

Τ.Ε.Ι. ΜΕΣΟΛΟΓΓΙΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ - ΑΛΙΕΙΑΣ

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΤΕΙ / Μ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ :

ΜΕΛΕΤΗ
ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ
ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΝΟΣ ΘΑΛΑΣΣΙΝΟΥ ΕΙΔΟΥΣ
ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ CHLORELLA

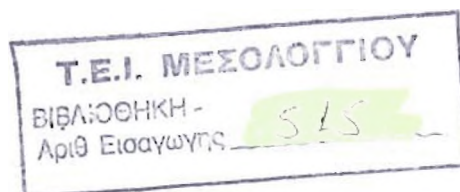
ΤΟΥ ΣΠΟΥΔΑΣΤΗ ΙΩΑΝΝΗ ΚΟΥΝΤΟΥΡΑΚΗ

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ ΘΕΜΑΤΟΣ :

Γ. ΧΩΤΟΣ

ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΤΕΙ / Μ



ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ 1995

ΑΦΙΕΡΩΝΕΤΑΙ ΣΕ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΜΑΘΗΤΕΥΟΜΕΝΟΥΣ ΜΑΓΟΥΣ
(ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΓΡΑΦΟΝΤΟΣ)

Ευχαριστώ

Α - 12 - 85

Μ.Κ.

Ο. ΚΑΡΑΟΛ

Επίσ. Καλύμνου

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΖΕΙ / Μ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	2
1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΓΕΝΟΣ CHLORELLA	
1.1. Ταξινόμηση	3
1.2. Ταυτοποίηση	4
1.3. Εξάπλωση	5
1.4. Δομή	5
1.5. Αναπαραγωγή	6
1.6. Οικονομική σημασία.....	7
2. ΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ	
2.1. Περίληψη.....	8
2.2. Μέθοδος και Υλικά	9
2.3. Αποτελέσματα.....	14
2.4. Συζήτηση.....	15
3. ΕΙΚΟΝΕΣ.....	16
4. ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ - ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ	19
5. ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ	21
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	23

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Καθώς ο ρόλος των Τ.Ε.Ι. είναι να αποτελούν μια γέφυρα ανάμεσα στην έρευνα των Α.Ε.Ι. και την εφαρμογή των ανακαλύψεων στην πράξη, αναζητήθηκε ένα θέμα πτυχιακής εργασίας, που να έχει άμεση πρακτική εφαρμογή. Καθώς η τεχνολογία στη μαζική παραγωγή φυτοπλαγκτού δεν είναι ιδιαίτερα διευρυμένη, αποφασίστηκε το θέμα να αφορά στο φυτοπλαγκτό και συγκεκριμένα ένα πολύ διαδεδομένο γένος, το γένος *Chlorella*. Διερευνώντας το ζήτημα της ανάπτυξης του γένους *Chlorella* σε διαφορετικές αλατότητες, θα προέκυπταν άμεσα οφέλη στην παραγωγή ζωντανής τροφής σε ιχθυογεννητικούς σταθμούς, στη διαχείριση λιμνοθαλασσών (επηρεάζοντας τα είδη του φυτοπλαγκτού που αφθονούν, επηρεάζουμε όλη την τροφική αλυσίδα) και στη διαχείριση μονάδων βιολογικού καθαρισμού λυμάτων.

Η επιλογή όμως του θέματος της πτυχιακής εργασίας είναι το πρώτο μόνο βήμα για την ολοκλήρωσή της. Γι' αυτό οφείλω να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή κ. Γ. Χώτο για την πολύπλευρη βοήθειά του, χωρίς την οποία αυτή η εργασία δεν θα είχε πραγματοποιηθεί ποτέ. Πρέπει να ευχαριστήσω επίσης τους καθηγητές κ. Θ. Βορεινάκη και κ. Δ. Πετρίδη για τη συμπαράστασή τους. Η ανεύρεση βιβλιογραφίας, εργασία χρονοβόρα και επίπονη, έγινε ευκολότερη χάρη στην εξυπηρετικότητα του προσωπικού της βιβλιοθήκης του Ε.Κ.Θ.Ε.

Τέλος, στους αναγνώστες αυτής της εργασίας απευθύνω την παράκληση να μου γνωστοποιήσουν οποιοδήποτε λάθος ή αδυναμία αντιληφθούν.

1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΓΕΝΟΣ CHLORELLA

1.1. Ταξινόμηση

Σύμφωνα με την εύστοχη παρατήρηση του Wynne (1978), "η ταξινόμηση των πράσινων αλγών, όπως και των περισσότερων άλλων κατηγοριών των αλγών διαφοροποιείται ανάλογα με τον ταξινομητή".

Πράγματι, υπάρχουν πολλά διαφορετικά συστήματα ταξινόμησης των αλγών, όπως των Eichler (1886), Pasher (1914), Smith (1933), κ.ά., από τα οποία επιλέχθηκε αυτό του Fritsch (1935) σαν το πιο εύχρηστο και πιο διαδεδομένο:

- Ομοταξία: Chlorophyceae
- Τάξη: Chlorococcales
- Υπόταξη: Autosporineae
- Οικογένεια: Chlorellaceae
- Γένος: Chlorella Beijerinck, 1890

1.2. Ταυτοποίηση

Μια ματιά στη βιβλιογραφία αναδεικνύει πολλά είδη του γένους *Chlorella*:

C. vulgaris, *C. pyrenoidosa*, *C. protothecoides*, *C. ellipsoidea*, *C. vannielli*, *C. sorokiniana*, *C. luteoviridis*, *C. fusca*, *C. nagashima*, *C. variegata*, *C. regularis*, *C. ultrasquamata*, *C. conductrix*, *C. salina*, *C. zofingiensis*, *C. nana*, *C. minutissima*, *C. homosphaera*, *C. kessleri*, *C. saccharophila*, *C. capsulata*, *C. ovalis*, *C. stigmatophora*, *C. spaerkii*, *C. autotrophica*, *C. emersonii*, *C. conglomerata*, *C. terricola*, *C. sphaerica*, *C. virginica*, *C. marina*, *C. parasitica*.

Για την ταυτοποίηση των διαφόρων ειδών του γένους *Chlorella* χρησιμοποιούνται τα εξής στοιχεία αυτόνομα ή συνδυασμένα:

α) Μορφολογία: με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (Fott, Lochhead, Clemenson (1975), Maruyama (1977), Rascio, Casadoro, Andreoli (1980), Kawagushi, Watanabe, Hirata (1986)),

β) Οικολογία: ανάπτυξη σε γλυκό ή θαλασσινό νερό, αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες, pH κ.τ.λ. (Albertano, Taddei (1984), Kessler (1985)),

γ) Χρωμοσώματα: αριθμός, διάταξη, σχήμα κ.τ.λ. (Huss, Wein, Kessler (1988)),

δ) Αντιγόνα: σύγκριση των αντιγόνων των διαφόρων ειδών (Sanders et al. (1971), Maruyama (1977), Kuemmel, Kessler (1980)),

ε) Φυσιολογία: εξάρτηση της ανάπτυξης του είδους από συγκεκριμένες ουσίες, παρουσία διαφόρων ενζύμων, δυνατότητα πρόκλησης διαφόρων χημικών αντιδράσεων κ.τ.λ. (Maruyama (1977), Kessler (1978), Cojocar, Shlosberg, Dubinsky, Finkel (1987), Takeda (1988)),

στ) Αποθήκευση θρεπτικών στοιχείων: άμυλο και έλαια, καθώς και η χημική τους σύσταση (Liersch (1976), Hegewald, Kneifel (1982)).

Πρέπει να επισημανθεί πάντως, ότι, ο αριθμός των ειδών του γένους *Chlorella* δεν έχει ακόμα καθοριστεί επακριβώς, όχι μόνο λόγω ανακαλύψεων νέων ειδών, αλλά και λόγω ανακατατάξεων ορισμένων ειδών σε άλλα γένη (Hindak (1982)), καθώς και λόγω διαπίστωσης ότι, ορισμένα είδη έχουν διπλή ονομασία (Fott, Lochhead, Clemenson (1975), Andreoli, Rascio, Casadoro (1978)).

Εξαιτίας της έλλειψης του απαραίτητου εξοπλισμού, στάθηκε αδύνατο να προσδιοριστεί το είδος που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα, γι' αυτό θα αναφερόμαστε σε αυτό σαν *Chlorella* sp.

1.3. Εξάπλωση

Ορισμένοι ερευνητές αποκαλούν την *Chlorella* "πανταχού παρούσα", γιατί συναντάται σε γλυκό ή θαλασσινό νερό, στάσιμο ή κινούμενο, σε υγρά εδάφη και τοίχους, σε λειχήνες, ακόμα και συμβιωτικά στο εσωτερικό άλλων οργανισμών όπως το *Paramecium*, η *Hydra* και διάφοροι σπόγγοι (Kessler et al. (1968), Lee, Reidy, Kessler (1982), Dunn (1987), Mc Auley (1988)).

1.4. Δομή

Πρόκειται για ένα μονοκύτταρο φυτικό οργανισμό, χωρίς δυνατότητα κίνησης. Τα κύτταρα είναι πολύ μικρά (2-12 μm) με σφαιρικό έως ελλειψοειδές σχήμα. Με εξαίρεση το είδος *C. conglomerata* που σχηματίζει ομάδες από 4 έως 16 κύτταρα, στα άλλα είδη, τα κύτταρα ζουν μεμονωμένα. Περιβάλλονται από ένα λεπτό τοίχωμα κυτταρίνης, που περικλείει ένα πλευρικό χλωροπλάστη σε σχήμα μισοφέγγαρου. Ο χλωροπλάστης διαθέτει συνήθως ένα πυρηνίσκο, ο οποίος δεν είναι πάντα εύκολα ορατός. Τα κύτταρα δεν διαθέτουν μαστίγια, ούτε συσταλτά κενοτόπια, αλλά έχουν έναν εύκολα ορατό πυρήνα. Οι Atkinson et al. (1972) και Dempsey et al. (1980), εξετάζοντας το κυτταρικό τοίχωμα ανέφεραν την παρουσία σποροπολλενίνης, μιας αλκοόλης που δημιουργεί σπόρια ικανά να επιβιώσουν για εκατομμύρια χρόνια.

Μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκάλυψαν ότι, τα κύτταρα της *Chlorella* περικλείονται από τοίχωμα διπλής μεμβράνης. Ο χλωροπλάστης καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του κυττάρου και αποτελείται από μια σειρά φωτοσυνθετικών τόξων. Η πυρηνική μεμβράνη έχει δυό στοιβάδες και είναι πορώδης. Υπάρχουν ακόμα στο κυτταρόπλασμα μιτοχόνδρια, στοιχεία Golgi και κενοτόπια. (Silverberg, Sawa (1974), Andreoli, Rascio, Casadoro (1978, 1980), Lee et al. (1982)).

(Εικ. 1).

1.5. Αναπαραγωγή

Η *Chlorella* αναπαράγεται με αυτοσπóρια. Τα σπóρια αυτά είναι μια μικρογραφία του μητρικού κυττάρου. Δεν έχει αναφερθεί αναπαραγωγή της *Chlorella* με ζωοσπóρια ή γαμέτες.

Κατά το σχηματισμό των αυτοσπορίων, το περιεχόμενο του ώριμου κυττάρου διαιρείται σε 2, 4, 8 και σπάνια 16 θυγατρικούς πρωτοπλάστες που στργγυλοποιούνται και αναπτύσσονται σε μη κινητά σπóρια που ονομάζονται αυτοσπóρια. Τα αυτοσπóρια απελευθερώνονται στο περιβάλλον με διάρρηξη ή διάλυση του κυτταρικού τοιχώματος του μητρικού κυττάρου, και ωριμάζουν σε νέα κύτταρα *Chlorella* (Bisalputra, Weier (1966), Wanka (1968), Griffiths, Griffiths (1969)).

Για την κυτταρική διαίρεση της *Chlorella* είναι απαραίτητη η παρουσία θείου και σε περίπτωση που αυτή γίνεται σε συνθήκες φωτοσύνθεσης, είναι απαραίτητο και άζωτο.

Ο Tamiya (1963) αφού μελέτησε τον κύκλο της ζωής της *Chlorella ellipsoidea* με την τεχνική της σύγχρονης καλλιέργειας, ανέφερε τις ακόλουθες 4 φάσεις στον κύκλο της ζωής της:

- i) Φάση ανάπτυξης, κατά την οποία τα αυτοσπóρια αναπτύσσονται σε μέγεθος, εκμεταλλευόμενα τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης,
- ii) Φάση αρχικής ωρίμανσης κατά την οποία τα κύτταρα προετοιμάζονται για την κυτταρική τους διαίρεση,
- iii) Φάση τελικής ωρίμανσης, κατά την οποία τα κύτταρα διαιρούνται δυο φορές, είτε στο φως, είτε στο σκοτάδι,
- iv) Φάση διαίρεσης, κατά την οποία σπάει το μητρικό κυτταρικό τοίχωμα και απελευθερώνονται τα αυτοσπóρια.

Αντίθετα, ο Hirata (1972) διακρίνει 3 φάσεις στον κύκλο ζωής της *Chlorella*:

- i) Θυγατρικό κύτταρο,
- ii) Φάση αρχικής ωρίμανσης,
- iii) Μητρικό κύτταρο.

Λόγω του ότι, τα αυτοσπóρια διαφέρουν από τα ώριμα κύτταρα μόνο ως προς το μέγεθος, η διάκριση μεταξύ αυτοσπορίων και ώριμων κυττάρων στο πείραμα έγινε υποκειμενικά.

(Εικ. 2, Εικ. 3).

1.6. Οικονομική σημασία

1) Λόγω της ομοιότητας των φωτοσυνθετικών χρωστικών και των θρεπτικών στοιχείων που αποθηκεύει η *Chlorella*, με αυτά των ανώτερων φυτών και λόγω της ευκολίας και της ταχύτητας με την οποία αναπτύσσεται κάτω από μια ποικιλία συνθηκών, χρησιμοποιείται ευρέως σαν κλασσικό υλικό για την μελέτη της φωτοσύνθεσης, της αναπνοής και για άλλα πειράματα φυσιολογίας.

2) Βιοχημικές μελέτες δείχνουν ότι, η *Chlorella* περιέχει υψηλά ποσοστά πρωτεϊνών (περίπου 50%), υδατανθράκων (περίπου 20%) και λιπιδίων (περίπου 20%), όλα τα απαραίτητα αμινοξέα και ανόργανα συστατικά παρόμοια με αυτά του καλαμποκιού.

Επίσης, είναι πλούσια σε βιταμίνες A, B και C. Για όλους αυτούς τους λόγους, χρησιμοποιείται σαν πρόσθετο σε τρόφιμα σε πολλές χώρες όπως στις Η.Π.Α., την Ιαπωνία, τη Γερμανία, το Ισραήλ, το Ηνωμένο Βασίλειο κ.ά., ενώ είναι κοινή πρακτική οι αστροναύτες να τρέφονται με σούπα *Chlorella*. Η μαζική παραγωγή της όμως, για ανθρώπινη διατροφή περιορίζεται από το υψηλό κόστος της καλλιέργειάς της, τη δυνατή μυρωδιά της και μια αίσθηση "ξηράνσης" του λαιμού που προκαλεί. (Pabst (1978), Muzafarov, Taubaev (1983), Endo (1984), Shubert et al. (1985), Richmond (1987)).

3) Χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό του αέρα (ρύθμιση παροχής CO₂ και O₂) σε διαστημόπλοια και πυρηνικά υποβρύχια. (Wharton, Averner (1984)).

4) Η *Chlorella* διαθέτει χλωρενίνη, ένα αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση πολλών μικροβίων (Dhillon, Mulla (1981)).

5) Η *Chlorella* χρησιμοποιείται επίσης στο βιολογικό καθαρισμό λυμάτων. (Dor (1976), Wong (1977), Jampani et al. (1986), Tiwari, Kumar (1986), Semenovich et al. (1987), Hosetti et al. (1988)).

6) Η χλωροφύλλη της *Chlorella* χρησιμοποιείται στη βιομηχανία αποσμητικών.

7) Κατά την εκτροφή γόνου ψαριών ή καρκινοειδών χρησιμοποιείται *Chlorella* είτε απευθείας, είτε σαν βάση για την ανάπτυξη ζωντανής τροφής (π.χ. τροχόζωα). (Meadow, Barrows (1971), Halbach (1972), Hirayama, Ogawa (1972), Hirayama, Watanabe (1973), Hirata (1974), Kersting, Leew-Leegwater (1976), Sick (1976), Moon (1981), Oda, Yamanoi (1984), Yamasaki, Nishihara (1984), Abu-Rezeq, James (1985), Wong, Cheung (1985), Hossain et al. (1988), Wong (1989)).

2. ΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ

2.1. Περίληψη

Στο εργαστήριο καλλιέργειας φυτο-ζωοπλαγκτού του τμήματος Ιχθυοκομίας - Αλιείας του Τ.Ε.Ι. Μεσολογγίου καλλιεργήθηκε αξενικά θαλάσσια *Chlorella* sp. στις αλατότητες των 15 ppt, 20 ppt, 25 ppt και 30 ppt και μελετήθηκε η ανάπτυξή της για ένα διάστημα 13 ημερών. Η ανάπτυξη μετρήθηκε σε κύτταρα/ml.

Σκοπός του πειράματος ήταν να βρεθεί η βέλτιστη αλατότητα για την ανάπτυξη της *Chlorella* sp., καθώς και να διερευνηθεί η τυχόν προτίμησή της για χαμηλότερες ή υψηλότερες αλατότητες. Για την επίτευξη των παραπάνω στόχων επιλέχθηκε ένα αρκετά μεγάλο εύρος αλατότητας που να αγγίζει τα όρια του γλυκού και του θαλασσινού νερού και διαστήματα αρκετά κοντινά ώστε να μπορεί να προσδιοριστεί η βέλτιστη αλατότητα με ικανοποιητική ακρίβεια. Το χρονικό διάστημα των 13 ημερών κρίθηκε αρκετό γιατί περιλαμβάνει τόσο τη φάση της λογαριθμικής ανάπτυξης, όσο και τη φάση της στασιμότητας. (Zarnowski (1972), Fabregas et al. (1987)).

2.2. Μέθοδος και Υλικά

Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν:

- i) κλίβανος αποστείρωσης,
- ii) μικροσκόπιο OLYMPUS CH,
- iii) σαλινόμετρο (διαθλασίμετρο) OGAWA SEIKI OSK 6495,
- iv) αιμοκυττόμετρο FUCHS-ROSENTHAL,
- v) φωτόμετρο,
- vi) θερμόμετρο,
- vii) λάμπες φθορισμού,
- viii) ποτήρια ζέσεως του ενός λίτρου,
- ix) πιπέττες 1ml, 2ml, 10ml, 100ml,
- x) δοκιμαστικοί σωλήνες,
- xi) καλυπτρίδες,
- xii) βαμβάκι,
- xiii) αλουμινόχαρτο,
- xiv) σελοφάν,
- xv) απιονισμένο νερό,
- xvi) τεχνητό αλάτι INSTANT OCEAN R.,
- xvii) πλαστικά σωληνάκια για αερισμό,
- xviii) εστία υγραερίου,
- xix) λαβίδες,
- xx) αυτοκόλλητες ετικέτες.

Δώδεκα ποτήρια ζέσεως του ενός λίτρου γέμισαν με 800 ml απιονισμένου νερού το καθένα. Στη συνέχεια διαλύθηκε σε αυτά τεχνητό αλάτι σε ποσότητες τέτοιες ώστε να σχηματιστούν 4 ομάδες των 3 ποτηριών με αλατότητες ελαφρά χαμηλότερες των 15 ppt, 20 ppt, 25 ppt και 30 ppt. Τα δώδεκα ποτήρια ζέσεως αριθμήθηκαν με αυτοκόλλητες ετικέτες, σκεπάστηκαν με αλουμινόχαρτο και αποστειρώθηκαν στους 120° C για 30 min. Κατόπιν, αφέθηκαν να κρυώσουν, αφαιρέθηκε το αλουμινόχαρτο και προστέθηκε ελάχιστη ποσότητα αποστειρωμένου τεχνητού αλατιού ώστε να φτάσουν ακριβώς στις αλατότητες των 15 ppt, 20 ppt, 25 ppt και 30 ppt σε ομάδες των 3 ποτηριών.

Στη συνέχεια προστέθηκαν τα θρεπτικά στοιχεία. Υπάρχουν πολλές διαφορετικές συνταγές θρεπτικών στοιχείων για την καλλιέργεια της *Chlorella* όπως: του Detmer (1888), του Beijerinck (1898), του De (1939),

του Fogg (1942), του Chu (1943), του Koch (1953), του Myero (1953), του Watanabe (1960), του Kuhl, του Molish, του Leningrad, του Tamiya κ.ά. Η συνταγή που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν του Walne (1966), ελαφρά τροποποιημένη από τον κ. Χώτο, έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο εργαστήριο για μεγάλο διάστημα και περιγράφεται παρακάτω:

1ο Διάλυμα (Μεταλλικά Άλατα)

NaNO_3 : 300 gr

K_2HPO_4 : 30 gr

NH_4Cl : 20 gr

} Διαλύονται σε 1 lt απεσταγμένο νερό.
Το διάλυμα αποστειρώνεται στους 120°C για 30 min.

2ο Διάλυμα (Ιχνοστοιχεία)

Βασικά διαλύματα:

Διάλυμα Α:

$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 30 gr

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 25 gr

$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 30 gr

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 20 gr

} Διαλύονται σε 1 lt απεσταγμένο νερό

Διάλυμα Β:

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 50 gr

Διαλύεται σε 1 lt απεσταγμένο νερό

Διάλυμα Γ :

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 25 gr

Διαλύεται σε 1 lt απεσταγμένο νερό

Διάλυμα Δ :

$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 50 gr

Διαλύεται σε 1 lt απεσταγμένο νερό

Τα διαλύματα Α, Β, Γ, Δ αποστειρώνονται στους 120°C για 30 min.

Τελικό διάλυμα ιχνοστοιχείων:

Διάλυμα Δ: 100 ml από το βασικό διάλυμα

Διάλυμα Α: 10 ml από το βασικό διάλυμα

Διάλυμα Β: 10 ml από το βασικό διάλυμα

Διάλυμα Γ: 10 ml από το βασικό διάλυμα

Προσθέτουμε 800 ml απεσταγμένο νερό.

Το τελικό διάλυμα ιχνοστοιχείων αποστειρώνεται στους 120° C για 30 min.

3ο Διάλυμα (Βιταμίνες)

Βασικά διαλύματα:

B12 : 100 mg σε 1 lt απεσταγμένο νερό

Βιοτίνη: 100 mg σε 1 lt απεσταγμένο νερό

Θειαμίνη: 10 mg σε 1 lt απεσταγμένο νερό

Τα βασικά διαλύματα βιταμινών δεν αποστειρώνονται. Διατηρούνται στο ψυγείο σε σκουρόχρωμες φιάλες.

Τελικό διάλυμα βιταμινών:

B12 : 10 ml από το βασικό διάλυμα

Βιοτίνη: 10 ml από το βασικό διάλυμα

Θειαμίνη: 10 ml από το βασικό διάλυμα

} Διαλύονται σε 1 lt
απεσταγμένο νερό

Για τη λίπανση του νερού των ποτηριών ζέσεως χρησιμοποιήσαμε 1 ml από το κάθε διάλυμα (1ο, 2ο και 3ο) για κάθε 1 lt νερού, δηλαδή 0,8 ml από το κάθε διάλυμα ανά ποτήρι, αφού κάθε ποτήρι περιέχει 0,8 lt νερού.

Ακολούθησε ο εμβολιασμός με *Chlorella* sp. από καθαρή καλλιέργεια που προέκυψε με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων από το απόθεμα του εργαστηρίου υδατοκαλλιεργειών υφαλμύρων υδάτων. Η καθαρή αυτή καλλιέργεια είχε αλατότητα 23 ppt, ώστε να βρίσκεται

στη μέση του εύρους των αλατοτήτων που θα μελετούνταν και να μην δημιουργηθεί "άνιση μεταχείριση" των κυττάρων μιας από τις υπό μελέτη αλατότητες λόγω ωσμωτικού shock και να μην χρησιμοποιηθούν για το πείραμα κύτταρα εγκλιματισμένα στις χαμηλότερες ή υψηλότερες αλατότητες του πειράματος.

Η αρχική αυτή καλλιέργεια είχε πυκνότητα 1950×10^4 κύτταρα/ml. Κάθε ποτήρι ζέσεως εμβολιάστηκε με 1 ml αρχικής καλλιέργειας δίνοντας:

$$\begin{aligned} \text{πυκνότητα εμβολιασμού} &= \\ &= 1950 \times 10^4 \text{ κυτ./ml αρχ. καλ.} \times \frac{1 \text{ ml εμβολιασμού}}{800 \text{ ml εμβολιαζόμενος όγκος}} = 2.4 \times 10^4 \text{ κυτ./ml} \end{aligned}$$

Μετά τον εμβολιασμό, οι καλλιέργειες σκεπάστηκαν με σελοφάν για μείωση της εξάτμισης και απέκτησαν μικρή παροχή αέρα με πλαστικά σωληνάκια για την ανάδυσή τους και την παροχή CO₂. Τοποθετήθηκαν με τυχαία σειρά σε θάλαμο και αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασία 28 +1 °C και συνεχή φωτισμό 6000 LUX (Zarnowski (1972), Fabregas et al. (1987)). Κάθε δεύτερη μέρα ελεγχόταν η αλατότητά τους (λόγω εξάτμισης) και γίνονταν οι διάφορες μικροδιορθώσεις με προσθήκη απιονισμένου, αποστειρωμένου νερού.

Οι καλλιέργειες μετρούνταν καθημερινά με αιμοκυττόμετρο Fuchs-Rosenthal. Το αιμοκυττόμετρο Fuchs-Rosenthal έχει δυό πανομοιότυπες επιφάνειες μέτρησης. Η κάθε μια από αυτές χωρίζεται σε 16 τετράγωνα (4x4), που με τη σειρά τους χωρίζονται σε 16 τετραγωνάκια (4x4). Τα τετράγωνα έχουν πλευρά μήκους 1 mm, άρα τα τετραγωνάκια έχουν πλευρά μήκους 1/4 mm. Τα τετραγωνάκια επομένως έχουν εμβαδόν 1/16 mm². Καθώς το βάθος του αιμοκυττόμετρου Fuchs-Rosenthal είναι 0,2 mm, ο όγκος του δείγματος που καλύπτει κάθε τετραγωνάκι είναι 0.0125 mm³ (0.0125 x 10⁻³ ml). Άρα, ο αριθμός των κυττάρων που μετράμε σε κάθε τετραγωνάκι περιέχεται σε 0.0125 x 10⁻³ ml και πολλαπλασιάζοντας την μέτρησή μας επί 80 x 10³ βρίσκουμε τον αριθμό των κυττάρων που υπάρχουν ανά ml.

Πρέπει να υπογραμμισθεί ότι, μετράμε τα κύτταρα που βρίσκονται μέσα στο τετραγωνάκι χωρίς να ακουμπούν σε καμία πλευρά του, καθώς και αυτά που αγγίζουν την πάνω και την αριστερή πλευρά του, άσχετα αν βρίσκονται μέσα ή έξω από το τετραγωνάκι. Δεν μετράμε όσα κύτταρα αγγίζουν την κάτω και την δεξιά πλευρά του τετραγώνου.

Παράδειγμα:

α) αν μετρήσαμε 28 κύτταρα σε κάποιο τετραγωνάκι έχουμε:

$$28 \times 80 \times 10^3 = 2240 \times 10^3 \text{ κυτ./ml.}$$

β) αν έχει προηγηθεί αραίωση του δείγματος με 4 όγκους νερού ανά όγκο δείγματος ($d = 1/5$) έχουμε:

$$28 \times 80 \times 10^3 \times 5 = 11200 \times 10^3 \text{ κυτ./ml.}$$

Ο τύπος λοιπόν που χρησιμοποιούμε είναι:

$$\frac{n \times 80 \times 10^3}{d} = \text{κυτ./ml}$$

όπου n = η μετρησή μας

d = η αραίωση του δείγματος

Αραίωση του δείγματος χρησιμοποιείται, όταν η πυκνότητα του καθαρού δείγματος υπερβαίνει τα 30 κύτταρα ανά τετραγωνάκι, οπότε οι μετρήσεις δυσκολεύουν.

Για το πείραμά μας μετρούσαμε 10 τετραγωνάκια για κάθε ποτήρι, 5 από κάθε επιφάνεια μέτρησης. Από αυτές τις μετρήσεις έβγαине ο μέσος όρος για το κάθε ποτήρι και από τους μέσους όρους των τριών ποτηριών κάθε ομάδας, ο μέσος όρος της ομάδας.

Για την στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MINITAB και για τη δημιουργία των διαγραμμάτων το HARVARD GRAPHICS.

(Εικ. 4, Εικ. 5, Εικ. 6).

2.3. Αποτελέσματα

Ο έλεγχος τών Kruskal - Wallis έδειξε ότι οι μέσοι όροι όλων των ομάδων για την κάθε ημέρα ήταν ίσοι, σε επίπεδο σημαντικότητας 0.05. Διαπιστώνοντας αυτό, κρίθηκε άσκοπο να ελεγχθούν οι μέγιστες τιμές των καλλιεργειών καθώς και οι ρυθμοί αύξησής τους για αναζήτηση στατιστικώς σημαντικών διαφορών.

Επομένως η *Chlorella* sp. είχε την ίδια ανάπτυξη και στις 4 διαφορετικές αλατότητες που μελετήθηκαν.

Η πυκνότητα των καλλιεργειών έφτασε μέχρι και τα 2.7×10^8 κύτ./ml. Η φάση της λανθάνουσας ανάπτυξης διήρκεσε 3 ημέρες και αυτή της λογαριθμικής ανάπτυξης, άλλες 3. Από την 6η ημέρα οι καλλιέργειες μπήκαν στη φάση της στασιμότητας.

(Μετρήσεις - Στατιστικά, Γραφήματα).

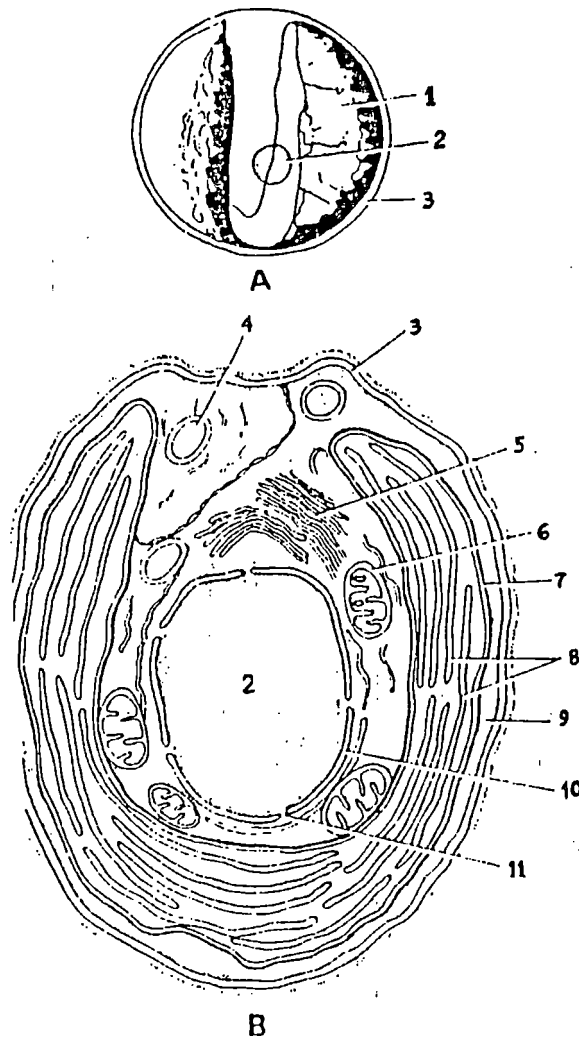
2.4. Συζήτηση

Συγκρινόμενα τα αποτελέσματα του πειράματος με αυτά άλλων εργασιών, προκύπτει ότι, αυτά συμφωνούν με τα αντίστοιχα των Fabregas et al. (1987) και Ahmad, Hellebust (1984). Αντίθετα, οι Ojeda et al. (1985) αναφέρουν ιδανική αλατότητα για την *Chlorella* sp. 18 ppt, ενώ ο Alias (1988) για τη *Chlorella virginica* τα 15 ppt. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι, η προσαρμογή και η ανάπτυξη σε διάφορες αλατότητες εξαρτάται από το είδος της *Chlorella*, ενώ είναι δυνατόν να αναπτυχθούν αλόφιλοι κλώνοι (Kossikou (1972)).

Εξ' άλλου, η τελική πυκνότητα των καλλιεργειών, είναι από τις υψηλότερες που έχουν επιτευχθεί. Παρόμοιες πυκνότητες έχουν αναφέρει μόνο οι Fabregas, Herrero (1986), Semenovich et al. (1987), τη διπλάσια ο Zarnowski (1972) και υποδιπλάσια οι Vonobyeva, Goryunova, Maksimov (1980). Οι Hirata, Murakoshi (1977), Yip, Wong (1978), Nesaratnam et al. (1986), Al-Khars, James (1986), Alias (1988), James et al. (1988), James, Rezeq (1988) έχουν βρει πολύ μικρότερες πυκνότητες. Αυτές οι διαφορές πρέπει να οφείλονται κυρίως στους διαφορετικούς τρόπους καλλιέργειας (Al - Khars, James (1986), Nesaratnam et al. (1986)), στις διαφορετικές συνταγές θρεπτικών στοιχείων (Yip, Wong (1978), James et al. (1988), James, Rezeq (1988)) και στον διαφορετικό φωτισμό (Alias (1988)).

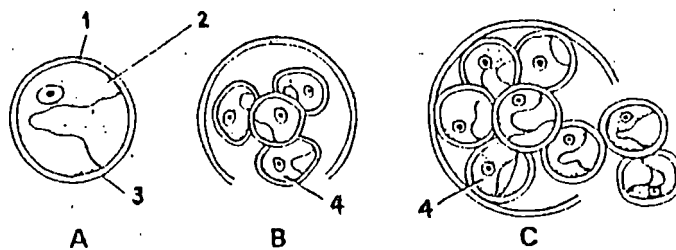
(Μετρήσεις - Στατιστικά, Γραφήματα).

3. ΕΙΚΟΝΕΣ



Εικ. 1. Α. Κύτταρο *Chlorella* στο μικροσκόπιο φωτός (κατά Grintzesco).
 Β. Κύτταρο *Chlorella* στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (σχηματικά) (κατά Bisalputra).

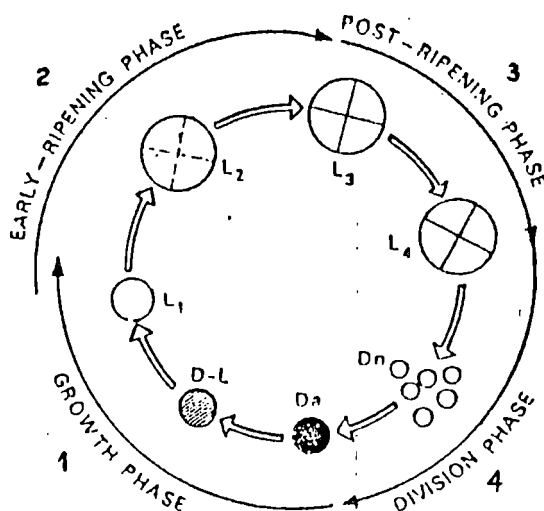
- | | | | |
|---|-------------------|----|----------------------|
| 1 | χλωροπλάστης | 7 | μεμβράνη χλωροπλάστη |
| 2 | πυρήνας | 8 | ακτίνες |
| 3 | κυτταρικό τοίχωμα | 9 | κυτταρόπλασμα |
| 4 | κενοτόπιο | 10 | πυρηνική μεμβράνη |
| 5 | στοιχείο Golgi | 11 | πόρος |
| 6 | μιτοχόνδριο | | (από Sharma (1986)). |



Εικ. 2. Α. Μη αναπαραγώμενο κύτταρο *Chlorella*.
 Β, Γ. Σχηματισμός αυτοσπορίων (κατά Fott και Novakova).

- 1 μη αναπαραγώμενο κύτταρο
- 2 χλωροπλάστης
- 3 κυτταρικό τοίχωμα
- 4 αυτοσπόριο

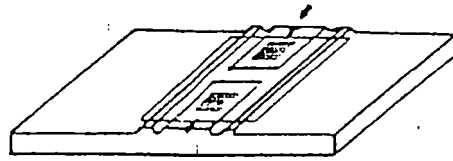
(από Sharma (1986)).



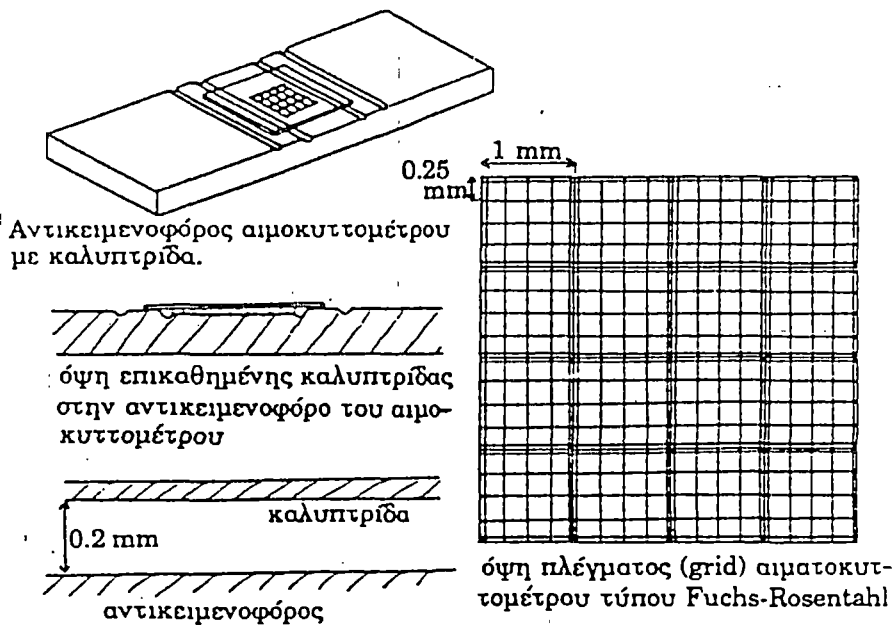
Εικ. 3. Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής της *Chlorella ellipsoidea* (κατά Tamiya).

- 1 φάση ανάπτυξης
- 2 φάση αρχικής ωρίμανσης
- 3 φάση τελικής ωρίμανσης
- 4 διαίρεση

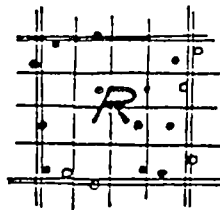
(από Sharma (1986)).



Εικ. 4. Τοποθέτηση δείγματος σε αιμοκυττόμετρο.
(από Χώτο και Ρογδάκη (1992)).



Εικ. 5. Στοιχεία αιμοκυττομέτρου.
(από Χώτο και Ρογδάκη (1992)).



● καταμετρώνται
○ δεν καταμετρώνται

Εικ. 6. Τρόπος μέτρησης σε αιμοκυττόμετρο.
(από Χώτο και Ρογδάκη (1992)).

4. ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ - ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ

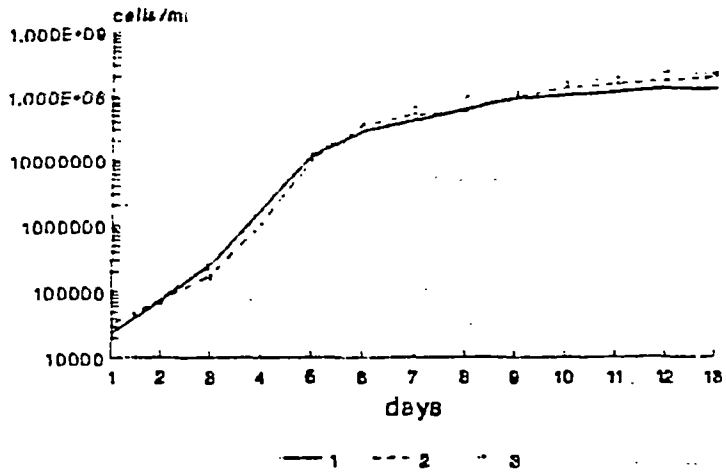
Στον πίνακα που ακολουθεί, παρουσιάζονται, για κάθε ημέρα καλλιέργειας, οι μέσοι όροι των μετρήσεων της συγκέντρωσης των κυττάρων *Chlorella* σε κάθε ποτήρι ζέσεως (κύτταρα x 10000 / ml). Ο τίτλος κάθε στήλης αποτελείται από δυο αριθμούς: ο πρώτος δείχνει την ημερομηνία που έγιναν οι μετρήσεις και ο δεύτερος την αλατότητα της κάθε ομάδας των ποτηριών.

π.χ. η στήλη με τον τίτλο 30-15 έχει τις μετρήσεις της 30 / 7 / 1991 από τα 3 ποτήρια ζέσεως με αλατότητα 15 ppt.

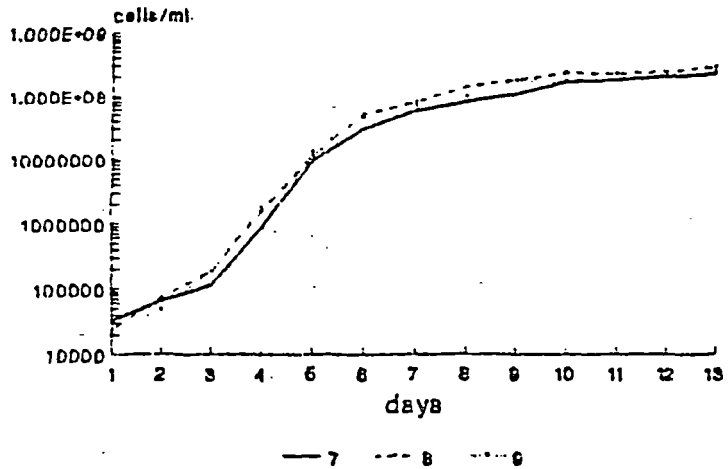
ROW	30-15	30-20	30-25	30-30	31-15	31-20	31-25	31-30	1-15	1-20
1	2.4	2.4	3.2	2.4	7.2	7.2	6.4	7.2	24.8	12.0
2	3.2	2.4	2.4	2.4	7.2	5.6	7.2	6.4	17.6	23.2
3	2.4	2.4	2.4	2.4	6.4	7.2	4.8	8.8	15.2	24.8
ROW	1-25	1-30	2-15	2-20	2-25	2-30	3-15	3-20	3-25	
1	11.2	13.6	162.4	100.0	85.6	137.6	1106.0	1046.4	904.8	
2	17.2	9.6	100.0	176.8	151.2	90.4	924.0	1291.6	1120.8	
3	18.4	14.4	166.4	183.2	180.8	147.2	1176.0	1608.0	1317.6	
ROW	3-30	4-15	4-20	4-25	4-30	5-15	5-20	5-25		
1	1010.4	2780.8	3300.0	2712.8	2772.0	3764.8	5661.6	5672.4		
2	724.8	3335.2	3795.2	5077.6	2980.8	4956.0	7106.4	7576.8		
3	1204.8	3669.6	4320.8	4312.0	3796.8	6333.6	5157.6	6703.2		
ROW	5-30	6-15	6-20	6-25	6-30	7-15	7-20			
1	5157.6	5871.2	6572.8	7576.8	7609.6	8776.0	9714.4			
2	5443.2	5477.6	9249.6	13448.0	8429.6	9588.0	14116.8			
3	6636.0	9151.2	7117.6	9282.4	11217.6	11260.8	8200.8			
ROW	7-25	7-30	8-15	8-20	8-25	8-30	7-15			
1	10322.4	12911.2	9707.5	12140.2	16373.0	15117.1	11162.4			
2	17752.0	9751.2	12884.5	17535.8	22512.9	15117.1	14503.5			
3	17544.0	14239.2	15024.1	12465.8	16931.2	17256.8	17954.5			
ROW	9-20	9-25	9-30	10-15	10-20	10-25	10-30			
1	14372.9	17721.9	14652.0	12931.0	14000.8	17708.1	16419.5			
2	19303.4	21769.7	14977.6	16698.6	19163.7	23210.6	17475.5			
3	11163.4	16838.2	14233.4	21815.2	12372.8	20791.9	16419.5			
ROW	11-15	11-20	11-25	11-30						
1	12415.3	16093.8	21675.7	15442.7						
2	19024.3	19149.6	27350.4	20326.7						
3	21210.5	16233.5	23071.1	17675.4						

	N	MEAN	STDEV	SE MEAN	95.0 PERCENT C.I.
30-15	3	2.667	0.462	0.267	(1.519, 3.814)
30-20	3	2.40000	0.00000	0.00000	(2.40000, 2.40000)
30-25	3	2.667	0.462	0.267	(1.519, 3.814)
30-30	3	2.40000	0.00000	0.00000	(2.40000, 2.40000)
31-15	3	6.933	0.462	0.267	(5.786, 8.081)
31-20	3	6.667	0.924	0.533	(4.372, 8.961)
31-25	3	6.133	1.222	0.706	(3.098, 9.169)
31-30	3	7.467	1.222	0.706	(4.431, 10.502)
1-15	3	19.20	5.00	2.88	(6.79, 31.61)
1-20	3	20.00	6.97	4.03	(2.68, 37.32)
1-25	3	16.27	4.41	2.54	(5.32, 27.21)
1-30	3	12.53	2.57	1.48	(6.15, 18.92)
2-15	3	142.9	37.2	21.5	(50.4, 235.4)
2-20	3	160.0	52.4	30.3	(29.8, 290.2)
2-25	3	139.2	48.7	28.1	(18.2, 260.2)
2-30	3	125.1	30.4	17.6	(49.5, 200.6)
3-15	3	1062.8	130.1	75.1	(745.5, 1392.1)
3-20	3	1312.00	282.03	162.83	(611.37, 2012.60)
3-25	3	1114.40	206.47	119.21	(601.49, 1627.31)
3-30	3	980.000	241.440	139.395	(360.231, 1579.770)
4-15	3	3261.83	448.67	259.15	(2146.78, 4376.89)
4-20	3	3872.00	521.43	301.05	(2576.69, 5167.31)
4-25	3	4100.80	1097.74	633.78	(1373.85, 6827.75)
4-30	3	3183.20	541.55	312.66	(1637.91, 4528.49)
5-15	3	5084.80	1189.64	686.84	(2129.57, 8040.03)
5-20	3	5975.20	1011.54	584.01	(3462.39, 8488.01)
5-25	3	6652.80	950.20	548.60	(4292.36, 9013.23)
5-30	3	5745.60	784.22	452.77	(3797.49, 7673.71)
6-15	3	6833.33	2016.96	1164.49	(1822.94, 11843.73)
6-20	3	7653.33	1407.09	812.38	(4157.93, 11148.74)
6-25	3	10102.4	3020.3	1743.8	(2599.6, 17605.2)
6-30	3	9085.60	1891.34	1091.97	(4387.25, 13783.95)
7-15	3	9941.60	1182.73	682.85	(7003.53, 12879.67)
7-20	3	10744.0	3044.0	1757.5	(3182.3, 18305.7)
7-25	3	15272.8	4292.0	2478.0	(4610.6, 25934.6)
7-30	3	12267.2	2292.9	1323.8	(6571.3, 17963.1)
8-15	3	12605.4	2559.7	1483.6	(6221.9, 18988.6)
8-20	3	14047.3	3025.5	1746.8	(6531.4, 21563.1)
8-25	3	18605.7	3395.2	1966.2	(10171.5, 27039.9)
8-30	3	15830.3	1235.4	713.2	(12761.5, 18699.1)
9-15	3	14574.5	3395.7	1966.5	(6139.2, 23009.7)
9-20	3	14946.6	4100.2	2367.3	(4761.1, 25132.1)
9-25	3	18776.3	2628.9	1517.8	(12245.7, 25306.9)
9-30	3	14621.0	373.1	215.4	(13674.3, 15547.7)
10-15	3	17148.3	4459.1	2574.5	(6071.2, 28225.4)
10-20	3	15179.2	3345.6	2047.0	(6371.4, 23986.5)
10-25	3	21303.5	1709.7	967.1	(17056.5, 25550.5)
10-30	3	17504.8	1879.9	1085.3	(12835.0, 22174.6)
11-15	3	17551.4	4576.9	2642.5	(6181.6, 28921.1)
11-20	3	17159.0	1725.3	996.1	(12673.1, 21444.9)
11-25	3	24032.4	2957.0	1707.2	(16686.7, 31377.9)
11-30	3	17814.9	2445.0	1411.6	(11741.2, 23888.6)

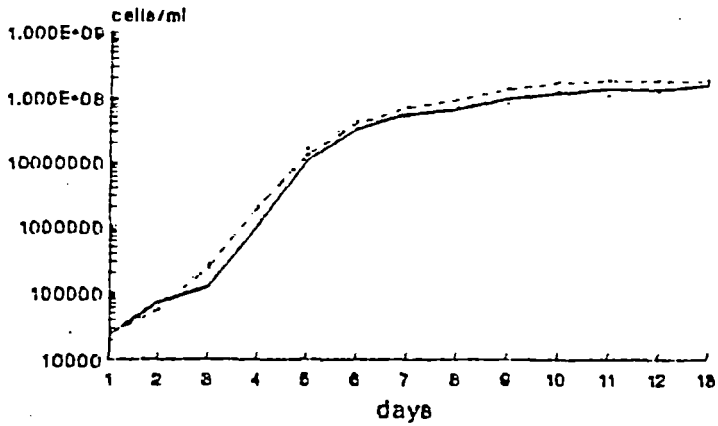
5. ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ



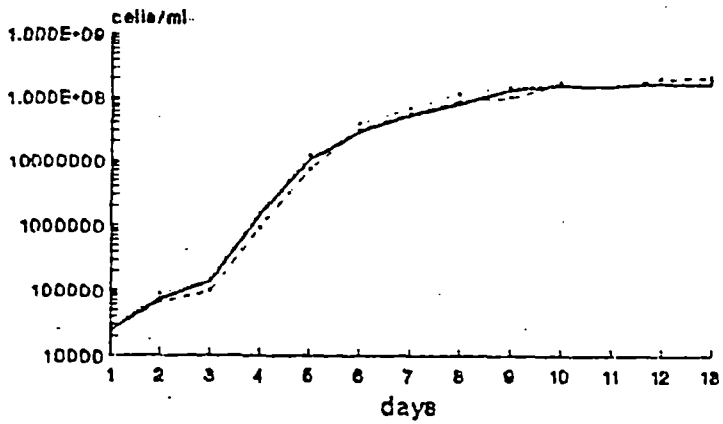
Γράφ. 1. Καμπύλη ανάπτυξης καλλιέργειας Chlorella σε αλατότητα 15 ppt.
(Συγκέντρωση κυττάρων / ml).



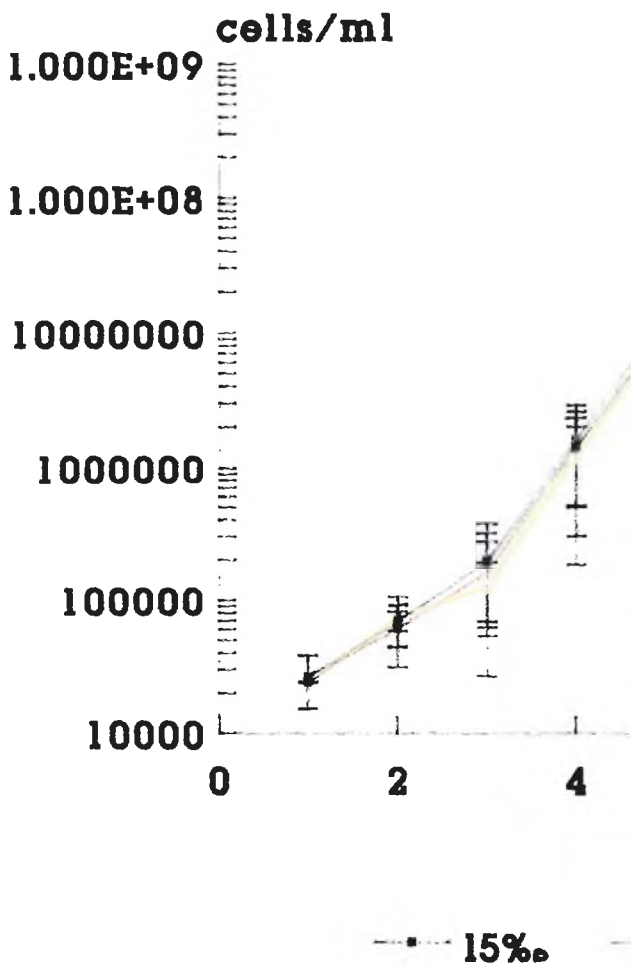
Γράφ. 3. Καμπύλη ανάπτυξης καλλιέργειας Chlorella σε αλατότητα 25 ppt.
(Συγκέντρωση κυττάρων / ml).

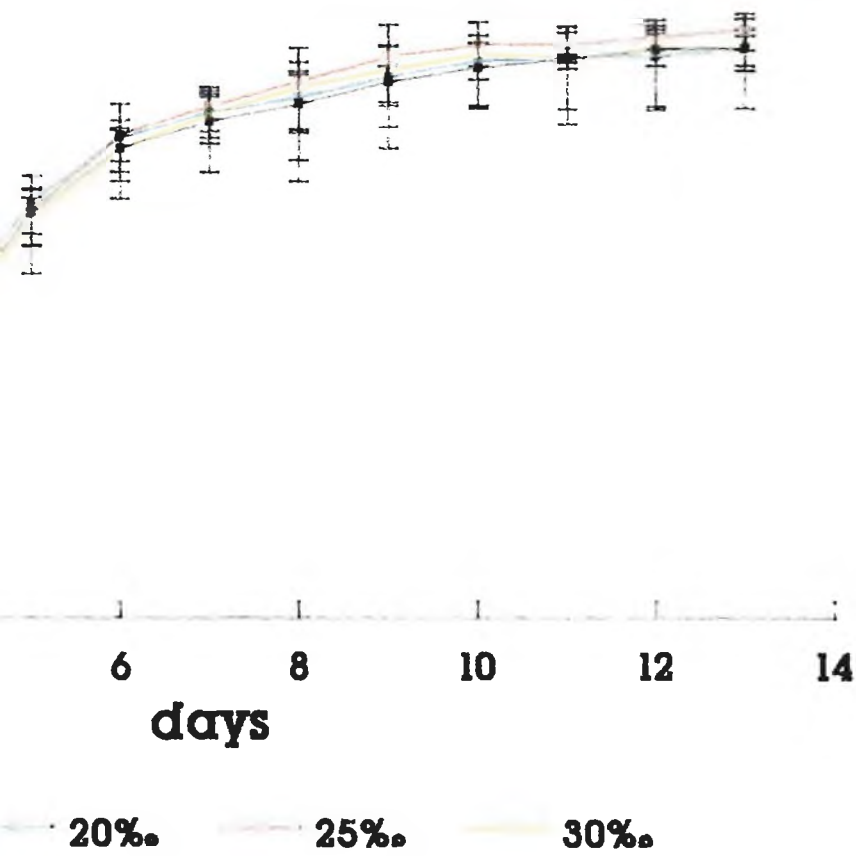


Γράφ. 2. Καμπύλη ανάπτυξης καλλιέργειας *Chlorella* σε αλατότητα 20 ppt.
(Συγκέντρωση κυττάρων / ml).



Γράφ. 4. Καμπύλη ανάπτυξης καλλιέργειας *Chlorella* σε αλατότητα 30 ppt.
(Συγκέντρωση κυττάρων / ml).





6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahlgren G., L. Lundstedt, M. Brett, C. Forsberg (1990). Lipid composition and food quality of some freshwater phytoplankton for cladoceran zooplankters. *J. of Plankton Research* 12-4, 809-818.
- Ahmad I., J.A. Hellebust (1984). Osmoregulation in the extremely euryhaline marine microalga *Chlorella autotrophica*. *Plant Physiol.* 74-4, 1010-1015.
- Bednarz T., M. Nowak (1972). The selection of algae for mass culture purposes. *Acta Hydrobiol.* 14-1, 1-18.
- Campbell R. C. (1989). *Statistics for Biologists*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Fabregas J., C. Herrero (1986). Marine microalgae as a potential source of minerals in fish diets. *Aquaculture* 51, 237-243.
- Fabregas J., C. Herrero, B. Cabezas, J. Abalde (1987). Growth and biochemical variability of the marine microalga *Chlorella stigmatophora* in batch cultures with different salinity and nutrient gradient concentration. *Br. Phycol. J.* 22, 269-276.
- Gupta J. S. (1981). *Textbook of Algae*. Tata McGraw-Hill Publishing Company Ltd., New Delhi.
- Henry E. C. (1987). Algal Cultures. In, C. S. Lobban, D. J. Chapman, B. P. Kremer (eds.) *Experimental Phycology: A Laboratory Manual*. Cambridge University Press, Cambridge, 7-15.
- Χώτος Γ., Ι. Ρογδάκης (1992). *Υδατοκαλλιέργειες Ευρύαλων Ψαριών*. Ιων, Αθήνα.
- James C. M., S. Al - Hinty, A. E. Salman (1989). Growth and ω 3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. *Aquaculture* 77, 337-351.
- Kirst G.O. (1987). Organic Osmotica: Their role as "compatible solutes" in response to salinity. In C. S. Lobban, D. J. Chapman, B. P. Kremer (eds.) *Experimental Phycology: A Laboratory Manual*. Cambridge University Press, Cambridge, 210-216.

- Kirst G. O. (1987). Accumulation of organic compounds with increasing salinity: mannitol accumulation in the unicellular phytoplankter *Platymonas*. In C. S. Lobban, D. J. Chapman, B. P. Kremer (eds.) *Experimental Phycology: A Laboratory Manual*. Cambridge University Press, Cambridge, 217-223.
- Kirst G. O. (1987). The contractile vacuole as an osmoregulatory organelle. In C. S. Lobban, D. J. Chapman, B. P. Kremer (eds.) *Experimental Phycology: A Laboratory Manual*. Cambridge University Press, Cambridge, 224-227.
- Kossikov K. V. (1972). Methods for the production of the effective strain of *Chlorella* sp. K. *Microbiologia* 41-4, 680-685.
- Lobban C. S. (1987). Writing a laboratory report. In C. S. Lobban, D. J. Chapman, B. P. Kremer (eds.) *Experimental Phycology: A Laboratory Manual*. Cambridge University Press, Cambridge, 1-6.
- Nematipour G. R., H. Nakagawa, K. Nanba, S. Kasahara, A. Tsujimura, K. Akira (1987). Effect of *Chlorella*-extract supplement to diet on lipid accumulation of ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi*.
- Ojeda A., A. Alfonso, D. Sacristan (1985). Effects of salinity, light and temperature on the growth of the phytoplanktonic algae *Chlorella* sp. *Inf. Tec. Inst. Esp. Oceanogr.* 29, 43-54.
- Πετριδης Δ. (1988). Σημειώσεις Βιομετρίας II , Μεσολόγγι.
- Prescott G.W. (1984). *The Algae: A Review*.
- Schoen S. (1987). Cell Counting. In C. S. Lobban, D. J. Chapman, B. P. Kremer (eds.) *Experimental Phycology: A Laboratory Manual*. Cambridge University Press, Cambridge, 16-22.
- Sharma O. P. (1986). *Textbook of Algae*. Tata McGraw-Hill Publishing Company Ltd., New Delhi.
- Spectorova C. V., C. P. Nosova, O. I. Goronkova, O. N. Albitskaya, Yu. N. Fillipovskij (1986). High density culture of marine microalgae - Promising items for mariculture. II. Determination of optimal light regime for *Chlorella* sp. f. *marina*, under high-density culture conditions. *Aquaculture* 55, 221-229.
- Veber K., V. Votapek, K. Livanskiy, Ya. Zagradnik, B. Prokesh (1984). Growth of *Chlorella vulgaris* in wastewater. In *Sanitary Hydrobiology and Hydroparasitology*. Scripta Publishing Co., 32-40.
- Yip S., M. Wong (1978). The comparison of sewage effluents and sludge extract in the cultivation of *Chlorella pyrenoidosa*. *Acta Hydrobiol.* 84-3, 368-380.

Zarnowski J. (1972). The effect of ethylenediaminetetraacetic acid on the growth of *Chlorella pyrenoidosa* and its role in the dynamics of metabolism and accessibility of iron and calcium. *Acta Hydrobiol.* 14-4, 353-373.

Zarnowski J. (1972). Effect of the chemical composition of the medium on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *Acta Hydrobiol.* 14-3, 215-223.