

## ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ: ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Γιώργος Μάρκου<sup>1</sup>, Ιωάννης Τζοβενής<sup>2</sup>, Ηλίας Νερατζής<sup>3</sup>

1. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής, Ιερά οδός 75, 11855 Αθήνα. E-mail: markoug@aua.gr
2. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Οικολογίας και Ταξινόμησης, Πανεπιστημιούπολη Αθηνών, 15784 Ζωγράφου. E-mail: itzoveni@eexi.gr
3. Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθηνών, Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής, Αγίου Σπυρίδωνος, 12210 Αιγάλεω. E-mail: enerat@teiath.gr

### Περίληψη

Τα μικροφύκη αποτελούν μία κατηγορία οργανισμών στην οποία στρέφεται το ενδιαφέρον της βιομηχανίας διεθνώς τα τελευταία χρόνια για παραγωγή νέων προϊόντων. Η βιομάζα των μικροφυκών χρησιμοποιείται εδώ και μερικές δεκαετίες στις υδατοκαλλιέργειες ως ζωντανή τροφή αλλά και στην παραγωγή προϊόντων διατροφής, είτε αυτούσια είτε μετά από επεξεργασία. Η καλλιέργεια ποικίλει ανάλογα με το τελικό προϊόν και γενικά δεν θεωρείται απλή. Απαιτείται συνδυασμός της τεχνολογίας φυτικής παραγωγής με αυτήν της μικροβιακής τεχνολογίας δεδομένης της φύσης των οργανισμών οι οποίοι είναι μικροσκοπικοί (κατά κανόνα μονοκύτταροι) υδρόβιοι, και φωτοσυνθετικοί. Παρά τα μεγάλα προβλήματα που υφίστανται στην παραγωγή και την προ-επεξεργασία (συγκομιδή, ξήρανση, κτλ) οι προοπτικές είναι ενθαρρυντικές. Την τελευταία δεκαετία μεγάλα ποσά επενδύονται με γεωμετρική πρόοδο στην έρευνα των μικροφυκών, κυρίως για την παραγωγή βιοκαυσίμων σε διάφορες χώρες και ιδίως στις ΗΠΑ.

### 1. Εισαγωγή

Τα φύκη (λατινικά *alga*, πλ. *algae*) είναι μια μεγάλη πολυφυλετική κατηγορία μονοκύτταρων ή πολυκύτταρων οργανισμών με σχήματα και μεγέθη που ποικίλουν σημαντικά. Ο όρος «φύκη» περιλαμβάνει δύο μεγάλες κύριες μορφολογικές κατηγορίες: τα μακροφύκη (*macroalgae* ή κοινώς *seaweeds*), συνήθως θαλάσσια είδη, και τα μικροφύκη (*microalgae*). Το κριτήριο της διάκρισης μεταξύ των δύο αυτών κατηγοριών είναι μόνο το μέγεθος. Τα μακροφύκη έχουν μήκος μερικών εκατοστών, το οποίο σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να φτάσει και πολλά μέτρα (50-70) όπως στα γιγάντια Φαιοφύκη (καφέ φύκη, *kelp*). Τουναντίον, τα μικροφύκη έχουν μήκος από μερικά μικρόμετρα (συνήθως 0.2-50  $\mu\text{m}$  τα μονοκύτταρα μέχρι 100-200  $\mu\text{m}$  στις περιπτώσεις των νηματωδών πολυκύτταρων σχηματισμών όπως το κυανοβακτήριο *Arthrospira (Spirulina) platensis*) έως κάποιες εκατοντάδες (έως και 1-2.000  $\mu\text{m}$  σε ορισμένα διάτομα). Στην τρέχουσα ταξινόμησή τους στον όρο «φύκη» συμπεριλαμβάνονται μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι  $\text{O}_2$ -γόνοι φωτοσυνθέτοντες αλλά και μη, ευκαρυωτικοί οργανισμοί, εξαιρουμένων όμως των ανώτερων φυτών (Barsanti and Gualtieri, 2006). Τα τελευταία εξελίχθηκαν από μεγάλα πράσινα φύκη (Χλωρόφυτα) για την ζωή στην χέρσο (van den Hoek, et al., 1997).

Τα κυανοβακτήρια, στα οποία ανήκει και η *Arthrospira (Spirulina) platensis*, παρόλο που είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί, σε αρκετές περιπτώσεις θεωρούνται ότι ανήκουν στα μικροφύκη επειδή είναι φωτοσυνθέτοντες οργανισμοί (Brodie and Lewis, 2007). Στην παρούσα μελέτη τα κυανοβακτήρια θα θεωρούνται ότι ανήκουν στα

μικροφύκη και σε όσα σημεία θα χρειαστεί να γίνει διαχωρισμός θα γίνεται με βάση τον όρο προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά μικροφύκη. Η βιολογία, η φυσιολογία και η οικολογία των μικροφυκών διαφέρουν ανάλογα με την ταξινόμηση του μικροφύκου. Οι βασικότερες ομάδες μικροφυκών (φύλα ή διαιρέσεις) είναι τα Χλωροφύκη (Chlorophyta), τα Πρασινοφύκη (Prasinophytes), τα Ετεροκοντόφυτα (Heterokontophyta) με κύριες υποδιαιρέσεις τα Χρυσοφύκη (Chrysophyceae), τα Διάτομα (Bacillariophyceae ή Diatomeae) τα Ευστιγματοφύκη (Eustigmatophyceae) και τα Ραφιδοφύκη (Raphidophytes), τα Απτόφυτα (Haptophytes, Prymnesiophyceae), τα Κρυπτοφύκη (Cryptophyceae), τα Δινομαστιγωτά (Dinophyta) και τα Κυανοβακτήρια (Cyanobacteria – blue-green algae) (Barsanti and Gualtieri, 2006, Darley, 1982, Metting, 1996, Waterbury, 2006). Επίσημα έχουν καταγραφεί πάνω από 120.000 είδη (>100.000 διάτομα) αλλά ο πραγματικός αριθμός τους μάλλον είναι κατά πολύ μεγαλύτερος (Metting, 1996).

Τα μικροφύκη περιλαμβάνουν κοκκοειδείς, μαστιγωτές, ή παλμειοειδείς μορφές και τριχώματα αλλά και μεγάλους αποικιακούς σχηματισμούς με νήματα, μικροθαλλούς ή πιο περίπλοκες συσσωματώσεις. Μαζί με τα μακροφύκη που διαβιούν στην παραλιακή ζώνη, το φυτοπλαγκτό και τα βενθικά μικροφύκη του εύφωτου πυθμένα, αποτελούν τους κύριους (είτε μοναδικούς) πρωτογενείς παραγωγούς στην θάλασσα ή στα εσωτερικά ύδατα (Falkowski, 1980, Reynolds, 2006) καθώς και σε ακραία περιβάλλοντα όπως οι θερμοπηγές (Brock, 1967) ή οι παγετώνες (Bunt and Wood, 1963). Εν ολίγοις αποτελούν την βάση διατροφής για το 70 % της γήινης παραγωγής βιομάζας (Andersen, 1996) ενώ ευθύνονται περίπου για το 50 % της γήινης φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου (Wiessner, et al., 1995). Η χρήση τους στην ανθρώπινη διατροφή έχει καταγραφεί από αρχαιοτάτων χρόνων (Jassby, 1988) και έχει ευρέως τεκμηριωθεί στην παραδοσιακή και την σύγχρονη υδατοκαλλιέργεια (De Pauw and Persoone, 1988, Guedes and Malcata, 2012).

Η εναγώνια αναζήτηση νέων υλικών και πρώτων υλών για την βιομηχανία οδήγησε στην ανάπτυξη της λεγόμενης μπλε βιοτεχνολογίας εστιάζοντας στους υδρόβιους μικροοργανισμούς (Bongiorni and Pietra, 1996, Kreeger, 1996). Από την άλλη πλευρά η έντονη συζήτηση που διεξήχθη για την αντιμετώπιση των συνεπειών του υπερπληθυσμού και την πίεση που αυτός ασκεί στους διαθέσιμους πόρους τις προηγούμενες δεκαετίες (Anonymous, 1994, Anonymous, 1999, Cairns, 1998, Greep, 1998, Klatzmann, 1996) οδήγησε πολλούς στην διερεύνηση της πιθανής καταφυγής και στα μικροφύκη είτε ως διατροφική λύση με παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (Kay and Barton, 1991, Kuhad, et al., 1997) είτε ως ανάκτηση του ρυπασμένου νερού (de la Nouë, et al., 1992) επαναφέροντας στο προσκήνιο και την πρόταση χρήσης τους στην αξιοποίηση άγονων εκτάσεων ιδίως με εξαλμυρισμένους υδροφόρους ορίζοντες για διάφορα προϊόντα (Barclay, et al., 1987, Dubinsky, et al., 1978, Isichei, 1990, Mitsui, 1980, Regan and Gartside, 1983). Όλη αυτή η συζήτηση κινητοποίησε θεαματικά πόρους και επιστημονικές ομάδες στην δεκαετία του 2000 στην κατεύθυνση της αξιοποίησης μικροφυκών με πολλές προοπτικές για τις επόμενες δεκαετίες (Mata, et al., 2010, Spolaore, et al., 2006, Wijffels and Barbosa, 2010).

## **2. Εφαρμογές και χρήσεις μικροφυκών**

### **2.1 Παραγωγή διαφόρων προϊόντων**

Τα μικροφύκη καλλιεργούνται σε παγκόσμιο επίπεδο κυρίως ως ζωντανή τροφή στις

υδατοκαλλιέργειες αλλά και για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων, κατά το πλείστον υψηλής αξίας και αφορούν προϊόντα τροφής, κοσμετολογίας, φαρμακευτικής χρήσης, και γενικά βιομηχανική χρήση. Αρκετά είδη χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιομάζας ως τροφής και συμπληρωμάτων διατροφής παραγωγή με υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης, λιπαρών οξέων (εικοσαπενταενοϊκού οξέος-EPA, δοκοσαεξαενοϊκού οξέως-DHA, γ-λινολενικού οξέος-GLA κλπ), βιταμινών, ανόργανων στοιχείων κλπ. Η παραγωγή αυτών των προϊόντων ενδεχομένως να έχουν εφαρμογή στην ανθρώπινη διατροφή, στην διατροφή ζώων, ψαριών κλπ.. Πολλοί από τους μεταβολίτες των φυκών έχουν φαρμακευτική αξία, είτε επειδή είναι αντιοξειδωτικά, είτε επειδή ενισχύουν το ανοσοποιητικό και το νευρικό σύστημα του ανθρώπου και των ζώων, είτε επειδή έχουν ιστατική δράση. Τα κυριότερα στελέχη που καλλιεργούνται ανήκουν στα γένη *Chlorella*, *Dunaliella*, *Arthrospira Nannochloropsis*, *Isochrysis*, *Haematococcus* και *Schizochytrium* (Brennan and Owende, 2010, Harun, et al., 2010, Pulz and Gross, 2004).

Τα μικροφύκη επίσης καλλιεργούνται για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων για γενική βιομηχανική χρήση. Τα σημαντικότερα προϊόντα είναι διάφορες χρωστικές ουσίες όπως η χλωροφύλλη, φυκοκυανίνη, καροτενοειδή (π.χ. ασταξανθίνη, β-καροτένιο) κλπ. Επίσης μια σημαντική εφαρμογή των φυκών είναι η παραγωγή λιπασμάτων και εδαφοβελτιωτικών προϊόντων. Η χρήση μικροφυκών ως εδαφοβελτιωτικού παράγοντα είναι μια πρακτική που εφαρμοζόταν σε παλαιότερες εποχές. Η εδαφοβελτιωτική δράση των φυκών οφείλεται στην ικανότητα της βιομάζας τους να κατακρατούν μεγάλες ποσότητες νερού και να βελτιώνουν τα δομικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά του εδάφους. Επίσης τα φύκη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως λίπασμα αργής αποδέσμευσης (slow release) και ειδικά τα αζωτοδεσμευτικά (nitrogen-fixing) είδη όπως τα *Anabaena* και *Nostoc*, τα οποία δεσμεύουν το άζωτο από την ατμόσφαιρα και την μετατρέπουν σε οργανική μορφή εντός της βιομάζας τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή λιπασμάτων με σαφώς πιο ήπιες περιβαλλοντικές επιπτώσεις σε σχέση με την τυπική διαδικασία παραγωγής αζωτούχων λιπασμάτων μέσω της διεργασίας Haber-Bosch (Grewe and Pulz, 2012, Metting, 1996, Pulz and Gross, 2004, Pulz, et al., 2008, Razon, 2012, Spolaore, et al., 2006).

## 2.2 Παραγωγή βιοκαυσίμων

Προσφάτως, τα μικροφύκη έχουν προσελκύσει πολύ έντονα το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών για την παραγωγή βιοενέργειας ως μια από τις απαντήσεις στα περιβαλλοντικά προβλήματα που προκύπτουν από την αυξανόμενη χρήση ορυκτών καυσίμων για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών και από την συσσώρευση CO<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα. Η παραγωγή βιομάζας μικροφυκών και κατ' επέκταση βιοενέργειας έχει όλα εκείνα τα πλεονεκτήματα της χρήσης ανανεώσιμων πηγών ενέργειας. Το πιο σημαντικό ίσως πλεονέκτημα της παραγωγής βιομάζας μικροφυκών είναι ότι το CO<sub>2</sub> μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας από την πηγή έκλυσής του παροχετεύοντάς το κατευθείαν στο υγρό υπόστρωμα ανάπτυξής τους (Ferreira, et al., 2012, Rosa, et al., 2011). Κατά αυτόν τον τρόπο το CO<sub>2</sub> επαναχρησιμοποιείται από τα μικροφύκη τα οποία το μετατρέπουν πάλι σε οργανική ύλη (βιομάζα) μέσω της φωτοσύνθεσης δημιουργώντας έναν κλειστό κύκλο στις μεταμορφώσεις του άνθρακα. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της καλλιέργειας μικροφυκών για παραγωγή ενέργειας είναι τα εξής: 1) είναι αποδοτικά βιολογικά συστήματα για την αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας, έχοντας συγκρίσιμο ή και μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης σε σύγκριση με τα επίγεια φυτά

2) είναι απλοί οργανισμοί χωρίς πολύπλοκα αναπαραγωγικά όργανα των οποίων μπορεί να αξιοποιηθεί ολόκληρη η βιομάζα τους 3) είναι μικροοργανισμοί που ακολουθούν υπό ευνοϊκές συνθήκες έναν απλό κύκλο κυτταρικής διαίρεσης, 4) η καλλιέργειά τους μπορεί να γίνει σε αλμυρό ή υφάλμυρο νερό, 5) η καλλιέργειά τους μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας ως λιπάσματα απόβλητα και απόνερα από διάφορους παραγωγικούς τομείς, 6) η στρεμματική απόδοση σε βιομάζα είναι συγκρίσιμη ή και μεγαλύτερη σε σχέση με εκείνη των επίγειων φυτών και η παραγωγή τους μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μη καλλιεργήσιμες εκτάσεις Παρόλα αυτά, η καλλιέργεια μικροφυκών παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα, με τα βασικότερα να είναι το μεγάλο κόστος εγκατάστασης των καλλιεργητικών μονάδων και λειτουργίας τους και κατ' επέκταση το αυξημένο κόστος παραγωγής βιομάζας (Amin, 2009, Brennan and Owende, 2010, Chisti, 2007, Singh, et al., 2011).

Για την παραγωγή βιοενέργειας από μικροφύκη, το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί σχεδόν αποκλειστικά σε εκείνα μόνο τα είδη που η βιομάζα τους περιέχουν αυξημένη ποσότητα σε λιπίδια. Τα λιπίδια ενδιαφέρουν γιατί αποτελούν την πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντίζελ μετά την μετεστεροποίησή τους σε μεθυλεστέρες (Chisti, 2007). Τα μικροφύκη, πέρα από τα λιπίδια, περιέχουν μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών και υδατανθράκων σε επίπεδα σχεδόν ίσα με τα λιπίδια (Πίνακας 1), (Becker, 1994). Τα μικροφύκη αποτελούν πρώτη ύλη για την παραγωγή ενέργειας ή βιοκαυσίμων μέσω διάφορων ενεργειακών τεχνολογιών μετατροπής της βιομάζας σε ενέργεια, όπως για παράδειγμα μέσω της αναερόβιας χώνευσης για την παραγωγή βιοαερίου, πυρολυτικών ελαίων μέσω της πυρόλυσης, αερίων σύνθεσης (syngas) μέσω της αεριοποίησης, βιοαιθανόλης μέσω της αναερόβιας ζύμωσης και διάφορων άλλων βιοκαυσίμων (Demirbas, 2010, Harun, et al., 2010, Kruse and Hankamer, 2010, Lam and Lee, 2012).

**Πίνακας 1** Περιεκτικότητα ορισμένων μικροφυκών σε πρωτεΐνες, λιπίδια και υδατάνθρακες (Πηγή: Brennan and Owende (2010)).

Είδος	Πρωτεΐνες (%)	Λιπίδια (%)	Υδατάνθρακες (%)
<i>Euglena gracilis</i>	39–61	14–20	14–18
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	21	17
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	2	26
<i>Chlorella vulgaris</i>	51–58	14–22	12–17
<i>Dunaliella salina</i>	57	6	32
<i>Arthrospira (Spirulina) maxima</i>	60–71	6–7	13–16
<i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i>	46–63	4–9	8–14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50–56	12–14	10–17

### 2.3 Διαχείριση αποβλήτων και απόνερων

Ήδη από τη δεκαετία του 1960 είχε προταθεί η καλλιέργεια μικροφυκών σε απόβλητα και απόνερα του βιομηχανικού, αστικού, γεωργο-κτηνοτροφικού και του τομέα της βιομηχανίας τροφίμων (Oswald, 2003). Η καλλιέργεια φυκών στα απόβλητα έχει ένα

διττό σκοπό: από την μία να παραχθεί χρήσιμη βιομάζα (η οποία να μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατάλληλα πχ ως εδαφοβελτιωτικό ή για βιοενέργεια) και από την άλλη να επιτευχθεί απορρύπανση των αποβλήτων και των απόνερων με την μείωση της συγκέντρωσης των οργανικών και ανόργανων ρύπων (κατά κύριο λόγο νιτρικά/αμμωνιακά και φωσφορικά στοιχεία). Η απορρύπανση των αποβλήτων είναι στην ουσία μια ανάκτηση των θρεπτικών στοιχείων που περιέχονται στα απόβλητα και με αυτό τον τρόπο μειώνεται η επίδρασή τους στα φαινόμενα του ευτροφισμού, της ρύπανσης υπόγειων νερών κλπ. Στον τομέα της παραγωγής βιοενέργειας η καλλιέργεια των μικροφυκών χρησιμοποιώντας απόβλητα και απόνερα κερδίζει όλα και πιο πολύ έδαφος γιατί βελτιώνει την βιωσιμότητα του εγχειρήματος (δες παρακάτω) (Pittman, et al., 2011).

Τα μικροφύκη για να μπορέσουν να αυξηθούν/πολλαπλασιαστούν θα πρέπει να προσλάβουν με τον ένα ή άλλο τρόπο κάποια συγκεκριμένα ανόργανα στοιχεία (C, N, P, K, S κλπ). Ειδικά ορισμένα μικροφύκη που περιέχουν υψηλές ποσότητες πρωτεϊνών, η καλλιέργειά τους προϋποθέτει την εφαρμογή σημαντικών ποσοτήτων ανόργανων αζωτούχων λιπασμάτων. Από την σκοπιά της περιβαλλοντικής προστασίας, αλλά και της οικονομικότητας, η χρήση συνθετικών αζωτούχων (αλλά και φωσφορικών) λιπασμάτων δεν αποτελούν λύση αιεφορίας. Για την κάλυψη των αναγκών των καλλιεργειών σε θρεπτικά στοιχεία αλλά και για την αποφυγή χρήσης συνθετικών λιπασμάτων, η καλλιέργεια των μικροφυκών μπορεί να γίνει σε υποστρώματα τα οποία περιέχουν απόβλητα. Ειδικά τα απόβλητα του κτηνοτροφικού τομέα, που έχουν αυξημένες συγκέντρωση αζώτου, προσιδιάζουν για την χρήση τους για την καλλιέργεια μικροφυκών (Abeliovich, 2007, Markou and Georgakakis, 2011, Posten and Schaub, 2009, Rawat, et al., 2011). Ορισμένα απόβλητα του γεωργο-κτηνοτροφικού τομέα που έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την καλλιέργεια μικροφυκών είναι του χοιροστασίου (Cañizares and Domínguez, 1993), βουστασίου (Lincoln, et al., 1996), πτηνοτροφικά απόβλητα (Mahadevaswamy and Venkataraman, 1986), ελαιοτριβείου (Hodaifa, et al., 2008) και τυροκομείου (Blier, et al., 1995). Η χρήση των αποβλήτων για καλλιέργεια μικροφυκών γίνεται είτε σε πρωτογενές (αδιαχείριστα απόβλητα) είτε σε τριτογενές στάδιο. Το τριτογενές στάδιο αναφέρεται στην χρήση αποβλήτων που έχουν υποστεί ήδη διαχείριση είτε με αερόβια σταθεροποίησή τους είτε με αναερόβια χώνευσή τους (Cañizares, et al., 1994, de la Noüe and Bassères, 1989, Martin, et al., 1985).

Η παραγωγή βιομάζας με τη χρήση αποβλήτων κυμαίνεται έντονα ανάλογα με το είδος του μικροφύκου και το είδος του αποβλήτου. Σε πειραματικές έρευνες έχει αναφερθεί παραγωγή από  $5 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  (ξηρή ουσία) (Mulbry and Wilkie, 2001) μέχρι και  $70,0 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  (ξηρή ουσία) (Lincoln, et al., 1996). Η μείωση των ανόργανων ρυπαντών (N και P) στα απόβλητα μετά την διαχείρισή τους με μικροφύκη μπορεί να ανέλθει στο 70-90% (Mulbry, et al., 2008) και η μείωση των οργανικών ρυπαντών μέχρι και 70% (COD) (González, et al., 2008).

Αρκετά είδη μικροφυκών έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται μιξοτροφικά, που σημαίνει ότι μπορούν να αξιοποιήσουν οργανικές ουσίες ως πηγή ενέργειας ή/και άνθρακα (δες παρακάτω). Η μιξοτροφική ανάπτυξη έχει το πλεονέκτημα ότι είναι πιο ταχεία από την αυτοτροφική ή την ετεροτροφική. Αυτό το γεγονός είναι σημαντικό γιατί σε απόβλητα με οργανικό φορτίο η ανάπτυξη τέτοιων ειδών μπορεί να είναι πιο ταχεία αυξάνοντας την παραγωγικότητα σε βιομάζα (Abreu, et al., 2012, Chojnacka and



Zielińska, 2011, Heredia-Arroyo, et al., 2011) και ταυτοχρόνως μειώνοντας η εξουδετερώνοντας την ανάγκη χρήσης ανόργανου άνθρακα (Markou, et al., 2012).

### **3 Τεχνολογία παραγωγής μικροφυκών**

Η καλλιέργεια των μικροφυκών μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ανοικτούς ή κλειστούς τύπους καλλιέργειών. Στις ανοικτού τύπου καλλιέργειες, τα μικροφύκη καλλιεργούνται σε τεχνητούς ή φυσικούς περιέκτες, όπως δεξαμενές, νερόλακκοι, λίμνες κλπ. Στις κλειστού τύπου καλλιέργειες η καλλιέργεια γίνεται εντός διαφόρων σχημάτων κλειστών περιεκτών που ονομάζονται φωτοβιοαντιδραστήρες (photobioreactors). Οι φωτοβιοαντιδραστήρες αποτρέπουν την άμεση επαφή της καλλιέργειας με τις εξωτερικές συνθήκες και έτσι την προστατεύουν από τους διάφορους περιβαλλοντικούς κινδύνους (Pulz, 2001, Richmond, 1992).

#### **3.1 Ανοικτού τύπου καλλιέργειες**

Οι ανοικτού τύπου καλλιέργειες έχουν το πλεονέκτημα ότι έχουν σχετικά μικρότερο κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας από τις κλειστού τύπου καλλιέργειες και έχουν σχετικά καλή δυνατότητα μαζικής καλλιέργειας μικροφυκών (Jorquera, et al., 2010). Στις ανοικτού τύπου καλλιέργειες όμως τα μικροφύκη είναι εκτεθειμένα στους περιβαλλοντικούς παράγοντες και συνήθως επιμολύνονται από διάφορα άλλα είδη μικροφυκών ή βακτηρίων ή άλλων μικροοργανισμών. Οι επιμολύνσεις με άλλους μικροοργανισμούς αλλοιώνει την σύσταση των καλλιέργειών και δυσχεραίνει την εφαρμογή της μονο-καλλιέργειας. Έντονες επιμολύνσεις μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την μικρή παραγωγή ή και σε ορισμένες περιπτώσεις την κατάρρευση της καλλιέργειας είτε λόγω της επικράτησης άλλων μικροοργανισμών είτε λόγω της εμφάνισης παρασιτικών ασθeneιών (Day, et al., 2011). Οι ανοικτού τύπου καλλιέργειες πάσχουν επιπλέον λόγω της εξάτμισης νερού που έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια σημαντικών ποσοτήτων νερού και την αύξηση της συγκέντρωσης αλάτων που από ένα επίπεδο και πάνω επιδρούν ανασταλτικά στην αύξηση των μικροφυκών. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην ανάγκη αναπλήρωσης νερού άρα και χρήση μεγάλων ποσοτήτων του. Παρόλα αυτά το νερό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί θα μπορεί να είναι υφάλμυρο ή αλμυρό, ανάλογα με το είδος του μικροφύκου που καλλιεργείται και την ανεκτικότητά του στην παρουσία αλάτων (Bilanovic, et al., 2009) αντλώντας και χρησιμοποιώντας έτσι μη πόσιμο ή/και μη αρδεύσιμο νερό από διάφορες πηγές.

Επίσης η παραγωγή ανά μονάδα επιφάνειας είναι μικρότερη σε σχέση με τις κλειστού τύπου καλλιέργειες με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της βιομάζας να είναι σχετικά μικρή ανεβάζοντας πολύ το κόστος συγκομιδής (Norsker, et al., 2011). Επίσης σε ορισμένες τοποθεσίες, οι περίοδοι καλλιέργειας είναι περιορισμένες, λόγω έντονων εποχιακών περιβαλλοντικών διακυμάνσεων ή χαμηλών θερμοκρασιών και ηλιοφάνειας. Για τον λόγο αυτό χώρες με μεγάλη διάρκεια και ένταση ηλιοφάνειας, όπως η Ελλάδα, έχουν πλεονέκτημα για την εγκατάσταση καλλιέργειας μικροφυκών, δεδομένου ότι η παραγωγή σε βιομάζα μπορεί να είναι ως και δέκα φορές μεγαλύτερη σε σχέση με περιοχές με μικρή διάρκεια και ένταση ηλιοφάνεια (Brányiková, et al., 2011).

Σε γενικές γραμμές τα κυριότερα μειονεκτήματα των ανοικτών καλλιέργειών είναι: 1) απώλειες λόγω εξάτμισης, 2) θερμοκρασιακές μεταβολές, 3) μικρή αποτελεσματικότητα στην αξιοποίηση του CO<sub>2</sub>, 4) αναποτελεσματική ανάδευση του υποστρώματος και 5) μικρή αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας (Brennan and Owende,

2010).

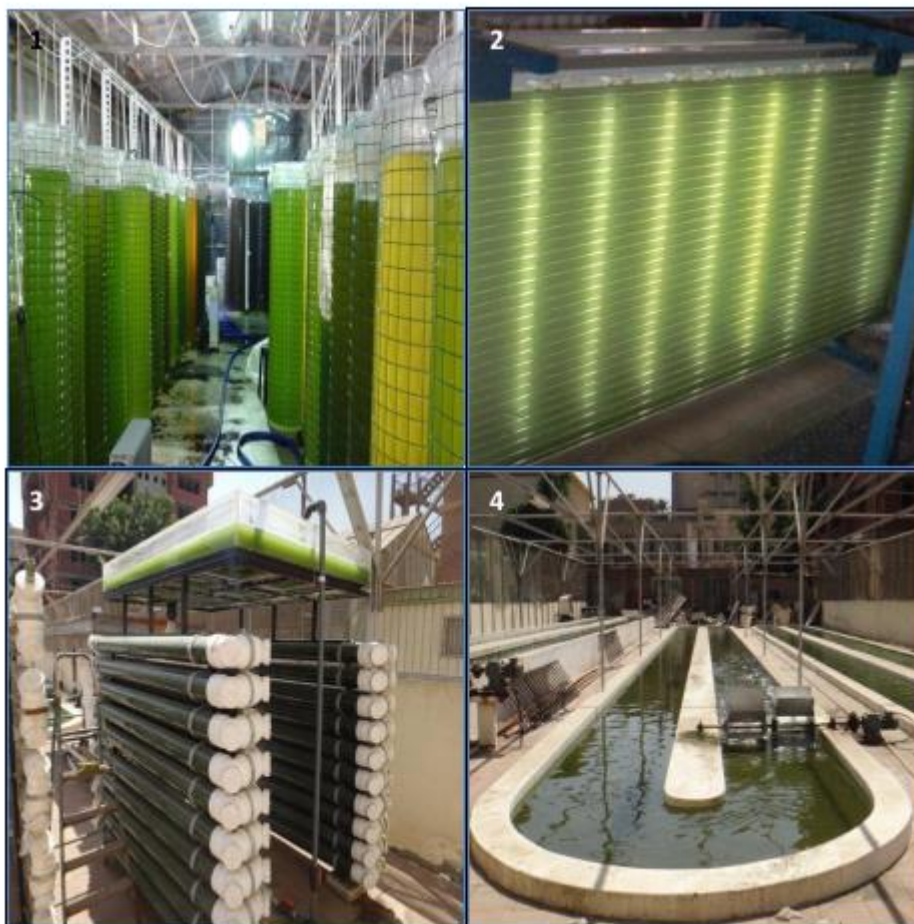
Τα προβλήματα των ανοικτών καλλιέργειών μπορούν να αντιμετωπιστούν με την χρήση κατάλληλων συνθηκών για το είδος του μικροφύκου. Αποτελεσματικές συνθήκες είναι συνήθως οι ακραίες και εξειδικευμένες συνθήκες όπου μόνο το επιλεχθέν μικροφύκος μπορεί να αναπτυχθεί, ενώ είναι ακατάλληλες για τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Παραδείγματα ειδών που καλλιεργούνται σε ακραίες συνθήκες είναι η *Dunaliella salina* που καλλιεργείται σε αλμυρά νερά (>20% άλας) ή η *Arthrospira (Spirulina) platensis* που καλλιεργείται σε αλκαλικά περιβάλλοντα (> pH 9,2). Επίσης για μια αποτελεσματική καλλιέργεια μπορεί να χρησιμοποιηθούν είδη μικροφυκών με σχετικά υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης για την επικράτηση έναντι άλλων μικροοργανισμών όπως τα μικροφύκη των γενών *Chlorella*, *Scenedesmus* και *Phaeodactylum* (Borowitzka, 1999, Brennan and Owende, 2010, Chen, 1996, Ugwu, et al., 2008).

Το σύστημα ανάδευσης των ανοικτών καλλιέργειών είναι μεγάλης σημασίας και στην ουσία αντικατοπτρίζει την εξέλιξη των διαφόρων τύπων δεξαμενών. Η ανάδευση είναι αναγκαία γιατί εμποδίζει την συσσωμάτωση και καθίζηση των μικροφυκών, αυξάνει την αξιοποίηση του φωτός, ομογενοποιεί το υπόστρωμα καθιστώντας τα διαλυτά ανόργανα ή/και οργανικά στοιχεία πιο προσπελάσιμα για την πρόσληψή τους από τα μικροφύκη (Chaumont, 1993). Ο κυριότερος τύπος ανοικτών τεχνητών δεξαμενών είναι η επιμήκης λεκάνη (raceway) και η κυκλική λεκάνη. Οι αγωγοί (διάδρομοι) της επιμήκους λεκάνης μπορεί να έχουν διάφορα σχήματα (απλοί, οφειοειδής, με παράλληλους αγωγούς κλπ) και η ανάδυσή τους γίνεται συνήθως με πτερυγωτό τροχό (paddle wheel), ενώ η κυκλική λεκάνη αναδεύεται με κινούμενο βραχίονα (Richmond, 1992).

Σημαντική παράμετρος για τον σχεδιασμό ανοικτών δεξαμενών είναι το βάθος της δεξαμενής, το οποίο δεν θα πρέπει να είναι πολύ μεγάλο για να επιτρέπεται η διείσδυση του φωτός, αλλά να μην είναι και πολύ μικρό για να μην αλλάζει η συγκέντρωση των ιόντων του υποστρώματος λόγω της εξάτμισης του νερού. Το βάθος της δεξαμενής θεωρείται βέλτιστο μεταξύ 20 και 30 cm. Παρόλα αυτά αναλόγως το είδος του μικροφύκου και τις κλιματικές συνθήκες της περιοχής το βάθος της δεξαμενής μπορεί να είναι μεγαλύτερο ή μικρότερο (Borowitzka, 1999).

### 3.2 Κλειστού τύπου καλλιέργειες

Στις καλλιέργειες κλειστού τύπου, οι συνθήκες είναι περισσότερο ή λιγότερο ελεγχόμενες, αναλόγως αν πρόκειται για καλλιέργειες στεγασμένες ή υπαίθριες. Στις υπαίθριες καλλιέργειες οι συνθήκες δεν ελέγχονται πλήρως (ηλιακή ένταση και θερμοκρασία). Αντίθετα στις στεγασμένες καλλιέργειες οι συνθήκες με τον ένα ή άλλο τρόπο είναι πιο ελεγχόμενες. Οι κλειστού τύπου καλλιέργειες πραγματοποιούνται σε κλειστούς περιέκτες, τους φωτοβιοαντιδραστήρες (photobioreactors). Τα υλικά κατασκευής και τα σχήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων ποικίλουν πολύ. Υπάρχουν φωτοβιοαντιδραστήρες επίπεδοι σαν ηλιακοί συλλέκτες κατακόρυφοι ή κεκλιμένοι, κυλινδρικοί με επιμήκης αγωγούς κατασκευασμένοι από διάφορα διάφανα υλικά (γυαλί ή πλαστικό), ή ελικοειδούς μορφής. Επίσης απλής κατασκευής φωτοβιοαντιδραστήρες θεωρούνται αυτοί του τύπου σακών πολυαιθυλενίου (Brennan and Owende, 2010, Carvalho, et al., 2006, Chisti, 2007, Pulz, 2001).



**Εικόνα 1.** Διάφοροι τύποι συστημάτων καλλιέργειας μικροφυκών. (1) Πλαστικοί σάκοι 300 λίτρων, (2) επίπεδοι φωτοαντιδραστήρες, (3) οριζόντιοι σωληνωτοί φωτοαντιδραστήρες και (4) ανοικτή δεξαμενή τύπου raceway (Φωτογραφίες από τη συλλογή Ι. Τζοβενή).

Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι: 1) καλύτερος έλεγχος των συνθηκών καλλιέργειας, 2) μεγαλύτερος λόγος επιφάνειας/όγκου, 3) σε ορισμένους τύπους φωτοβιοαντιδραστήρων καλύτερος έλεγχος της παροχέτευσης και της κίνησης των αερίων (πχ  $\text{CO}_2$ ), 4) περιορισμός της εξάτμισης νερού από το υπόστρωμα καλλιέργειας, 5) καλύτερη θερμική κατανομή στο υπόστρωμα καλλιέργειας, 6) σχετικά εύκολη εγκατάσταση σε ανοιχτό χώρο, 7) προστασία από επιμολύνσεις από διάφορους μικροοργανισμούς 8) σχετικά υψηλές αποδόσεις σε σχέση με τις ανοικτές δεξαμενές και 9) η δυνατότητα καλλιέργειας σε τύπο μιξοτροφίας ή ετεροτροφίας χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα επιμόλυνσης (Chen, 1996, Chisti, 2007).

Παρόλα τα πλεονεκτήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων σε σχέση με τις ανοικτές δεξαμενές, οι καλλιέργειες αυτού του τύπου έχουν αυξημένα κόστη κατασκευής και λειτουργίας όπως και η περιορισμένη δυνατότητα να κατασκευαστούν σε μεγάλης κλίμακας εγκαταστάσεις (scaled-up). Ένας από τους κυριότερους λόγους για την περιορισμένη δυνατότητα να κατασκευαστούν σε μεγάλης κλίμακα εγκαταστάσεις είναι η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου στο υγρό υπόστρωμα ανάπτυξης. Κατά την φωτοσύνθεση των μικροφυκών παράγεται μοριακό οξυγόνο το οποίο λόγω των συνθηκών εντός του φωτοβιοαντιδραστήρα διαλύεται στο υγρό υπόστρωμα ανάπτυξης. Το διαλυμένο οξυγόνο θα πρέπει να απομακρύνεται με κάποιο τρόπο γιατί μεγάλες συγκεντρώσεις διαλυμένου οξυγόνου είναι ανασταλτικές της ανάπτυξης που μερικές φορές σε συνδυασμό με υψηλές εντάσεις φωτός προκαλείται φωτοοξείδωση. Αυτό το



γεγονός περιορίζει αρκετά το μήκος των αγωγών το οποίο δεν θα πρέπει να ξεπερνά τα 80m (Molina, et al., 2001). Βέβαια παράγοντες όπως η ηλιακή ένταση, η συγκέντρωση της βιομάζας, ο ρυθμός ροής του υγρού κλπ επηρεάζουν σημαντικά τις διαστάσεις των αγωγών (Chisti, 2007, Lehr and Posten, 2009, Molina, et al., 2001).

Ο σχεδιασμός των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι μια πολύπλοκη υπόθεση και προϋποθέτει την καλή γνώση διαφόρων φυσικών και βιολογικών φαινομένων για τον επιτυχή σχεδιασμό των διαφόρων υποσυστημάτων. Τα κυριότερα υποσυστήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι: 1) το σύστημα φωτισμού, 2) το σύστημα εμπλουτισμού με CO<sub>2</sub>, 3) το σύστημα ανάδευσης, 4) το σύστημα απομάκρυνση O<sub>2</sub> και διαχωρισμό αερίων, 5) το σύστημα θέρμανσης/ψύξης και 6) το σύστημα θρέψης (Chisti and Moo-Young, 2002, Eriksen, 2008, Molina, et al., 2001)

### 3.3 Είδη μεταβολισμού

Η πλειοψηφία των μικροφυκών είναι  $\Theta_2$ -γόνοι φωτοσυνθέτοντες μικροοργανισμοί που σημαίνει ότι η πηγή ενέργειας είναι ο ήλιος και η πηγή άνθρακα το CO<sub>2</sub>. Παρόλα αυτά, ορισμένα μικροφύκη έχουν την ικανότητα να ακολουθούν διάφορους τύπους μεταβολισμού και να εναλλάσσουν τον μεταβολισμό τους ανάλογα της μορφής της διαθέσιμης ενέργειας και του διαθέσιμου άνθρακα. Οι μεταβολικοί τύποι με τους οποίους μπορούν να αναπτυχθούν ορισμένα μικροφύκη είναι: 1) **Φωτοαυτότροφος**: στον τύπο αυτό τα μικροφύκη αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας ως πηγή ενέργειας τον ήλιο και ως πηγή άνθρακα το CO<sub>2</sub> ή άλλες ανόργανες μορφές, 2) **Ετερότροφος**: Στον τύπο αυτό τα μικροφύκη χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας και πηγή άνθρακα διάφορες οργανικές ουσίες όπως γλυκόζη, οξικό οξύ, γλυκερίνη κλπ, 3) **Μιξότροφος**: τα μικροφύκη στον τύπο αυτό είναι σε θέση να αυξάνονται/πολλαπλασιάζονται είτε αξιοποιώντας τον ήλιο ως πηγή ενέργειας είτε αξιοποιώντας διάφορες οργανικές ουσίες και ως πηγή άνθρακα είτε το CO<sub>2</sub> είτε τις οργανικές ουσίες και 4) **Φωτοετερότροφος**: στον τύπο αυτό τα μικροφύκη χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας τον ήλιο και σαν πηγή άνθρακα τις οργανικές ενώσεις (Chojnacka and Marquez-Rocha, 2004).

Ο ετερότροφος και μιξότροφος μεταβολισμός μπορούν να αποτελέσουν ιδανική καλλιεργητική τεχνική για την παραγωγή μικροφυκών, γιατί έτσι αντιμετωπίζεται το πρόβλημα της αξιοποίησης του φωτός σε καλλιέργειες με μεγάλη πυκνότητα ή σε καλλιέργειες με φωτοπαρεμπόδιση (κατά τους καλοκαιρινούς μήνες). Στις ετερότροφες ή/και μιξότροφες καλλιέργειες η προσθήκη οργανικού άνθρακα στο υπόστρωμα καλλιέργειας δίνει μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας σε σχέση με τις φωτοαυτότροφες καλλιέργειες. Γενικά όμως ο μιξότροφος μεταβολισμός έχει μεγαλύτερους ρυθμούς ανάπτυξης και μεγαλύτερη τελική παραγωγή σε βιομάζα σε σχέση με τους άλλους τρεις μεταβολισμούς (Chojnacka and Marquez-Rocha, 2004). Η προσθήκη όμως οργανικού άνθρακα προϋποθέτει αζενικές συνθήκες καλλιέργειας λόγω του κινδύνου της υπέρμετρης ανάπτυξης βακτηρίων και την τελική τους επικράτηση στις καλλιέργειες. Ειδικά για την παραγωγή μικροφυκών για ενεργειακούς σκοπούς, όπου το ζήτημα της μείωσης του κόστους των χρησιμοποιούμενων θρεπτικών υλικών είναι πολύ σημαντικό, για την πραγματοποίηση ετερότροφων ή μιξότροφων καλλιεργειών είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν οργανικά απόβλητα του παραγωγικού τομέα (Abreu, et al., 2012, Andrade and Costa, 2007, Chen, 1996, Chojnacka and Zielińska, 2011, Gao, et al., 2010, Zhang, et al., 2011).

### 3.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών

Οι καλλιέργειες των μικροφυκών είναι αρκετά πολύπλοκα συστήματα και η ανάπτυξή τους επηρεάζεται από διαφορετικούς βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες. Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών είναι: ο φωτισμός, η

θερμοκρασία, τα θρεπτικά συστατικά (C, N, P και μικροστοιχείων), το pH του θρεπτικού υποστρώματος, η αλατότητα του θρεπτικού υποστρώματος, διάφορες παρεμποδιστικές και ανασταλτικές ουσίες που παράγονται από τα ίδια τα μικροφύκη ή που μπορεί να υπάρχουν στο θρεπτικό υπόστρωμα, ο αερισμός, η ανάδευση, η παρουσία ή μη άλλων ειδών μικροοργανισμών στην καλλιέργεια. Παρακάτω θα γίνει μια σχετικά σύντομη ανάλυση ορισμένων από τους παραπάνω παράγοντες.

### 3.4.1 Φωτισμός

Η διάρκεια, η ένταση και η ποιότητα του φωτισμού είναι καθοριστικοί παράγοντες για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Η ποιότητα του φάσματος του φωτός και η έντασή του πρέπει να επιλέγονται με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτρέπουν την μέγιστη ανάπτυξη των μικροφυκών. Το φάσμα του φωτός που αξιοποιείται από τα μικροφύκη είναι μεταξύ 400-700 nm (ενεργή φωτοσυνθετική ακτινοβολία). Τα διάφορα είδη μικροφυκών περιέχουν σε διαφορετικές αναλογίες τις διάφορες φωτοσυνθετικές χρωστικές ουσίες και ως εκ τούτου αξιοποιούν λιγότερο ή περισσότερο διαφορετικά μήκη κύματος. Ο φωτισμός είναι σε γενικές γραμμές ο καθοριστικότερος παράγοντας για την ανάπτυξη των μικροφυκών και ειδικά στις ανοικτού τύπου καλλιέργειες συνήθως είναι και ο περιοριστικός παράγοντας (Janssen, 2002, Suh and Lee, 2003).

Γενικά ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροφυκών αυξάνεται με την αύξηση της έντασης της ακτινοβολίας μέχρι ένα όριο. Τα περισσότερα μικροφύκη κορένονται σε ένταση φωτισμού μεταξύ 200 και 400  $\mu\text{E m}^{-1} \text{s}^{-1}$ , αλλά αυτό εξαρτάται από την πυκνότητα της καλλιέργειας. Μετά το όριο αυτό ο ρυθμός ανάπτυξης παραμένει σταθερός και από ένα σημείο και έπειτα μειώνεται λόγω της βλάβης που υφίστανται τα κύτταρα λόγω φωτοοξειδωσης (Carvalho, et al., 2011, Fernandes, et al., 2010, Molina Grima, et al., 1999).

Η πηγή του φωτός μπορεί να είναι είτε φυσική (ήλιος) είτε τεχνητή (λαμπτήρες). Ειδικά σε περιπτώσει μικροφυκών που καλλιεργούνται για υψηλής αξίας προϊόντα ο τεχνητός φωτισμός παρέχει πιο σταθερές ελεγχόμενες συνθήκες και έτσι προτιμάται. Νέες τεχνολογίες λαμπτήρων όπως τα LED (light emitting diode) τα οποία έχουν σχετικά μικρή κατανάλωση ενέργειας ή οι οπτικές ίνες ή και υβριδικά συστήματα φυσικού και τεχνητού φωτισμού θεωρούνται ότι θα συμβάλουν αρκετά στην βελτιστοποίηση της παραγωγής μικροφυκών (Chen, et al., 2011, Wang, et al., 2007).

### 3.4.2 Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία είναι ο πιο καθοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη των μικροφυκών μετά τον φωτισμό. Πολλά μικροφύκη μπορούν να αντέξουν θερμοκρασίες μέχρι και 15 °C χαμηλότερα από την βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους, αλλά υπάρχει πιθανότητα με μια μεταβολή της τάξης των 2-4°C πάνω από το βέλτιστο σημείο να υπάρξει πλήρης απώλεια της καλλιέργειας. Στους φωτοβιοαντιδραστήρες υπάρχει ο κίνδυνος της υπερθέρμανσης που σε ζεστές μέρες η θερμοκρασία μπορεί να ανέλθει στους 55°C. Για τους παραπάνω λόγους φαίνεται ότι είναι αναγκαίο να υπάρχει εγκατεστημένο σύστημα ψύξης της καλλιέργειας (Richmond, 1999). Η θερμοκρασία είναι επίσης σημαντικός παράγοντας γιατί έχει συνεργιστική δράση με τον φωτισμό. Σε χαμηλές θερμοκρασίες μειώνεται και το σημείο έντασης του φωτισμού που δημιουργεί ανασταλτικές συνθήκες ή φωτοοξειδωση. Με άλλα λόγια σε ψυχρές περιοχές ή περιόδους του έτους η φωτοοξειδωση είναι πιο έντονη και συχνότερο φαινόμενο (Carvalho, et al., 2009, Jensen and Knutsen, 1993, Richmond, 1999). Τα περισσότερα μικροφύκη αναπτύσσονται μεταξύ 20-30°C, αλλά υπάρχουν και θερμοφιλά στελέχη που μπορούν να αναπτυχθούν και σε θερμοκρασίες ως 40-42°C (Vonshak, 2002).

### 3.4.3 Θρεπτικά στοιχεία

Τα μικροφύκη για να πολλαπλασιαστούν πέρα από την ενέργεια και τον άνθρακα χρειάζονται και διάφορα άλλα ανόργανα στοιχεία τα οποία είναι αναγκαία για τις διάφορες μεταβολικές κυτταρικές διεργασίες. Τα κυριότερα θρεπτικά στοιχεία (μακροστοιχεία) που είναι αναγκαία για την ανάπτυξη των μικροφυκών, πέρα από τον άνθρακα είναι το άζωτο (N), ο φώσφορος (P) και το κάλιο (K). Αναγκαία αλλά σε μικρότερες ποσότητες τα μικροστοιχεία όπως το θείο (S), ο σίδηρος (Fe), το μαγνήσιο (Mg), το ασβέστιο (Ca), όπως και διάφορα άλλα μέταλλα (πχ μόλυβδος, νικέλιο, κλπ) (Richmond, 2004).

### 3.4.4 Άνθρακας

Τα μικροφύκη ως φωτοσυνθέτοντες μικροοργανισμοί μετατρέπουν την ηλιακή ενέργεια και τον ανόργανο άνθρακα (CO<sub>2</sub>) μέσω πολύπλοκων βιοχημικών διεργασιών σε οργανικό άνθρακα (γλυκόζη). Το CO<sub>2</sub> όταν είναι διαλυμένο στο νερό για τις τιμές του pH στο οποίο αναπτύσσονται τα περισσότερα μικροφύκη βρίσκεται είτε σε μορφή διτανθρακικής ρίζας (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), είτε σε μορφή ανθρακικής ρίζας (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> σε μεγαλύτερες τιμές του pH). Τα μικροφύκη (με εξαίρεση ορισμένες κατηγορίες όπως για παράδειγμα τα ροδοφύκη) έχουν έναν μηχανισμό (carbon concentrating mechanism) κατά τον οποίο το διαλυμένο CO<sub>2</sub> συγκεντρώνεται γύρω από το κύτταρο και είτε ο άνθρακας απορροφάται ως διτανθρακική ρίζα είτε με την βοήθεια ενζύμων (carbonic anhydrase) απορροφάται σε μορφή CO<sub>2</sub> (Badger and Price, 2003, Giordano, et al., 2005).

Η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα είναι περίπου 360 ppmv (0,036%) και δεδομένου ότι τα μικροφύκη μπορούν να αναπτυχθούν σε υπόστρωμα καλλιέργειας που να περιέχει ως και 15% διαλυμένο CO<sub>2</sub> και ότι για την παραγωγή ενός κιλού ξηρής βιομάζας μικροφυκών χρειάζονται περίπου 1.8 κιλά CO<sub>2</sub> η παροχή CO<sub>2</sub> από την ατμόσφαιρα προϋποθέτει να παροχετεύονται στις καλλιέργειες μεγάλοι όγκοι αέρα για την ικανοποιητική ανάπτυξη βιομάζας. Για τον λόγο αυτό το CO<sub>2</sub> μπορεί να παρέχεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είτε χρησιμοποιώντας μη τοξικά καυσαέρια από παραγωγικές δραστηριότητες είτε χρησιμοποιώντας διάφορα ανθρακικά άλατα, όπως για παράδειγμα η ανθρακική ή διτανθρακική σόδα για είδη μικροφυκών που καλλιεργούνται σε υψηλά επίπεδα pH (Brennan and Owende, 2013, Doucha, et al., 2005, Ferreira, et al., 2012, Wang, et al., 2008).

Κατά την φωτοσύνθεση και κατά την μετατροπή της διτανθρακικής ρίζας σε CO<sub>2</sub> και την δέσμευσή του παράγονται ιόντα OH<sup>-</sup>, σύμφωνα με την χημική αντίδραση HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> → CO<sub>2</sub> + OH<sup>-</sup> και ως εκ τούτου η τάση στις καλλιέργειες των μικροφυκών είναι να αυξάνεται το pH τους. Σε περιπτώσεις μη-ρύθμισης του pH οι τιμές του μπορεί να ανέλθουν ακόμα και στο 11 με ανάλογες επιπτώσεις στην καλλιέργεια. Ένας τρόπος ρύθμισης του pH είναι η παροχέτευση CO<sub>2</sub> που δεσμεύει ιόντα OH<sup>-</sup> για την παραγωγή HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ενώ επίσης μπορεί να γίνει με διάφορα οξέα (ανόργανα ή και οργανικά) (Grobelaar, 2004).

Ορισμένα μικροφύκη, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, μπορούν να αξιοποιήσουν και οργανικό άνθρακα ως πηγή άνθρακα. Τα μικροφύκη έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται αξιοποιώντας διάφορες οργανικές ουσίες τις οποίες απορροφούν με συγκεκριμένους μηχανισμούς ανάλογα με την οργανική ουσία. Για παράδειγμα η απορρόφηση γλυκόζης γίνεται μετά από φωσφορυλίωση, η γλυκερόλη με απλή διάχυση εντός των κυττάρων και τα οργανικά οξέα με τη χρήση μεταφορικών πρωτεϊνών των μεμβρανών (Perez-Garcia, et al., 2011).

### 3.4.5 Άζωτο

Το άζωτο είναι ένα από τα βασικότερα θρεπτικά στοιχεία γιατί συμμετέχει σε αρκετά σημαντικά βιοχημικά μακρομόρια (πρωτεΐνες, DNA, RNA κλπ) και η παροχή του είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Η περιεκτικότητα του αζώτου στην βιομάζα των μικροφυκών, ειδικά σε εκείνα που περιέχουν μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών, μπορεί να ανέλθει ακόμα και στο 10%. Το άζωτο μπορεί να προσληφθεί από διάφορες μορφές όπως αμμωνιακό άζωτο, νιτρικό και λιγότερο από τη νιτρώδη μορφή. Επίσης ορισμένα είδη μικροφυκών (όπως τα κυανοβακτήρια *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Anabaena* κλπ) μπορούν να δεσμεύσουν μοριακό άζωτο από την ατμόσφαιρα. Όταν το άζωτο είναι σε μοριακή μορφή διαχέεται κατευθείαν εντός των κυττάρων διαπερνώντας τις μεμβράνες. Τα μικροφύκη γενικά προτιμούν την πρόσληψη αζώτου υπό αμμωνιακή μορφή γιατί δεν χρειάζονται να ξοδέψουν ενέργεια όπως χρειάζεται για τα νιτρικά τα οποία πρέπει πρώτα να αναχθούν σε αμμωνιακή μορφή (Boussiba and Gibson, 1991, Grobbelaar, 2004). Παρόλα αυτά η παροχή νιτρικών αλάτων έχει δείξει ότι έχει καλύτερα αποτελέσματα στην παραγωγή βιομάζας (Costa, et al., 2001). Επιπλέον, μεγάλες συγκεντρώσεις αμμωνίας στα υποστρώματα ανάπτυξης δρουν τοξικά και αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροφυκών (Azon and Goldman, 1982).

Για την μείωση του κόστους παραγωγής χρησιμοποιώντας νιτρικά άλατα, αρκετοί ερευνητές προσπάθησαν να τα αντικαταστήσουν με φτηνότερα υλικά. Αυτό που δείχνει να έχει ενδιαφέρον για την παραγωγή μικροφυκών σε μεγάλη κλίμακα είναι η χρήση ουρίας ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ). Στην ουρία το άζωτο είναι σε οργανική μορφή και υδρολύεται προς αμμώνιο. Η ουρία πέρα από πηγή αζώτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης και ως πηγή άνθρακα. Ένα από τα μειονεκτήματα της χρήσης ουρίας είναι ότι το παραγόμενο αμμώνιο, ειδικά σε αλκαλικά υποστρώματα ανάπτυξης διαφεύγει και χάνεται στην ατμόσφαιρα (Danesi, et al., 2002, Hsieh and Wu, 2009, Matsudo, et al., 2009).

### 3.4.6 Φώσφορος

Ουσιαστικής σημασίας θρεπτικό στοιχείο για την ανάπτυξη των μικροφυκών είναι και ο φώσφορος, ο οποίος συμμετέχει ως στοιχείο σε διάφορα μακρομόρια, όπως φωσφολιπίδια, αδενοσινοτριφωσφορικό οξύ (ATP) κ.α. Τα μικροφύκη περιέχουν λιγότερο από 1% φώσφορο στη βιομάζα τους, παρόλα αυτά ο φώσφορος πολύ συχνά είναι ο περιοριστικός παράγοντας ανάπτυξης, ειδικότερα σε φυσικά περιβάλλοντα (πχ λίμνες). Ο φώσφορος προσλαμβάνεται από τα μικροφύκη ως ορθοφωσφορική ρίζα ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Η διαλυτότητα του φωσφόρου επηρεάζεται πολύ ισχυρά από την παρουσία ιόντων (πχ  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ) με ποιο σημαντικό το ιόν του ασβεστίου ( $\text{Ca}^{2+}$ ) με το οποίο σχηματίζει το σχεδόν αδιάλυτο υδροξυαπατίτη ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Για την διάλυση του φωσφόρου από την μορφή αυτή απαιτούνται διάφορες μικροβιακές δραστηριότητες. Όταν ο φώσφορος είναι σε οργανική μορφή τότε τα μικροφύκη εκκρίνουν φωσφατάσες και με αυτό τον τρόπο ο οργανικός φώσφορος μετατρέπεται σε ορθοφωσφορικό φώσφορο. Η φωσφατάσες εκκρίνονται σε μεγαλύτερο βαθμό όταν ο ορθοφωσφορικός φώσφορος είναι σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. (Oliver and Ganf, 2000, Stal, 2012). Όταν η συγκέντρωση φωσφόρου στο περιβάλλον είναι χαμηλή τότε τα μικροφύκη τον αποθηκεύουν σε μεγαλύτερες ποσότητες από αυτές που χρειάζονται άμεσα. Η αποθήκευση του φωσφόρου γίνεται υπό μορφή πολυφωσφορικών κόκκων και μπορεί να καλύψει τις ανάγκες δύο ή ακόμα και τριών κύκλων διαίρεσης (γενιές) (Oliver, et al., 2012, Powell, et al., 2011).

### 3.4.7 Αλατότητα

Υπάρχουν ήδη μικροφυκών, όπως για παράδειγμα η *Dunaliella salina* που αναπτύσσονται καλύτερα σε αλμυρά ή υφάλμυρα νερά προϋποθέτοντας σχετικά μεγάλες συγκεντρώσεις αλάτων. Άλλα μικροφύκη όπως για παράδειγμα το *Chlorella*, *Arthrospira*,



*Porphyridium* κλπ είναι απλώς ανεκτικά ως ανθεκτικά σε μεγάλες συγκεντρώσεις αλάτων, παρόλο που δεν τις προϋποθέτουν. Πολλά είδη δεν αναπτύσσονται σε υποστρώματα με αλατότητα περισσότερη από  $4 \text{ g l}^{-1}$ . Για τα είδη που έχουν ανθεκτικότητα στην αλατότητα, αυτή βρέθηκε ότι πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 20 και  $24 \text{ g l}^{-1}$ , αν και κάθε είδος έχει την δικιά του βέλτιστη τιμή. Η αυξημένη αλατότητα επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη των μικροφυκών επιδρώντας άμεσα στο σύστημα της φωτοσύνθεσης (φωτοσύστημα II) (Barsanti and Gualtieri, 2006, Bilanovic, et al., 2009, Richmond, 2004).

#### 3.4.8 pH

Τα περισσότερα μικροφύκη αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με pH που κυμαίνεται μεταξύ 7 και 9. Παρόλα αυτά υπάρχουν είδη που είναι οξύφιλα (όπως το *Chlamydomonas acidophila*) αλλά και αλκαλόφιλα (όπως το *Arthrospira*). Απότομη αλλαγή στο pH μπορεί να έχει καταστροφικές επιπτώσεις στην καλλιέργεια. Όπως αναφέρθηκε και πριν, κατά την φωτοσύνθεση το pH της καλλιέργειας έχει την τάση να αυξάνεται. Αν το pH αυξηθεί πάνω από μια τιμή τότε επέρχεται κυτταρόλυση. Το αντίθετο συμβαίνει όταν χρησιμοποιείται αμμωνία ως πηγή αζώτου, όπου κατά την πρόσληψή της από τα μικροφύκη παράγονται ιόντα  $\text{H}^+$ , ωθώντας το pH να μειωθεί. Μεγάλες τιμές του pH ευνοούν την στερεοποίηση και καθίζηση του φωσφόρου με ανάλογες επιπτώσεις στην καλή ανάπτυξη των μικροφυκών (Borowitzka, 1998, Richmond, 2004).

#### 3.5 Συγκομιδή

Η συγκομιδή των μικροφυκών είναι ένα πεδίο με μεγάλα περιθώρια έρευνας, δεδομένου ότι οι μέθοδοι συγκομιδής που χρησιμοποιούνται μέχρι τώρα είναι είτε αναποτελεσματικές είναι ενεργειακόβρες. Το κόστος της συγκομιδής μπορεί να ανέλθει στο 20-30% του συνολικού κόστους παραγωγής της βιομάζας (Molina Grima, et al., 2003). Η μέθοδοι συγκομιδής που έχουν αναπτυχθεί μέχρι στιγμής βασίζονται σε χημικές, φυσικές, βιολογικές και ηλεκτρικές ιδιότητες των μικροφυκών. Για την συγκομιδή της βιομάζας χρησιμοποιούνται οι εξής σημαντικότερες μέθοδοι: α) φιλτράρισμα β) φυγοκέντριση γ) συσσωμάτωση-κροκίδωση και δ) επίπλευση (flocculation).

Το φιλτράρισμα σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους είναι η πιο ανταγωνιστική μέθοδος συγκομιδής μικροφυκών. Υπάρχουν διάφοροι τύποι φιλτραρίσματος, όπως το φιλτράρισμα εφαπτόμενης ροής (TFF, tangential flow filtration), διασταυρούμενης ροής (cross-flow filtration), φιλτράρισμα με τύμπανο, φιλτράρισμα μέσω λεπτόκοκκων υλικών όπως άμμος ή ιλύς και φιλτράρισμα υπό πίεση ή υπό κενό. Από τις παραπάνω μεθόδους φιλτραρίσματος, η καθεμιά προσιδιάζει στα χαρακτηριστικά μικροφύκους που πρόκειται να συγκομιστεί. Επειδή οι διαστάσεις των μικροφυκών ποικίλουν έντονα, είναι δύσκολη η εύρεση μιας καθολικής μεθόδου συγκομιδής που να έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα σε όλα τα είδη μικροφυκών. Το κυριότερο μειονέκτημα του φιλτραρίσματος για την συγκομιδή της βιομάζας είναι η έμφραξη των πόρων του μέσου φιλτραρίσματος, το οποίο μπορεί να αντιμετωπιστεί με ανάποδες πλύσεις των φίλτρων (Christenson and Sims, 2011, Molina Grima, et al., 2003, Salim, et al., 2010, Uduman, et al., 2010).

Η φυγοκέντριση σαν μέθοδος συγκομιδής έχει εξεταστεί αρκετά και έχει αποδειχθεί ότι έχει καλύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με άλλες μεθόδους. Προτιμάται σαν μέθοδος όταν είναι να συγκομιστεί βιομάζα μικροφυκών με μεγάλη προστιθέμενη αξία γιατί σαν μέθοδος είναι ενεργειακόβρος και προσθέτει μεγάλα κόστη στο τελικό προϊόν (Christenson and Sims, 2011, Molina Grima, et al., 2003).

Η μέθοδος συγκομιδής με συσσωμάτωση βασίζεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα των μικροφυκών είναι ηλεκτρικά αρνητικώς φορτισμένα εμποδίζοντας έτσι την συνάντησή τους και την δημιουργία συσσωματωμάτων. Ουδετεροποιώντας το ηλεκτρικό

φορτίο είναι δυνατό να δημιουργηθεί συσσωμάτωμα που καθιζάνει στο κάτω μέρος του περιέκτη τους. Για την ουδετεροποίηση των ηλεκτρικών φορτίων χρησιμοποιούνται διάφορες χημικές ουσίες όπως μεταλλικά άλατα ( $(\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ),  $\text{FeCl}_3$  κλπ) διάφορα πολυμερή (χιτοσίνη, κατιονικό άμυλο κλπ) ή και χρήση χημικών ουσιών για την αύξηση της τιμής του pH της καλλιέργειας ( $\text{NaOH}$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ). Η χρήση μεταλλικών αλάτων μπορεί να είναι ανεπιθύμητη όταν τα μικροφύκη καλλιεργούνται και προορίζονται για διάφορες χρήσεις όπου η βιομάζα θα πρέπει να έχει κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά και να είναι απαλλαγμένη από τα διάφορα μέταλλα (Parazi, et al., 2010, Salim, et al., 2010, Vandamme, et al., 2012, Vandamme, et al., 2010).

#### 4. Βιωσιμότητα και αειφορεία

Τα συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών όπως περιγράφηκαν παραπάνω, είναι πολύπλοκα και το κόστος παραγωγής βιομάζας είναι μεγάλο. Τα κυριότερα υποσυστήματα που συμβάλουν ιδιαίτερα στο αυξημένο κόστος παραγωγής είναι: 1) σύστημα φωτισμού, 2) ανάδευση, 3) συγκομιδή και 4) η χρήση θρεπτικών στοιχείων. Σε γενικές γραμμές οι ανοιχτές δεξαμενές, οι οποίες είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες για καλλιέργεια μικροφυκών σε μεγάλη κλίμακα είναι και αυτές που έχουν λιγότερο κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας (Norsker, et al., 2011). Μέχρι στιγμής σε μεγάλη κλίμακα τα μικροφύκη καλλιεργούνται για την παραγωγή προϊόντων μεγάλης αξίας όπως για παράδειγμα τα μικροφύκη *Arthrospira (Spirulina)*, *Chlorella*, *Dunaliella* κτλ για την παραγωγή συμπληρωμάτων διατροφής, προϊόντων κοσμετολογίας κ.α. (Πίνακας 2).

Η καλλιέργεια των μικροφυκών για παραγωγή βιοενέργειας μέχρι στιγμής κρίνεται οικονομικά ασύμφορη αλλά και μη αειφόρα. Διάφορες μελέτες βασισμένες στη μεθοδολογία της Ανάλυσης Κύκλου Ζωής (Life cycle analysis-LCA) και Κόστος Κύκλου Ζωής (Life cycle cost-LCC) δείχνουν ότι με την παρούσα τεχνολογία οι εισροές ενέργειας είναι μεγαλύτερες από τις εκροές, που σημαίνει ότι το ενεργειακό ισοζύγιο είναι αρνητικό. Οι ανοιχτές δεξαμενές υπολογίζεται ότι έχουν 32% λιγότερες ενεργειακές απαιτήσεις για την κατασκευή και λειτουργία τους. Επίσης λιγότερο καλύτερα αποτελέσματα έδωσαν είδη μικροφυκών που αναπτύσσονται σε υφάλμυρα ως αλμυρά νερά σε σχέση με αυτά που αναπτύσσονται σε γλυκά νερά. Παρόλα αυτά όλες οι μελέτες LCA καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι το ισοζύγιο μπορεί να βελτιωθεί με την χρήση αποβλήτων για την κάλυψη των αναγκών ανάπτυξης της βιομάζας (Clarens, et al., 2010, Razon and Tan, 2011, Resurreccion, et al., 2012, Soratana and Landis, 2011).

**Πίνακας 1** Παγκόσμια παραγωγή προϊόντων από μικροφύκη (Πηγή: Brennan and Owende (2010))

Μικροφύκος	Ετήσια παραγωγή	Παραγωγός χώρα	Χρήση	Τιμή (€)
<i>Arthrospira (Spirulina)</i>	3000 τόνοι ξηρού βάρους	Κίνα, Ινδία,	Διατροφή	36 kg <sup>-1</sup>
		ΗΠΑ, Μιανμάρη, Ιαπωνία	Κοσμετολογία Φυκο-πρωτεΐνες	11 mg <sup>-1</sup>
<i>Chlorella</i>	2000 τόνοι ξηρού βάρους	Ταϊβάν,	Διατροφή	36 kg <sup>-1</sup>
		Γερμανία, Ιαπωνία	Κοσμετολογία Ιχθυοκαλλιέργεια	50 Γ <sup>-1</sup>

<i>Dunaliella</i>	1200 ξηρού βάρους	τόνοι	Αυστραλία, Ισραήλ, Ιαπωνία	ΗΠΑ,	Διατροφή Κοσμετολογία Β-καροτίνη	215-2150 kg <sup>-1</sup>
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	500 ξηρού βάρους	τόνοι	ΗΠΑ		Διατροφή	
<i>Haematococcus</i>	300 ξηρού βάρους	τόνοι	Ισραήλ, Ινδία	ΗΠΑ,	Ιχθυοκαλλιέργεια Ασταξανθίνη	50 l <sup>-1</sup>
<i>Cryptocodinium</i>	240 ξηρού βάρους	τόνοι	ΗΠΑ		Λιπαρά (DHA) οξέα	43 g <sup>-1</sup>
<i>Schizochytrium</i>	10 ξηρού βάρους	τόνοι	ΗΠΑ		Λιπαρά (DHA) οξέα	43 g <sup>-1</sup>

### Βιβλιογραφία

1. Abeliovich A. (2007) "Water pollution and bioremediation by microalgae: Water purification. Algae in wastewater oxidation ponds". In: eds. Handbook of Microalgal Culture, p. 430-438
2. Abreu A. P., Fernandes B., Vicente A. A., Teixeira J. and Dragone G. (2012) "Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source". *Bioresource Technology*, 118): 61-66
3. Amin S. (2009) "Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae". *Energy Conversion and Management*, 50(7): 1834-1840
4. Andersen R. A. (1996) "Algae". In: J. C. Hunter-Cevera and C. A. Belt eds. Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry, London, UK, p. 29-64
5. Andrade M. R. and Costa J. A. V. (2007) "Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate". *Aquaculture*, 264(1-4): 130-134
6. Anonymous (1994) "World reserves growing faster than production". *Gas World International*, 199(4907): 11-13
7. Anonymous (1999) "Resurgent Oil Demand, OPEC Cohesion Set Stage for Optimistic Outlook for Oil Industry at the Turn of the Century". *Oil Gas Journal*, 97(42): 49-55
8. Azov Y. and Goldman J. C. (1982) "Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures". *Applied and Environmental Microbiology*, 43(4): 735-739
9. Badger M. R. and Price G. D. (2003) "CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution". *Journal of Experimental Botany*, 54): 609-622
10. Barclay W. R., Terry K. L., Nagle N. J., Weissman J. C. and Goebel R. P. (1987) "Potential of New Strains of Marine and Inland Saline-Adapted Microalgae for Aquaculture". *Journal of the World Aquaculture Society*, 18(4): 218-228
11. Barsanti L. and Gualtieri P. (2006) "*Algae: Anatomy, biochemistry and biotechnology*". New York, CRC Taylor & Francis
12. Becker E. W. (1994) "*Microalgae: Biotechnology and Microbiology*". Cambridge, Cambridge University Press
13. Bilanovic D., Andargatchew A., Kroeger T. and Shelef G. (2009) "Freshwater and marine microalgae sequestering of CO<sub>2</sub> at different C and N concentrations –

- Response surface methodology analysis". *Energy Conversion and Management*, 50(2): 262-267
14. Blier R., Laliberté G. and de la Noüe J. (1995) "Tertiary treatment of cheese factory anaerobic effluent with *Phormidium bohneri* and *Micractinium pusillum*". *Bioresource Technology*, 52(2): 151-155
  15. Bongiorno L. M. and Pietra F. (1996) "Marine natural products for industrial applications". *Chemistry and Industry*, 2): 54-58
  16. Borowitzka M. (1998) "Limits to growth". In: Y. S. Wong and N. F. Y. Tam eds. *Wastewater treatment with algae*, p. 203-226
  17. Borowitzka M. A. (1999) "Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters". *Journal of Biotechnology*, 70(1-3): 313-321
  18. Boussiba S. and Gibson J. (1991) "Ammonia translocation in cyanobacteria". *FEMS Microbiology Letters*, 88(1): 1-14
  19. Brányiková I., Maršálková B., Doucha J., Brányik T., Bišová K., Zachleder V. and Vítová M. (2011) "Microalgae—novel highly efficient starch producers". *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4): 766-776
  20. Brennan L. and Owende P. (2010) "Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2): 557-577
  21. Brennan L. and Owende P. (2013) "Biofuels from microalgae: Towards meeting advanced fuel standards". In: J. W. Lee eds. *Advanced biofuels and bioproducts*, p. 553-599
  22. Brock T. D. (1967) "Life at high temperatures". *Science*, 158): 1012-1019
  23. Bunt J. S. and Wood E. J. C. (1963) "Microbiology and Antarctic sea ice". *Nature*, 199): 1254-1255
  24. Cairns J. (1998) "Malthus, exemptionism and the risk/uncertainty paradox". *Hydrobiologia*, 384): 1-5
  25. Cañizares R. O. and Domínguez A. R. (1993) "Growth of *Spirulina maxima* on swine waste". *Bioresource Technology*, 45(1): 73-75
  26. Cañizares R. O., Rivas L., Montes C., Domínguez A. R., Travieso L. and Benitez F. (1994) "Aerated swine-wastewater treatment with K-carrageenan-immobilized *Spirulina maxima*". *Bioresource Technology*, 47(1): 89-91
  27. Carvalho A., Monteiro C. and Malcata F. (2009) "Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova lutheri*". *Journal of Applied Phycology*, 21(5): 543-552
  28. Carvalho A., Silva S., Baptista J. and Malcata F. (2011) "Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5): 1275-1288
  29. Carvalho A. P., Meireles L. A. and Malcata F. X. (2006) "Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances". *Biotechnology Progress*, 22(6): 1490-1506
  30. Chaumont D. (1993) "Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture". *Journal of Applied Phycology*, 5(6): 593-604
  31. Chen C.-Y., Yeh K.-L., Aisyah R., Lee D.-J. and Chang J.-S. (2011) "Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review". *Bioresource Technology*, 102(1): 71-81
  32. Chen F. (1996) "High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth". *Trends in Biotechnology*, 14(11): 421-426
  33. Chisti Y. (2007) "Biodiesel from microalgae". *Biotechnology Advances*, 25(3): 294-306



34. Chisti Y. and Moo-Young M. (2002) "Bioreactors". In: R. A. Meyers eds. *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, San Diego, p. 247-271
35. Chojnacka K. and Marquez-Rocha F. J. (2004) "Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae". *Biotechnology Advances*, 3): 21-34
36. Chojnacka K. and Zielińska A. (2011) "Evaluation of growth yield of *Spirulina* (*Arthrospira*) sp. in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*): 1-9
37. Christenson L. and Sims R. (2011) "Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts". *Biotechnology Advances*, 29(6): 686–702
38. Clarens A. F., Resurreccion E. P., White M. A. and Colosi L. M. (2010) "Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks". *Environmental Science & Technology*, 44(5): 1813-1819
39. Costa J. A. V., Cozza K. L., Oliveira L. and Magagnin G. (2001) "Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(5): 439-442
40. Danesi E. D. G., de O. Rangel-Yagui C., de Carvalho J. C. M. and Sato S. (2002) "An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*". *Biomass and Bioenergy*, 23(4): 261-269
41. Darley W. M. (1982) "Algal biology: A physical approach". In: J. F. Wilkinson eds. *Basic microbiology*, London, p. 30-52
42. Day J. G., Slocombe S. P. and Stanley M. S. (2011) "Overcoming biological constraints to enable the exploitation of microalgae for biofuels". *Bioresource Technology*):
43. de la Noüe J. and Bassères A. (1989) "Biotreatment of anaerobically digested swine manure with microalgae". *Biological Wastes*, 29(1): 17-31
44. de la Noüe J., Laliberté G. and Proulx D. (1992) "Algae and waste water". *Journal of Applied Phycology*, 4(3): 247-254
45. De Pauw N. and Persoone G. (1988) "Micro-algae for aquaculture". In: M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka eds. *Micro-Algal Biotechnology*, Cambridge, p. 197-221
46. Demirbas A. (2010) "Use of algae as biofuel sources". *Energy Conversion and Management*, 51(12): 2738-2749
47. Doucha J., Straka F. and Lívanský K. (2005) "Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella* sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor". *Journal of Applied Phycology*, 17(5): 403-412
48. Dubinsky Z., Berner T. and Aaronson S. (1978) "*Potential of large-scale algal culture for biomass and lipid production in arid lands*".
49. Eriksen N. (2008) "The technology of microalgal culturing". *Biotechnology Letters*, 30(9): 1525-1536
50. Falkowski P. G. (1980) "*Primary Productivity in the Sea*". New York, Plenum Press
51. Fernandes B., Dragone G., Teixeira J. and Vicente A. (2010) "Light regime characterization in an airlift photobioreactor for production of microalgae with high starch content". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161(1): 218-226
52. Ferreira L. S., Rodrigues M. S., Converti A., Sato S. and Carvalho J. C. M. (2012) "*Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* cultivation in tubular photobioreactor: Use of no-cost CO<sub>2</sub> from ethanol fermentation". *Applied Energy*, 92(0): 379-385

53. Gao C., Zhai Y., Ding Y. and Wu Q. (2010) "Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*". *Applied Energy*, 87(3): 756-761
54. Giordano M., Beardall J. and Raven J. (2005) "CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution". *Annual Review of Plant Biology*, 56): 99-131
55. González C., Marciniak J., Villaverde S., León C., García P. A. and Muñoz R. (2008) "Efficient nutrient removal from swine manure in a tubular biofilm photobioreactor using algae-bacteria consortia". *Water Science and Technology*, 58(1): 95-102
56. Greep R. O. (1998) "Whither the global population problem". *Biochemical Pharmacology*, 55(4): 383-386
57. Grewe C. B. and Pulz O. (2012) "The Biotechnology of Cyanobacteria". In: B. A. Whitton eds. *Ecology of Cyanobacteria II*, p. 707-739
58. Grobbelaar J. U. (2004) "Algal nutrition. Mineral nutrition". In: A. Richmond eds. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, Oxford, p. 97-115
59. Guedes A. C. and Malcata F. X. (2012) "Nutritional Value and Uses of Microalgae in Aquaculture". In: Z. Muchlisin eds. *Aquaculture*, p.
60. Harun R., Jason W. S. Y., Cherrington T. and Danquah M. K. (2010) "Microalgal biomass as a cellulosic fermentation feedstock for, bioethanol production". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, In Press, Uncorrected Proof):
61. Harun R., Singh M., Forde G. M. and Danquah M. K. (2010) "Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(3): 1037-1047
62. Heredia-Arroyo T., Wei W., Ruan R. and Hu B. (2011) "Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials". *Biomass and Bioenergy*, 35(5): 2245-2253
63. Hodaifa G., Martínez M. E. and Sánchez S. (2008) "Use of industrial wastewater from olive-oil extraction for biomass production of *Scenedesmus obliquus*". *Bioresource Technology*, 99(5): 1111-1117
64. Hsieh C.-H. and Wu W.-T. (2009) "Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation". *Bioresource Technology*, 100(17): 3921-3926
65. Isichei A. O. (1990) "The role of algae and cyanobacteria in arid lands. A review". *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 4(1): 1-17
66. Jassby A. (1988) "Spirulina: a model of microalgae as human food". In: C. Lembi and J. R. Waaland eds. *Algae and Human Affairs*, Cambridge, p. 149-179
67. Jensen S. and Knutsen G. (1993) "Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis *Spirulina platensis*". *Journal of Applied Phycology*, 5(5): 495-504
68. Jorquera O., Kiperstok A., Sales E. A., Embiruçu M. and Ghirardi M. L. (2010) "Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors". *Bioresource Technology*, 101(4): 1406-1413
69. Kay R. A. and Barton L. L. (1991) "Microalgae as food and supplement". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30(6): 555-573
70. Klatzmann J. (1996) "Overpopulation, threat or myth?". *Comptes Rendus de l'Academie d'Agriculture de France*, 82): 83-89
71. Kreeger K. Y. (1996) "Industry investors show increased interest in denizens of the deep". *The Scientist*, 10): 8-9

72. Kruse O. and Hankamer B. (2010) "Microalgal hydrogen production". *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3): 238-243
73. Kuhad R. C., Singh A., Tripathi K. K., Saxena R. K. and Eriksson K.-E. L. (1997) "Microorganisms as an Alternative Source of Protein". *Nutrition Reviews*, 55(3): 65-75
74. Lam M. K. and Lee K. T. (2012) "Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward". *Biotechnology Advances*, 30(3): 673–690
75. Lehr F. and Posten C. (2009) "Closed photo-bioreactors as tools for biofuel production". *Current Opinion in Biotechnology*, 20(3): 280-285
76. Lincoln E. P., Wilkie A. C. and French B. T. (1996) "Cyanobacterial process for renovating dairy wastewater". *Biomass and Bioenergy*, 10(1): 63-68
77. Mahadevaswamy M. and Venkataraman L. V. (1986) "Bioconversion of poultry droppings for biogas and algal production". *Agricultural Wastes*, 18(2): 93-101
78. Markou G., Chatzipavlidis I. and Georgakakis D. (2012) "Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in olive-oil mill wastewater treated with sodium hypochlorite". *Bioresource Technology*, 112(0): 234-241
79. Markou G. and Georgakakis D. (2011) "Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review". *Applied Energy*, 88(10): 3389-3401
80. Martin C., de la Noüe J. and Picard G. (1985) "Intensive cultivation of freshwater microalgae on aerated pig manure". *Biomass*, 7(4): 245-259
81. Mata T. M., Martins A. A. and Caetano N. S. (2010) "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1): 217-232
82. Matsudo M. C., Bezerra R. P., Sato S., Perego P., Converti A. and Carvalho J. C. M. (2009) "Repeated fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* using urea as nitrogen source". *Biochemical Engineering Journal*, 43(1): 52-57
83. Metting F. B. (1996) "Biodiversity and application of microalgae". *Journal of Industrial Microbiology*, 17(5): 477-489
84. Mitsui A. (1980) "Biosaline Research: The Use of Photosynthetic Marine Organisms in Food and Feed Production". In: A. Hollaender, J. C. Aller, E. Epstein, A. San Pietro and O. R. Zaborsky eds. *The Biosaline Concept*, New York, p. 177-215
85. Molina E., Fernández J., Ación F. G. and Chisti Y. (2001) "Tubular photobioreactor design for algal cultures". *Journal of Biotechnology*, 92(2): 113-131
86. Molina Grima E., Belarbi E. H., Ación Fernández F. G., Robles Medina A. and Chisti Y. (2003) "Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics". *Biotechnology Advances*, 20(7-8): 491-515
87. Molina Grima E., Fernández F. G. A., García Camacho F. and Chisti Y. (1999) "Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup". *Journal of Biotechnology*, 70(1–3): 231-247
88. Mulbry W., Kondrad S., Pizarro C. and Kebede-Westhead E. (2008) "Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: Algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers". *Bioresource Technology*, 99(17): 8137-8142
89. Mulbry W. W. and Wilkie A. C. (2001) "Growth of benthic freshwater algae on dairy manures". *Journal of Applied Phycology*, 13(4): 301-306
90. Norsker N.-H., Barbosa M. J., Vermuë M. H. and Wijffels R. H. (2011) "Microalgal production — A close look at the economics". *Biotechnology Advances*, 29(1): 24-27

91. Oliver R. L. and Ganf G. G. (2000) "Freshwaters blooms". In: B. A. Whitton and M. Potts eds. *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*, New York, p. 149-194
92. Oliver R. L., Hamilton D. P., Brookes J. D. and Ganf G. G. (2012) "Physiology, Blooms and Prediction of Planktonic Cyanobacteria". In: B. A. Whitton eds. *Ecology of Cyanobacteria II*, p. 155-194
93. Oswald W. J. (2003) "My sixty years in applied algology". *Journal of Applied Phycology*, 15(2): 99-106
94. Papazi A., Makridis P. and Divanach P. (2010) "Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants". *Journal of Applied Phycology*, 22(3): 349-355
95. Perez-Garcia O., Escalante F. M. E., de-Bashan L. E. and Bashan Y. (2011) "Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products". *Water Research*, 45(1): 11-36
96. Pittman J. K., Dean A. P. and Osundeko O. (2011) "The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources". *Bioresource Technology*, 102(1): 17-25
97. Posten C. and Schaub G. (2009) "Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels--A process view". *Journal of Biotechnology*, 142(1): 64-69
98. Powell N., Shilton A., Pratt S. and Chisti Y. (2011) "Luxury uptake of phosphorus by microalgae in full-scale waste stabilisation ponds". *Water Science and Technology*, 63(4): 704-709
99. Pulz O. and Gross W. (2004) "Valuable products from biotechnology of microalgae". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6): 635-648
100. Pulz O., Scheibenbogen K. and Groß W. (2008) "Biotechnology with Cyanobacteria and Microalgae". In: eds. *Biotechnology Set*, p. 105-136
101. Pulz O. P. (2001) "Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(3): 287-293
102. Rawat I., Ranjith Kumar R., Mutanda T. and Bux F. (2011) "Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production". *Applied Energy*, 88(10): 3411-3424
103. Razon L. F. (2012) "Life cycle energy and greenhouse gas profile of a process for the production of ammonium sulfate from nitrogen-fixing photosynthetic cyanobacteria". *Bioresource Technology*, 107(0): 339-346
104. Razon L. F. and Tan R. R. (2011) "Net energy analysis of the production of biodiesel and biogas from the microalgae: *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis*". *Applied Energy*, 88(10): 3507-3514
105. Regan D. L. and Gartside G. (1983) "*Liquid Fuels from Microalgae in Australia*". Melbourne, CSIRO
106. Resurreccion E. P., Colosi L. M., White M. A. and Clarens A. F. (2012) "Comparison of Algae Cultivation Methods for Bioenergy Production Using a Combined Life Cycle Assessment and Life Cycle Costing Approach". *Bioresource Technology*, (0): In press
107. Reynolds C. S. (2006) "*The ecology of phytoplankton*". Cambridge University Press
108. Richmond A. (1992) "Open systems for the mass production of photoautotrophic microalgae outdoors: physiological principles". *Journal of Applied Phycology*, 4(3): 281-286
109. Richmond A. (1999) "Physiological principles and modes of cultivation in mass production of photoautotrophic microalgae". In: Z. Cohen eds. *Chemical from Microalgae*, Philadelphia, p. 353-386



110. Rosa A. P. C. d., Carvalho L. F., Goldbeck L. and Costa J. A. V. (2011) "Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors". *Energy Conversion and Management*, 52(8–9): 3071-3073
111. Salim S., Bosma R., Vermuë M. and Wijffels R. (2010) "Harvesting of microalgae by bio-flocculation". *Journal of Applied Phycology*, 23(5): 849-855
112. Singh A., Nigam P. S. and Murphy J. D. (2011) "Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels". *Bioresource Technology*, 102(1): 10-16
113. Soratana K. and Landis A. E. (2011) "Evaluating industrial symbiosis and algae cultivation from a life cycle perspective". *Bioresource Technology*, 102(13): 6892-6901
114. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E. and Isambert A. (2006) "Commercial applications of microalgae". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2): 87-96
115. Stal L. J. (2012) "Cyanobacterial Mats and Stromatolites". In: B. A. Whitton eds. *Ecology of Cyanobacteria II*, p. 65-125
116. Suh I. and Lee C.-G. (2003) "Photobioreactor engineering: Design and performance". *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8(6): 313-321
117. Uduman N., Qi Y., Danquah M. K., Forde G. M. and Hoadley A. (2010) "Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels". *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 2(1): 012701
118. Ugwu C. U., Aoyagi H. and Uchiyama H. (2008) "Photobioreactors for mass cultivation of algae". *Bioresource Technology*, 99(10): 4021-4028
119. van den Hoek C., Mann D. G. and Jahns H. M. (1997) *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge, Cambridge University Press
120. Vandamme D., Foubert I., Fraeye I., Meesschaert B. and Muylaert K. (2012) "Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: Role of magnesium and calcium and practical implications". *Bioresource Technology*, 105(1): 114-119
121. Vandamme D., Foubert I., Meesschaert B. and Muylaert K. (2010) "Flocculation of microalgae using cationic starch". *Journal of Applied Phycology*, 22(4): 525-530
122. Vonshak A. (2002) "*Spirulina*: Growth, physiology and biochemistry". In: A. Vonshak eds. *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and Biotechnology*, London, p. 43-65
123. Wang B., Li Y., Wu N. and Lan C. (2008) "CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(5): 707-718
124. Wang C.-Y., Fu C.-C. and Liu Y.-C. (2007) "Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*". *Biochemical Engineering Journal*, 37(1): 21-25
125. Waterbury J. B. (2006) "The Cyanobacteria—Isolation, Purification and Identification". In: M. Dworkin eds. *The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria*, p. 1053–1073
126. Wiessner W., Schnepf E. and Starr R. C. (1995) *Algae, Environment Human Affairs*. Bristol, UK, Biopress Ltd
127. Wijffels R. H. and Barbosa M. J. (2010) "An outlook on microalgal biofuels". *Science*, 329(5993): 796-799
128. Zhang H., Wang W., Li Y., Yang W. and Shen G. (2011) "Mixotrophic cultivation of *Botryococcus braunii*". *Biomass and Bioenergy*, 35(5): 1710-1715