

Τεχνικές Επεξεργασίας Μικροφυκιών με Εφαρμογή στις Υδατοκαλλιέργειες

Πτυχιακή εργασία

Εισηγητής

Κος Καπαρλιώτης Απόστολος

Σπουδάστρια

Κουμπάρου Βιολέττα

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου,
τους καθηγητές μου και
τους συναδέλφους μου
για την βοήθεια και τη συμπαράσταση που μου
έδειξαν για τη διεκπεραίωση αυτής μου της προσπάθειας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΕΙΔΩΝ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗ ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ ΣΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΤΡΙΒΛΙΩΝ ΣΤΡΩΜΕΝΩΝ ΜΕ ΑΓΑΡ	5
1α) Μέθοδος ψεκασμού.....	6
1β) Μέθοδος ψεκασμού με τριχοειδή πιπέτα.....	7
2) Μέθοδος επίστρωσης τριβλίων με χρήση μικροβιολογικού κρίκου.....	7
ΠΙΘΑΝΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ	9
2. ΜΙΚΡΟΧΕΙΡΙΣΤΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ	10
ΕΞΟΠΑΙΣΜΟΣ	10
ΜΕΘΟΔΟΙ	12
ΠΙΘΑΝΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ	13
ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΓΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΑΡΑΠΑΝΩ ΜΕΘΟΔΩΝ	13

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ Α	17
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	19
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ Β	23
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	24
ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ	29

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΤΑΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΥΚΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	31
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 1	32
ΜΕΘΟΔΟΣ	32
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	33
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 2	36
ΜΕΘΟΔΟΣ	36
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	37
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 3	38
ΜΕΘΟΔΟΣ	38
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	39

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΕΥΡΥΤΕΡΗ ΧΡΗΣΗ ΦΥΚΩΝ

1.ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΦΥΚΩΝ ΜΕ ΕΥΡΕΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗ	43
A. Άγαρ	43
B. Καρραγενάσσες	44
2. ΤΑ ΦΥΚΗ ΚΑΙ Η ΙΑΤΡΙΚΗ	45
A. Μικροφύκη και μακροφύκη	45
B. Εφαρμογή ροδοφυκών στην παραδοσιακή Κινέζικη ιατρική	45
3. ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΦΥΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ	46

<i>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</i>	48
----------------------------------	----

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η υδατοκαλλιέργεια σύμφωνα με στοιχεία και εκτιμήσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Τροφίμων (F.A.O.) αποτελεί έναν από τους ταχύτερα αναπτυσσόμενους τομείς τροφίμων.

Η παγκόσμια παραγωγή υδατοκαλλιεργειών (εξαιρουμένων των φυκών) ανήλθε το 1997 σε 26,3 εκατ. τόνους αντιπροσωπεύοντας το 23% της παγκόσμιας παραγωγής αλιείας και υδατοκαλλιεργειών έναντι 10,6 εκατ. τόνους το 1987, σημείωσε δηλ. μια αύξηση 148%. Η αξία της παραγωγής αυτής ανήλθε σε 41,5 δισεκατομμύρια δολάρια. Την ίδια περίοδο η αλιευτική παραγωγή των θαλασσών ανήλθε σε 94,6 εκατ. τόνους έναντι 85,0 εκατ. τόνους αντίστοιχα, σημειώνοντας μια αύξηση μόλις 11,2%.

Οι προβλέψεις των ειδικών για το μέλλον κάτω από το πρίσμα των νέων αρχών της υπεύθυνης αλιείας και υδατοκαλλιέργειας αλλά και των αναγκών της παγκόσμιας αγοράς αφορούν στην παραγωγή 52 εκατ. τόνων το 2010 και 92 εκατ. τόνων το 2025, ενώ η απόδοση των θαλασσών θα μείνει στάσιμη ή και θα φθίνει.

Ετσι η υδατοκαλλιέργεια από τον αιώνα που άρχισε θα κληθεί να καλύψει το έλλειμμα μεταξύ της διαθέσιμης παραγωγικής δυνατότητας των θαλασσών και της αυξανόμενης ζήτησης αλιευτικών προϊόντων.

Θα είναι δηλαδή ο τομέας τροφίμων που θα συνδεθεί καθοριστικά με το νέο αιώνα.

Το 1997 η συνολική παραγωγή υδατοκαλλιεργειών στην Ε.Ε. έφθασε τους 1.107.763 τόνους συνολικής αξίας 1.975 εκατ. Ευros.

Παρά το γεγονός ότι η Ευρωπαϊκή παραγωγή υδατοκαλλιεργειών αποτελεί το 3% σε όγκο και το 4% σε αξία της παγκόσμιας παραγωγής, εν τούτοις σε ορισμένα είδη (όπως το λαβράκι και η τσιπούρα) η Ευρ. Ένωση προπορεύεται σε παγκόσμια κλίμακα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον και σημασία για εμάς έχει η θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια στην Ελλάδα, η οποία σημειωτέον αντιπροσωπεύει το 55% της Ευρωπαϊκής και το 40% περίπου της Μεσογειακής παραγωγής.

Ο τομέας εξελίχθηκε εντυπωσιακά από τις αρχές της δεκαετίας του '80 λόγω κυρίως των κατάλληλων κλιματολογικών συνθηκών, της διαμόρφωσης των ακτών και των ισχυρών οικονομικών κινήτρων που θεσπίστηκαν από την Ε.Ε. και το Ελληνικό κράτος. Ετσι σήμερα η χώρα μας αποτελεί την πρώτη παραγωγό χώρα σε Μεσογειακό-Ευρωπαϊκό επίπεδο.

Από 12 μονάδες το 1986, 100 το 1990, 193 το 1995 ο κλάδος αριθμεί σήμερα περισσότερες από 250 μονάδες. Αναφορικά με τη συνολική αλιευτική παραγωγή το μερίδιο των θαλάσσιων ιχθυοκαλλιεργειών από 1% το 1990 διαμορφώθηκε σε 20% το 1998. Το ακαθάριστο προϊόν των ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας καλύπτει μερίδιο 32% του συνολικού προϊόντος αλιείας και υδατοκαλλιεργειών.

Για το 1999 οι εκτιμήσεις σύμφωνα με τον Πανευρωπαϊκό Σύνδεσμο Υδατοκαλλιεργητών (F.E.A.P.) αναφέρουν ότι η Ελληνική παραγωγή υπερέβη τις 40.000 τόνους.

Η επιστήμη καθώς και η τεχνολογία στηρίζουν και αναπτύσσουν συνεχώς αυτόν τον τομέα των υδατοκαλλιεργειών. Επιχορηγούνται συνεχώς νέες

επιστημονικές έρευνες, εξοπλισμοί καθώς και σεμινάρια για την επιμόρφωση εκείνων που ασχολούνται με αυτά τα θέματα.

Οι υδατοκαλλιέργειες στηρίζονται καθαρά στην παραγωγή και εκτροφή του γόνου των ψαριών. Όταν αυτός είναι υγιής, αναθρεμένος με τροφές υψηλής ποιότητας, τότε καταλήγουμε σε ένα ανταγωνιστικό ποιοτικό προϊόν. Αυτό το έχει καταφέρει η χώρα μας, όπως αναπτύχθηκε παραπάνω, και συνεχώς εξελίσσεται.

Ο γόνος των ψαριών για την ομαλή ανάπτυξή του χρειάζεται παράλληλα να υποστηρίζεται η καλλιέργειά του και από καλλιέργειες πλαγκτονικών οργανισμών, φυτικούς και ζωικούς. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται και τα μικρόφύκη. Οι ιχθυογεννητικοί σταθμοί καλλιεργούν μεγάλους όγκους μικροφυκών. Τα μικρόφύκη που χρησιμοποιούνται είναι επί το πλείστον εισαγόμενα από τράπεζες καλλιερειών του εξωτερικού. Τα συγκεκριμένα είναι πολλές φορές δύσκολο να προσαρμοστούν στα Ελληνικά νερά και δεν αποδίδουν τόσο καλά όσο θα απέδιδαν αν ήταν ενδημικά. Αν ήταν εφικτό να απομονωθούν στελέχη ενδημικά των περιοχών όπου υφίστανται οι ιχθυογεννητικοί σταθμοί τότε και το κόστος της αγοράς τους θα μηδενιζόταν αλλά το σημαντικότερο, αυτά θα είχαν καλύτερους ρυθμούς ανάπτυξης αφού θα προσαρμόζονταν ευκολότερα στις συνθήκες καλλιέργειας. Επομένως το τελικό προϊόν θα είχε χαμηλότερη τιμή και καλύτερη ποιότητα. Μέθοδοι απομόνωσης στελεχών αναφέρονται στο κεφάλαιο 1 αυτής της εργασίας.

Η καλλιέργεια των μικροφυκών σε μεγάλους όγκους που απαιτείται στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς επιφέρει πολλά προβλήματα. Καταρχήν η συντήρηση τέτοιων όγκων είναι ασύμφορη από θέμα χώρου, ενεργειακού κόστους καθώς και εργατοωρών. Σε αυτή τη διαδικασία δίνει λύση η κρουοπροστασία. Μέθοδοι αυτής αναφέρονται στο κεφάλαιο 2. Είναι μια τεχνική που επιτρέπει να καταψύχονται τα μικρόφύκη για μεγάλο χρονικό διάστημα και όταν τα έχουμε ανάγκη ξεπαγώνουν και συνεχίζουν να επιτελούν κανονικά τις βιολογικές τους λειτουργίες.

Άλλο πρόβλημα που εμφανίζεται στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς είναι οι ασθένειες. Μέχρι τώρα αντιμετωπίζονται προληπτικά με κάποια απολυμαντικά, με φιλτράρισμα του θαλασσινού νερού, με εμβολιασμούς, ή με τη χρήση αντιβιοτικών όπου κρίνεται απαραίτητο. Σημαντικό ρόλο παίζει επίσης και η διατήρηση συνθηκών υγιεινής από το προσωπικό. Ωστόσο η χρήση εμβολίων ή αντιβιοτικών αλλά και απολυμαντικών και αντισηπτικών αφήνει κατάλοιπα στο περιβάλλον και στους καλλιεργούμενους οργανισμούς. Με τη συνεχή χρήση αντιβιοτικών ουσιών δημιουργούνται ανθεκτικά στελέχη μικροβίων και χρειάζονται έτσι ισχυρότερα αντιβιοτικά με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας αλυσίδας που δε σταματά ποτέ. Σε αυτό το στάδιο η επιστήμη επεμβαίνει και πειραματίζεται για την καταπολέμηση των ασθενειών με πιο φυσικό τρόπο. Η συγκεκριμένη προσπάθεια βρίσκεται σε πειραματικό στάδιο. Με την εύρεση ουσιών στα ενδημικά μικρόφύκη που να αναστέλλουν την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών θα λυθεί το πρόβλημα χρήσης αντιβιοτικών ουσιών και τα κατάλοιπα στο περιβάλλον και στο παραγόμενο προϊόν. Το κόστος επίσης θα μειωθεί και επακόλουθα θα μειωθεί και η τιμή πώλησης του προϊόντος. Στο κεφάλαιο 3 αναπτύσσονται μέθοδοι που ασχολούνται με την εύρεση βακτηριοστατικών ουσιών στα μικρόφύκη.

Από τη βιβλιογραφία αναφέρονται ανά τον κόσμο προσπάθειες εύρεσης ουσιών στα φύκη που δρουν βακτηριοστατικά. Τα τροπικά θαλάσσια φύκη έχει αποδειχθεί ότι είναι πλούσια πηγή βιοενεργών ουσιών με βιοφαρμακευτικές δυνατότητες. Έχουν αναφερθεί από τα θαλάσσια φύκη ιδιότητες που αφορούν τοπικά καθαριστικά (Reichelt & Borowitzka, 1984), αντιμυκητιακές (Welch, 1962, Moreau et al, 1984), αντινεοπλασματικές (Mayer & Panick 1984, Patterson et al 1984), αντιγόνιμες

(Naqvietal 1980) και αντι-μολυσματικές (για ιούς). Ο Horpe (1979) ανασκόπησε την ευρεία παγκόσμια χρήση των φυκών στην παραδοσιακή ιατρική.

Αντιβακτηριακή δράση έχει ευρέως αναφερθεί από θαλάσσια φύκη και έχουν δημοσιευθεί άρθρα από τους Sieburth (1964) και Burkholder (1973). Μεταγενέστερες έρευνες για την αντιβακτηριδιακή δράση των φυκών έχει αναφερθεί από τη Μεσόγειο (Caccamese *et al*, 1980, 1981, Moreau *et al*, 1984), την Ινδία (Raot & Parekh, 1981), Κίνα (Mat Tan, 1984), Αυστραλία (Reichelt & Borowitzka, 1984), Αργεντινή (Especho *et al*, 1984) και Ατλαντικό Καναδά (Ragon, 1984).

Η χρήση των φυκών δε σταματά εδώ. Εδώ και αιώνες τα μακροφύκη χρησιμοποιούνται από τους Ιάπωνες και τους Κινέζους ως τροφή. Τα τελευταία χρόνια θεωρείται από τους Δυτικούς λαούς υγιεινή τροφή και έχει πλέον ενταχθεί στο διατολόγιό τους. Κάποια συστατικά των φυκών χρησιμοποιούνται από βιομηχανίες τροφίμων. Τέλος πολύ σημαντική είναι η χρήση τους στον τομέα των καλλυντικών και της ιατρικής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΕΙΔΩΝ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗ ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μονοκαλλιέργεια οργανισμών ορίζεται ως η καλλιέργεια ενός μόνου είδους. Σε αυτό το κεφάλαιο γίνεται αναφορά σε μεθόδους απομόνωσης μικροφυκών που έχουν συλλεχθεί από το πεδίο και αποσκοπούν στη μονοκαλλιέργειά τους. Οι λόγοι για τους οποίους γίνεται η απομόνωση των μικροφυκών είναι εξαιρετικής σημασίας.

Για τα είδη που είναι απομονωμένα από το πεδίο ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζουν οι τράπεζες καλλιέργειών. Εκεί βρίσκονται απομονωμένα πολλά είδη με διαφορετικό επιστημονικό ενδιαφέρον. Η αρμοδιότητα των τραπεζών είναι να διατηρούν τα καλλιεργούμενα είδη όσο το δυνατόν με μικρό βακτηριακό φορτίο έως καθόλου και να δέχονται παραγγελίες για προμήθευση στοκ καλλιέργειών σε διάφορα ερευνητικά κέντρα ανά τον κόσμο καθώς και σε σταθμούς υδατοκαλλιέργειών.

Τα μικροφύκη που χρησιμοποιούνται στους Ιχθυογεννητικούς σταθμούς είναι επί το πλείστον εισαγόμενα από τράπεζες καλλιέργειών του εξωτερικού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα πολλές φορές την αδυναμία εγκλιματισμού τους στις συνθήκες των νεράων της καλλιέργειας (αργή ανάπτυξη με λιγότερη έτσι διατροφική αξία). Συνεπώς ο γόνος από μικρή ηλικία δεν καλλιεργείται στις άριστες συνθήκες άρα δεν αναπτύσσεται και σωστά. Αν όμως υπήρχαν διαθέσιμα κάποια μικροφύκη απομονωμένα από τις Ελληνικές θάλασσες με σημαντική διατροφική αξία τότε και ο γόνος θα αναπτυσσόταν υπό καλύτερες συνθήκες αλλά και το κόστος της εισαγωγής μικροφυκών θα μηδενιζόταν.

Άλλο πλεονέκτημα έχει να κάνει με την αντιβακτηριδιακή δράση των μικροφυκών (κεφ. 3). Αν όντως κάποια μικροφύκη απομονωμένα από το πεδίο παρουσιάζουν τέτοια δράση ενάντια στους παθογόνους μικροοργανισμούς που καταπονούν τις υδατοκαλλιέργειες τότε θα υπήρχε η δυνατότητα πρόληψης των ασθενειών αυτών με απόλυτα φυσικό τρόπο χωρίς τη χρήση χημικών σκευασμάτων. Αυτό σημαίνει μείωση των κατάλοιπων των αντιβιοτικών στο παραγόμενο προϊόν, καλύτερη ποιότητα και συνεπώς ασφάλεια για τον καταναλωτή.

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ

Οι μέθοδοι απομόνωσης μικροφυκών είναι μια ερευνητική προσπάθεια που έχει ξεκινήσει από παλιά. Οι πρώτες μονοκαλλιέργειες από φύκη πραγματοποιήθηκαν από τον **Beijerinck (1890)**, χρησιμοποιώντας βακτηριολογικές μεθόδους τις οποίες συμβουλευτηκε από τον **Koch το 1881**.

Η διαδικασία που εφαρμόστηκε είναι η εξής: Ένα θρεπτικό υπόστρωμα σε μορφή ζελατίνης που περιείχε οργανικές ουσίες, υγροποιήθηκε και τα φύκη αναμίχθηκαν μαζί του.

Μόλις στερεοποιούνταν σε ένα τριβλίο Petri, τοποθετούνταν στο φως για κάποιες εβδομάδες. Οι πράσινες αποικίες που προέκυπταν συλλέγονταν με μια βελόνα από πλατίνα και μεταφέρονταν σε νέο θρεπτικό μέσο.

Αυτή η μέθοδος διανομής των κυττάρων μέσα στο άγαρ έχει συγκεκριμένα μειονεκτήματα. Είναι αδύνατο να είναι γνωστό από πριν τι πρόκειται να αναπτυχθεί και τι όχι. Κάποια είδη δε θα πολλαπλασιαστούν όταν "εντοιχίζονται" στο άγαρ. Οι αποικίες που αναπτύσσονται εσωτερικά στο άγαρ, στην καλύτερη περίπτωση αναπτύσσονται πολύ πιο αργά από ό,τι αυτές στην επιφάνεια και διαφέρουν σε εμφάνιση οπότε δεν αναγνωρίζονται εύκολα.

Οι συνθήκες μέσα σε στερεοποιημένο άγαρ δεν είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη των φυκών, που εν μέρει μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη CO₂ το οποίο μπορεί να φτάσει στα κύτταρα μόνο με διάχυση. Αυτή περιλαμβάνει θερμοδυναμική μοριακή κίνηση, η οποία είναι μια πολύ αργή διαδικασία και είναι πιθανόν να μην μπορεί να εφοδιάσει τα κύτταρα αποτελεσματικά με CO₂, ακόμα και όταν η απόσταση που πρέπει να διανυθεί δεν είναι μεγαλύτερη από ένα κλάσμα του χιλιοστού.

Αυτός είναι ο λόγος που η μέθοδος του *Chodat* της "ανάμιξης φυκών μέσα σε ρευστό άγαρ" δε συστήνεται. Σε ένα τέτοιο στερεό όγκο η απόσταση από την επιφάνεια ενός κυττάρου μπορεί να είναι αξιόλογη. Συγκεκριμένα χρειάζονται αρκετές εβδομάδες ή και μήνες και κάτω από τις καλύτερες συνθήκες, πριν οι αποικίες αναπτυχθούν σε τέτοιο μέγεθος ώστε να μπορούν να αναγνωριστούν και να μεταφερθούν.

Ένα άλλο μειονέκτημα της μεθόδου του *Chodat* είναι ότι ο όγκος του άγαρ δεν μπορεί να τεμαχιστεί. Η διαδικασία αυτή είναι υπεύθυνη για τη μόλυνση των αποικιών με βακτήρια που υπάρχουν στο μέσο.

1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ ΣΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΤΡΙΒΛΙΩΝ ΕΠΙΣΤΡΩΜΕΝΩΝ ΜΕ ΑΓΑΡ

Ο σκοπός οποιασδήποτε μεθόδου απομόνωσης μικροφυκών από το πεδίο που χρησιμοποιεί τριβλία είναι τριπλός :

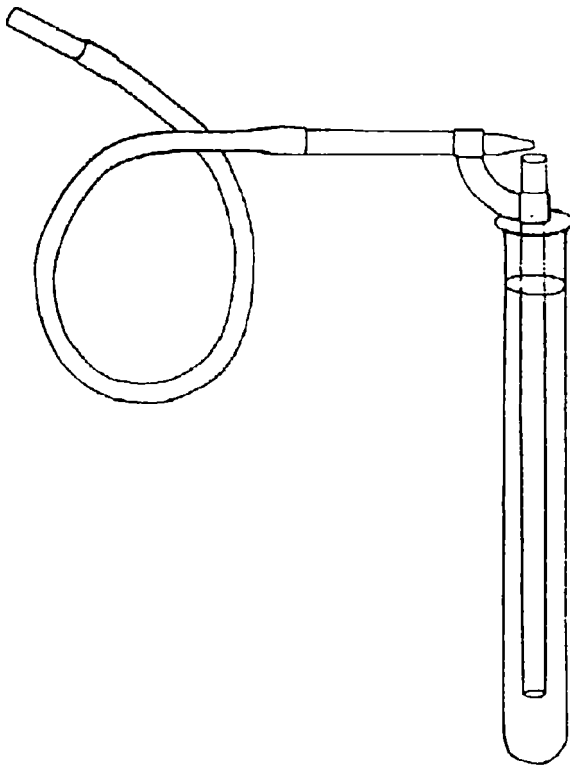
- 1) Να ακινητοποιήσει τα κύτταρα ώστε να μην αναμιγνύονται μεταξύ τους.
- 2) Να τα διαχωρίσει από άλλους οργανισμούς που μπορεί να διαφέρουν στην οργάνωσή τους.
- 3) Να τους παρέχει θρεπτικές ουσίες και άλλες ευνοϊκές συνθήκες για την αναπαραγωγή τους σε ομοιογενείς πληθυσμούς. Τέτοιες αποικίες, όπως καλούνται αυτές οι καλλιέργειες, αποτελούνται από ένα είδος μόνο και με τη μεταφορά τους σε αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο, έχουμε το σημείο εκκίνησης για καθαρές καλλιέργειες. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί, αν τα κύτταρα είναι απομονωμένα αποτελεσματικά το ένα με το άλλο. Αν ένας ανεπιθύμητος οργανισμός παρουσιαστεί σε μια αποικία, μπορεί να απλωθεί σε όλο το μέσο με τους μηχανισμούς κίνησής του και να επιμολύνει την καλλιέργεια.

Τα θρεπτικά μέσα, στα τριβλία Petri, θα πρέπει να είναι στερεά, για να αποφευχθεί η ανάμιξη των κύτταρων και επιπλέον να είναι ικανά να απορροφούν νερό και θρεπτικές ουσίες σε κατάσταση διασποράς των κυττάρων. Ένα άλλο ποιοτικό χαρακτηριστικό που είναι συχνά απαραίτητο και όλες τις φορές πολύτιμο είναι η ημιδιαφάνεια του μέσου. Έτσι μπορούμε να διαπιστώνουμε τον πολλαπλασιασμό και την καθαρότητα της καλλιέργειας με μικροσκόπιο ή και με γυμνό μάτι. Για αυτό το λόγο το χώμα, η άμμος ή η άργιλλος είναι λιγότερο κατάλληλα από ό,τι τα κολλοειδή στερεής μορφής ή ζελατινώδη.

Η παραπάνω μέθοδος που χρησιμοποιεί τριβλία διακρίνεται σε δύο κατηγορίες:

1) **Μέθοδος ψεκασμού** (δύο παραλλαγές 1α & 1β): Το υγρό δείγμα που είναι προς απομόνωση δεν αναμιγνύεται με το άγαρ αλλά διασπείρεται πάνω στην επιφάνεια του άγαρ με ψεκασμό.

2) **Μέθοδος της επίστρωσης με μικροβιολογικό κρίκο**: Εμβολιάζεται το υλικό σε τριβλία αλλά με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου.



1α) Μέθοδος ψεκασμού: Η καλύτερη μέθοδος διασποράς κυττάρων πάνω στην επιφάνεια του άγαρ είναι να θέσουμε σε λειτουργία έναν ψεκαστήρα, αλλά είναι αρκετά κουραστική στο χειρισμό. Ο ψεκαστήρας αποτελείται από 2 γυάλινες ράβδους που ενώνονται στις άκρες τους. Φίλτρα από βαμβάκι τοποθετούνται στο οριζόντιο μέρος της ράβδου μέσα από την οποία διοχετεύεται πιεσμένος αέρας και αποστειρώνεται. Το αιώρημα των φυκών θα πρέπει να είναι αρκετά πυκνό και να μην περιέχει παρά ένα μικρό αριθμό

βακτηρίων. Ένας δοκιμαστικός σωλήνας χρησιμοποιείται σαν δοχείο απ' όπου το αιώρημα διοχετεύεται μέσα στα τριβλία με το άγαρ. Ο δοκιμαστικός σωλήνας γεμίζεται σχεδόν ως την κορυφή.

Όσο για άλλες μεθόδους εμβολιασμού, το άγαρ θα πρέπει να έχει κάποιο βαθμό συνοχής έτσι ώστε, καθώς θα γεμίζει με σταγονίδια νερού από τον ψεκαστήρα, να στεγνώνει πάλι. Ένα κομμάτι από λάστιχο συνδέεται στο οριζόντιο στόμιο του ψεκαστήρα και το κάθετο κομμάτι του εισχωρεί στο δοκιμαστικό σωλήνα. Το ανοικτό αποστειρωμένο τριβλίο Petri τοποθετείται κάθετα και

φυσώντας μέσα στον πλαστικό σωλήνα σχηματίζεται σπρέϊ που κατευθύνεται στην επιφάνεια του άγαρ. Μόνο ένα μικρό στρώμα από υγρό θα παραμείνει στην επιφάνεια, αλλιώς τα απομονωμένα κύτταρα θα αναμιχθούν με αυτό (εικ 1.1.α).



1β) Μέθοδος ψεκασμού με τριχοειδή πιπέτα: Μια παραλλαγή της προηγούμενης μεθόδου είναι η μέθοδος της τριχοειδούς πιπέτας. Χρησιμοποιείται ένα ανεστραμμένο κάλυμμα από τριβλίο ως πιάτο απομόνωσης. (εικ 1.1.β)

1. Τοποθετούνται 10 με 15 σταγόνες φυσικού δείγματος στο κέντρο σε ένα ανεστραμμένο καπάκι απομόνωσης
2. Τοποθετούνται 6 με 8 σταγόνες κατάλληλου θρεπτικού μέσου σε 6 θέσεις κινώντας σε κυκλική τροχιά το δείγμα. Σημειώνεται μία θέση με τον αριθμό 1.
3. Χρησιμοποιείται μία καθαρή, αποστειρωμένη τριχοειδή πιπέτα και μεταφέρονται με αυτή τα επιθυμητά κύτταρα από το δείγμα σε μία από τις 6 σταγόνες θρεπτικού μέσου.
4. Μεταφέρεται μια ποσότητα (ελάχιστη) από την πρώτη σταγόνα στη δεύτερη του θρεπτικού μέσου, με τη φορά των δεικτών του ρολογιού.
5. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία μέχρι να τελειώσουν όλες οι σταγόνες και έως ότου φανεί ότι υπάρχει ένα μόνο κύτταρο σε μία σταγόνα.
6. Μεταφέρεται η σταγόνα στο σωλήνα με το θρεπτικό μέσο.

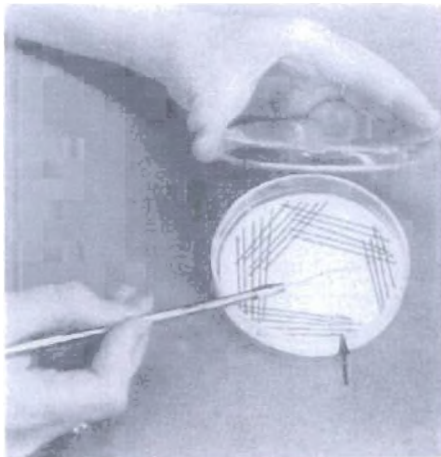
2) Μέθοδος επίστρωσης τριβλίων με χρήση μικροβιολογικού κρίκου: Όταν τα κύτταρα έχουν διάμετρο 10 μm ή μικρότερη, απομονώνονται εύκολα με αυτή τη μέθοδο καθώς και με την προηγούμενη. Κάθε μία από αυτές τις μεθόδους επιτυγχάνει να απομονώσει κύτταρα και να παράγει μια αξενική καλλιέργεια καθώς και να διαχωρίσει απλά και εύκολα τα κύτταρα που είναι προς απομόνωση. Η τεχνική είναι αυτή που χρησιμοποιείται στη μικροβιολογία. (εικ1.1.2α,β,γ,δ.)

1. Προετοιμάζονται τριβλία Petri (γυάλινα ή πλαστικά) με στερεό θρεπτικό μέσο και περιεκτικότητα σε άγαρ 1-1,5%. Το άγαρ θα πρέπει να καλύπτει το 1/2 με 2/3 του βάθους του τριβλίου.

2. Τοποθετούνται με 2 σταγόνες στην περιφέρεια του άγαρ



Αποστειρώνεται στη φλόγα ένας κρίκος (εικ. 1.1.α)



Με τον κρίκο χαράσσονται πάνω στο άγαρ παράλληλες γραμμές. Έτσι το δείγμα αιωρείται πάνω στο άγαρ. (εικ. 1.1.β)

3. Το τριβλίο σκεπάζεται με το καπάκι και αφήνεται να περάσουν 4 με 8 ημέρες κάτω από κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας (εικ. 1.1.γ)





4. Η παρατήρηση γίνεται σε στερεοσκόπιο με υλικό από τις επιθυμητές αποικίες (που είναι απαλλαγμένες από άλλους οργανισμούς), για επιπλέον απομόνωση. Το δείγμα απομακρύνεται χρησιμοποιώντας τριχοειδή πιπέτα ή μία βελόνα και τοποθετείται σε μια σταγόνα από θρεπτικό μέσο επάνω σε μια καλυπτρίδα. Η παρατήρηση στο μικροσκόπιο θα δείξει ότι το δείγμα περιέχει μόνο ένα είδος. (εικ. 1.1.δ)

5. Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία από τα ήδη απομονωμένα κύτταρα και οι αποικίες αφήνονται να αναπτυχθούν ξανά. Αυτή η επανάληψη μειώνει την πιθανότητα μόλυνσης από βακτήρια.

6. Η αποικία μεταφέρεται σε υγρό θρεπτικό μέσο ή σε άγαρ.

ΠΙΘΑΝΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ

Οι παραπάνω μέθοδοι θα πρέπει να αποφεύγονται για οργανισμούς που είναι κινούμενοι γιατί ίσως δεν καταφέρουν να προσαρμοστούν (με αποτέλεσμα να πεθάνουν) στις συγκεκριμένες συνθήκες που τα καθιστούν ακίνητα στο άγαρ.

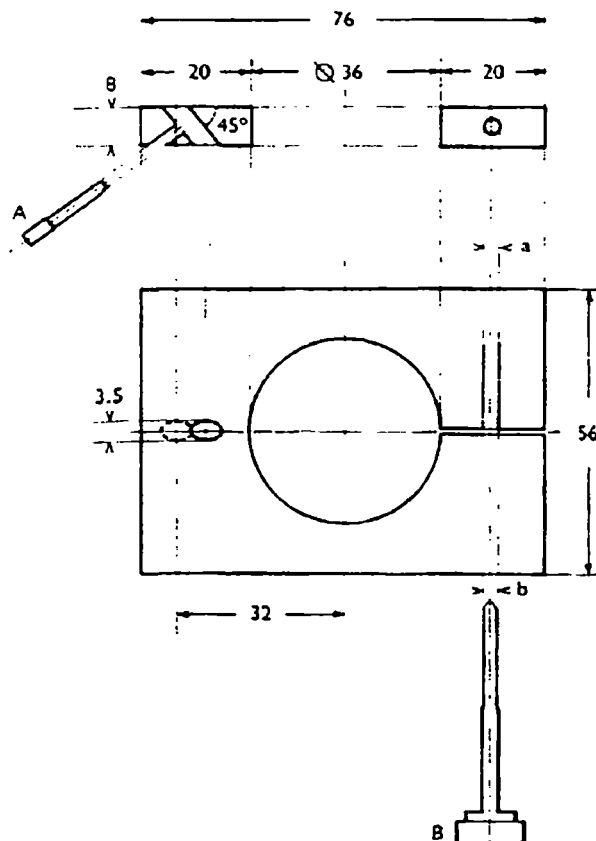
2. ΜΙΚΡΟΧΕΙΡΙΣΤΕΣ (MICROMANIPULATORS) ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

Οι μικροχειριστές υπό ευρεία έννοια αποτελούν κάθε τύπο εξοπλισμού που σχεδιάστηκε για χειρισμό μικροσκοπικού μεγέθους ομάδων κυττάρων, οργανιδίων κ.τ.λ. Ο όρος συνήθως περιορίζεται στον εξοπλισμό όπου κάποια μηχανικά μέρη σχετίζονται με το χειρισμό κατά τη διάρκεια της εργασίας πάνω στο συγκεκριμένο αντικείμενο.

Ο εξοπλισμός και η τεχνική που χρησιμοποιείται για απομόνωση κυττάρων, ποικίλλει από απλές βελόνες και τριχοειδείς σωλήνες, που μεταχειρίζονται με το χέρι, έως πολύπλοκους μικροχειριστές με μικροπιπέτες με επεξεργασμένο σχήμα

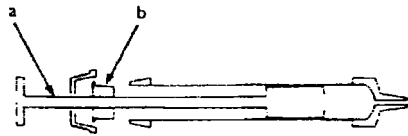
ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

A. Ανάστροφο μικροσκόπιο με συγκεντρωτικό φακό για εργασία από μεγάλη απόσταση, λάμπα μεγάλης εντάσεως, χαμηλής μεγέθυνσης αντικειμενικού (δηλ. 2,5-4x, 10x, 20-40x), και 10-15x προσοφθάλμιους φακούς με ευρύ πεδίο.

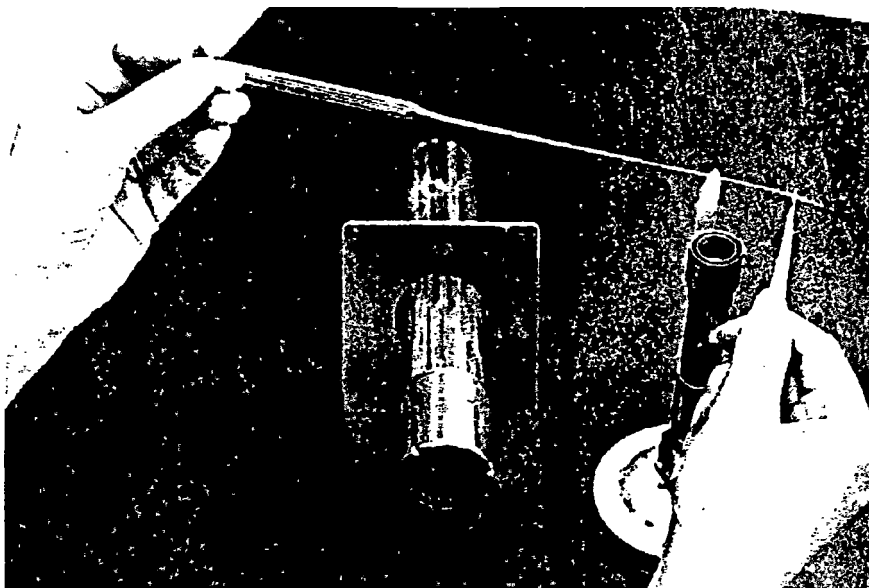


B. Υποδοχή-λαβή μικροεργαλείων, που αποτελείται από ένα πλαστικό πιάτο (Perspex) με ένα άνοιγμα για τον αντικειμενικό φακό και μια πλάγια οπή για τον προσοφθάλμιο. A και B είναι βίδες. Η διάμετρος b πρέπει να είναι αρκετά μεγάλη ώστε να επιτρέπει ελεύθερη κίνηση της βίδας. Όλες οι μετρήσεις γίνονται σε mm. (εικ 1.2.α)

Γ. Σύριγγα με προσαρμογή βίδας και 400 -500 mm πλαστικό σωλήνα για να συνδεθεί με την πιπέτα. (εικ 1.2.β)



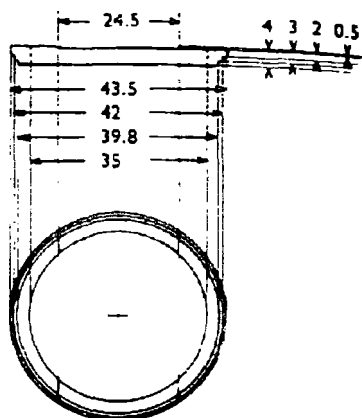
Δ. Πιπέτα τύπου Pasteur (εξωτερική διάμετρο 3 mm) με τριχοειδή άκρη που έχει φτιαχτεί σύροντας την πιπέτα στη φλόγα έτσι ώστε να δημιουργηθεί ένα τριχοειδές άνοιγμα. (εικ 1.2.γ)



(εικ 1.2.δ)

Η συγκεκριμένη εικόνα παρουσιάζει την κατασκευή της τριχοειδούς πιπέτας. Μια πιπέτα Pasteur σύρεται στη φλόγα και κόβεται στην άκρη της δημιουργώντας έτσι μια μικροσκοπική οπή.

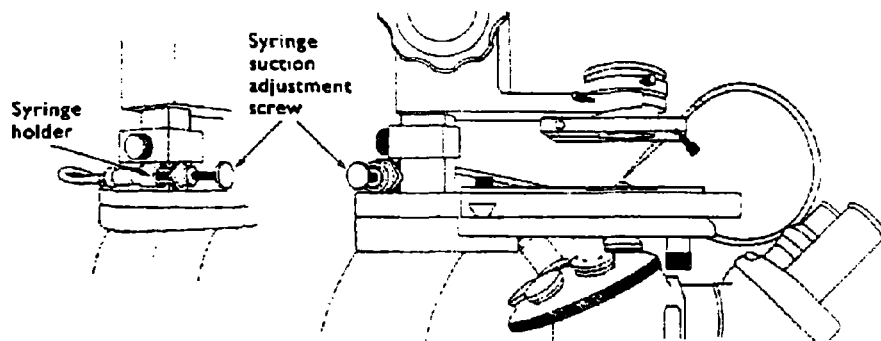
Ε. Καλυπτρίδες (24 x 36 mm) με μία λαβή τυποποιημένες μικροσκοπικές διαφάνειες.
(εικ 1.2.ε)



ΜΕΘΟΔΟΙ

Προτιμάται ένα δωμάτιο με σχετική υγρασία, αρκετή ώστε να αποτρέψει τη γρήγορη εξάτμιση του θρεπτικού μέσου. Θερμικά σοκ θα πρέπει να αποφεύγονται.

Α. Η μικροπιπέτα (που έχει ήδη κατασκευαστεί) τοποθετείται πάνω στο στήριγμα του μικροσκοπίου κάτω από τον συγκεντρωτικό φακό (εικ. 1.2.στ). Ένα καθαρό γυάλινο σκέπασμα τοποθετείται στο στήριγμα της τράπεζας (ή μία διαφάνεια αν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν χαμηλές μεγεθύνσεις). Η πιπέτα κεντράρεται δια μέσου των κεντρικών βιδών που συγκρατούν τον συγκεντρωτικό φακό.



(εικ. 1.2.στ)

Β. Τοποθετούνται ξεχωριστά κάποιες σταγόνες θρεπτικού μέσου και μία σταγόνα δείγματος στην καλυπτρίδα. Η καλυπτρίδα γεμίζει με τη δύναμη των τριχοειδών φαινομένων.

Γ. Το δείγμα εστιάζεται και χαμηλώνει η πιπέτα ώστε να είναι εμφανής στο μικροσκόπιο. Το επιθυμητό κύτταρο προς απομόνωση μεταφέρεται κοντά στο άνοιγμα της πιπέτας (με τη χρήση της μηχανικής τράπεζας και αναρροφάται γυρίζοντας τη βίδα της σύριγγας).

Δ. Ανασηκώνεται η πιπέτα, μετακινείται η τράπεζα ώστε η πιπέτα να ακουμπήσει μια σταγόνα θρεπτικού μέσου. Το κύτταρο διοχετεύεται μέσα στο θρεπτικό μέσο.

Ε. Η πιπέτα, αδειάζει σε ένα φίλτρο από χαρτί και ξαναγεμίζει με μια σταγόνα θρεπτικού μέσου.

ΣΤ. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται όπως περιγράφηκε στα βήματα Γ έως Ε μέχρι το επιθυμητό κύτταρο να είναι το μοναδικό μέσα στη σταγόνα.

Ζ. Έπειτα το κύτταρο αναρροφάται από την πιπέτα, το στήριγμα της πιπέτας ανασηκώνεται και αν είναι απαραίτητο η πιπέτα απομακρύνεται από το στήριγμα και το κύτταρο διοχετεύεται μέσα σε μια κωνική φιάλη ή σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα με θρεπτικό υγρό.

ΠΙΘΑΝΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ

Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι ιδιαίτερα επίπονη. Απαιτούνται πολλές ώρες χρήσης του μικροσκοπίου προκειμένου να απομονωθεί το κατάλληλο στέλεχος. Με την πρώτη φορά όμως τα αποτελέσματα δεν είναι και τα αναμενόμενα. Υπάρχουν κύτταρα με την μορφή σπόρων (ίσως μορφή κάποιου σταδίου ανάπτυξης ή μορφή λαμβανόμενη για λόγους επιβίωσης) που δεν είναι διακριτά στο μικροσκόπιο. Καταφέρνουν όμως να αναπτύσσονται στο θρεπτικό μέσο με το κύτταρο που είναι προς απομόνωση. Επομένως η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου στο μέσο βρεθεί ένα μόνο κύτταρο.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΑΡΑΠΑΝΩ ΜΕΘΟΔΩΝ

Οι προφυλάξεις που πρέπει να λαμβάνονται, για να αποφευχθεί η μόλυνση των οργανισμών και του μέσου κατά την απομόνωση, εξαρτώνται από τις συνθήκες του εργαστηρίου καθώς και από το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Οι πιπέτες μπορεί να αποστειρωθούν και να φυλαχτούν σε δοκιμαστικούς σωλήνες κλεισμένους με βαμβάκι και οι αντικειμενοφόροι ή οι καλυπτρίδες σε τριβλία Petri. Ανάλογα με τον τύπο του δείγματος που χρησιμοποιείται μπορεί να είναι σκόπιμη η αλλαγή της πιπέτας πριν πραγματοποιηθεί η τελική απομόνωση.

Κατά την παρασκευή θρεπτικών μέσων θα πρέπει να υπάρχει σχολαστικότητα όσον αφορά την υγιεινή του προσωπικού και την καθαριότητα των υαλικών που χρησιμοποιούνται. Κατά την παρασκευή κάποιου διαλύματος υπάρχει περίπτωση να χρησιμοποιούνται στοκ διαλύματα τα οποία δεν αποστειρώνονται γιατί ίσως κάποιο από τα χημικά να αλλοιωθεί κατά την παραμονή του στις συνθήκες που επικρατούν στο αυτόκαυστο. Σε αυτή την περίπτωση τα υαλικά που θα χρησιμοποιηθούν θα πρέπει να είναι απολύτως καθαρά αν όχι αποστειρωμένα, για αποφυγή ανάπτυξης μικροβίων. Μετά την παρασκευή τους φυλάσσονται στο ψυγείο για το ανώτατο διάστημα των 2 μηνών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κρυοπροστασία είναι η διατήρηση των επιζώντων κυττάρων και των ιστών σε θερμοκρασίες κάτω του μηδενός. Έχει εφαρμογές σε πολλούς τομείς της Βιολογίας συμπεριλαμβάνοντας την αποθήκευση του αίματος, σπερματοζωαρίων, εμβρύων, φυτικών και ζωικών ιστών, καλλιέργειες βακτηριδίων, ζυμομυκήτων, μυκήτων, πρωτοζώων και φυκών, M.R.McLellan, 1989). Η μέθοδος αυτή έχει το πλεονέκτημα να διατηρεί αναλλοίωτες τις βιολογικές λειτουργίες των κυττάρων μετά το ξεπάγωμά τους

Η κρυοπροστασία είναι χρήσιμη για τις Υδατοκαλιέργειες και μπορεί να λύσει σημαντικά προβλήματα (π.χ. χώρου και προγραμματισμού) κατά τη διάρκεια του παραγωγικού κύκλου. Οι ιχθυογεννητικοί σταθμοί χρησιμοποιούν συνέχεια μεγάλους όγκους μικροφυκών τα οποία χρησιμοποιούν κυρίως για την υποστήριξη των ζωοπλαγκτονικών καλλιεργειών που απαιτούνται για να δοθούν ως τροφή στα αρχικά στάδια του γόνου των ψαριών.

Ένας ιχθυογεννητικός σταθμός έχει απαιτήσεις από μεγάλους όγκους καλλιεργειών και άμεσα πολλές φορές. Όταν αυτοί οι όγκοι ψύχονται κατάλληλα και διατηρούνται με τη βοήθεια κρυοπροστατευμένων ουσιών λύνουν αυτό το πρόβλημα άμεσα, αφού σε λίγο χρονικό διάστημα μετά την απόψυξη επιτελούν και πάλι κανονικά τις βιολογικές τους λειτουργίες. Επίσης αυτή η μέθοδος συμφέρει σε περίπτωση που απαιτείται να μεταφερθεί μεγάλος όγκος μακριά από το σταθμό (ίσως και η απόσταση που θα διανυθεί να κρατήσει αρκετές ημέρες).

Για την καλλιέργεια μικροφυκών ως τροφή των τροχοζώων και των προνυμφών γαρίδας υπάρχουν πολλοί ερευνητές που έχουν ασχοληθεί όπως οι Becker, 1986; De Pauw and Persoone, 1988. Αντί των ζωντανών φυκών έχουν επιχειρηθεί δίαιτες με φύκη σε ξηρή μορφή (Day *et al.*, 1991). Παρόλα αυτά, παρά την επιτυχία τους στην τεχνική, τα φύκη ως ζωντανή τροφή δεν αντικαθίστανται. Σήμερα μια ανάμιξη μικροφυκών στο διαιτολόγιο των καλλιεργούμενων οργανισμών φαίνεται να έχει αποδοτικά αποτελέσματα. Τα μικροφύκη ως ζωντανή βιομάζα διατηρούνται κρυοπροστατευμένα. Πολλοί καλλιεργητές βρίσκουν ότι η κρυοπροστατευμένη ζωντανή βιομάζα δίνει καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την ξηρή βιομάζα που δημιουργεί προβλήματα λόγω δυσκολιών στην ανάμιξη και στη γρήγορη καθίζησή τους (Coutteau & Sorgeloos, 1992).

Σε αυτό το κεφάλαιο παρατίθενται κάποιες διαδικασίες που έγιναν από κάποιους ερευνητές (θα αναφερθούν αναλυτικότερα σε κάθε διαδικασία), για να εξεταστεί η κρυοπροστατευτική δράση κάποιων ουσιών. Τα μικροφύκη που χρησιμοποιήθηκαν είναι κάθε φορά διαφορετικά ανάλογα με την κρίση του ερευνητή. Αυτές οι

διαδικασίες δεν είναι ξεκομμένες η μία από την άλλη. Υπάρχει μια γενική διαδικασία στην οποία στηρίζονται και η οποία είναι η εξής:

Τα είδη που προορίζονται για πείραμα καλλιεργούνται κάτω από κατάλληλες συνθήκες.

Τα μικροφύκη που χρησιμοποιούνται βρίσκονται πάντα στη στατική φάση της ανάπτυξής τους (8η με 12η ημέρα).

Τα κύτταρα υπόκεινται σε ελαφρά φυγοκέντριση και ο χρόνος της φυγοκέντρισης εξαρτάται από το μέγεθός τους. Αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο υγρό η διαδικασία επαναλαμβάνεται ακόμα 2 με 3 φορές.

Το συμπύκνωμα των κυττάρων μεταφέρεται σε φιαλίδια σε χαμηλή θερμοκρασία και αφού γίνεται η καταμέτρηση των κυττάρων προστίθενται οι κρυοπροστατευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται ανάλογα. Οι συγκεκριμένες ουσίες έχουν μια αναλογία με το συμπύκνωμα των κυττάρων η οποία ποικίλλει ανάλογα με τους οργανισμούς, το κρυοπροστατευτικό μέσο και τέλος με το αντικείμενο της έρευνας.

Έπειτα από αυτό, τα φιαλίδια με τις κρυοπροστατευτικές ουσίες τοποθετούνται σε διαφορετικές θερμοκρασίες για να εξεταστεί η ανάλογα δράση των κρυοπροστατευτικών ουσιών. Οι θερμοκρασίες φτάνουν έως τη βαθεία ψύξης. Για κάθε συνδυασμό συγκέντρωσης κρυοπροστατευτικού και θερμοκρασίας πραγματοποιείται κάποιος αριθμός επαναλήψεων του πειράματος.

Τα φιαλίδια παραμένουν στις παραπάνω θερμοκρασίες για κάποιο χρονικό διάστημα (από ώρες έως και ημέρες) και κατόπιν γίνεται η μεταφορά τους στους 35°C περίπου, για κάποια λεπτά της ώρας.

Τα φιαλίδια φυγοκεντρούνται ξανά και στη συνέχεια απομακρύνεται η κρυοπροστατευτική ουσία.

Τοποθετούνται έπειτα σε σκοτεινό θάλαμο, σε σταθερή θερμοκρασία για κάποιες ώρες. Μετά εμβολιάζονται σε θρεπτικό μέσο, προσδιορίζεται η πυκνότητα και καλλιεργούνται για κάποιες ημέρες.

Τέλος προσδιορίζεται ο ρυθμός αύξησης των κυττάρων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ Α

Η παρακάτω διαδικασία πραγματοποιήθηκε από τους J.-G. Day and C. Fenwick, το 1993. Τα είδη που εξετάστηκαν ήταν η *Tetraselmis suecica* (kylin) Butcher CCAP 66/4, η *Tetraselmis suecica* (kylin) Butcher CCAP 66/22A καθώς και *T. Chuii* Butcher CCAP 8/6 & *T. Chuii* Butcher CCAP 66/21B χρησιμοποιώντας ως κρυοπροστατευτικό μέσο DMSO (dimethyl sulfoxide) ή glycerol. Έχει αποδειχθεί (Fenwick & Day, 1992), ότι τα συγκεκριμένα κρυοπροστατευτικά έχουν λιγότερη τοξική δράση στην *Tetraselmis suecica*.

Αναλυτικά η διαδικασία έχει ως εξής:

Συνθήκες καλλιέργειας: Κατάλληλο θρεπτικό μέσο και διατήρηση σε φιάλες στους 10, 15, 20 & 25°C, 16/8 ώρες φως/σκοτάδι και ένταση φωτισμού $33 \mu\text{mol} \cdot \text{photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

Διατηρούνται σε μια σειρά ανακαλλιεργειών με εμβολιασμό 10% σε φρέσκο θρεπτικό μέσο ανά 14 ημέρες.

Περιοδικοί έλεγχοι για τυχόν ανάπτυξη μικροβίων πραγματοποιούνται με μικροσκοπική ανάλυση καθώς και με τοποθέτηση 0,1ml καλλιέργειας σε τριβλία με άγαρ που εκκολάφθηκαν στους 20°C.

ΨΥΞΗ & ΤΗΞΗ

Οι καλλιέργειες βρίσκονται σε στατική φάση της ανάπτυξής τους.

0,5 ml από την καλλιέργεια φυλάσσονται σε φιαλίδια που αντέχουν τις πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. (Nunc)

Τα κρυοπροστατευτικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι: DMSO ή glycerol 5 ή 10%(v/v).

0,5ml αποστειρωμένου κρυοπροστατευτικού μέσου προστέθηκε σε 0,5ml καλλιέργειας με 0,5ml θρεπτικού μέσου να προστίθενται σε δείγματα ελέγχου (μάρτυρες) που στερούνταν κρυοπροστατευτικού μέσου.

Το υλικό στα φιαλίδια επώαστηκε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου πριν την κρυοπροστασία. Τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν

- α) Σε υδατόλουτρο που περιείχε μεθυλική αλκοόλη που είχε ψυχθεί στους -30°C, ή
- β) σε οικιακό καταψύκτη ή
- γ) σε προγραμματισμένο καταψύκτη στους -30°C. Έπειτα τα δείγματα μεταφέρθηκαν στους -196 °C με την εμβάπτισή τους σε υγρό άζωτο.

Επήλθε τήξη από τους -196 °C με γρήγορη τοποθέτηση των φιαλιδίων στους 40 °C μέχρι το λιώσιμο του πάγου.

Το δείγμα έπειτα μεταφέρθηκε σε φρέσκο θρεπτικό μέσο για να μειωθούν τα υπολείμματα της συγκέντρωσης των κρυοπροστατευτικών ουσιών.

ΔΟΚΙΜΕΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ

Η ικανότητα των φυκών να διαιρούνται μετά την τήξη καθορίστηκε από την ικανότητα να σχηματίζουν αποικίες στο άγαρ. Τηκώμενα δείγματα (1ml) μεταφέρθηκαν σε 9ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου.

1ml υποπολλαπλάσιο των λογαριθμικών αραιώσεων μεταφέρεται με πιπέτα σε τριβλία Petri (50 mm διάμετρος).

Περίπου 2,5ml από 1,0% άγαρ στους 40°C προστίθεται σε κάθε τριβλίο που ανακινείται απαλά για να διασφαλιστεί η ολοκληρωτική μίξη του άγαρ και της καλλιέργειας.

Τα τριβλία έπειτα καλύπτονται με παραφίλμ και επωάζονται στους 25°C με μια φωτοπερίοδο 16:8 ώρες φω/σκοτάδι για 21 ημέρες.

Οι αποικίες μετριοούνται στο μικροσκόπιο και η βιωσιμότητα υπολογίζεται ως το ποσοστό των αποικιών που σχηματίζεται σε τριβλία που δεν περιέχουν αραιώσεις από καλλιέργειες που έχουν καταψυχθεί.

Η βιωσιμότητα των δειγμάτων καθορίζεται επίσης με την απ'ευθείας παρατήρηση της κινητικότητας (ακολουθώντας μια αραιώση 1:10 σε φρέσκο θρεπτικό μέσο), με μικροσκόπιο "αντίθεσης φάσεων". Αυτό γίνεται 24 ώρες μετά την τήξη αφού έχουν επωαστεί σε κατάλληλες συνθήκες. Τα κύτταρα μετριοούνται με αιματοκυτταρόμετρο.

Αρχικά μετριοούνται κύτταρα που είναι κινούμενα. Έπειτα προστίθεται στα δείγματα 1% φορμαλδεΰδη και μετριέται ο συνολικός αριθμός κυττάρων. Ο αριθμός των κινούμενων κυττάρων υπολογίστηκε ως η μικρότερη συνολική αρχική μέτρηση των κυττάρων και εκφράστηκε σαν ποσοστό των κινούμενων κυττάρων πριν την τήξη.

Τα δείγματα υπόκεινται σε χρώση (φθορίζον diacetate:FDA), για 5 λεπτά πριν παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο. Τα κύτταρα που είναι ζωντανά φαίνονται με πράσινο χρώμα και αυτά που δεν επέζησαν με κόκκινο ή δεν έχουν χρώμα. Η βιωσιμότητα των πληθυσμών που χρησιμοποιήθηκαν υπολογίζεται με τη διαίρεση του ποσοστού των FDA-θετικών κυττάρων στο χρησιμοποιούμενο δείγμα, με το ποσοστό των FDA-θετικών κυττάρων στο δείγμα μάρτυρα.

Είναι πολύ σημαντικό να υπάρχει χρόνος αναμονής 24 ωρών για την πλήρη ανάρρωση των κυττάρων, καθώς με την ψύξη χάνονται τα μαστίγια και στην τήξη από τους -196°C, δεν παρατηρούνται κινούμενα κύτταρα.

Παρόμοια η χρώση μπορεί να δώσει μη αξιόπιστα αποτελέσματα όσον αφορά την βιωσιμότητα αμέσως μετά την τήξη, καθώς τα κύτταρα με την σχεδόν θανατηφόρα ζημιά μπορεί να δώσουν ένα αναληθές θανατηφόρο θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η τοποθέτηση της καλλιέργειας σε ένα υδατόλουτρο στους -30°C και η τοποθέτηση της έπειτα σε υγρό άζωτο δεν ήταν τόσο αποτελεσματική για την *T. Chuii* Butcher. Τα υψηλότερα επίπεδα βιωσιμότητας αποκτήθηκαν όταν οι καλλιέργειες μεγάλωσαν στους 20°C αφού είχαν εμβολιαστεί σε 10%(v/v) γλυκερόλη ακολουθώντας μια διαδικασία ψύξης δύο σταδίων, χρησιμοποιώντας μια κλίμακα από $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ έως $-30^{\circ}\text{C min}^{-1}$ και έπειτα τοποθέτησή τους σε υγρό άζωτο. Τα επίπεδα βιωσιμότητας ήταν υψηλότερα σε όλα τα στελέχη που καλλιεργήθηκαν στους 15°C με 20°C . Η *Tetraselmis suecica* (kylin) Butcher είχε υψηλότερη βιωσιμότητα (>70%) από την *T. Chuii* Butcher (28-40%). Τα αποτελέσματα φαίνονται και στους πίνακες 1 έως 5.

Πιν 1 Αποτελέσματα βιωσιμότητας με διαφορετικές θερμοκρασίες καλλιέργειας και συγκεντρώσεις κρυοπροστατευτικού μέσου(Glycerol και DMSO) για το στέλεχος *T. chui* 8/6

Cultivation Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Cryoprotectant (v/v)		Regeneration of viable culture
10	Glycerol	5%	-
10	Glycerol	10%	-
10	DMSO	5%	-
10	DMSO	10%	-
15	Glycerol	5%	+
15	Glycerol	10%	+
15	DMSO	5%	+
15	DMSO	10%	+/-
20	Glycerol	5%	+
20	Glycerol	10%	+
20	DMSO	5%	+
20	DMSO	10%	-
25	Glycerol	5%	-
25	Glycerol	10%	+/-
25	DMSO	5%	-
25	DMSO	10%	-

Πιν 2 Αποτελέσματα βιωσιμότητας με διαφορετικές θερμοκρασίες καλλιέργειας και συγκεντρώσεις κρυοπροστατευκού μέσου(Glycerol και DMSO) για το στέλεχος *T. chui* 66/21B

Cultivation Temperature (°C)	Cryoprotectant (v/v)		Regeneration of viable culture
10	Glycerol	5	-
10	Glycerol	10	-
10	DMSO	5	-
10	DMSO	10	-
15	Glycerol	5	+
15	Glycerol	10	+
15	DMSO	5	+
15	DMSO	10	+/-
20	Glycerol	5	+
20	Glycerol	10	+
20	DMSO	5	+
20	DMSO	10	-
25	Glycerol	5	+/-
25	Glycerol	10	-
25	DMSO	5	-
25	DMSO	10	-

Πιν 3 Αποτελέσματα βιωσιμότητας με διαφορετικές θερμοκρασίες καλλιέργειας και συγκεντρώσεις κρυοπροστατευκού μέσου(Glycerol και DMSO) για το στέλεχος *T. chui* 66/4

Cultivation Temperature (°C)	Cryoprotectant (v/v)		Regeneration of viable culture
10	Glycerol	5	-
10	Glycerol	10	-
10	DMSO	5	-
10	DMSO	10	-
15	Glycerol	5	+
15	Glycerol	10	+
15	DMSO	5	+
15	DMSO	10	+
20	Glycerol	5	+
20	Glycerol	10	+
20	DMSO	5	+
20	DMSO	10	+/-
25	Glycerol	5	+
25	Glycerol	10	+
25	DMSO	5	+
25	DMSO	10	+

Πιν 4 Αποτελέσματα βιωσιμότητας με διαφορετικές θερμοκρασίες καλλιέργειας και συγκεντρώσεις κρυοπροστατευκού μέσου(Glycerol και DMSO) για το στέλεχος *T. chui* 66/22A

Cultivation Temperature (°C)	Cryoprotectant (v/v) %		Regeneration of viable culture
	Glycerol	DMSO	
10	Glycerol	5	+
10	Glycerol	10	+/-
10	DMSO	5	-
10	DMSO	10	-
15	Glycerol	5	+
15	Glycerol	10	+
15	DMSO	5	+
15	DMSO	10	+
20	Glycerol	5	+
20	Glycerol	10	+
20	DMSO	5	+
20	DMSO	10	+
25	Glycerol	5	+
25	Glycerol	10	+
25	DMSO	5	-
25	DMSO	10	-

Στους παρακάτω πίνακες έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικά κρυοπροστατευτικά συστήματα για την *Tetraselmis*. Εξετάστηκαν τέσσερα είδη που καλλιεργήθηκαν στους 20°C και εμβολιάστηκαν σε 10% v/v glyserol πριν την τήξη. Παρατηρούνται τα αποτελέσματα της αναγέννησης της καλλιέργειας.

Πιν 5 Ψύξη στους -30°C

Είδος	Αναγέννηση καλλιέργειας
<i>T. chui</i> 8/6	+
<i>T. chui</i> 66/21B	+
<i>T. suecica</i> 66/4	+
<i>T. suecica</i> 66/22A	+

Πιν 6 Ψύξη στους -26°C

Είδος	Αναγέννηση καλλιέργειας
T. chui 8/6	+/-
T. chui 66/21B	+
T. suecica 66/4	+
T. suecica 66/22A	-

Πιν 7

10°C έως -30°C	
Είδος	Αναγέννηση καλλιέργειας
T. chui 8/6	+
T. chui 66/21B	+
T. suecica 66/4	+
T. suecica 66/22A	+

Πιν 8

Από 1°C έως -30°C	
Είδος	Αναγέννηση καλλιέργειας
T. chui 8/6	+
T. chui 66/21B	+
T. suecica 66/4	+
T. suecica 66/22A	+

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ Β

Η παρακάτω διαδικασία πραγματοποιήθηκε από τους B. Cordero & D. Voltolina το 1997. Τα στελέχη μικροφυκών που χρησιμοποιήθηκαν είναι το *Chaetoceros sp.* και το *Phaeodactylum tricornutum*.

Τα κύτταρα διατηρούνται σε 15 λίτρων ημισυνεχείς καλλιέργειες με 50 και 75% καθημερινές αραιώσεις και για τα δύο είδη σε θρεπτικό μέσο.

Συνθήκες καλλιέργειας: Αλατότητα = 32‰, Θερμοκρασία = $21 \pm 1^\circ\text{C}$, pH = 7,5 ~ 8,2, Συνεχής αερισμός καθώς και συνεχής φωτισμός.

Η καθημερινή παραγωγή συγκεντρώνονταν με φυγοκέντριση για 15 λεπτά (1200g) και διαιρούνταν σε μικρότερες ποσότητες με σκοπό να εκτιμηθεί η αξία και οι αλλαγές στη βιοχημική σύνθεση που απορρέουν από τη συντήρηση και αποθήκευση (Cordero-Esquivel *et al.*, 1993; Cordero-Esquivel and Voltolina, 1996)

Επιπροσθέτως αρκετά φιαλίδια του 1ml με κυτταρικές συγκεντρώσεις περίπου $1 \cdot 10^9$ κύτταρα/ml χρησιμοποιήθηκαν για να διαπιστωθεί αν η φυγοκέντριση προκαλεί αρχική ζημιά στο κύτταρο.

Άλλες ποσότητες καταψύχονται και διατηρούνται σε θερμοκρασία -20°C ή βυθίζονται σε υγρό άζωτο μέχρι να στερεοποιηθούν από την ψύξη και αποθηκεύονται σε καταψύκτη -60°C . Και στις δύο περιπτώσεις, αυτές οι μικρές ποσότητες λυοφιλοποιούνταν σε έναν λυοφιλοποιητή και αποθηκεύονταν σε έναν ξηραντήρα.

Στην περίπτωση των δειγμάτων που καταψύχονται στους -20°C , σε κάποια από αυτά δε χρησιμοποιήθηκε κρυοπροστατευτικό μέσο ενώ σε άλλα προστέθηκε γλυκερόλη ή Me_2SO σε αναλογία 1,5 και 10%(v/v).

Η βιωσιμότητα μετριέται ως η παρουσία ή η απουσία ανάπτυξης σε τριπλή σειρά αραιώσεων 1:10, από ένα αρχικό υπο-δείγμα συγκέντρωσης $1 \cdot 10^7$ κύτταρα/ml σε $1 \cdot 10^4$ κύτταρα/ml. Η ανάπτυξη μετριέται ως οπτική πυκνότητα που αυξάνει στα 550nm σε σπεκτροφωτόμετρο.

Παρατηρήσεις στο μικροσκόπιο επιβεβαιώνουν τότε οι αυξήσεις οφείλονται στα μικροφύκη ή στη βακτηριδιακή ανάπτυξη.

Για τα διατηρημένα δείγματα οι δοκιμές έγιναν μετά από 7, 15 και 30 ημέρες από τη συλλογή.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι καθημερινές αποδόσεις συγκεντρώθηκαν και αποθηκεύτηκαν με ψύξη ή ψύξη-ξήρανση για περισσότερο από ένα μήνα. Μετά από αργή ή γρήγορη ψύξη χωρίς τα κρυοπροστατευτικά μέσα glycerol ή Me₂SO κανένα από τα μικροφύκη δεν κατάφερε να αναπτυχθεί. Αντίθετα, με την αργή ψύξη (και τα κρυοπροστατευτικά μέσα), δόθηκαν καλά αποτελέσματα μετά από 7 ημέρες αποθήκευση στους -20°C. Όμως μετά από 15 και 30 ημέρες η ανάπτυξη δεν ήταν ικανοποιητική. Πιθανόν οφειλόταν στη βακτηριακή μόλυνση. Η χρήση Ψύξης-ξήρανσης έδωσε ακόμα χειρότερα αποτελέσματα. Πίνακες έως 10.

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα βιωσιμότητας σε μια τριπλή σειρά αραιώσεων του *Chaetoceros sp.* που ψύχθηκαν στους -20°C με glycerol και Me₂SO σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, μετά από διαφορετικές ώρες αποθήκευσης. Το (+) δηλώνει ανάπτυξη και το (-) μη ανάπτυξη.

Πιν 1

7 ημέρες				
	1*10 ⁷	1*10 ⁶	1*10 ⁵	1*10 ⁴
Glycerol %				
1	+	+++ ²	+++	-
5	+	+++ ²	+++	-
10	+	+++ ²	++-	+-
Me₂SO %				
1	+	+++ ²	-	-
5	+	+++ ²	++-	+-
10	+	+++ ²	+++	+-

Πιν 2

15 ημέρες				
	1*10 ⁷	1*10 ⁶	1*10 ⁵	1*10 ⁴
Glycerol %				
1	-	-	-	-
5	-	-	-	-
10	+	+-	-	-
Me₂SO %				
1	+	+ ⁻³	-	-
5	+	+++ ²	-	-
10	+	+++ ²	-	-

Πιν 3

30 ημέρες				
	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^4$
Glycerol %				
1	-	-	-	-
5	+	+++ ²	+++	-
10	+	+++ ²	+ -	-
Me₂SO %				
1	-	-	-	-
5	+	-	-	-
10	+	-	-	-

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα βιωσιμότητας σε μια τριπλή σειρά αραιώσεων του *Phaeodactylum tricornutum* που ψύχθηκαν στους -20°C με glycerol και Me₂SO σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, μετά από διαφορετικές ώρες αποθήκευσης. Το (+) δηλώνει ανάπτυξη και το (-) μη ανάπτυξη.

Πιν 4

7 days				
	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^4$
Glycerol %				
1	+	+---	---	---
5	+	+++	+++	+++
10	+	+++	++-	+ -
Me₂SO %				
1	+	+++ ²	+++	+++
5	+	+ ²	+ -	-
10	+	+++ ²	-	-

Πιν 5

15 days				
	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^4$
Glycerol %				
1	+	+-- ⁴	---	--
5	-	-	-	-
10	-	-	-	-
Me₂SO %				
1	+	-	-	-
5	-	-	-	-
10	-	-	-	-

Πιν 6

30 days				
	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^4$
Glycerol %				
1	+	-	-	-
5	+	-	-	-
10	+	+++ ²	-	-
Me₂SO %				
1	+	-	-	-
5	+	-	-	-
10	+	-	-	-

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα βιωσιμότητας σε μια τριπλή σειρά αραιώσεων του λυοφιλοποιομένου *Chaetoceros sp.* μετά από αργή ψύξη με glycerol και Me₂SO σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, μετά από διαφορετικές ώρες αποθήκευσης. Το (+) δηλώνει ανάπτυξη και το (-) μη ανάπτυξη.

Πιν 7

15 days				
	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^4$
Glycerol %				
1	+	-	-	-
5	+	-	-	-
10	+	-	-	-
Me₂SO %				
1	+	-	-	-
5	+	-	-	-
10	+	-	-	-

Πιν 8

30 days				
	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^4$
Glycerol %				
1	-	-	-	-
5	-	-	-	-
10	+	-	-	-
Me₂SO %				
1	-	-	-	-
5	+	-	-	-
10	-	-	-	-

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα βιωσιμότητας σε μια τριπλή σειρά αραιώσεων του λυοφιλοποιομένου *Chaetoceros sp.* μετά από αργή ψύξη με glycerol και Me₂SO σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, μετά από διαφορετικές ώρες αποθήκευσης. Το (+) δηλώνει ανάπτυξη και το (-) μη ανάπτυξη.

Πιν 9

15 days				
	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^4$
Glycerol %				
1	+	-	-	-
5	+	-	-	-
10	-	-	-	-
Me₂SO %				
1	+	-	-	-
5	+	-	-	-
10	-	-	-	-

Итв 10

30 days				
	1*10⁷	1*10⁶	1*10⁵	1*10⁴
Glycerol %				
1	+	-	-	-
5	+	-	-	-
10	-	-	-	-
Me₂SO %				
1	-	-	-	-
5	-	-	-	-
10	-	-	-	-

ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ

Η μελέτη των αποτελεσμάτων χαμηλών θερμοκρασιών στα βιολογικά συστήματα ή κρύο - βιολογία είναι μια καθιερωμένη επιστήμη και πολλά είναι γνωστά για το πώς τα κύτταρα είναι ανεκτικά ή παθαίνουν βλάβη από το stress ψύξης. Ακολουθώντας τον σχηματισμό του πάγου γύρω από τα κύτταρα (έξω-κυτταρικός πάγος), ή σε δοκιμαστικό σωλήνα (*in vitro*), ή σε ζωντανό οργανισμό (*in vivo*), τα κύτταρα φθάνουν σε μια πολύ χαμηλή συγκέντρωση ιόντων παρά το περιβαλλόμενο διάλυμα, όπου η αφαίρεση του έξω-κυτταρικού ύδατος σαν πάγος οδηγεί σε ένα " μη παγωμένο κλάσμα " που περιέχει διαλύτες. Για παράδειγμα, εάν ένα διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaCl) γραμμομοριακής συγκέντρωσης 0,15M στους 20°C, ψύχεται στους -20°C, το μη παγωμένο διάλυμα φθάνει γραμμομοριακή συγκέντρωση της τάξης των 5M (Morris 1981). Σε απάντηση σε αυτήν την έξω-κυτταρική υπερτονικότητα, το νερό πρέπει να απομακρυνθεί από το κύτταρο ώστε να διατηρηθεί η ισορροπία (Mazur 1970).

Αυτό μπορεί να λάβει χώρα με δύο τρόπους :

1. Με τον σχηματισμό του ενδοκυτταρικού πάγου ο οποίος συνήθως είναι θανατηφόρος, ή
2. Με την οσμωτική κίνηση του νερού από το κύτταρο στο υπερτονικό έξω-κυτταρικό τμήμα.

Οποιοδήποτε από τα ανωτέρω μπορεί να συμβεί, εξαρτάται κατά πολύ από την αναλογία ψύξης. Στις χαμηλές αναλογίες ψύξης υπάρχει αρκετός χρόνος για οσμωτική ισορροπία η οποία μπορεί να διατηρηθεί. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την πλασμόλυση (εάν υποθέσουμε ότι το κύτταρο του φυτού είναι εντοιχισμένο) (Levitt 198), ή τη συρρίκνωση του κυττάρου εάν το τοίχωμα του κυττάρου είναι αρκετά ελαστικό και η σύνδεση ανάμεσα στο τοίχωμα και στη μεμβράνη του κυττάρου είναι στενή (Morris, Coulson & Clarke 1988). Μερικά κύτταρα είναι ανεκτικά σε τέτοιες καταστάσεις.

Σε χαμηλές αναλογίες ψύξης, τα κύτταρα μπορεί να εκτεθούν στα δυναμικά καταστροφικά αποτελέσματα του υπερτονικού stress για μακρές περιόδους. Καθώς η αναλογία ψύξεως αυξάνεται η πιθανότητα καταστροφής του διαλύτη μειώνεται αλλά αυξάνεται η πιθανότητα σχηματισμού ενδοκυτταρικού πάγου (HF), καθώς μειώνεται ο διαθέσιμος χρόνος για την απομάκρυνση του νερού από το κύτταρο με την βοήθεια της όσμωσης. Αυτό αφήνει μη ψυγμένο το ενδοκυτταρικό υγρό το οποίο μπορεί να παγώσει. Πρακτικά η αναλογία ψύξης προσαρμόζεται για να ελαχιστοποιήσει την καταστροφή που προκλήθηκε από τους δύο τύπους stress. Η άριστη αναλογία ψύξης για την κρυοπροστασία μπορεί να ποικίλει από 1°C/min, σε

καλλιέργειες φυτικών ιστών (Withens 1987), έως 200°C/min για κάποια πράσινα φύκη (Morris 1976).

Άλλοι παράγοντες εκτός της αναλογίας ψύξης μπορεί να βελτιωθούν για αποδοτική κρυοπροστασία. Για τα περισσότερα κύτταρα είναι αναγκαίο τα θρεπτικά μέσα να εμπεριέχουν "κρυοπροστατευτικά" όπως το διμεθυλοσουλφιδικό οξύ (DMSO) την γλυκερίνη και την μεθανόλη. Όλα φαίνονται να είναι αποτελεσματικά εξαιτίας των επιδράσεων των ουσιών που είναι διαλυμένες στο διαλύτη και με το να παρέχουν ειδική προστασία στις μεμβράνες και στις πρωτεΐνες κατά την ψύξη. Η φάση της ανάπτυξης, η θερμοκρασία ανάπτυξης και η αλλαγή της τροφικής σύνθεσης έχουν αποδειχθεί ότι επιδρούν στην ανταπόκριση των κυττάρων κατά την ψύξη (Morris *et al.*, 1981).

Χρησιμοποιώντας τις τεχνικές οι οποίες αναπτύχθηκαν από τον Morris (1978), η πλειοψηφία των ειδών των **Κυανοφυκών** και **Χλωροφυκών** που βρίσκονται στη συλλογή καλλιέργειας για τα φύκη και τα πρωτόζωα (CCAP: Culture Collection of Algae and Protozoa), διατηρούνται ως κρυοπροστατευμένες καλλιέργειες κάτω από υγρό άζωτο στους -196°C. Η βιωσιμότητα η οποία ακολουθεί την κρυοπροστασία είναι ανεξάρτητη από τον χρόνο της αποθήκευσης (Leeson, Canu & Morris, 1984) και μερικά είδη από φύκη έχουν βελτιωθεί χωρίς αξιοσημείωτη παρέκκλιση στην βιωσιμότητα, 13 χρόνια μετά την αρχική αποθήκευση. Οι απαιτήσεις της διατήρησης των κρυοπροστατευμένων καλλιέργειών είναι ελάχιστες.

Επιπρόσθετα της δυσκολίας αυτής της μεθόδου, ένα άλλο πρόβλημα παρουσιάζεται με την διατήρηση των καλλιέργειών των διατόμων, εξαιτίας του γνωστού τους χαρακτηριστικού της μείωσης σε μέγεθος κατά την διάρκεια των επαναλαμβανόμενων διαιρέσεων (e.g. Jaworski, Wineman & Reynolds, 1988). Αυτό δημιουργεί δυσκολίες κατά την διάρκεια των μακρόχρονων μελετών στα διάτομα των καλλιέργειών.

Προσπάθειες έχουν γίνει για να βελτιώσουν την απόδοση στις μεθόδους διατήρησης για τα διάτομα. Ο Umebayashi (1972) ανέφερε ότι διάφορα θαλασσινά διάτομα, θα μπορούσαν να διατηρηθούν χωρίς ανακαλλιέργειες για πολλούς μήνες σε 5°C, υπό την προϋπόθεση ότι τακτικά θα δίδονται στα κύτταρα περίοδοι φωτός για μερικές φορές την ημέρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΤΑΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΥΚΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η έρευνα που αφορά τη μελέτη βιολογικά ενεργών χημικών ουσιών από τη θαλάσσια χλωρίδα και πανίδα με σκοπό να βρεθούν νέες χημικές ενώσεις που να είναι κατάλληλες για θεραπευτική ιατρική, κτηνιατρικές εφαρμογές συμπεριλαμβανομένων και των οργανισμών που βρίσκονται στις υδατοκαλλιέργειες, βρίσκεται σε πειραματικό στάδιο. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές αναφορές αντιβιοτικών απομονωμένων από θαλάσσια φύκη (π.χ. Hornsey & Hide 1979, Burkholder, *et al.*, 1960, Ohta 1977, Fenical, *et al.*, 1977, Rao & Parekh 1981).

Ο χαρακτήρας της έρευνας είναι αρχικά οικολογικός. Τα μικροφύκη που θα χρησιμοποιηθούν θα προέρχονται από νερά ίδιας προέλευσης με των ιχθυογεννητικών σταθμών ή των μονάδων ή θα εισαχθούν σε αυτούς χωρίς βέβαια να αλλοιώσουν τη φυσική ισορροπία του περιβάλλοντος νερού. Αν κατά τη διάρκεια της έρευνας βρεθούν στελέχη που να περιέχουν ουσίες με αντιμικροβιακή δράση, τότε θα μειωθεί η χρήση των απολυμαντικών καθώς και των αντιβιοτικών. Τα συγκεκριμένα στελέχη θα έχουν την ικανότητα να αναχαιτίζουν ή να μειώνουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς των νερών με φυσικό τρόπο. Επομένως η ποσότητα των παραπάνω χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται κατά κόρον στις υδατοκαλλιέργειες και προξενούν προβλήματα με το να δημιουργούν ανθεκτικές μορφές μικροβίων θα μειωθούν σημαντικά.

Αυτό συνεπάγεται και ένα δεύτερο πολύ σημαντικό αποτέλεσμα. Λιγότερα κατάλοιπα στη σάρκα του ψαριού, άρα και καλύτερη ποιότητα και συνεπώς ασφάλεια της υγείας του καταναλωτή.

Η συγκεκριμένη εφαρμογή των στελεχών έχει καθαρά προληπτικό χαρακτήρα. Με αυτόν τον τρόπο η θνησιμότητα στη μονάδα θα μειωθεί σημαντικά. Απορρέουν έτσι οικονομικά οφέλη για την επιχείρηση. Το κέρδος αυξάνεται γιατί μειώνεται η θνησιμότητα. Από την άλλη πλευρά τα χημικά σκευάσματα κοστίζουν ακριβά επομένως με τη μείωσή τους μειώνονται και τα έξοδα της επιχείρησης. Ως αποτέλεσμα είναι να φτάσει στον καταναλωτή ένα προϊόν με καλύτερη ποιότητα και με λιγότερο κόστος.

Παρακάτω παρατίθενται η γενική μεθοδολογία για την ανίχνευση βακτηριοστατικής δράσης στα διάφορα στελέχη μικροφυκών. Έπειτα ακολουθούν μεθοδολογίες από διάφορους ερευνητές και τέλος τα αποτελέσματα του κάθε ερευνητή παρουσιάζονται σε ένα πίνακα.

Συλλέγονται τα φύκη και καθαρίζονται.

Ομογενοποιούνται με κάποιες χημικές ουσίες που βοηθούν στο να δημιουργηθεί απόσταγμα.

Έπειτα το μείγμα φυγοκεντρείται για να απομακρυνθούν οι ακαθαρσίες.

Το υλικό αυτό διαποτίζεται σε μικρούς χάρτινους δίσκους και τοποθετείται σε τριβλία που ήδη έχουν εμβολιστεί με τα στελέχη μικροβίων που είναι προς έλεγχο.

Έπειτα από επώαση κάποιων ωρών (κατά μέσο όρο 24 ώρες) και θερμοκρασία (κατά μέσο όρο πάνω από 25°C) εκτιμάται η ζώνη αναστολής γύρω από το χάρτινο δίσκο. Τα φύκη που έχουν μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση έχουν και μεγαλύτερη ζώνη αναστολής.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 1

Η έρευνα διεξήχθη στα παράλια της Κίνας στο Qingdao από τους Ma Jing-wen & tan Wei-ci το 1984.

Μαζεύτηκαν θαλάσσια φύκη από τη μεσοπαλιρροιακή ζώνη που ανήκαν στις 17 ακόλουθες τάξεις: Bangiales, Nemalionales, Ceramiales, Gelidiales, Cryptonemiales, Gigartinales and Rhodymeniales των Ροδοφυκών Ectocarpales, Fucales, Dictyosiphonales, Scytosiphonales, Desmarestiales, Laminarales and Dictyonales των Φαιοφυκών, και Ulvales, Clidophorales και Siphonales των Χλωροφυκών Συνολικά εξετάστηκαν 60 είδη.

Οι ακόλουθοι 4 μικροοργανισμοί χρησιμοποιήθηκαν για τα τεστ ελέγχου: : *Bacillus subtilis* (Gram-θετικό βακτήριο), *Escherichia coli* (Gram-αρνητικό βακτήριο), *Vibrio sp.* (θαλάσσιο βακτήριο) και *Saccharomyces cerevisiae*.

ΜΕΘΟΔΟΣ

Είδη φυκών μετά τη συλλογή μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο σε πλαστικές σακούλες πάνω σε πάγο και αποθηκεύτηκαν στους -12°C. Έγινε ταξινομική αναγνώριση των περισσοτέρων

Αφού καθαρίστηκαν από επίφυτα και ακαθαρσίες, 50 gr υγρού βάρους φυκών ομογενοποιήθηκε για 2 λεπτά σε έναν ομογενοποιητή σε 100 ml toluene-methanol (1:3).

Μετά από 12 ώρες αυτό το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για απομάκρυνση των υπολειμμάτων και 20 μg αυτού του αποστάγματος, που αντιστοιχούσε σε 10 mg υγρού βάρους ιστού, διαποτίστηκε σε ένα χάρτινο δίσκο 13 mm.

Κατόπιν αυτοί οι δίσκοι τοποθετήθηκαν σε τριβλία με άγαρ που ήταν ήδη εμβολιασμένα με φρέσκιες καλλιέργειες των ελεγχόμενων μικροοργανισμών. Πλάκες εμβολιασμένες με *E.coli* και *B.sybtilis* εκκολάφθηκαν στους 37°C για 24ώρες, τα *Saccharomyces cerevisiae* και *Vibrio sp.* στους 25°C για 48 ώρες. Μετά την επώαση αυτά τα φύκη που είχαν αντιμικροβιακή δράση, έδειξαν αξιοσημείωτη ζώνη αναστολής γύρω από το δίσκο. Η διάμετρος αυτής της ζώνης μετρήθηκε. Κάθε απόσταγμα ελέγχθηκε εις διπλούν στα τέστ των 4 μικροοργανισμών.

Τρία κοινά χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά σε σταθερές συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν για να ελέγξουν την ευαισθησία και το μέγεθος ζωνών αναστολής

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τα 60 είδη θαλάσσιων φυκών που εξετάστηκαν, τα αποστάγματα των 10 ειδών (περίπου 17 %) ήταν ενεργά ενάντια σε τουλάχιστον από τα 4 είδη μικροοργανισμών που εξετάστηκαν. Από αυτά, 14 % ήταν ενεργά ενάντια στο *B.subtilis*, 3 % ενάντια στο *E.coli*, 3 % ενάντια στο *S.cerevisiae* και 7 % ενάντια στο *Vibrio sp.* Από τις παραπάνω πληροφορίες φαίνεται ότι η ανταπόκριση ενάντια στο *B.subtilis* είναι πολύ υψηλότερη από ό,τι για τα άλλα είδη μικροοργανισμών. Τα αποτελέσματα του προγράμματος φαίνονται στον **πίνακα 3.1.1.**

Αντιμικροβιακή δράση βρέθηκε σε γενικές γραμμές σε όλες τις ομάδες φυκών αλλά δεν είχαν ομοιόμορφη κατανομή ανάμεσα στις διάφορες τάξεις μέσα σε κάθε Φύλο. Ενεργά είδη ήταν επικεντρωμένα στα Ceremiales των Ροδοφυκών, όπως τα *Laurencia sp.* και *Rhodomela confervoides* και στα Fucales των Φαιοφυκών, όπως τα *Sargassum kjellmanianum* και *S.thunbergii*, τα οποία είναι άφθονα κατά μήκος της ακτής Qingdao.

Οι αντιμικροβιακές δράσεις των πιο ενεργών γενών που βρέθηκαν στη συγκεκριμένη έρευνα έχουν αναφερθεί από άλλους ερευνητές (Glombitza 1979, Youngken & Shimizu 1975).

Όπως δείχνει η συγκεκριμένη μελέτη, ένας αριθμός ειδών δεν έδειξε καθόλου αντιμικροβιακές δράσεις, αν και μερικά είδη του ίδιου γένους αναφέρθηκαν από πολλές ομάδες ως βιοενεργά. Τα αρνητικά αποτελέσματα οφείλονται πιθανόν στα διαφορετικά είδη που συλλέχθηκαν ή στη συλλογή από μια διαφορετική περιφέρεια ή σε ένα διαφορετικό στάδιο ανάπτυξης.

Πιν 3.1.1. Στον συγκεκριμένο πίνακα φαίνονται τα είδη μικροφυκών που έχουν θετική αντίδραση ενέντια στους παθογόνους μικροοργανισμούς *B. subtilis*, *E. Coli*, *S. cerev.*, *Vibrio sp.*

ΕΙΔΗ ΦΥΚΩΝ	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerev.</i>	<i>Vibrio sp.</i>	ΕΡΕΥΝΗΤΕΣ
Rhodophyta (7 orders. 32 species)					
Bangiales					
<i>Porphyra marginata</i>					Tseng & T. J. Chang
Nemalionales					
<i>Nemalion helminthoides</i>					(Veil. in With.) Batl. var. vermiculare (Sur.) Tseng
Gelidiales					
<i>Gelidium amansii</i>	*				Lamour.
<i>Gelidium divaricatum</i>					Martens
<i>Dumontia simplex</i>					Cotton
Cryptonemiales					

<i>Hyalosiphonia caespitosa</i>				Okam
<i>Gloiosiphonia capillaris</i>				(Huds.) Carm.
<i>Gloiopeltis furcata</i>				(Post &. Rupr.) J.Ag.
<i>Halymenia</i> sp.				
<i>Corallina officinalis</i>				L.
<i>Corallina pilulifera</i>				Post. & Rupr.
<i>Grateloupia filicina</i>				(Wulf.) C.Ag.
<i>Grateloupia filicina</i> var. <i>prolongata</i>				(J.Ag.) Tseng
<i>Grateloupia filicina</i> var. <i>lomentaria</i>				Howe
Gigartinales				
<i>Gracilaria verrucosa</i>				(Huds.) Papenf.
<i>Gracilaria textorii</i>				(Sur.) De Toni
<i>Gracilaria</i> sp.				
<i>Plocamium telfairiae</i>	*		*	Harv.
<i>Gymnogongrus flabelliformis</i>				Harv.
<i>Chondrus</i> sp.				
Rhodymeniales				
<i>Chrysiomenia wrightii</i>				(Harv.) Yamada
<i>Champia parvula</i>				(C.Ag.) Harv.
Ceramiales				
<i>Ceramium kondoi</i>				Yendo
<i>Ceramium boydenii</i>				Gepp
<i>Platythamnion yezoense</i>				Inagaki
<i>Heterosiphonia japonica</i>	*			Yendo
<i>Laurencia</i> sp.-1				
<i>Laurencia</i> sp.-2	*		*	
<i>Chondria tenuissima</i>				(Good & Woodw.) C.Ag.
<i>Symphyocladia latiuscula</i>				(Mart.) Yamada
<i>Rhodomela confervoides</i>	*		*	(Huds.) Silva
<i>Polysiphonia urceolata</i>		*		(Lightf. ex Dillw.) Grev.
Phaeophyta (7 orders, 20 species)				
Ectocarpales				
<i>Ectocarpus confervoides</i>				(Roth) Le Jol.
Scytosiphonales				
<i>Scytosiphon lomentaria</i>				(Lyngb.) Link
<i>Colpomenia sinuosa</i>				(Roth) Derb. & Sol.

<i>Colpomenia bullosa</i>				(Saund.) Yamada
Dictyosiphonales				
<i>Myelophycus simplex</i>				(Harv.) Papenf.
<i>Punctaria latifolia</i>				Grev.
<i>Punctaria plantaginea</i>				(Roih) Grev.
Desmarestiales				
<i>Desmarestia viridis</i>				(O. F. Müll.) Lamour.
Dictyotales				
<i>Dictyota indica</i> Sond.				
<i>Dictyopteris divaricata</i>				(Okam) Okam.
<i>Padina crassa</i>				Yamada
Laminariales				
<i>Chorda filum</i>				(L.) Stackh.
<i>Undaria pinnatifida</i>				(Harv.) Sur.
<i>Laminaria japonica</i>				Aresch.
Fucales				
<i>Pelveita siliquosa</i>				Tseng & C. F. Chang
<i>Sargassum pallidum</i>				(Turn.) C.Ag.
<i>Sargassum fusiforme</i>	*			(Harv.) Setch.
<i>Sargassum thunbergii</i>	*		*	(Mert.) O. Kuntze
<i>Sargassum kjellmanianum</i>	*	*	*	Yendo
<i>Sargassum</i> sp.				
Chlorophyta (3 orders, 8 species)				
Ulvales				
<i>Ulva pertusa</i>			*	Kjellm.
<i>Enteromorpha linza</i>				(L.) J.Ag.
<i>Enteromorpha intestinalis</i>				(L.) Link
<i>Enteromorpha prolifera</i>				(O. F. Müll.) J.Ag.
<i>Enteromorpha</i> Sp.				
Cladophorales				
<i>Cladophora</i> sp.				
Siphonales				
<i>Codium fragile</i>				(Sur.) Hariot
<i>Bryopsis hypnoides</i>				Lamour.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 2

Αυτή η έρευνα διεξήχθη στη Γαλλική Μεσογειακή ακτή από τους J. Moreau, D. Pesando & B. Caram, το 1984. Τα φύκη που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα *Dictyota dichotoma*, *Dictyota linearis*, *D. dichotoma* (f. *implexa*), *Dilophus spiralis* και *Taonia atomaria*

Αποστάγματα εξανίου και methylene dichloride με τα φύκη ελέγχθηκαν ενάντια σε διαφορετικούς μικροοργανισμούς δείχνοντας ιδιαίτερα, ότι αρκετά είδη των Dictyotales Φαιοφύκη έχουν αντιμυκητιακή δραση.

ΜΕΘΟΔΟΣ

Στο πεδίο τα φύκη καθαρίστηκαν από επίφυτα, πλύθηκαν προσεκτικά με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό, στέγνωσαν σε απορροφητικό χαρτί και κόπηκαν σε μικρά κομμάτια πριν διατηρηθούν σε 100 % αιθανόλη. Στο εργαστήριο αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη.

Το απόσταγμα αιθανόλης φιλτραρίστηκε και εξατμίστηκε έως ότου στεγνώσει, σε μειωμένη πίεση.

Παρασκευάστηκαν δύο αποστάγματα εξανίου και methylene dichloride που ελέγχθησαν ενάντια σε Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια και ενάντια σε μύκητες (ζυμομύκητες, μούχλα και δερματόφυτα). Κάθε τεστ βασίστηκε σε υλικά στεγνού βάρους.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όλα τα φύκη *Dictyotales* που ελέχθηκαν (πίνακας 3.2.1) επέδειξαν ένα μεγάλο φάσμα αντιμυκητιακής δραστηριότητας. Επιπλέον επισημαίνεται ότι αυτή η δραστηριότητά τους βρέθηκε να ποικίλλει ανάλογα με την εποχή συλλογής τους.

Πίνακας 3.2.1. Αναχαιτίση βακτηριακής και μυκητιακής ανάπτυξης από αποστύγματα εξανίου. NT: Δεν εξετάστηκαν, + 10mm, ++ 10 με 16 mm. Συγκέντρωση = 500μdisc⁻¹ από διάμετρο 60mm.

Phaeophyceae	Bacteria		Fungi		
	Gram +	Gram -	Yeast	Moulds	Dermatophytes
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Sporothrix schenckii</i>	<i>Trichophyton schoenleinii</i> <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichophyton menthaeforme</i> <i>Microrhizum audouinii</i> <i>Microrhizum gypseum</i> <i>Microrhizum fulvum</i> <i>Microrhizum canis</i> <i>Epidermophyton floccosum</i>
<i>Dictyota dichotoma</i> June	-	-	-	-	++
<i>Dictyota dichotoma</i> April	-	-	+	++	+++
<i>Dictyota dichotoma</i> f. <i>implexa</i> April	-	+	-	++	++
<i>Dictyota linearis</i> September	-	-	-	+++	+++
<i>Dilophus fasciola</i> June	-	-	-	++	+++
<i>Dilophus fasciola</i> April	-	-	-	+	++
<i>Dilophus spiralis</i> June	-	-	-	-	NT
<i>Dilophus spiralis</i> April	-	-	+	+++	+++
<i>Dilophus spiralis</i> May	NT	NT	NT	NT	NT
<i>Tuonia atomaria</i> May	NT	NT	NT	NT	NT

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 3

Η εργασία που αναφέρεται παρακάτω παρουσιάζει στοιχεία για την αντιβακτηριδιακή δράση των φυκών (Hornsey & Hide 1974, Espeche *et al.* 1984, Reichelt & Borowitzka 1984, Kellm & Walker 1989).

Ειδικότερα, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να εξετάσει τις δυνατότητες των φυκών για βακτηριακό έλεγχο σε καλλιέργειες προνυμφών γαρίδων στις οποίες χορηγείτο τεχνητή τροφή περιεχόμενη σε κάψα MED (MICROENCAPSULATED DIETS).

ΜΕΘΟΔΟΣ

Η καλλιέργειά του γόνου *Pennaeus indicus* πραγματοποιούνταν σε δεξαμενές με κλειστό σύστημα επανακυκλοφορίας νερού. Οι προνύμφες στο στάδιο 1 (PZ1) διατηρούνταν σε πυκνότητα 10 άτομα/l σε γυάλινα δοχεία χωρητικότητας 2 l για τον προσδιορισμό της επιβίωσης καθώς και την παρακολούθηση της ανάπτυξης τους σε διαφορετικές δίαιτες με ζωντανή και τεχνητή τροφή. Πραγματοποιήθηκαν 3-8 επαναλήψεις για κάθε πείραμα

Συνθήκες καλλιέργειας:

Θαλασσινό νερό της περιοχής διοχετεύονταν αφού περνούσε από φίλτρο πόρου 5μm.

Θερμοκρασία: σταθερή στους $28 \pm 1^\circ\text{C}$ και αλατότητα: 30-35‰.

Το φως ακολουθούσε έναν ελεγχόμενο κύκλο: 14 ωρών φως, και 10 ωρών σκοτάδι

Επίσης διεξάγονταν τακτικοί έλεγχοι στα επίπεδα pH και στις συγκεντρώσεις αμμωνίας και νατρίου ακολουθώντας στάνταρτς μεθόδους (Parsons *et al.* 1984, Boyd and Tucker 1992). Τα επίπεδα παρέμειναν μέσα στα αποδεκτά όρια για καλλιέργεια γόνου. (Chin and Chen 1987, Chin and Chen 1988).

Χρησιμοποιήθηκε μείγμα από τα φύκη *Skeletomena costatum* και *Tetraselmis chuii* στη δίαιτα της ζωντανής τροφής ως μάρτυρας με πυκνότητα 50 κύτταρα/μl και το ίδιο μείγμα με 10-15 κύτταρα/μl σαν μόνη δόση φυκών (SDLA) στις προνύμφες PZ1.

Μια πειραματική φόρμουλα τεχνητής τροφής περιεχόμενης σε κάψα, MED χορηγήθηκε στις προνύμφες σε όλες τις δοκιμές σε πυκνότητα 4mg/l μέχρι το στάδιο 3 της Μύσιδας (M3).

Πρόσφατα εκκολαπτόμενη *Artemia* (EGINV aquaculture) επίσης δόθηκε σε όλες τις δοκιμές σε πυκνότητα 2-5 Artemia/ml από το στάδιο PZ3 των προνυμφών και μετά.

Τα γυάλινα δοχεία καλλιέργειας πλένονταν και αποστειρώνονταν 10-12 ώρες στους 28°C μετά από κάθε δοκιμή του πειράματος.

Ανά δεύτερη ημέρα τα δοχεία αδειάζονταν και ο γόνος καταμετρήτοταν

Όλες οι τεχνητές δίαιτες ενυδατώνονταν καθημερινά και διοχετεύονταν στην καλλιέργεια γόνου τις ώρες 08:00, 12:00, 20:00, 24:00.

Τα φύκη αναπτύσσονταν σε ημισυνεχείς καλλιέργειες και η πυκνότητα των κυττάρων τους υπολογίζονταν χρησιμοποιώντας αιματοκυτταρόμετρο.

Απόσταγμα φυκών

Η *Tetraselmis chuii* διατηρήθηκε σε καλλιέργεια και συλλέχθηκε αφού πρώτα φυγοκεντρήθηκε στα 5000 g για 15 λεπτά.

Όλα τα φύκη αποξηράνθηκαν με πάγο.

Τα φύκη αποστάχθηκαν χρησιμοποιώντας διχλωρομεθάνιο. Το διχλωρομεθάνιο εξατμίστηκε και το απόσταγμα τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο θαλασσινό νερό.

Επίδραση των αποσταγμένων μικροφυκών στη βακτηριδιακή ανάπτυξη

Βακτηριδιακά τεστ διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα θρεπτικά μέσα για 7 είδη βακτηριδίων (*Bacteria I*, *Bacteria II*, *Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio ordalii*).

Ελέχθηκαν τα αποστάγματα από τα φύκη *Tetraselmis chuii* και *Polysiphonia lanosa*. Το δεύτερο είδος επιλέχθηκε γιατί καθώς αναφέρεται από τους Hornsey και Hide (1974) εμφανίζει μια έντονη αντιβακτηριδιακή δραστηριότητα.

Βακτηριακές μετρήσεις

Οι Βακτηριακές μετρήσεις έγιναν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της φθορίζουσας χρώσης DAPI (Porter & Feig, 1980). Η συγκέντρωση της χρώσης κρατήθηκε σταθερά στα 50 $\mu\text{g}^{-1}\text{ml}$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι δίαιτες MED χρησιμοποιήθηκαν για να αντικαταστήσουν ολοκληρωτικά τα μικροφύκη σε εκκολαπτήρια της συγκεκριμένης γαρίδας, τα οποία προμηθεύονταν νερό από την περιοχή του σταθμού. Το συγκεκριμένο νερό υπόκεινται σε

βακτηριακά ‘bloom’ τα οποία επηρεάζουν τους πληθυσμούς των μικροφυκών που με τη σειρά τους επηρεάζουν τα επίπεδα επιβίωσης των προνυμφών. Δοκιμές με το *Penaeus indicus* γίνονταν για δύο χρόνια στην Αγγλία για να καθοριστεί ότι τα εποχικά βακτηριακά ‘bloom’ είναι άμεσα συνδεδεμένα με με την μικρή επιβίωση σε δίαιτες με MED. Αυτές οι δοκιμές επίσης δείχνουν ότι αν μια μονή δόση φυκών (SDLA:single dose of live algae) δοθεί στα πρωτόζωα στο στάδιο (PZ1), τα επίπεδα βιωσιμότητας με δίαιτες με MED δεν διαφέρουν σημαντικά από τη ζωντανή διαίτα στα δείγματα μαρτύρων.

Τα πειράματα δείχνουν ότι ο παράγοντας που είναι υπεύθυνος στο SDLA για βελτίωση της επιβίωσης σε δίαιτες με MED, είναι πιθανόν να είναι έκκριμα ή ένας μεταβολίτης όπου τροποποιεί τα βακτήρια στο νερό της καλλιέργειας. Η δράση αυτή του μεταβολίτη μειώνει ή αποτρέπει τη συμπεριφορά του *V. Harveyi* και άλλων ειδών.

Σε μια προσπάθεια να απομονωθεί ο παράγοντας στο SDLA που είναι υπεύθυνος για την ενίσχυση της επιβίωσης ακόμη με παρουσία υψηλών βακτηριακών αριθμών, μια περαιτέρω σειρά πειραμάτων διεξάγει κατά τη διάρκεια καλοκαιρινής περιόδου (πίνακας 1).

feed	Sea water treatment	<i>P. indicus</i> % survival to PL1							Mean % survival
		1	2	3	4	5	6	7	
live feed control	5µm filtered	63±5.9	68±2.6	88±10.1	61±6.5	62±6.7	84±6.2	76±6.5	72
MED + SDLA	5µm filtered	89±4.9				89±5.4	73±3.5	80±7.8	83
MED + AW	5µm filtered	89±12.2	49±2.2	76±4.9					71
MED + AW	autoclaved filtered 0.2µm	83±3.2							83
MED	5µm filtered		0	3±1.3	43±10.7	57±6.6			34
MED	autoclaved				0				0

Στα πειράματα 1-3 το SDLA αποτελούμενο από 8-10 cells µl⁻¹ *Skeletonema* και 8-10 cells µl⁻¹ από *Tetraselmis* μαζεύτηκε ως φυσιολογικό αλλά τα κύτταρα φυκών μετακινήθηκαν με το φιλτράρισμα και μόνο η καλλιέργεια φυκών προστέθηκε στο MED.

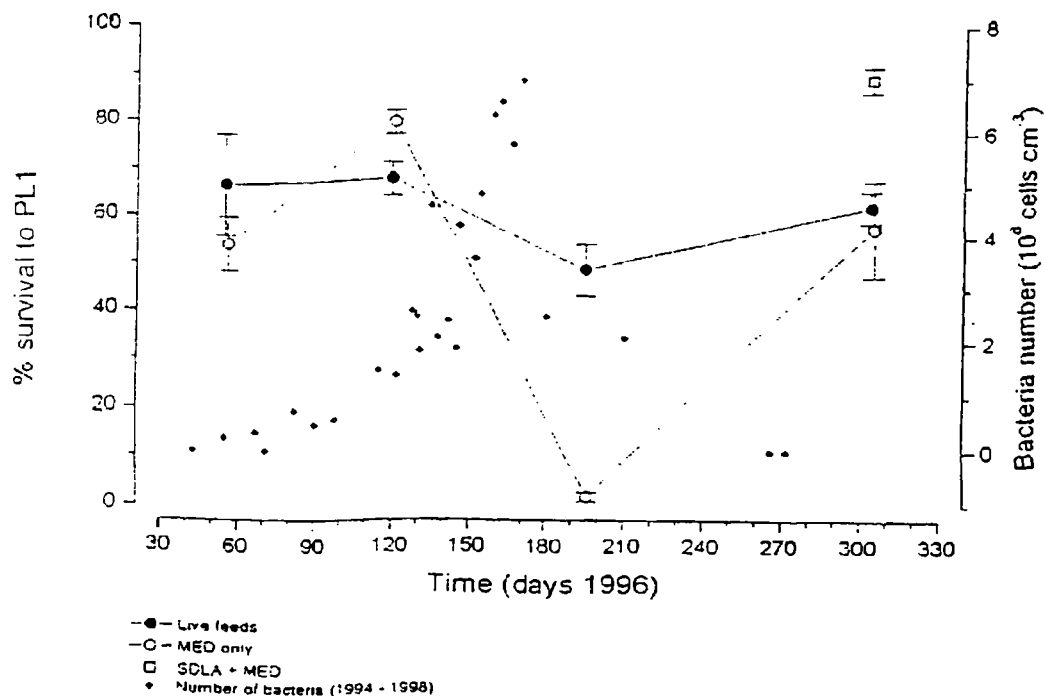
Αν και εξ' αιτίας της έλλειψης γόνου δεν ήταν πάντα εύκολο να γίνει πλήρης σειρά από έλεγγους η προσθήκη νερού φυκών στο MED προώθησε σημαντικά υψηλότερη επιβίωση από ότι μόνο το MED (πίνακας 1, πειρ. 2,3).

Στο πείραμα 1(πίνακας 1) η πρόσθεση νερού φυκών έδωσε όμοια επίπεδα στο MED συν SDLA και στους ελέγχους ζωντανών ταισμάτων, υποδηλώνοντας ότι τα φύκη στο SDLA δεν συνεισφέρουν στη διατροφή γόνου. Όμοια σε αυτό το πείραμα η υψηλή κλίμακα επιβίωσης στο MED με νερό φυκών φιλτραρισμένο από πόρο 0,2 μm αποκλείει κάθε συνεισφορά από βακτήρια από την καλλιέργεια φυκών.

Η κλίμακα επιβίωσης για MED χωρίς SDLA (πιν.1, πειρ. 2-5) ήταν κυμαινόμενη από 0-57% όπως είδαμε προηγουμένως όταν χρησιμοποιήθηκε 5μm φιλτραρισμένο θαλασσινό νερό κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου του χρόνου (εικ.1).

Η αποστείρωση του θαλασσινού νερού πριν τη χρήση του (πιν.1,πειρ. 4) προκάλεσε πλήρη κατάρρευση της καλλιέργειας γόνου.

Σε αντίθεση τα πειράματα 5-7 παρέχουν περαιτέρω απόδειξη για την σταθερή επιτυχία καλλιιεργειών γόνου ταϊσμένου με MED με SDLA. Όπως φαίνεται από τον πίνακα 1 ο παράγοντας που παρήχθη από μικροφύκη επαυξάνει την επιβίωση γόνου, ακόμη και στην παρουσία υψηλών βακτηριακών αριθμών, είναι πιθανόν να είναι ένα έκκριμα ή μεταβολίτης. Σχεδιάστηκε μια περαιτέρω σειρά πειραμάτων για να ελέγξει τα αποτελέσματα αποστάγματος φυκών πάνω στον έλεγχο των βακτηρίων.



Η εικ. 1 παρουσιάζει το ποσοστό επιβίωσης γόνου (PL) σε μία σειρά δοκιμών με την *P.indicus* χρησιμοποιώντας γόνο ταϊσμένο με καθορισμένη ζωντανή τροφή (μικροφύκη στο στάδιο PZ3 ακολουθούμενα από *Atremia* στο στάδιο PL1). Αυτές οι δοκιμές έγιναν κατά τη διάρκεια του έτους 1996, χρησιμοποιώντας θαλασσινό νερό φιλτραρισμένο από πόρο 5μm. Υπάρχουν έντονες εποχιακές αλλαγές στην πρωτογενή παραγωγικότητα του θαλασσινού νερού με μια ετήσια άνθηση του *Phaeocystis* νωρίς το καλοκαίρι ακολουθούμενη από μια άνθηση της συγκέντρωσης των βακτηρίων. Το χειμώνα η συγκέντρωση των θαλάσσιων βακτηρίων είναι κατά μέσο όρο $1 \cdot 10^3 \text{ ml}^{-1}$ αλλά αυξάνεται απότομα ακολουθώντας τη μείωση της άνθησης των φυκών και κυμαίνεται από $7 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ (περίοδος 1994-1998). Το 1996 η επιβίωση γόνου που ταϊστηκε με ζωντανές τροφές ήταν υψηλότερη τους χειμερινούς μήνες όταν η συγκέντρωση των βακτηρίων στα παράλια νερά ήταν χαμηλή, αλλά μειώθηκε καθώς η συγκέντρωση των βακτηρίων αυξανόταν ακολουθώντας την άνθηση των *Phaeocystis*. Οι συνολικές διακυμάνσεις στην επιβίωση κυμαίνονται από 49-66,6% για γόνο ταϊσμένο με φύκη. Αντίθετα, όταν η τεχνητή τροφή (MED) υποκαθιστούσε τα μικροφύκη, η επιβίωση κυμαινόταν από 0-80%. Αξιοσημείωτο είναι το χρονικό σημείο της κατάρρευσης της καλλιέργειας που συνέπιπτε με την περίοδο όπου τα επίπεδα των βακτηρίων στα παράλια νερά ήταν στα ύψη (**εικ.1**). Σε χρονικές περιόδους όπου τα επίπεδα των βακτηρίων ήταν μειωμένα, η επιβίωση με χορήγηση τεχνητής τροφής (MED) ήταν όμοια με εκείνη του γόνου ταϊσμένου με μικροφύκη, αλλά όταν χορηγούνταν στο πρώτο στάδιο προνυμφών PZ1 δόση φυκών (SDLA) επιπλέον με το MED στην ημέρα πειράματος 303 (**εικ.1**) η επιβίωση βελτιωνόταν σε 89% από 62% που ήταν το ποσοστό της όταν χορηγούνταν ζωντανή τροφή και 57% που ήταν το ποσοστό επιβίωσης όταν χορηγούνταν τεχνητή τροφή μόνο (MED).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΕΥΡΥΤΕΡΗ ΧΡΗΣΗ ΦΥΚΩΝ

Τα θαλασσινά φύκη, ως το πρώτο επίπεδο της πρωτογενούς παραγωγής, δεν έχουν μόνο οικολογική σημασία αλλά και η οικονομική πλευρά είναι ενδιαφέρουσα αφού χρησιμοποιούνται ως τροφή και φάρμακα εδώ και αιώνες. Σήμερα, διάφορα είδη από θαλασσινά φύκη παρέχουν όχι μόνο τροφή αλλά παράγουν και εκχυλίσματα όπως άγαρ, καραγενάσες και αλγινάσες. Αυτά τα εκχυλίσματα έχουν πολλές εφαρμογές σε τροφές, στην φαρμακευτική, στην κοσμετολογία και στη βιομηχανία.

1. ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΦΥΚΩΝ ΜΕ ΕΥΡΕΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗ

Τα πιο σημαντικά για την εμπορική τους αξία και ευρέως διαδεδομένα εκχυλίσματα φυκών είναι το άγαρ καθώς και οι καραγενάσες. Η προέλευση καθώς και η χρήση αυτών που εφαρμόζονται άμεσα στη βιομηχανία τροφίμων και την ιατρική παραθέτονται σε αυτήν την ενότητα.

A. Άγαρ

Το άγαρ είναι μία γενική ονομασία για πολυσακχαρίτες που προέρχονται από συγκεκριμένα είδη ροδοφυκών. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για πολυσακχαρίτη που αποτελείται κατά 70% από αγαρόζη και 30% από αγαροπηκτίνη (Horpe, 1982).

Το όνομα άγαρ, παράγεται από τη Μαλαισιανή λέξη "άγαρ-άγαρ", όπου κατά γράμμα σημαίνει φύκος και είναι γνωστό στην Κίνα από τον 17ο αιώνα. Τα εκχυλίσματα από τα ροδοφύκη μεταφέρονταν στα βουνά για να παγώσουν κατά τη διάρκεια της νύχτας ώστε το νερό και άλλες ακαθαρσίες να αποσπαστούν από το υλικό. Το άγαρ βρίσκει ευρεία χρήση ως συμπαγές σταθερό υπόστρωμα υπόστρωμα για μικροβιολογικές καλλιέργειες (βακτήρια-μύκητες-μικροφύκη).

Το μοντέρνο άγαρ είναι μια καθαρή μορφή που αποτελείται επί το πλείστον από το ουδέτερο κομμάτι γνωστό ως αγαρόζη. Η μη ιονική της φύση την κάνει πιο κατάλληλη για ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών στο εργαστήριο. Το άγαρ σε ακατέργαστη ή επεξεργασμένη μορφή εξαιτίας της πηκτικής του ιδιότητας βρίσκει εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων όπου χρησιμοποιείται σε πολλά είδη όπως παγωτά, κονσερβοποιημένα τρόφιμα και αρτοποιήματα.

Η καλύτερη ποιότητα σε άγαρ παράγεται από είδη των γενών *Pterocladia* & *Gelidium*, που συλλέγονται από φυσικούς πληθυσμούς που αναπτύσσονται κυρίως σε τροπικές περιοχές δηλ. σε θαλάσσιες περιοχές με σχετικά υψηλές θερμοκρασίες νερού όπως στην Ισπανία, Πορτογαλία, Μαρόκο, Αζόρες, Καλιφόρνια, Μεξικό, Νέα Ζηλανδία, Νότια Αφρική, Ινδία, Χιλή και την Ιαπωνία. Άγαρ κατώτερης ποιότητας παράγεται από είδη των *Gracilaria* & *Hypnea*. Η ποιότητα του άγαρ εμφανίζει

παράγεται από είδη των *Gracilaria* & *Hypnea*. Η ποιότητα του άγαρ εμφανίζει εποχιακές διακυμάνσεις στα είδη των *Pterocladia*, είναι χαμηλότερη τους κρύους μήνες και υψηλότερη τους θερμούς. Αυτή τη στιγμή, τα μακροφύκη δεν καλλιεργούνται σε μεγάλη κλίμακα ανά τον κόσμο, γιατί ακόμα δεν έχουν βρεθεί τεχνικές που να καλλιεργούνται τα μακροφύκη και να αποδίδουν καλή ποιότητα άγαρ. Στις μέρες μας, παράγονται 10.000 τόννοι μακροφυκών. Υπάρχει ανεπάρκεια όσον αφορά τους οργανισμούς που βρίσκονται προς εκμετάλλευση και σίγουρα το άγαρ είναι ένα ακριβό προϊόν. Περισσότερο από το 50% από το συνολικό άγαρ που παράγεται, προέρχεται από την *Gracilaria*.

Παραγωγή του Άγαρ

Το άγαρ όπως και οι καραγενάσες που αναφέρονται παρακάτω ανήκουν στις φυκοκολλοειδείς ουσίες, δηλ. σε ζελατινώδεις ουσίες με υψηλό ιξώδες που βρίσκονται όπως προαναφέρθηκε σε ορισμένα θαλάσσια μακροφύκη. Οι ουσίες αυτές που αποτελούν συνήθως το 20-30% της ξηρής βιομάζας των φυκών, εναποτίθενται στα κυτταρικά τοιχώματα, δηλ. αποτελούν μία δομική ομάδα οργανικών ουσιών του κυτταρικού τοιχώματος.

Το άγαρ λαμβάνεται μέσω εκχύλισης από την ξηρή βιομάζα των ροδοφυκών. Η εκχύλιση γίνεται συνήθως με θερμό νερό ή με διάλυμα ανθρακικού ασβεστίου. Τα φυκοκολλοειδή αποτελούν την άμορφη βλεννώδη μάζα του κυτταρικού τοιχώματος, μέσα στην οποία βρίσκονται η βασική στηρικτική δομική ουσία του κυτταρικού τοιχώματος, η κυτταρίνη. Η βλεννώδης αυτή ουσία του κυτταρικού τοιχώματος διαλύεται σχετικά εύκολα σε ζεστό νερό. Με αυτόν τον τρόπο και σε συνδυασμό με αρκετές διηθήσεις και αλλαγές της φυσικής του κατάστασης, καθώς και με κατάλληλο καθαρισμό και ξήρανση το προϊόν γίνεται κατάλληλο για διάφορες χρήσεις.

Η πιο γνωστή ιδιότητά του είναι η δημιουργία ζελατινώδους μάζας, η οποία στερεοποιείται στους 35-50°C και ρευστοποιείται στους 80-100°C.

B. Καραγενάσες

Οι καραγενάσες είναι το γενικό όνομα των πολυσακχαριτών που προέρχονται από συγκεκριμένα είδη φυκών. Η λέξη καρραγενάση παράγεται από την κοινό Ιρλανδικό όνομα για αυτό το φύκος, carrageen (από Ιρλανδική τοποθεσία, πιθανότατα το Carriggen Head στο Co. Donegal, Carrigin, “μικρός βράχος”). Η χρήση αυτού του φύκου για παραγωγή ζελατίνης, είναι γνωστή στην Ιρλανδία από το 1810. Το φύκος *Chondrus crispus* συνήθως ήταν η μοναδική πηγή για καρραγενάσες, αλλά είδη όπως *Cymnogongrus*, *Eucheuma*, *Ahnfeltia* & *Gigartina* είναι τα πλέον κοινά είδη από τα οποία προέρχονται οι καραγενάσες. Περίπου 25.000 τόννοι από καρραγενάσες, παρασκευάζονται βιομηχανικά και παρόλο που το *Chondrus* δεν είναι πια η μοναδική πηγή, είναι ακόμα η κύρια.

Οι μοντέρνες καραγενάσες είναι προϊόντα σχεδιασμένα έτσι ώστε να αναμιγνύονται διάφοροι τύποι από αυτές, ώστε να παραχθεί ζελατίνη με συγκεκριμένες ιδιότητες. Η μεγαλύτερη ποσότητα από το *Chondrus* που χρησιμοποιείται στην βιομηχανία καρραγενάσης, προέρχεται από την θαλασσίνη αποικία του Καναδά (Nova Scotia κ.τ.λ.), όπου περίπου 50.000 υγροί τόννοι από το *Chondrus crispus* συλλέγονται κάθε χρόνο από φυσικούς πληθυσμούς. Η συγκομιδή

πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ζύστρες και βυθοκόρους από μικρές βάρκες. Το μακροφύκος στη συνέχεια ξηραίνεται, είτε απλώνοντάς το να στεγνώσει με τον αέρα είτε χρησιμοποιώντας περιστροφικούς ξηραντήρες και εξάγεται στις Η.Π.Α και στη Δανία για επεξεργασία.

Παρασκευή καραγενάσης

Η καραγενάση όπως και το άγαρ, παρασκευάζεται μέσω εκχύλισης με ζεστό νερό από την ξηρή βιομάζα των προαναφερθέντων φυκών. Το τελικό προϊόν σε καθαρή μορφή λαμβάνεται μετά από διαδοχικές διηθήσεις, λεύκανση και ξήρανση.

2. ΤΑ ΦΥΚΗ ΚΑΙ Η ΙΑΤΡΙΚΗ

A. Μικροφύκη και μακροφύκη

Το μακροφύκος *Laminaria digitata* θεωρείται ότι είναι η πιο ολοκληρωμένη πηγή τροφής σε όλο τον πλανήτη. Περιέχει το κατάλληλο ποσοστό μετάλλων που χρειάζεται το σώμα για να διατηρήσει την καλή του υγεία. Τα μακροφύκη θεωρούνται ότι είναι εκ φύσεως η πιο ολοκληρωμένη και ισορροπημένη διατροφή. Όλα τα μέταλλα, ιχνοστοιχεία, βιταμίνες, αμινοξέα, ένζυμα και ορμόνες βρίσκονται σε αφθονία.

Έτσι το συγκεκριμένο φύκος χρησιμοποιείται σε διάφορα ινστιτούτα για θεραπείες διαφόρων παθήσεων καθώς και αισθητικής. Διάφορα μικρο- και μακροφύκη χρησιμοποιούνται σε διάφορους τύπους για αποτοξίνωση, εξάλειψη της κατακράτησης νερού, έλεγχο του κυκλοφορικού συστήματος, του μεταβολισμού, βελτίωση της ελαστικότητας του δέρματος και τροφοδοτούν με θρεπτικές ουσίες όλα τα εσωτερικά συστήματα του σώματος, μειώνοντας το στρες, και τελικά ισορροπώντας όλο το σύστημα του ανθρώπινου σώματος. Τέλος οι θεραπείες παρέχουν χαλάρωση και βελτιωμένη υφή του δέρματος.

B. Εφαρμογή των ροδοφυκών στην παραδοσιακή Κινέζικη ιατρική

Τα ροδοφύκη είναι χρήσιμα σε προγράμματα αδυνατίσματος και για τη μείωση της χοληστερίνης και του λίπους στο αίμα. Περιλαμβάνουν ζελατινώδεις ουσίες όπως άγαρ και καραγενάσες που συγκεκριμένα τονώνουν τους πνεύμονες και το γαστρεντερικό σύστημα. Το σκληρό κυτταρικό τοίχωμα στα φύκη της οικογένειας Dumontiaceae βρέθηκε ότι είναι ανεκτίμητο. Συγκρατεί βαρέα μέταλλα, φυτοφάρμακα, καρκινογόνους παράγοντες και μεταφέρει αυτές τις τοξίνες με ασφάλεια έξω από το σώμα. Στα κυτταρικά τοιχώματα εμπεριέχονται πολυσακχαρίτες. Αυτές οι μακριές αλυσίδες των πολυσακχαριτών διεγείρουν την παραγωγή της ιντερφερόνης, καθώς επίσης αυξάνουν τη δραστηριότητα για την προστασία του ανοσοποιητικού συστήματος και τη δραστηριότητα για την αποφυγή δημιουργίας όγκων (βελτιώνοντας τη δραστηριότητα των T- και B-λεμφοκυττάρων). Άλλα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος σχετίζονται με αυτά που βρέθηκαν σε «φιλικά» βακτήρια τα οποία ενισχύουν και βελτιώνουν το ανοσοποιητικό μας σύστημα και αντιμετωπίζουν τους οργανισμούς και τις τοξίνες που εισβάλλουν στον οργανισμό μας.

ανοσοποιητικό μας σύστημα και με επιλεκτικότητα δρουν ενισχυτικά στην αντιμετώπιση ιών όπως αυτόν του έρπητα και του Epstein Barr, δράσεις ιδιαίτερα πολύτιμες σήμερα για τον ανθρώπινο οργανισμό.

3. ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΦΥΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

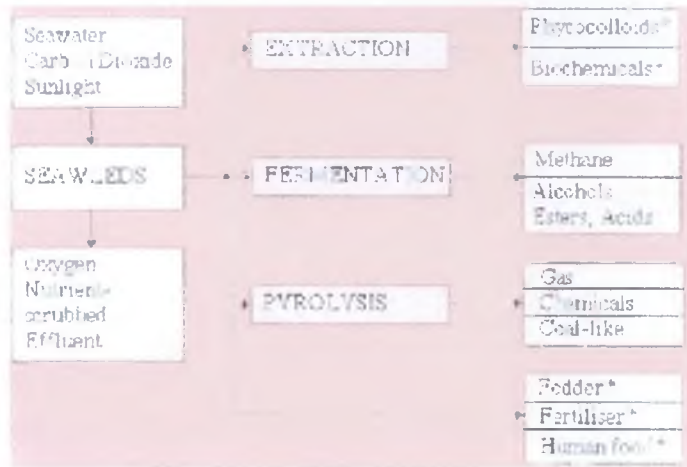


Τα μακροφύκη παίζουν σημαντικό ρόλο στο διαιτολόγιο, στην Ιαπωνία και την Κίνα από το 600 π.Χ. Περισσότερα από 20 είδη χρησιμοποιούνται στην καθημερινή μαγειρική της Ιαπωνίας, 6 από αυτά από τον 8^ο αιώνα. Τα μακροφύκη αναλογούν στο 10% της διαίτας των Ιαπώνων, η κατανάλωση έφτασε κατά μέσο όρο τα 3,5 kg ανά νοικοκυριό το έτος 1973, και μέσα σε 10 χρόνια παρουσιάστηκε μια αύξηση στην κατανάλωση περίπου 20% (Indergaard, 1983). Τα πιο διαδεδομένα στην χρήση είναι τα Nori (είδη *Porphyra*), Kombu (*Laminaria* spp.) και Wakame (*Undaria* spp.).

Εκτός από τους κοινωνικοοικονομικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες που συνετέλεσαν στο να συνηθίσει ο άνθρωπος στις χώρες αυτές να τρέφεται με θαλάσσια φυτική τροφή, σημαντικό ρόλο έπαιξε και η θρεπτική αξία των φυκών. Σε ορισμένες περιπτώσεις η ποσότητα των πρωτεϊνών σε μερικά φαιοφύκη κυμαίνεται σε ποσοστά 20-25% επί του ξηρού βάρους.

Γενικά όμως η κατανάλωση φυκών από τον άνθρωπο θεωρούνταν πριν μερικές δεκαετίες δείκτης χαμηλού βιοτικού επιπέδου. Τα τελευταία όμως χρόνια παρατηρείται σταδιακή αύξηση της κατανάλωσης των φυκών και μάλιστα από κοινωνικά στρώματα με υψηλό βιοτικό επίπεδο. Στη Δύση, τα μακροφύκη θεωρούνται ιδιαίτερα υγιεινή τροφή και με το πέρασμα του χρόνου εμφανίζονται σιγά σιγά στα σύγχρονα διαιτολόγια.

ΓΕΝΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΧΡΗΣΗΣ ΦΥΚΩΝ



Το διάγραμμα παρουσιάζει χημικές ουσίες και σκευάσματα που παράγονται από φύκη (είτε πιθανά ή περιορισμένης χρήσης είτε άμεσα εφαρμόσιμα-αυτά που δηλώνονται με αστερίσκο) ανάλογα με την επεξεργασία που υφίστανται.

Όταν γίνεται εκχύλιση παράγονται Φυκολλοειδή και βιοχημικές ενώσεις. Όταν γίνεται ζύμωση από τα φύκη παράγονται μεθάνιο, αλκοόλες, εστέρες και οξέα. Τέλος από την πυρόλυση παράγονται χημικά, αέριο, τροφές ζώων, ανθρώπινη τροφή και λιπάσματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

CORDERO B. & VOLTOLINA 1997. Viability of mass algal cultures preserved by freezing and freeze -drying **In: Aquacultural engineering 16, 205-211**

DAY J.G. & FENWICK 1993. Cryopreservation of members of the genus *Tetraselmis* used in aquaculture **In: Aquaculture 118, 151-160.**[eds Elsevier Science Publishers B.V.,Amsterdam]

FARFIELD K. Red Marine Algae & Traditional Chinese Medicine At:
<http://www.alphazee.com/a/algae/rma-tcm.html>

MA JING-WEN & TAN WEI-CI 1984. Screening for antimicrobial activities in marine algae from the Qingdao coast, China **In: Hydrobiologia 116/117, 517-520** [eds Dr W.Junk Publishers, Dordrecht. Printed in the Netherlands]

MOREAU J., PESANDO D. & CARAM B. 1984. Antifungal and antibacterial screening of Dictyotales from the French Mediterranean coast **In: Hydrobiologia 116/117,521-524** [eds Dr W.Junk Publishers, Dordrecht. Printed in the Netherlands]

PRINGSHEIM E.G. 1964. Plating methods for making pure cultures. **In: PURE CULTURES OF ALGAE Their Preparation & Maintenance** [eds HAFNER PUBLISHING COMPANY] pp. (117 pages)

REICHELT J.L. & BOROWITZKA M. A. 1984. Antimicrobial activity from marine algae: Results of a large-scale screening programme **In: Hydrobiologia 116/117**

ROBERT W.and HOSHAW 1979. Methods For Mikroskopie Algae. **In: HANDBOOK OF PHYCOLOGICAL METHODS** [eds: Published by the Press Syndicate of the university of Cambridge] pp. (448 pages)

THRONSEN J., 1979. Special methods-micromanipulators **In: HANDBOOK OF PHYCOLOGICAL METHODS** ,[eds Cambridge University Press 1973], pp. (448)