



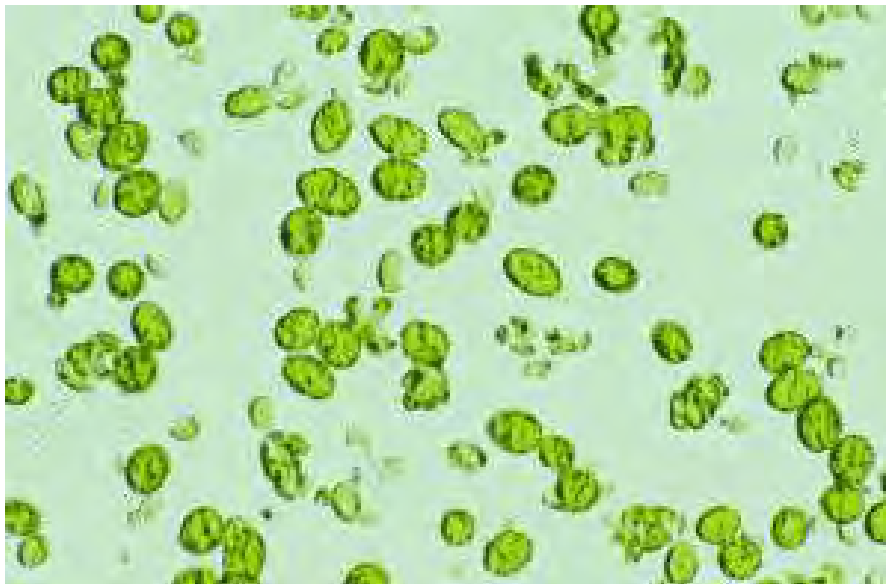
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΑΙ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Βιοενεργητική Στρατηγική Βιοαποικοδόμησης της  
Υδροξυτυροσόλης από το Μονοκύτταρο Χλωροφύκος  
*Scenedesmus obliquus*

Bioenergetic Strategy for the Biodegradation of  
Hydroxytyrosol by the Unicellular Green Alga  
*Scenedesmus obliquus*



Διπλωματική Εργασία  
Μυρτώ Συμεωνίδη

## Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Κοτζαμπάσης Κυριάκος, **Επιβλέπων**

**Καθηγητής Φυσιολογίας και Βιοχημείας Φυτικών Οργανισμών**, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

2. Καρπούζας Δημήτριος, **Συνεπιβλέπων**

**Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας**, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3. Μόσιαλος Δημήτριος, **Μέλος**

**Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων**, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

*Εικόνα εξωφύλλου: Κύτταρα του μονοκύτταρου χλωροφύκου Scenedesmus obliquus σε οπτικό μικροσκόπιο*

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ξεκινήσω ευχαριστώντας τον καθηγητή Φυσιολογίας και Βιοχημείας Φυτικών Οργανισμών του Πανεπιστημίου Κρήτης, Κοτζαμπάση Κυριάκο, που δέχτηκε να εκτελέσω τη διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψή του, και διαδραμάτισε σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση των επιστημονικών μου ενδιαφερόντων και μελλοντικών βλέψεων.

Φυσικά, θέλω να ευχαριστήσω τη Δρ. Παπαζή Αικατερίνη, αλλά και τον Ιωάννου Αντρέα, για την κατανόηση που μου έδειξε και την υπομονή να μου διδάξουν ότι χρειάστηκε να ξέρω για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Τέλος, δε μπορώ να παραλείψω την οικογένειά μου και τους φίλους, που στάθηκαν δίπλα μου από την αρχή των φοιτητικών μου χρόνων μέχρι το τέλος τους.

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Abstract .....	5
Εισαγωγή .....	6
Παραγωγική Διαδικασία Ελαιόλαδου .....	6
Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου .....	10
Προβλήματα σε Περιβάλλον και Υγεία .....	12
Διαχείριση των Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου .....	14
Βιοαποικοδόμηση Φαινολικών Ενώσεων από Μικροφύκη .....	14
Σκοπός .....	17
Υλικά και Μέθοδοι .....	17
Οργανισμός.....	17
Συνθήκες Ανάπτυξης .....	18
Εκτίμηση Κυτταρικού Όγκου.....	20
Μετρήσεις Επαγωγικού Φθορισμού – Καταγραφή της Μοριακής Δομής και Λειτουργίας του Φωτοσυνθετικού Μηχανισμού .....	21
Ποσοτική και Ποιοτική Ανάλυση Φαινολικών Ενώσεων .....	25
Αποτελέσματα .....	26
Επίδραση της Υδροξυτυροσόλης σε Αυτότροφες Καλλιέργειες <i>Scenedesmus obliquus</i> .....	26
Βιοαποικοδόμηση της Υδροξυτυροσόλης σε Αυτότροφες Καλλιέργειες <i>Scenedesmus     obliquus</i> .....	29
Επίδραση του Συνδυασμού Υδροξυτυροσόλης και Τυροσόλης σε Αυτότροφες Καλλιέργειες <i>Scenedesmus obliquus</i> .....	31
Βιοαποικοδόμηση Συνδυασμού Υδροξυτυροσόλης και Τυροσόλης σε Αυτότροφες Καλλιέργειες <i>Scenedesmus obliquus</i> .....	33
Συζήτηση.....	35
Βιβλιογραφία .....	39

## Περίληψη

Τα λύματα των ελαιοτριβείων έχουν σημαντικές ρυπαντικές ιδιότητες, κυρίως λόγω της υψηλής συγκέντρωσης των αρωματικών ενώσεων (κυρίως φαινόλες) που είναι τοξικές και μπορεί να αναστείλουν τη βιολογική επεξεργασία. Η απόρριψη των 30 εκατομμυρίων m<sup>3</sup> αποβλήτων κάθε χρόνο, αποτελεί μείζον περιβαλλοντικό πρόβλημα, ιδίως στις χώρες της Μεσογείου. Η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη είναι δύο από τις κύριες φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στα απόβλητα των ελαιουργείων, οι οποίες είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές στον αέρα/οξυγόνο, τη βακτηριακή και ενζυμική αποικοδόμηση, και είναι ιδιαίτερα ρυπογόνες. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* για την βιοαποικοδόμηση της υδροξυτυροσόλης, αλλά και του συνδυασμού υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης, σε υψηλή (0,3mM) και χαμηλή συγκέντρωση (0,05mM). Η υδροξυτυροσόλη, όπως και η τυροσόλη, ανήκουν σε αυτές τις φαινολικές ενώσεις που δεν είναι τοξικές για το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus*. Το γεγονός αυτό έδωσε την ευκαιρία στο μικροφύκος, που αναπτύσσεται σε αυτότροφες συνθήκες, να βιοδιασπά την υδροξυτυροσόλη, προκειμένου να την χρησιμοποιήσει ως εναλλακτική πηγή άνθρακα/ενέργειας. Η απόδοση της βιοαποικοδομησιμότητας ήταν υψηλότερη στις υψηλότερες συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν. Σε αυτότροφες συνθήκες και με ταυτόχρονη παρουσία της υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης, η βιοαποικοδόμηση της υδροξυτυροσόλης ήταν η υψηλότερη. Υπό αυτές τις συνθήκες η βιοαποικοδόμηση ξεκίνησε από την πλέον απαιτητική ενεργειακά φαινολική ένωση (υδροξυτυροσόλη), ενώ η τυροσόλη παρουσίασε μόνο μία μικρή βιοαποικοδόμηση. Μετά την πλήρη βιοαποικοδόμηση της υδροξυτυροσόλης αναμένεται πιο αποτελεσματική βιοαποικοδομησιμότητα και της τυροσόλης. Αυτή η στρατηγική του μικροφύκους μπορεί να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω και σε έργα μεγάλης κλίμακας, ανοίγοντας το δρόμο για μελλοντικές βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

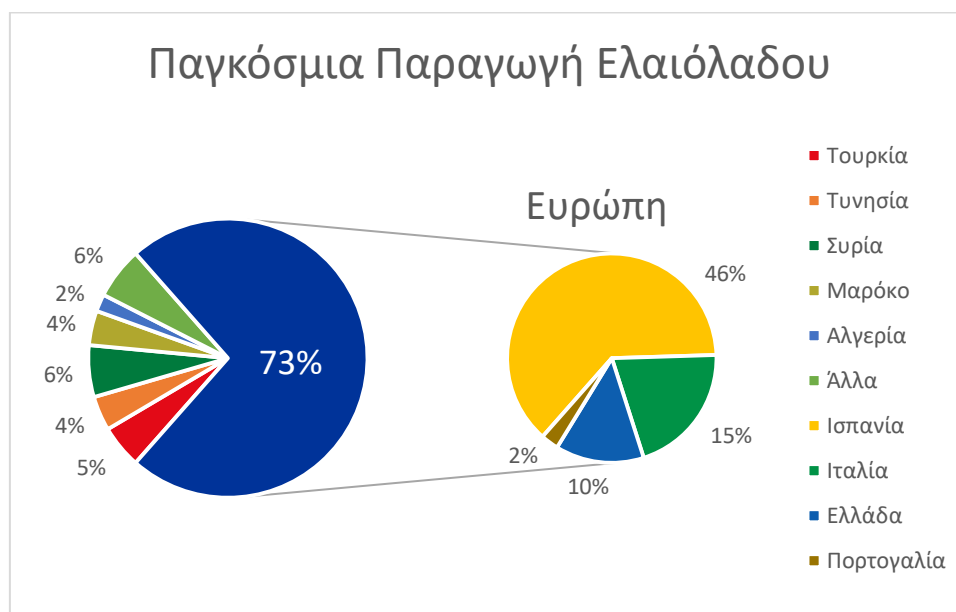
## Abstract

Wastewater from olive oil mills has significant polluting properties, especially due to the high concentration of aromatic compounds (mainly phenolics) which are toxic and may inhibit biological treatment. The disposal of 30 million m<sup>3</sup> of wastes every year is a major environmental problem especially in the Mediterranean countries. Hydroxytyrosol and tyrosol are two of the main phenolic compounds present in olive mill wastewaters, which are significantly resistant to air/oxygen, bacterial and enzymatic degradation, and are highly polluting. In this study the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus* was used to biodegrade hydroxytyrosol, as well as the combination of hydroxytyrosol and tyrosol, in high (0.3mM) and low concentration (0.05mM). Hydroxytyrosol and tyrosol belong to those phenolic compounds that were not toxic for the microalga *Scenedesmus obliquus*. This fact gave the opportunity to the microalga, grown under autotrophic conditions, to biodegrade hydroxytyrosol in order to use as alternative energy/carbon source. The biodegradability yield was higher in the higher tested concentrations. In the treatment with the simultaneous presence of hydroxytyrosol with tyrosol, the biodegradation yield of hydroxytyrosol was higher in the autotrophic culture medium. Under these conditions the biodegradation started by the most energetically demanding phenolic compound (hydroxytyrosol). Tyrosol appeared as a compound that was biodegraded a little when existed in parallel with hydroxytyrosol. After the biodegradation of hydroxytyrosol a more effective tyrosol biodegradability was expected as well. This strategy of microalga can be further used in large scale projects, paving the way for future biotechnological applications.

## Εισαγωγή

### Παραγωγική Διαδικασία Ελαιόλαδου

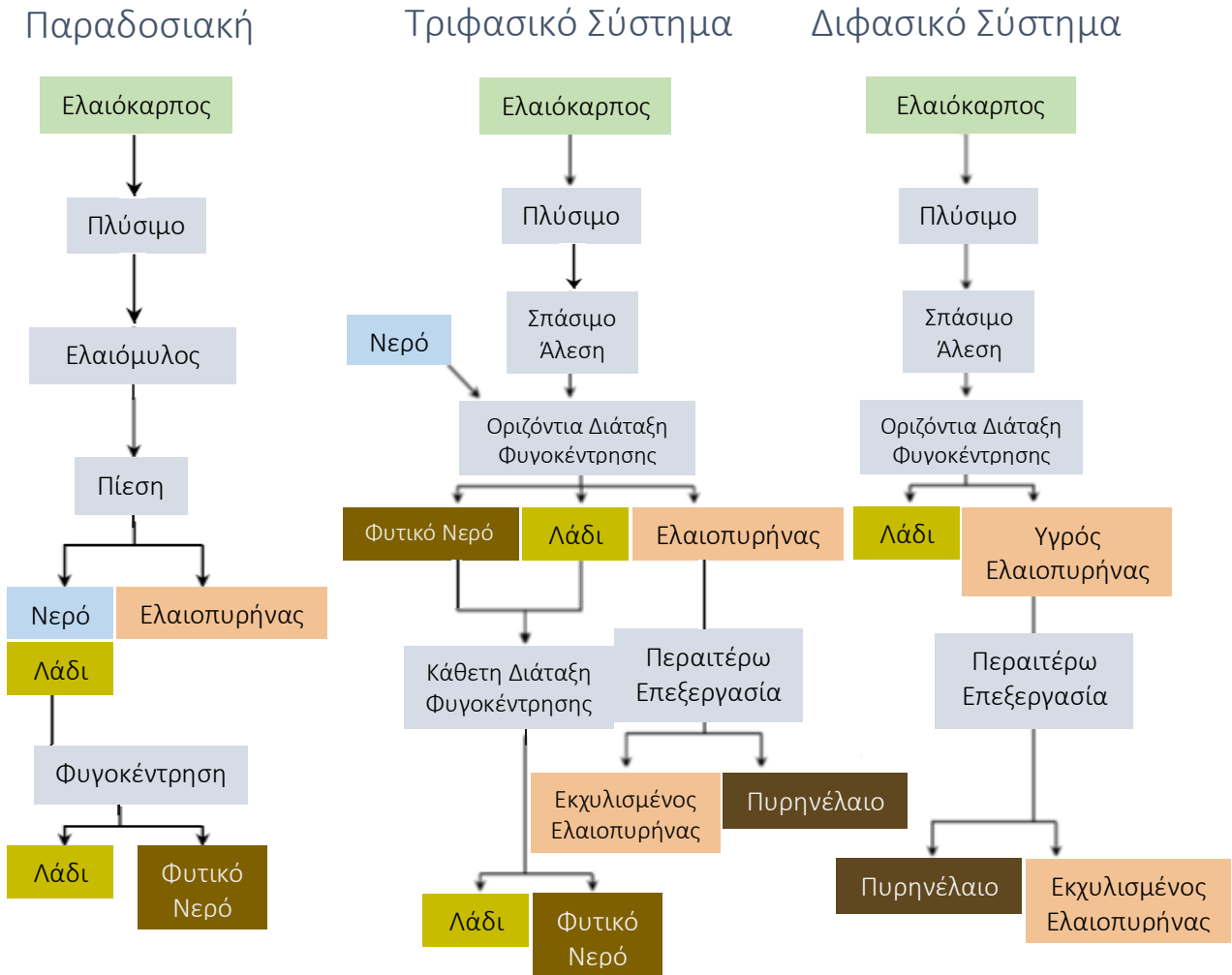
Η παραγωγή ελιάς και ελαιόλαδου εντοπίζεται κυρίως στις χώρες της Ευρώπης, με επίκεντρο χώρες της Μεσογείου, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 95% της παραγωγής, δηλαδή 2,5 – 3 εκατομμύρια τόνους το χρόνο [International Oil Council].



Εικόνα 1. Παγκόσμια παραγωγή ελαιόλαδου

Στην Ελλάδα, τον τρίτο στη σειρά ελαιοπαραγωγό μετά την Ισπανία και την Ιταλία (Εικόνα 1), αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους τομείς γεωργικής παραγωγής, με περίπου 400.000 τόνους ετησίως [Niaounakis and Halvadakis, 2006].

Για την παραγωγή του λαδιού υπάρχουν τρεις μέθοδοι, η παραδοσιακή μέθοδος πίεσης, και τα φυγοκεντρικά συστήματα τριών και δύο φάσεων (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Διάγραμμα ροής των τριών διαδικασιών ελαιοπαραγωγής [Μπλίκια, 2009]

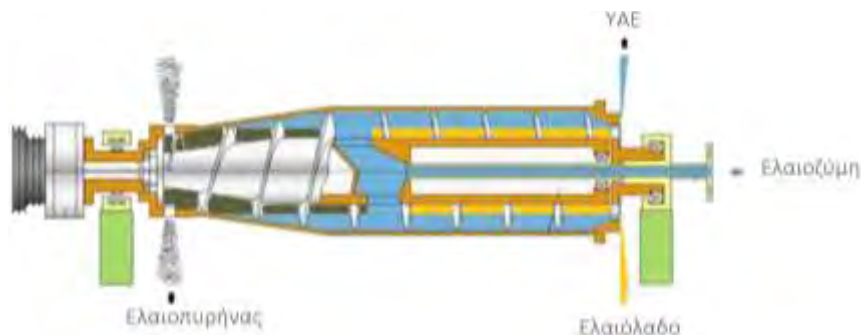
Η παραδοσιακή μέθοδος είναι μια ασυνεχής διαδικασία, στην οποία το άλεσμα των καρπών δημιουργεί μια υγρή φάση και στερεά απόβλητα (ελαιοπυρήνας). Από την υγρή φάση, μετά από επεξεργασία, προκύπτει το ελαιόλαδο και τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (ΥΑΕ, κασίγαρος) (Εικόνα 3). Κατά την τριφασική διαδικασία, η φυγόκεντρος διαχωρίζει την ελαιοζύμη σε ελαιόλαδο, ελαιοπυρήνα και ΥΑΕ (Εικόνα 3, 4). Το κύριο μειονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι η μεγάλη απαίτηση σε νερό ώστε να καταστεί δυνατός ο διαχωρισμός, και συνεπώς η παραγωγή σημαντικού όγκου ΥΑΕ. Το διφασικό σύστημα ήρθε να



Εικόνα 3. Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου



αντικαταστήσει το τριφασικό, καθώς η κύρια διαφορά μεταξύ τους είναι η ενσωμάτωση των ΥΑΕ στον ελαιοπυρήνα (ελαιοπολτός).



**Εικόνα 4.** Ο τριφασικός διαχωριστής. Η ελαιοζύμη διαχωρίζεται σε ελαιόλαδο (ελαφριά υγρή φάση), ΥΑΕ (βαριά υγρή φάση) και ελαιοπυρήνα (στερεά απόβλητα). Το ελαιόλαδο συλλέγεται από κάτω, και τα υγρά και στερεά απόβλητα αποβάλλονται από πάνω και μπροστά, αντίστοιχα.

Το διφασικό σύστημα πλεονεκτεί στην αισθητά μικρότερη κατανάλωση νερού, καθώς χρησιμοποιείται μόνο κατά το πλύσιμο, στην απουσία ΥΑΕ, και στις χαμηλότερες τιμές Βιοχημικά Απαιτούμενου Οξυγόνου (Biochemical Oxygen Demand, BOD), δηλαδή η ποσότητα του διαλυμένου οξυγόνου που χρησιμοποιείται από τους μικροοργανισμούς για την πλήρη οξείδωση της οργανικής ύλης σε δείγματα νερού. Από την άλλη, η υγρασία του ελαιοπολτού και το ρυπαντικό φορτίο είναι πλέον αυξημένα, καθιστώντας το χειρισμό, τη μεταφορά και την αποθήκευση των αποβλήτων προβληματική.

Ενδεικτικά παρατίθενται οι Πίνακες 1, 2, και 3 με κάποια από τα χαρακτηριστικά των παραπάνω μεθόδων [Μπλίκια, 2009].

**Πίνακας 1.** Μέση σύσταση υγρών αποβλήτων ελαιουργείων

Χαρακτηριστικά	Τιμή (g/L)
Ολικά στερεά	14 – 126
Πτητικά οργανικά στερεά	12 – 105
Ολικά αιωρούμενα στερεά	0,4 – 24
Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD)	25 – 162
Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD)	9,2 – 100
Ολικό οργανικό άζωτο	0,009 – 3,2
Ολικός φώσφορος	Ίχνη – 1,4

Πίνακας 2. Σύγκριση ορισμένων χαρακτηριστικών των αποβλήτων από τις διάφορες επεξεργασίες παραγωγής ελαιόλαδου

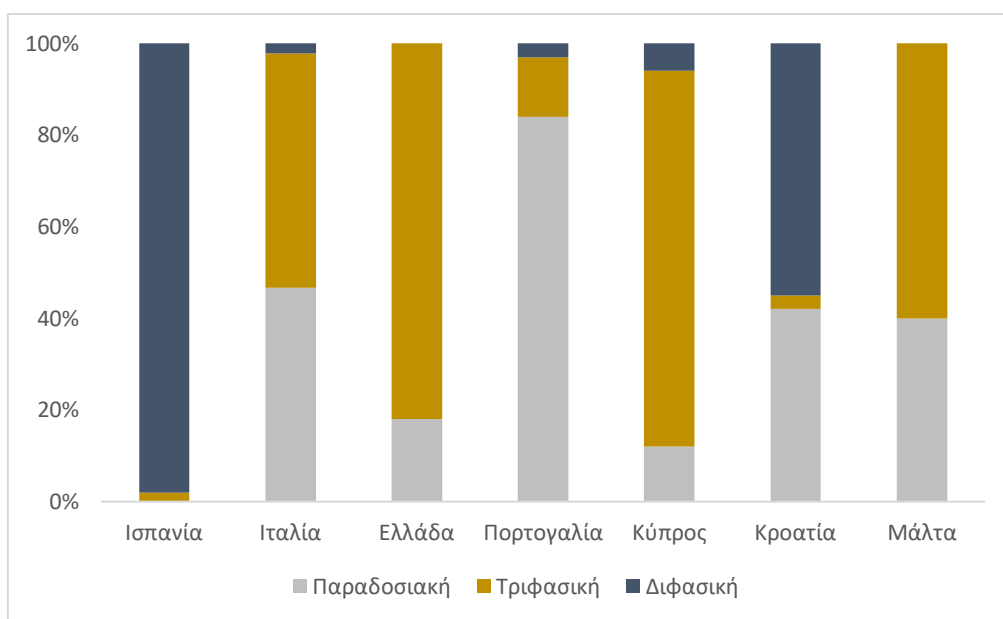
	Παραδοσιακή	Τριφασικό Σύστημα	Διφασικό Σύστημα
Στερεό υπόλειμμα (kg/tn καρπού)	330	500	800
Υγρά απόβλητα (L/tn καρπού)	600	1200	250
Φυτικό νερό των υγρών αποβλήτων	94	90	99
BOD υγρών αποβλήτων (g/L)	100	80	10
Πολυφαινόλες στα υγρά απόβλητα (mg/L)	203	164	200
Δείκτης πικρότητας	1,4	0,5	-

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά των αποβλήτων των παραδοσιακών και των φυγοκεντρικών ελαιουργείων

	Παραδοσιακό	Φυγοκεντρικό
pH	4,5 – 6,5	4,7 – 5,2
<i>Ρυπογόνο Δυναμικό</i>		
Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD) (g/L)	120 – 130	45 – 60
Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD) (g/L)	90 – 100	35 – 48
Αιωρούμενα στερεά (%)	0,1	0,9
Ολικά στερεά (%)	12	6
Ολικά οργανικά στερεά (%)	10,5	5,5
Ολικά ανόργανα στερεά (%)	1,5	0,5
<i>Οργανικές ουσίες (%)</i>		
Ολικά σάκχαρα	2 – 8	0,5 – 2,6
Αζωτούχες ενώσεις	0,5 – 2	1,7 – 2,4
Οργανικά οξέα	0,5 – 1	0,2 – 0,4
Πολυαλκοόλες	1 – 1,5	0,3 – 0,5
Πηκτίνες, Ταννίνες	1 – 1,5	0,2 – 0,4
Πολυφαινόλες	2 – 2,4	0,3 – 0,8
Λίπη	0,03 – 1	0,5 – 2,3
<i>Ανόργανα Στοιχεία (%)</i>		
P	0,11	0,03
K	0,72	0,27
Ca	0,07	0,02
Mg	0,04	0,01
Na	0,09	0,03

Η συγκέντρωση των πολυφαινολών στο ελαιόλαδο του τριφασικού συστήματος είναι μικρότερη λόγω του προστιθέμενου νερού, ενώ το παραγόμενο από διφασικό σύστημα ελαιόλαδο είναι υψηλότερης ποιότητας και σταθερότερο στην οξείδωση (Πίνακας 2). Τα φυγοκεντρικά συστήματα παράγουν απόβλητα χαμηλότερης περιεκτικότητας σε στερεά, συγκριτικά με τα παραδοσιακά (Πίνακας 3).

Οι μέθοδοι εξαγωγής του ελαιόλαδου ποικίλουν ανάλογα με τη χώρα στην Ισπανία επικρατεί κατά 98% το διφασικό σύστημα, στην Ιταλία και στην Ελλάδα συναντάμε κυρίως το τριφασικό (Εικόνα 5). Τα παραγόμενα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου αποτελούν μια πρόκληση για χώρες που έχουν υιοθετήσει το σύστημα τριών φάσεων.



Εικόνα 5. Τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ελαιόλαδου στην Ευρώπη [Kotronarou and Méndez, 2003]

## Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου

Τα υγρά απόβλητα ελαιουργείου, ή αλλιώς κασίγαρος, αποτελούν ένα φυτικό εκχύλισμα προερχόμενο από τη μάλαξη, τη φυγοκέντρωση σε τριφασικό σύστημα, και τον ελαιοδιαχωρισμό του μείγματος νερού και χυμού του ελαιοκάρπου. Διαθέτει σκούρο θολό χρώμα (με απόχρωση από κίτρινο - πράσινο έως καφέ-μαύρο), το οποίο εξαρτάται από την αναλογία των συστατικών του, κυρίως τις ταννίνες. Η οσμή είναι

χαρακτηριστικά όξινη, κάτι που οφείλεται στο πλήθος πτητικών οξέων [Μπαλατσούρας, 1997; Tsagaraki et al., 2006]. Ο κασίγαρος είναι πλούσιος σε οργανικά και ανόργανα υλικά: πηκτίνες, ταννίνες, σάκχαρα, οργανικά οξέα, ανόργανα άλατα, υπολείμματα ελαιοπολτού, και διαθέτει όξινο pH (Πίνακας 3, 4).

Η σύσταση των αποβλήτων (Πίνακας 5) εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως τα χαρακτηριστικά του καρπού (ποικιλία ελιάς, στάδιο ωρίμανσης, θρέψη) και τεχνικά χαρακτηριστικά (κλιματολογικές συνθήκες, σύστημα συγκομιδής του καρπού, μέθοδος παραγωγής ελαιόλαδου).

Πίνακας 4. Κύρια Συστατικά των ΥΑΕ [Zervakis and Balis, 1996]

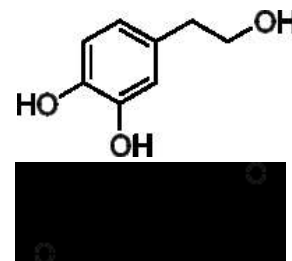
Συστατικά	Συγκέντρωση (%)	Κύρια Συστατικά
Νερό	83 – 92	
Λίπη	0,03 - 1	Υπολείμματα ελαίου
Αζωτούχες Ενώσεις	1,2 – 2,4	Γλουταμίνη, Ιστιδίνη, Γλυκίνη, Προλίνη, Αργινίνη, Τυροσίνη, Φαινυλαλανίνη
Σάκχαρα	2 – 8	Ραφινόζη, Σακχαρόζη, Μανόζη, Γλυκόζη, Αραβινόζη, Ραμνόζη, Γαλακτόζη, Ξυλόζη
Οργανικά Οξέα	0,5 – 1,5	Οξικό, Ηλεκτρικό, Κιτρικό, Γλυκερικό, Γαλακτικό, Μηλονικό, Οξαλικό, Φουμαρικό
Πολυαλκοόλες	0,5 – 1,5	Γλυκερίνη, Μανιτόλη
Πηκτίνες	0,4 – 1,5	
Ταννίνες		
Φαινολικές Ενώσεις	0,3 – 0,8	<b>Φλαβονοειδή</b> Απεγινίνη, Λουτεολίνη, Κερσετίνη <b>Φαινόλες</b> Καφεϊκό, Κινναμικό, Τυροσόλη, Υδροξυτυροσόλη, π-Κουμαρικό, Ελαιοευρωπεΐνη
Ανόργανα Στοιχεία	0,4 – 1,5	K, P, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Cl, S

Πίνακας 5. Κύρια Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά των ΥΑΕ [Fiesta Ros de Ursinos and broja-Padilla, 1992; Hamdi and Ellouz, 1992].

	Όρια τιμών
Νερό (%)	83 – 93
Οργανικά συστατικά (%)	4 – 16
Ανόργανα Συστατικά (%)	1 – 2
Πυκνότητα (g/cm <sup>3</sup> )	1.024
Αγωγιμότητα (μS/cm)	80.000 – 160.000
pH	4,5 – 6,5
Βιοχημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (BOD) (mg/L)	14.000 – 110.000
Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (COD) (mg/L)	41.400 – 130.000

Παρά το ότι το πιο σημαντικό, από ποσοτική άποψη, τμήμα του οργανικού κλάσματος καταλαμβάνεται από σάκχαρα, από ποιοτικής απόψεως οι πολυφαινόλες και οι λιπαρές ουσίες είναι τα πιο σημαντικά συστατικά, διότι προσδίδουν στα ΥΑΕ ανεπιθύμητες ιδιότητες (χρώμα, φυτοτοξικότητα κ.α.).

Οι κύριες φαινόλες που εμπεριέχονται στα ΥΑΕ αναφέρονται στον Πίνακα 4, με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα να έχουν η υδροξυτυροσόλη [IUPAC: 4-(2-υδροξυαιθυλ)βενζολ-1,2-διόλη, CHEBI:68889] και η τυροσόλη [IUPAC: 4-(2-υδροξυαιθυλ)φαινόλη, CHEBI:1879] (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Υδροξυτυροσόλη (πάνω) και τυροσόλη (κάτω)

## Προβλήματα σε Περιβάλλον και Υγεία

Η αποτοξικοποίηση των ΥΑΕ αποτελεί μια σημαντική πρόκληση, λόγω της υψηλής τιμής του χημικά (COD) και βιοχημικά απαιτούμενου οξυγόνου (BOD) (90.000 – 100.000 ppm) το BOD των αστικών αποβλήτων κυμαίνεται στα 300 – 400 ppm. Η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων μη εύκολα βιοαποικοδομήσιμων μορίων, όπως μακριές αλυσίδες λιπαρών οξέων, δυσχεραίνουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών, και η μεγάλη περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες οργανικά οξέα, ταννίνες και ανόργανα άλατα παρεμποδίζουν τις μικροβιακές και φυτικές δραστηριότητες [Λοϊζίδης, 2009].

Τα απόνερα συνήθως εκχύνονται σε κοντινά ύδατα, λίμνες, ποτάμια, ρεματιές, θάλασσές. Αποτέλεσμα αυτού είναι το τεράστιο πρόβλημα ρύπανσης των υδάτινων συστημάτων στα σημεία απόρριψης και η υποβάθμιση της γύρω περιοχής, οπτικά και ποιοτικά. Η εναπόθεση των ΥΑΕ αυξάνει την υδροφοβικότητα στο επιφανειακό στρώμα εδάφους και την διαπερατότητα των αργιλικών εδαφών, ενισχύοντας, έτσι, τη διάβρωση του εδάφους και τη διαφυγή των αποβλήτων στον υδροφόρο ορίζοντα [Jarboui et al., 2008; Mahmoud et al., 2010; Πατώνη, 2010]. Η πιθανότητα οι ρύποι αυτοί να καταλήξουν σε καλλιεργούμενες εκτάσεις μετά από άρδευση των ρυπασμένων υδάτων είναι αυξημένη, ιδιαίτερα αν λάβουμε υπόψιν ότι οι εγκαταστάσεις των ελαιοτριβείων συχνά εδράζουν σε περιοχές παραγωγής ελαιοκάρπου.

Η παρουσία φαινολικών ενώσεων και οργανικών οξέων, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, προκαλεί έντονα φαινόμενα φυτοτοξικότητας [D' Annibale et al., 2004; Aliotta et al., 2002; Capasso et al., 1992], παρεμβαίνει στη βλάστηση και ανάπτυξη των φυτών [Saez et al., 1992]. Έχει ακόμα αναφερθεί ότι η άμεση εφαρμογή ανεπεξέργαστων ΥΑΕ προκαλεί πτώση των καρπών και φύλλων του φυτού [Κουσέρη, 2008]. Παράλληλα τα ΥΑΕ αλλοιώνουν τα χαρακτηριστικά του εδάφους στο οποίο απορρίπτονται [Ben Sassi et al., 2006] και την μικροβιακή κοινότητα [Karpouzas et al., 2010; Kotsou et al. 2004]. Το αντίκτυπο στην υγεία είναι εξίσου σοβαρό. Μετά από κατάποση έχουν αναφερθεί παθήσεις, όπως γαστρεντερικές ενοχλήσεις, ηπατικά και νεφρικά προβλήματα, νευρικοί σπασμοί, καρδιακές αρρυθμίες, ακόμα και θάνατο. Σε ποντίκια έχει παρατηρηθεί καρκινογένεση, αν και δεν υπάρχουν αντίστοιχα αποτελέσματα σε ανθρώπους. Προβλήματα μπορούν να δημιουργηθούν ακόμη και όταν έρθει σε επαφή με το δέρμα, όπως ερεθισμός, εγκαύματα και νέκρωση ιστών [Environmental Health Criteria for Phenols].

Τα λιπίδια δημιουργούν μεμβράνες, αδιαπέραστες σε φως και οξυγόνο, σε ύδατα και εδάφη, οδηγώντας στην παρεμπόδιση της μικροβιακής και φυτικής ανάπτυξης [Δερβίσης, 2004]. Η αποδόμηση των οργανικών ουσιών, από μικροοργανισμούς που καταφέρνουν να επιβιώσουν ή και ακόμα να επικρατήσουν στο ρυπασμένο περιβάλλον, απαιτεί την κατανάλωση οξυγόνου. Λόγω της μετέπειτα έλλειψης

οξυγόνου που προκαλείται, διαταράσσεται ακόμα περισσότερο η μικροβιακή κοινότητα των υδατικών και εδαφικών περιβαλλόντων [Πατώνη, 2010].

## Διαχείριση των Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου

Οι προσεγγίσεις του προβλήματος γίνονται σε τρεις κατευθύνσεις [Fiesta Ros de Ursinos and broja-Padilla, 1992]:

1. Με αποτοξικοποίηση των αποβλήτων με φυσικοχημικές, θερμικές και βιολογικές μεθόδους.

Τα ΥΑΕ υπόκεινται σε πρωτοβάθμια (ή μηχανική) επεξεργασία (διήθηση, επίπλευση, καθίζηση), δευτεροβάθμια (ή βιολογική) επεξεργασία (λίμνες ή lagoons [Rozzi and Malpei, 1996], συστήματα ενεργοποιημένης λάσπης, συστήματα απομάκρυνσης ανόργανων, συστήματα αναερόβιας χώνευσης), και τριτοβάθμια (ή χημική) επεξεργασία (διεργασίες μεμβρανών, συσσωμάτωση, προσρόφηση, εξάτμιση, αποτέφρωση, καθίζηση, οξειδωση-αναγωγή). Η πρωτοβάθμια και τριτοβάθμια επεξεργασία συμμετέχουν στην ελάττωση του ρυπαντικού φορτίου και στη βελτίωση της ποιότητας των αποβλήτων, τον κύριο όμως ρόλο απορρύπανσης τον διαδραματίζει η δευτεροβάθμια επεξεργασία [Μπλίκια, 2009; Israilides et al., 1997; Rozzi and Malpei, 1996; Brenes et al., 1993; Brinck et al., 1998].

Τα ελαιοτριβεία είναι συνήθως μικρού μεγέθους βιομηχανικές μονάδες με ετήσια λειτουργία 3-4 μηνών, τα απόβλητα επομένως παράγονται σε τεράστιες ποσότητες σε μικρό χρονικό διάστημα. Κατ' επέκταση πολλές από τις παραπάνω τεχνικές διαχείρισης είναι τεχνικά ανεφάρμοστες ή οικονομικά μη βιώσιμες.

2. Με ανακύκλωση των αποβλήτων με ή χωρίς ανάκτηση χρήσιμων συστατικών.
3. Με αλλαγή της παραγωγικής διαδικασίας εξαγωγής ελαιόλαδου.

## Βιοαποικοδόμηση Φαινολικών Ενώσεων από Μικροφύκη

Υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές όπου χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί για να βιοαποικοδομήσουν τις φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στον κατσίγαρο. Έχει αναφερθεί ότι ο μύκητας *Corioloropsis rigida* μπορεί να

βιοαποικοδομήσει σε ποσοστό μεγαλύτερο από 70% τις φαινολικές ενώσεις (Υδροξυτυροσόλη: 1824mg/kg στερεών αποβλήτων, Τυροσόλη: 682mg/kg στερεών αποβλήτων) που υπάρχουν στον κασίγαρο σε διάστημα 20 ημερών [Sampedro et al., 2004]. Ανάλογες έρευνες με *Phanerochaete flavid-alba* [Linares et al., 2003] και *Pleurotus ostreatus* [Aggelis et al., 2003] έδωσαν παρόμοιες βιοαποικοδομήσεις, σε μικρότερα όμως χρονικά διαστήματα, των 10 ημερών και 2 εβδομάδων, αντίστοιχα. Ο μικροοργανισμός *Corioloropsis gallica* έχει αναφερθεί ότι βιοαποικοδομεί ποσοστό μεγαλύτερο από 90% του φαινολικού φορτίου (28 μg/mg εκχυλίσματος ΥΑΕ) των υγρών αποβλήτων του κασίγαρου σε διάστημα 12 ημερών [Daassi et al., 2014], ενώ οι μικροοργανισμοί *Geotrichum* sp., *Aspergillus* sp., *Candida tropicalis* σε μικρότερα ποσοστά της τάξης του 50% (8,2g tannic acid/L) [Fadil et al., 2003].

Τα βακτήρια όμως αποτελούν ετερότροφους οργανισμούς, απαιτείται λοιπόν η συνεχής παροχή οργανικής ύλης για την κάλυψη των ενεργειακών τους αναγκών για την ανάπτυξη και την βιοαποικοδόμηση των ρύπων. Είναι εύλογο, κατ' επέκταση, να φανταστούμε ότι η χρήση βακτηρίων για την απορρύπανση αποβλήτων χαμηλής συγκέντρωσης ρύπων δεν είναι οικονομικά βιώσιμη. Η προσέγγιση του προβλήματος της βιοαποικοδόμησης ρύπων χρησιμοποιώντας μικροφύκη προτάθηκε αρχικά από τους Oswald and Gotaas, 1975, καθώς είναι φωτοσυνθετικοί αυτότροφοι οργανισμοί. Ενώ η αντιμετώπιση ρύπων με τη χρήση βακτηρίων [Diaz, 2004; Janssen et al., 2005; Kobayashi and Rittmann, 1982], ανώτερων φυτών [Konoβα et al., 1995] και ζώων [James et al., 1977] έχει μελετηθεί εκτενέστερα, η χρήση των μικροφυκών έχει κερδίσει το ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Αυτό οφείλεται στα πλεονεκτήματα που δύναται να προσφέρει η χρήση τους, δηλαδή την χρήση της ηλιακής ενέργειας για τη σύνθεση και την παραγωγή βιομάζας και την παραγωγή ουσιών υψηλής εμπορικής αξίας [Aaronson et al., 1980]. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα φύκη είναι οργανισμοί που φέρουν στο γονιδίωμά τους την ικανότητα να ανθίστανται στην παρουσία των φαινολών, δεδομένου ότι επιβίωσαν σε πολύ πιο αντίξοες συνθήκες (NO<sub>x</sub>, H<sub>2</sub>S) σε σύγκριση με τη σημερινή ατμόσφαιρα. Πολλά είδη μικροφυκών (π.χ. *Chlorella* sp., *Scenedesmus obliquus*, *Selenastrum capricornutum* και *Ochromonas Danica*) έχει φανεί πως είναι αρκετά ανθεκτικοί [Jankevicius et al., 1992] ώστε να μπορούν να βιοαποικοδομήσουν πλήθος ρύπων, όπως το ζιζανιοκτόνο 2,4-



διχλωροφαινοξοξεικό οξύ [Butler et al., 1975], φαινόλες [Ellis, 1977; Klekner and Kosaric, 1992] [Tikoo et al., 1997; Pinto et al., 2002] και πολυαρωματικούς υδρογονάνθρακες [Warshawsky et al., 1988; Warshawsky et al., 1995].

Η απλούστερη φαινολική ένωση, η φαινόλη, χρησιμοποιείται από το χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* ως εναλλακτική πηγή άνθρακα, ενώ σε συνδυασμό με την κατάλληλη ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας, επιτυγχάνεται ο πλήρης μεταβολισμός της (100% βιοαποικοδόμηση) [Papazi and Kotzabasis, 2007]. Αυξάνοντας το βαθμό δυσκολίας της βιοδιάσπασης, προσθέτοντας έναν υποκαταστάτη στο φαινολικό δακτύλιο, η βιοαποικοδόμηση γίνεται μέσω συμμεταβολισμού, και πραγματοποιείται σε δύο διακριτές φάσεις. Κατά την πρώτη φάση, αποσπάται ο υποκαταστάτης (αλογόνο) και κατά τη δεύτερη φάση λαμβάνει χώρα η σχάση του φαινολικού δακτυλίου [Papazi and Kotzabasis, 2007]. Η επιπλέον αύξηση του βαθμού δυσκολίας της βιοαποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων από το χλωροφύκος, που επιτυγχάνεται με την προσθήκη ενός δεύτερου υποκαταστάτη στο φαινολικό δακτύλιο (π.χ. διχλωροφαινόλες), διαφοροποιεί το επίπεδο βιοαποικοδόμησης ανάλογα με το πόσα meta-υποκατεστημένα χλώρια υπάρχουν στο φαινολικό δακτύλιο [Papazi and Kotzabasis, 2013]. Η βιοαποικοδόμηση ξενοβιοτικών ουσιών είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία που εξαρτάται από βιοτικές και αβιοτικές μεταβλητές.

Για την αποτοξικοποίηση μιας ξενοβιοτικής ουσίας από μικροφύκη, υιοθετούνται διαφορετικές στρατηγικές ανάλογα με την τοξικότητα της ουσίας και το ενεργειακό ισοζύγιο του χλωροφύκου. Αυτό το ενεργειακό ισοζύγιο καθορίζεται από πληθώρα βιοτικών και αβιοτικών παραμέτρων. Όσον αφορά τις φαινολικές ενώσεις, η θέση (ortho-, meta- ή para-) και ο αριθμός των υποκαταστατών στο φαινολικό δακτύλιο, τα φαινόμενα του συντονισμού και της επαγωγής, που ελέγχουν τη συμπεριφορά του υποκαταστάτη ως δότη ή δέκτη ηλεκτρονίων, καθορίζουν τις ενεργειακές απαιτήσεις για τη βιοδιάσπασή τους, ενώ η εξωγενής πηγή του άνθρακα (ανόργανου ή/και οργανικού) και η ένταση της φωτονιακής ακτινοβολίας είναι οι σημαντικότεροι από τους παράγοντες που ελέγχουν (μέσω της αναπνευστικής και φωτοσυνθετικής διαδικασίας) τα ενεργειακά αποθέματα του χλωροφύκου που θα επενδυθούν για τη βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων διαφορετικής τοξικότητας και δυσκολίας

βιοδιάσπασης [Pinto et al.,2002; Papazi and Kotzabasis, 2007; Papazi and Kotzabasis, 2008; Papazi et al., 2012; Papazi and Kotzabasis, 2013]. Σημαντικό ρόλο παίζουν επίσης η θερμοκρασία [Margesin et al.,2005], το pH [Graham et al., 2004], η διαθεσιμότητα και περιεκτικότητα σε οξυγόνο [Melo et al., 2005], και η αρχική συγκέντρωση κυττάρων στην καλλιέργεια [Jiang et al., 2012].

## Σκοπός

Σε συνέχεια προηγούμενων πειραματικών σειρών που αφορούσαν την εξακρίβωση της στρατηγικής βιοαποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων από μικροφύκη [Papazi and Kotzabasis, 2007; Papazi and Kotzabasis, 2008; Papazi et al., 2012; Papazi and Kotzabasis, 2013], η παρούσα εργασία επιχειρεί να μελετήσει στοχευμένα την βιοαποικοδόμηση της υδροξυτυροσόλης, και του συνδυασμού υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης από το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus*. Οι φαινολικές αυτές ενώσεις αποτελούν το κύριο ρυπαντικό φορτίο των Υγρών Αποβλήτων Ελαιολιτριβείων.

## Υλικά και Μέθοδοι

### Οργανισμός

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* wild type D3 [Gaffron, 1939] (Εικόνα 7). Η φυλογενετική του ταξινόμηση είναι η εξής:

**Βασίλειο:** Φυτά

**Διαίρεση:** Χλωρόφυτα

**Κλάση:** Χλωροφύκη

**Τάξη:** Chlorococcales

**Γένος:** *Scenedesmus*

**Είδος:** *Scenedesmus obliquus*



Εικόνα 7. Το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus*

Ο οργανισμός αυτός είναι μονοκύτταρος ευκαρυωτικός, με ελλειψοειδή κύτταρα, μήκους περίπου 5-10 μm. Ο κύκλος ζωής του διαρκεί γύρω στις 20 ώρες. Στη διάρκεια

αυτή, διαιρείται μία φορά δίνοντας 4-8 θυγατρικά κύτταρα, τα οποία μόλις σχηματιστούν πλήρως, συνήθως αποκόπτονται μεταξύ τους (δεν σχηματίζουν κοινόβια). Εξελικτικά, βρίσκεται πολύ κοντά στα άλλα δύο, γνωστά στο ερευνητικό πεδίο, φύκη τη Χλαμυδομονάδα (*Chlamydomonas*) και τη Χλωρέλλα (*Chlorella*). Πρόκειται για φωτοσυνθετικό μικροοργανισμό, που παράγει οξυγόνο κατά τη φωτοσύνθεσή του. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά της φωτοσυνθετικής του δραστηριότητας μοιάζει με τα γυμνόσπερμα φυτά. Ο άγριος τύπος (wt) έχει την ικανότητα βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης και στο σκοτάδι, όπως και στο φως. Δηλαδή, ακόμα και σε ετερότροφες συνθήκες έχει διαμορφωμένους χλωροπλάστες και ενεργά φωτοσυστήματα I και II.

### Συνθήκες Ανάπτυξης

Η ανάπτυξη των οργανισμών έγινε σε επιμήκεις γυάλινους σωλήνες ( $\varnothing$  5cm x 50 cm), με ειδικό στόμιο στο κάτω μέρος του σωλήνα, που επιτρέπει τον αερισμό της καλλιέργειας, ενώ τοποθετήθηκαν σε ενυδρείο σταθερής θερμοκρασίας 30°C, μπροστά από λάμπες λευκού φωτισμού, με ρυθμιζόμενη ένταση (Εικόνα 8). Η σύσταση του θρεπτικού υλικού



Εικόνα 8. Σύστημα προκαλλιέργειας του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*

αναγράφεται στον Πίνακα 6. Το μικροφύκος αναπτύχθηκε σε αυτές τις συνθήκες για 2-3 ημέρες περίπου, έπειτα χρησιμοποιήθηκε ως μητρική καλλιέργεια για τη διεξαγωγή του πειράματος.

Όλα τα πειράματα έλαβαν χώρα σε ερμητικά, με septa, μπουκαλάκια (serum bottles) των 100 mL (Εικόνα 9). Η δειγματοληψία γινόταν καθημερινά την ίδια ώρα με αποστειρωμένες σύριγγες, ενώ η διάρκεια διεξαγωγής του κάθε πειράματος ήταν 5 ημέρες. Η διάρκεια των 5 ημερών επιλέχθηκε ως η ιδανικότερη για την αποφυγή του προβλήματος της έλλειψης θρεπτικών, μετά από προκαταρκτικά πειράματα αναφορικά με την καμπύλη ανάπτυξης του χλωροφύκου στις συγκεκριμένες συνθήκες. Ο



Εικόνα 9. Μπουκαλάκι των 100 mL, με καλλιέργεια του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*, ερμητικά κλειστό με septum.

τελικός όγκος της καλλιέργειας στο κάθε μπουκάλι ήταν 50 mL. Η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων ήταν 1,5  $\mu\text{L PCV/mL}$  (Packed Cell Volume– Πακεταρισμένα Κύτταρα) καλλιέργειας. Τα μπουκαλάκια αυτά τοποθετήθηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (30°C), ενώ το φως που έφτανε στην επιφάνεια της καλλιέργειας ήταν 50-60  $\mu\text{mol}\times\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

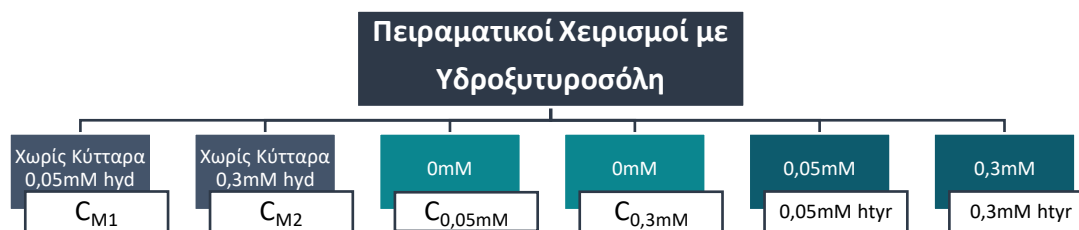
Πίνακας 6. Συστατικά του μέσου καλλιέργειας του *Scenedesmus obliquus* [Bishop and Senger, 1971].

Συστατικά	Περιεκτικότητα (σε g/L)
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,50
$\text{KNO}_3$	80,0
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	24,6
$\text{NaCl}$	47,0
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	17,8
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1\text{H}_2\text{O}$	40,5
$\text{FeSO}_4 \times 1\text{H}_2\text{O}$	0,06
$\text{Fe(III)citrate}$	0,24
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2,86
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	1,81
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,222
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,079
$\text{MoO}_3$ (85%-99.5%)	0,0177

Εκτελέστηκαν δύο σειρές πειραμάτων, όπου χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* με εξωγενώς παρεχόμενη υδροξυτυροσόλη και μίγμα υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης. Σε κανένα από τα πειράματα δεν προστέθηκε κάποιου είδους εξωτερική πηγή άνθρακα εκτός από τις ίδιες τις φαινολικές ενώσεις.

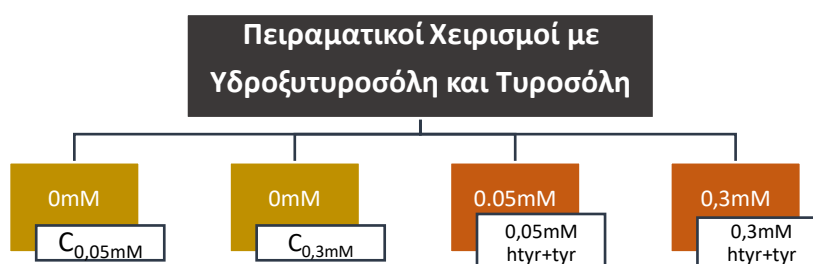
Η πρώτη σειρά πραγματοποιήθηκε σε αυτότροφες συνθήκες με παροχή υδροξυτυροσόλης σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις, 0,05mM και 0,3mM [0,05mM htyr, 0,3mM htyr]. Σημειώνεται ότι το stock διαλύματος της υδροξυτυροσόλης ήταν διαλυμένο σε αιθανόλη, οπότε η ίδια μικροποσότητα αιθανόλης προστέθηκε και στις καλλιέργειες του μάρτυρα [C<sub>0,05mM</sub>, C<sub>0,3mM</sub>], ώστε τα αποτελέσματα να είναι απολύτως συγκρίσιμα. Στους πρώτους δύο χειρισμούς χρησιμοποιήθηκαν θρεπτικά χωρίς κύτταρα, όπου προστέθηκαν 0,05mM [C<sub>M1</sub>] και

0,3mM [ $C_{M2}$ ] υδροξυτυροσόλης, ώστε να εξεταστεί το ενδεχόμενο φωτοοξειδωσης της φαινόλης (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Πειραματική χειρισμοί με υδροξυτυροσόλη σε συγκεντρώσεις 0,05mM [0,05mM htyr] και 0,3mM [0,3mM htyr], μάρτυρα χωρίς υδροξυτυροσόλη [ $C_{0,05mM}$ ,  $C_{0,3mM}$ ] και μάρτυρα χωρίς κύτταρα για τις δύο συγκεντρώσεις [ $C_{M1}$ ,  $C_{M2}$ ]

Στην δεύτερη σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε μίγμα υδροξυτυροσόλης με τυροσόλη. Στον ένα χειρισμό προστέθηκε ταυτόχρονα 0,05mM τυροσόλης και 0,05mM υδροξυτυροσόλης [0,05mM htyr+tyr], και στον άλλο 0,3mM τυροσόλης και 0,3mM υδροξυτυροσόλης [0,3mM htyr+tyr]. Ομοίως με παραπάνω, προστέθηκε η αντίστοιχη ποσότητα αιθανόλης στο μάρτυρα (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Πειραματική χειρισμοί με υδροξυτυροσόλη-τυροσόλη σε συγκεντρώσεις 0,05mM [0,05mM htyr+tyr] και 0,3mM [0,3mM htyr+tyr] και μάρτυρα χωρίς υδροξυτυροσόλη-τυροσόλη [ $C_{0,05mM}$ ,  $C_{0,3mM}$ ]

## Εκτίμηση Κυτταρικού Όγκου

Δείγματα των 5 mL από τις καλλιέργειες των φυκών φυγοκεντρήθηκαν σε βαθμονομημένο τριχοειδή υαλοσωλήνα για 5 λεπτά στα 1500g, προκειμένου να καθιζήσουν (Εικόνα 12) [Logothetis et al., 2004]. Η εκτίμηση της κυτταρικής συγκέντρωσης, παρουσιάζεται ως όγκος καθιζάμενων κυττάρων (Packed Cell Volume; PCV) ανά mL καλλιέργειας ( $\mu\text{L PCV}/\text{mL}$  καλλιέργειας) [Senger and Brinkmann, 1986].



Εικόνα 12. Διαβαθμισμένοι σωλήνες PCV

Ως εναλλακτικός τρόπος μέτρησης της κυτταρικής πυκνότητας –για εξοικονόμηση ποσότητας δείγματος και χρόνου- χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική καταγραφή της θολερότητας του μέσου καλλιέργειας στα 550 nm (Εικόνα 13)



Εικόνα 13. Φασματοφωτόμετρο UV/VIS (PERKIN ELMER lambda 20)

[DellaGreca et al., 2001], ενώ παράλληλα συσχετίστηκαν οι δύο τρόποι εκτίμησης της κυτταρικής συγκέντρωσης με βάση την ακόλουθη καμπύλη αναφοράς:

$$PCV = 0.6285 \times A_{550}$$

$$R^2 = 0.9973$$

### Μετρήσεις Επαγωγικού Φθορισμού – Καταγραφή της Μοριακής Δομής και Λειτουργίας του Φωτοσυνθετικού Μηχανισμού

Μόνο ένα μέρος της ενέργειας που απορροφάται από τις χρωστικές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού χρησιμοποιείται για τη φωτοχημεία της φωτοσύνθεσης. Το υπόλοιπο εκπέμπεται είτε ως θερμότητα, είτε ως φθορισμός. Η επαγωγή του φθορισμού από φωτοσυνθετικούς οργανισμούς παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τους [Kautsky and Hirsch, 1931](#). Η επαγωγή του φθορισμού από τα φυτά πραγματοποιείται σε δύο φάσεις, εκ των οποίων η πρώτη είναι ταχεία και η δεύτερη αργή. Σήμερα, η μελέτη της καμπύλης του επαγωγικού φθορισμού – ιδιαίτερα της ταχείας φάσης – έχει εξελιχθεί σε πολύτιμο ερευνητικό μέσο για τη μελέτη της μοριακής δομής και λειτουργίας, αλλά και της απόδοσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Βάσει της μεθόδου των [Strasser and Strasser, 1995](#), μπορεί να εκτιμηθεί, εκτός των άλλων, το μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυνθετικής κεραίας, η πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης και μια σειρά από παραμέτρους, που αφορούν τη μοριακή δομή και τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Ο φθορισμός αυξάνεται όταν η φωτοχημική απόδοση της φωτοσύνθεσης παρεμποδίζεται για οποιοδήποτε λόγο, για παράδειγμα όταν δεν υπάρχει διαθέσιμος οξειδωμένος δέκτης ηλεκτρονίων σε κάποιο σημείο στην πορεία της ηλεκτρονιακής μεταφοράς. Όταν ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός (wt κύτταρα), μετά από την

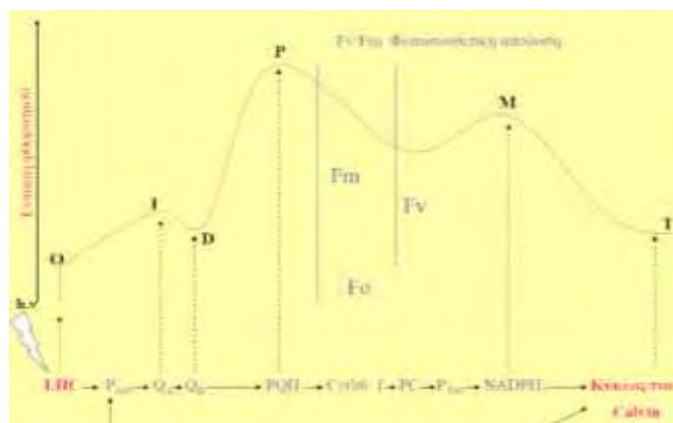
προσαρμογή του στο σκοτάδι, δεχτεί την επίδραση συνεχούς φωτισμού, τότε ο φθορισμός του αυξάνεται από το αρχικό του επίπεδο ( $F_0$ ) σε ένα μέγιστο επίπεδο ( $F_m$ ) και στη συνέχεια μειώνεται βαθμιαία μέχρι ένα σταθερό επίπεδο ( $F_S$ ).

Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού έγιναν με τη συσκευή Plant Efficiency Analyser (Handy PEA Handy Analyser Instruments) (Εικόνα 14), και ακολούθησε επεξεργασία των δεδομένων με χρήση εξειδικευμένου λογισμικού εφαρμογής του JIP-test (BioLyzer HP 4.0), σύμφωνα με τη μέθοδο των Strasser and Strasser, 1995.



Εικόνα 14. Handy PEA για τις μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού

Όλες οι μετρήσεις έγιναν σε δείγματα καλλιεργειών όγκου 1 mL, τα οποία προτού διεγερθούν είχαν παραμείνει στο σκοτάδι για 10 min, προκειμένου να “αδειάσουν” τα κέντρα αντίδρασης από ηλεκτρόνια. Από τις μετρήσεις υπολογίστηκε ο λόγος  $F_v/F_m$ , που συνδέεται άμεσα με τη φωτοσυνθετική απόδοση [Strasser and Strasser, 1995]. Επίσης με εφαρμογή του JIP-TEST για τιμές φθορισμού, που αντιστοιχούν σε καθορισμένα στάδια [J, I και P (Εικόνα 15)], υπολογίστηκαν τα επιμέρους χαρακτηριστικά του φωτοσυνθετικού μηχανισμού: ο λόγος  $ABS/RC$ , που συνδέεται με το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PSII, ο λόγος  $DIO/RC$ , που συνδέεται με την ενέργεια που χάνεται με τη μορφή θερμότητας, ο λόγος  $RC/CSO$ , που συνδέεται με την πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης του PSII, ο φωτοσυνθετικός δείκτης ( $PI_{(abs)}$ ) και η πρωτογενής φωτοχημεία ( $PSI_0$ ).



Εικόνα 15. Τυπική καμπύλη επαγωγικού φθορισμού

Η μέθοδος βασίζεται σε μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού με ανάλυση 10 μs σε χρονικό διάστημα 1 δευτερολέπτου. Ο φθορισμός μετρήθηκε με 12-bit ανάλυση και η διέγερση έγινε από 3 διόδους φωτισμού (LEDs) με ένταση ακτινοβολίας μέχρι  $3000 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ερυθρού φωτός (650nm).

Πίνακας 7. Βασικές παράμετροι του JIP-TEST

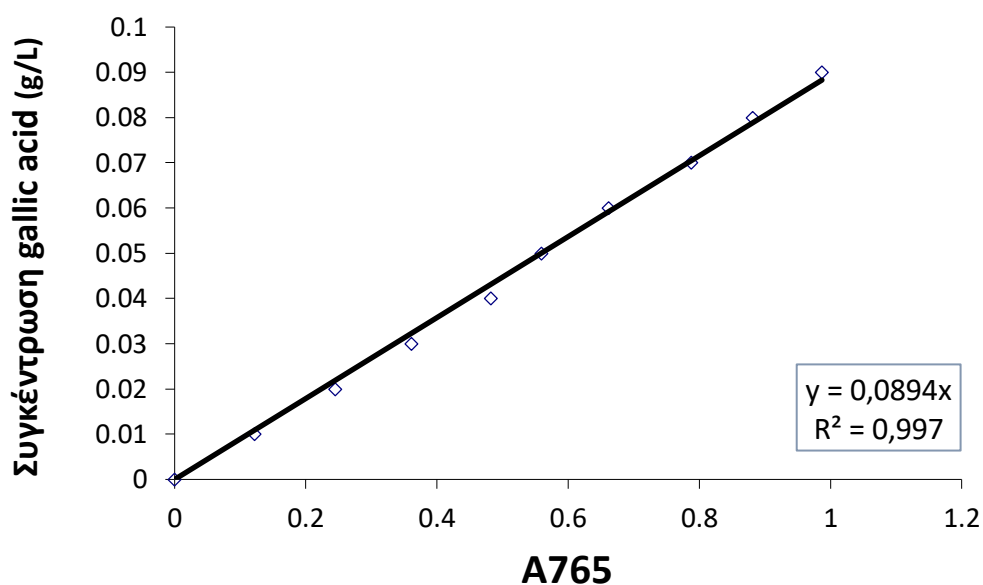
Μεταβλητή OJIP καμπύλης	Ορισμός
$F_t$	Τιμή φθορισμού σε χρόνο t μετά την ακτινοβολήση
$F_{50\mu s}$	Ένταση φθορισμού στα 50 μs
$F_{300\mu s}$	Ένταση φθορισμού στα 300 μs
$F_J = F_{2ms}$	Ένταση φθορισμού στο βήμα J (2 ms) της καμπύλης OJIP
$F_I = F_{30ms}$	Ένταση φθορισμού στο βήμα I (30 ms) της καμπύλης OJIP
$F_P (= F_m)$	Μέγιστη ένταση φθορισμού στο P της καμπύλης OJIP
$t_{Fm}$	Χρόνος σε (ms) που απαιτείται για να μεγιστοποιηθεί η ένταση του φθορισμού $F_m$
$Area$	Συνολική συμπληρωματική περιοχή ανάμεσα στην καμπύλη OJIP και την ευθεία που διέρχεται από το $F = F_m$
<i>Παράμετροι JIP-test</i>	
$F_o$	Ελάχιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί σε “ανοιχτά” κέντρα (open PSII RCs, t = 0)
$F_m$	Μέγιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί στο χρόνο όπου όλα τα κέντρα είναι “κλειστά” (closed PSII RCs, t = tFm)
$F_v$ $F_v = F_m - F_o$	Μεταβλητή τιμή φθορισμού τη χρονική στιγμή t
$V_t = (F_t - F_o)(F_m - F_o)$	Μέγιστη τιμή μεταβλητής τιμής φθορισμού
$V_J = (F_J - F_o)(F_m - F_o)$	Σχετική μεταβολή φθορισμού τη χρονική στιγμή t
$M_o = (\Delta V / \Delta t)_o$ $= 4(F_{300 \mu s} - F_o) / (F_m - F_o)$	Σχετική μεταβολή φθορισμού στο βήμα J
$S_m = (Area) / (F_m - F_o)$	Αρχική κλίση σε ms της καμπύλης $V = f(t)$
$S_s = V_J / M_o$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης OJIP (Area), ομαλοποιούμενο ως προς $F_v$ (αποτελεί μέτρο του αριθμού των οξειδοαναγωγικών κύκλων της $Q_A$ )
$N = S_m / S_s = S_m M_o (1/V_J)$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης OJIP που αντιστοιχεί μόνο στην OJ φάση (διάστημα όπου η $Q_A$ των RC ανάγεται μία φορά)
	Μέτρο αριθμού κύκλων αναγωγής της $Q_A$ στο διάστημα tFm



<i>Ειδικές ροές ενέργειας (ανά κέντρο που ανάγει <math>Q_A</math>)</i>	
$ABS/RC = M_o (1/V_J)(1/\Phi_{P_o})$	Μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας
$TR_o/RC = M_o (1/V_J)$	Ενέργεια που παγιδεύεται ανά κέντρο αντίδρασης (για $t = 0$ )
$ET_o/RC = M_o (1/V_J)\Psi_o$	Ροή ηλεκτρονίων ανά κέντρο αντίδρασης (για $t = 0$ )
$DI_o/RC = (ABS/RC) - (TR_o/RC)$	Διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης (για $t = 0$ )
<i>Αποδόσεις ή λόγοι επιμέρους ροών</i>	
$\Phi_{P_o} = TR_o/ABS = [1 - (F_o/F_m)]$	Μέγιστη κβαντική απόδοση της πρωτογενούς φωτοχημείας (για $t = 0$ )
$\Psi_o = ET_o/TR_o = 1 - V_J$	Πιθανότητα να προκαλέσει μια διέγερση (excitation) τη μετακίνηση ενός ηλεκτρονίου κατά μήκος της αλυσίδας πέρα από την $Q_A$ (για $t = 0$ )
$\Phi_{E_o} = ET_o/ABS = [1 - (F_o/F_m)] \Psi_o$	Κβαντική απόδοση της μεταφοράς ηλεκτρονίων (για $t = 0$ )
$\Phi_{D_o} = 1 - \Phi_{P_o} = F_o/F_m$	Κβαντική απόδοση της διάχυσης ηλεκτρονίων (για $t = 0$ )
<i>Εκτιμώμενες ροές ενέργειας ανά διεγερμένη περιοχή</i>	
$ABS/CS_o$	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το $F_o$
$ABS/CS_m$	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το $F_m$
$TR_o/CS_o = \Phi_{P_o} (ABS/CS_o)$	Παγιδευμένη ενέργεια ανά διεγερόμενη περιοχή της μεμβράνης (για $t = 0$ )
$ET_o/CS_o = \Phi_{E_o} (ABS/CS_o)$	Ροή ηλεκτρονίων ανά περιοχή διέγερσης (για $t = 0$ )
$DI_o/CS_o = (ABS/CS_o) - (TR_o/CS_o)$	Διαχεόμενη ενέργεια ανά περιοχή διέγερσης (για $t = 0$ )
<i>Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης</i>	
$RC/CS_o$	Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης
<i>Δείκτες επίδοσης</i>	
$PI_{ABS} = (RC/ABS)(\Phi_{P_o}/1 - \Phi_{P_o})(\Psi_o/1 - \Psi_o)$	Επιδόσεις ανά απορροφώμενη ενέργεια
$PI_{CS_o} = (RC/CS_o)(\Phi_{P_o}/1 - \Phi_{P_o})(\Psi_o/1 - \Psi_o)$	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης ( $t = 0$ )
$PI_{CS_m} = (RC/CS_m)(\Phi_{P_o}/1 - \Phi_{P_o})(\Psi_o/1 - \Psi_o)$	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης ( $t = t_{Fm}$ )
$SFI_{ABS} = (1 - \Phi_{P_o})(1 - \Psi_o)$	Δείκτης λειτουργικότητας
<i>Ικανότητα παραγωγής έργου</i>	
$DF_{ABS} = \log PI_{ABS}$	Εκτιμώμενη παραγωγή έργου ανά απορροφώμενη ενέργεια

## Ποσοτική και Ποιοτική Ανάλυση Φαινολικών Ενώσεων

Για την ποσοτικοποίηση των ολικών φαινολικών ενώσεων στα ληφθέντα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος των Singleton and Rossi, 1965. Συνοπτικά, η μέθοδος περιλαμβάνει την ανάμειξη 500μL αντιδραστηρίου FC 0.2N και 200μL δείγματος (στο μάρτυρα το δείγμα αντικαταστάθηκε από 200μL dH<sub>2</sub>O), 5 λεπτά επώαση στο σκοτάδι, και τέλος επώαση μίας ώρας στο σκοτάδι μετά την προσθήκη 400μL ανθρακικού νατρίου (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (75 g/L). Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 765nm σε φασματοφωτόμετρο PERKIN ELMER lambda 20 (Εικόνα 13). Χρησιμοποιήθηκε καμπύλη αναφοράς με gallic acid, για την αναγωγή των φαινολικών ενώσεων σε γραμμάρια gallic acid ανά λίτρο (g GAE (L)<sup>-1</sup>), με εξίσωση  $y = 0,0894x$ , όπου x είναι η απορρόφηση στα 765 nm και y η συγκέντρωση του gallic acid σε g/L (Εικόνα 16) [Leouifoudi et al., 2014].



Εικόνα 16. Καμπύλη αναφοράς για την αναγωγή των τιμών απορρόφησης φαινολικών ενώσεων σε g/L gallic acid.

Η μέθοδος αυτή είναι γρήγορη για την ποσοτική εκτίμηση των φαινολικών ενώσεων, αδυνατεί όμως να διακρίνει μεταξύ της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης. Στο χειρισμό με την χρήση μείγματος υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), που επιτρέπει την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση του δείγματος βάσει του

φάσματος απορρόφησης των επιμέρους μεγίστων. Η ποσοτική εκτίμηση έγινε με τη βοήθεια γνωστών συγκεντρώσεων φαινολικών ενώσεων.

Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 1500g και το υπερκείμενο εγχύθηκε στην HPLC (αντλία Shimadzu LC-10AD, ανιχνευτής Shimadzu SPD-M10A) (Εικόνα 17). Για το διαχωρισμό των φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε διαλύτης έκλουσης, ο οποίος περιείχε τους διαλύτες Α. μεθανόλη (CH<sub>3</sub>OH) και Β. διπλά απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O), σε αναλογία Α:Β=1:9. Οι ροή της στήλης



Εικόνα 17. Το σύστημα της HPLC

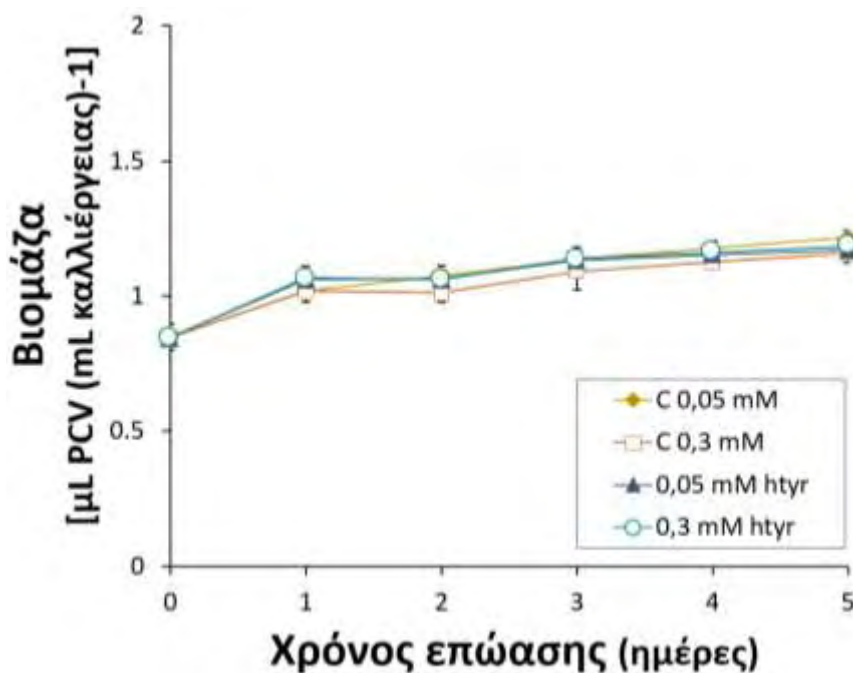
(C18, 2,1 × 150μm, 5μm particle size hypersil, SUPELCO) ήταν σταθερή στα 0,2 mL/min και η θερμοκρασία διαχωρισμού στους 25°C [Lovell et al., 2002]. Η υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη ανιχνεύτηκαν στα 280nm, με βάση την απορρόφηση γνωστών ποσοτήτων φαινολικών ουσιών.

## Αποτελέσματα

### Επίδραση της Υδροξυτυροσόλης σε Αυτότροφες Καλλιέργειες *Scenedesmus obliquus*

Η υδροξυτυροσόλη είναι μια από τις φαινολικές ενώσεις με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα στα ΥΑΕ. Τα ΥΑΕ αποτελούν σημαντικό ρύπο σε περιοχές ελαιοπαραγωγής, η αποικοδόμησή της, κατ' επέκταση χρήζει προσοχής. Η βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων με το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus* έχει δείξει υποσχόμενα αποτελέσματα [Papazi and Kotzabasis, 2007; Papazi and Kotzabasis, 2008; Papazi et al., 2012; Papazi and Kotzabasis, 2013], δοκιμάστηκε λοιπόν η βιοαποικοδόμηση της υδροξυτυροσόλης. Οι δοκιμές περιελάμβαναν χαμηλή (0,05mM) και υψηλή συγκέντρωση (0,3mM). Σε κάθε δοκιμή αντιστοιχεί και ένας μάρτυρας λόγω του γεγονότος ότι το stock υδροξυτυροσόλης εμπεριείχε αιθανόλη, οπότε η αντίστοιχη μικροποσότητα που υπάρχει στις δοκιμές προστέθηκε και στους μάρτυρες.

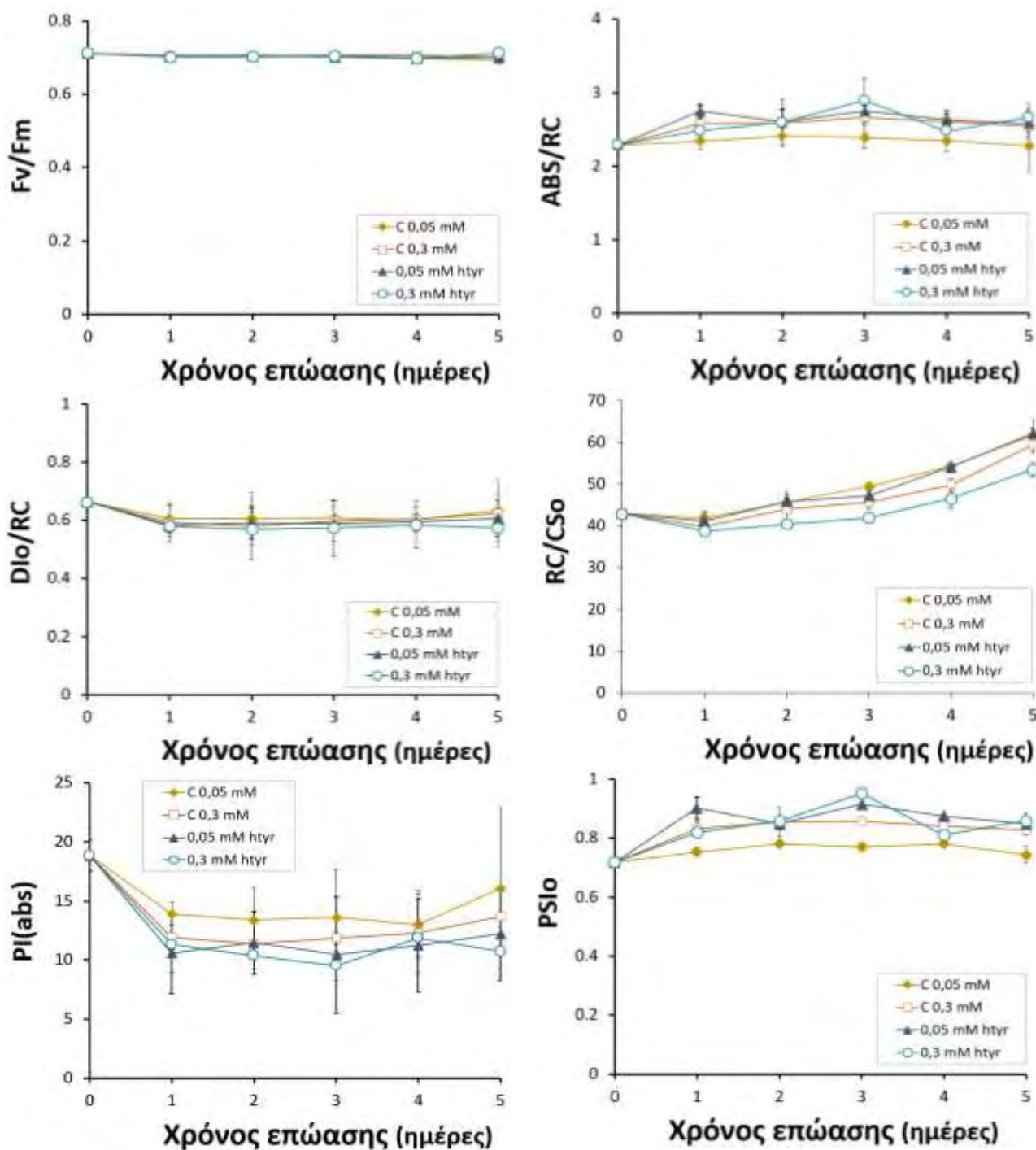
Αρχικά εξετάστηκε η ικανότητα ανάπτυξης του μικροφύκου παρουσία της υδροξυτυροσόλης.



Εικόνα 18. Κινητική ανάπτυξης του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* παρουσία 0,05mM και 0,3mM υδροξυτυροσόλης

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 18, η ανάπτυξη του *Scenedesmus obliquus* σε αυτότροφες συνθήκες δεν επηρεάζεται από την παρουσία της υδροξυτυροσόλης, σε καμία από τις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,05mM, 0,3mM).

Στη συνέχεια εξετάστηκε η μοριακή δομή, λειτουργία και απόδοση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, μέσω της μέτρησης του επαγωγικού φθορισμού. Σε γενικές γραμμές, η παρουσία της υδροξυτυροσόλης, μετά από τις 5 μέρες του πειράματος, διατηρεί αμετάβλητη τη φωτοσυνθετική απόδοση ( $F_v/F_m$ ), το μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυνθετικής κεραίας (ABS/RC), την ενέργεια που διαχέεται με τη μορφή θερμότητας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης ( $D_{10}/RC$ ), την πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης ( $RC/CS_0$ ) και την πρωτογενή φωτοχημεία ( $PSI_0$ ). Υπάρχει μια μικρή παρέκκλιση στις τιμές του φωτοσυνθετικού δείκτη ( $PI_{abs}$ ), η οποία όμως δεν είναι άξια προσοχής (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Παράμετροι του JIP-test κατά τη διάρκεια των 5 ημερών διεξαγωγής του πειράματος, που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*, παρουσία 0,05 mM και 0,3mM υδροξυτυροσόλης, σε ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας  $50-60 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Fv/Fm: φωτοσυνθετική απόδοση

ABS/RC: μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας

D10/RC: ενέργεια που διαχέεται με τη μορφή θερμότητας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης

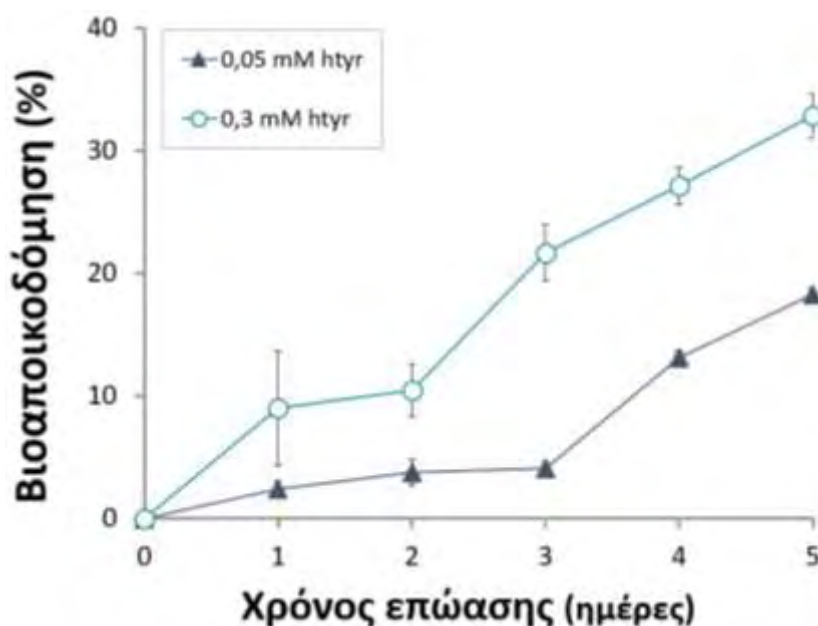
RC/CS<sub>0</sub>: πυκνότητα φωτοσυνθετικών ενεργών κέντρων αντίδρασης

PI<sub>(abs)</sub>: επιδόσεις ανά απορροφούμενη ενέργεια

PSII<sub>0</sub>: πρωτογενής φωτοχημεία

## Βιοαποικοδόμηση της Υδροξυτυροσόλης σε Αυτότροφες Καλλιέργειες *Scenedesmus obliquus*

Μετά το πέρας των 5 ημερών, το μικροφύκος είχε καταφέρει να αποικοδομήσει το 18,3% της υδροξυτυροσόλης στην χαμηλή συγκέντρωση (0,05mM), και το 33% στην υψηλή (0,3mM) (Εικόνα 20). Αν η ποσοστιαία αποικοδόμηση αναχθεί σε γραμμάρια ανά κυτταρικό όγκο είναι 1,18 g/L PCV και 12,85 g/L PCV αντίστοιχα (Εικόνα 21).

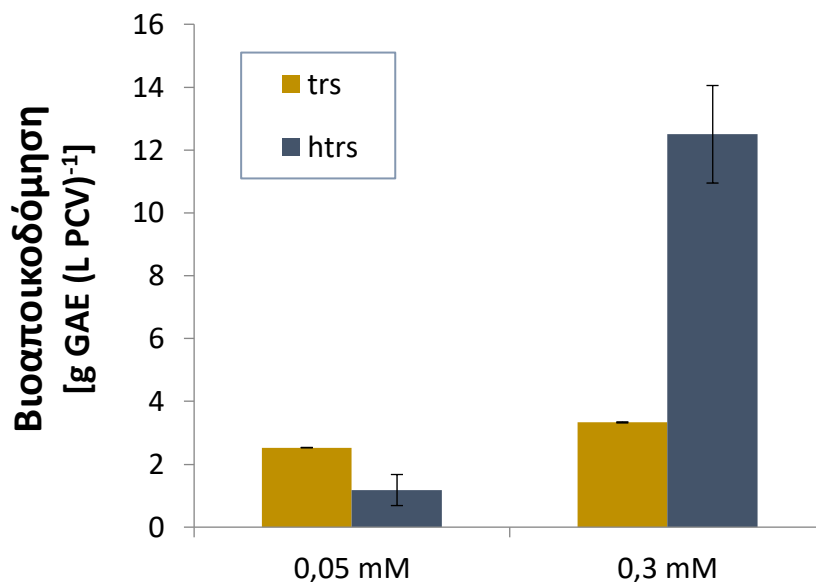


Εικόνα 20. Ποσοστιαία βιοαποικοδόμηση υδροξυτυροσόλης (0,05 mM, 0,3mM) ανά καλλιέργεια του μικροφύκους *Scenedesmus obliquus*, κατά τη διάρκεια των 5 ημερών του πειράματος.

Σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου, τα οποία διεξήχθησαν από τους Ανδρέα Ιωάννου και Κατερίνα Παπαζή εξετάστηκε η βιοαποικοδόμηση της τυροσόλης από το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus* σε αυτότροφες συνθήκες, ομοίως σε συγκέντρωση 0,05mM και 0,3mM. Και σε αυτή την περίπτωση η βιοαποικοδόμηση της τυροσόλης ανά κυτταρικό όγκο είναι υψηλότερη στην συγκέντρωση 0,3mM από ότι στην συγκέντρωση 0,05mM (Εικόνα 21).

Στην Εικόνα 21 απεικονίζεται συγκριτικά η βιοαποικοδόμηση των δύο φαινολών σε συγκεντρώσεις 0,05mM και 0,3mM ανά κυτταρικό όγκο του μικροφύκους. Καθώς η υδροξυτυροσόλη διαθέτει ένα επιπλέον υδροξύλιο συγκριτικά με την τυροσόλη, αναμένεται η βιοαποικοδόμησή της να είναι υψηλότερη από αυτή της τυροσόλης. Η πρόβλεψη αυτή επιβεβαιώνεται στην περίπτωση της υψηλής συγκέντρωσης (0,3mM), όχι όμως στη χαμηλή (0,05mM). Αυτή η παρέκκλιση πιθανά να οφείλεται

στην παρουσία της αιθανόλης στην οποία ήταν διαλυμένη η υδροξυτυροσόλη (βλέπε ΥκΜ). Κατ' επέκταση, το μικροφύκος, στην συγκέντρωση 0,05mM, δίνει προτεραιότητα στην αιθανόλη ως πηγή άνθρακα, γεγονός που καθυστερεί την έναρξη της βιοαποικοδόμησης της υδροξυτυροσόλης.

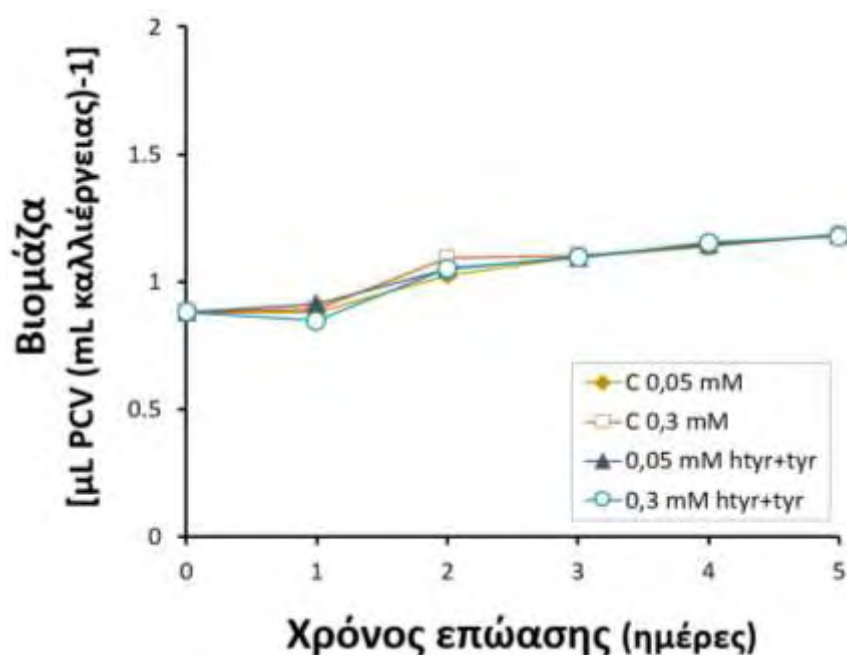


Εικόνα 21. Συγκριτική απεικόνιση της βιοαποικοδόμησης της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης (0,05 mM, 0,3mM) ανά κυτταρικό όγκο (PCV) του μικροφύκους *Scenedesmus obliquus* την 5<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος (αναγωγή σε g GAE (L PCV)<sup>-1</sup>, βλέπε ΥκΜ).

Για να εξεταστεί το ενδεχόμενο αποικοδόμησης της υδροξυτυροσόλης που δεν οφείλεται στο μικροφύκος, το ίδιο πείραμα διαξήχθη απουσία κυττάρων. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι η αποικοδόμηση της υδροξυτυροσόλης οφείλεται αποκλειστικά στην παρουσία του μικροφύκους.

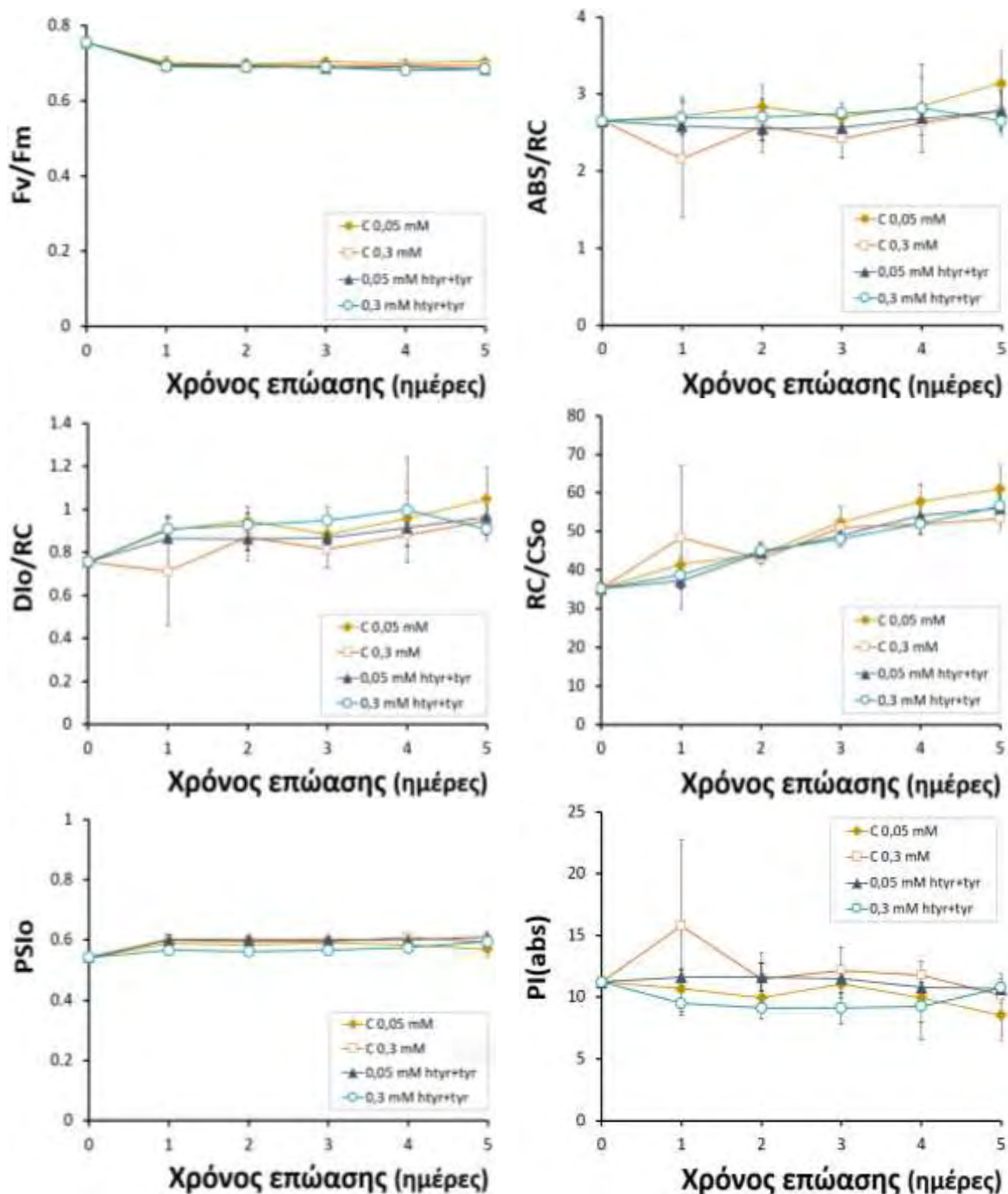
## Επίδραση του Συνδυασμού Υδροξυτυροσόλης και Τυροσόλης σε Αυτότροφες Καλλιέργειες *Scenedesmus obliquus*

Δεδομένου των προηγούμενων πειραμάτων και των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν, δοκιμάστηκε η ταυτόχρονη βιοαποικοδόμηση και των δύο κύριων φαινολών των ΥΑΕ (htyr+tyr) από το μικροφύκος σε δύο δοκιμές, 0,05mM από την κάθε φαινόλη στην πρώτη δοκιμή και 0,3mM από κάθε φαινόλη στη δεύτερη (Βλέπε ΥΚΜ). Λόγω της παρουσίας αιθανόλης στο stock της υδροξυτυροσόλης, και άρα στις δοκιμές με την χαμηλή (0,05mM) και υψηλή (0,03mM) συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων, τα control είναι δύο, στα οποία έχει προστεθεί η αντίστοιχη μικροποσότητα αιθανόλης. Η ανάπτυξη του μικροφύκου δεν παρεμποδίζεται από την παρουσία των φαινολών (Εικόνα 22), και η μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού δεν υποδεικνύουν σημάδια καταπόνησης λόγω της παρουσίας του φαινολικού μίγματος (Εικόνα 23).



Εικόνα 22. Κινητική ανάπτυξης του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* παρουσία 0,05mM και 0,3mM από κάθε φαινόλη





**Εικόνα 23.** Παράμετροι του JIP-test κατά τη διάρκεια των 5 ημερών διεξαγωγής του πειράματος, που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*, παρουσία 0,05 mM και 0,3mM από κάθε φαινόλη, σε ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50-60  $\mu\text{mol} \times \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Fv/Fm: φωτοσυνθετική απόδοση

ABS/RC: μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας

D10/RC: ενέργεια που διαχέεται με τη μορφή θερμότητας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης

RC/CS0: πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης

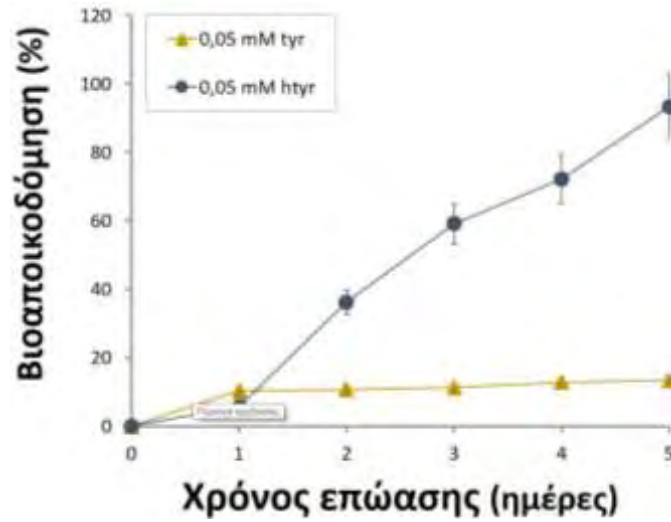
PI<sub>(abs)</sub>: φωτοσυνθετικός δείκτης.

PSI<sub>0</sub>: πρωτογενής φωτοχημεία

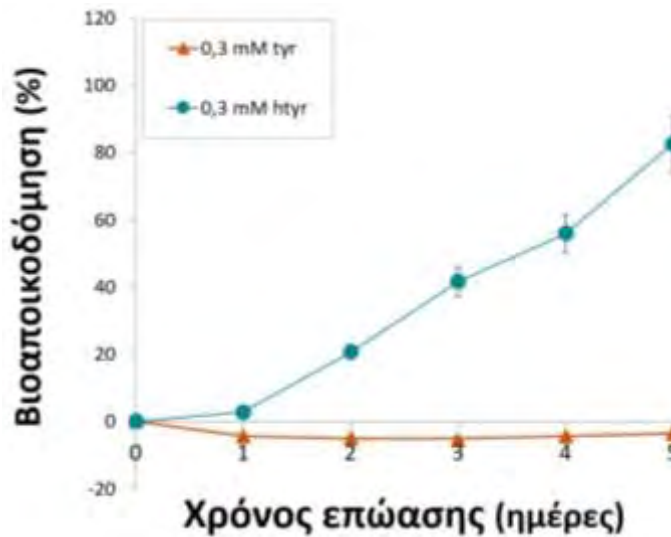
## Βιοαποικοδόμηση Συνδυασμού Υδροξυτυροσόλης και Τυροσόλης σε Αυτότροφες Καλλιέργειες *Scenedesmus obliquus*

Αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκε HPLC για την διευκρίνιση της ποσότητας των δύο φαινολικών ενώσεων (htyr + tyr) που είχε βιοαποικοδομηθεί στο τέλος του πειράματος, διότι η μέθοδος Folin-Ciocalteu δεν είναι ικανή να διακρίνει μεταξύ των δύο φαινολών, καθώς ανιχνεύει γενικά φαινόλες.

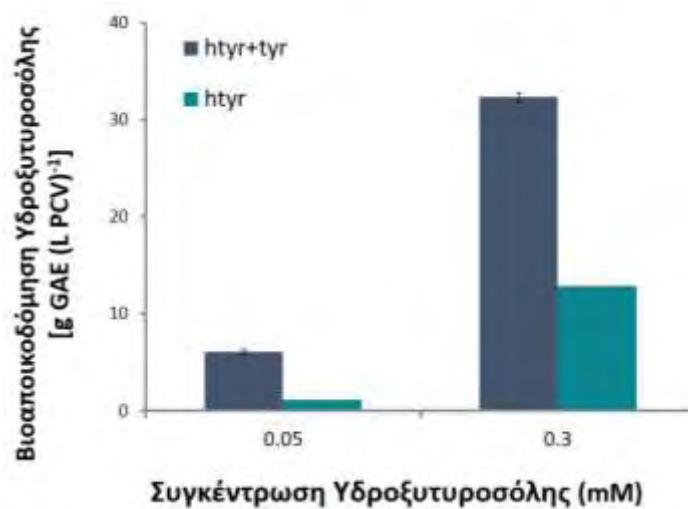
Στη μικρότερη συγκέντρωση η υδροξυτυροσόλη βιοαποικοδομείται κατά 93,5% και η τυροσόλη σε ποσοστό 13% (Εικόνα 24). Στην υψηλή συγκέντρωση, η υδροξυτυροσόλη αποικοδομείται επίσης σε μεγάλο ποσοστό (83,5%), η ποσοστιαία βιοαποικοδόμηση της τυροσόλης όμως φαίνεται να παίρνει αρνητικές τιμές (Εικόνα 25). Η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη διαφέρουν κατά ένα υδροξύλιο, επομένως το πρώτο βήμα της διάσπασης της υδροξυτυροσόλης είναι πιθανά η αφαίρεση αυτού του υδροξυλίου και η μετατροπή της σε τυροσόλη. Ανεβαίνει έστω και οριακά η συγκέντρωση της τυροσόλης στο θρεπτικό μέσο, εξού και οι αρνητικές τιμές στην ποσοστιαία αποικοδόμηση της τυροσόλης. Μετά την εξάντληση της υδροξυτυροσόλης από το θρεπτικό αναμένεται η βιοαποικοδόμηση της τυροσόλης. Η ανά κυτταρικό όγκο βιοαποικοδόμηση της υδροξυτυροσόλης υποδεικνύει ότι η υψηλότερη συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης οδηγεί σε υψηλότερη βιοαποικοδομησιμότητα. Επιπροσθέτως, η βιοαποικοδόμηση της υδροξυτυροσόλης είναι υψηλότερη παρουσία τυροσόλης παρά απουσία αυτής (Εικόνα 26). Το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο υψηλότερο τοξικό φορτίο λόγω της παρουσίας και των δύο φαινολών, με αποτέλεσμα το μικροφύκος να επενδύει το ενεργειακό του απόθεμα του στη αποτοξικοποίηση του περιβάλλοντος, ξεκινώντας με την πιο ενεργειακά απαιτητική ένωση, την υδροξυτυροσόλη.



Εικόνα 24. Βιοαποικοδόμηση υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης (0,05 mM) ανά καλλιέργεια του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus*



Εικόνα 25. Βιοαποικοδόμηση υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης (0,3mM) ανά καλλιέργεια του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus*

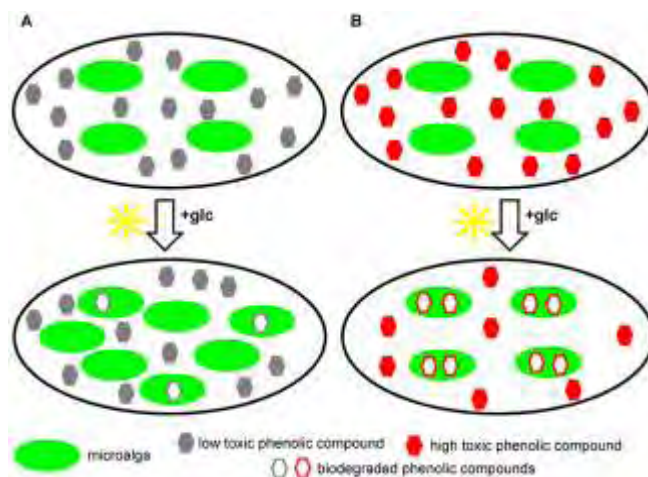


Εικόνα 26. Βιοαποικοδόμηση υδροξυτυροσόλης απουσία ή παρουσία τυροσόλης (0,05 mM, 0,3mM) ανά κυτταρικό όγκο (PCV) του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus*

## Συζήτηση

Πρόσφατες αναφορές έχουν δείξει ότι δεν έχει τόσο σημασία η επιλογή του οργανισμού, όσο η επιλογή των κατάλληλων εκείνων συνθηκών που θα αλλάξουν το βιοενεργητικό ισοζύγιο και θα επιτρέψουν την ενεργοποίηση των απαραίτητων μεταβολικών μηχανισμών για τη βιοαποικοδόμηση των τοξικών ενώσεων [Papazi and Kotzabasis, 2007; Papazi and Kotzabasis, 2008; Papazi et al., 2012; Papazi and Kotzabasis, 2013]. Η βιοαποικοδόμηση ξеноβιοτικών ουσιών είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία που εξαρτάται από βιοτικές και αβιοτικές μεταβλητές. Για την αποτοξικοποίηση μιας ξеноβιοτικής ουσίας από μικροφύκη, υιοθετούνται διαφορετικές στρατηγικές ανάλογα με την τοξικότητα της ουσίας και το ενεργειακό ισοζύγιο του χλωροφύκου. Αυτό το ενεργειακό ισοζύγιο καθορίζεται από πληθώρα βιοτικών και αβιοτικών παραμέτρων. Όσον αφορά τις φαινολικές ενώσεις, η θέση (ortho-, meta- ή para-) και ο αριθμός των υποκαταστατών στο φαινολικό δακτύλιο, τα φαινόμενα του συντονισμού και της επαγωγής, που ελέγχουν τη συμπεριφορά του υποκαταστάτη ως δότη ή δέκτη ηλεκτρονίων, καθορίζουν τις ενεργειακές απαιτήσεις για τη βιοδιάσπασή τους, ενώ η εξωγενής πηγή του άνθρακα (ανόργανου ή/και οργανικού) και η ένταση της φωτονιακής ακτινοβολίας είναι οι σημαντικότεροι από τους παράγοντες που ελέγχουν (μέσω της αναπνευστικής και φωτοσυνθετικής διαδικασίας) τα ενεργειακά αποθέματα του χλωροφύκου που θα επενδυθούν για τη βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων διαφορετικής τοξικότητας και δυσκολίας βιοδιάσπασης [Pinto et al., 2002; Papazi and Kotzabasis, 2007; Papazi and Kotzabasis, 2008; Papazi et al., 2012; Papazi and Kotzabasis, 2013]. Σημαντικό ρόλο παίζουν επίσης η θερμοκρασία [Margesin et al., 2005], το pH [Graham et al., 2004], η διαθεσιμότητα και περιεκτικότητα σε οξυγόνο [Melo et al., 2005], και η αρχική συγκέντρωση κυττάρων στην καλλιέργεια [Jiang et al., 2012].

Το μικροφύκος χρησιμοποιεί δύο κύριες στρατηγικές αποτοξικοποίησης. Η πρώτη στρατηγική απαιτεί την εξογενή παροχή ενέργειας, πχ. γλυκόζη, ώστε να εξασφαλιστεί η απαραίτητη ενέργεια ενεργοποίησης για το σχάση του φαινολικού δακτυλίου. Αυτή η στρατηγική χρησιμοποιείται ως



Εικόνα 27. Οι δύο στρατηγικές που χρησιμοποιεί το μικροφύκος για την βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων, ανάλογα με την τοξικότητά τους.

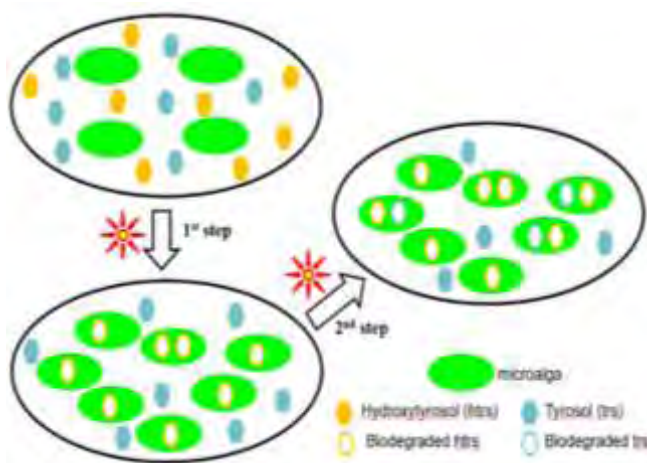
επί το πλείστον όταν η διάσπαση της φαινολικής ένωσης είναι ενεργειακά πιο απαιτητική. Όσο αυξάνεται η τοξικότητα της φαινολικής ένωσης, φαίνεται να επενδύεται περισσότερη ενέργεια από το μικροφύκος για την αποτοξικοποίηση του περιβάλλοντός του και λιγότερη για την ανάπτυξη του χλωροφύκου (άμεση αποτοξικοποίηση) (Εικόνα 27<sub>B</sub>) [Papazi and Kotzabasis, 2007; Papazi and Kotzabasis, 2008; Papazi et al., 2012; Papazi and Kotzabasis, 2013]. Η δεύτερη στρατηγική δεν προϋποθέτει την παροχή εξωγενούς ενέργειας, διότι το μικροφύκος προτιμά την κατανάλωση της γλυκόζης παρά της φαινολικής ένωσης. Η στρατηγική αυτή ακολουθείται για ενώσεις που δεν προκαλούν υψηλά επίπεδα τοξικότητας, η οποία εκφράζεται ως απουσία παρεμπόδισης της ανάπτυξης και καταπόνησης στο μοριακό μηχανισμό και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Η χαμηλή τοξικότητα δίνει το περιθώριο στο μικροφύκος να μην εστιάσει στην βιοαποικοδόμηση της φαινολικής ένωσης, αλλά να αυξήσει τη βιομάζα του, σε σημείο που ο αριθμός των κυττάρων είναι αρκετά μεγαλύτερος από τον αριθμό των κυττάρων της αρχικής καλλιέργειας, ώστε το κάθε κύτταρο να έχει να αντιμετωπίσει μικρότερο αριθμό τοξικών ουσιών. Η αποτοξικοποίηση επέρχεται χωρίς την σπατάλη επιπλέον ενέργειας (έμμεση αποτοξικοποίηση) (Εικόνα 27<sub>A</sub>).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* για την βιοαποικοδόμηση της υδροξυτυροσόλης, αλλά και του συνδυασμού υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης, σε υψηλή (0,3mM) και χαμηλή συγκέντρωση (0,05mM). Η υδροξυτυροσόλη, όπως και η τυροσόλη, ανήκουν σε αυτές τις

φαινολικές ενώσεις που δεν είναι τοξικές για το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus*. Αυτό φαίνεται τόσο από τα αποτελέσματα της ανάπτυξης του μικροφύκου (Εικόνα 18), όσο και από τα αποτελέσματα των μετρήσεων του επαγωγικού φθορισμού που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Εικόνα 19). Το γεγονός αυτό έδωσε την ευκαιρία στο μικροφύκος που αναπτύσσεται σε αυτότροφες συνθήκες να βιοδιασπά την υδροξυτυροσώλη, προκειμένου να την χρησιμοποιήσει ως εναλλακτική πηγή άνθρακα/ενέργειας. Τα πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι η υδροξυτυροσώλη είναι μια βιοαποικοδομήσιμη, από το μικροφύκος *Scenedesmus obliquus*, φαινολική ένωση. Σύμφωνα με την παραπάνω στρατηγική, αναμενόταν να παρατηρηθεί υψηλότερη βιοαποικοδόμηση και στις δύο συγκεντρώσεις, συγκριτικά με την τυροσώλη. Στην υψηλότερη συγκέντρωση των 0,3mM η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε, στην χαμηλότερη συγκέντρωση των 0,05mM, όμως, τα αποτελέσματα ήταν τα αντίθετα (Εικόνα 21). Η απόκλιση αυτή μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία μικροποσότητας αιθανόλης στο μέσο καλλιέργειας, η οποία υπήρχε στο αρχικό stock της υδροξυτυροσώλης (βλέπε ΥΚΜ). Κατά συνέπεια, στην χαμηλή συγκέντρωση (0,05mM) το μικροφύκος προτιμάει την κατανάλωση της αιθανόλης ως πηγή άνθρακα, και αφού αυτή εκλείψει, στρέφεται στην υδροξυτυροσώλη, γεγονός που καθυστερεί την βιοαποικοδόμηση της υδροξυτυροσώλης.

Σε αυτότροφες συνθήκες και με ταυτόχρονη παρουσία της υδροξυτυροσώλης και τυροσώλης, η βιοαποικοδόμηση της υδροξυτυροσώλης ήταν η υψηλότερη. Το μικροφύκος βιοαποικοδόμησε πρώτα την ενεργειακά πιο απαιτητική φαινολική ένωση (υδροξυτυροσώλη), με μεγαλύτερη απόδοση στην υψηλή συγκέντρωση (0,3mM) (Εικόνες 24, 25). Επιπροσθέτως, η βιοαποικοδόμηση της υδροξυτυροσώλης ήταν υψηλότερη όταν υπήρχε και τυροσώλη στο μέσο καλλιέργειας (Εικόνα 26), κάτι

που οφείλεται στη μεγαλύτερη δυσκολία που δημιουργεί η ταυτόχρονη παρουσία των δύο φαινολικών ενώσεων, οπότε το μικροφύκος καλείται να αποτοξικοποιήσει το περιβάλλον του, ξεκινώντας από την ενεργειακά πιο απαιτητική ένωση (Εικόνα 28) [Papazi and Kotzabasis, 2013]. Η τυροσόλη φαίνεται να βιοαποικοδομείται ελάχιστα, όταν συνυπάρχει με



Εικόνα 28. Σε αυτότροφες συνθήκες και με ταυτόχρονη παρουσία της υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης, το μικροφύκος βιοαποικοδομεί πρώτα την ενεργειακά πιο απαιτητική φαινολική ένωση (υδροξυτυροσόλη), και στην συνέχεια την λιγότερο απαιτητική (τυροσόλη).

την υδροξυτυροσόλη στο μέσο. Στην υψηλότερη συγκέντρωση του συνδυασμού των φαινολικών ενώσεων, η τυροσόλη αυξήθηκε αντί να μειωθεί. Η υδροξυτυροσόλη, μετά την σχάση του δεσμού μεταξύ της υδροξυλομάδας και του φαινολικού δακτυλίου, μετατρέπεται σε τυροσόλη, η οποία συσσωρεύεται έως ότου να καταναλωθεί όλη η υδροξυτυροσόλη. Από το σημείο αυτό και μετά, αναμένεται η τυροσόλη να βιοαποικοδομηθεί, κάτι που δεν καταφέραμε να παρατηρήσουμε λόγω της σύντομης διάρκειας του πειράματος.

Η εκμετάλλευση των στρατηγικών που υιοθετούνται από το μικροφύκος ανάλογα με το ενεργειακό ισοζύγιο και την καταπόνηση που δέχεται από τον ρύπο μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω σε μεγαλύτερης κλίμακας πειράματα, ανοίγοντας το δρόμο για μελλοντικές βιοτεχνολογικές εφαρμογές που αφορούν τη βιοαποικοδόμηση αποβλήτων ελαιουργείων.

## Βιβλιογραφία

- Aaronson S., Berner T., Dubinsky Z. (1980). *Algal biomass: Production and Use*. Shelef, G. Soeder, C.J. (ed.) Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. p.575-601 ISBN: 0444802428.
- Aggelis G., Iconomou D., Christou M., Bocas D., Kotzailias S., Christou G., Tzagou V., Papnikolaou S. (2003). *Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using Pleurotus ostreatus in bioreactor cultures and biological evaluation of the process*. Water Research 37(16): 3897-3904.
- Aliotta G., Fiorentino A., Oliva A., Temussi F. (2002). *Olive oil mill wastewater: Isolation of polyphenols and their phytotoxicity in vitro*. Allelopathy Journal 9(1): 9-17.
- Ben Sassi A., Boularbah A., Jaouad A., Walker G., Boussaid A. (2006). *A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco*. Process Biochemistry 41(1): 74-78.
- Bishop L., Senger H. (1971). *Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of Scenedesmus*. San Pietro, A. (ed.) *Methods in Enzymology*. Academic Press. p.130–143 ISBN: 978-0-12-803048-6.
- Brenes M., García A., García P., Rios J.J., Garrido A. (1993). *Phenolic compounds in Spanish olive oils*. Journal of Agricultural Food and Chemistry 47(9): 3535-3540.
- Brinck J., Jönsson A.S., Jönsson B., Lindau J. (1998). *Influence of the pH on the adsorptive fouling of ultrafiltration membranes by fatty acid*. Journal of Membrane Sciences 164(1-2): 187-194.
- Butler G.L., Deason T.R., O'Kelley J.C., (1975). *Loss of five pesticides from cultures of twenty-one planktonic algae*. Bulletin of Environmental Contamination Toxicology 13(2): 149-152.
- Capasso R., Cristinzio G., Evidente A., Scognamiglio F. (1992). *Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste waters*. Phytochemistry 31(12): 4125-4128.
- D' Annibale A., Casa R., Pieruceti F., Ricci M., Marabottini R. (2004). *Lentinula edodes removes phenols from olive – mill wastewater: impact on durum wheat (Triticum durum Desf.) germinability*. Chemosphere 54(7): 887-894.
- Daassi D., Lozano-Sanchez J., Borrás-Linares I., Belbahri L., Woodward S., Zouari-Mechichi H., Mechichi T., Nasri M., Segura-Carretero A. (2014). *Olive oil mill wastewaters: Phenolic content characterization during degradation by Coriopsis gallica*. Chemosphere 113: 62-70.
- DellaGreca M., Monaco P., Pinto G., Pollio A., Previtiera L., Temussi F. (2001). *Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill waste waters*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 67(3): 352-359.



- Diaz E. (2004). *Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility*. International Microbiology 7(3): 173-180.
- Ellis B.E. (1977). *Degradation of phenolic compounds by fresh-water algae*. Plant Science Letters 8(3): 213-216.
- Environmental health criteria for phenol  
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc161.htm>
- Fadil K., Chahlaoui A., Ouahbi A., Zaid A., Borja R. (2003). *Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry*. International Biodeterioration and Biodegradation 51(1): 37-41.
- Fiesta Ros de Ursinos J.A., Borja-Padilla R. (1992). *Use and treatment of olive mill wastewater: current situation and prospects in Spain*. Grasas y Aceites, 43(2): 101-106.
- Gaffron H. (1939). *Der auffallende Unterschied in der Physiologie nahe verwandter Algenstaemme nebst Bemerkungen über die Lichtatmung*. Biologisches Zentralblatt 43: 402-410.
- Graham N., Jiang C.C., Li X.Z., Jiang J.Q., Ma J. (2004). *The influence of pH on the degradation of phenol and chlorophenols by potassium ferrate*. Chemosphere 56(10): 949-56.
- Hamdi M., Ellouz R. (1992). *Use of Aspergillus niger to improve filtration of olive mill wastewaters*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 53(2): 195–200.
- International Oil Council  
<https://www.exportgate.gr/overview/sectors/agriculture/olive-oil>  
<http://www.oliveoiltimes.com/olive-oil-business/ioc-market-summary-september-2011/20979>
- Israilides C.J., Vlyssides A.G., Mourafeti V.N., Karvouni G. (1997). *Olive oil Waste treatment with the use of an electrolysis system*. Bioresources Technology 61(2): 163-170.
- James M.O., Fouts J.R., Bend J.R. (1977). *Xenobiotic metabolizing enzymes in marine fish* Kahn. Springer US, Plenum Press, New York 171–189 ISBN: 978-1-4684-2870-4.
- Jankevicius K., Pakal-Nis R., Baranauskiene A., Juknevicius L., Jankaviciute G. (1992). *Effects of petroleum products polluting the Baltic Sea upon vital activity of plankton and the role of hydrobacteria as self-cleaning factor in water*. Ekologia 4: 35–52.
- Janssen D.B., Dinkla I.J., Poelarends G.J., Terpstra P. (2005). *Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities*. Environmental Microbiology 7(12): 1868-1882.
- Jarboui R., Sellami F., Kharroubi A., Gharsallah N., Ammar E. (2008). *Olive mill wastewater stabilization in open-air ponds: Impact on clay–sandy soil*. Bioresource Technology 99(16): 7699–7708.

- Jiang L., Ruan Q., Li R., Li T. (2012). *Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of Acinetobacter sp. BS8Y*. Journal of Basic Microbiology 53(3): 224-230.
- Karpouzas D.G., Ntougias S., Iskidou E., Rousidou C., Papadopoulou K.K., Zervakis G.I., Ehaliotis C. (2010). *Olive mill wastewater affects the structure of soil bacterial communities*. Applied Soil Ecology 45(2): 101-111.
- Kautsky H., Hirsch A. (1931). *Neue versuche zur kohlenfaure-assimilation*. Naturwissenschaften 19(48): 964.
- Klekner V., Kosaric N. (1992). *Degradation of phenols by algae*. Environmental Technology 13(5): 493-501.
- Kobayashi H., Rittmann B.E. (1982). *Microbial removal of hazardous organic compounds*. Environmental Science and Technology 16(3): 170-183.
- Kotronarou N., Méndez M. (2003). *IMPEL Olive Oil Project*. European Union Network for the Implementation and Enforcement of Environmental Law.
- Kotsou M., Mari I., Lasaridi K., Chatzipavlidis I., Balis C., Kyriacou A. (2004). *The effect of olive oil mill wastewater (OMW) on soil microbial communities and suppressiveness against Rhizoctonia solani*. Applied Soil Ecology 26(2): 113-121.
- Leouifoudi I., Zyad A., Amechrouq A., Oukerrou M.A., Mouse H.A., Mbarki M. (2014). *Identification and characterisation of phenolic compounds extracted from Moroccan olive mill wastewater*. Food Science and Technology 34(2): 249-257.
- Linares A., Caba J.M., Ligeró F., De la Rubia T., Martínez J. (2003). *Detoxification of semisolid olive-mill wastes and pine-chip mixtures using Phanerochaete flavido-alba*. Chemosphere 51(9): 887-891.
- Logothetis K., Dakanali S., Ioannidis N., Kotzabasis K. (2004). *The impact of high CO<sub>2</sub> concentration on the structure and function of the photosynthetic apparatus and the role of polyamines*. Journal of Plant Physiology 161(6): 715-724.
- Lovell C.R., Eriksen N.T., Lewitus A.J., Chen Y.P. (2002). *Resistance of the marine diatom Thalassiosira sp. to toxicity of phenolic compounds*. Marine Ecology Progress Series 229: 11-1.
- Mahmoud M., Janssen M., Haboub N., Nassour A., Lennartz B. (2010). *The impact of olive mill wastewater application on flow and transport properties in soils*. Soil and Tillage Research 107(1): 36-41.
- Margesin R., Fonteyne P.A., Redl B. (2005). *Low-temperature biodegradation of high amounts of phenol by Rhodococcus spp. and basidiomycetous yeasts*. Research in Microbiology 156(1): 68-75.

- Meloa J.S., Kholib S., Patwardhanb A.W., D'Souza S.F. (2005). *Effect of oxygen transfer limitations in phenol biodegradation*. Process Biochemistry 40(2): 625-628.
- Niaounakis M., Halvadakis C.P. (2006). *Olive Processing Waste Management*, Literature Review and Patent Survey 2nd Edition Pergamon ISBN: 0-08-044851-8.
- Oswald W., Gotaas H. (1957). *Photosynthesis in sewage treatment*. Transactions of the American Society of Civil Engineers 122: 73-105.
- Papazi A., Assimakopoulos K., Kotzabasis K. (2012). *Bioenergetic strategy for the biodegradation of p-cresol by the unicellular green alga Scenedesmus obliquus*. PLoS One 7: e51852.
- Papazi A., Kotzabasis K. (2007). *Bioenergetic strategy of microalgae for the biodegradation of phenolic compounds: exogenously supplied energy and carbon sources adjust the level of biodegradation*. Journal of Biotechnology 129(4): 706-716.
- Papazi A., Kotzabasis K. (2008). *Inductive and resonance effects of substituents adjust the microalgal biodegradation of toxic phenolic compounds*. Journal of Biotechnology 135(4): 366-373.
- Papazi A., Kotzabasis K. (2013). *"Rational" Management of Dichlorophenols Biodegradation by the Microalga Scenedesmus obliquus*. PLoS One 8: e61682.
- Pinto G. Pollio A., Previtiera L., Temussi F. (2002). *Biodegradation of Phenols by microalgae*. Biotechnology Letters 24(24): 2047-2051.
- Rozzi A., Malpei F. (1996). *Treatment and Disposal of Olive Mill Effluents*. International Biodeterioration and Biodegradation 38(3-4): 135-144.
- Saez L., Perez J., Martinez J. (1992). *Low molecular weight phenolics attenuation during simulated treatment of wastewaters from olive oil mills in evaporation ponds*. Water Research 26(9): 1261-1266.
- Sampedro I., Romero C., Ocampo J.A., Brenes M., Garcia I. (2004). *Removal of Monomeric Phenols in Dry Mill Olive Residue by Saprobic Fungi*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(14): 4487-4492.
- Senger H., Brinkmann G. (1986). *Protochlorophyll(ide) accumulation and degradation in the dark and photoconversion to chlorophyll in the light in pigment mutant C-2A' of Scenedesmus obliquus*. Physiologia Plantarum 68(1): 119-124.
- Singleton V.L., Rossi J.A. (1965). *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. American Journal of Enology and Viticulture 16(3): 144-158.
- Strasser B.J., Strasser R.J. (1995). *Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test* in Mathis, P. (ed.) *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, Springer Netherlands. p.977-980 ISBN: 978-94-009-0173-5.

- Tikoo V., Scragg A.H., Shales S.W. (1997). *Degradation of pentachlorophenol by microalgae*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 68(4): 425-431.
- Tsagaraki E., Lazarides H.N., Petrotos K.B. (2006). *Olive Mill Wastewater Treatment*. Oreopoulou, V. Russ, W. (ed.) *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*, Springer US. p.133-157 ISBN: 978-0-387-35766-9.
- Warshawsky D., Cody T., Radike M., Reilman R., Schumann B., La Dow K., Schneider J. (1995). *Biotransformation of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light*. Chemo-Biological Interactions 97(2) 131-148.
- Warshawsky D., Radike M., Jayasimhulu K., Cody, T. (1988). *Metabolism of benzo(a)pyrene by a dioxygenase enzyme system of the freshwater green alga *Selenastrum capricornutum**. Biochemical and Biophysical Research Communications 152(2): 540-544.
- Zervakis G., Balis C. (1996). *Bioremediation of olive oil mill wastes through the production of fungal biomass*. Royle D.J. *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Pennsylvania State University p.311-323 ISBN: 1-883956-01-3.
- Δερβίσης Σ. (2004). *Αποικοδόμηση Αποβλήτων των Διαφασικών Ελαιουργείων Χρησιμοποιώντας Υπέρηχους και Συγκριτική Ανάλυση Αποβλήτων Ελαιουργείων με τις Μεθόδους Χημειοφωταύγειας και Folin-Ciocalteu*. Διπλωματική Εργασία, Χανιά Κρήτης.
- Κουσέρη Ε. (2008). *Συνεισφορά εντός κοίτης αποθέσεων κασιόγαρου στην ποιότητα του ποταμού Ευρώτα*. Διπλωματική Εργασία, Χανιά Κρήτης.
- Λοϊζίδης Μ. (2009). *Επεξεργασία υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη μέθοδο της συγχουμοποίησής τους με πυρηνόξυλο*. Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα.
- Μπαλατσούρας Γ. Δ. (1997). *Το Ελαιόδενδρο*. Πελεκάνος p.409 ISBN: 960-400-060-8.
- Μπλίκια Π. (2009). *Βιοτεχνολογικές Μέθοδοι Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου*. Διδακτορική Διατριβή, Πάτρα.
- Πατώνη Μ. (2010). *Μελέτη αναερόβιας βιοαποδόμησης υγρών αποβλήτων υψηλού COD με ηλεκτρολυτική προεπεξεργασία*. Διδακτορική Διατριβή, Χανιά Κρήτης.