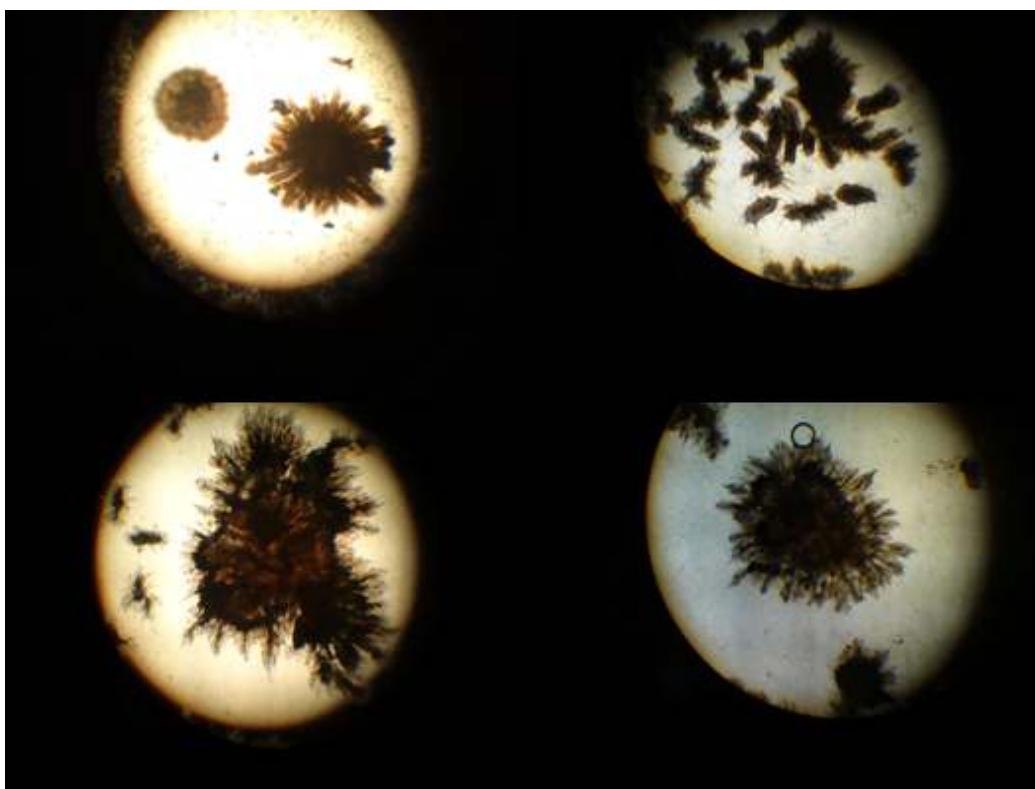
Μη αναγνωρισμένοι θαλάσσιοι ακτινομύκητες, δωρεά από το Τμήμα Φαρμακευτικής, του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Έχουν απομονωθεί από την επιφάνεια του κόκκινου είδος φυκιού *Laurencia*.<sup>[21]</sup>



Οι μικροοργανισμοί δεν είναι αναγνωρισμένοι γιατί οι επιστήμονες δεν έχουν λόγο να τους ονομάσουν εφόσον δεν έχουν κάποια συγκεκριμένη χρήσιμη εφαρμογή. Επιπλέον η όλη διαδικασία είναι χρονοβόρα και κοστίζει.



**Εικόνα 4.1** Στέλεχος 1



**Εικόνα 4.2** Στέλεχος 2

- **Αντιδραστήρια – Συσκευές**

*Αντιδραστήρια*

Media – Marine Broth

MeOH (HPLC gradient grade)

Acetic Acid (HPLC gradient grade)

H<sub>2</sub>O (M.H.Q)

H<sub>2</sub>O απιονισμένο

Άγαρ

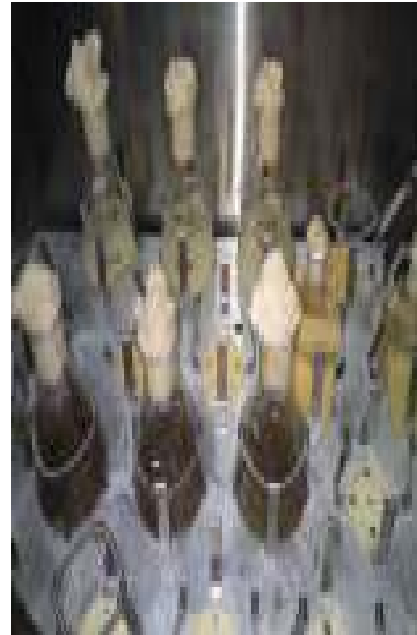
*ΣΥΣΚΕΥΕΣ*

Αυτόκλειστο

Θερμοκοιτίδα σεικερ

Ψυγείο

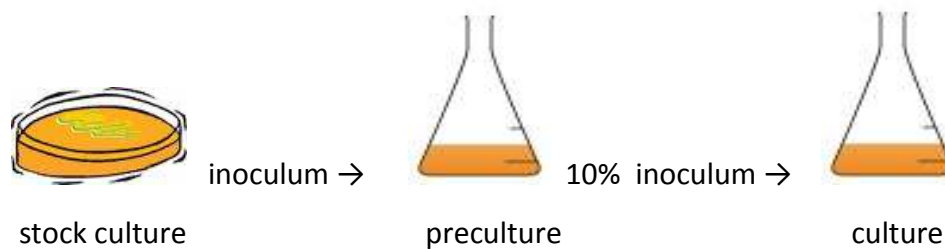
HPLC



**Εικόνα 4.3** Έτοιμες Καλλιέργειες σε θερμοκοιτίδα σεικερ

**4.2.2 Δημιουργία Καλλιέργειας**

Για την καλλιέργεια των βακτηριών χρησιμοποιήθηκαν 40g/L Marine Broth media σε απιονισμένο νερό. Αποστειρώθηκαν σε αυτόκλειστο στους 121 C για 15 λεπτά. Το στέλεχος μας καλλιεργήθηκε για τα πειράματα, σε δύο καλλιέργεια δύο βημάτων. Τα στελέχη εμβολιάστηκαν από την μητρική καλλιέργεια όταν η κυτταρική ανάπτυξη τους ήταν προς το τέλος της εκθετικής αύξησης σε υγρό περιβάλλον. Από την πρό-καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε εμβόλιο για την επόμενη καλλιέργεια, σε τέτοια ποσότητα ώστε η μόλυνση να ήταν το 10% της τελικής συγκέντρωσης της νέας καλλιέργειας (εικόνα 4.3).



**Εικόνα 4.4** Καλλιέργεια δυο σταδίων

Οι υγρές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε 100 mL υγρό περιβάλλον, σε κωνικές φιάλες των 250 mL με πώματα από βαμβάκι (ή 50 ml υγρού μέσα σε φιάλη των 100 ml), και αναδεύονταν με ταχύτητα 130 rpm στους 37 C σε θερμοκοιτίδα σέικερ.



**Εικόνα 4.5** Νέες Καλλιέργειες

#### 4.2.3 Συντήρηση Καλλιέργειας

Η διατήρηση της καλλιέργειας συνεπάγεται την διατήρηση των αποθεμάτων καλλιέργειας. Ο στόχος αυτής της διαδικασίας ήταν να εξισορροπήσει τις ανάγκες διατήρησης υγιών καλλιεργειών. Οι καλλιέργειες διατηρούνταν σε κρυσυντήρηση ή σε πλάκες με υπόστρωμα άγαρ.

Για την αποθήκευση βακτηριακών στελεχών για μακροχρόνια περίοδο. προσθέσαμε 500 μL γλυκερόλης 50% σε 500 μL μιας ολονύκτιας ή καλλιέργειας 2 ημερών του στελέχους σε φιαλίδιο ή erpendorf και καταψύξαμε στους -80 C. Οι πλάκες με υπόστρωμα άγαρ έγιναν σε υγρό περιβάλλον Marine Broth με την προσθήκη 17 g/L άγαρ. Περίπου 20 ml τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο Petri. Η διαδικασία επαναλαμβανόταν για νέες καλλιέργειες κάθε μήνα.





Εικόνα 4.6 Πλάκες με τις stick καλλιέργειες

#### 4.2.4 Παρασκευή μέσου

Για μια συνήθης καλλιέργεια των 200 ml, χρησιμοποιήσαμε φιάλη των 500 με 8 gr marine broth και 200 ml απιονισμένου νερού προζυγισμένα σε ογκομετρική ζυγαριά και κύλινδρο αντίστοιχα.



Εικόνα 4.7 Έτοιμο μέσο

### **4.3 Σχεδιασμός Πειραμάτων με βακτήρια**

#### **4.3.1 Έλεγχος σταθερότητας της Ρεσορσινόλης**

Αυτό το πείραμα είχε ως σκοπό να ελέγξει ένα πρόβλημα με την παρασκευή των δειγμάτων. Σε μερικά δείγματα, η ποσότητα της ρεσορσενόλης εμφανίστηκε σε διαφορετική συγκέντρωση στο HPLC από ότι στα αρχικά δείγματα, ενώ αυτό δεν αναμενόταν.

Για την εύρεση και λύση του προβλήματος :

1. Προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα στα δείγματα του HPLC
2. Χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό υπόστρωμα
3. Ρυθμίστηκε με ρυθμιστικό διάλυμα το pH του υποστρώματος στο 7(θεωρητικά κάτω από το 7 η ρεσορσινόλη ίσως διασπαστεί από μόνη της)

Ελέγχτηκε τη σταθερότητα της ρεσορσενόλης στις συνθήκες μας. Προστέθηκαν 200 ppm ρεσορσενόλης σε υπόστρωμα Marine Broth, σε κλειστές φιάλες με ελαστικό πώμα και περίβλημα από αλουμίνιο για να αποφευχθεί τυχόν μόλυνση.

Πάρθηκαν δείγματα τις ημέρες 0, 7, 8, 9, 10. Η ρεσορσενόλη είναι γνωστό ότι είναι ευαίσθητη στον αέρα και στο φως. Από δημοσιευμένα άρθρα όμως, φαίνεται να είναι σταθερή σε υδατικό διάλυμα για 7 ημέρες εκτεθειμένη στο φως του ήλιου<sup>[22]</sup>. Τα φαινορικά είναι πιο ασταθή σε ελαφρά όξινο από ότι σε αλκαλικό pH<sup>[23]</sup>.

#### **4.3.2 Προσδιορισμός Καμπύλης Ανάπτυξης των Βακτηριών**

Πρόκειται για κλειστή καλλιέργεια όπου θέλαμε να προσδιορίσουμε τις φάσεις ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Λανθάνουσα, εκθετική, στατική και φάση θανάτου. Αναγνωρίσαμε τις φάσεις με τον κλασσικό τρόπο καθώς είχαμε να κάνουμε με μη αναγνωρισμένο μικροοργανισμό.

Κατά τη λανθάνουσα φάση ο πληθυσμός των μικροοργανισμών που προέρχεται από την αρχική καλλιέργεια παραμένει σχεδόν σταθερός. Αυτό οφείλεται στο ότι οι μικροοργανισμοί χρειάζονται κάποιο χρονικό διάστημα για να προσαρμοστούν στις καινούργιες συνθήκες και να αρχίσουν να αναπτύσσονται.

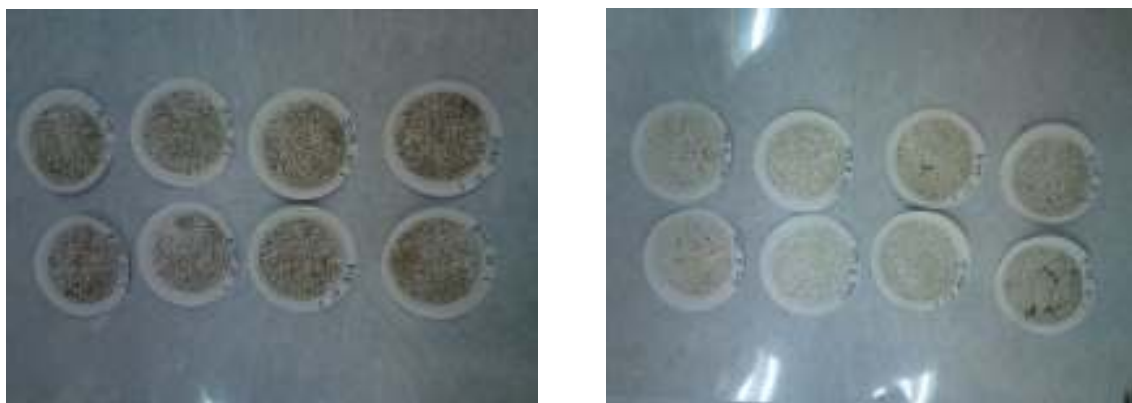
Στη συνέχεια, στην εκθετική φάση οι μικροοργανισμοί διαιρούνται με ταχύ ρυθμό, επειδή η καλλιέργεια πραγματοποιείται κάτω από άριστες συνθήκες θερμοκρασίας, pH, συγκέντρωσης O<sub>2</sub> και στο υλικό καλλιέργειας υπάρχουν άφθονα θρεπτικά συστατικά.

Ακολουθεί η στατική φάση, κατά την οποία ο πληθυσμός των βακτηρίων δεν αυξάνεται, λόγω εξάντλησης κάποιου θρεπτικού συστατικού ή λόγω συσσώρευσης τοξικών προϊόντων από το μεταβολισμό των μικροοργανισμών.

Τέλος κατά τη φάση θανάτου ο αριθμός των μικροοργανισμών μειώνεται<sup>[24]</sup>.

#### - Παραλαβή Βιομάζας

Η παραλαβή της βιομάζας έγινε από τις καλλιέργειες με διήθηση υπό κενό δειγμάτων όγκου 5 ml σε φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45 μm.



**Εικόνα 4.8** Δείγματα βιομάζας στα φίλτρα διήθησης δεξιά για τον MM001 και αριστερά για τον MM002

### 4.3.3 Ποιοτικός έλεγχος Δειγμάτων

Χρησιμοποιήσαμε υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC), για να αναγνωρίσουμε τι ουσίες που περιείχαν τα δείγματα που λήφθηκαν κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης των βακτηρίων. Θελήσαμε να εντοπίσουμε, να ποσοτικοποιήσουμε και να καθαρίσουμε τη συγκέντρωση της ρεσορσινόλης στα δείγματα μας γνωρίζοντας την αρχική της συγκέντρωση.

#### - Προετοιμασία δειγμάτων

Αποψύχουμε τα δείγματα που βρίσκονταν στην κατάψυξη και χρησιμοποιούμε αρκετή ποσότητα για τα ειδικά φιαλίδια που επεξεργάζεται το μηχάνημα. Υπάρχει περίπτωση κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας να απορροφήθηκαν και μικροοργανισμοί που είναι ανεπιθύμητοι στο μηχάνημα λόγω της ειδικής αντλίας που χρησιμοποιεί. Επομένως θα κάνουμε διπλή διήθηση για μεγαλύτερη σιγουριά με φίλτρα των 0,45 mm.

#### - HPLC

Χρησιμοποιούμε isocratic method με diode array detector σε κύμα wavelength 280. Επίσης η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η column C18. Το HPLC ρυθμίστηκε ώστε να χρησιμοποιεί solvent με ροή(flow) 0,8 ml/min. Επίσης η χρόνος παραμονής της συσκευής στο κάθε δείγμα ήταν 10 min. Επομένως για το κάθε δείγμα χρειάστηκαν 8 ml solvent.

*[Παρασκευή solvent: MeOH 50%+Acetic Acid 1%+H2O 49%*

*Τα παραπάνω αναμειχτήκαν στο κατάλληλο δοχείο, σκεπάστηκαν με αλουμινόχαρτο στο οποίο είχαν ανοιχτεί τρύπες για διέλευση του αέρα. Το δοχείο τοποθετήθηκε στο sonicator για 20 λεπτά για να επέλθει το degas.]*

#### **4.4 Φύκη**

Νέοι κύκλοι πειραμάτων όπου αυτή την φορά χρησιμοποιήθηκαν φύκη (algae).

##### **4.4.1 Υλικά Αντιδραστήρια και Μέθοδος**

###### **- Μικροοργανισμοί**

Ο *Nannochloropsis* 12 είναι ένα μικροφύκος διαφορετικό από τα άλλα στο γεγονός ότι στερείται χλωροφύλλης β και γ. Ο *Nannochloropsis* είναι σε θέση να δημιουργήσει σε υψηλή συγκέντρωση μια σειρά από χρωστικές ουσίες, όπως η ασταξανθίνη, ζεαξανθίνη και κανθαξανθίνης. Θεωρείται μια πολλά υποσχόμενη άλγη για βιομηχανικές εφαρμογές λόγω της ικανότητάς της να συσσωρεύει σε υψηλά επίπεδα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.



**Εικόνα 4.9** Καλλιέργειες *Nannochloropsis* όπως αυτές φυλάσσονταν στο ψυγείο

###### **- Αντιδραστήρια – Συσκευές**

*Αντιδραστήρια*

Θαλασσινό νερό

MeOH (HPLC gradient grade)

Acetic Acid (HPLC gradient grade)

H<sub>2</sub>O (M.H.Q)

H<sub>2</sub>O απιονισμένο

NaHCO<sub>3</sub>

F2-Si

Συσκευές

Αυτόκλειστο

Ψυγείο

HPLC

#### 4.4.2 Δημιουργία Καλλιέργειας

Για την καλλιέργεια φυκών χρησιμοποιήθηκαν 2 με 3 ml από ήδη υπάρχουσα καλλιέργεια σε 200 ml μέσου.

Το μέσο δημιουργήθηκε ως εξής :

Σε 1 lt απιονισμένου θαλασσινού νερού προστέθηκαν 20 ml F2-Si(πίνακας 4.1) και μισό gr  $\text{NaHCO}_3$ . Το θαλασσινό νερό πέρα από την αποστείρωση υπέστη και διπλή διήθηση. Η πρώτη με διηθητικό χαρτί για την απομάκρυνση των μεγάλων ακαθαρσιών και η δεύτερη υπό αντλία κενού για τα πιο μικρά ανεπιθύμητα συστατικά. Το θαλασσινό νερό του εργαστηρίου διατηρείται στο Cold Room.

Η νέα καλλιέργεια αφέθηκε να αναπτυχθεί 5 ημέρες πριν την διεξαγωγή πειράματος.

**Πίνακας 4.1** Περιεχόμενα του μέσου F2-Si

| Ουσία   | g/L (F2) | g/L (50x F2) |
|---|----------|--------------|
| $\text{NaNO}_3$                                       | 0.075    | 3,75         |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$    | 0.005    | 0,25         |
| $(\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ | 0.00565  | 0.2826       |
| $\text{Na}_2\text{SiO}_3$                             | 0,01289  | 0,6445       |
| $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$             | 3,15E-03 | 0,1575       |
| $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$    | 4,36E-03 | 0,218        |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$             | 9,80E-06 | 4,90E-04     |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   | 6,30E-06 | 3,15E-04     |

|                                       |          |          |
|---------------------------------------|----------|----------|
| ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O | 2,20E-05 | 1,10E-03 |
| CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O | 1,00E-05 | 5,00E-04 |
| MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O | 1,80E-04 | 9,00E-03 |
| Vitamin B <sub>12</sub>               | 5,00E-07 | 2,50E-05 |
| Biotin                                | 5,00E-07 | 2,50E-05 |
| Thiamine · HCl                        | 1,00E-04 | 5,00E-03 |

Θέλαμε να μελετήσουμε την επίδραση της ρεσορσινόλης σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Επομένως σε κλειστές φιάλες με ελαστικό πώμα και περίβλημα από αλουμίνιο για να αποφευχθεί τυχόν μόλυνση, παρασκευάστηκαν καλλιέργειες των 80 ml. Το 10% της καλλιέργειας ήταν από πλήρως επωασμένη καλλιέργεια. Έτσι σε κάθε φιάλη τοποθετήθηκαν 72 ml μέσου και 8 ml έτοιμα φύκη. Οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν για μελέτη ήταν αυτές των 25, 50 και 100 ppm ρεσορσινόλης.

Επίσης, γνωρίζοντας ότι το φως επιδρά στην ανάπτυξη των φυκών, εκτελέστηκαν δύο ίδια πειράματα όπου στο ένα οι καλλιέργειες φυλάσσονταν σε συνθήκες σκοταδιού και οι άλλες σε φως.

Χρησιμοποιήθηκαν διπλές καλλιέργειες για κάθε συγκέντρωση, τυφλά χωρίς ρεσορσινόλη καθώς και τυφλά με ρεσορσινόλη αλλά χωρίς φύκη. Συνολικά δημιουργήθηκαν 25 καλλιέργειες.



**Εικόνα 4.10** Καλλιέργειες που διατηρούνταν στο φως

#### 4.4.3 Συντήρηση Καλλιέργειας

Η διατήρηση της καλλιέργειας συνεπάγεται την διατήρηση των αποθεμάτων καλλιέργειας. Ο στόχος αυτής της διαδικασίας ήταν να εξισορροπήσει τις ανάγκες διατήρησης υγιών καλλιεργειών. Οι καλλιέργειες διατηρούνταν σε ψυγείο στους 20 C με τεχνητό φως. Για την αποθήκευση νέες καλλιέργειες γίνονταν κάθε 2 εβδομάδες.



Εικόνα 4.11 Παλιές και νέες καλλιέργειες Nannocloropsis

#### 4.5 Σχεδιασμός Πειραμάτων με φύκη

##### 4.5.1 Προσδιορισμός Καμπύλης Ανάπτυξης των Φυκών

Και εδώ έπρεπε να προσδιοριστούν οι φάσεις ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

Η κυτταρική πυκνότητα προσδιορίστηκε με βάση την απορρόφηση κυτταρικού διαλύματος, με μέτρηση στα 750 nm ( $OD_{750}$ ) σε κυψελίδα 1 cm στο φασματοφωτόμετρο S-22 UV/VIS Spectrophotometer της BOECO Germany. Για τον συντελεστή μετατροπής απορρόφησης  $A_{750}$  σε συγκέντρωση g/L θεωρήσαμε τον συντελεστή που βρέθηκε στα πλαίσια διπλωματικής από προηγούμενο φοιτητή που εργάστηκε με τα ίδια υλικά στα ίδια εργαστήρια την προηγούμενη χρονιά.



Τα αποτελέσματα της πειραματικής του διαδικασίας έδειξαν ότι ο συντελεστής μετατροπής της απορρόφησης σε συγκέντρωση ήταν:

$$C(\text{g/L}) = 0,27 * A_{750}$$

Η καμπύλες ανάπτυξης του μικροοργανισμού επίσης δίνονταν και διαφορετικές εντάσεις φωτός. Διαλέξαμε αυτή που αντιστοιχούσε στην ένταση του πειράματος μας που ήταν

Επειδή στο πείραμα που διεξαγάγαμε θέλαμε να μελετήσουμε και την υποβάθμιση της ουσίας μας σε συνθήκες σκοταδιού, χρειαστήκαμε και μια καμπύλη ανάπτυξης σε αυτές τις συνθήκες. Αυτή πρόκυψε με τον παραπάνω συντελεστή και μετρήσεις απορρόφησης καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος.

#### 4.5.2 Ποιοτικός έλεγχος Δειγμάτων

Χρησιμοποιήθηκε υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC), για να μπορέσουμε να αναγνωρίσουμε τι ουσίες που περιέχονταν στα δείγματα που λήφθηκαν κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης των φυκών. Σκοπός ήταν να εντοπίσουμε, να ποσοτικοποιήσουμε και να καθαρίσουμε τη συγκέντρωση της ρεσορσινόλης στα δείγματα μας γνωρίζοντας την αρχική της συγκέντρωση.



Εικόνα 4.12 Δειγματοληψία για ποιοτικό έλεγχο

- **Προετοιμασία δειγμάτων**

Αποψύχουμε τα δείγματα που βρίσκονταν στην κατάψυξη και χρησιμοποιούμε αρκετή ποσότητα για τα ειδικά φιαλίδια που επεξεργάζεται το μηχάνημα. Υπάρχει περίπτωση κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας να απορροφήθηκαν και μικροοργανισμοί που είναι ανεπιθύμητοι στο μηχάνημα λόγω της ειδικής αντλίας που χρησιμοποιεί. Επομένως θα κάνουμε διπλή διήθηση για μεγαλύτερη σιγουριά με φίλτρα των 0,45 mm.

- **HPLC**

Χρησιμοποιούμε isocratic method με diode array detector σε κύμα wavelength 280. Επίσης η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η column C18. Το HPLC χρησιμοποιεί solvent με ροή(flow) 0,8 ml/min. Επίσης η χρόνος παραμονής της συσκευής στο κάθε δείγμα είναι 10 min. Άρα για το κάθε δείγμα θα χρειαστούμε 8 ml solvent.

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ****ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ****5.1 Σταθερότητας της Ρεσορσινόλης**

Έγινε έλεγχος στα pH. Σε 30 ml απιονισμένου νερού προστέθηκε 1,2 g Marine Broth. Το pH του διαλύματος έγινε 5,62. Προστέθηκε 0,2364 g triHCl που είναι το buffer μας και το pH έγινε 5,57. Τα pH τους τώρα είναι 5,45 και 5,98 αντίστοιχα. Η επανάληψη έδειξε το pH με buffer έγινε τώρα 5,7 (προσθέτοντας και άλλο έφτασε μέχρι το 5,98. Τέλος με την προσθήκη ρεσορσινόλης έγινε 6,4. Παρατηρήσαμε ότι η προσθήκη ρεσορσινόλης αυξάνει το pH, αλλά λίγο.

Παρασκευάστηκαν νέα δείγματα:

- (α) Μόνο με ρεσορσινόλη
- (β) Με Marine Broth και ρεσορσινόλη που προστέθηκε πριν την αποστείρωση και
- (γ) Με Marine Broth και ρεσορσινόλη που προστέθηκε μετά την αποστείρωση.

Για αυτά στα οποία η ρεσορσινόλη προστέθηκε μετά, δυο κλείστηκαν αεροστεγώς και δύο μη αεροστεγώς με βαμβάκι. Τέλος υπήρξαν και δείγματα με ρυθμιστικό διάλυμα buffer trisHCl το οποίο προστέθηκε μετά την αποστείρωση για ρύθμιση του pH (τα δύο δείγματα απέκτησαν pH 7,02 και 7).

**Πίνακας 5.1** Έλεγχος σταθερότητας μέσω έλεγχο του pH

|                 | res-before |      | res closed |      | res open |      | buffer |      |
|-----------------|------------|------|------------|------|----------|------|--------|------|
| <b>Ημέρα 0</b>  | 5,96       | 6,01 | -          | -    | -        | -    | -      | -    |
| <b>Ημέρα 1</b>  | 6,19       | 6,28 | 6,32       | 6,53 | 7,43     | 7,4  | 6,91   | 6,97 |
| <b>Ημέρα 10</b> | 6,46       | 6,43 | 6,32       | 6,53 | 7,36     | 7,36 | 6,88   | 6,82 |

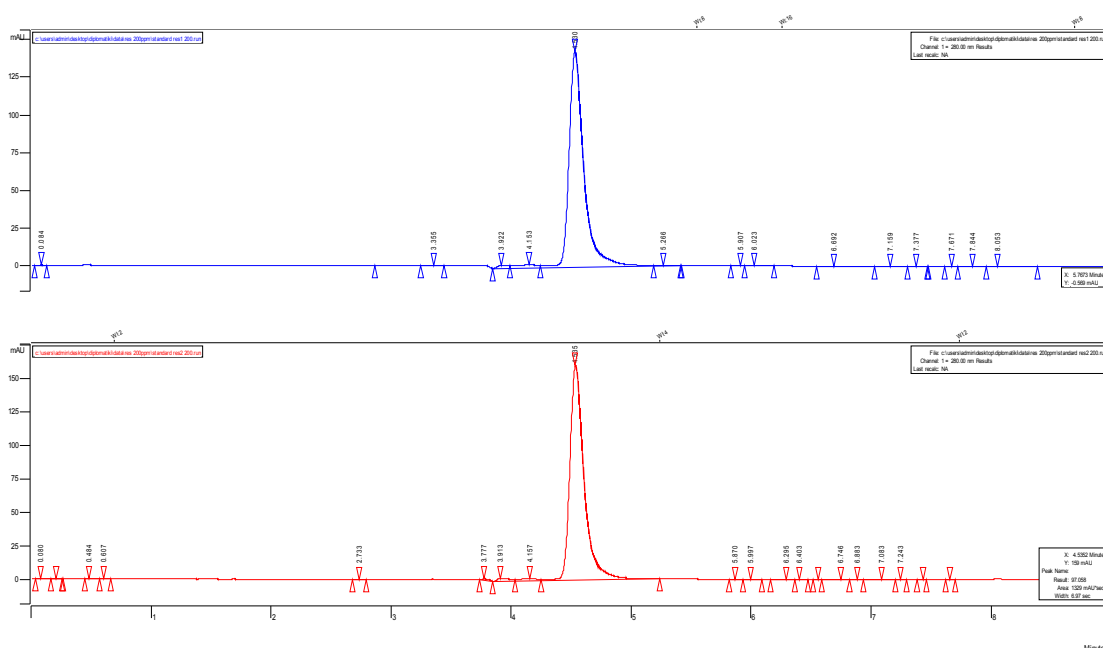
Φαίνεται ότι το pH δεν αλλάζει σημαντικά εάν δεν γίνει κάτι δραστικό στο διάλυμα, όπως εάν η ρεσορσινόλη μπει στην αποστείρωση μαζί με το διάλυμα. Σε αυτή την

περίπτωση η ρεσορσινόλη διασπάται λόγω της υψηλής θερμοκρασίας και για αυτό μια τέτοια μέθοδος δεν θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί γιατί είναι άσκοπη.

Ακολουθούν χρωματογραφήματα HPLC οπότε είναι αναγκαία και μια σύντομη επεξήγηση τους.

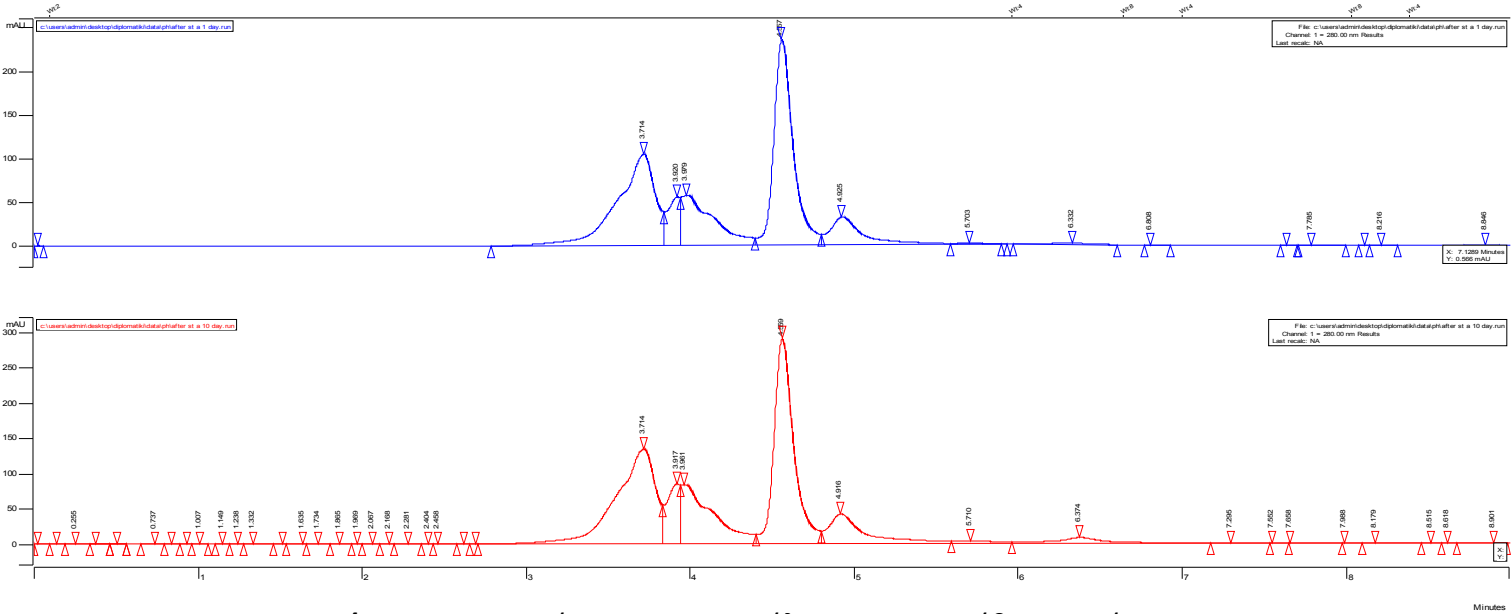
Ένα χρωματογράφημα είναι η οπτική απόδοση του χρωματογράφου. Στην περίπτωση του βέλτιστου διαχωρισμού, οι διαφορετικές κορυφές ή μοτίβα στο χρωματογράφημα αντιστοιχούν στα διαφορετικά συστατικά του διαχωρισμένου μίγματος.

Σχεδιασμένοι στον x-άξονα είναι ο χρόνος διατήρησης και στον y-άξονα ένα σήμα (για παράδειγμα, που λαμβάνεται με ένα φασματοφωτόμετρο, φασματόμετρο μάζας ή μια ποικιλία άλλων ανιχνευτών) που αντιστοιχεί στην απάντηση που δημιουργείται από την αναλυτών στην έξοδο του συστήματος. Στην περίπτωση ενός επιτυχημένου συστήματος το σήμα είναι ανάλογο προς τη συγκέντρωση της διαχωρισμένης αναλυτέας ουσίας.

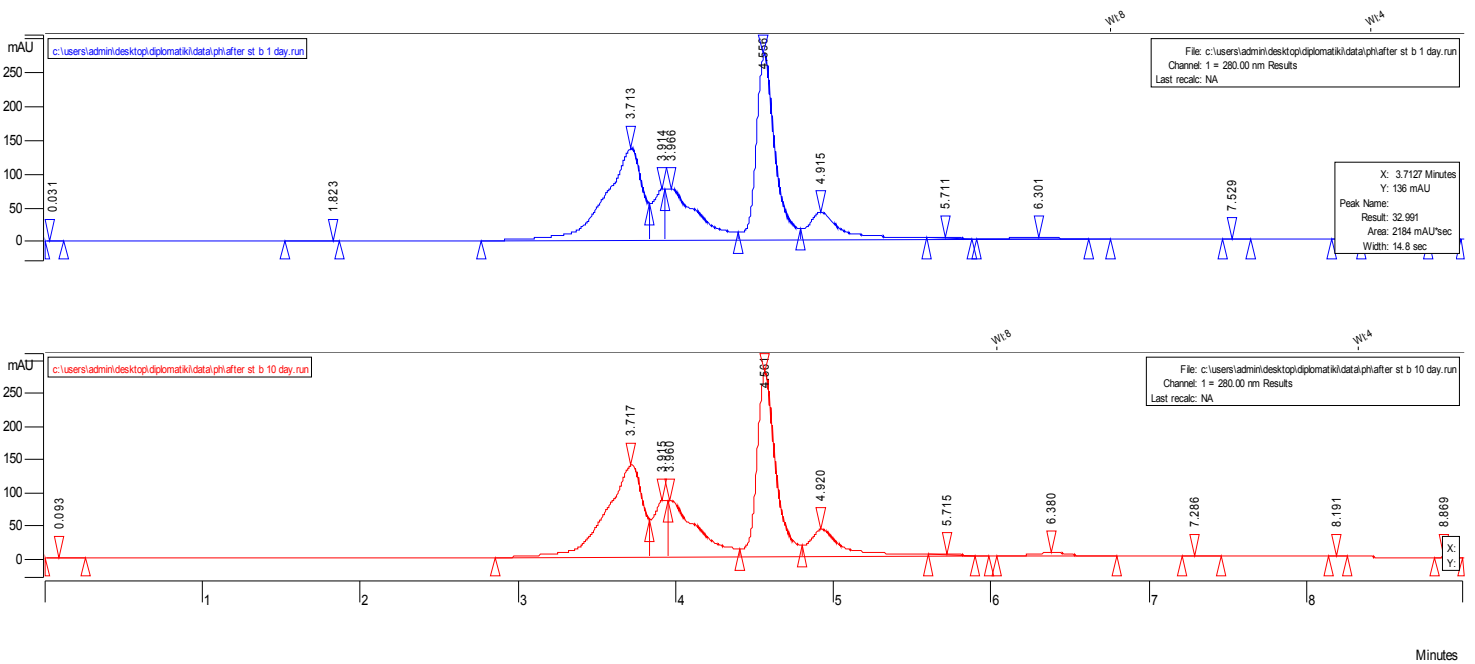


**Διάγραμμα 5.1** Τα δύο standard που περιέχουν μόνο ρεσορσινόλη

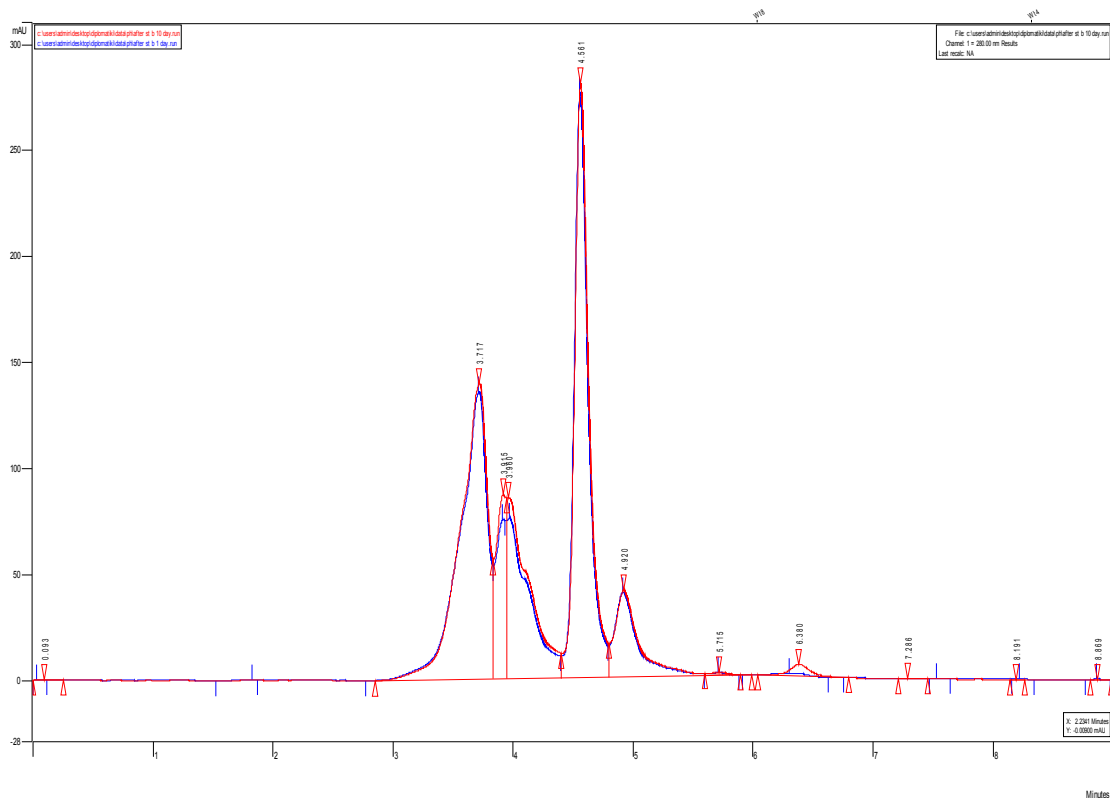
Αυτή η κορυφή βρίσκεται στα 4,53 λεπτά και την θεωρούμε από εδώ και πέρα την κορυφή της ρεσορσινόλης. Στα διαγράμματα που ακολουθούν μπορεί αυτή η κορυφή να βρίσκεται ελαφρώς μετατοπισμένης.



**Διάγραμμα 5.2** Δείγμα α ρεσορσινόλης που προστέθηκε μετά την αποστείρωση(closed). Σύγκριση πρώτης με δέκατη ημέρα.



**Διάγραμμα 5.3** Δείγμα β ρεσορσινόλης που προστέθηκε μετά την αποστείρωση(closed). Σύγκριση πρώτης με δέκατη ημέρα.

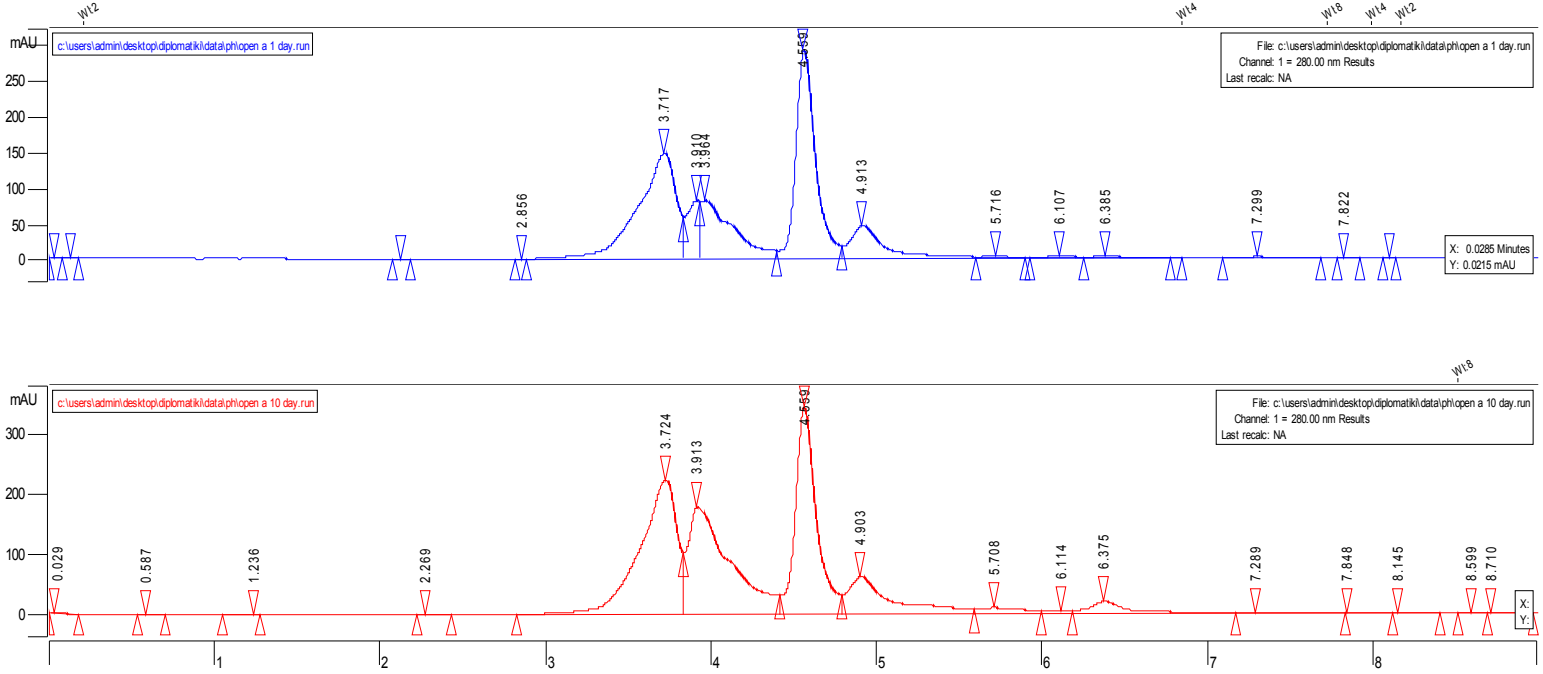


**Διάγραμμα 5.4** Κοινό διάγραμμα δείγματος α ρεσορσινόλης που προστέθηκε μετά την αποστείρωση(closed). Σύγκριση πρώτης με δέκατης ημέρας.

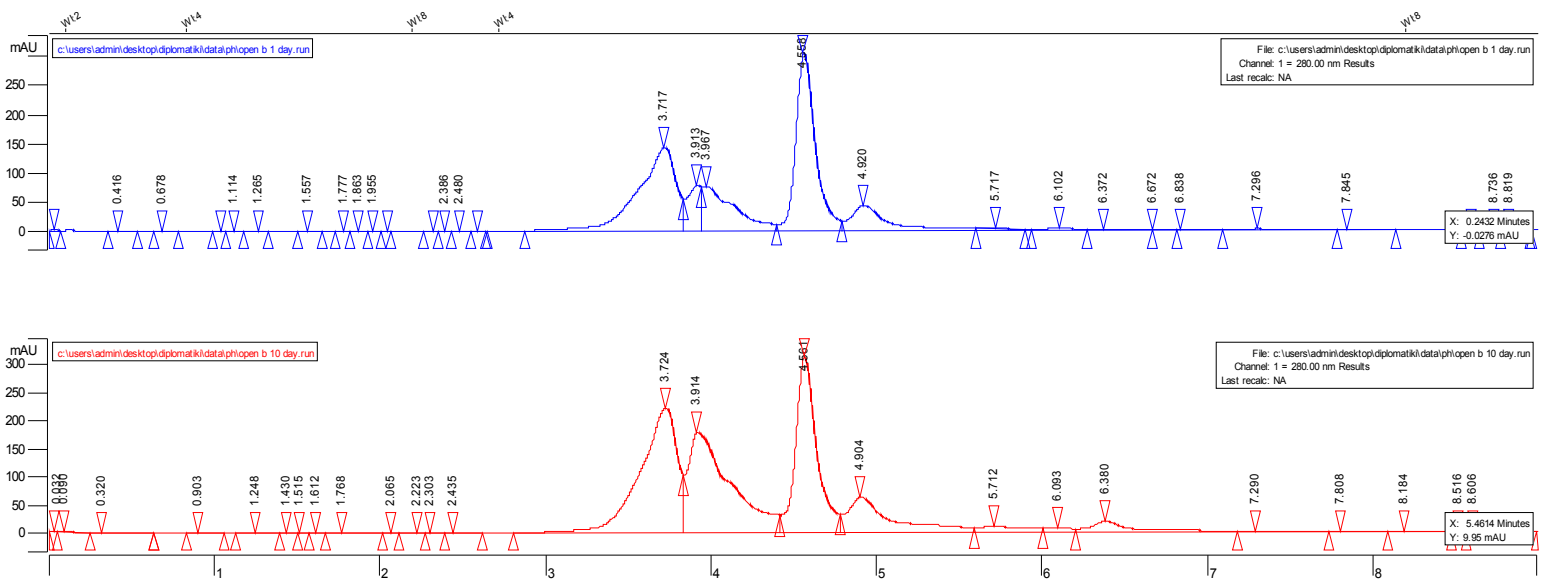
Το κοινό διάγραμμα των δύο ημερών μας δείχνει ότι η μπλε καμπύλη (1<sup>η</sup> μέρα) συμπίπτει με την κόκκινη (10<sup>η</sup> μέρα) σχεδόν απόλυτα. Οποιοσδήποτε ελάχιστες διαφοροποιήσεις οφείλονται σε σφάλματα κατά την δειγματοληψία ή την παρασκευή των δειγμάτων για το HPLC.

**Συμπέρασμα:** Η ρεσορσινόλη, όπως και το μέσο Marine Broth δεν επηρεάστηκαν με το πέρασμα του χρόνου στα δείγματα όπου η ρεσορσινόλη προστέθηκε μετά την αποστείρωση και σφραγίστηκαν. Οι κορυφές είναι οι ίδιες και δεν εμφανίζεται καμία καινούργια. Αυτό μας δείχνει ότι η ρεσορσινόλη είναι σταθερή σε συνθήκες συνθήκες χωρίς φωτισμό και αερισμό και από μόνη της δεν θα διασπαστεί. Οποιαδήποτε αλλαγή παρατηρείται στην ουσία αυτή, στα επόμενα πειράματα υπό αυτές τις συνθήκες, οφείλεται καθαρά σε κάποιον άλλο παράγοντα όπως ο μεταβολισμός των μικροοργανισμών.

Στη συνέχεια εξετάζεται η περίπτωση όπου η ρεσορσινόλη προστίθεται μεν μετά την αποστείρωση, αλλά φυλάσσεται σε ανοιχτά δοχεία(δηλαδή με βαμβάκι για να υπάρχει αερισμός).

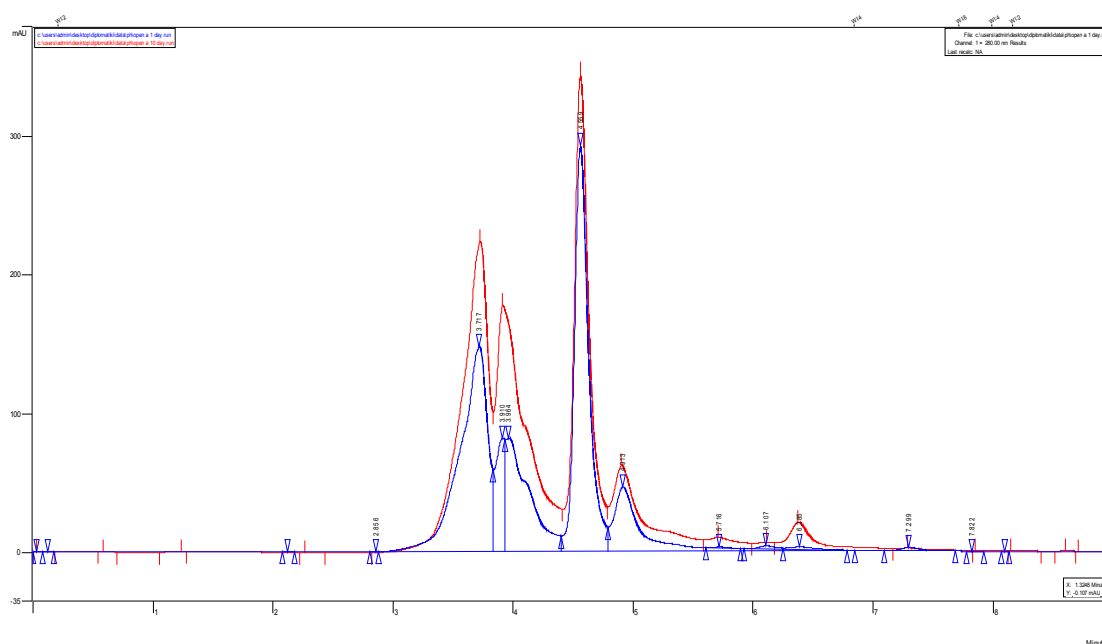


**Διάγραμμα 5.5** Δείγμα α ρεσορσινόλης που προστέθηκε μετά την αποστείρωση(ορεν). Σύγκριση πρώτης με δέκατη ημέρα.



**Διάγραμμα 5.6** Δείγμα β ρεσορσινόλης που προστέθηκε μετά την αποστείρωση(ορεν). Σύγκριση πρώτης με δέκατη ημέρα.

Και σε αυτή την περίπτωση φαίνεται πως οι κορυφές παραμένουν οι ίδιες χωρίς να εμφανίζεται καμία καινούργια.



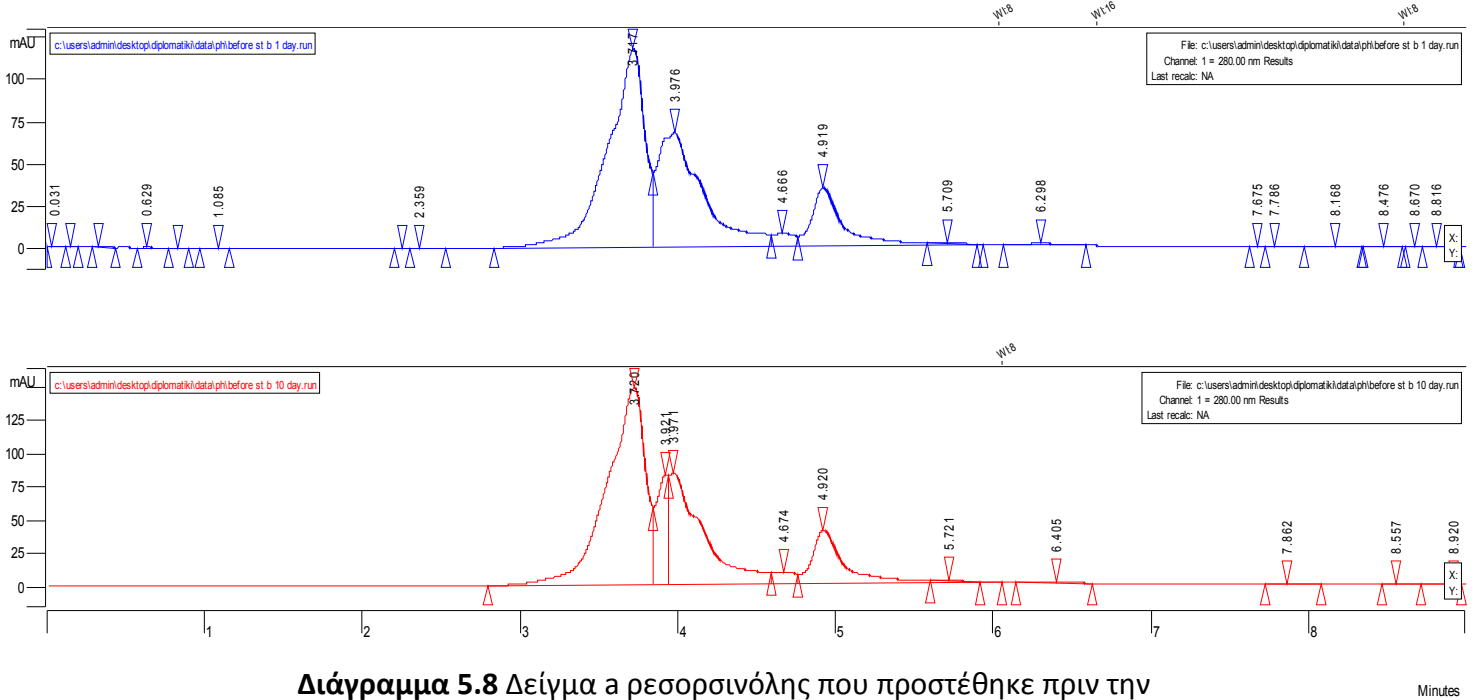
**Διάγραμμα 5.7** Κοινό διάγραμμα δείγματος α ρεσορσινόλης που προστέθηκε μετά την αποστείρωση(open). Σύγκριση πρώτης με δέκατης ημέρας.

Το κοινό διάγραμμα των δύο ημερών μας δείχνει ότι η μπλε καμπύλη (1<sup>η</sup> μέρα) δεν συμπίπτει με την κόκκινη (10<sup>η</sup> μέρα). Υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στη συγκέντρωση των ενώσεων και μάλιστα παρατηρείται αύξηση τους. Χρησιμοποιώντας τα εργαλεία του προγράμματος που ανοίγει τα διαγράμματα του HPLC μπορούμε να ποσοτικοποιήσουμε αυτή τη διαφορά. Υπάρχει αύξηση 12% για όλες τις κορυφές.

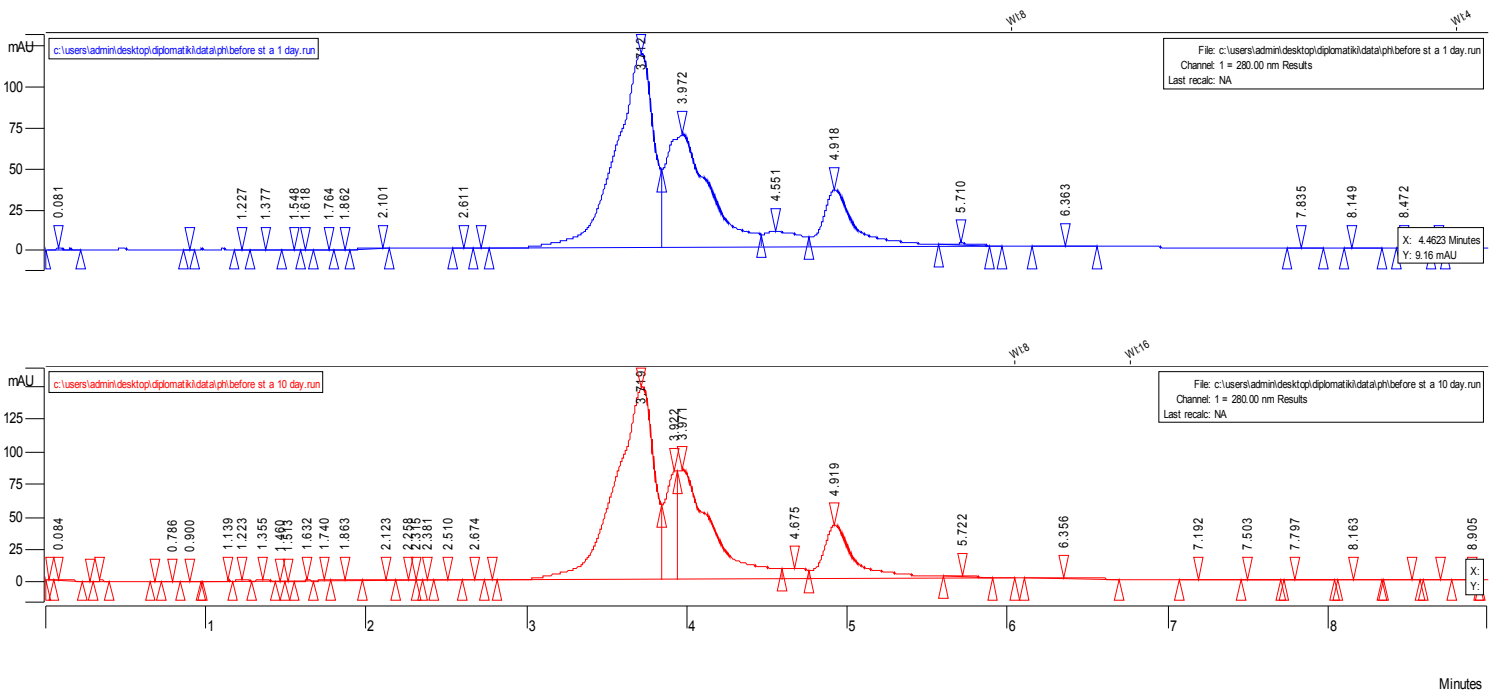
**Συμπέρασμα:** Η ρεσορσινόλη και το μέσο Marine Broth δεν επηρεάστηκαν με το πέρασμα του χρόνου στα δείγματα όπου η ρεσορσινόλη προστέθηκε μετά την αποστείρωση. Οι κορυφές είναι οι ίδιες και δεν εμφανίζεται καμία καινούργια. Όμως οι συγκεντρώσεις όλων των ουσιών αυξήθηκαν. Η μόνη διαφορά με τα προηγούμενα δείγματα είναι ο αερισμός. Συνήθως σε συνθήκες αερισμού παρατηρείται εξάτμιση του νερού που περιέχουν τα δείγματα. Επομένως μια λογική εξήγηση θα ήταν πως η εξάτμιση του νερού οδήγησε σε διάλυμα με τις ίδιες ουσίες



αλλά λιγότερο νερό, δηλαδή σε αύξηση των συγκεντρώσεων λόγω συμπύκνωσης.  
 Στη συνέχεια εξετάζεται η περίπτωση όπου η ρεσορσινόλη προστίθεται πριν την αποστείρωση, και φυλάσσεται σε κλειστά δοχεία.



**Διάγραμμα 5.8** Δείγμα a ρεσορσινόλης που προστέθηκε πριν την αποστείρωση(ορεν). Σύγκριση πρώτης με δέκατη ημέρα.



**Διάγραμμα 5.9** Δείγμα b ρεσορσινόλης που προστέθηκε πριν την αποστείρωση(ορεν). Σύγκριση πρώτης με δέκατη ημέρα.

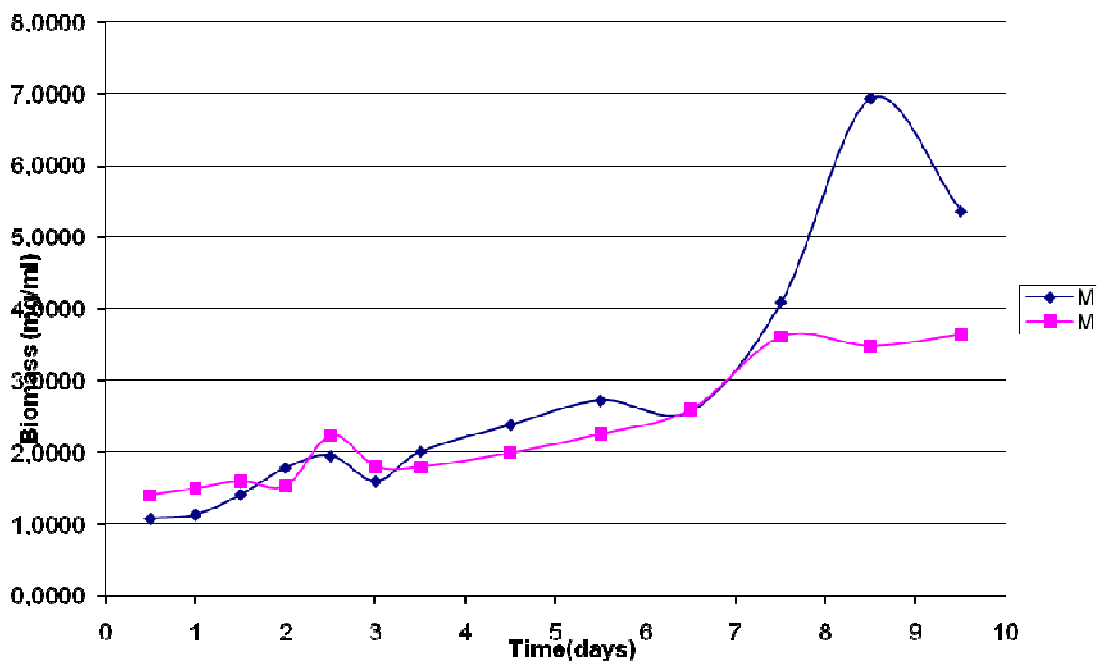
**Συμπέρασμα:** Η κορυφή της ρεσορσινόλης είναι σχεδόν εξαφανισμένη από την πρώτη κιάλας μέρα, κάτι που υποδεικνύει ότι η ρεσορσινόλη δεν διατηρείται στην αποστείρωση. Επομένως στο μέλλον δεν θα πρέπει να επιλέγεται μια τέτοια διαδικασία.

Από τα διαγράμματα αυτά σε συνδυασμό με τους πίνακες του pH, όπου ούτε εκεί φαίνεται αλλαγή, φαίνεται ότι ρεσορσινόλη παραμένει σταθερή, γεγονός που συμφωνεί με τις βιβλιογραφικές αναφορές. Η συγκέντρωση της όμως μπορεί να αλλάξει σε συνθήκες αερισμού.

## 5.2 Βακτήρια

### 5.2.1 Καμπύλη Ανάπτυξης των Βακτηριών

Για να βρούμε την καμπύλη ανάπτυξης των μικροοργανισμών καλλιεργήσαμε το στέλεχος MM001 και MM002 σε 250 ml Erlenmeyer flasks με 100 ml μέσο. Παίρναμε δείγματα κάθε 12 ώρες μετά από 3 και μισή μέρες. Τα στελέχη είχαν πολύ αργή ανάπτυξη κάτι που αναμενόταν. Το πρώτο στέλεχος παρήγαγε μεγαλύτερα ποσοστά βιομάζας και έφτασε τη φάση στασιμότητας στην 8<sup>η</sup> με 9<sup>η</sup> μέρα. Το δεύτερο στέλεχος έφτασε στη φάση στασιμότητας στην 7<sup>η</sup> μέρα.



**Διάγραμμα 5.9** Καμπύλες ανάπτυξης των μικροοργανισμών MM001 και MM002

Από το παραπάνω διάγραμμα χωρίσαμε τις φάσεις ανάπτυξης των βακτηρίων. Έτσι στη συνέχεια εφαρμόζοντας την καλλιέργεια δύο βημάτων που αναφέραμε, κάναμε τον εμβολιασμό κατά την 7<sup>η</sup> μέρα για να έχουμε όσο το δυνατόν καλύτερα και πιο ακριβή αποτελέσματα.

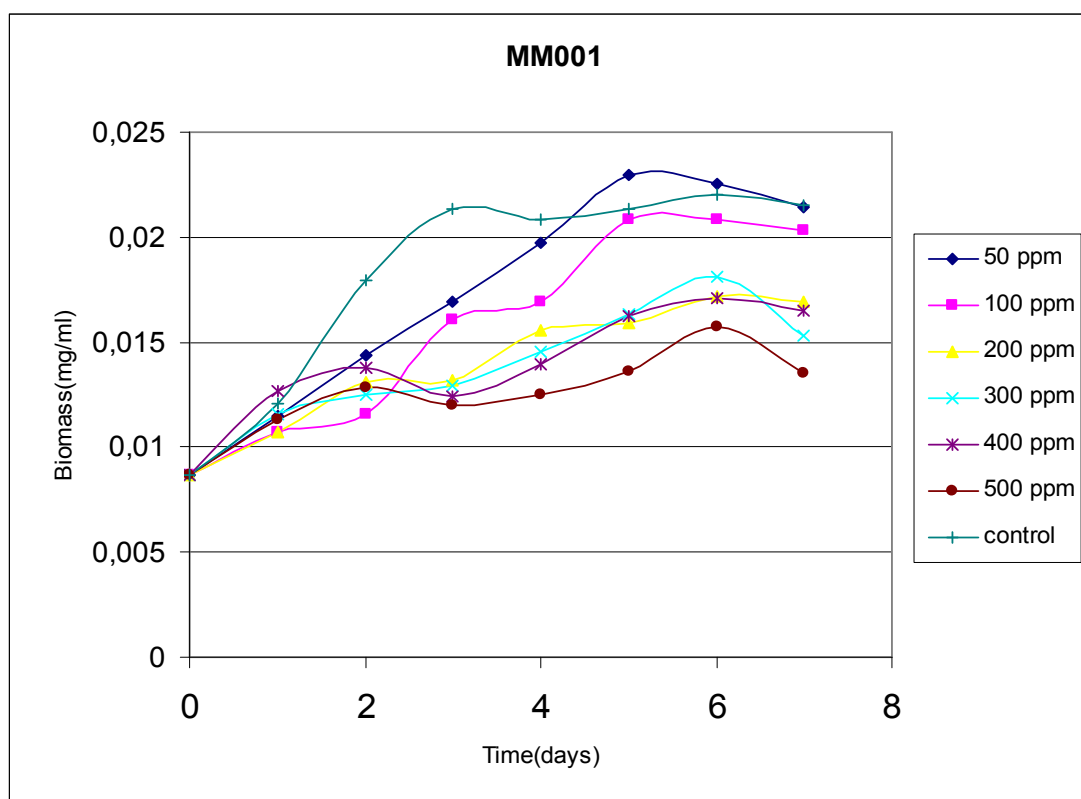
Μελετήσαμε επίσης την ανάπτυξη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ρεσορσενόλης.

Συγκεντρώσεις : 50, 100, 200, 300, 400, 500 ppm (mg/L)

Για τον MM001 τα δεδομένα μας είναι:

**Πίνακας 5.2** Βιομάζα του MM001 σε 7 ημέρες

| day | 50 ppm  | 100 ppm | 200 ppm | 300ppm  | 400 ppm | 500 ppm | control |
|-----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 0   | 0,0087  | 0,0087  | 0,0087  | 0,0087  | 0,0087  | 0,0087  | 0,0087  |
| 1   | 0,01145 | 0,0107  | 0,01075 | 0,01155 | 0,0127  | 0,0113  | 0,0121  |
| 2   | 0,01435 | 0,0116  | 0,0131  | 0,0125  | 0,01375 | 0,01285 | 0,0179  |
| 3   | 0,01695 | 0,01605 | 0,01315 | 0,01295 | 0,01245 | 0,01195 | 0,02135 |
| 4   | 0,0197  | 0,01695 | 0,0156  | 0,01455 | 0,01395 | 0,0125  | 0,02085 |
| 5   | 0,02295 | 0,02085 | 0,0159  | 0,0163  | 0,01625 | 0,0136  | 0,02135 |
| 6   | 0,02255 | 0,02085 | 0,0172  | 0,01815 | 0,01705 | 0,0157  | 0,022   |
| 7   | 0,02145 | 0,0203  | 0,0169  | 0,0153  | 0,0165  | 0,01355 | 0,0215  |

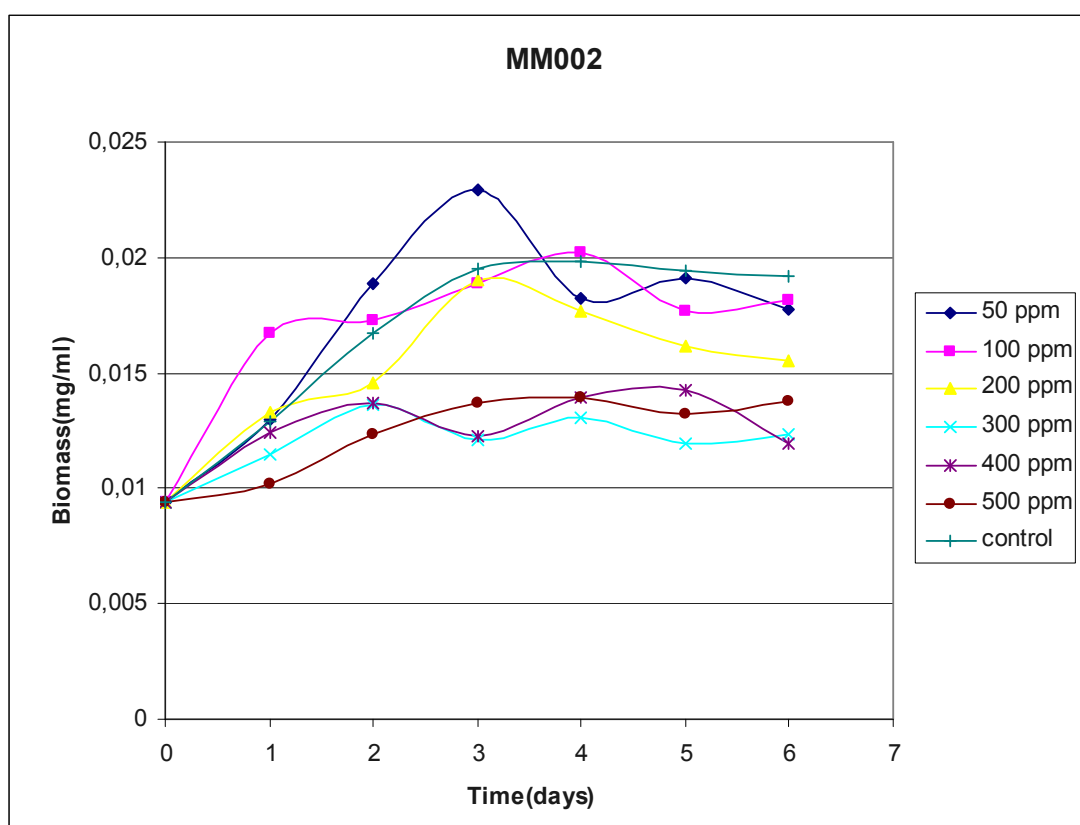


**Διάγραμμα 5.8** Καμπύλη ανάπτυξης του MM001 σε καλλιέργεια 7 ημερών σε συγκεντρώσεις ρεσορσενόλης από 50 έως 500 ppm.

Για τον MM002 τα δεδομένα μας είναι:

**Πίνακας 5.3** Βιομάζα του MM002 σε 6 ημέρες

| day | 50 ppm   | 100 ppm | 200 ppm | 300ppm  | 400 ppm | 500 ppm | control |
|-----|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 0   | 0,0094   | 0,0094  | 0,0094  | 0,0094  | 0,0094  | 0,0094  | 0,0094  |
| 1   | 0,01295  | 0,0167  | 0,0133  | 0,0115  | 0,0124  | 0,0102  | 0,0129  |
| 2   | 0,01885  | 0,0173  | 0,01455 | 0,01365 | 0,0137  | 0,01235 | 0,01675 |
| 3   | 0,0229   | 0,01885 | 0,01905 | 0,0121  | 0,0123  | 0,0137  | 0,0195  |
| 4   | 0,018245 | 0,02025 | 0,01765 | 0,01305 | 0,01395 | 0,0139  | 0,01985 |
| 5   | 0,0191   | 0,01765 | 0,0162  | 0,01195 | 0,01425 | 0,01325 | 0,01945 |
| 6   | 0,01775  | 0,01815 | 0,01555 | 0,01235 | 0,01195 | 0,0138  | 0,0192  |



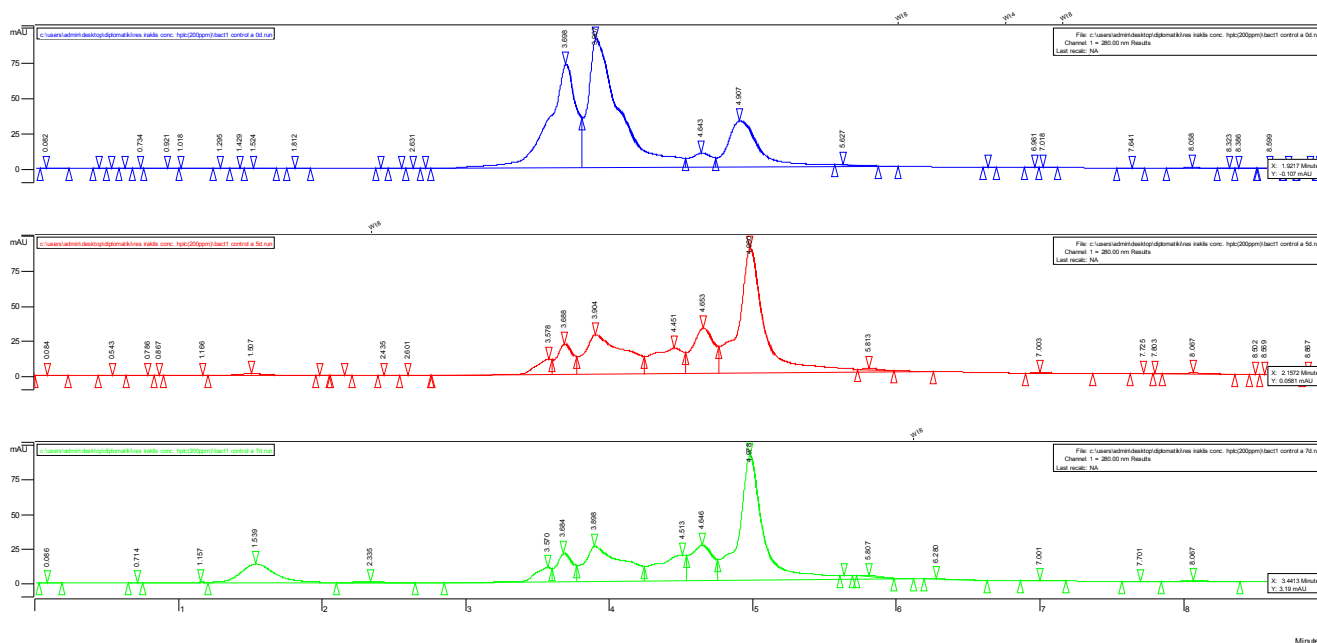
**Διάγραμμα 5.9** Καμπύλη ανάπτυξης του MM002 σε καλλιέργεια 6 ημερών σε συγκεντρώσεις ρεσορσενόλης από 50 έως 500 ppm.

Στο πρώτο πείραμα με διαφορετικές συγκεντρώσεις ρεσορσινόλης δεν παρατηρήθηκε βακτηριακή υποβάθμιση ή βιομετατροπή της ουσίας. Αυτό φάνηκε και από τα διαγράμματα HPLC που ακολουθούν. Τα πρότυπα παρασκευάστηκαν νωρίτερα και η καμπύλη αναφοράς ήταν κανονική.

### 5.2.2 Ποιοτικός έλεγχος – Δείγματα βακτηρίων με ρεσορσινόλη διαφορετικών συγκεντρώσεων (HPLC)

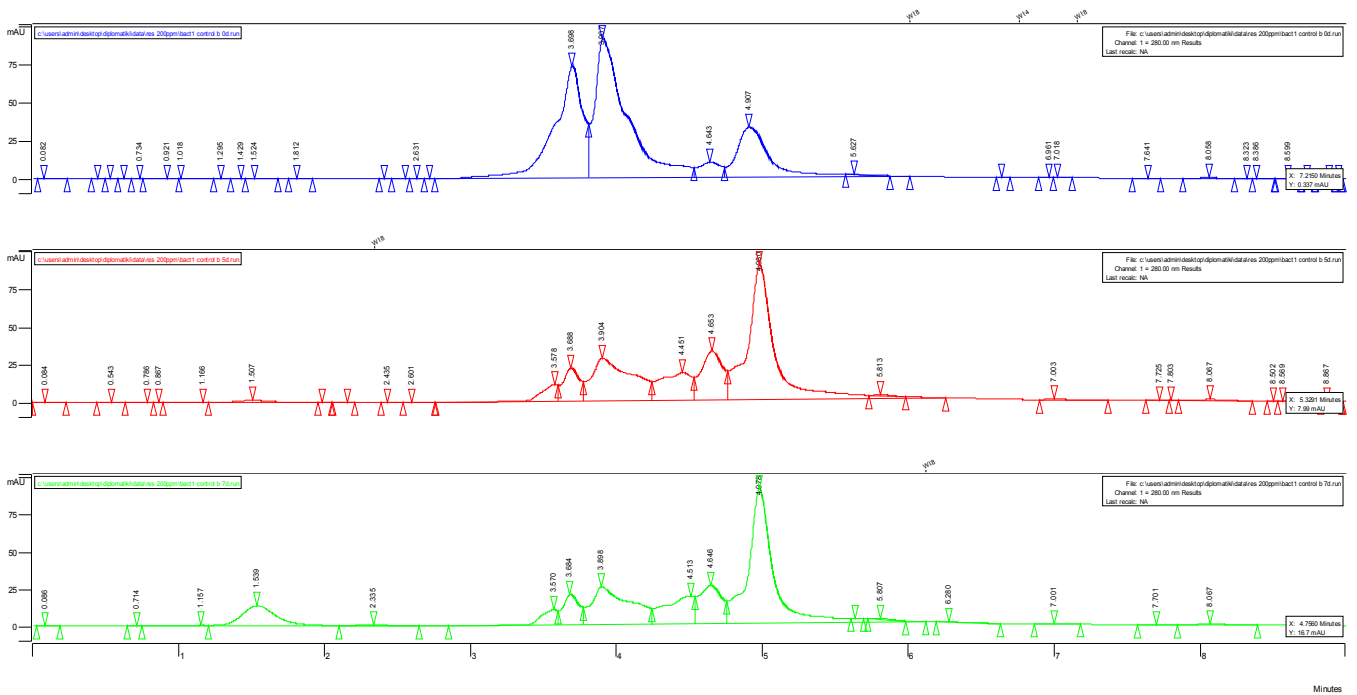
Τα παρακάτω διαγράμματα αφορούν τη συγκέντρωση των 200 ppm ρεσορσινόλης. Διαθέτουμε δύο είδη τυφλών δειγμάτων. Το πρώτο έχει μόνο ρεσορσινόλη και Marine Broth, ενώ το δεύτερο τους μικροοργανισμούς με Marine Broth.

Έχουμε ήδη παραθέσει τα standard που δείχνουν την κορυφή της ρεσορσινόλης. Παραθέτουμε και τα control δείγματα μας, τα οποία για μεγαλύτερη επαναληψιμότητα των μετρήσεων είναι διπλά:



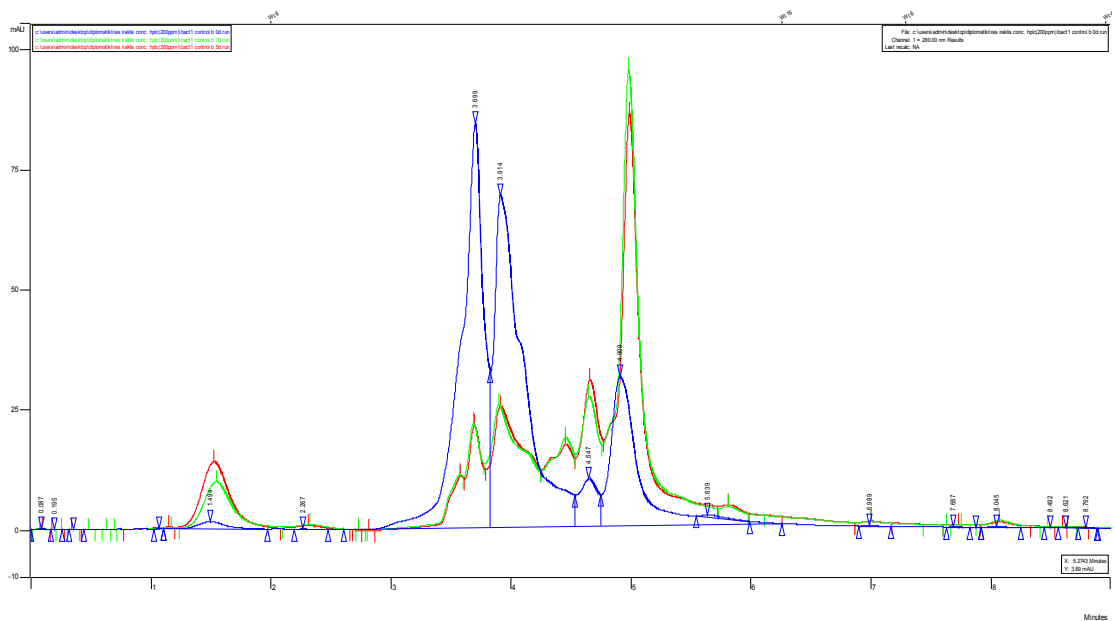
**Διάγραμμα 5.10** Δείγμα Control a (μόνο θρεπτικό μέσο) του MM001 τις μέρες 0, 5,

7



**Διάγραμμα 5.11** Δείγμα Control a (μόνο θρεπτικό μέσο) του MM001 τις μέρες 0, 5,

7



**Διάγραμμα 5.12** Κοινό διάγραμμα δείγματος a Control a (μόνο θρεπτικό μέσο) του MM001 για τις μέρες 0, 5, 7.

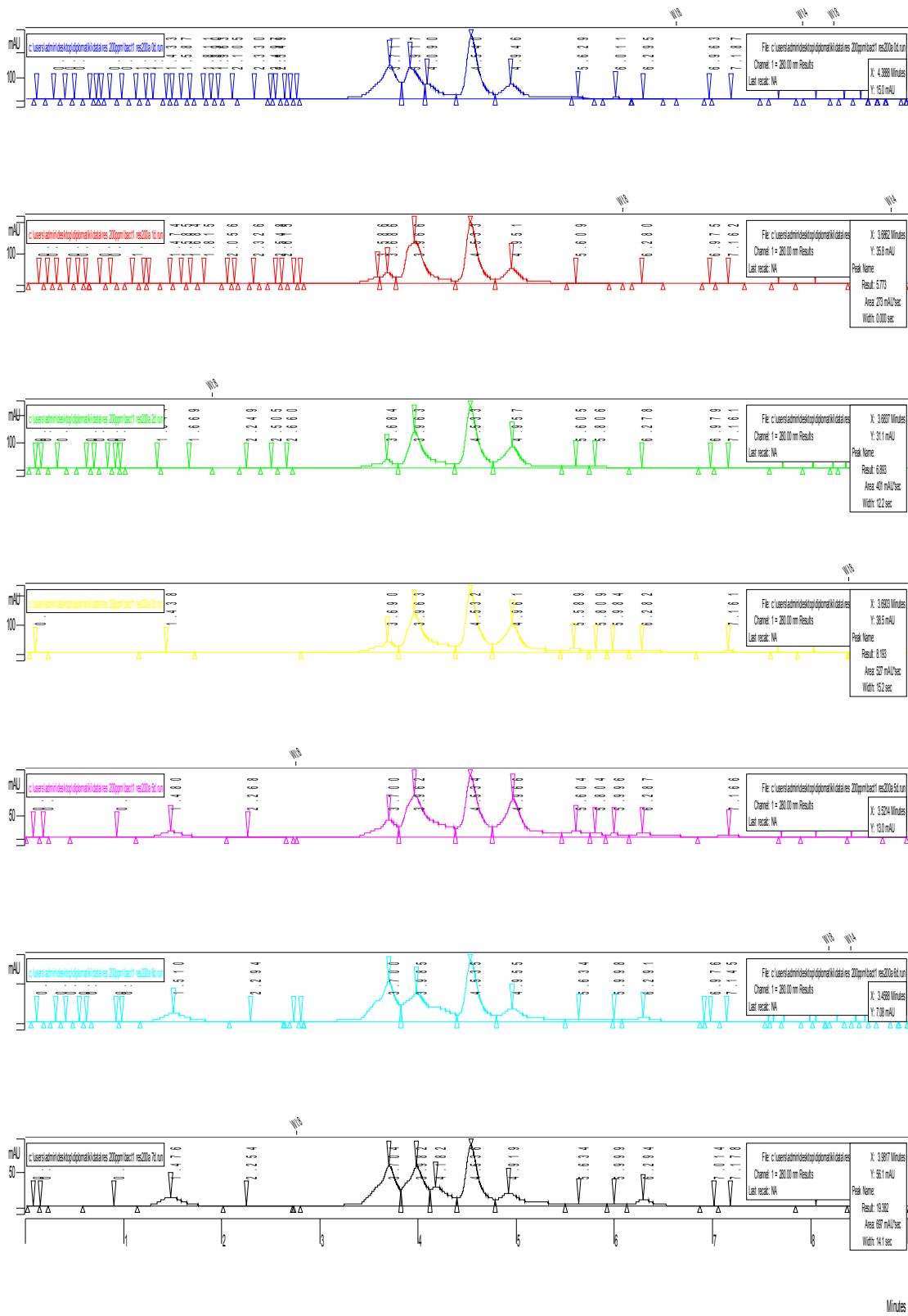
Η μπλε γραμμή είναι η μέρα μηδέν, η κόκκινη είναι πέμπτη και η πράσινη είναι η έβδομη.

Από τα διαγράμματα φαίνεται πώς οι μικροοργανισμοί κατανάλωσαν το μέσο το οποίο τους δόθηκε που εδώ αντιπροσωπεύεται από τις αρχικές κορυφές της ημέρας 0 στα 3,69 και 3,9 λεπτά.

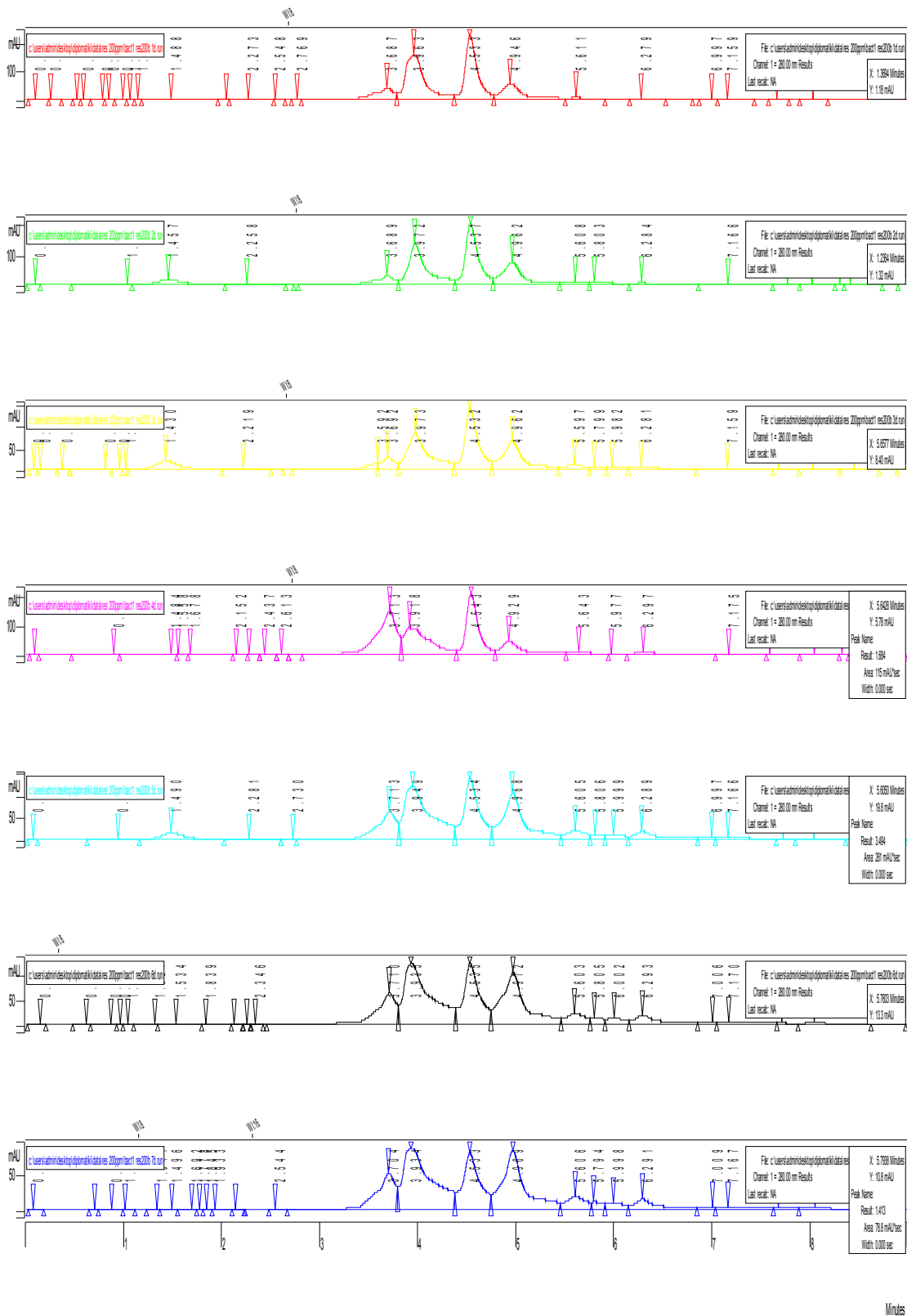
Ο μεταβολισμός των μικροοργανισμών μετέτρεψε τις αρχικές ουσίες σε κάτι διαφορετικό, δηλαδή στις κορυφές των μεταγενέστερων ημερών στα 4,98 λεπτά. Η κορυφή αυτή υπάρχει και την ημέρα μηδέν. Αυτό σημαίνει πως είναι μια ουσία που υπάρχει στο αρχικό θρεπτικό μέσο αλλά ο μικροοργανισμός δεν την προτίμησε εξ αρχής και μάλιστα την παρήγαγε. Όμως όταν οι συγκεντρώσεις των άλλων ουσιών μειώθηκαν αισθητά μετά το πέρας της 4<sup>ης</sup> μέρας, τότε άρχισε και η κατανάλωση αυτής της ουσίας. Πιο συγκεκριμένα μπορέσαμε και υπολογίσαμε το ποσοστό μείωσης των ουσιών μεταξύ της πρώτης και της τελευταίας μέρας. Η πρώτη κορυφή μειώθηκε σε ποσοστό 92% και η δεύτερη σε ποσοστό 71%. Η ουσία που αρχικά παρήχθει και στη συνέχεια καταναλώθηκε έχει συνολική αύξηση σε ποσοστό 59%. Μια ανάλογη εικόνα αναμενόταν και για την κορυφή της ρεσορσινόλης αλλά και για αυτές του μέσου, στα υπόλοιπα διαγράμματα εφόσον τελικά υπήρχε κατανάλωση αυτής.

Τα επόμενα διαγράμματα ξεκινούν από την 1<sup>η</sup> και καταλήγουν στην 7<sup>η</sup> μέρα ανεξαρτήτως χρώματος καμπύλων.

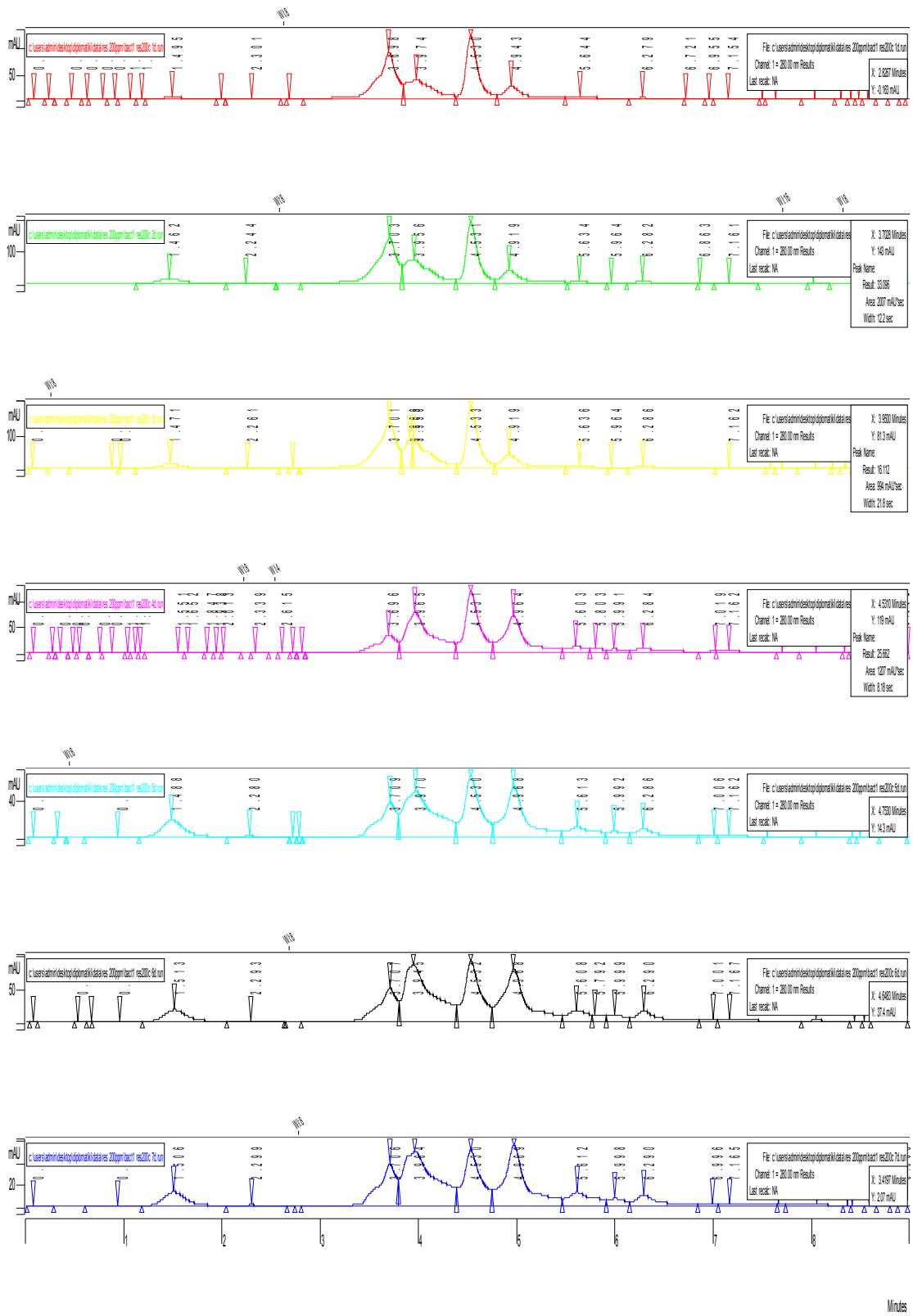




**Διάγραμμα 5.13** Δείγμα α MM001+ρεσορσινόλης 200 ppm. Σύγκριση πρώτης έως έβδομης ημέρας.



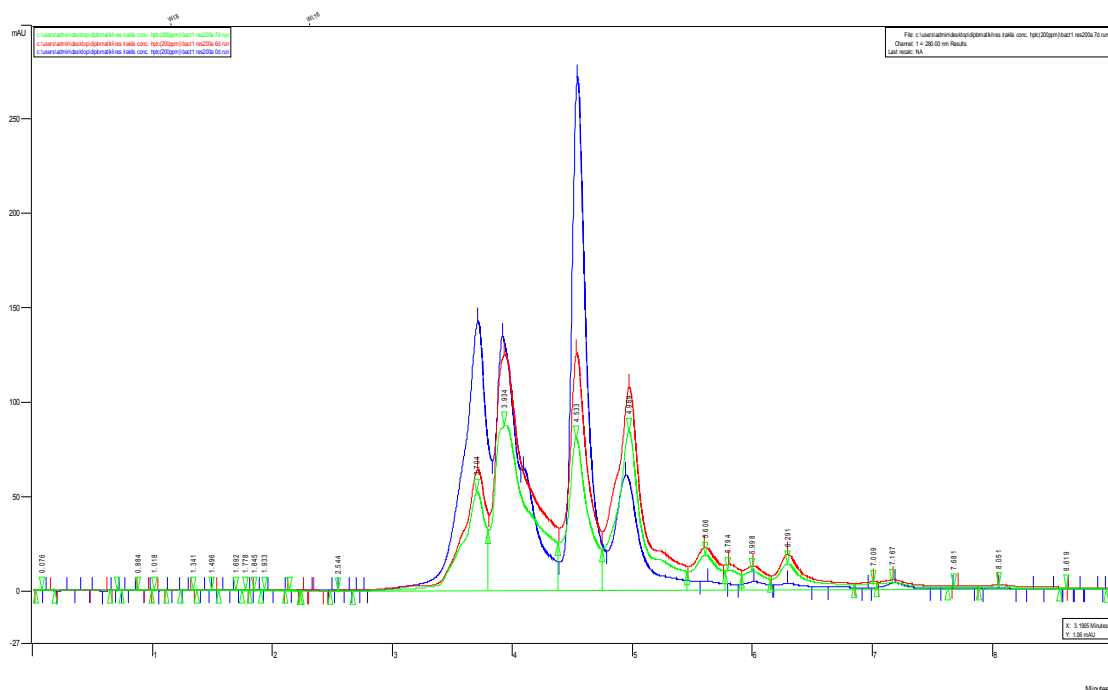
**Διάγραμμα 5.14** Δείγμα b MM001+ρεσορσινόλης 200 ppm. Σύγκριση πρώτης έως εβδομης ημέρας.



**Διάγραμμα 5.14** Δείγμα Control MM001 και MM002 χωρίς μικροοργανισμό.

Σύγκριση πρώτης έως έβδομης ημέρας.

Θα εστιάσουμε την προσοχή μας στην μηδενική, έκτη και έβδομη μέρα. Και για το α και για το β τα διαγράμματα είναι παρόμοια.



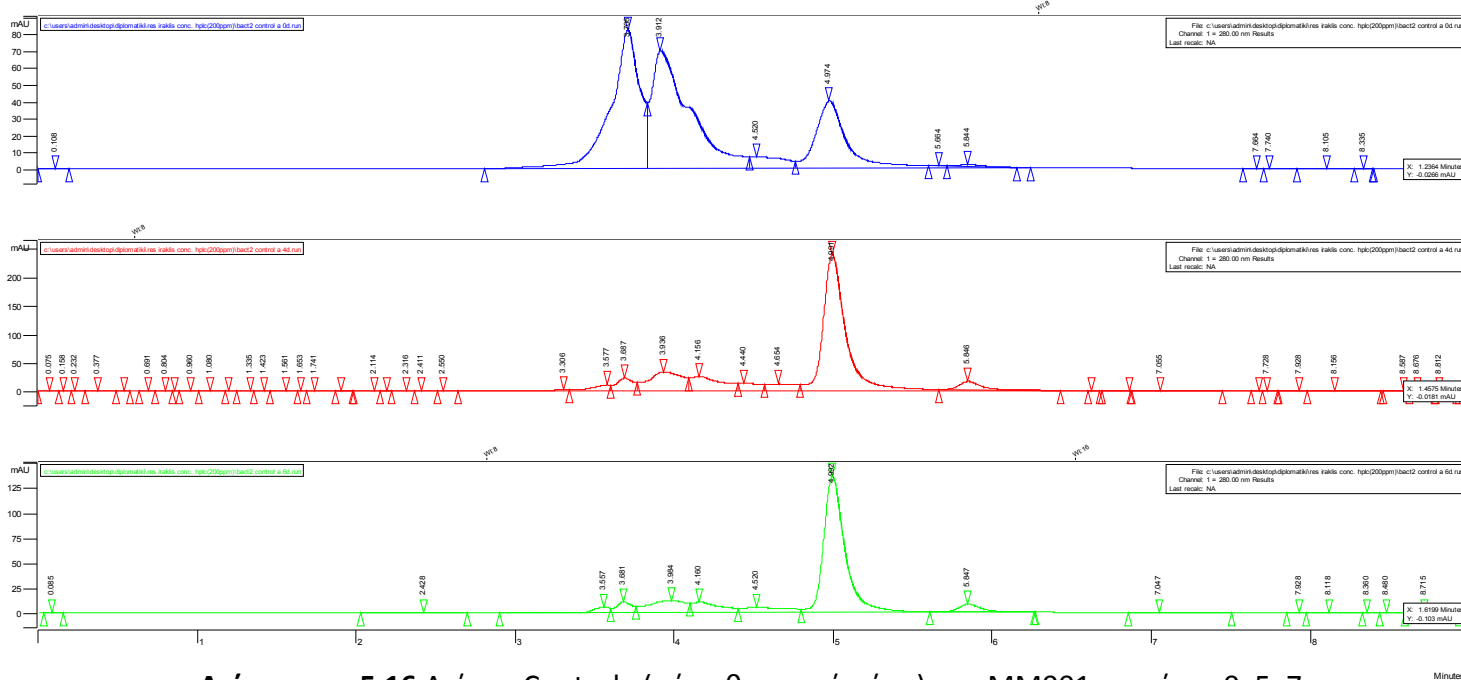
**Διάγραμμα 5.15** Κοινό διάγραμμα δείγματος α ρεσορσινόλης 200 ppm για τον MM001. Σύγκριση πρώτης έκτης και έβδομης ημέρας.

Η μπλε γραμμή είναι η μέρα μηδέν, η κόκκινη είναι έκτη και η πράσινη είναι η έβδομη.

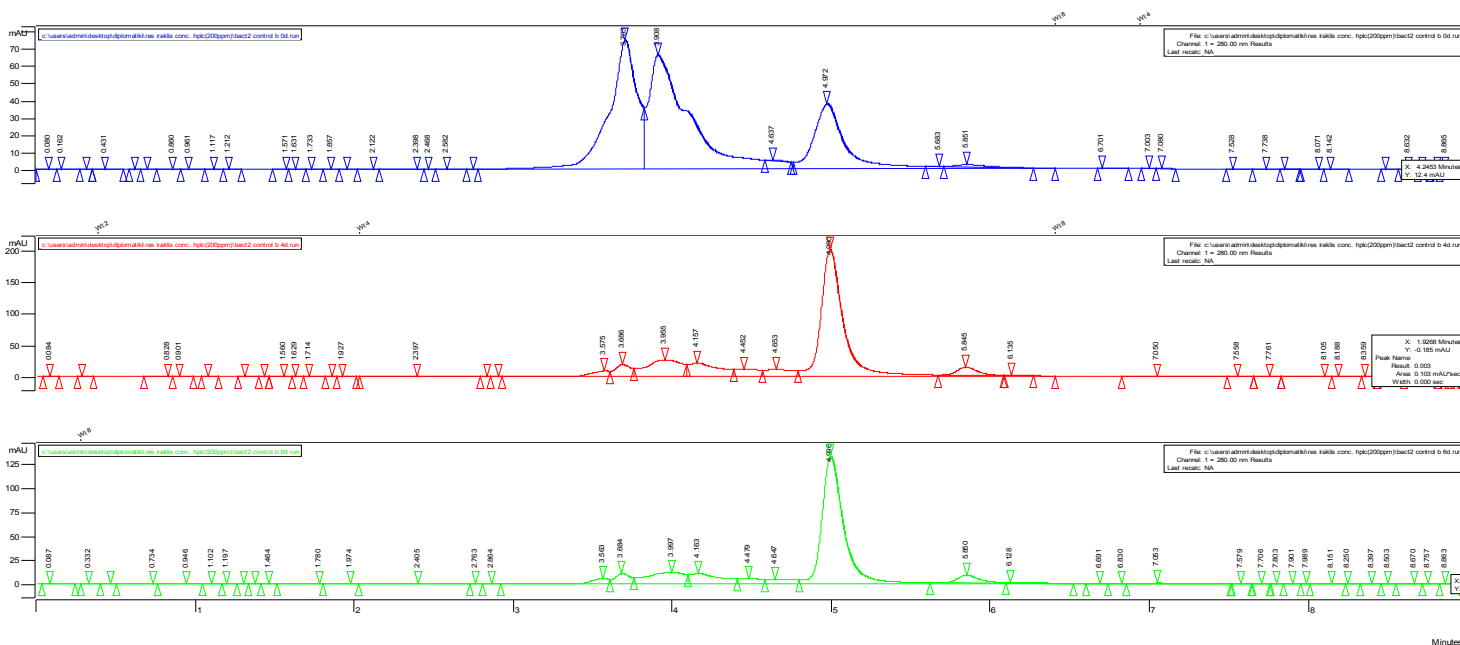
Αυτά που παρατηρήθηκαν στα παραπάνω διαγράμματα είναι τα εξής:

1. Υπήρξε ελάττωση στην συγκέντρωση των κορυφών που απεικονίζουν το μέσο σε ποσοστό που υπολογίσθηκε και συγκρίθηκε με τα αρχικά ποσοστά ελάττωσης του πρώτου control (92 και 71%). Η πρώτη κορυφή μειώθηκε 73% και η δεύτερη 4%. Το ότι τα ποσοστά ελάττωσης είναι μικρότερα είναι λογικό καθώς ο μικροοργανισμός έχει και άλλη πηγή τροφής αυτή την φορά και αυτή είναι η ρεσορσινόλη.
2. Αν και πολύ μικρές, υπήρξαν διάφορες κορυφές μετά τα 5,6 min οι οποίες δεν υπήρχαν σε κανένα από τα τυφλά. Αυτό μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ρεσορσινόλη ευθύνεται για αυτές τις κορυφές.
3. Η κορυφή της ρεσορσινόλης ήταν εμφανώς μειωμένη με το πέρασμα 7 ημερών σε ποσοστό που βρέθηκε ίσο με 78%.

Ακολουθούν τα αντίστοιχα διαγράμματα για τον MM002.

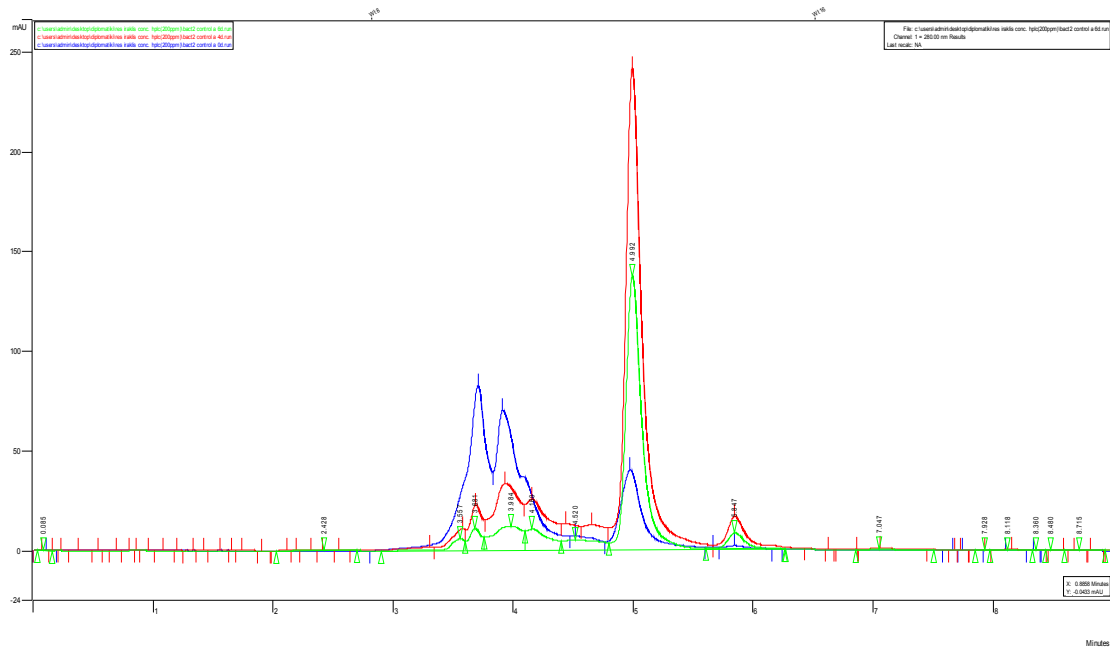


Διάγραμμα 5.16 Δείγμα Control α(μόνο θεραπευτικό μέσο) του MM001 τις μέρες 0, 5, 7



Διάγραμμα 5.17 Δείγμα Control b(μόνο θεραπευτικό μέσο) του MM001 τις μέρες 0, 5, 7

Από τα διαγράμματα φάνηκε πώς και εδώ οι μικροοργανισμοί κατανάλωσαν το μέσο το οποίο τους δόθηκε. Η μπλε γραμμή είναι η μέρα μηδέν, η κόκκινη είναι τώρα η τέταρτη και η πράσινη είναι η έκτη.

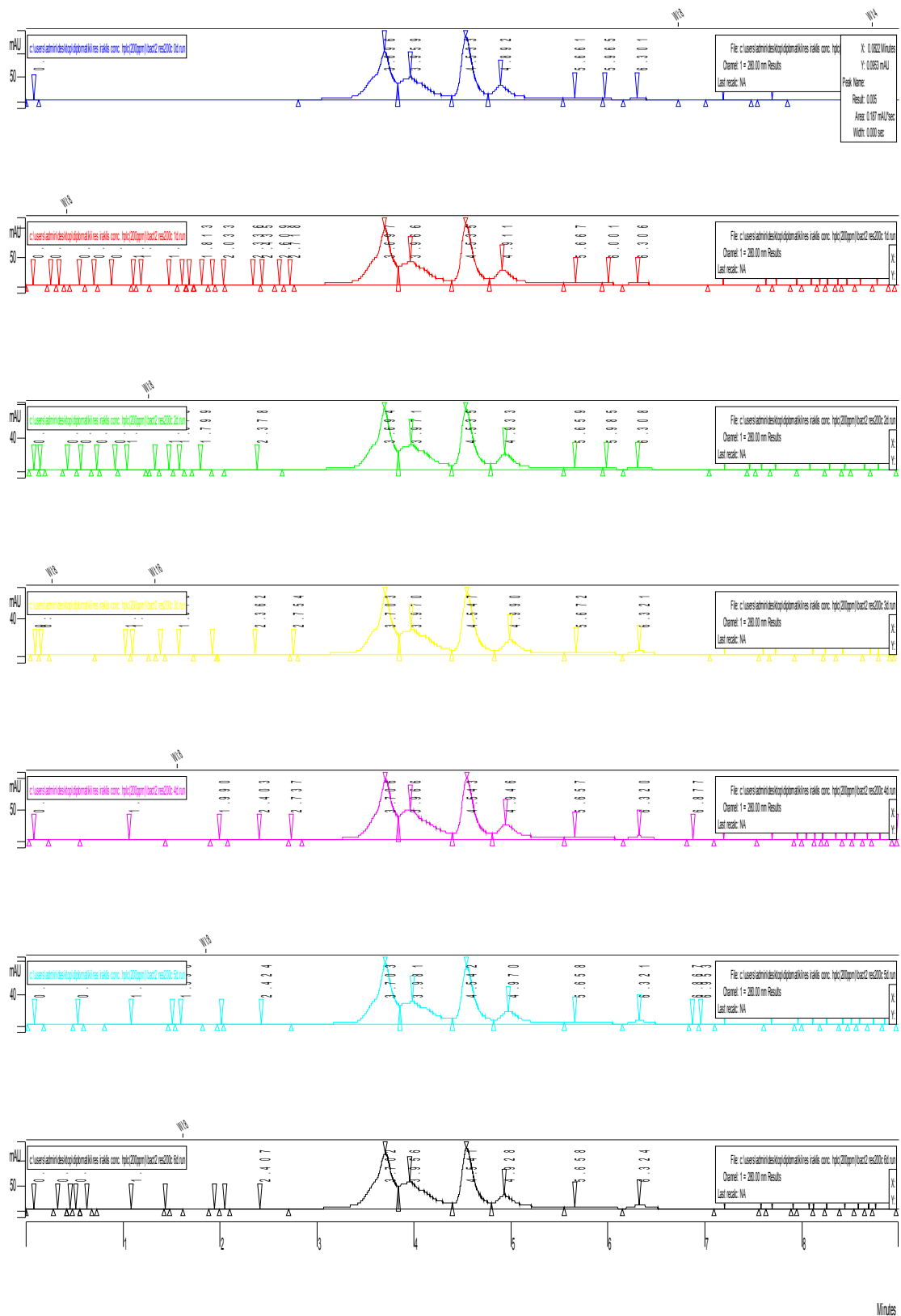


**Διάγραμμα 5.18** Κοινό διάγραμμα δείγματος a Control a (μόνο θρεπτικό μέσο) του MM002 για τις μέρες 0, 5, 7.

Ο μεταβολισμός των μικροοργανισμών μετέτρεψε τις αρχικές ουσίες σε κάτι διαφορετικό, δηλαδή στις κορυφές των μεταγενέστερων ημερών στα 4,95 λεπτά. Η κορυφή αυτή υπάρχει και την ημέρα μηδέν. Αυτό σημαίνει πως είναι μια ουσία που υπάρχει στο αρχικό θρεπτικό μέσο αλλά ο μικροοργανισμός δεν την προτίμησε εξ αρχής και μάλιστα την παρήγαγε. Όμως όταν οι συγκεντρώσεις των άλλων ουσιών μειώθηκαν αισθητά μετά το πέρας της 4<sup>ης</sup> μέρας, τότε άρχισε και η κατανάλωση αυτής της ουσίας. Πιο συγκεκριμένα μπορέσαμε και υπολογίσαμε το ποσοστό μείωσης των ουσιών μεταξύ της πρώτης και της τελευταίας μέρας. Η πρώτη κορυφή μειώθηκε σε ποσοστό 91% και η δεύτερη σε ποσοστό 65%. Η ουσία που αρχικά παρήχθει και στη συνέχεια καταναλώθηκε έχει συνολική αύξηση σε ποσοστό 68%.

Μια ανάλογη εικόνα αναμενόταν και για την κορυφή της ρεσορσινόλης αλλά και για αυτές του μέσου, στα υπόλοιπα διαγράμματα εφόσον τελικά υπήρχε κατανάλωση αυτής.

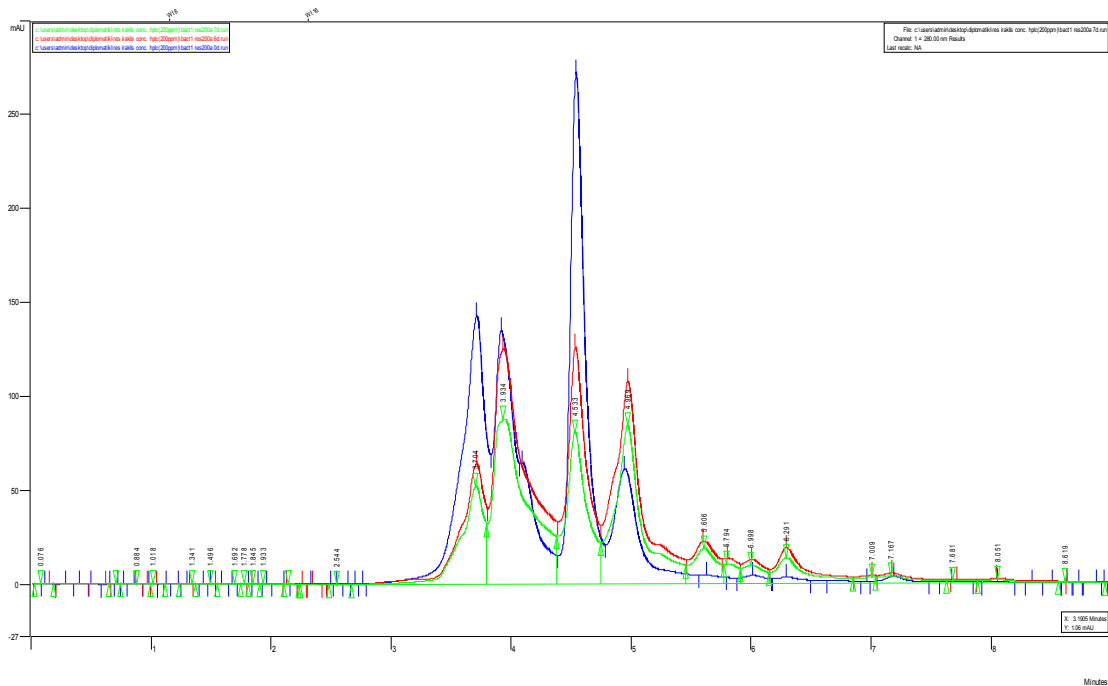




**Διάγραμμα 5.20** Δείγμα b MM002+ρεσορσινόλης 200 ppm. Σύγκριση πρώτης έως έκτης ημέρας



Θα εστιάσουμε την προσοχή μας στην μηδενική, πέμπτη και έκτη μέρα. Και για το α και για το β, τα διαγράμματα είναι παρόμοια.



**Διάγραμμα 5.21** Κοινό διάγραμμα δείγματος α ρεσορσινόλης 200 ppm για τον MM002. Σύγκριση πρώτης έκτης και έβδομης ημέρας.

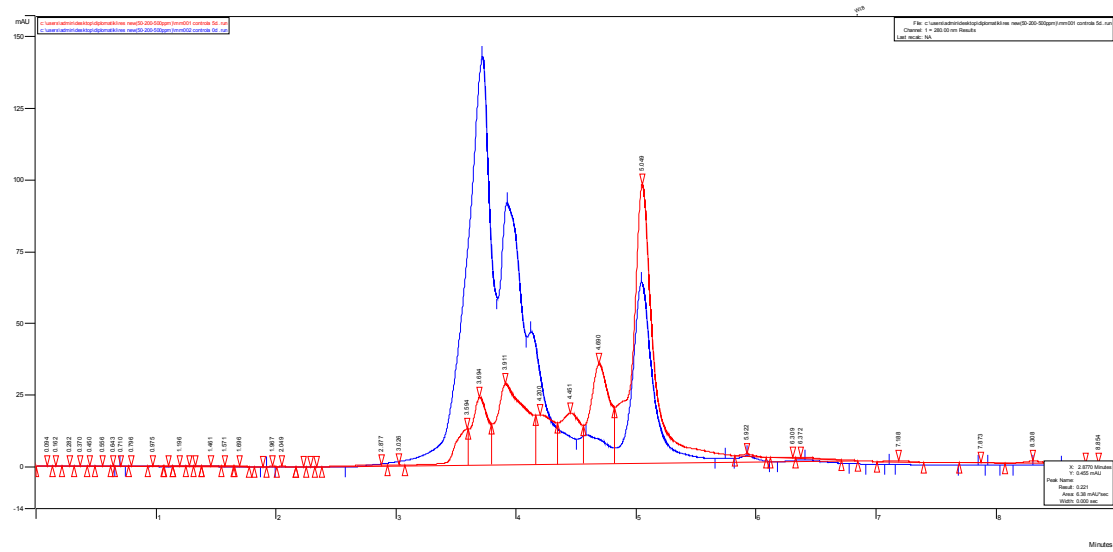
Η μπλε γραμμή είναι η μέρα μηδέν, η κόκκινη είναι πέμπτη και η πράσινη είναι η έκτη.

Αυτά που παρατηρήθηκαν στα παραπάνω διαγράμματα είναι τα εξής:

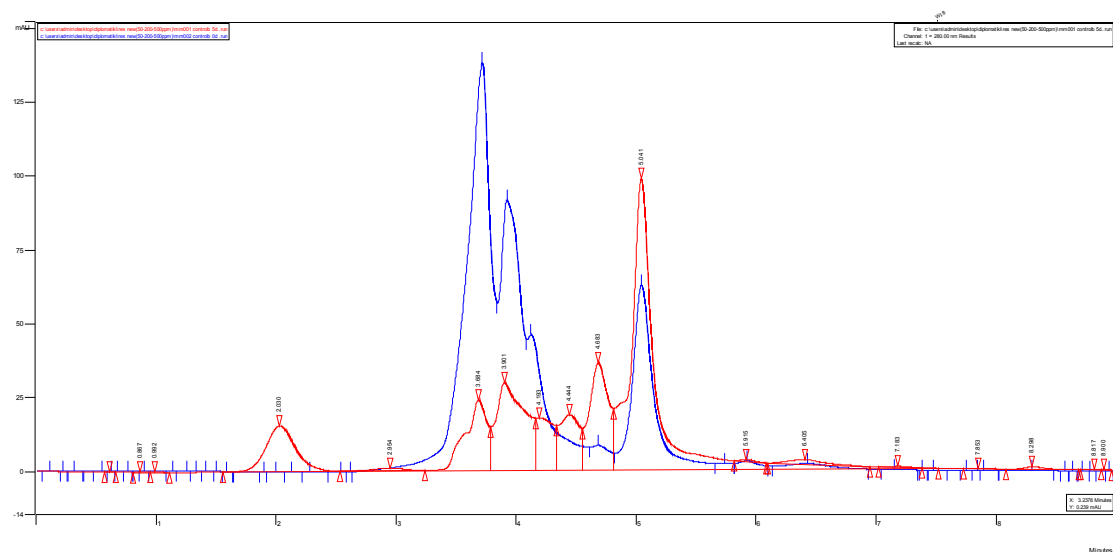
1. Υπήρξε ελάττωση στην συγκέντρωση των κορυφών που απεικονίζουν το μέσο σε ποσοστό που υπολογίσθηκε και να συγκρίθηκε με τα αρχικά ποσοστά ελάττωσης του πρώτου control (91 και 65%). Η πρώτη κορυφή μειώθηκε 76% και η δεύτερη 1%. Το ότι τα ποσοστά ελάττωσης είναι μικρότερα είναι λογικό καθώς ο μικροοργανισμός έχει και άλλη πηγή τροφής αυτή την φορά και αυτή είναι η ρεσορσινόλη.
2. Αν και πολύ μικρές, υπήρξαν διάφορες κορυφές μετά τα 5,6 min οι οποίες δεν υπήρχαν σε κανένα από τα τυφλά. Αυτό μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ρεσορσινόλη ευθύνεται για αυτές τις κορυφές.
3. Η κορυφή της ρεσορσινόλης ήταν εμφανώς μειωμένη με το πέρασμα 6 ημερών σε ποσοστό που βρέθηκε ίσο με 56%.

Η σύγκριση των δύο ποσοτών μείωσης της ρεσορσινόλης για τα δύο βακτήρια μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο MM001 διασπά καλύτερα την ουσία που του δόθηκε.

Ο επόμενος κύκλος πειραμάτων επικεντρώθηκε στον μικροοργανισμό MM002 και διαφορετικές συγκεντρώσεις ρεσορσινόλης. Οι συγκεντρώσεις αυτή τη φορά ήταν 50, 200 και 500 ppm. Για τον MM001 επαναλήφθηκαν τα πειράματα με 200 ppm.



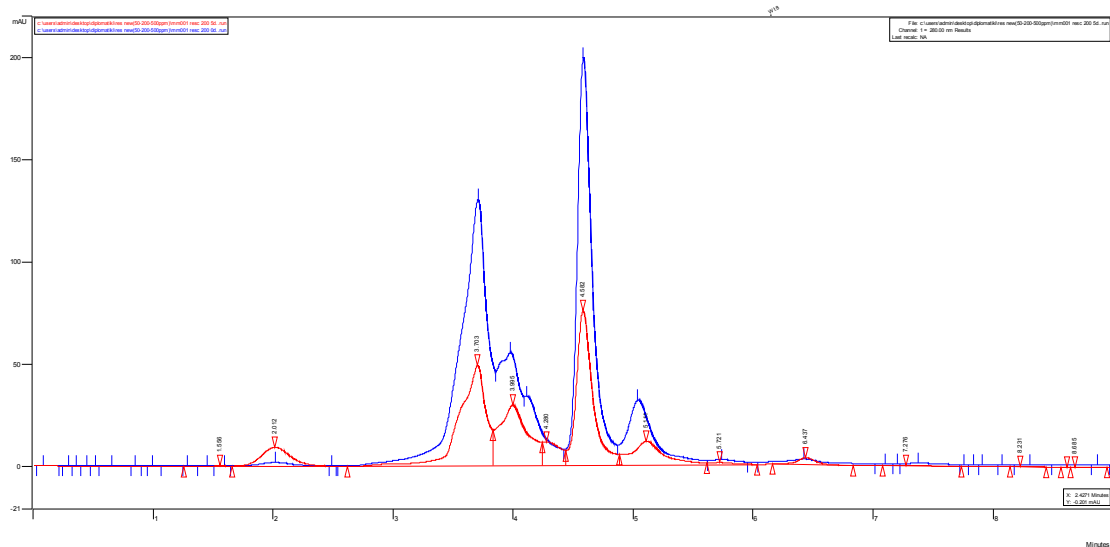
**Διάγραμμα 5.22** Κοινό διάγραμμα δείγματος a Control (μόνο θρεπτικό μέσο) του MM001 για τις μέρες 0, 7.



**Διάγραμμα 5.23** Κοινό διάγραμμα δείγματος b Control (μόνο θρεπτικό μέσο) του MM001 για τις μέρες 0, 7.

Η μπλε γραμμή είναι η μέρα μηδέν και η κόκκινη είναι η έβδομη.

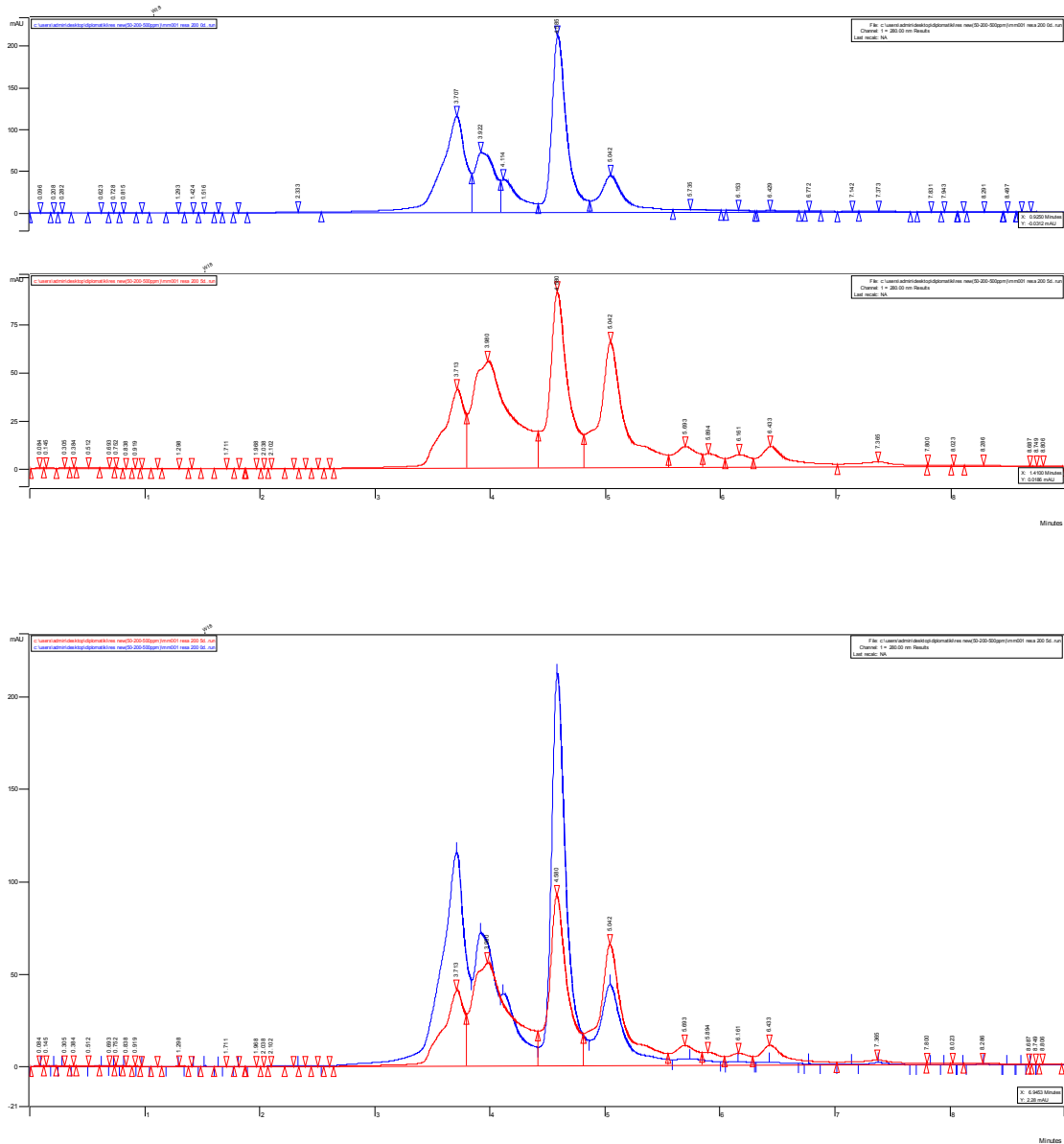
Παρόμοια με πριν υπολογίσαμε το ποσοστό μείωσης της πρώτης κορυφής στο 88% και της δεύτερης στο 55%. Μια ανάλογη εικόνα περιμέναμε να δούμε για την κορυφή της ρεσορσινόλης αλλά και αυτές του μέσου και στα υπόλοιπα διαγράμματα εφόσον τελικά υπήρχε κατανάλωση αυτής.



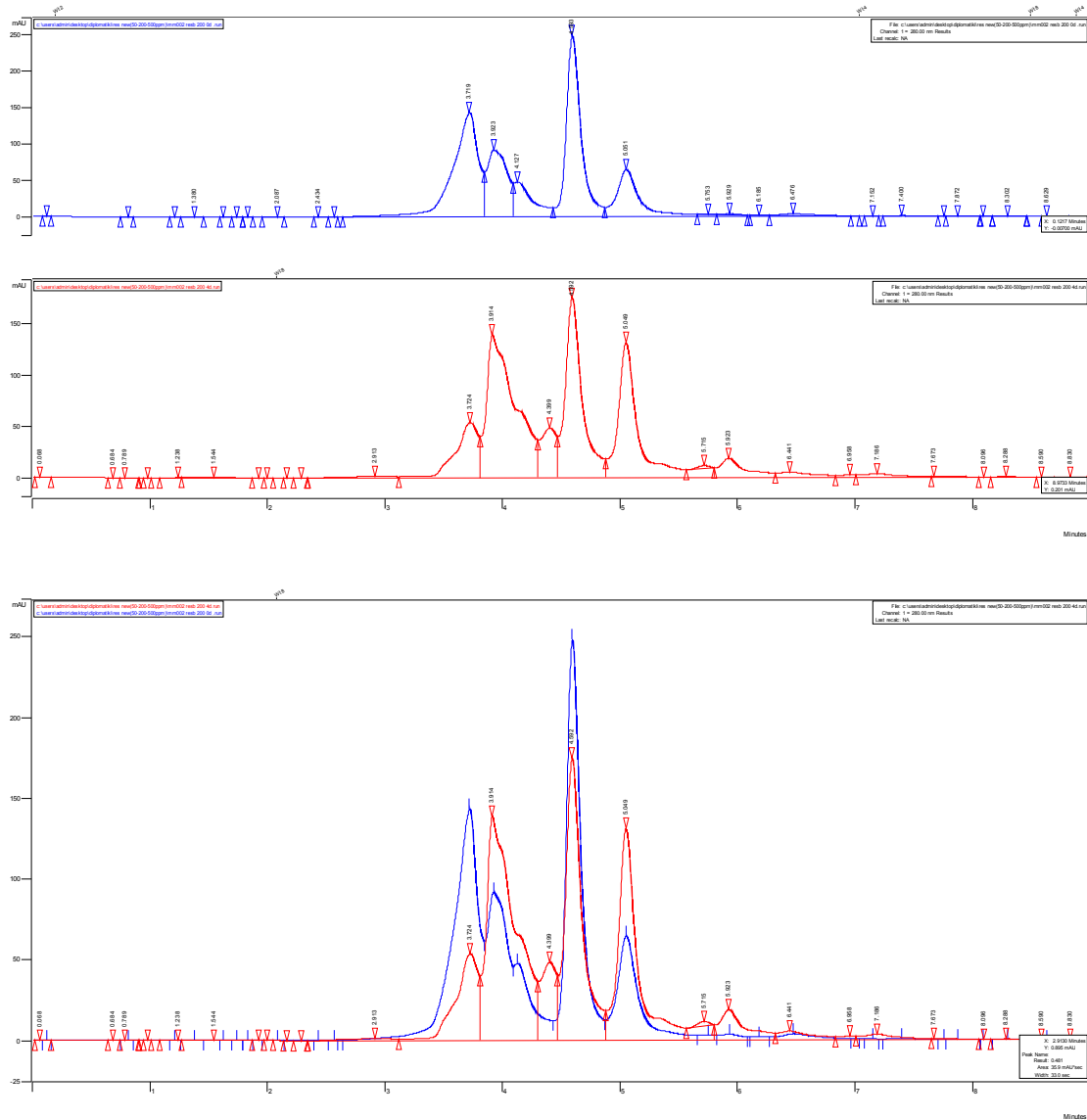
**Διάγραμμα 5.23** Κοινό διάγραμμα δείγματος Control (θρεπτικό μέσο και ρεσορσινόλη) του MM001 για τις μέρες 0, 7.

Η μπλε είναι η μέρα μηδέν και κόκκινη είναι η μέρα 7.

Αυτό το control δεν θα έπρεπε να περιέχει μικροοργανισμούς και οι συγκεντρώσεις όλων των ουσιών να αυξηθούν όπως και πριν λόγω εξάτμισης του νερού, δηλαδή συμπύκνωσης του διαλύματος. Δυστυχώς σε αυτό το διάλυμα υπήρξε μόλυνση και το υπόστρωμα καταναλώθηκε.



**Διάγραμμα 5.24** Δείγμα α 200 ppm ρεσορσινόλης του MM001 για τις μέρες 0 και 7.



**Διάγραμμα 5.25** Δείγμα b 200 ppm ρεσορσινόλης του MM001 για τις μέρες 0 και 7. Η μπλε γραμμή είναι η μέρα μηδέν, και η κόκκινη είναι η τέταρτη.

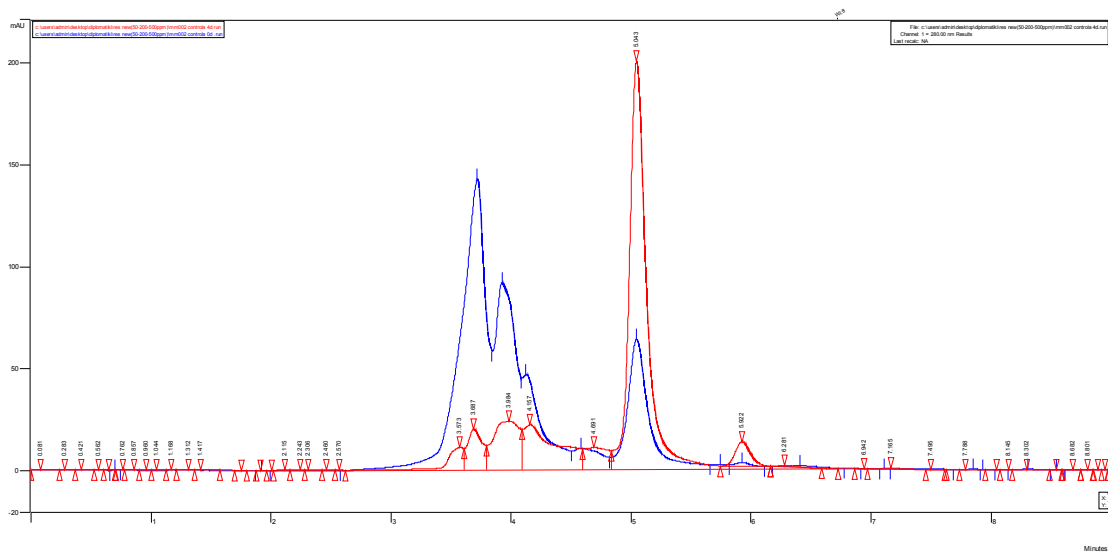
Αυτά που παρατηρήθηκαν στα παραπάνω διαγράμματα είναι τα εξής:

1. Υπήρξε ελάττωση στην συγκέντρωση των κορυφών που απεικονίζουν το μέσο σε ποσοστό που υπολογίσθηκε και να συγκρίθηκε με τα αρχικά ποσοστά ελάττωσης του πρώτου control (88 και 55%). Η πρώτη κορυφή μειώθηκε 80% και η δεύτερη αυξήθηκε 15%. Αυτό σημαίνει ότι αρχικά ο μικροοργανισμός προτίμησε την πρώτη κορυφή και την ρεσορσινόλη. Επομένως η συγκέντρωση της δεύτερης κορυφής αυξήθηκε λόγω εξάτμισης.
2. Αν και πολύ μικρές, υπήρξαν διάφορες κορυφές μετά τα 5,6 min οι οποίες δεν υπήρχαν σε κανένα από τα τυφλά. Αυτό μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ρεσορσινόλη ευθύνεται για αυτές τις κορυφές.
3. Η κορυφή της ρεσορσινόλης ήταν εμφανώς μειωμένη με το πέρασμα 7 ημερών σε ποσοστό που βρέθηκε ίσο με 70%.

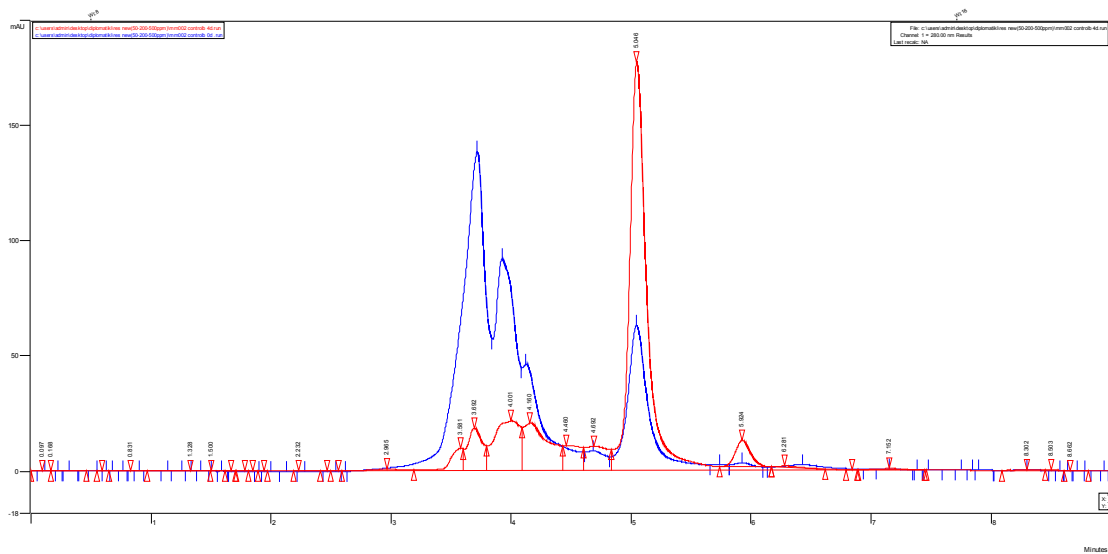
Φάνηκε πως σε αυτή την συγκέντρωση η ρεσορσινόλη προτιμάται από τον μικροοργανισμό καθώς υπήρξε μεγάλη μείωση της συγκέντρωσης για αυτό το χρονικό διάστημα. Τα πειραματικά αποτελέσματα εδώ συμφώνησαν με αυτά του αρχικού πειράματος.

Ακολουθούν τα διαγράμματα του MM002.

Το control μόνο με τον μικροοργανισμό και Media(διπλό για μεγαλύτερη επαναληψιμότητα των μετρήσεων).



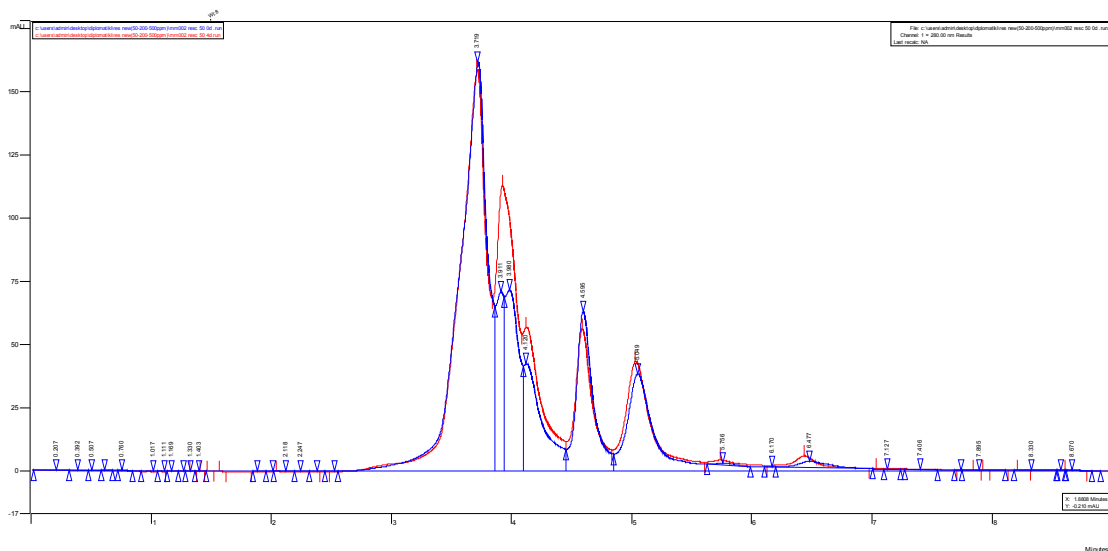
**Διάγραμμα 5.26** Κοινό διάγραμμα δείγματος a Control (μόνο θρεπτικό μέσο) του MM002 για τις μέρες 0, 6.



**Διάγραμμα 5.27** Κοινό διάγραμμα δείγματος b Control (μόνο θρεπτικό μέσο) του MM002 για τις μέρες 0, 6.

Η μπλε γραμμή είναι η μέρα μηδέν και η κόκκινη είναι η έκτη.

Παρόμοια με πριν υπολογίσαμε το ποσοστό μείωσης της πρώτης κορυφής στο 90% και της δεύτερης στο 52%. Μια ανάλογη εικόνα περιμέναμε να δούμε για την κορυφή της ρεσορσινόλης αλλά και αυτές του μέσου και στα υπόλοιπα διαγράμματα εφόσον τελικά υπήρχε κατανάλωση αυτής.

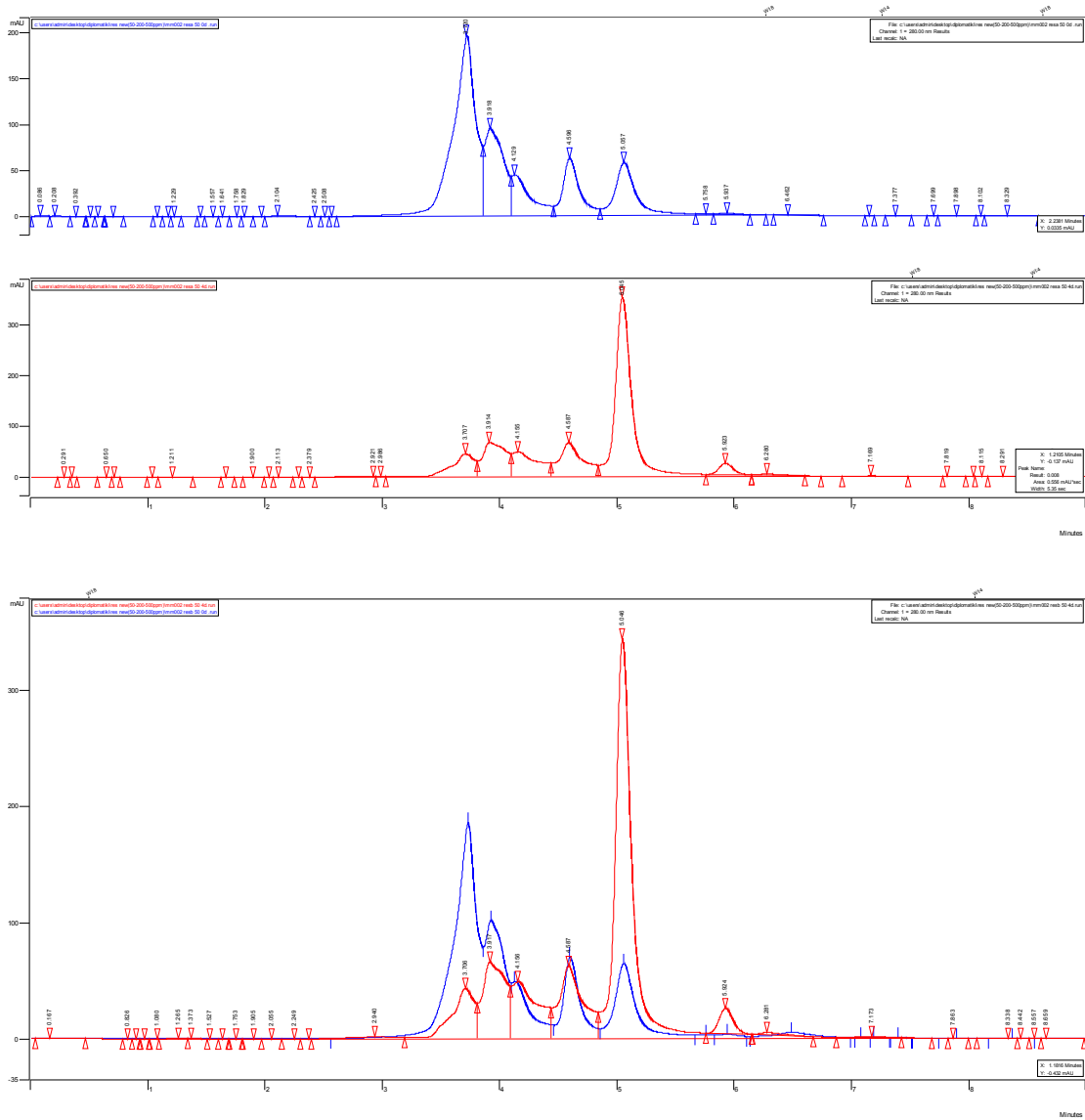


**Διάγραμμα 5.28** Κοινό διάγραμμα δείγματος Control 50 ppm(θρεπτικό μέσο και ρεσορσινόλη) του MM002 για τις μέρες 0, 6.

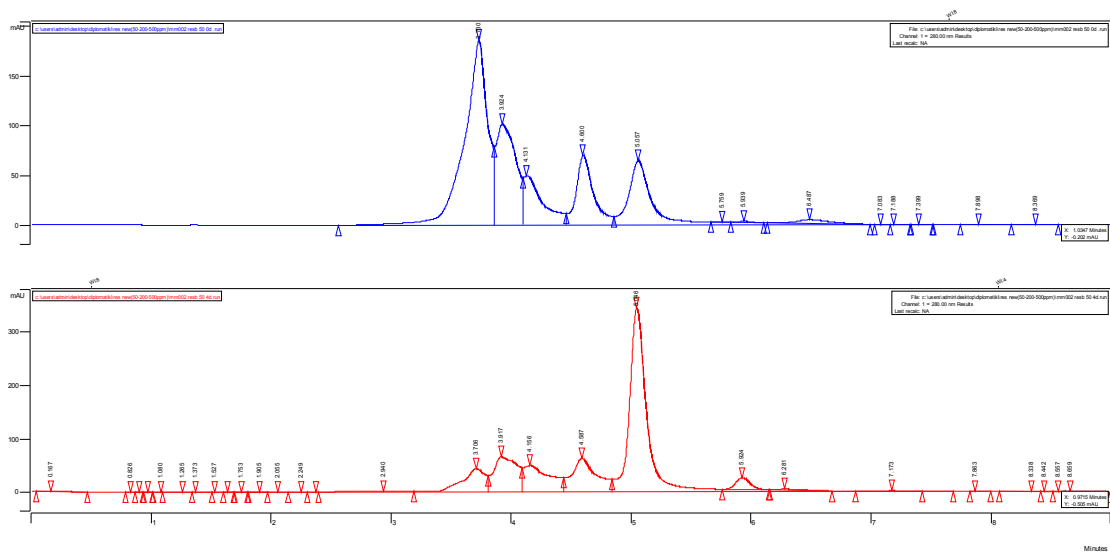
Η μπλε είναι η μέρα μηδέν και κόκκινη είναι η έκτη μέρα .

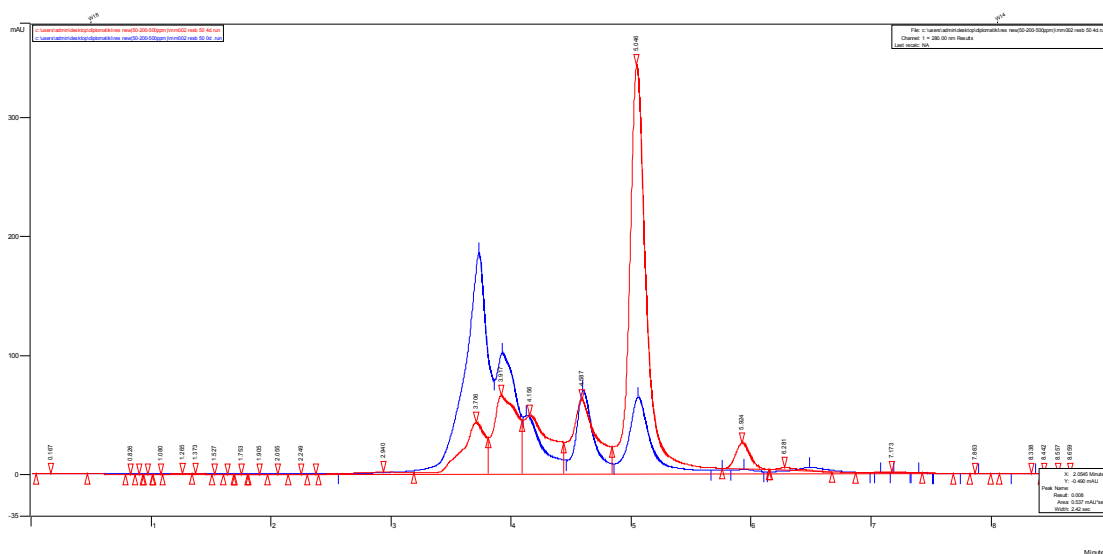
Όπως φάνηκε στο control που δεν περιέχει μικροοργανισμούς, οι συγκεντρώσεις όλων των ουσιών αυξήθηκαν. Όπως και πριν σε συνθήκες αερισμού παρατηρήθηκε εξάτμιση του νερού που περιείχαν τα δείγματα. Επομένως το διάλυμα συμπυκνώθηκε.





**Διάγραμμα 5.29** Δείγμα α 50 ppm ρεσορσινόλης του MM002 για τις μέρες 0 και 6.





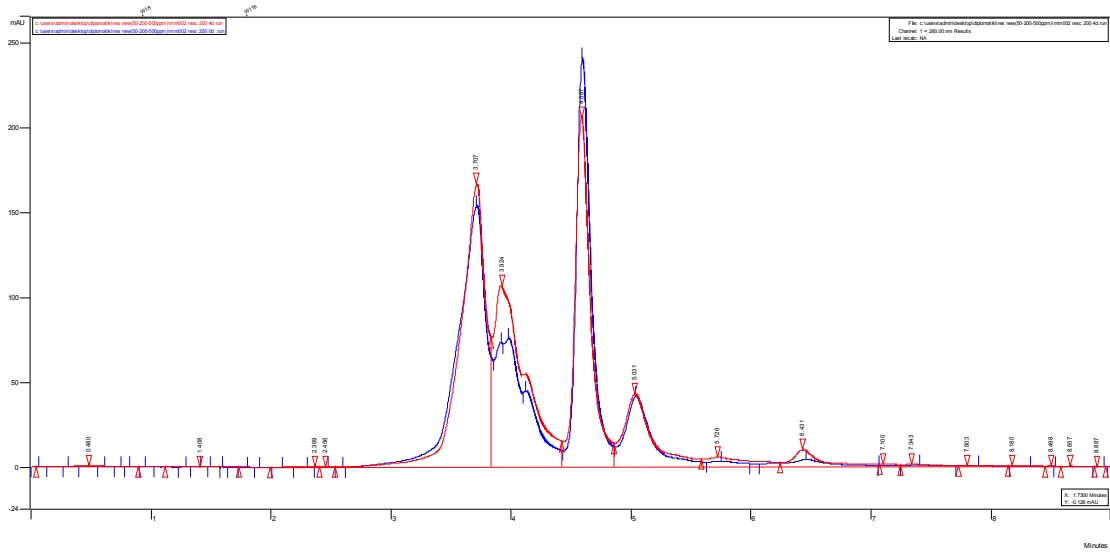
**Διάγραμμα 5.30** Δείγμα b 50 ppm ρεσορσινόλης του MM002 για τις μέρες 0 και 6.

Η μπλε γραμμή είναι η μέρα μηδέν, και η κόκκινη είναι η έκτη.

Αυτά που παρατηρήθηκαν στα παραπάνω διαγράμματα είναι τα εξής:

1. Υπήρξε ελάττωση στην συγκέντρωση των κορυφών που απεικονίζουν το μέσο σε ποσοστό που υπολογίσαμε και συγκρίναμε με τα αρχικά ποσοστά ελάττωσης του πρώτου control (90 και 52%). Η πρώτη κορυφή μειώθηκε 87% και η δεύτερη 22%. Τα ποσοστά ελάττωσης είναι μεν μικρότερα που είναι αναμενόμενο λόγω της ύπαρξης διαφορετικής πηγής τροφής, όμως αυτή την φορά σε πολύ μικρότερο βαθμό. Αυτό δείχνει ότι η ρεσορσινόλη δεν καταναλώθηκε σε μεγάλο βαθμό.
2. Αν και πολύ μικρές, υπήρξαν διάφορες κορυφές μετά τα 5,6 min οι οποίες δεν υπήρχαν σε κανένα από τα τυφλά. Αυτό μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ρεσορσινόλη ευθύνεται για αυτές τις κορυφές.
3. Η κορυφή της ρεσορσινόλης μειώθηκε πολύ λίγο με το πέρασμα 6 ημερών σε ποσοστό που υπολογίσαμε ίσο με 25%.

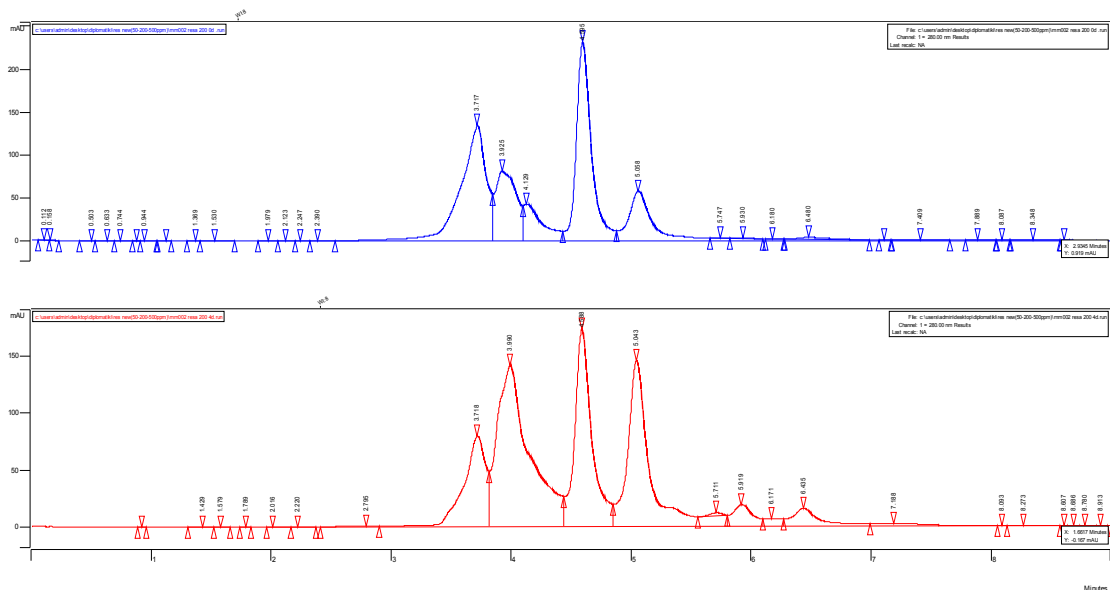
Φάνηκε πως σε αυτή την συγκέντρωση η ρεσορσινόλη δεν προτιμήθηκε από τον μικροοργανισμό καθώς δεν υπήρξε μεγάλη μείωση της συγκέντρωσης της.

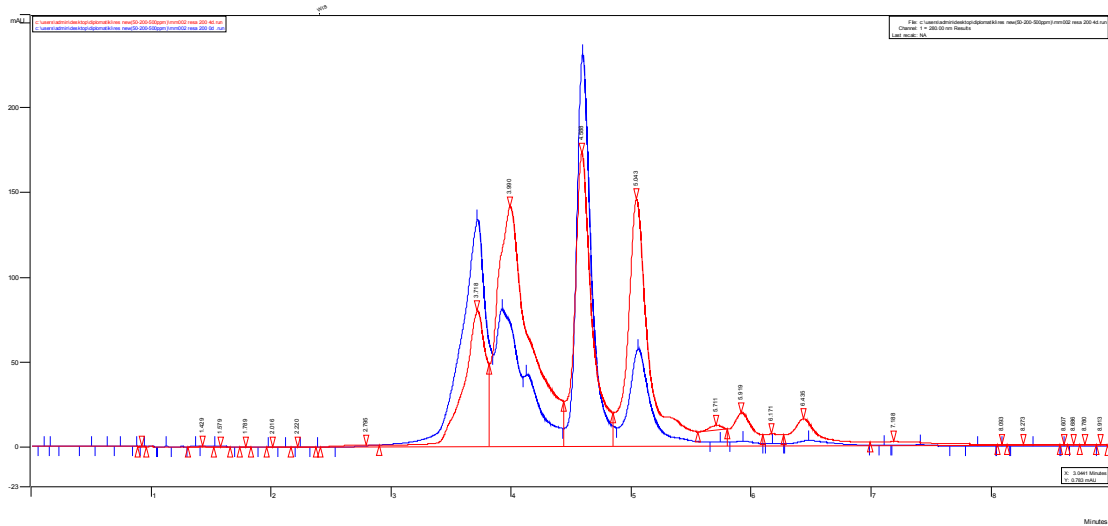


**Διάγραμμα 5.31** Κοινό διάγραμμα δείγματος Control 200 ppm(θρεπτικό μέσο και ρεσορινόλη) του MM002 για τις μέρες 0, 6.

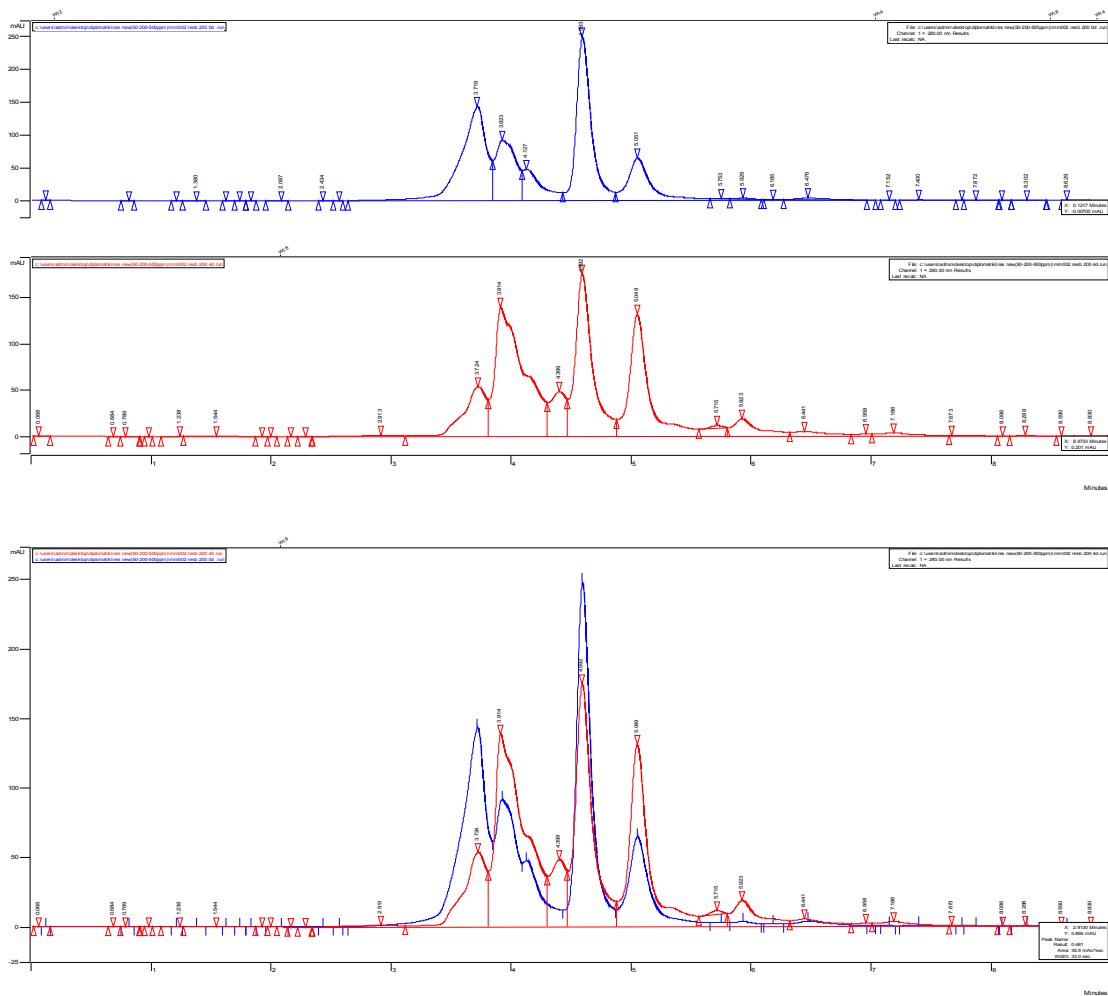
Η μπλε είναι η μέρα μηδέν και κόκκινη είναι η μέρα 6.

Όπως φάνηκε στο control που δεν περιείχε μικροοργανισμούς, οι συγκεντρώσεις όλων των ουσιών αυξήθηκαν. Όπως και πριν σε συνθήκες αερισμού παρατηρήθηκε εξάτμιση του νερού που περιείχαν τα δείγματα. Επομένως το διάλυμα συμπυκνώθηκε.





**Διάγραμμα 5.32** Δείγμα α 200 ppm ρεσορσινόλης του MM002 για τις μέρες 0 και 6



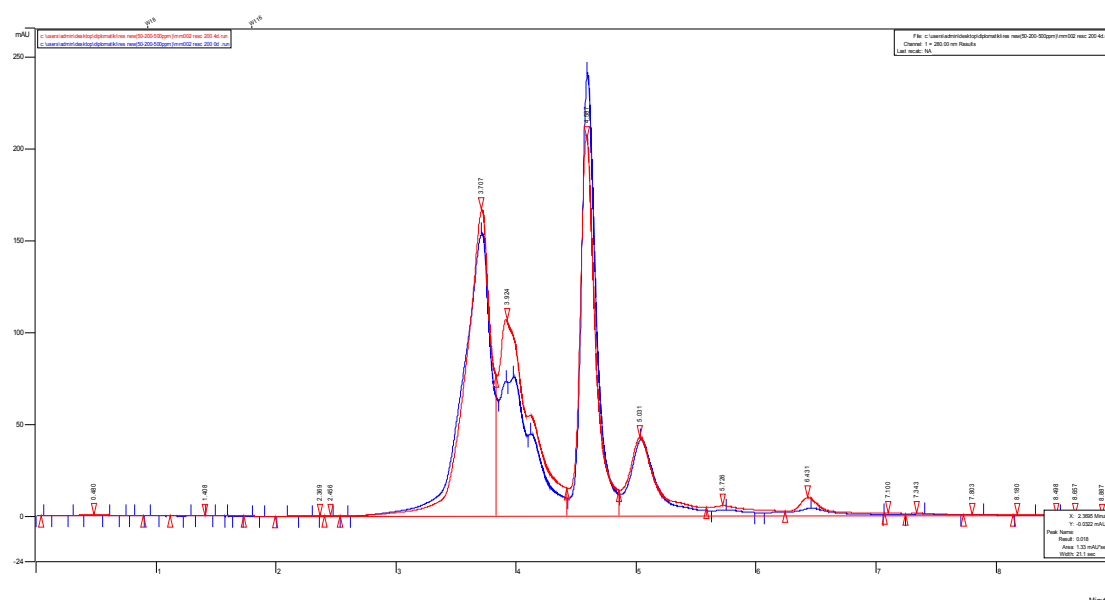
**Διάγραμμα 5.33** Δείγμα β 200 ppm ρεσορσινόλης του MM002 για τις μέρες 0 και 6

Η μπλε γραμμή είναι η μέρα μηδέν, και η κόκκινη είναι η έκτη.

Αυτά που παρατηρήθηκαν στα παραπάνω διαγράμματα είναι τα εξής:

1. Υπήρξε ελάττωση στην συγκέντρωση των κορυφών που απεικονίζουν το μέσο σε ποσοστό που υπολογίσαμε και συγκρίναμε με τα αρχικά ποσοστά ελάττωσης του πρώτου control (90 και 52%). Η πρώτη κορυφή μειώθηκε 84% και η δεύτερη αυξήθηκε 33%. Αυτό σημαίνει ότι αρχικά ο μικροοργανισμός προτίμησε την πρώτη κορυφή και την ρεσορσινόλη. Επομένως η συγκέντρωση της δεύτερης κορυφής αυξήθηκε λόγω εξάτμισης.
2. Αν και πολύ μικρές, υπήρξαν διάφορες κορυφές μετά τα 5,6 min οι οποίες δεν υπήρχαν σε κανένα από τα τυφλά. Αυτό μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ρεσορσινόλη ευθύνεται για αυτές τις κορυφές.
3. Η κορυφή της ρεσορσινόλης μειώθηκε λίγο με το πέρασμα 6 ημερών σε ποσοστό που υπολογίσαμε ίσο με 44%.

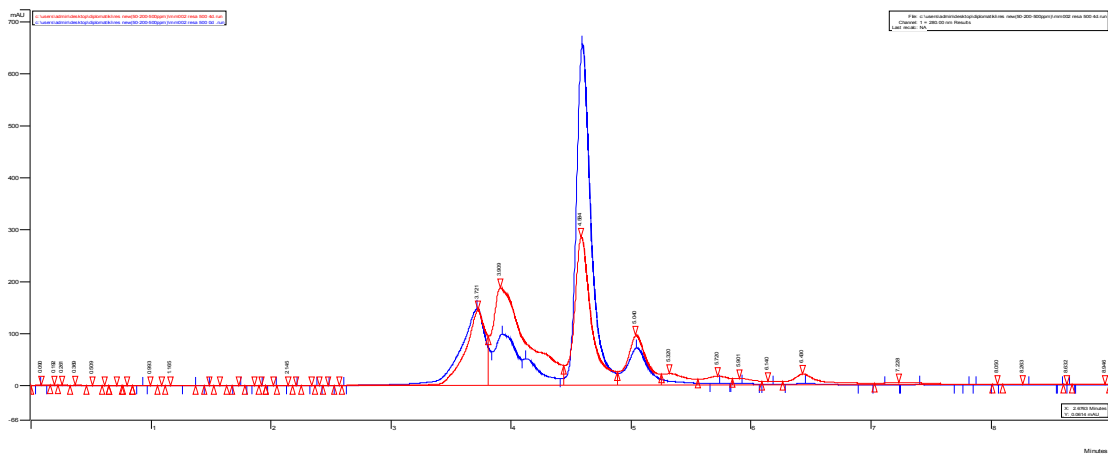
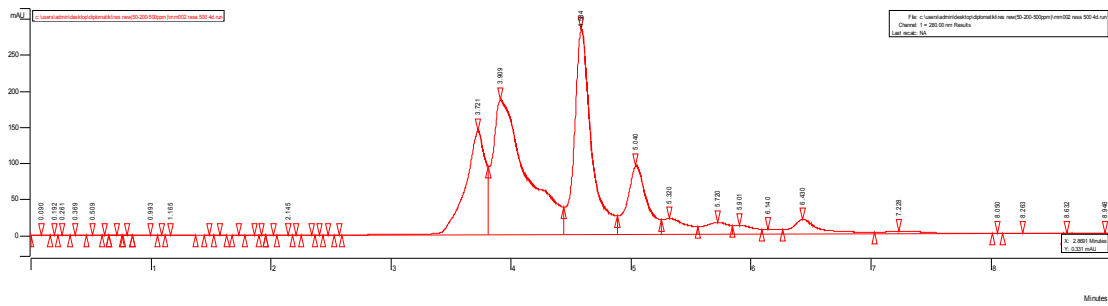
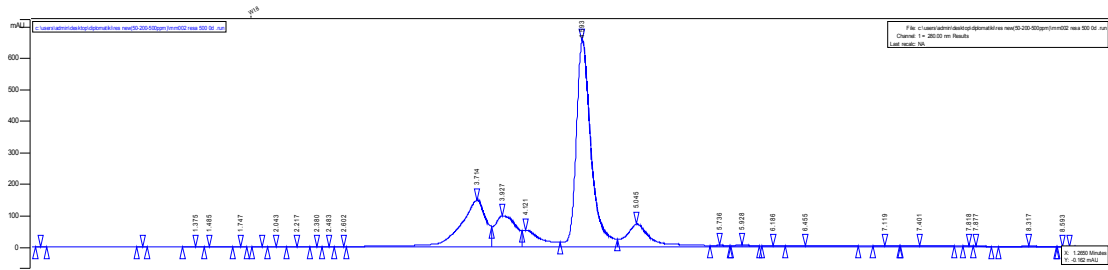
Φάνηκε πως σε αυτή την συγκέντρωση η ρεσορσινόλη προτιμήθηκε από τον μικροοργανισμό καθώς υπήρξε μεγάλη μείωση της συγκέντρωσης της. Τα πειραματικά αποτελέσματα εδώ συμφώνησαν με αυτά του αρχικού πειράματος.



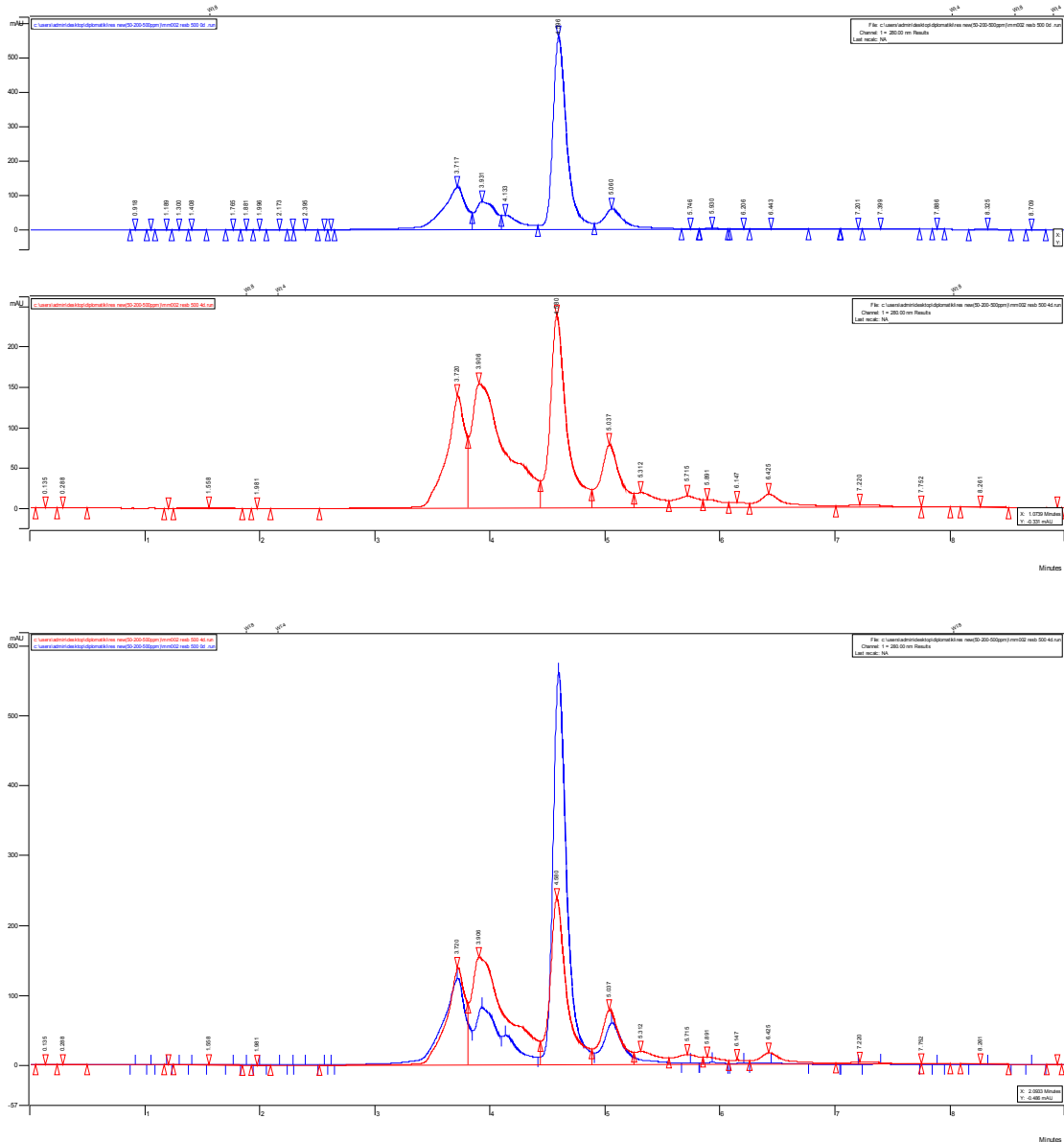
**Διάγραμμα 5.34** Κοινό διάγραμμα δείγματος Control 500 ppm(θρεπτικό μέσο και ρεσορσινόλη) του MM002 για τις μέρες 0, 4.

Η μπλε γραμμή είναι η μέρα μηδέν, και η κόκκινη είναι η έκτη.

Όπως φαίνεται στο control που δεν περιείχε μικροοργανισμούς, οι συγκεντρώσεις όλων των ουσιών αυξήθηκαν. Όπως και πριν σε συνθήκες αερισμού παρατηρήθηκε εξάτμιση του νερού που περιείχαν τα δείγματα. Επομένως το διάλυμα συμπυκνώθηκε.



**Διάγραμμα 5.35** Δείγμα α 500 ppm ρεσορσινόλης του MM002 για τις μέρες 0 και 6



**Διάγραμμα 5.36** Δείγμα b 500 ppm ρεσορσιόλης του MM002 για τις μέρες 0 και 6

Η μπλε γραμμή είναι η μέρα μηδέν, και η κόκκινη είναι η έκτη.

Αυτά που παρατηρήθηκαν στα παραπάνω διαγράμματα είναι τα εξής:

1. Υπήρξε ελάττωση στην συγκέντρωση των κορυφών που απεικονίζουν το μέσο σε ποσοστό που υπολογίσαμε και συγκρίναμε με τα αρχικά ποσοστά ελάττωσης του πρώτου control (90 και 52%). Η πρώτη κορυφή μειώθηκε 52% και η δεύτερη αυξήθηκε 63%. Αυτό σημαίνει ότι αρχικά ο μικροοργανισμός προτίμησε την πρώτη κορυφή και την ρεσορσινόλη. Επομένως η συγκέντρωση της δεύτερης κορυφής αυξήθηκε λόγω εξάτμισης.
2. Αν και πολύ μικρές, υπήρξαν διάφορες κορυφές μετά τα 5,6 min οι οποίες δεν υπήρχαν σε κανένα από τα τυφλά. Αυτό μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ρεσορσινόλη ευθύνεται για αυτές τις κορυφές.
3. Η κορυφή της ρεσορσινόλης μειώθηκε με το πέρασμα 6 ημερών σε ποσοστό που υπολογίσαμε ίσο με 61%.

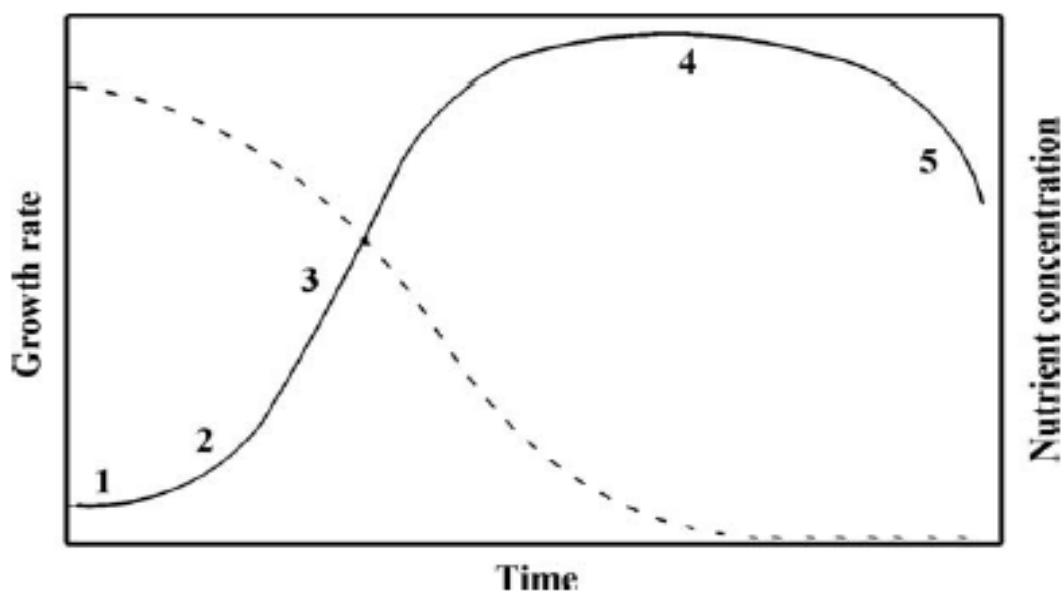
Φάνηκε πως σε αυτή την συγκέντρωση η ρεσορσινόλη προτιμήθηκε ακόμα περισσότερο από τον μικροοργανισμό καθώς υπήρξε η μεγαλύτερη μείωση στη συγκέντρωσης της που έχει παρατηρηθεί για αυτό το χρονικό διάστημα. Τα πειραματικά αποτελέσματα εδώ συμφώνησαν με αυτά του αρχικού πειράματος.



### 5.3 Φύκη

#### 5.3.1 Καμπύλη Ανάπτυξης του Nannocloropsis

Η δοθείσα καμπύλη ανάπτυξης του Nannocloropsis για τις συνθήκες μας είναι:



**Διάγραμμα 5.37** Καμπύλη ανάπτυξης του Nannocloropsis σε καλλιέργεια 7 ημερών σε συνθήκες με φως

Ο συντελεστής μετατροπής της απορρόφησης σε συγκέντρωση ήταν:

$$C(\text{g/L}) = 0,27 \cdot A_{750}$$

Για να βρούμε την καμπύλη ανάπτυξης του Nannocloropsis σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ρεσορσενόλης, καλλιεργούμε τον μικροοργανισμό σε καλλιέργειες των 80 ml με την μέθοδο της καλλιέργειας των δύο βημάτων.

Συγκεντρώσεις : 25, 50, 100 ppm (mg/L)

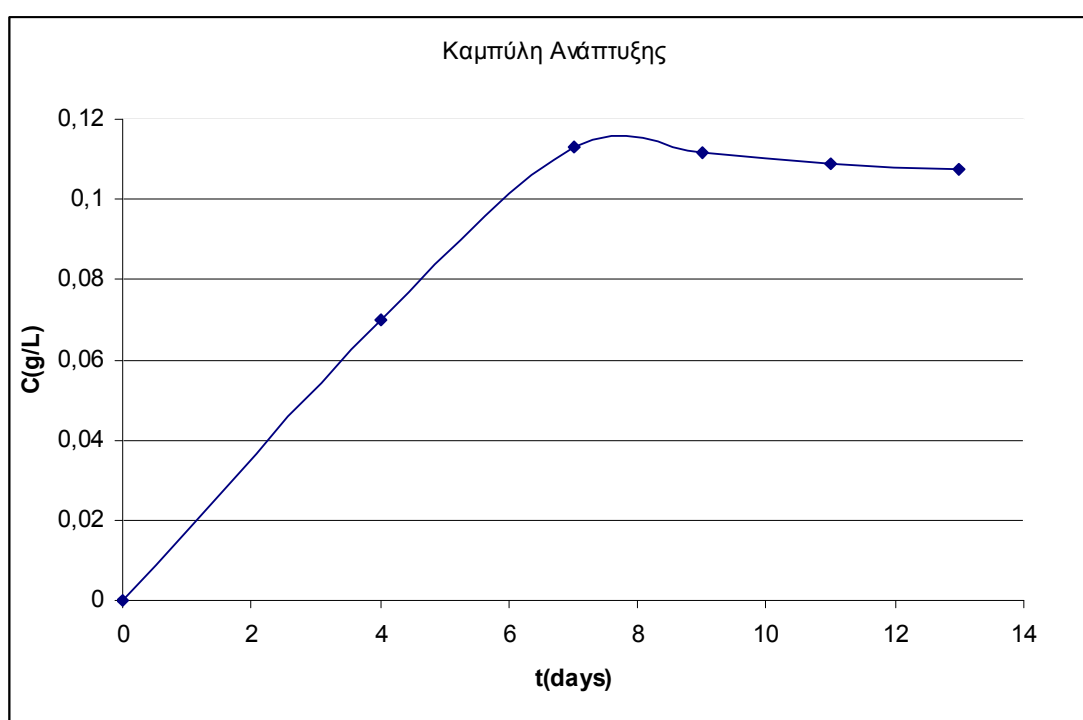
Παίρνουμε δείγματα κάθε 2 μέρες μετά από 3 μέρες.

Επίσης, γνωρίζοντας ότι το φως επιδρά στην ανάπτυξη των φυκών, εκτελέστηκαν δύο ίδια πειράματα όπου στο ένα οι καλλιέργειες φυλάσσονταν στο σκοτάδι και οι άλλες σε φως.

Στο φως τα δεδομένα μας είναι:

**Πίνακας 5.4** Βιομάζα του *Nannocloropsis* σε συνθήκες σκοταδιού

| t(days) | C(g/L)  |
|---------|---------|
| 0       | 0       |
| 4       | 0,06993 |
| 7       | 0,11286 |
| 9       | 0,11178 |
| 11      | 0,10908 |
| 13      | 0,10746 |



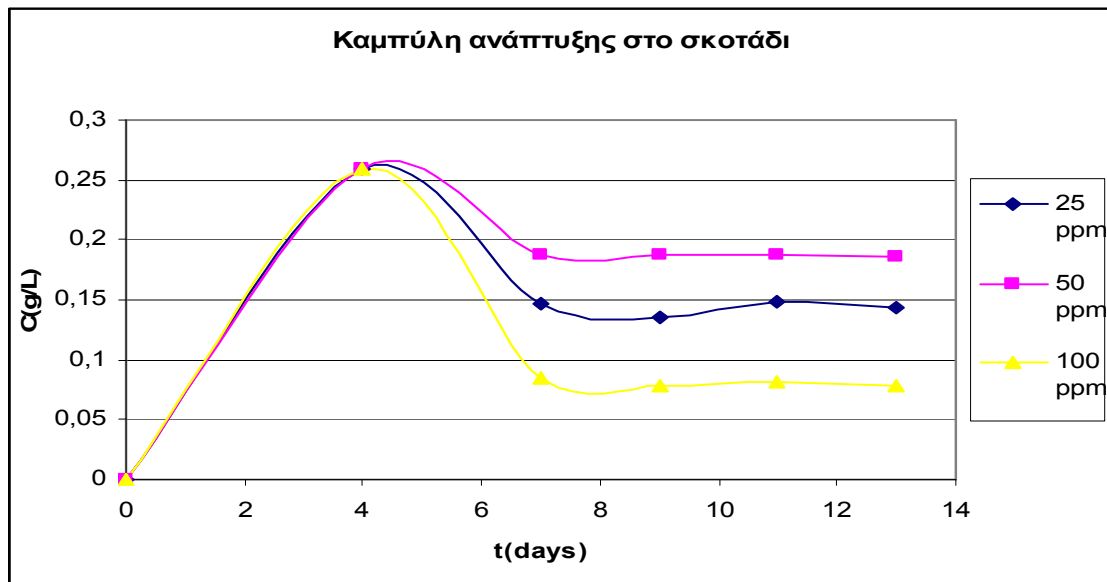
**Διάγραμμα 5.38** Καμπύλη ανάπτυξης του *Nannocloropsis* σε καλλιέργεια 6 ημερών σε συνθήκες με σκοτάδι

Το στέλεχος *Nannochloropsis* sp. φαίνεται πως αναπτύσσεται έστω και για λίγο υπό αυτές τις συνθήκες ειδικά τις πρώτες μέρες, φτάνοντας σε μέγιστο την 7<sup>η</sup> μέρα και παραμένοντας σε αυτά τα επίπεδα μέχρι και το τέλος των μετρήσεων.

Μελετήσαμε επίσης την ανάπτυξη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ρεσορσενόλης και με φως και χωρίς. Συγκεντρώσεις : 25, 50, 100 ppm (mg/L)

**Πίνακας 5.5** Βιομάζα του *Nannochloropsis* σε συνθήκες με σκοτάδι σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ρεσορσινόλης

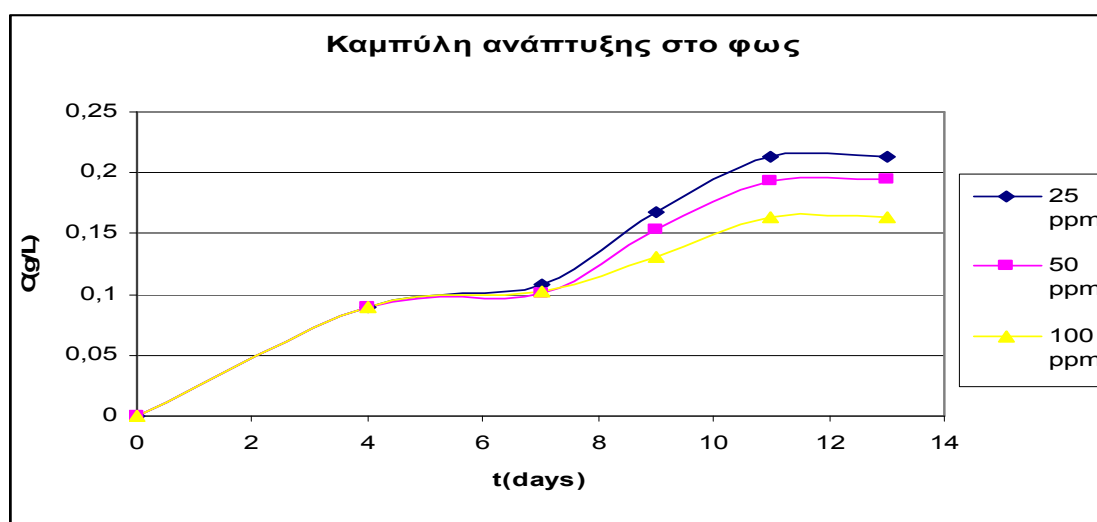
| t(days) | Biomass  |          |          |
|---------|----------|----------|----------|
|         | 25 ppm   | 50 ppm   | 100 ppm  |
| 0       | 0        | 0        | 0        |
| 4       | 0,259    | 0,259    | 0,259    |
| 7       | 0,14688  | 0,187515 | 0,085455 |
| 9       | 0,13581  | 0,186975 | 0,07776  |
| 11      | 0,147825 | 0,18819  | 0,080865 |
| 13      | 0,144045 | 0,18603  | 0,077895 |



**Διάγραμμα 5.39** Καμπύλη ανάπτυξης του *Nannochloropsis* σε καλλιέργεια 13 ημερών με συνθήκες σκοταδιού σε συγκεντρώσεις ρεσορσενόλης 25, 50 και 100 ppm.

**Πίνακας 5.6** Βιομάζα του *Nannochloropsis* σε συνθήκες με φως σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ρεσορσινόλης

| t(days) | Biomass |          |          |
|---------|---------|----------|----------|
|         | 25 ppm  | 50 ppm   | 100 ppm  |
| 0       | 0       | 0        | 0        |
| 4       | 0,09    | 0,09     | 0,09     |
| 7       | 0,108   | 0,10044  | 0,10206  |
| 9       | 0,16821 | 0,153225 | 0,13122  |
| 11      | 0,21276 | 0,19359  | 0,163755 |
| 13      | 0,21301 | 0,19399  | 0,164011 |



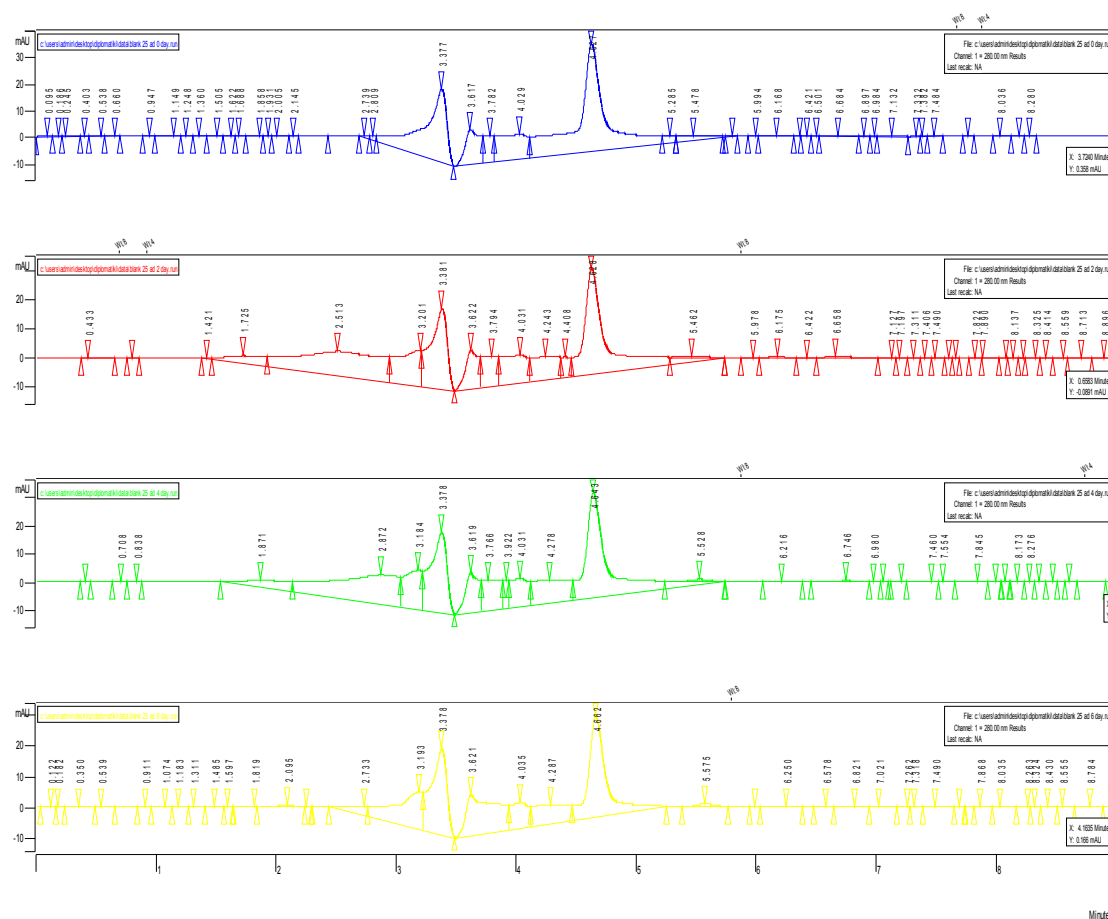
**Διάγραμμα 5.40** Καμπύλη ανάπτυξης του *Nannochloropsis* σε καλλιέργεια 13 ημερών με συνθήκες φωτός σε συγκεντρώσεις ρεσορσινόλης 25, 50 και 100 ppm.

Το στέλεχος *Nannochloropsis* sp. είχε την καλύτερη ανάπτυξη όταν τοποθετήθηκε στο φως και με την μικρότερη συγκέντρωση ρεσορσινόλης. Δηλαδή φάνηκε πως η ουσία παρεμποδίζει την ανάπτυξη, αλλά αυτό δεν σημαίνει πως την σταμάτησε ή η ίδια η ουσία δεν καταναλώθηκε. Όταν το στέλεχος *Nannochloropsis* sp. τοποθετήθηκε στο σκοτάδι πέτυχε την καλύτερη ανάπτυξη με την μεσαία συγκέντρωση ρεσορσινόλης. Αυτό που έδειξαν τα παρακάτω διαγράμματα HPLC ήταν ότι σε συγκέντρωση 50 ppm ο μικροοργανισμός πέτυχε το μεγαλύτερο ποσοστό διάσπασης.

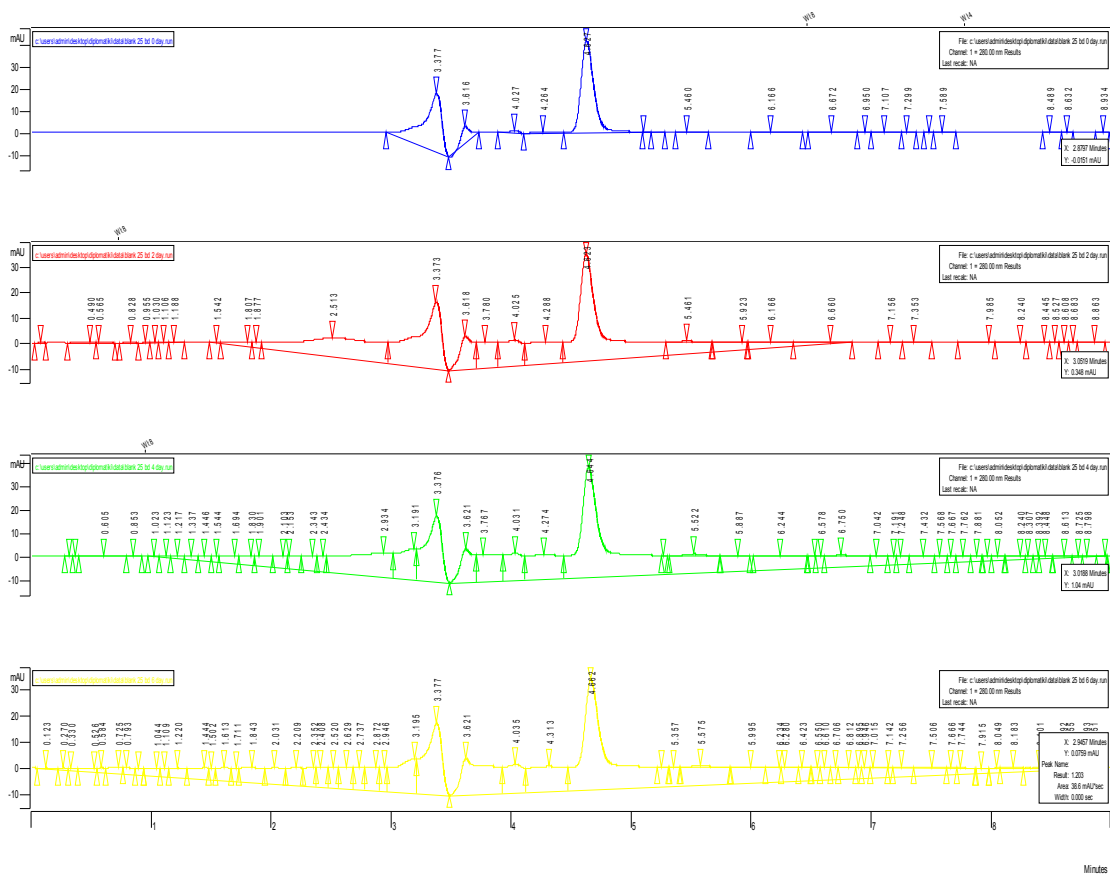
### 5.3.2 Ποιοτικός έλεγχος – Δείγματα φυκών με ρεσορσινόλη διαφορετικών συγκεντρώσεων (HPLC)

Διαθέτουμε δύο είδη δειγμάτων. Το πρώτο έχει μόνο ρεσορσινόλη και θρεπτικό μέσο δηλαδή blanks, ενώ το δεύτερο περιέχει και φύκη.

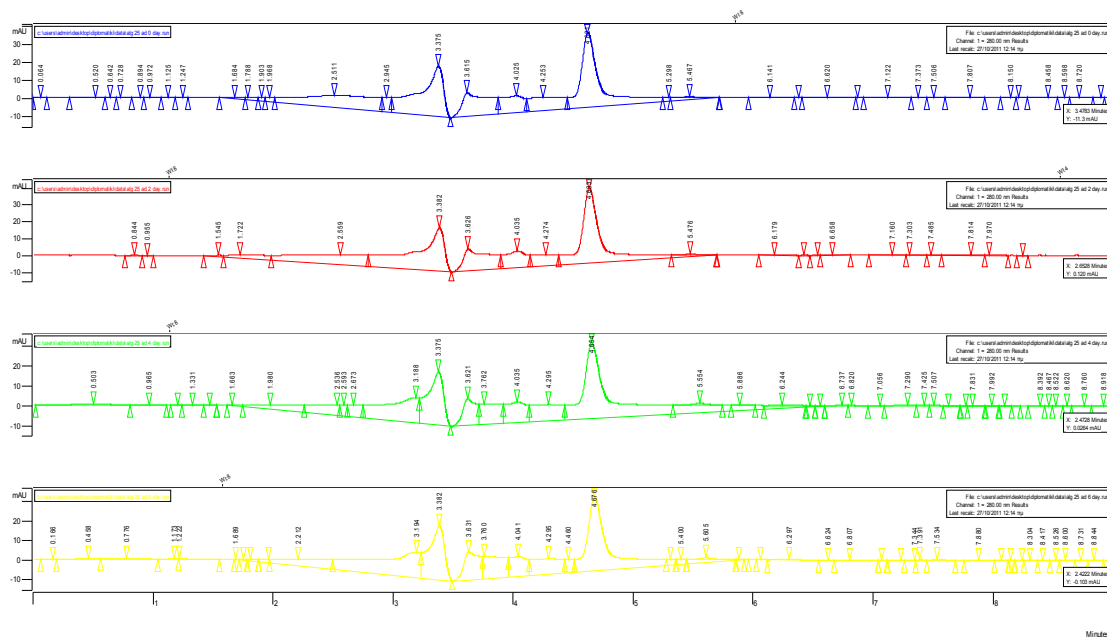
Έχουμε ήδη παραθέσει τα standard που δείχνουν την κορυφή της ρεσορσινόλης. Παραθέτουμε και τα blank δείγματα μας, τα οποία για μεγαλύτερη επαναληψιμότητα των μετρήσεων είναι διπλά:



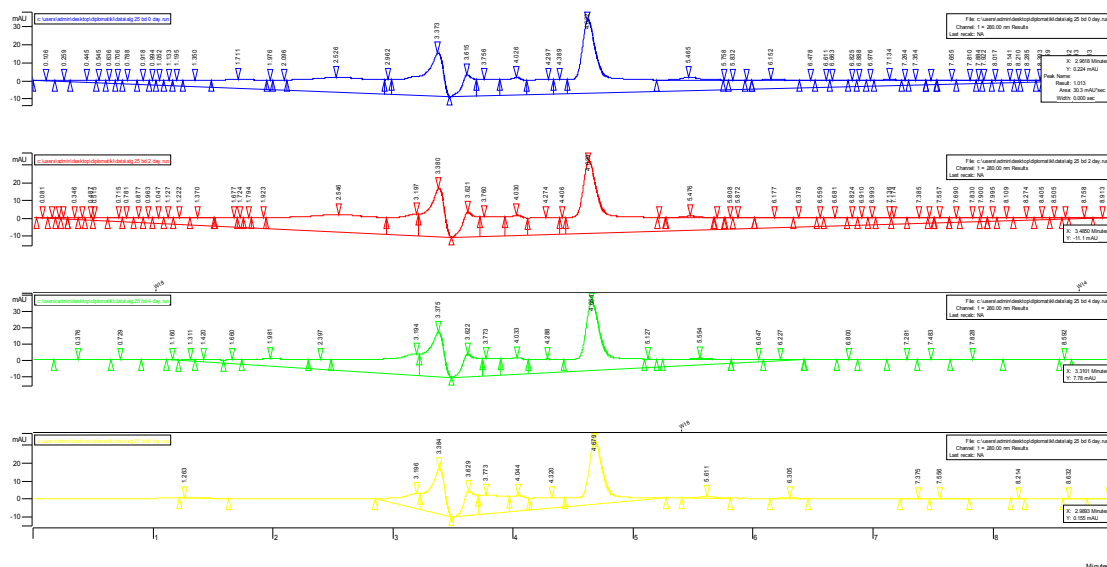
**Διάγραμμα 5.41** Blank του Nannocloropsis a στο σκοτάδι για τις ημέρες 0,2,4,6



Αυτό που φάνηκε στα παραπάνω διαγράμματα είναι ότι δεν υπήρξε ελάττωση στην συγκέντρωση των κορυφών που απεικονίζουν το μέσο ούτε στην κορυφή της ρεσορσινόλης. Αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς οι καλλιέργειες ήταν κλειστές και δεν αναμενόταν εξάτμιση. Σε παρόμοια συμπεράσματα είχαμε καταλήξει στα πειράματα σταθερότητας της ρεσορσινόλης.

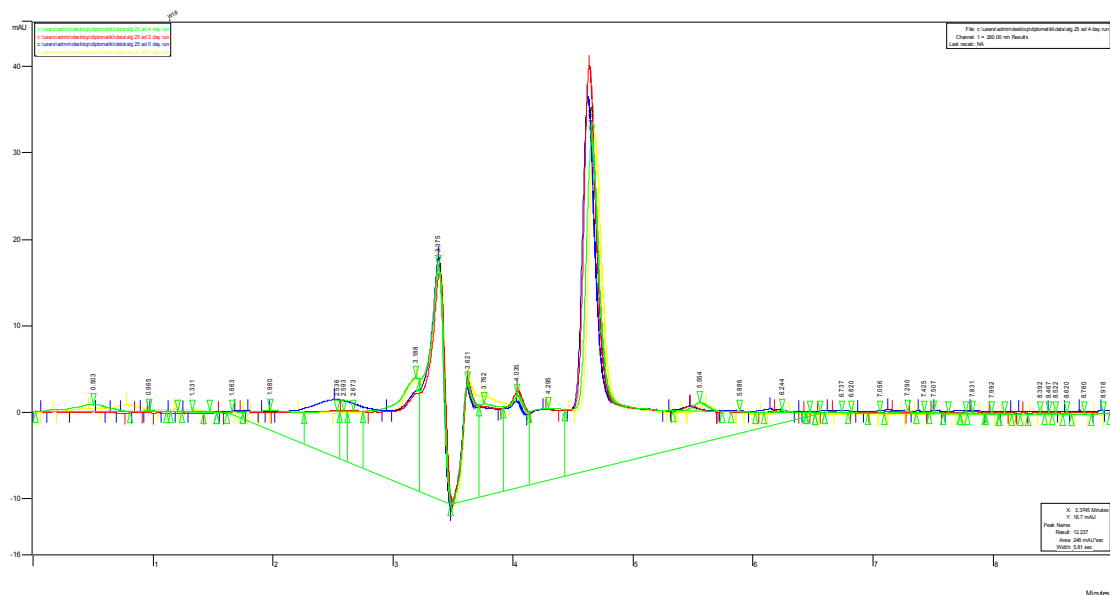


**Διάγραμμα 5.44** Nannocloropsis+25 ppm res. Δείγμα α στο σκοτάδι για τις ημέρες 0,2,4,6



**Διάγραμμα 5.45** Nannocloropsis+25 ppm res. Δείγμα b στο σκοτάδι για τις ημέρες 0,2,4,6

Η μπλε είναι η μέρα 0, η κόκκινη είναι η μέρα 2, η πράσινη είναι η μέρα 4 και η κίτρινη η 6 μέρα.



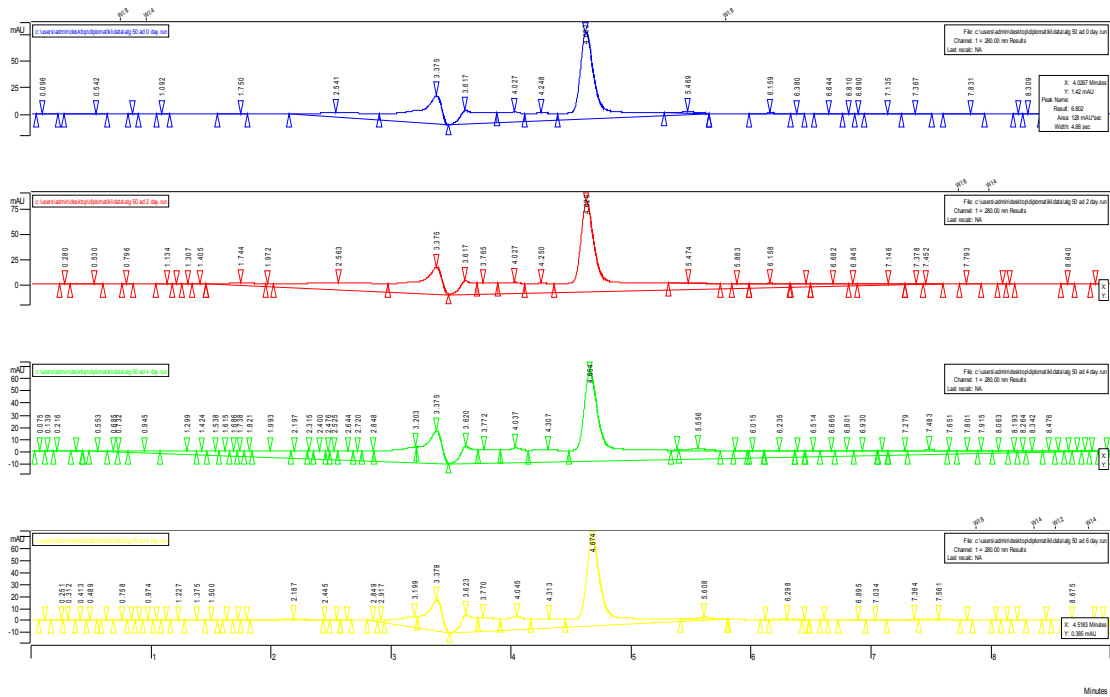
**Διάγραμμα 5.46** Κοινό διάγραμμα Nannochloropsis+25 ppm res για τις ημέρες 0,2,4,6. Δείγμα α στο σκοτάδι

Αυτό που παρατηρήθηκε στα παραπάνω διαγράμματα είναι τα εξής:

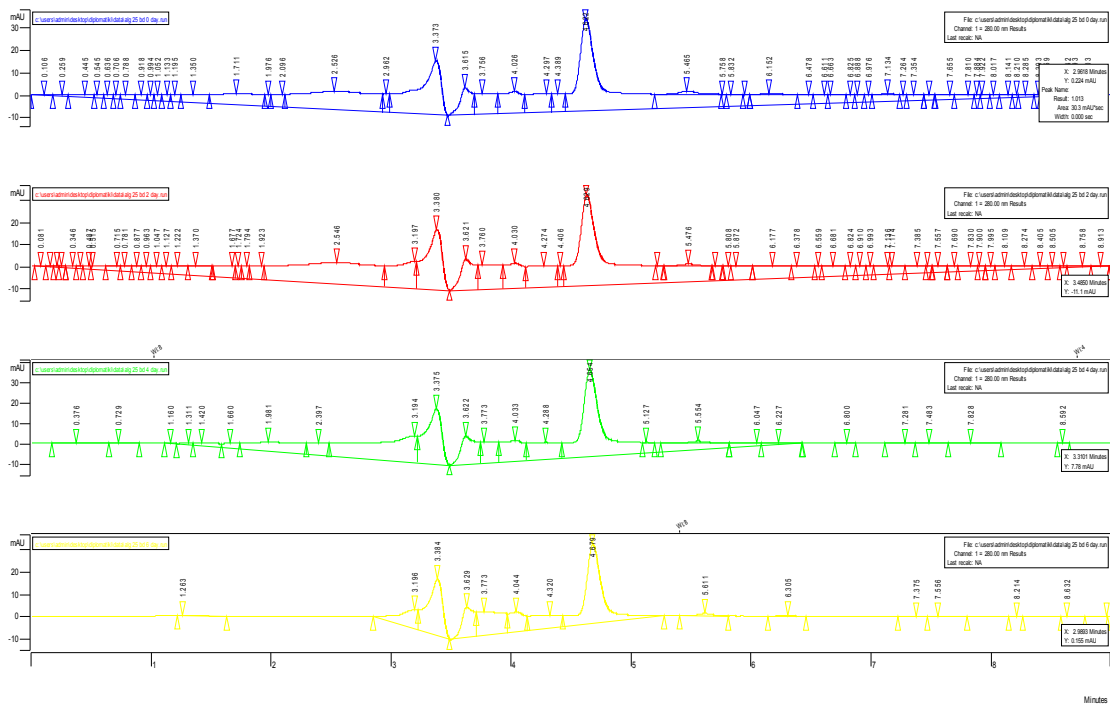
1. Δεν υπήρχε ελάττωση στην συγκέντρωση των κορυφών που απεικονίζουν το μέσο. Αυτό σε συνδυασμό με την καμπύλη ανάπτυξης που βρέθηκε μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα φύκη δεν αναπτύχθηκαν καλά σε αυτές τις συνθήκες.
2. Η κορυφή της ρεσορσινόλης ήταν μειωμένη με το πέρασμα 6 ημερών σε ποσοστό που υπολογίσαμε ίσο με 8%.

Επομένως το στέλεχος Nannochloropsis sp. δεν αναπτύχθηκε καλά υπό αυτές τις συνθήκες όμως παρόλα αυτά προτίμησε την κατανάλωση της ρεσορσινόλης από το μέσο το οποίο του δόθηκε.



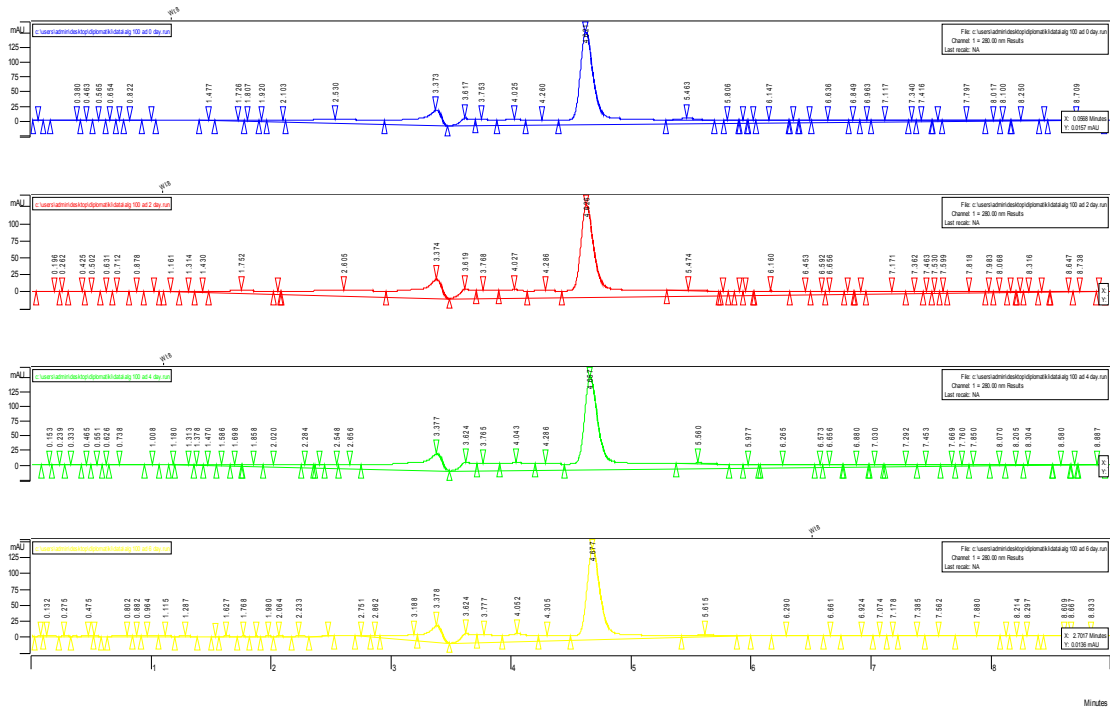


**Διάγραμμα 5.47** Nannocloropsis+50 ppm res. Δείγμα α στο σκοτάδι για τις ημέρες 0,2,4,6

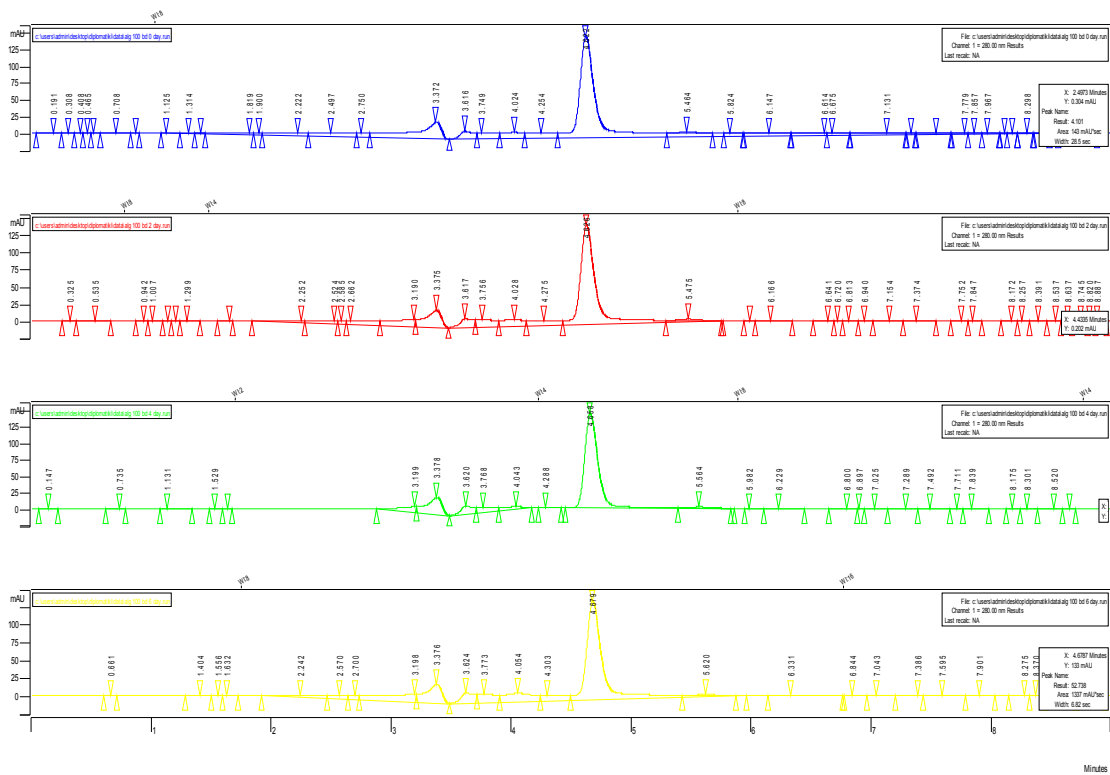


**Διάγραμμα 5.48** Nannocloropsis+50 ppm res. Δείγμα β στο σκοτάδι για τις ημέρες 0,2,4,6



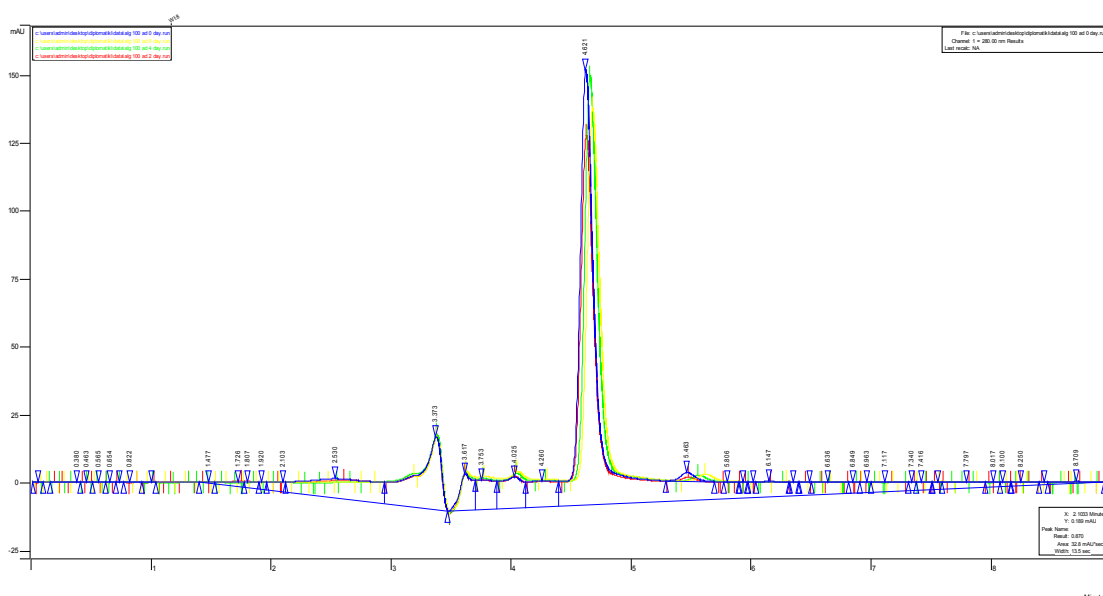


**Διάγραμμα 5.50** Nannocloropsis+100 ppm res. Δείγμα α στο σκοτάδι για τις ημέρες 0,2,4,6



**Διάγραμμα 5.51** Nannocloropsis+100 ppm res. Δείγμα β στο σκοτάδι για τις ημέρες 0,2,4,6

Η μπλε είναι η μέρα 0, η κόκκινη είναι η μέρα 2, η πράσινη είναι η μέρα 4 και η κίτρινη η 6 μέρα.



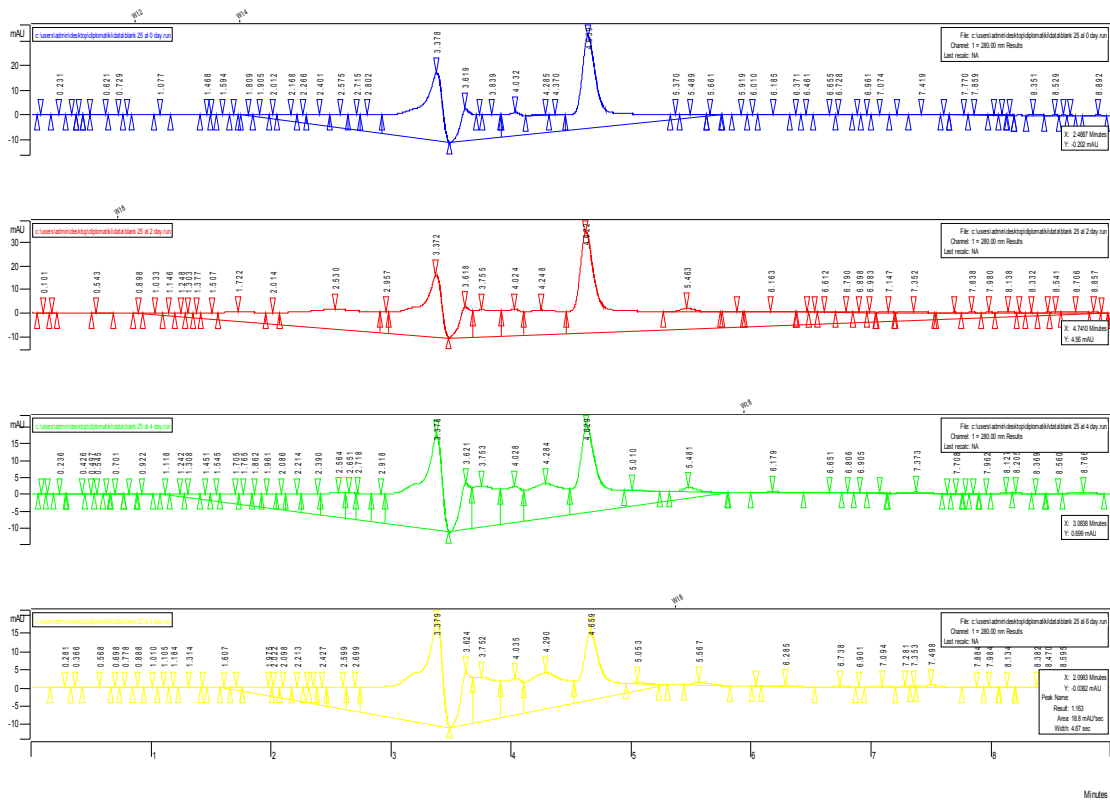
**Διάγραμμα 5.52** Κοινό διάγραμμα Nannochloropsis+100 ppm res για τις ημέρες 0,2,4,6. Δείγμα b στο σκοτάδι

Αυτό που παρατηρήθηκε στα παραπάνω διαγράμματα είναι τα εξής:

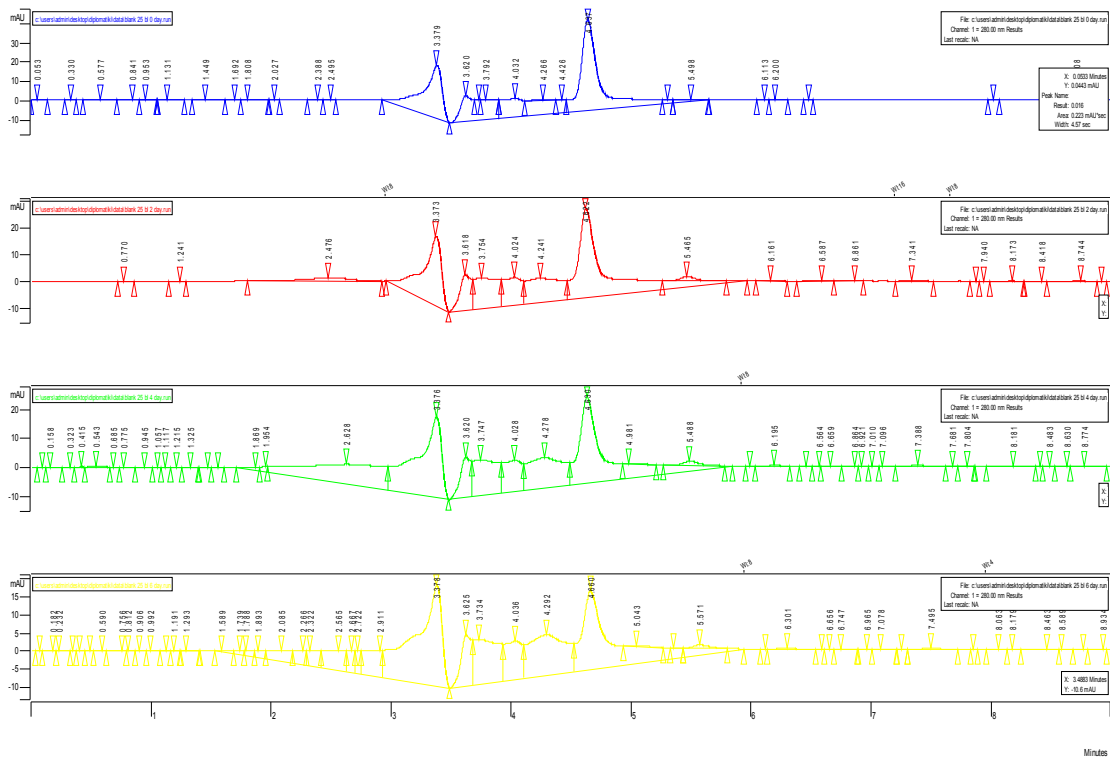
1. Δεν υπήρχε ελάττωση στην συγκέντρωση των κορυφών που απεικονίζουν το μέσο. Αυτό σε συνδυασμό με την καμπύλη ανάπτυξης που βρέθηκε μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα φύκη δεν αναπτύχθηκαν καλά σε αυτές τις συνθήκες.
2. Η κορυφή της ρεσορσινόλης ήταν μειωμένη με το πέρασμα 6 ημερών σε ποσοστό που υπολογίσαμε ίσο με 4%.

Επομένως το στέλεχος Nannochloropsis sp. δεν αναπτύχθηκε καλά υπό αυτές τις συνθήκες όμως παρόλα αυτά προτίμησε την κατανάλωση της ρεσορσινόλης από το μέσο το οποίο του δόθηκε, όμως τώρα το ποσοστό έπεσε σε πού χαμηλά επίπεδα.

Ακολουθούν τα αντίστοιχα διαγράμματα για τα φύκη που διατηρούνταν στο φώς.

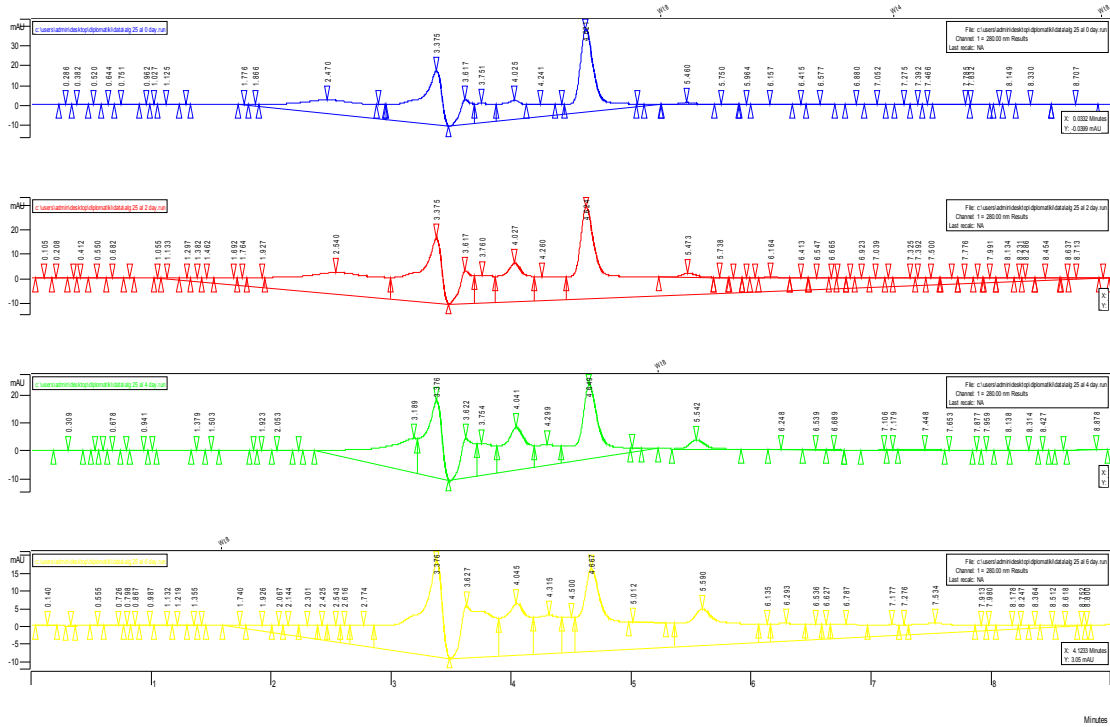


**Διάγραμμα 5.53** Blank του Nannocloropsis a στο φως για τις ημέρες 0,2,4,6

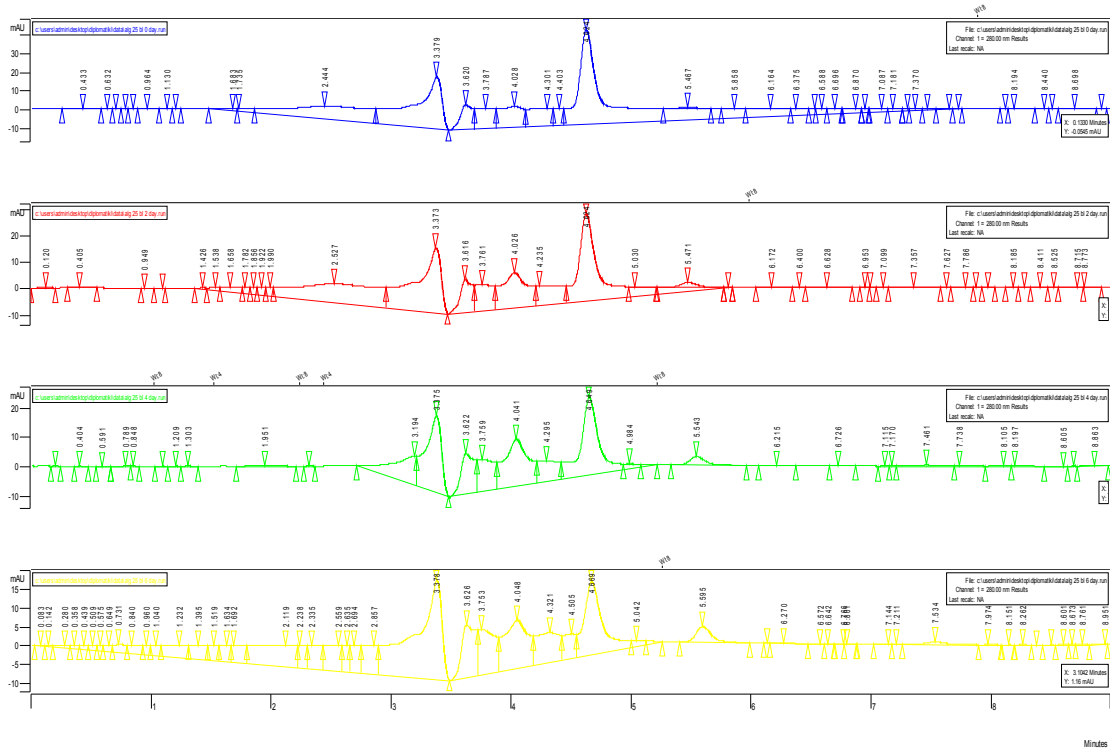


**Διάγραμμα 5.54** Blank του Nannocloropsis b στο φως για τις ημέρες 0,2,4,6



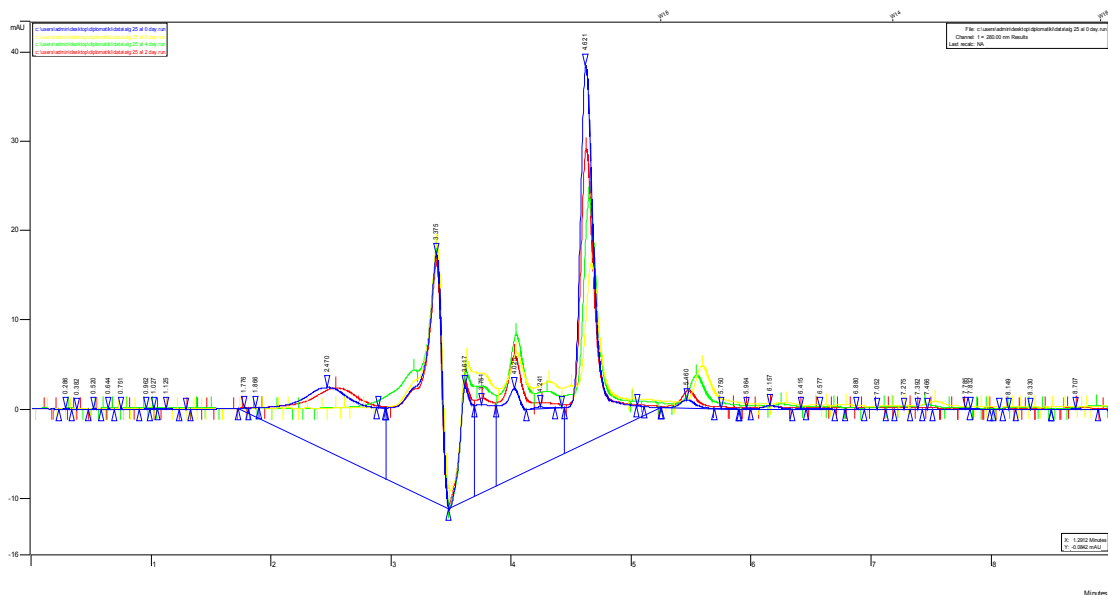


**Διάγραμμα 5.56** Nannocloropsis+25 ppm res. Δείγμα α στο φως για τις ημέρες 0,2,4,6



**Διάγραμμα 5.57** Nannocloropsis+25 ppm res. Δείγμα b στο φως για τις ημέρες 0,2,4,6

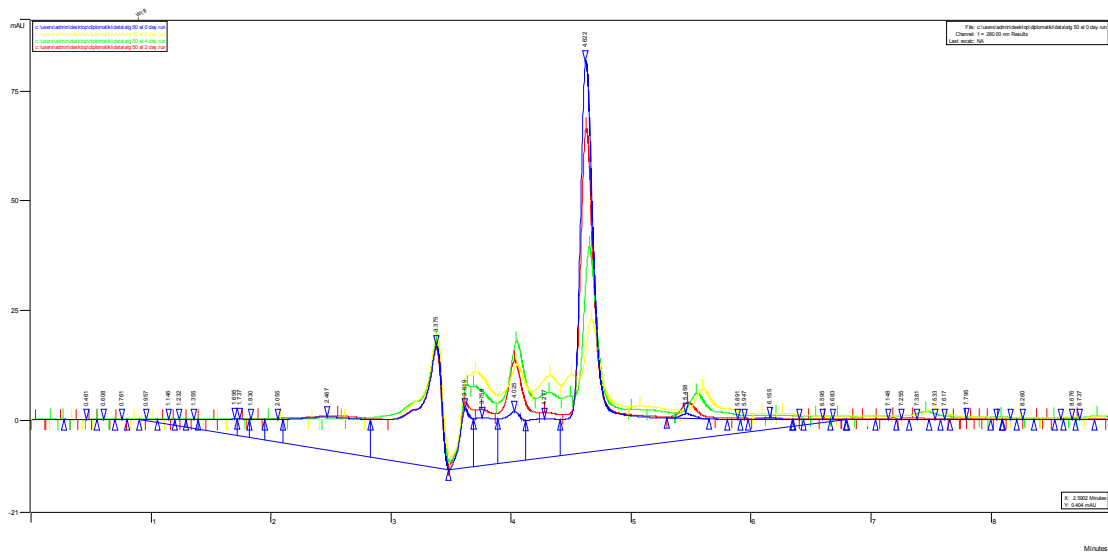
Η μπλε είναι η μέρα 0, η κόκκινη είναι η μέρα 2, η πράσινη είναι η μέρα 4 και η κίτρινη η 6 μέρα.

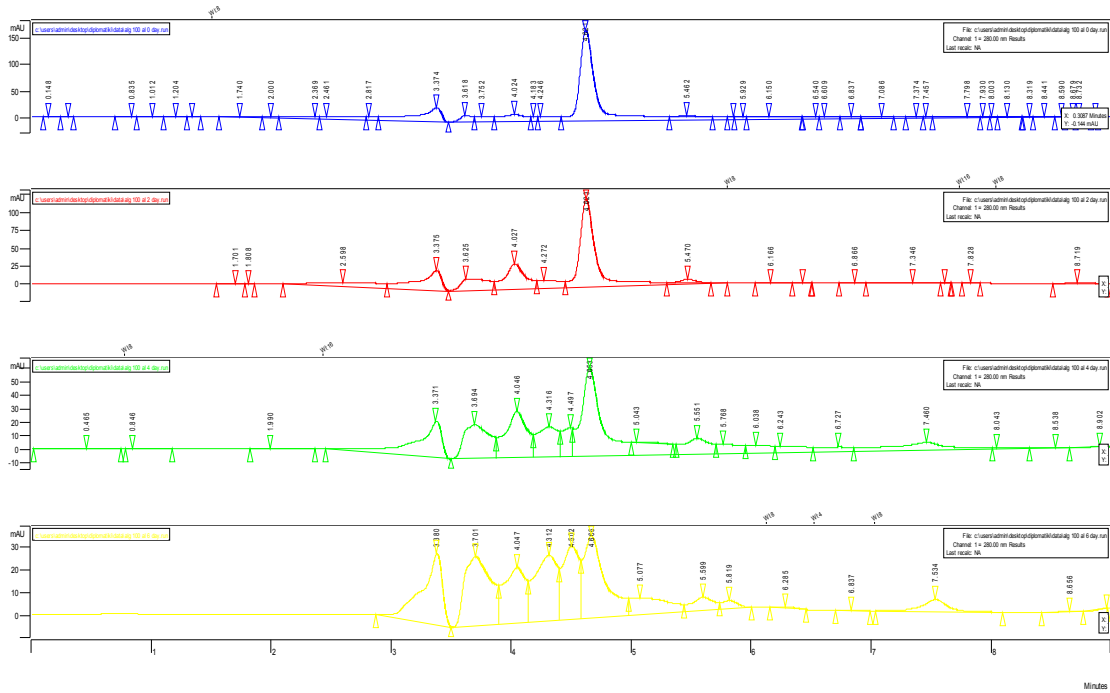




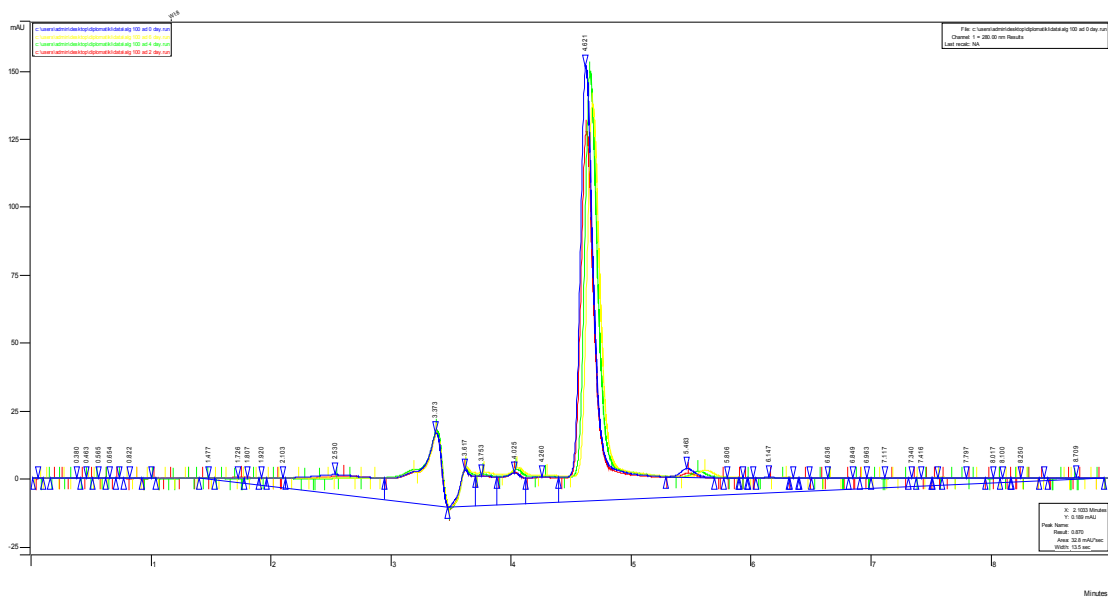


Η μπλε είναι η μέρα 0, η κόκκινη είναι η μέρα 2, η πράσινη είναι η μέρα 4 και η κίτρινη η 6 μέρα.





Η μπλε είναι η μέρα 0, η κόκκινη είναι η μέρα 2, η πράσινη είναι η μέρα 4 και η κίτρινη η 6 μέρα.



**Διάγραμμα 5.64** Κοινό διάγραμμα Nannochloropsis+100 ppm res για τις ημέρες 0,2,4,6. Δείγμα α στο φως

Αυτό που παρατηρήθηκε στα παραπάνω διαγράμματα είναι τα εξής:

1. Δεν υπήρχε ελάττωση στην συγκέντρωση των κορυφών που απεικονίζουν το μέσο.
2. Η κορυφή της ρεσορσινόλης ήταν μειωμένη με το πέρασμα 6 ημερών σε ποσοστό που υπολογίσαμε ίσο με 92%.

Επομένως το στέλεχος Nannochloropsis sp. αναπτύχθηκε καλά υπό αυτές τις συνθήκες και προτίμησε την κατανάλωση της ρεσορσινόλης από το μέσο το οποίο του δόθηκε και τώρα το ποσοστό ανέβηκε σε ακόμα μεγαλύτερα επίπεδα.

#### **5.4 Τελικά Συμπεράσματα**

✚ Όλοι οι μικροοργανισμοί βρέθηκαν ικανοί να μεταβολίσουν την ρεσορσινόλη σε μικρές και μεγάλες συγκεντρώσεις. Οι ακτίνομύκητες σε μεγαλύτερα ποσοστά από ότι το στέλεχος *Nannochloropsis* sp..

✚ Η ρεσορσινόλη δεν ήταν τοξική για κανέναν μικροοργανισμό αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φάνηκε να παρεμποδίζει την ανάπτυξη τους.

✚ Ο MM001 μεταβολίζει καλύτερα την ουσία. Για συγκέντρωση 200 ppm, σε 7 μέρες το ποσοστό μείωσης ήταν 74%. Ο MM002 για την ίδια συγκέντρωση και τις ίδιες ημέρες (σε σχέση με την καμπύλη ανάπτυξης του) πέτυχε ποσοστά μείωσης 50%. Ακόμα σε μικρότερη συγκέντρωση (50 ppm) όπου ο μικροοργανισμός είχε καλύτερη ανάπτυξη τα ποσοστά ήταν και πάλι μικρότερα. Την 7<sup>η</sup> ημέρα ο MM002 είχε πετύχει μετατροπή 25%. Για συγκέντρωση 100 ppm το ποσοστό την 7<sup>η</sup> ημέρα ήταν 61% (<74%).

✚ Το στέλεχος *Nannochloropsis* sp. μελετήθηκε σε συνθήκες σκοταδιού αλλά και φωτός, όπου και είχε καλύτερη ανάπτυξη. Για συγκεντρώσεις 25, 50 και 100 ppm ρεσορσινόλης τα ποσοστά μείωσης στο σκοτάδι μετά από 6 ημέρες καλλιέργειας ήταν 8, 12, και 4 % αντίστοιχα. Τα ποσοστά αυτά θεωρούνται πολύ μικρά.

✚ Τα αντίστοιχα ποσοστά στο φως ήταν 61, 82 και 92%. Τα ποσοστά από αυτά φαίνονται πολύ μεγάλα αλλά διαπιστώθηκε από τα τυφλά, ότι στις συγκεκριμένες συνθήκες η ρεσορσινόλη διασπάται και από το πολύ υψηλό φως. Το ποσοστό αυτό για 6 ημέρες υπολογίστηκε στο 57%. Επομένως το φως έδρασε συνεργατικά με τον *Nannochloropsis* για τη διάσπαση της ρεσορσινόλης και δεν μπορούμε να μιλήσουμε με απόλυτη σιγουριά με ακριβέστερα νούμερα.

✚ Για την πληρέστερη αξιολόγηση των δυνατοτήτων βιοαποικοδόμησης ουσιών

από φύκη, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[1] Dagley, S. (1978) Microbial catabolism, the carbon cycle and environmental pollution. *Naturwissenschaften* 65, 85^95.

[2] Middlehoven, W.J. (1993) Catabolism of benzene compounds by ascomycetous and basidiomycetous yeasts and yeast-like fungi. *Antonie van Leeuwenhoek* 63, 125^144.

[3] Semple, K.T. and Cain, R.B. (1995) Metabolism of phenols by *Ochromonas danica*. *FEMS Microbiol. Lett.* 133, 253^257.

[4] Kobayashi, H. and Rittman, B.E. (1982) Microbial removal of hazardous organic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 16,170A^183A.

[5] «Removal of low molecular weight phenols from olive oil mill wastewater using microalgae» Gabriele Pinto, Antonino Pollio, Lucio Previtiera, Maria Stanzione & Fabio Temussi Dipartimento di Biologia Vegetale, Universit`a Federico II, Via Foria 223, I-80139 Napoli, Italy

[6] «Biodegradation: Webster's Timeline History», Icon Group International, 2007

[7] Schleyer, Paul von Ragué (2001). "Introduction: Aromaticity". *Chemical Reviews* 101 (5): 1115. [8]A. T. Balaban, P. v. R. Schleyer and H. S. Rzepa (2005). "Crocker, Not Armit and Robinson, Begat the Six Aromatic Electrons".

[9] Schleyer, Paul von Ragué (2005). "Introduction: DelocalizationPi and Sigma". *Chemical Reviews* 105: 3433

[10] Resorcinol Book by Drs S. Hahn, J. Kielhorn, J. Koppenhöfer, A. Wibbertmann, and I.Mangelsdorf, Fraunhofer Institute of Toxicology and Experimental Medicine,

Hanover, Germany

[11] Bioactive Marine Natural Products, D.S. Bhakuni, D.S. Rawat

[12] Valuable products from biotechnology of microalgae, Otto Pulz, Wolfgang Gross, April 2004

[13] Γεώργιος Χατζηπαναγής. Διπλωματική Εργασία «Αριστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας για την παραγωγή βιοντήζελ από το θαλάσιο Μικροφύκος *Nannochloropsi* sp.

[14] Antia, N.J. & Cheng, J.Y. (1982). The keto-carotenoids of two marine coccoid members of the Eustigmatophyceae. *British Phycological Journal* 17: 39-50.

[15] Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, Richmond A. editor. Blackwell, 2004

[16] Andersen, R. A., R. W. Brett, et al. (1998). "Phylogeny of the Eustigmatophyceae based upon 18s rDNA, with emphasis on *Nannochloropsis*." *Protist* 149(1): 61-74.

[17] Assaf Sukenik, Y. C. T. B. (1989). "Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp." *Journal of Phycology* 25(4): 686-692.

[18] Hibberd (1981). "Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (Synonym Xanthophyceae)." *Botanical journal of the Linnean society* 82: 93-119.

[19] Fawley (2007). "Observations on the Diversity and Ecology of Freshwater *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), with Descriptions of New Taxa." *Protist* 158: 325-336.



- [20] Ghanem N.B., Sabry S.A., Ei-Sherif Z.M. and El-Ela G.A.A. 2000. Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 46: 105–111.
- [21] Waksman, S. A. (1961) *The Actinomycetes*, Vol. II, The Williams and Wilkins Co., Baltimore
- [22] Sütfield , R. 1998, Polymerization of Resorcinol by an Cryptophycean Exoenzyme in honour of Professor G. H. Neil Towers 75th birthday , *Phytochemistry Volume 49*, Issue 2, , P. 451-459
- [23]. A. Tschsch and B. Schink, Fermentative degradation of resorcinol and resorcyclic acids, *Archs Microbiol.* 143 (1985), pp. 52–59
- [24]. Water, Air & Soil Pollution, 2003, 144: 419-440. Ζανάκη , 1996: "Έλεγχος Ποιότητας Νερού" Εκδ. "ΙΩΝ" Αθήνα, ISBN 960 -405-501-1
- [25]. Κάγκαλου Ι., 1997: "Σημειώσεις Λιμνολογίας" ΤΕΙ Ηπείρου, Ηγουμενίτσα Καράταγλης 1992: Φυτών" ART TEXT, ISBN 960-312-009-X
- [26]. Κουσουρήs Θ. , 1998: "Μονογραφίες Θαλάσσιων Επιστημών - Το Νερό στη Φύση, Ανάπτυξη, Προστασία Περιβάλλοντος" Εθνικό Θαλάσσιων Ερευνών, Αθήνα
- [27]. «Κυριότερες μέθοδοι Απορρύπανσης» Χριστούλας 96', Αντωνόπουλος 01'
- [28]. Lindsay, S. ; Kealey, D. (1987). High performance liquid chromatography. Wiley.
- [29]. V. Kleknera; N. Kosaric. Degradation of phenols by algae. Biochemical Engineering, The University of Western Ontario, London, Ontario, Canada

- [29]. De La Noue J. and De Pauw N., The potential of microalgal biotechnology: A review of production and uses of microalgae. *Biotechnol. Adv.*, 6, 725-770 (1988).
- [30]. Storck S.L. and Rittmann B.E., Using attached phototrophs to detoxify hazardous organic compounds. AIChE National Meeting, Boston (1986).
- [31]. Wright S.J.L., Interaction of pesticides with micro-algae. In: *Pesticide Microbiology*, Hill I.R. and Wright S.J.L. (eds.), Acad. Press, N.Y. (1978).
- [32]. Mouchet P., Algae reactions to mineral and organic micropollutants, ecological consequences, and possibilities for industrial-scale application: A review. *Water Res.*, 20, 399-412 (1986).
- [33]. Ellis B.E., Degradation of phenolic compounds by fresh-water algae. *Plant Sci. Lett.*, 8, 213-216 (1977).
- [34]. Cerniglia C.E. and Baalen C.V. and Gibson D.T., Metabolism of naphthalene by the cyanobacterium *Oscillatoria* sp. strain JCM. *J. Gen. Microbiol.*, 116, 485-494 (1980).
- [35]. Cerniglia C.E. and Baalen C.V. and Gibson D.T., Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae. *J. Gen. Microbiol.*, 116, 495-500 (1980).
- [36]. Reineke W., Microbial degradation of halogenated aromatic compounds. In: *Microbial Degradation of Organic Compounds*. Gibson D.T. (ed.), Dekker M., N.Y. (1984).
- [37]. Shigeoka T., Sato Y., Takeda Y., Yoshida K. and Yamauchi P., Acute toxicity of chlorophenols to green algae, *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella vulgaris*, and quantitative structure-activity relationships. *Environ. Toxic. Chem.*, 7, 847-854 (1988).

- [38]. Microalgae for biodiesel production and other applications, Teresa M. Mata a, Antonio A. Martins a, Nidia. S. Caetano b, July 2009
- [39]. Valuable products from biotechnology of microalgae, Otto Pulz, Wolfgang Gross, April 2004
- [40]. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, Liam Brennan a, Philip Owende a, b, October 2009
- [41]. A perspective on the Biotechnological Potential of microalgae, R.Raja a,b, S. Hemaiswarya b, N. Ashok Kumar a,c, S. Sridhar a,d, R. Rengasamy a, May 2008
- [42] Practicle High Performance Liquid Chromatography, Student Manua l/Agilent Technologies/, Manual Part Number H5930A-90000, January 2001
- [43] The Columbia Encyclopedia, Sixth Edition Copyright© 2004, Columbia University Press.
- [44] Kofler A (1943) Über die stabilen Modifikationen organischer Stoffe, die bei der üblichen Darstellung in einer total oder partiell instabilen Form kristallisieren. *Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, 281:8 – 22.
- [45] Schmiedel KW, Decker D (2000) Resorcinol. In: *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. Weinheim, Wiley - VCH Verlagsgessellschaft, pp. 1–14.
- [46] Kirk-Othmer (1981) Hydroquinone, resorcinol, and catechol. In: *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*, 3rd ed. Vol. 13. New York, NY, John Wiley & Sons, pp. 39–69.

[47] Health Council of the Netherlands (2004) *Resorcinol (CAS No. 108-46-3). Health-based reassessment of administrative occupational exposure limits*. The Hague, Health Council of the Netherlands, Committee on Updating of Occupational Exposure Limits, pp. 1–28 (No. 2000/15OSH/139)

[48] Dressler H (1994) *Resorcinol, its uses and derivatives*. New York, NY, Plenum Press.

[49] Curtis M, Ward C (1981) Aquatic toxicity of forty industrial chemicals: testing in support of hazardous substance spill prevention regulation. *Journal of Hydrology*, 51:359–367.

[50] APHA, AWWA, WPCA (1976) *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 14th ed. Washington, DC, American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation, 1193 pp.

[51] Sütfeld R, Petereit F, Nahrstedt A (1996) Resorcinol in exudates of *Nuphar lutea*. *Journal of Chemical Ecology*, 22(12): 2221– 2231.

[52] Cooksey RC, Gaitan E, Lindsay RH, Hill HB, Kelly K (1985) Humic substances, a possible source of environmental goitrogens. *Organic Geochemistry*, 8(1):77–80.

[53] Chou C-H, Patrick ZA (1976) Identification and phytotoxic activity of compounds produced during decomposition of corn and rye residues in soil. *Journal of Chemical Ecology*, 2(3):369– 387.

[54] INDSPEC (2004) Robust summaries & test plans: Resorcinol. Submitted by Huntingdon Life Sciences on behalf of INDSPEC Chemical Corporation, Pittsburgh, PA. Washington, DC, United States Environmental Protection Agency, High Production Volume Challenge Program.

[55] CEH (2001) Chemical economics handbook: Resorcinol — product review. Menlo Park, CA, SRI International, pp. 1–58 (691.7000A).

[56] Karam PG (1993) 50% resorcinol peel. *International Journal of Dermatology*, 32(8):569–574.

[57] Herbes SE, Beauchamp JJ (1977) Toxic interaction of mixtures of two coal conversion effluent components (resorcinol and 6- methylquinoline) to *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 17(1):25–32.

[58] Hernández-Pérez E (1997) Resorcinol peel as a part of a facial rejuvenation program. *American Journal of Cosmetic Surgery*, 14:35–40.

[59] Hernández-Pérez E (2002) The versatile golden peel: when less is more. *International Journal of Cosmetic Surgery and Aesthetic Dermatology*, 4(1):27–32.

[60] Hernández-Pérez E, Carpio E (1995) Resorcinol peels: gross and microscopic study. *American Journal of Cosmetic Surgery*, 12:337–340. Hernández-Pérez E, Jáurez-Arce V (2000) Gross and microscopic findings with a combination of Jessner solution plus 53% resorcinol paste in chemical peels. *American Journal of Cosmetic Surgery*, 17:85–89.

[61] Bachet J, Guilmet D (1999) The use of biological glue in aortic surgery. *Cardiology Clinics*, 17(4):779–796.

[62] Kazui T, Washiyama N, Bashar AH, Terada H, Suzuki K, Yamashita K, Takinami M (2001) Role of biologic glue repair of proximal aortic dissection in the development of early and midterm redissection of the aortic root. *Annals of Thoracic Surgery*, 72(2):509–514.

[63] von Oppell UO, Karani Z, Brooks A, Brink J (2002) Dissected aortic sinuses repaired with gelatin–resorcin–formaldehyde (GRF) glue are not stable on follow up. *Journal of Heart Valve Disease*, 11(2):249–257.

[64] BUA (1993) Resorcinol (1,3-Dihydroxybenzol). Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe; Stuttgart, S. Hirzel Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, pp. 1–80 (BUA Report 99).

[65] Perbet G, Filiol C, Boule P, Lemaire J (1979) Photolyse et photo-oxydation des diphenols en solution aqueuse diluée. *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, 76:89–96.

[66] Fh-ITEM (2004) *Estimation of environmental/chemical properties for 1,3-benzenediol (CAS: 108-46-3), Epi Suite Version 3.12*. Hanover, Fraunhofer Institute of Toxicology and Experimental Medicine, 10 pp.

[67] Mill T, Mabey W (1985) Photochemical transformations. In: Neely W, Blau G, eds. *Environmental exposure from chemicals. Vol. 1*. Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 175–216.

[68] Shen YS, Lin CC (2003) The effects of pH on the decomposition of hydrophenols in aqueous solutions by ultraviolet direct photolysis and the ultraviolet–hydrogen peroxide process. *WaterEnvironment Research*, 75(1):54–60.

[69] Hoechst AG (1992) *Bericht über die biologische Abbaubarkeit und weitere ökologische Daten von Resorcin*. Frankfurt am Main, Hoechst AG, 28 August 1992.

[70] Pitter P (1976) Determination of biological degradability of organic substances. *Water Research*, 10:231–235.

[71] Wellens H (1990) Zur biologischen Abbaubarkeit mono- und disubstituierter Benzolderivate. Zeitschrift für Wasser- und Abwasserforschung, 23:85–98.

[72] Gubser H (1969) Probleme bei der Reinigung von Chemieabody weightässern. Gas Wasser Abwasser, 49:175–181.

[73] Tschsch A, Schink B (1985) Fermentation degradation of resorcinol and resorcylic acid. Archives of Microbiology, 143(1):52–59.

[74] Latkar M, Chakrabarti T (1994) Resorcinol, catechol and hydroquinone biodegradation in mono and binary substrate matrices in upflow anaerobic fixed-film fixed-bed reactors. Water Research, 28(3):599–607.

[75] Chapman PJ, Ribbons DW (1976) Metabolism of resorcinolic compounds by bacteria: alternative pathways for resorcinol catabolism in *Pseudomonas putida*. Journal of Bacteriology, 125(3):985–998.

[76] Gaal A, Neujahr HY (1979) Metabolism of phenol and resorcinol in *Trichosporon cutaneum*. Journal of Bacteriology, 137(1):13–21.

[77] Ingle AO, Purohit HJ, Dagainawala HF (1985) Studies on the biodegradation of resorcinol by indigenously isolated bacteria, mold and yeast. Journal of Environmental Biology, 6(1):45–55.

[78] Groseclose EE, Ribbons DW (1981) Metabolism of resorcinolic compounds by bacteria: new pathway for resorcinol catabolism in *Azotobacter vinelandii*. Journal of Bacteriology, 146(2):460–466.

[79] Heider J, Fuchs G (1997) Anaerobic metabolism of aromatic compounds. European Journal of Biochemistry, 243(3):577–596.

[80] BUA (1993) Resorcinol (1,3-Dihydroxybenzol). Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe; Stuttgart, S. Hirzel Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, pp. 1–80 (BUA Report 99).

[81] INDSPEC (2004) Robust summaries & test plans: Resorcinol. Submitted by Huntingdon Life Sciences on behalf of INDSPEC Chemical Corporation, Pittsburgh, PA. Washington, DC, United States Environmental Protection Agency, High Production Volume Challenge Program.

[82] Stauber JL, Florence TM (1987) Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Marine Biology*, 94:511– 519. [83] Kramer C-R, Trümper L (1986) Quantitative Struktur-Aktivitäts- Beziehungen für die Hemmung des autotrophen Wachstums synchroner *Chlorella vulgaris*-Suspensionen durch monosubstituierte Phenole. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 181:81–89.

[84] Bringmann G, Kühn R (1960) Vergleichende toxikologische Befunde an Wasser-Bakterien. *Gesundheits-Ingenieur*, 81:337 – 339.

[85] Stom DI, Roth R (1981) Some effects of polyphenols on aquatic plants: I. Toxicity of phenols in aquatic plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 27:332–337.

[86] Schultz TW (1987) The use of the ionization constant (pKa) in selecting models of toxicity in phenols. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 14:178–183.

[87] Soni G, Bhatia I (1980) Toxicity of phenolics and related compounds to *Fusarium oxasporium* Schlecht. and effect of pH on their toxicity. *Indian Journal of Agricultural Science*, 50(10):772– 777.

[88] Lee K, Lee CG. Effects of light/dark cycles on wastewater treatments by microalgae *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2001;6:194-9.



[89] Li Y, Wang B, Wu N, Lan CQ. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid production of *Neochloris oleoavundans*. *Applied microbiology and biotechnology* 2008;81(4):629-36

[90] Richmond A *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Ltd; 2004.

[91] Moheimani NR. The culture of Coccolithophorid Algae for carbon dioxide bioremediation. PhD thesis. Murdoch University; 2005.

[92] Kaewpintong K. Cultivation of *Haematococcus pluviaris* in Airlift Bioreactor. Master thesis in Chemical Engineering. Department of Chemical Engineering, Chulalongkorn University; 2004.

[93] Chojnacka K, Marquez-Rocha FJ, Kinetic. Stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology* 2004;3(1): 21-34

[94] Christi Y, Pneumatically agitated bioreactors in industrial and environmental bioprocessing: hydrodynamic, hydraulics and transport phenomena, *Appl. Mech. Rev* 1998;51:33-112.

[95] Mata Teresa M., Martins Antonio A., Caetano Nidia. S., *Microalgae for biodiesel production and applications: A review for renewable and sustainable energy* 14,2010;217-232

[96] Capasso, R., A.I. Izzo, F. Capasso, G. Romussi, A. Bisio and N. Mascolo, 2004. A diterpenoid from *Salvia cinnabarina* inhibits mouse intestinal motility in vivo. *Planta Med.*, 70: 375-377.

[97] Ramos-Cormenzana A, Monteoliva-Sanchez M, Lopez MJ (1995) Bioremediation of alpechin. *Int. Biodeter. Biodegr.* 249–268.

- [98] Capasso R, Evidente A, Schivo L, Orru G, Marcialis MA, Cristinzio R (1995) Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 393–398.
- [99] Tarlan E, Dilek FB, Yetis U (2002) Effectiveness of algae in the treatment of a wood-based pulp and paper industry wastewater. *Bioresour. Technol.* 84: 1–5.
- [100] Boyd SA, Shelton DR, Berry D, Tiedje JM (1983) Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge. *Applied Environmental Microbiology*, 46:50–54.
- [101] Boule P, Guyon C, Lemaire J (1982) Photochemistry and environment IV — Photochemical behaviour of monochlorophenols in dilute aqueous solution. *Chemosphere*, 11(12):1179–1188.
- [102] Leszczynska D, Kowal AL (1980) Destruction of selected phenol compounds with ozone. *Environment Protection Engineering*, 6(4):465–480.







introduced by

DNA

organisms

Biotechnology

also

proteins and

also

genetic

organisms

diseases

bacteria  
alter

gene  
clone

genetically

products