

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΛΙΕΙΑΣ ΚΑΙ  
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

(πρώην Τμήμα Τεχνολογίας Αλιείας –Υδατοκαλλιέργειών)

Πτυχιακή Εργασία

Καρακαλπάκη Ευστάθιου

Σταγάκη Μαρίας

Τύρου Λυδίας Αναστασίας



Εισηγητής: Γεώργιος Χώτος, καθηγητής

Συγκριτική με άλλα μικροφύκη καλλιέργεια του  
αλοανθεκτικού χλωροφύκου *Asteromonas gracilis* και  
χρήση του ως θρεπτικό υπόστρωμα ηθμοφάγων  
οργανισμών.

Μεσολόγι 2020

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	4
Ευχαριστίες .....	4
Εισαγωγή .....	5
Θεωρητικό Υπόβαθρο.....	7
<i>Πράσινα φύκη</i> .....	9
<i>Διάτομα</i> .....	9
<i>Κόκκινα φύκη</i> .....	10
<i>Καστανά φύκη</i> .....	10
Χρήσεις των καλλιεργούμενων φυκών .....	10
Φωτοσύνθεση .....	10
Προϋποθέσεις φωτοσύνθεσης .....	11
Φυσικοχημικές παράμετροι καλλιέργειας μικροφυκών .....	12
Αναπαραγωγή.....	12
Ποσοτικός υπολογισμός φυτοπλαγκτονικού πληθυσμού.....	14
Καταμέτρηση αριθμού κυττάρων.....	16
Βιολογικά στοιχεία των χρησιμοποιηθέντων οργανισμών .....	17
<i>Fabrea salina</i> .....	17
<i>Asteromonas gracilis</i> .....	20
<i>Tetraselmis suecica</i> .....	21
<i>Isochrysis galbana</i> .....	23
<i>Rhodomonas salina</i> .....	24
<i>Brachionus plicatilis</i> .....	25
<i>Tisbe sp.</i> .....	29
Υλικά και Μέθοδοι .....	30
1 <sup>ο</sup> πείραμα .....	30
Πείραμα αλληλοπάθειας μικτής καλλιέργειας φυτοπλαγκτού .....	30
2 <sup>ο</sup> πείραμα .....	35
Επίδραση διαφορετικών φυκών ως τροφή στην αύξηση του πληθυσμού ετερότροφων οργανισμών. ....	35
Αποτελέσματα.....	37
Αποτελέσματα 1 <sup>ο</sup> πειράματος .....	37
Αποτελέσματα 2 <sup>ο</sup> πειράματος .....	41

Εξέλιξη αριθμού πυκνοτήτων .....	41
.....	42
Ξεχωριστή απόδοση .....	45
Πίνακες λογιστικού προγράμματος past.....	52
Συζήτηση.....	55
Βιβλιογραφία .....	60

## Περίληψη

Η πτυχιακή μας εργασία αφορά μία προσπάθεια συγκριτικής μελέτης του αλοανθεκτικού μικροφύκου *Asteromonas gracilis* με άλλα φύκη και χρήση των ως θρεπτικό υπόστρωμα σε 3 ηθμοφάγους οργανισμούς. Σαν σκοπό έχει την παρατήρηση και καταγραφή της αλληλοπάθειας σε μείγμα μικροφυκών που επiléχθησαν καθώς και με τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν μεταξύ δύο διαφορετικών αλατοτήτων (35 και 50ppt) και σε θρεπτικό υπόστρωμα 3 διαφορετικών μικροφυκών, τις πληθυσμιακές αυξήσεις τριών ετερότροφων ηθμοφάγων οργανισμών χρήσιμων ή δυνητικώς χρήσιμων για τις λαρβοκαλλιέργειες.

Και τα δύο πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, Αλιείας και Υδατοκαλλιεργειών, στο εργαστήριο Καλλιέργειες Πλαγκτού. Όσον αφορά το πρώτο πείραμα η μεθοδολογία που ακολουθήσαμε είναι αρκετά απλή. Αφού πραγματοποιήθηκαν όλες οι απαραίτητες ενέργειες για το σωστό ξεκίνημα καλλιέργειών μικροφυκών, τοποθετήσαμε στις κωνικές φιάλες των 250 ml, 20ml φύκος, 4 διαφορετικά είδη. Επίσης δημιουργήσαμε σε 2 κωνικές φιάλες των 500ml μείγματα μικροφυκών για την παρατήρηση της αλληλοπάθειας μεταξύ των. Κατά το δεύτερο πείραμα η μεθοδολογία που ακολουθήσαμε είναι λίγο περισσότερο περίπλοκη σε σχέση με το πρώτο πείραμα. Σε κάθε τετραγωνάκι τοποθετήθηκαν 2ml αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και με ειδικά τροποποιημένη πιπέτα τοποθετήσαμε 2-3 οργανισμούς μετρώντας τα πάντα για την σωστή μετέπειτα καταμέτρηση τους σε διάστημα 5 συνολικών ημερών.

Στην παρούσα εργασία προσπαθήσαμε να καταγράψουμε την συμπεριφορά του εξεταζόμενου χλωροφύκου *Asteromonas gracilis* όταν καλλιεργείται αναμειγμένο με άλλα μικροφύκη. Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 26 υπήρχε η παρουσία έντονων διακυμάνσεων στην πυκνότητα των κυττάρων και μικρή σχετικά τελική πυκνότητα (~96.000κυτ/ml). Αξιοσημείωτο θα ήταν να αναφέρουμε πως και στις 2 συνθέσεις μίγματος 3 μικροφυκών δεν επικράτησε σε καμία από τις 2. Στην περίπτωση της *Fabrea* η διαφορά ήταν εντυπωσιακή με σχεδόν 15πλάσια απόδοση σε άτομα στην αλατότητα των 50ppt έναντι στην αλατότητα των 35ppt. Επίσης παρουσιάστηκε στατιστική ομοιότητα και για την κάθε μία από τις χρησιμοποιηθείσες τροφές μεταξύ των 2 αλατοτήτων. Η *Asteromonas* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θρεπτικό υπόστρωμα για την καλλιέργεια των ηθμοφάγων οργανισμών.

## Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής μας εργασίας θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε όσους προσέφεραν την πολύτιμη βοήθειά τους καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής της διαδικασίας και εκπόνησής της.

Κατά αρχήν οφείλουμε να αποδώσουμε τις ευχαριστίες μας στον επιβλέποντα καθηγητή μας, κ. Χώτο Γεώργιο για την πολύτιμη βοήθειά του καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος με τις απαραίτητες και πολύτιμες γνώσεις του πάνω στο θέμα, την

υποστήριξή του, την υπομονή, την επιμονή όπως και την βοήθειά του στις όποιες απορίες μας δημιουργήθηκαν κατά την διάρκεια της συγγραφής της. Επίσης τον ευχαριστούμε θερμά για το φωτογραφικό υλικό που μας προμήθευσε και για τα συγγράματα τα οποία επιμελήθηκε και δημιούργησε ο ίδιος στα ελληνικά.

Ευχαριστίες θα πρέπει να αποδώσουμε και στην κ. Αβραμίδου Δέσποινα για την πολύτιμη και άμεση ανταπόκρισή της κατά την πειραματική διαδικασία η οποία προσέφερε απλόχερα την βοήθειά της σε ότι χρειαστήκαμε.

Τέλος θα πρέπει να ευχαριστήσουμε όλο το προσωπικό του Ιδρύματος που εργάζεται καθημερινά στην αφάνεια καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά του σε ότι απορίες είχαμε κατά την διάρκεια των αιτήσεων που έπρεπε να πραγματοποιηθούν.

## Εισαγωγή

Υπάρχουν πολλές ιστορικές αναφορές χρήσης φυκών στην ανθρώπινη διατροφή, οι παλαιότερες των οποίων τοποθετούν τη χρήση των φυκών περί το 2700 π.Χ. στην Κίνα. Στην Αφρική, για αιώνες, τοπικοί πληθυσμοί στη Λίμνη Chad συνέλεξαν και χρησιμοποιούσαν σαν καθημερινή τροφή το κυανοβακτήριο σπιρουλίνα, γνωστό στην τοπική διάλεκτο ως “dihé”. Οι γυναίκες της φυλής Kanembu ακόμη συλλέγουν σε καθημερινή βάση την επιπλέον βιομάζα των κυανοβακτηρίων στη Λίμνη Kossorom.

Η βιομάζα αποξηραίνεται στον ήλιο και χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη για την παρασκευή πιάτων όπως σάλτσες λαχανικών και ζωμοί κρέατος. Οι Αζτέκοι χρησιμοποιούσαν τον 13ο αιώνα μ.Χ., στην άλλη άκρη του Ατλαντικού Ωκεανού, κυανοβακτήρια του ίδιου γένους που συνέλεξαν από τη λίμνη Texcoco στο Μεξικό. Ισπανοί ιστορικοί περιγράφουν ψαράδες να συλλέγουν τη βιομάζα των κυανοβακτηρίων από τις λίμνες και να τη χρησιμοποιούν για την παρασκευή ενός είδους πίτας, γνωστή ως “tecuitlatl”. Άλλες ιστορικές πηγές αναφέρονται στις συναλλαγές Ινδιάνων της νότιας Αμερικής με κατοίκους παράκτιων περιοχών. Οι Ινδιάνοι πλήρωναν με χρυσό τα μακροφύκη καθώς τα χρησιμοποιούσαν για ιαματικούς σκοπούς, κυρίως για την αντιμετώπιση ασθενειών του θυρεοειδούς αδένου (1).

Τα μικροφύκη είναι μικροσκοπικά φύκη, που συνήθως απαντώνται σε συστήματα γλυκού νερού και θαλάσσης που ζουν τόσο στην επιφάνεια του νερού όσο και στο βυθό. Είναι μονοκύτταρα είδη που υπάρχουν ξεχωριστά, ή σε αλυσίδες ή ομάδες. Ανάλογα με το είδος, τα μεγέθη τους μπορεί να κυμαίνονται από μερικά

μικρόμετρα (μm) έως μερικές εκατοντάδες μικρόμετρα. Σε αντίθεση με τα ανώτερα φυτά, τα μικροφύκη δεν έχουν ρίζες, στελέχη ή φύλλα. Είναι ειδικά προσαρμοσμένα σε ένα περιβάλλον που κυριαρχείται από ιξώδεις δυνάμεις.

Τα μικροφύκη, είναι ικανά να φωτοσυνθέτουν, και είναι σημαντικά για τη ζωή στη γη, παράγουν περίπου το ήμισυ του ατμοσφαιρικού οξυγόνου και ταυτόχρονα καταναλώνουν το διοξείδιο του άνθρακα. Τα μικροφύκη, μαζί με τα βακτήρια, αποτελούν τη βάση του ιστού των τροφίμων και παρέχουν ενέργεια σε όλα τα τροφικά επίπεδα πάνω από αυτά. Η βιομάζα μικροφυκών συχνά μετριέται με συγκεντρώσεις χλωροφύλλης και μπορεί να παράσχει ένα χρήσιμο δείκτη δυνητικής παραγωγής. Το σταθερό απόθεμα των μικροφυκών είναι στενά συνδεδεμένο με αυτό των αρπακτικών τους. Χωρίς τις πιέσεις της βόσκησης το σταθερό απόθεμα των μικροφυκών μειώνεται δραματικά (2).

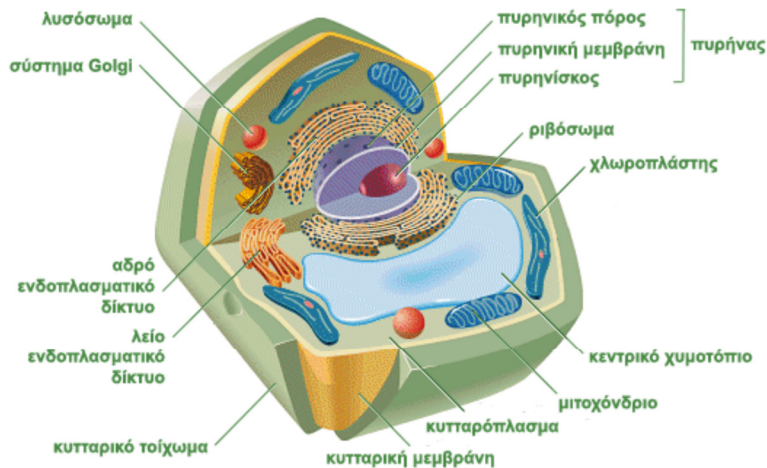
Η βιοποικιλότητα των μικροφυκών είναι τεράστια και αντιπροσωπεύουν έναν σχεδόν αναξιοποίητο πόρο. Έχει εκτιμηθεί ότι υπάρχουν περίπου 200.000-800.000 είδη σε πολλά διαφορετικά γένη από τα οποία περιγράφονται περίπου 50.000 . Πάνω από 15.000 νέες ενώσεις που προέρχονται από βιομάζα φυκών έχουν προσδιοριστεί χημικά. Τα περισσότερα από αυτά τα είδη μικροφυκών παράγουν μοναδικά προϊόντα όπως τα καροτενοειδή, τα αντιοξειδωτικά, τα λιπαρά οξέα, τα ένζυμα, τα πολυμερή, τα πεπτίδια, τις τοξίνες και τις στερόλες.

Η χημική σύνθεση των μικροφυκών δεν είναι ένας εγγενής σταθερός παράγοντας αλλά ποικίλλει σε μεγάλο εύρος, ανάλογα με το είδος και τις συνθήκες καλλιέργειας. Ορισμένα μικροφύκη έχουν την ικανότητα να εγκλιματίζονται σε αλλαγές στις περιβαλλοντικές συνθήκες μεταβάλλοντας τη χημική τους σύνθεση ως απάντηση της περιβαλλοντικής μεταβλητότητας. Ένα παράδειγμα τέτοιας συμπεριφοράς είναι η ικανότητά τους να αντικαθιστούν τα φωσφολιπίδια με λιπίδια μη-φωσφορούχου μεμβράνης σε περίσσεια φωσφόρου. Είναι δυνατή η συσσώρευση των επιθυμητών προϊόντων σε μικροφύκη σε μεγάλο βαθμό με την αλλαγή περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως η θερμοκρασία, ο φωτισμός, το pH, η παροχή CO<sub>2</sub>, το αλάτι και τα θρεπτικά συστατικά.

Τα μικροφύκη, αποτελούν το βασικό τρόφιμο για πολλά είδη υδατοκαλλιέργειας. Τα φωτοσυνθετικά και χημειοσυνθετικά μικρόβια μπορούν επίσης να σχηματίσουν συμβιωτικές σχέσεις με οργανισμούς-ξενιστές (3).

## Θεωρητικό Υπόβαθρο

Το φυτικό κύτταρο περιβάλλεται από εύκαμπτη κυτταρική μεμβράνη, στην εξωτερική επιφάνεια της οποίας υπάρχει το κυτταρικό τοίχωμα το οποίο είναι μια άκαμπτη δομή που δίδει σταθερό σχήμα στο κύτταρο. Βασικό συστατικό του τοιχώματος αυτού είναι η κυτταρίνη. (23)



Σχήμα 1 Το φυτικό κύτταρο και τα διάφορα μέρη του. (από Hotos, 2016)

Τα φύκη είναι ένας ανεπίσημος όρος για μια μεγάλη, ποικιλόμορφη ταξινομική ομάδα φωτοσυνθετικών οργανισμών. Οι συμπεριλαμβανόμενοι οργανισμοί κυμαίνονται από μονοκύτταρα γένη μικροφυκών έως και σε πολυκύτταρες μορφές, όπως το γιγάντιο φύλλωμα, ένα μεγάλο καφέ φύκος που μπορεί να μεγαλώσει μέχρι και τα 50 μέτρα.

Οι περισσότεροι είναι υδρόβιοι και αυτότροφοι οργανισμοί και στερούνται πολλών από τους ξεχωριστούς τύπους κυττάρων και ιστών, όπως το ξύλο και ο ηθμός, που απαντώνται στα χερσαία φυτά. Τα μεγαλύτερα και πιο σύνθετα φύκη του αλμυρού νερού ονομάζονται θαλάσσια φύκη, ενώ οι πιο σύνθετες μορφές τους, του γλυκού νερού είναι τα Charophyta, μία τάξη των πράσινων φυκών που περιλαμβάνει, για παράδειγμα, την τάξη Charales (4).

Τα φύκη λοιπόν αποτελούν μια πολυφυλετική ομάδα αφού δεν περιλαμβάνουν έναν κοινό πρόγονο και παρόλο που τα πλασμίδια τους φαίνεται να έχουν μία και μόνη προέλευση, τα κυανοβακτήρια, εξελίχθηκαν με διαφορετικούς τρόπους. Τα πράσινα φύκη είναι παραδείγματα φυκών που έχουν πρωτογενείς χλωροπλάστες προερχόμενους από ενδοσυμβιωτικά κυανοβακτήρια. Τα διάτομα και τα καστανά φύκη είναι παραδείγματα φυκών με δευτερογενείς χλωροπλάστες προερχόμενους από ενδοσυμβιωτικά κόκκινα φύκη. Τα φύκη είναι δυνατό να τα κατηγοριοποιήσουμε σε δύο μεγάλες ταξινομικές ομάδες που βασίζονται στο μέγεθός τους: τα μικροφύκη, που δεν είναι ορατά με γυμνό μάτι και το μέγεθός τους κυμαίνεται από 0,2 μm έως πάνω από 200 μm που τα συναντάμε σε ορισμένες αποικιακές μορφές κυανοβακτηρίων, τα μακροφύκη, των οποίων το μέγεθος και βασικότερα το μήκος

κυμαίνεται από λίγα χιλιοστά έως και μερικές δεκάδες μέτρα, όπως οι γιγάντιες κέλπιες που φτάνουν τα 60m.

Οι βασικότερες ομάδες μικροφυκών είναι:

- τα Κυανοβακτήρια
- τα Χλωροφύκη
- τα φωτοσυνθετικά Σταχυομαστιγωτά
- τα Χρυσοφύκη
- τα Διάτομα
- τα Ευστιγματοφύκη
- τα Ραφιδοφύκη
- τα Απτόφυτα
- τα Κρυπτοφύκη
- τα Δινοφύκη

Αντίστοιχα, οι βασικότερες ομάδες μακροφυκών είναι:

- τα Χλωροφύκη
- τα Ροδοφύκη
- τα Φαιοφύκη

τα οποία ανήκουν επίσης στη μεγάλη υπερομάδα των φωτοσυνθετικών σταχυομαστιγωτών (4).

Τα φύκη παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα αναπαραγωγικών μεθόδων, από την απλή κυτταρική διαίρεση έως τις πολύπλοκες μορφές αναπαραγωγής. Τα φύκη στερούνται τις διάφορες δομές που χαρακτηρίζουν τα φυτά της γης, όπως τα φυλλίδια (φυλλοειδείς δομές) των βρυοφυτικών οργανισμών, τις ρίζες, τα φύλλα και άλλα όργανα.

Ορισμένα μονοκύτταρα είδη από πράσινα φύκη, πολλά χρυσά φύκη, ευγενίδια, διφωσφορικά και άλλα φύκη είναι ετερότροφα (αποκαλούμενα επίσης άχρωμα ή αποχλωρωτικά φύκη), μερικές φορές παρασιτικά, βασίζονται δηλαδή εξ ολοκλήρου σε εξωτερικές πηγές ενέργειας και έχουν περιορισμένη ή καθόλου φωτοσυνθετική συσκευή. Κάποιοι άλλοι ετερότροφοι οργανισμοί, προέρχονται επίσης από κύτταρα των οποίων οι πρόγονοί είχαν πλαστίδια, αλλά δεν θεωρούνται παραδοσιακά φύκη. Τα φύκη διαθέτουν φωτοσυνθετικούς μηχανισμούς που τελικά προέρχονται από κυανοβακτήρια που παράγουν οξυγόνο ως υποπροϊόν της φωτοσύνθεσης, σε αντίθεση με άλλα φωτοσυνθετικά βακτήρια όπως τα κόκκινα και τα πράσινα βακτήρια. Εμφανίζεται γενικά λοιπόν μια ποικιλία μορφολογιών των φυκών και η σύγκλιση χαρακτηριστικών σε μη σχετιζόμενες ομάδες είναι κοινή. Οι



μόνες ομάδες που παρουσιάζουν τρισδιάστατους πολυκύτταρους θαλλούς είναι τα κόκκινα και καφέ φύκη, και μερικά χλωρόφυτα.

Τα περισσότερα από τα πιο απλά φύκη είναι μονοκύτταρα με μαστίγια αλλά οι αποικιακές και μη μορφές έχουν αναπτυχθεί ανεξάρτητα μεταξύ πολλών από τις ομάδες των φυκών. Μερικά από τα πιο κοινά οργανωτικά επίπεδα, περισσότερα από τα οποία μπορεί να εμφανιστούν στον κύκλο ζωής ενός είδους, είναι :

- Colonial: μικρές, τακτικές ομάδες κινητικών κυττάρων
- Capsoid: μεμονωμένα μη κινητικά κύτταρα
- Coccoid: μεμονωμένα μη κινητικά κύτταρα με κυτταρικά τοιχώματα
- Palmelloid: μη εύθραυστα κύτταρα ενσωματωμένα σε βλεννώδη
- Νήματα με ίνες: μια σειρά μη κινητικών κυττάρων που συνδέονται μεταξύ τους, μερικές φορές με διακλαδώσεις
- Παρεγχυματικά: κύτταρα που σχηματίζουν ένα θαλλό με μερική διαφοροποίηση ιστών

Οι κύριες ομάδες λοιπόν ευκαρυωτικών φυκών είναι τα πράσινα φύκη, τα δίατομα, τα κόκκινα φύκη, τα καστανά φύκη και τα δινοφυλάκια, που κατατάσσονται στα πρώτιστα. Μια άλλη ομάδα, τα μπλε-πράσινα φύκη, είναι τα κυανοβακτήρια. Ορισμένοι επιστήμονες δεν θεωρούν ότι τα μπλε-πράσινα φύκη είναι αληθινά φύκη επειδή είναι προκαρυωτικοί, και όχι ευκαρυωτικοί οργανισμοί (5).

### *Πράσινα φύκη*

Τα πράσινα φύκη είναι τα φύκη τα οποία σχετίζονται περισσότερο με τα φυτά. Έχουν τις ίδιες χρωστικές ουσίες (χλωροφύλλη a και b και καροτενοειδή), τα ίδια χημικά συστατικά στα κυτταρικά τους τοιχώματα (κυτταρίνη) και τους ίδιους υδατάνθρακες με τα φυτά. Τα πράσινα φύκη μπορεί να είναι μονοκύτταρα ή να σχηματίζουν νημάτια, , φύλλα, ή πολύπλοκες δομές με βρύα. Υπάρχουν τόσο στα γλυκά όσο και στα θαλάσσια νερά. Ορισμένα είδη πράσινων φυκών ζουν στο χιόνι ή σε συμβιωτικές ενώσεις όπως λειχήνες ή με σφουγγάρια ή άλλα υδρόβια ζώα. Υπάρχουν τουλάχιστον δεκαεπτά χιλιάδες είδη πράσινων φυκών.

### *Δίατομα*

Τα δίατομα θεωρούνται συχνά τα πιο όμορφα φύκη. Τα σχέδια στα κυτταρικά τοιχώματα των διατόμων είναι τόσο ακριβή που χρησιμοποιούνταν για χρόνια για να δοκιμάσουν την οπτική των νέων μικροσκοπίων. Τα δίατομα είναι επίσης τα πιο άφθονα φύκη στον ανοικτό ωκεανό και ευθύνονται για το ένα τέταρτο περίπου του συνόλου του αερίου οξυγόνου που παράγεται στη γη κάθε χρόνο. Οι πληθυσμοί διατομών συχνά ανθίζουν στις λίμνες την άνοιξη, παρέχοντας μια σημαντική τροφή για το ζωοπλαγκτόν, που αποτελεί τη βάση της υδρόβιας τροφικής αλυσίδας. Υπάρχουν πάνω από εκατό χιλιάδες είδη διατόμων.

### Κόκκινα φύκη

Τα κόκκινα φύκη είναι σχεδόν αποκλειστικά θαλάσσια και περιλαμβάνει πολλά βρώσιμα και οικονομικά σημαντικά είδη, όπως το nori. Τα κόκκινα φύκη είναι επίσης η πηγή του agarose και του άγαρ, τα οποία χρησιμοποιούνται ως πυκνωτικά τροφίμων και σταθεροποιητές. Τα κόκκινα φύκη είναι ως επί το πλείστον μεγάλα, πολύπλοκα φύκη. Υπάρχουν τέσσερις χιλιάδες έως έξι χιλιάδες είδη.

### Καστανά φύκη

Τα καστανά φύκη είναι σχεδόν αποκλειστικά θαλάσσια και περιλαμβάνουν τα μεγαλύτερα και πιο περίπλοκα φύκη. Το Kelp, για παράδειγμα, μπορεί να είναι πάνω από 60 μέτρα (200 πόδια) ψηλό, και σχηματίζει πυκνά υποβρύχια δάση στις ακτές της Καλιφόρνια. Άλλα σημαντικά καφέ φύκη περιλαμβάνουν το Sargassum, από τα οποία ονομάζεται και η θάλασσα του Sargasso. Υπάρχουν περίπου δεκαπέντε εκατοντάδες είδη καστανά φύκη.(6)

### Χρήσεις των καλλιεργούμενων φυκών

1. Υδατοκαλλιέργειες
2. Βιοφαρμακευτική, Κοσμετική
3. Υγιεινές τροφές, πρόσθετα (23)

### Φωτοσύνθεση



Σχήμα 2 Σχήμα παραγωγής ενέργειας στο φυτικό κύτταρο. ( από Hotos, 2016)

Η φωτοσύνθεση γίνεται σε στάδια και με μια σειρά από πολύπλοκες χημικές αντιδράσεις. Το σημείο του κυττάρου στο οποίο διαδραματίζονται οι αντιδράσεις αυτές, είναι οι χλωροπλάστες. Σε αυτούς ένα μόριο χλωροφύλλης, το οποίο βρίσκεται στο ενεργειακό κέντρο του κυττάρου, με τη βοήθεια κι άλλων φωτοευαίσθητων χρωστικών συγκεντρώνει και δεσμεύει την ενέργεια του ηλιακού φωτός καθώς παράγει φορτισμένα μόρια-ένζυμα ATP και NADPH από τις αφόρτιστες μορφές του ADP και NADP<sup>+</sup> αντίστοιχα.

Η φωτεινή φάση της φωτοσύνθεσης, αλλιώς φωτοφωσφορυλίωση, είναι ο βιοχημικός μηχανισμός παραγωγής ATP από ADP με τη βοήθεια του ηλιακού φωτός. Με τη βοήθεια αυτού εξασφαλίζεται η δέσμευση ανόργανου φωσφόρου σε ένα μόριο ADP παράγοντας ATP. Γενικά, η φωτοφωσφορυλίωση χαρακτηρίζεται ως μία μορφή αποθήκευσης ενέργειας.

Η σκοτεινή φάση της φωτοσύνθεσης, αλλιώς Κύκλος του Calvin, όπου σε αυτήν το διοξείδιο του άνθρακα ενσωματώνεται σε περισσότερο πολύπλοκα μόρια και τελικά σε υδατάνθρακες. Σε κάθε ολοκλήρωση του κύκλου δεσμεύεται ένα μόριο διοξειδίου του άνθρακα και παράγονται δύο μόρια φωσφογλυκερικού οξέος. Σε κάθε έξι ολοκληρώσεις του κύκλου παράγονται επαρκείς ποσότητες PGAL προκειμένου να παραχθεί ένα μόριο γλυκόζης. (23)

### Προϋποθέσεις φωτοσύνθεσης

1. Διοξείδιο του άνθρακα
2. Νερό
3. Φως
4. Χλωροφύλλη

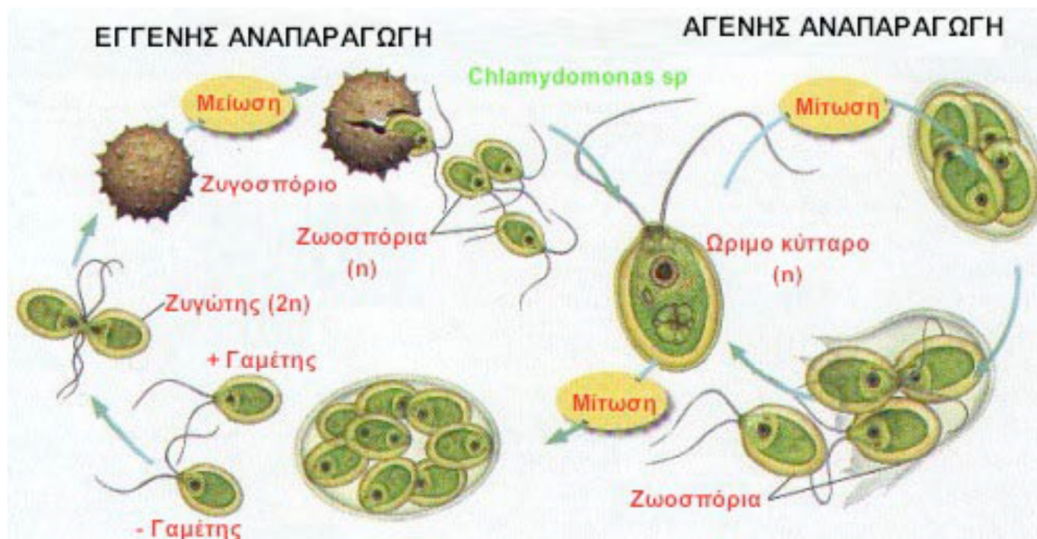
- 5. Θερμοκρασία
- 6. Ένζυμα (23)

### Φυσικοχημικές παράμετροι καλλιέργειας μικροφυκών

- Φως (1000-10000 Lux)
- Θερμοκρασία
  - I. 20-23 οC (*Nannochloropsis ocullata*, *Asteromonas gracilis*)
  - II. 18-20 οC (*Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Rhodomonas salina*)
- pH (8.2-8.7)
- Αλατότητα ( 20-30 %ο για τα περισσότερα θαλασσινά είδη)
- Αερισμός (έντονος, πάντοτε επωφελής σε αναμειξείς με CO2)
- Θρεπτικά συστατικά (διάλυμα μεταλλικών αλάτων, ιχνοστοιχείων και βιταμινών) (23)

### Αναπαραγωγή

Η διαδικασία αναπαραγωγής στα μικροφύκη γίνεται με αγενή και εγγενή τρόπο. Αρκετά μικροφύκη πολλαπλασιάζονται μόνο με τον αγενή τρόπο αναπαραγωγής, ενώ άλλα και με τον αγενή και με τον εγγενή τρόπο αναπαραγωγής.



Σχήμα 3 Αναπαραγωγικός κύκλος του μικροφύκου γένους *Chlamydomonas*. ( από Hotos, 2016)

### Αγενής αναπαραγωγή:

Πολλά μονοκύτταρα φύκη αυξάνουν τους πληθυσμούς τους, με απλή διαμήκη ή εγκάρσια κυτταρική διαίρεση. Ωστόσο, φύκη με διαφορετικούς τύπους θαλλών αναπαράγονται αγενώς με μαστιγοφόρα κύτταρα, τα ζωοσπόρια ή με μη-μαστιγοφόρα κύτταρα τα απλανοσπόρια ή αυτοσπόρια. Πρόκειται για αγενή αναπαραγωγή καθώς δεν πραγματοποιείται σύντηξη γαμετών.

### **Ζωοσπόρια:**

Κατά την ζωοσποριογένεση, το κυτόπλασμα ενός κυττάρου μετατρέπεται σε ένα ως πολλά μαστιγοφόρα κύτταρα. Όταν ωριμάσουν τα ζωοσπόρια απελευθερώνονται και διασπείρονται στο υδάτινο περιβάλλον, δίνοντας στη συνέχεια νέα μονοκύτταρα ή πολυκύτταρα άτομα.

### **Απλανοσπόρια:**

Τα απλανοσπόρια διαχέονται από το μητρικό κυτταρικό τοίχωμα όπου και μπορούν να αναπτυχθούν σε ώριμους θαλλούς.

### **Αυτοσπόρια:**

Τα αυτοσπόρια, δεν έχουν την ικανότητα παραγωγής μαστιγίων, ζουν εξαπλωμένα και αναπτύσσονται, όπως τα ζωοσπόρια και τα απλανοσπόρια (8).

## Εγγενής αναπαραγωγή:

Ο εγγενής βιολογικός κύκλος είναι ένας παράγοντας που κάνει τα μονοκύτταρα φύκη να διαφέρουν. Οι κυριότεροι τύποι εγγενών βιολογικών κύκλων είναι τρεις.

- **Ζυγωτική μείωση** έχουμε στα φύκη, στους βιολογικούς κύκλους των οποίων τα μόνα διπλοειδή κύτταρα είναι ζυγώτες.
- Στη **γαμετική μείωση** παρατηρείται μείωση όταν παράγονται απλοειδείς γαμέτες από διπλοειδή βλαστητικά κύτταρα. Η σύντηξη των γαμετών προκαλεί τον σχηματισμό ενός διπλοειδούς ζυγώτη όπου ύστερα από πολλές μιτωτικές διαιρέσεις προκύπτει ένας πολυκύτταρος διπλοειδής θαλλός.
- Στη **σποριακή μείωση**, παράγονται απλοειδή σπόρια δηλαδή μεμονωμένα κύτταρα τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν και να σχηματίσουν ένα πολυκύτταρο απλοειδή θαλλό γνωστό ως γαμετόφυτο. Με κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες κάποια από τα κύτταρα του γαμετόφυτου παράγουν απλοειδείς γαμέτες όπου και ενώνονται και σχηματίζεται ένας διπλοειδής ζυγώτης. Ο διπλοειδής ζυγώτης διαιρείται μιτωτικά και έτσι προκύπτει ένας πολυκύτταρος διπλοειδής θαλλός γνωστός ως σποριόφυτο.

Τα περισσότερα φύκη μπορούν να ζήσουν για ημέρες, εβδομάδες ή μήνες. Τα μικρά φύκη εμφανίζονται μερικές φορές σε αφθονία σε σύντομο χρονικό διάστημα και παραμένουν αδρανείς κατά τη διάρκεια του υπολοίπου του έτους. Σε ορισμένα είδη, η αδρανής μορφή είναι μια ανθεκτική κύστη, ενώ άλλα είδη παραμένουν σε φυτική κατάσταση αλλά σε πολύ χαμηλό πληθυσμό. Μπορούν να χάσουν το κύριο

σώμα στο τέλος της καλλιεργητικής περιόδου, αλλά το τμήμα προσάρτησης, παράγει νέα ανάπτυξη μόνο στην αρχή της επόμενης καλλιεργητικής περιόδου.

Τα κόκκινα φύκη, έχουν μερικούς από τους πιο πολύπλοκους κύκλους ζωής που είναι γνωστοί για τους ζωντανούς οργανισμούς. Μετά τη μείωση, παράγονται τέσσερα απλοειδή τετρασπόρια, τα οποία βλαστάνουν και παράγουν είτε αρσενικό είτε θηλυκό γαμετόφυτο. Όταν ωριμάσει, το αρσενικό γαμετόφυτο παράγει ειδικά σπερματοζωάρια που φέρουν δομές, που ονομάζονται σπερμαγγάνια, που περιέχουν σπερματίτια, τους αρσενικούς γαμέτες.

Η γονιμοποίηση εμφανίζεται όταν ένα αρσενικό σπερματοζωάριο, που μεταφέρεται από ρεύματα νερού, συγκρούεται με το εκτεταμένο τμήμα ενός θηλυκού καρπογόνιου και οι δύο γαμέτες ενώνονται. Το γονιμοποιημένο ζυγωτό και ο θηλυκός ιστός του γαμετόφυτου γύρω του, εξελίσσονται σε μια δομή που ονομάζεται καρποσπορόφυτο. Το καρποσπορόφυτο τελικά παράγει και απελευθερώνει διπλοειδή καρποσπόρια που αναπτύσσονται σε τετρασπορόφυτα. Ορισμένα κύτταρα του τετρασποροφύτου υφίστανται μείωση και έτσι ο κύκλος επαναλαμβάνεται.

Οι κύκλοι ζωής των διατόμων, οι οποίοι είναι διπλοειδείς, είναι επίσης μοναδικοί. Τα τοιχώματα διατομών αποτελούνται από δύο επικαλυπτόμενα τμήματα (βαλβίδες). Κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, δύο νέες βαλβίδες σχηματίζονται στη μέση του κυττάρου και χωρίζουν το πρωτόπλασμα σε δύο μέρη. Συνεπώς, οι νέες βαλβίδες είναι γενικά κάπως μικρότερες από τις πρωτότυπες, οπότε μετά από πολλές διαδοχικές γενιές, τα περισσότερα κύτταρα του αυξανόμενου πληθυσμού είναι μικρότερα από τους γονείς τους.

Τα μικρά διπλοειδή κύτταρα υφίστανται μείωση και μεταξύ των λεπτών, ελλειπτικών διατομών οι προκύπτοντες απλοειδείς γαμέτες διασυνδέονται με ένα ζυγωτό, που αναπτύσσεται αρκετά μεγάλο και σχηματίζει ένα ειδικό είδος κυττάρου που ονομάζεται *Auxospore*. Το *Auxospore* διαιρείται, σχηματίζοντας δύο μεγάλα, βλαστικά κύτταρα και με αυτόν τον τρόπο ανανεώνεται το μεγαλύτερο μέγεθος. Στα κεντρικά διάτομα υπάρχει έντονη διαφοροποίηση μεταξύ μη θηλυκών γαμετών, οι οποίες δρουν ως κύτταρα αυγών, και κινητικών (τυπικά μονοφυλακτικών) αρσενικών γαμετών (8).

## Ποσοτικός υπολογισμός φυτοπλαγκτονικού πληθυσμού



Σχήμα 4 Καμπύλη αύξησης φυτοπλακτονικής καλλιέργειας. ( από Hotos, 2016)

### **Φάση καθυστέρησης:**

Η αδρανοποίηση κάποιων ενζύμων, ο μειωμένος μεταβολισμός, η απουσία κυτταρικών διαιρέσεων, αποτελούν βασικούς λόγους της καθυστέρησης αύξησης του φυτοπλακτονικού πληθυσμού.

### **Φάση εκθετικού ρυθμού αύξησης:**

Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από ένα σταθερό και ταχύ ρυθμό κυτταρικών διαιρέσεων. Κατά τη διάρκεια της 2ης φάσης η πυκνότητα των κυττάρων αυξάνεται με τον χρόνο  $t$  σύμφωνα με τη λογαριθμική εξίσωση  $C_t = C_0 e^{\mu t}$  με  $C_t$  και  $C_0$  να είναι συγκεντρώσεις κυττάρων σε χρόνο  $t$  και μηδέν (0) αντίστοιχα και ( $\mu$ ) ο ειδικός ρυθμός αύξησης. Ο εκάστοτε ρυθμός αύξησης είναι κυρίως εξαρτώμενος από τα είδη των μικροφυκών, την ένταση του φωτός και τη θερμοκρασία.

### **Φάση πτωτικής τάσης ρυθμού αύξησης:**

Η εξάντληση θρεπτικών συστατικών, η μειωμένη διαθεσιμότητα  $CO_2$ , η αλλαγή του pH, η μείωση της διαπερατότητας του φωτός, η παραγωγή τοξικών ουσιών, αποτελούν πιθανές αιτίες αναστολής των κυτταρικών διαιρέσεων.

### **Στατική φάση:**

Στη φάση αυτή ο φυτοπλακτονικός πληθυσμός βρίσκεται σε κατάσταση ισορροπίας μεταξύ του ρυθμού αύξησης και των συσσωρευμένων περιοριστικών παραγόντων.

### **Φάση κατάρρευσης:**

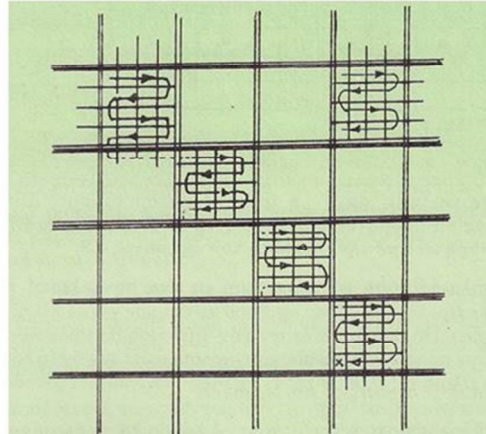
Η αλλιώς, «φάση θανάτου», που επέρχεται με πολύ γρήγορο ρυθμό καθώς η ποιότητα του νερού έχει μειωθεί και τα θρεπτικά συστατικά έχουν εξαντληθεί. Οι κυτταρικές διαιρέσεις έχουν σταματήσει και τελικώς η καλλιέργεια καταρρέει παρουσιάζοντας την εικόνα είτε ενός θολού είτε ενός διαυγούς νερού με ένα στρώμα ιζήματος νεκρών φυκών στον πυθμένα του δοχείου. (23)

### **Καταμέτρηση αριθμού κυττάρων**

Η καταμέτρηση των κυττάρων σε καλλιεργούμενους φυτοπλακτονικούς πληθυσμούς πραγματοποιείται με την χρήση αιμοκυττόμετρου ή αιμοκυτταρόμετρου (τύπου Burkner, τύπου Fuchs-Rosenthal ή τύπου Neubauer), με συνηθέστερο και πρακτικότερο αυτό των Fuchs-Rosenthal. Αυτή η μέθοδος είναι απλή και επιτρέπει να καταμετρηθούν μικροφύκη με κυτταρική διάμετρο 2 έως 30  $\mu\text{m}$  και μέχρι περίπου  $50 \cdot 10^6$  κύτταρα / ml σε πυκνότητα.

Το αιμοκυττόμετρο τύπου Fuchs-Rosenthal διαθέτει δύο χαραγμένα τετράγωνα πλαίσια (grid). Κάθε πλαίσιο διαιρείται σε 16 ενδιάμεσα τετράγωνα το καθένα από τα οποία διαιρείται σε 16 ελάχιστα τετραγωνάκια. Τα 16 ενδιάμεσα τετράγωνα είναι 1 mm σε μήκος το καθένα. Το όλο πλαίσιο είναι εμβαδού 16  $\text{mm}^2$ . Επειδή το βάθος του Fuchs-Rosenthal είναι 0,2 mm, ο όγκος του δείγματος που καλύπτει το όλο πλαίσιο (και τα 16 ενδιάμεσα τετράγωνα του πλαισίου) είναι 0,0032 ml. (23)

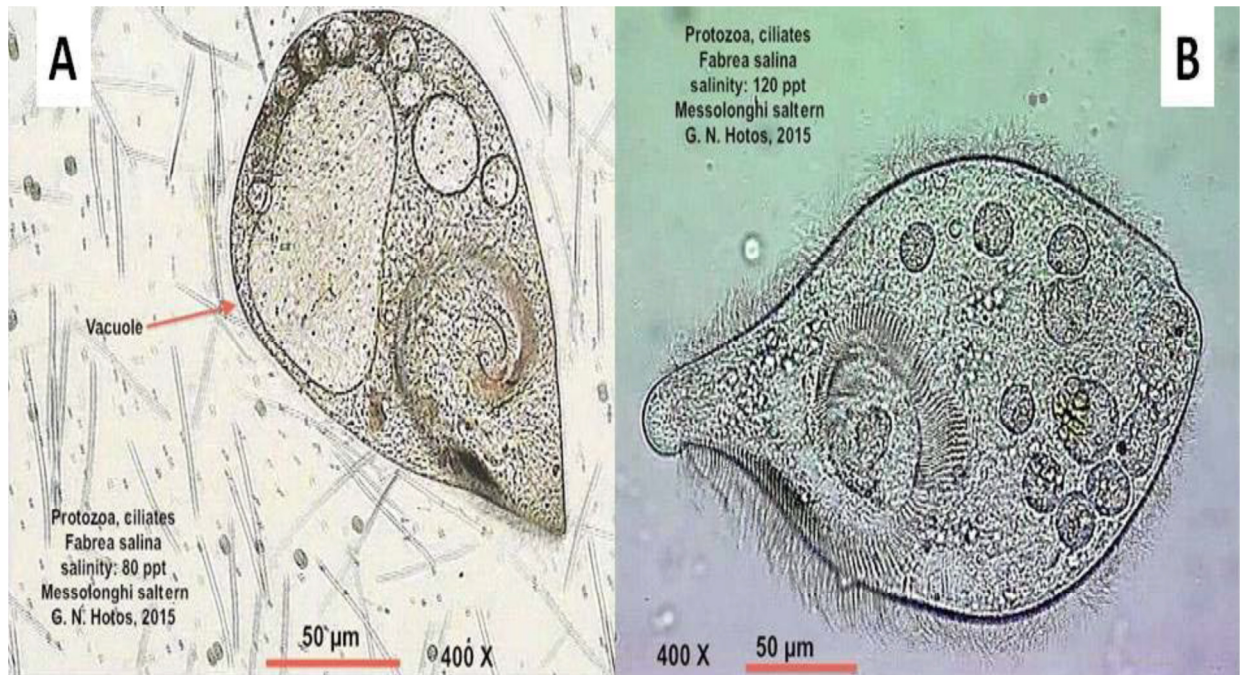




Σχήμα 5 Αριστερή εικόνα: Αιμοκυττόμετρο τύπου Fuchs- Rosenthal (το οποίο και χρησιμοποιήθηκε). Δεξιά εικόνα: Τρόπος καταμέτρησης αιμοκυττομέτρου. Δηλαδή 4 διαγώνια τετράγωνα και 1 γωνιακό, σύνολο 80 τετραγωνάκια. ( από Hotos, 2016)

## Βιολογικά στοιχεία των χρησιμοποιηθέντων οργανισμών

*Fabrea salina*



Σχήμα 6 Αριστερή εικόνα: Το δείγμα έχει ένα μακρύ τριγωνικό σχήμα ρύγχους. Στο μπροστινό μέρος του κυττάρου υπάρχει μια περιοχή με έντονο σκούρο χρώμα. Γύρω από όλο το κύτταρο υπάρχουν πολυάριθμα κοκκοειδή και νηματώδη κυανοβακτήρια. Δεξιά εικόνα: Το ρύγχος διαγραμματίζεται σε στυλ προβοσκίδας. Οι βλεφαρίδες είναι εμφανής καθ' όλο το εξωτερικό μήκος του κυττάρου. (από Hotos, 2018)

### Ταξινόμηση :

Kingdom: *Chromista*

Subkingdom: *Harosa*

Infrakingdom: *Alveolata*

Phylum: *Ciliophora*

Subphylum: *Postciliodesmatophora*

Class: *Heterotrichea*

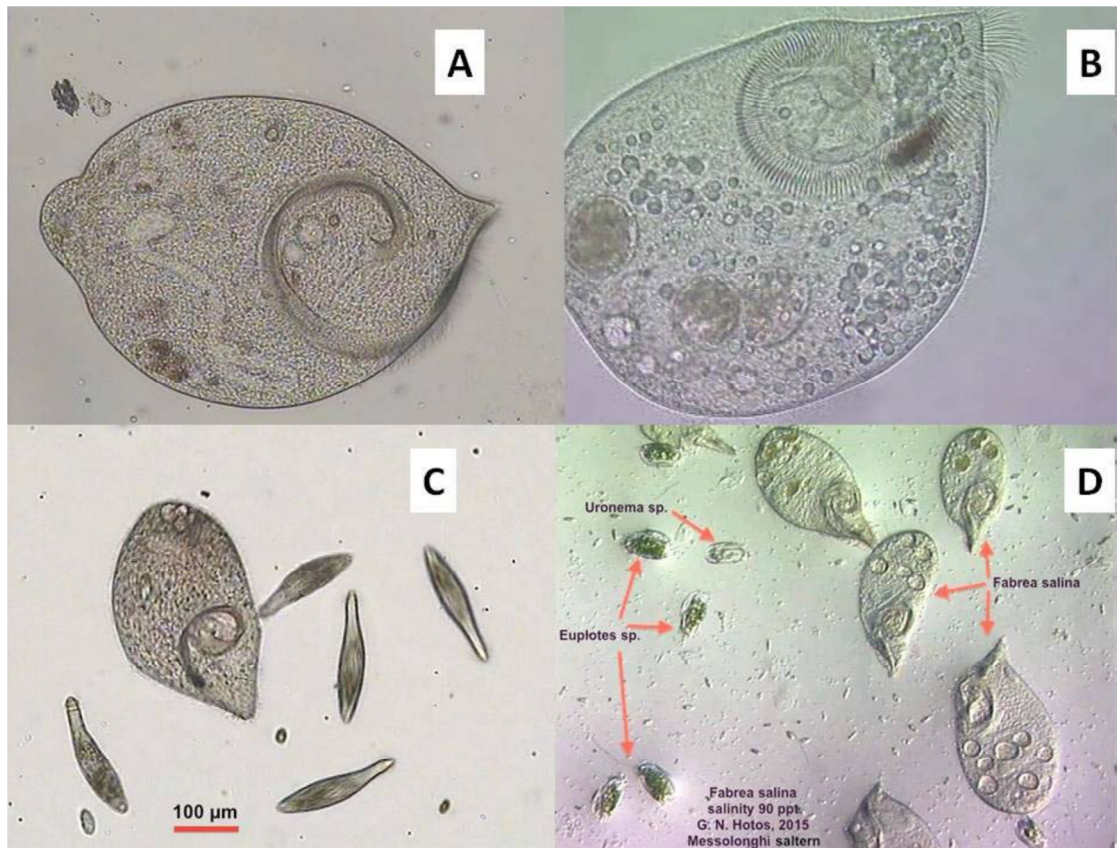
Order: *Heterotrichida*

Family: *Climacostomidae*

Genus: *Fabrea*

Species: *Fabrea salina*

Οφθαλμοειδές, με μυτερό πρόσθιο, μήκους 450 μικρών. Παρατηρείται ένας μακρύς σκώληκας, μακροπυρήνας. Διάφορα σημεία χρωστικής υπάρχουν στο σώμα. Αυτό το είδος έχει σημειώσει μεγάλη ποικιλία χρωμάτων. Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι έχει πολύ υψηλό ρυθμό ανάπτυξης.

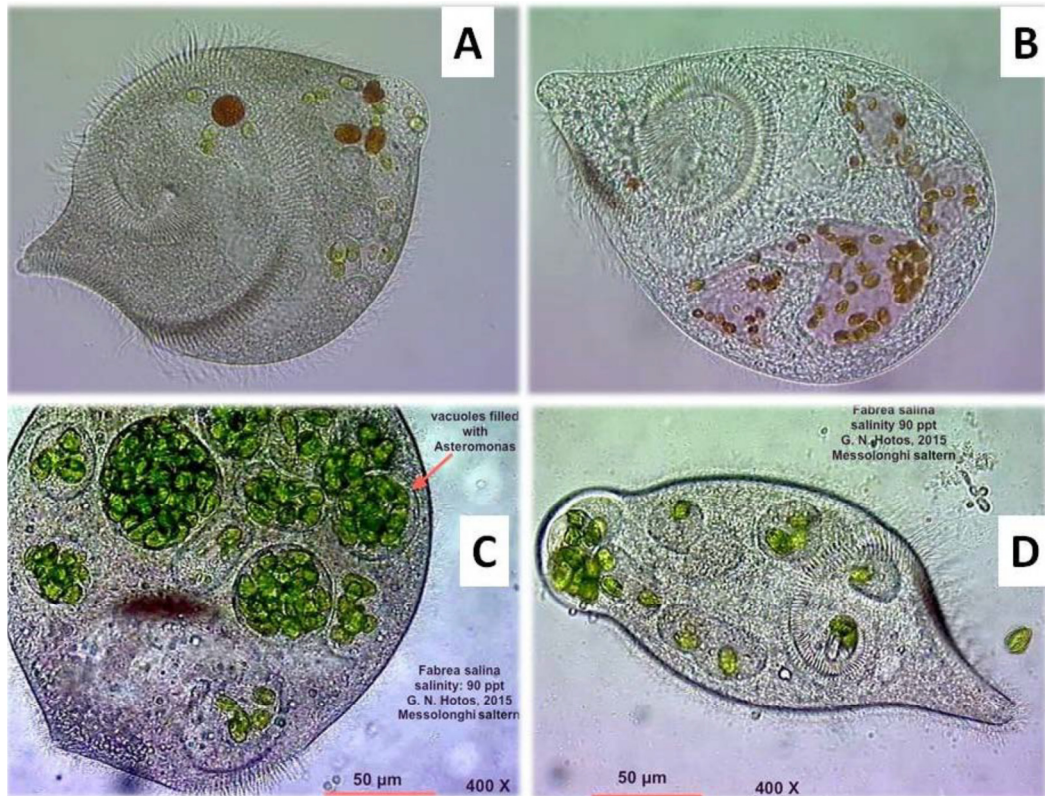


Σχήμα 7 Εικόνα Α: Μπορούμε να διακρίνουμε το “S” σχήμα των μακροπυρήνων. Εικόνα Β: Γίνονται διακριτές οι μεγάλες βλεφαρίδες στην περιοχή του στόματος. Εικόνα Γ: Η *Fabrea* περιτριγυρισμένη από το *Hemiorhys*. Εικόνα Δ: Διακρίνεται η *Fabrea* περιτριγυρισμένη από αρκετά *Euplotes*. Μπορούμε να συμπεράνουμε την διαφορά στο μέγεθος ανάμεσα στην *Fabrea* (>200μm) και τα *Euplotes* (~50-100μm). (από Hotos, 2018)

Πρώτη φορά περιγράφεται το ενδεχόμενο να διαδραματίζει ευεργετικό ρόλο το βλεφαριδωτό πρωτόζωο *Fabrea salina* στην καλή κρυστάλλωση του άλατος στις αλυκές του Μεσολογίου. Μέχρι τώρα οι εργασίες ανέφεραν μόνο την *Artemia* ως θετικό παράγοντα.(13)

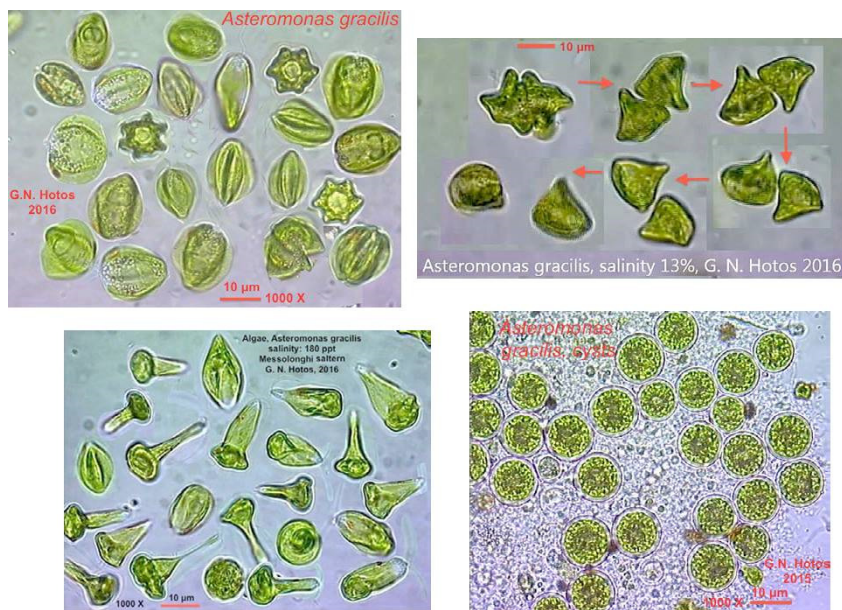
Η *Fabrea* είναι ένα πελαγικό, αλοανθεκτικό είδος, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ζωντανή τροφή στην ιχθυογέννηση ιχθύων. Η μεγάλη τιμή στην πολλής καλής ποιότητας *Artemia* για τροφή στα πρώιμα στάδια της ιχθυοκαλλιέργειας, οδήγησε στην αναζήτηση νέων ειδών πιο οικονομικών, με τα ίδια ίσως και καλύτερα αποτελέσματα, υπολογίζοντας πάντα το μέγεθος και τα διατροφικά θρεπτικά στοιχεία. Έχει συζητηθεί επίσης η ανάγκη για την χρησιμοποίηση πρωτοζώων σαν πηγές διατροφής στις θαλάσσιες λαρβοκαλλιέργειες. Μπορεί να αναπτυχθεί σε ποικίλα περιβάλλοντα όπως: αλμυρά έλη, υπεραλατούχες λίμνες καθώς και υδατοσυλλογές με αυξημένη αλατότητα σε σχέση με την αλατότητα της θάλασσας.

Με λίγα λόγια η *Fabrea salina* κατά το πλείστον έχει ότι χρειάζεται για να χρησιμοποιηθεί σαν ζωντανή τροφή. Κάποιες από αυτές τις πτυχές είναι το μικρό μέγεθος, η πελαγική φύση της, τον περιοδικά μικρό χρόνο ζωής, την δυνατότητα να δημιουργεί κύστες σε περιπτώσεις εκτάκτου ανάγκης, η δυνατότητα να ευημερεί στις ζωντανές και σε αδρανείς τροφές καθώς και η ευρυπλαστικότητα που διαθέτει. (21)



Σχήμα 8 Εικόνα Α: Ταΐσμένη με *Dunaliella salina*, τόσο με κόκκινα καροτενοειδή όσο και με πράσινα κύτταρα. Εικόνα Β: Φαίνεται διακριτά η διαδικασία της πέψης από *Rhodomonas salina*. Εικόνα Γ και Δ: Φαίνεται η μεγάλης ποσότητας κατάποση *Asteromonas gracilis* από εργαστηριακές καλλιέργειες με 90ppt αλατότητα. Επίσης στην εικόνα Γ δεν υπάρχει το ρύγχος ενώ στην εικόνα Δ υπάρχει σε σχήμα προβοσκίδας. (από Hotos, 2018)

### *Asteromonas gracilis*



Σχήμα 9 Επάνω αριστερά διακρίνονται κάποιες ποικίλες μορφές της *Asteromonas gracilis*. Επάνω δεξιά φαίνονται τα στάδια της κυτταρικής διαίρεσης. Κάτω αριστερά διακρίνεται η καρφοειδής μορφή που μπορεί να συναντάται. Κατω δεξιά παρατηρούνται κύστεις της *Asteromonas*. ( από Hotos, 2016)

## Ταξινόμηση :

Υπερβασίλειο : Ευκαρυωτικά

Βασίλειο : Πρώτιστα

Φύλο : *Chlorophyta*

Ομοταξία : *Chlorophyceae*

Τάξη : *Chlamydomonadales*

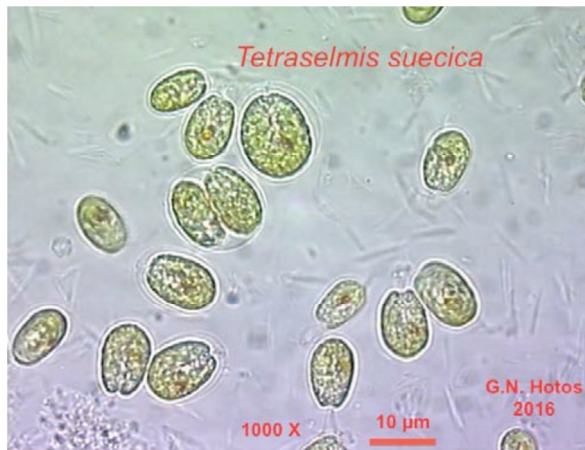
Οικογένεια : *Asteromonadaceae*

Γένος : *Asteromonas*

Είδος : *Asteromonas gracilis*

Είδος του αλμυρού νερού, αυξάνεται σε συγκεντρώσεις άλατος από 0,5 γραμμομόρια NaCl (θαλασσινό νερό) έως κορεσμό (4,5 γραμμομόρια NaCl). Ρυθμίζει την περιεκτικότητα γλυκερόλης για να αντισταθμίσει τις οσμωτικές κλίσεις στην επιφάνεια της κυψέλης. Το *Asteromonas gracilis* παραμένει κινητό σε όλη την κυτταρική διαίρεση. Είναι φύκος μεγάλου μεγέθους (18 – 25 μm) με δύο μεγάλα μαστίγια που του δίνουν έντονη κινητικότητα η οποία χαρακτηρίζεται από αργή στροβιλοτρεμώδη κίνηση με εύκολα παρακολουθήσιμη στο μικροσκόπιο πορεία προς τα εμπρός ή με στρίψιμο προς άλλη κατεύθυνση. Είναι ιδανική τροφή για τροχόζωα, πρωτόζωα, κοπήποδα και την *Artemia*. Αναπαράγεται με απλή κυτταρική διαίρεση. Η *Asteromonas* όπως και η *D. salina* παρουσιάζει θαυμαστή ωσμωρυθμιστική ικανότητα (και τα δύο είδη για να αντέξουν την ωσμωτική διαφορά στην υψηλή αλατότητα παράγουν ενδοκυτταρικά γλυκερίνη), αντέχοντας ένα μεγάλο εύρος αλατότητας από θαλασσινό (35 ppt) έως υπεράλμυρο νερό επιπέδου άλμης (> 300 ppt). Όταν οι συνθήκες χειροτερεύουν (έλλειψη θρεπτικών, κ.ά.) τα κύτταρα μεταμορφώνονται σε κύστες με παχύ μεμβρανικό τοίχωμα και μπορούν να παραμείνουν σε διάπαυση για μήνες ή και χρόνια ακόμα και σε αλάτι και να ξαναμεταμορφωθούν σε κινητικά κύτταρα όταν οι συνθήκες ξαναγίνουν ευνοϊκές. Αυτή της η ιδιότητα σε συνδυασμό με την εύκολη προσαρμογή της σε μεγάλο εύρος αλατότητας, θερμοκρασίας, έντασης φωτός, pH και την μη ανάγκη της για βιταμίνες στο θρεπτικό μέσο, την κάνουν πολύ πρακτικό είδος για καλλιέργεια η οποία μάλιστα δεν καταρρέει εύκολα και αν αυτό γίνει μετά από πολύ καιρό, οι δημιουργηθείσες εν τω μεταξύ κύστες της μπορούν να ξαναδώσουν νέα βιώσιμη καλλιέργεια. (23)

## *Tetraselmis suecica*



Σχήμα 10 Απεικόνιση της *Tetraselmis suecica*. ( από Hotos, 2016)

### Ταξινόμηση :

Υπερβασίλειο : Ευκαρυωτικά

Βασίλειο : Πρώτιστα

Φύλο : *Chlorophyta*

Ομοταξία : *Chlorophyceae*

Τάξη : *Volvocales*

Οικογένεια : *Chlamydomonadaceae*

Γένος : *Tetraselmis*

Είδος : *Tetraselmis suecica*

Το *Tetraselmis* είναι ένα είδος πράσινου φύκου και χαρακτηρίζεται από τον έντονο πράσινο χλωροπλάστη του. Βρίσκονται τόσο στα θαλάσσια όσο και στα γλυκά ύδατα σε ολόκληρο τον πλανήτη. Το εύρος των οικοτόπων τους περιορίζεται κυρίως από το βάθος του νερού λόγω του φωτοσυνθετικού τους χαρακτήρα. Έτσι, ζουν σε ποικίλα περιβάλλοντα νερού εάν υπάρχουν αρκετές θρεπτικές ουσίες και φως για καθαρή φωτοσυνθετική δραστηριότητα. Τα είδη *Tetraselmis* έχουν αποδειχθεί χρήσιμα τόσο για την έρευνα όσο και για τη βιομηχανία. Επιπλέον, πολλά είδη εξετάζονται επί του παρόντος για τη χρήση τους ως βιοκαύσιμα λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε λιπίδια (14). Τα είδη *Tetraselmis* ποικίλλουν σημαντικά στο μέγεθος και το σχήμα των κυττάρων τους. Τα κύτταρα μπορεί να είναι στρογγυλά, ωοειδή, ελλειπτικά, πεπλατυσμένα, συμπιεσμένα ή συνδυασμός αυτών των σχημάτων, στα οποία τα μήκη των πλευρών τους μπορούν να κυμαίνονται από 7 έως 10  $\mu\text{m}$ . Η βέλτιστη αλατότητα είναι τα 25 ppt, pH 7 – 8, θερμοκρασία 18 – 22  $^{\circ}\text{C}$  και φωτισμό 5000 – 10000 lux. (23)

Τα κύτταρα των *Tetraselmis* έχουν τέσσερα μαστίγια ίσου μήκους, τα οποία εξέρχονται από την κορυφή. Στα περισσότερα είδη, τα μαστίγια αναδύονται σε ζεύγη και προβάλλουν μακριά το ένα από το άλλο. Γενικά, ξεχωριστά κύτταρα μετακινούνται με γραμμικό τρόπο για μεγάλο χρονικό διάστημα και στη συνέχεια αλλάζουν ταχέως την κατεύθυνση χωρίς να σταματήσουν, στα οποία τα μαστίγια παράγουν δύναμη για κίνηση μέσα σε ένα υδατικό περιβάλλον (15). Τα είδη *Tetraselmis* ήταν σημαντικά για την έρευνα κυτταρικής βιολογίας, για τη μελέτη κύκλων ανάπτυξης πλαγκτόν και μπορεί να έχουν μελλοντική χρήση στην παραγωγή βιοκαυσίμων. Τα *Tetraselmis* και άλλα είδη μικροφυκών χρησιμοποιούνται ως τρόφιμα στην Υδατοκαλλιέργεια (τροχόζωα) αλλά και για βιοτεχνολογικές χρήσεις. Τα είδη του *Tetraselmis*, μαζί με άλλα μικροφύκη, είναι μια πολλά υποσχόμενη πηγή για χρήση βιοκαυσίμων λόγω του ταχύτατου ρυθμού ανάπτυξής τους, της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε λιπίδια, των φωτοσυνθετικών μηχανισμών τους, της λιγότερης ανάγκης για γεωργική γη, χρήσιμων υποπροϊόντων και φιλικών προς το περιβάλλον, διεξάγεται επί του παρόντος έρευνα σε συγκεκριμένα είδη μικροφυκών για χρήση βιοκαυσίμων. Έχει πολύ υψηλό επίπεδο λιπιδίων, τα αμινοξέα τους διεγείρουν τη σίτιση σε θαλάσσιους οργανισμούς (16).

### *Isochrysis galbana*



Σχήμα 11 Απεικόνιση της *Isochrysis galbana*. ( από Hotos, 2016)

Ταξινόμηση :

Υπερβασιλείο : Ευκαρυωτικά

Βασιλείο : Πρώτιστα

Φύλο : *Chrysophyta*

Ομοταξία : *Haptophyceae*

Τάξη : *Isochrysidales*

Οικογένεια : *Isochrysidaceae*

Γένος : *Isochrysis*

Είδος : *Isochrysis galbana*

Το *Isochrysis galbana* είναι το είδος του γένους *Isochrysis*. Είναι ένα εξαιρετικό φαγητό για διάφορες προνύμφες δίθυρων και αυτή τη στιγμή καλλιεργείται ευρέως για χρήση στη βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας δίθυρων. Το μέγεθός τους κυμαίνεται στα 5 έως 7 μm (17), δεν σχηματίζουν αποικίες και διαθέτουν δύο ισομεγέθη μαστίγια. Οι νύμφες των, τρέφονται με τροχόζωα και τα τροχόζωα τρεφόμενα με *Isochrysis* εμπλουτίζονται με DHA (εικοσιδυοεξαενοϊκό οξύ). (23)

### *Rhodomonas salina*



Σχήμα 12 Απεικόνιση της *Rhodomonas*. Επίσης διακρίνεται αμυδρά το κόκκινο χρώμα πο προσφέρει στην καλλιέργεια. ( από Hotos, 2016)

Ταξινόμηση :

Υπερβασίλειο : Ευκαρυωτικά

Βασίλειο : Πρώτιστα

Φύλο : *Cryptophyta*



Ομοταξία : *Cryptophyceae*

Τάξη : *Pyrenomonadales*

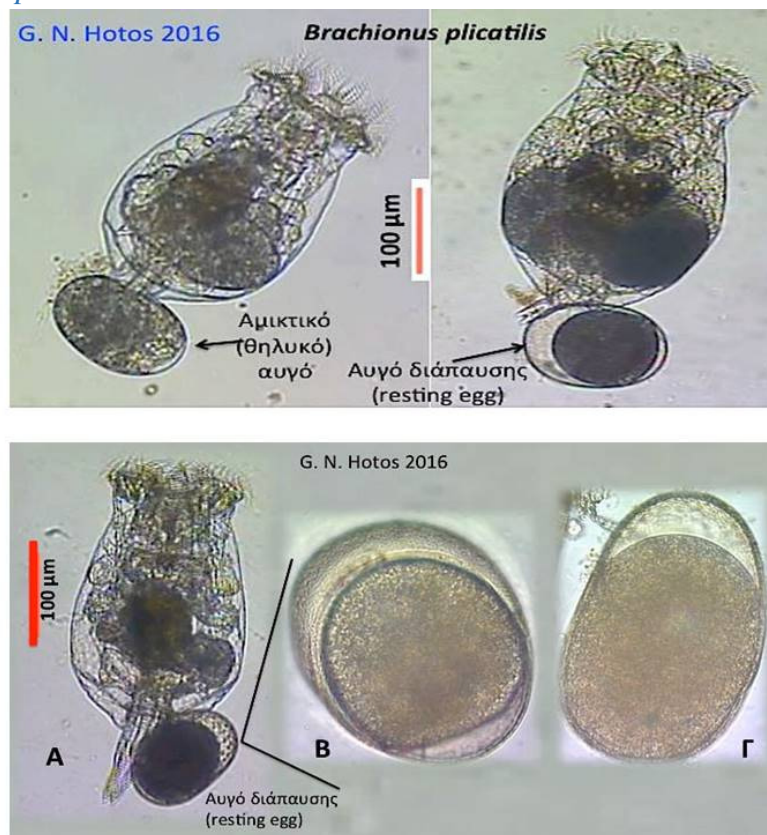
Οικογένεια : *Pyrenomonadaceae*

Γένος : *Rhodomonas*

Είδος : *Rhodomonas salina*

Το *Rhodomonas* είναι ένα γένος κρυπτομονάδων, που περιλαμβάνει το είδος *Rhodomonas salina*. Είναι κοσμοπολίτικο και κοινό, αν και σπάνια άφθονο, σε θαλάσσια και υφάλμυρα νερά και δύο είδη γλυκών υδάτων είναι γνωστά από την Ευρώπη. Έχουν ελεύθερα ωοειδή κύτταρα μεγέθους 5 – 13 μm και πάχους 6 – 8 μm, πεπλατυσμένα με μία πρόσθια αύλακα με δύο ελαφρώς άνισα μαστίγια, τα οποία προσφέρουν κινητική ικανότητα. Το χρώμα τους ποικίλλει από σκούρο κόκκινο έως κόκκινο – καφέ. Το βέλτιστο αλατότητας είναι τα 20 ppt, θερμοκρασία στους 20oC, pH 8 με 8,2 και με συνεχή φωτισμό εντάσεως 1000 με 7500 lux. Το γένος είναι εύκολο να αναγνωριστεί κάτω από το μικροσκόπιο φωτός και το είδος καλλιεργείται εύκολα. (23)

### *Brachionus plicatilis*



Σχήμα 13 Στην επάνω εικόνα στα δεξιά διακρίνεται το θηλυκό με αμικτικό αυγό και στα αριστερά με αυγό διάπαυσης. ( από Hotos, 2016) Στην κάτω εικόνα ένα μικτικό θηλυκό *Brachionus plicatilis* με αυγό διάπαυσης και σε μεγένθυση στα δεξιά δύο όψεις του αυγού. ( από Hotos, 2016)

Ταξινόμηση :

Βασίλειο : Ζώα

Φύλο: Τροχόζωα (*Rotifera*)

Ομοταξία : *Monogononta*

Τάξη : *Ploimida*

Οικογένεια : *Brachionidae*

Γένος : *Brachionus*

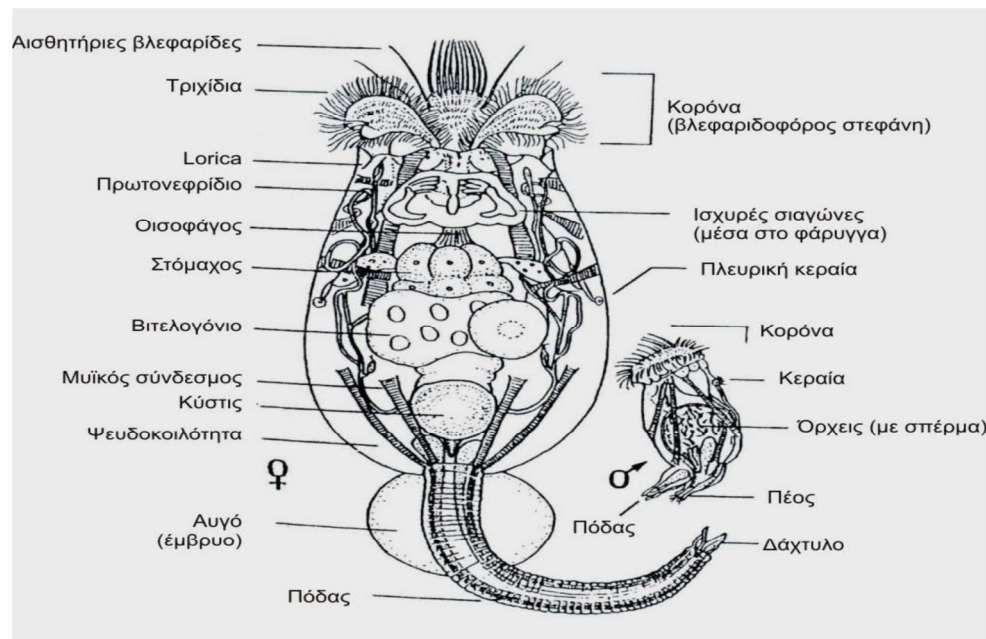
Είδος : *Brachionus plicatilis*

Το *Brachionus plicatilis* είναι ένα ευρύαλο τροχόζωο (αντέχει σε μεγάλη ποικιλία αλατότητας). Ανήκει στην οικογένεια *Brachionidae* και είναι ίσως το μόνο εμπορικώς σημαντικό είδος που καλλιεργείται στη βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας ως τροφή για τις προνύμφες των ψαριών. Έχει μια ευρεία κατανομή σε αλατούχες λίμνες σε όλο τον κόσμο και έχει γίνει ένα πρότυπο είδος για μελέτες στην οικολογία και την εξέλιξη. (18) Υπάρχουν κάποιοι παράμετροι νερού οι οποίοι συμβάλλουν στην αποδοτική καλλιέργειά του. Αρχικά μία παράμετρος είναι το οξυγόνο το οποίο θα πρέπει να είναι κοντά στον ατμοσφαιρικό κορεσμό στα 8 mg/L. Μία άλλη παράμετρος είναι η θερμοκρασία, η οποία ιδανικά είναι στους 26° – 27° C, αλλά κυμαίνεται από τους 10° – 35° αν και υπάρχει πολύ μικρή παραγωγή στις ακραίες θερμοκρασιακές συνθήκες. Το pH είναι μία πολύ σημαντική παράμετρος η οποία θα πρέπει να κυμαίνεται από 6,5-8,5 καθώς πέρα από το συγκεκριμένο εύρος παρατηρείται stress. Τέλος η αλατότητα κυμαίνεται σε ποσοστά από 3 έως 50ppt. Το ιδανικό για αρκετά είδη είναι από 10 έως 20ppt.(7) Το μήκος του σώματος τους αν και ενίοτε φτάνει μέχρι και τα 2mm, σπάνια ξεπερνά τα 0,5 mm. Έχει μήκος 150-350 μm. Τα αρσενικά άτομα παρουσιάζουν μικρότερα μεγέθη και είναι λιγότερο ανεπτυγμένα από τα θηλυκά (κάποια αρσενικά εμφανίζουν μήκος μόλις 60 μm.). Το σώμα όλων των ειδών παρουσιάζει αμφίπλευρη συμμετρία. Η δομή του χαρακτηρίζεται ως ευτελική και συνκυτιακή, δηλαδή αποτελείται από ένα σταθερό αριθμό κυττάρων. Συγκεκριμένα στα είδη του γένους *Brachionus* τα κύτταρα είναι περίπου 1000 και μάλιστα θα λέγαμε ότι αυτά δεν αποτελούν το καθένα μια ξεχωριστή οντότητα, αλλά μάλλον σχηματίζουν όλα μαζί μια πλασματική περιοχή. Στην πραγματικότητα τα κύτταρα αυτά είναι πολλοί πυρήνες μέσα σε ένα μεγάλο κοινό πρωτόπλασμα. Το σώμα των τροχοζώων διαιρείται σε τρία ευδιάκριτα μέρη, που είναι:

α. η κεφαλική περιοχή

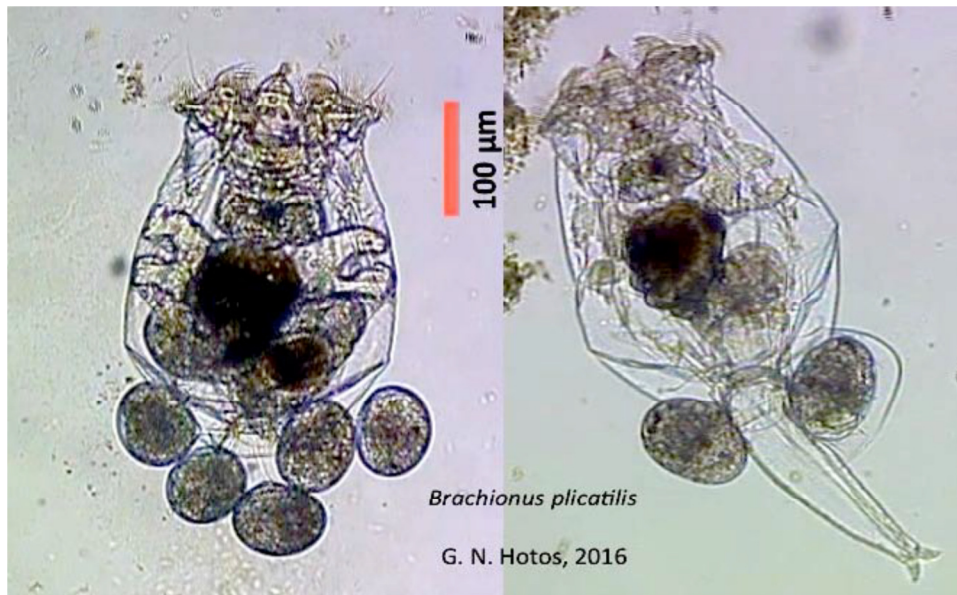
β. ο κορμός

γ. ο πόδας.



Σχήμα 14 Βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά με σύγκριση μεγεθών και σωματικής κατασκευής μεταξύ αρσενικού και θηλυκού ατόμου ενός τροχοζώου. ( από Hotos, 2016)

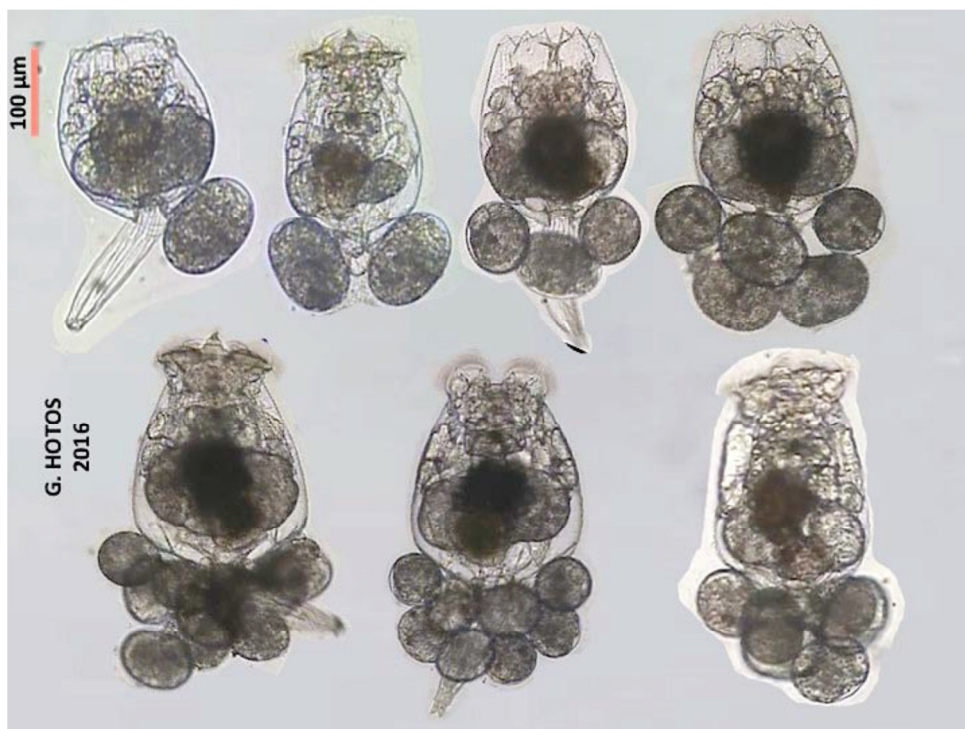
Η κεφαλική περιοχή φέρει στο ανώτερο τμήμα της μία βλεφαριδοφόρο στεφάνη, που ονομάζεται corona, της οποίας η εμφάνιση με τη γρήγορη κίνηση των βλεφαρίδων θυμίζει «τροχό σε κίνηση». Η ύπαρξη της corona διασφαλίζει τη μετακίνηση και την περιστροφική κίνηση στο νερό, που διευκολύνει τη πρόσληψη μικρών θρεπτικών αιωρούμενων στο νερό μικροσωματιδίων (κυρίως φύκη). Ένας τύπος μεγέθους είναι ο Small ή S-τύπος με μέγεθος 120-180  $\mu\text{m}$  και ο άλλος ο Large ή L-τύπος με μέγεθος 250-350  $\mu\text{m}$ . Ο S-τύπος διακρίνεται από τη στρογγυλότερη στεφάνη (corona) με τις πιο οξύληκτες «άκανθες» της και είναι γενικά θερμοφίλος με βέλτιστα χαρακτηριστικά ανάπτυξης σε θερμοκρασίες άνω των 20  $^{\circ}\text{C}$ . Ο L-τύπος διακρίνεται για την πιο επιμηκυμένη του στεφάνη στην οποία οι «άκανθες» της είναι πιο αμβλείες απ' ό,τι στον S-τύπο. Ο L-τύπος έχει μεγαλύτερη αντοχή στις χαμηλότερες των 20  $^{\circ}\text{C}$  θερμοκρασίες και μπορεί εξ' αυτού να θεωρηθεί καλύτερο θήραμα για τις νύμφες των ψαριών που ζουν σε ψυχρότερα νερά. Τα είδη του *Brachionus* μπορούν φυσιολογικά να αναπαράγονται αμικτικά και μικτικά (κυκλική παρθενογένεση). Κατά την παρθενογένεση το θηλυκό παράγει ακριβή γενετικά αντίγραφα του εαυτού του, δηλαδή κλώνους. Μάλιστα, ορισμένα θηλυκά που γίνονται «μικτικά» παράγουν ειδικά μικρά αυγά από τα οποία θα προκύψουν αρσενικά μικρά άτομα. Η αμικτική αναπαραγωγή είναι πιο γρήγορη με αποτέλεσμα την ταχύτερη αύξηση του πληθυσμού, το οποίο βοηθά σε σημαντικό βαθμό την εντατική καλλιέργεια των *Rotifers*. Όταν οι συνθήκες είναι ακατάλληλες τότε χρησιμοποιούν τη μικτική αναπαραγωγή. Η παραγωγή των μικτικών θηλυκών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αλατότητα, την πυκνότητα και την ποιότητα και ποσότητα της τροφής τους. Κατά το μικτικό τρόπο τα μικτικά θηλυκά γονιμοποιούνται από τα μικτικά αρσενικά και παράγονται αυγά διάρκειας ή διάπαυσης με υποχρεωτικό λανθάνοντα χρόνο τουλάχιστον ενός μηνός.



Σχήμα 15 Θηλυκά μικτικά άτομα *Brachionus plicatilis* με 5 αυγά (αριστερά) και 2 αυγά (δεξιά) . ( από Hotos, 2016)

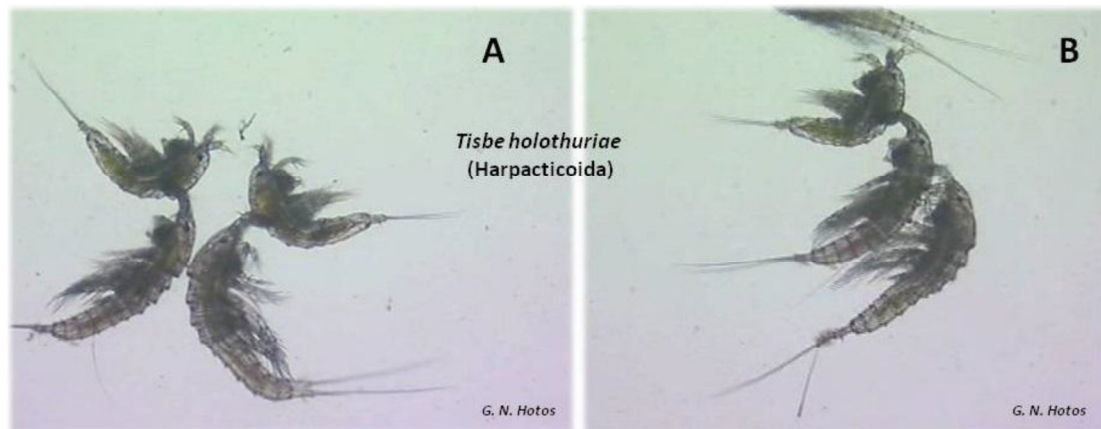
Ο προτιμότερος τρόπος αναπαραγωγής είναι ο αμικτικός για τους εξής λόγους:

1. Είναι ταχύτερος
2. Προκαλεί κατάρρευση της καλλιέργειας
3. Τα αρσενικά που παράγονται κατά τον μικτικό τρόπο έχουν χαμηλότερη θρεπτική αξία λόγω έλλειψης πεπτικού συστήματος. (23)



Σχήμα 16 Αμικτικά τροχόζωα *B. plicatilis* με ποικίλο αριθμό αμικτικών αυγών προσκολλημένων στο θηλυκό άτομο. ( από Hotos, 2016)

*Tisbe* sp.



Σχήμα 17 Απεικόνιση του *Tisbe* sp. Στο Α φαίνονται 2 ζεύγη της αναπαραγωγής κωπηπόδων *Tisbe holothuriae* με τα ευμεγέθη αρσενικά να συγκρατούν με τις κεραιές του 1ου ζεύγους των το θηλυκό. Στο Β μια παράξενη συνεύρεση όπου στη ράχη του αρσενικού που έχει συλλάβει ένα θηλυκό έχει προσκολληθεί ένα άλλο αρσενικό. Αγνωστη η σημασία αυτής της πρακτικής η οποία παρατηρήθηκε συχνά στο είδος αυτό ( Γ. Χώτος, 2017).

Ταξινόμηση :

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

Subphylum: *Crustacea*

Superclass: *Multicrustacea*

Subclass: *Copepoda*

Infraclass: *Neocopepoda*

Superorder: *Podoplea*

Order: *Harpacticoida*

Family: *Tisbidae*

Genus: *Tisbe*

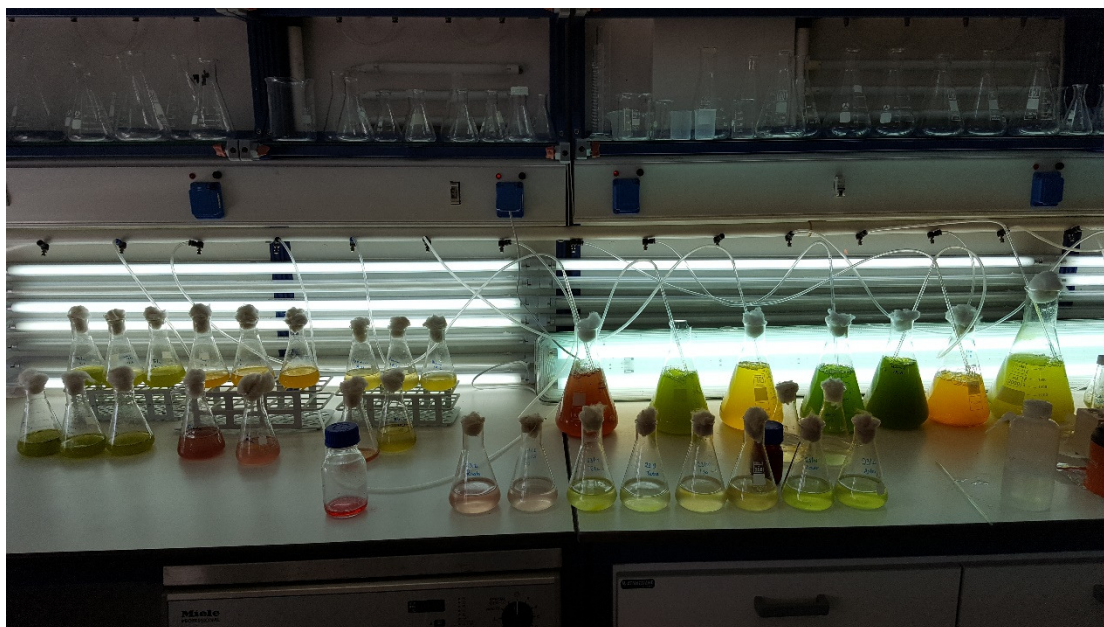
Ως μέλη της τάξης *Harpracticoida*, το γένος *Tisbe* χαρακτηρίζεται από ένα μοναδικό ζευγάρι βραχόμαυρων κεραιών βραχείας διάρκειας, ένα δεύτερο ζευγάρι κεραιές και μια ευρεία κοιλιά με το τέταρτο και πέμπτο τμήμα τους να ενώνονται. Η ταυτοποίηση των ειδών αυτού του γένους είναι ιδιαίτερος δύσκολη, καθώς είναι απαραίτητη μια λεπτομερής παρατήρηση ή ακόμη και πειράματα καλλιέργειας (20). Διευκολύνει την καλλιέργεια καθώς προσδίδει υψηλή γονιμότητα, σύντομο χρόνο παραγωγής, ανοχή σε περιβαλλοντικές αλλαγές (αλατότητες κυμαινόμενες από 15-70 ‰, θερμοκρασίες από 17-30°C), αποδοχή σε μεγάλο εύρος τροφών (μικροφύκη, μαγιά, ξηρή τροφή), μεγάλες σε αριθμό πυκνότητες (περ. 412 άτομα/ml). (23)

## Υλικά και Μέθοδοι

Και τα δύο πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο ΑΤΕΙ, στο τμήμα Τεχνολογίας Αλιείας- Υδατοκαλλιεργειών, στο εργαστήριο Καλλιέργειας Πλαγκτού.

### 1<sup>ο</sup> πείραμα

### Πείραμα αλληλοπάθειας μικτής καλλιέργειας φυτοπλαγκτού



Σχήμα 18 Στα αριστερά φαίνονται οι καθαρές καλλιέργειες. Στα δεξιά φαίνονται οι καλλιέργειες (τριπλέτες) των 500ml που φτιάξαμε. Στο μπροστινό τμήμα του πάγκου φαίνονται οι καθαρές καλλιέργειες που θα αντικαταστήσουν αυτές στα αριστερά.

### **Σκοπός 1<sup>ο</sup> πειράματος:**

Παρατήρηση αλληλοπάθειας σε μείγμα μικροφυκών που αναπτύσσονται μαζί. Το φύκος *Asteromonas* το οποίο απομονώθηκε τοπικώς και καθώς έχει αλοανθεκτική ιδιότητα δοκιμάστηκε με άλλα 3 φύκη σε δύο συνδυασμούς.

### **Υλικά:**

- Φύκη (*Nannochloropsis oculata*, *Rhodomonas salina*, *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Asteromonas gracilis*)
- Κωνική φιάλη Erlenmeyer (250ml, 500ml)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Αποστειρωμένο λιπασμένο θαλασσινό νερό 35ppt
- Βιταμίνες
- Πλάκα Fuchs-Rosenthal
- Μικροσκόπιο
- Υδρόφιλο βαμβάκι
- Πλαστικές πιπέτες μίας χρήσης
- Αυτόκαυαστο
- Επικαλυπτρίδα
- Απιονισμένο νερό
- Αλουμινόχαρτο
- Θερμόμετρο
- Παροχή αέρα
- Lugol
- Ποτήρι ζέσεως
- Ζυγός ακριβείας

### **Μεθοδολογία:**

Το συγκεκριμένο πείραμα είναι σχετικά απλό, εκτός από κάποια σημεία τα οποία θέλουν αρκετή προσοχή τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω. Αρχικά καθαρίστηκαν ενδελεχώς οι κωνικές φιάλες καθώς και όλος ο υπόλοιπος εργαστηριακός εξοπλισμός ο οποίος επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε η παρασκευή των θρεπτικών σύμφωνα με την εκάστοτε συνταγή που δόθηκε, και στη συνέχεια τη βάλουμε στο αυτόκαυαστο για αποστείρωση στους 110°C για 20 λεπτά. Ακολούθως αναμειγνύουμε τις δύο συνταγές των θρεπτικών και τα ξαναβάζουμε για αποστείρωση μαζί με το νερό για την παρασκευή των βιταμινών. Αφού τελειώσει η αποστείρωση φτιάχνουμε τις βιταμίνες ακολουθώντας πιστά την συνταγή με τη βοήθεια ζυγού ακριβείας. Βάζουμε και αναδεύουμε σε νερό 35ppt τα θρεπτικά σε

ποσότητα 1,8 ml, στα 100 σύνολο, σε 10 κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 ml και αφού τοποθετήσουμε στο στόμιο υδρόφιλο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο τις τοποθετούμε για αποστείρωση. Επίσης επειδή πρέπει να κρατήσουμε καθαρές καλλιέργειες βάζουμε σε δοκιμαστικούς σωλήνες, 11 στο σύνολο, 10 ml νερό 35ppt μαζί με θρεπτικά και τους ταπώνουμε με υδρόφιλο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο και τους τοποθετούμε και αυτούς για αποστείρωση μαζί με τις φιάλες.



Σχήμα 19 Προετοιμασία δοκιμαστικών σωλήνων για τη δημιουργία και αντικατάσταση παλιών καθαρών καλλιεργειών.



Σχήμα 20 Δημιουργία αποστειρωμένων συνθηκών με το φλόγιστρο για την αντικατάσταση καθαρών καλλιεργειών.



Αρχικά στις κωνικές φιάλες των 250 ml τοποθετήσαμε *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Rhodomonas salina*, *Nannochloropsis oculata*, *Asteromonas gracilis* ( 2 φιάλες για το κάθε φύκος) και χρησιμοποιήσαμε 20 ml φύκος. Ενώ στους δοκιμαστικούς βάλουμε 2 ml από τα προαναφερθέντα φύκη ( 2 δοκιμαστικοί σωλήνες για το κάθε φύκος. Και στους δοκιμαστικούς αλλά και στις κωνικές φιάλες ρίξαμε από μία σταγόνα βιταμίνες.

Επιπροσθέτως κάναμε και 2 συνδυασμούς φυκών σε 500 ml κωνικές φιάλες στις οποίες βάλουμε 50 ml φύκος και οι συνδυασμοί είναι:

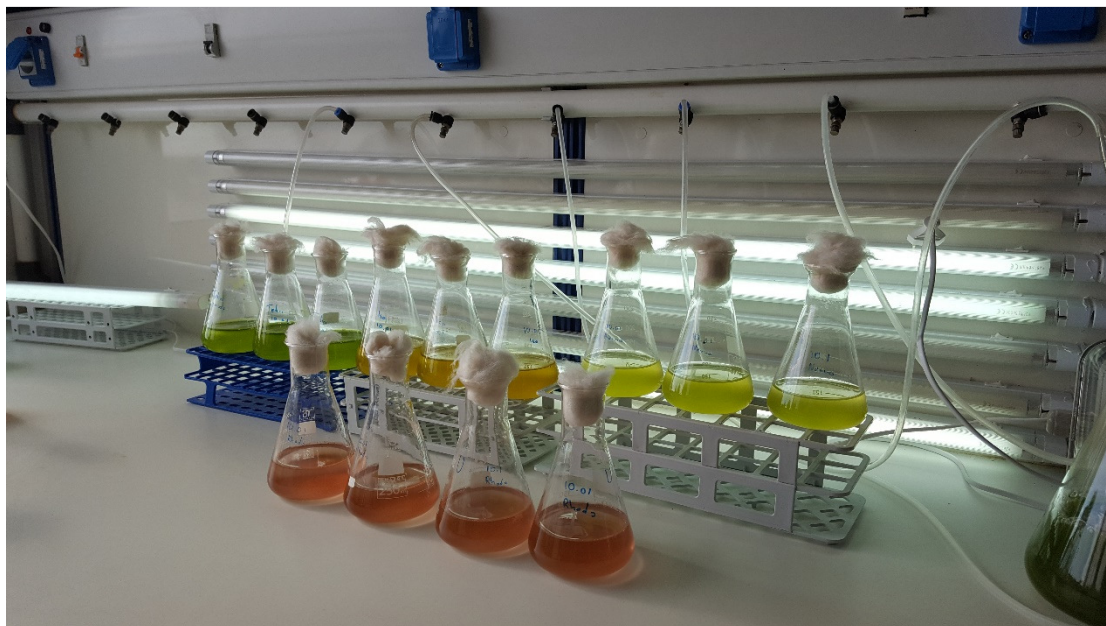
1. *Asteromonas gracilis*  
*Rhodomonas salina*  
*Isochrysis galbana*
2. *Asteromonas gracilis*  
*Tetraselmis suecica*  
*Isochrysis galbana*

Αλλά και 4 κωνικές φιάλες των 500ml οι οποίες περιέχουν 50 ml από διαφορετικό φύκος (*Rhodomonas salina*, *Isochrysis galbana*, *Asteromonas gracilis*, *Tetraselmis suecica*).



Σχήμα 21 Κωνικές φιάλες των 250ml με διαφορετικό φύκος η κάθε μία. Από αριστερά προς δεξιά (*Tetraselmis suecica*, *Rhodomonas salina*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis oculata*, *Asteromonas gracilis*).

Ανά 7 μέρες ξανά κάναμε την διαδικασία στις φιάλες των 250 ml έτσι ώστε να έχουμε καθαρές καλλιέργειες.

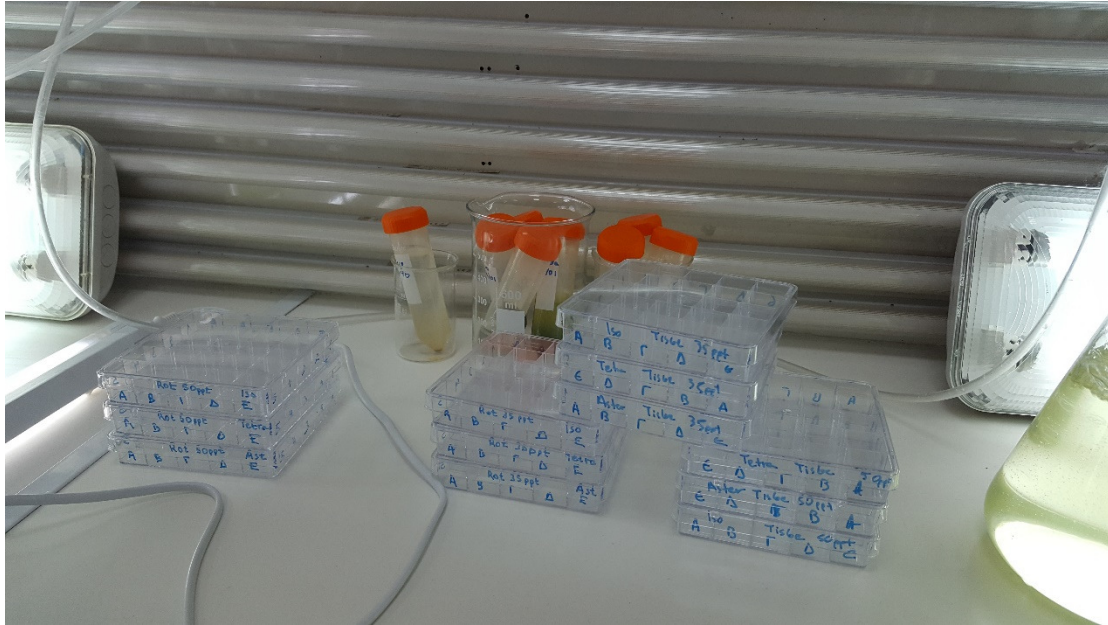


Σχήμα 22 Καθαρές καλλιέργειες των 250ml οι οποίες ανανεωνόντουσαν ανά εβδομάδα περίπου.

Ο όλος σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι να παρατηρήσουμε την ανάπτυξη των φυκών σε ένα εύρος χρόνου αλλά και να δούμε αν στις τριπλέτες φυκών θα υπερισχύσει κάποιο φύκος. Για να πραγματοποιηθεί αυτό πήραμε μία μικρή ποσότητα φύκους σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα και τοποθετήσαμε Lugol για την ακινητοποίηση των φυκών. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε πλάκα Fuchs-Rosenthal με επικαλυπρίδα και μετρήθηκαν στο μικροσκόπιο.

## 2<sup>ο</sup> πείραμα

Επίδραση διαφορετικών φυκών ως τροφή στην αύξηση του πληθυσμού ετερότροφων οργανισμών.



Σχήμα 23 Τετραγωνάκια καλλιέργειας (*Rotifer*, *Tisbe* sp) με δύο διαφορετικές αλατότητες.

### Σκοπός 2<sup>ου</sup> πειράματος:

Ήταν να δοκιμαστούν σε δύο αλατότητες και σε θρεπτικό υπόστρωμα τριών διαφορετικών μικροφυκών οι αυξήσεις πληθυσμών τριών ετερότροφων οργανισμών χρήσιμων ή δυνητικώς χρήσιμων για τις λαρβοκαλλιέργειες.

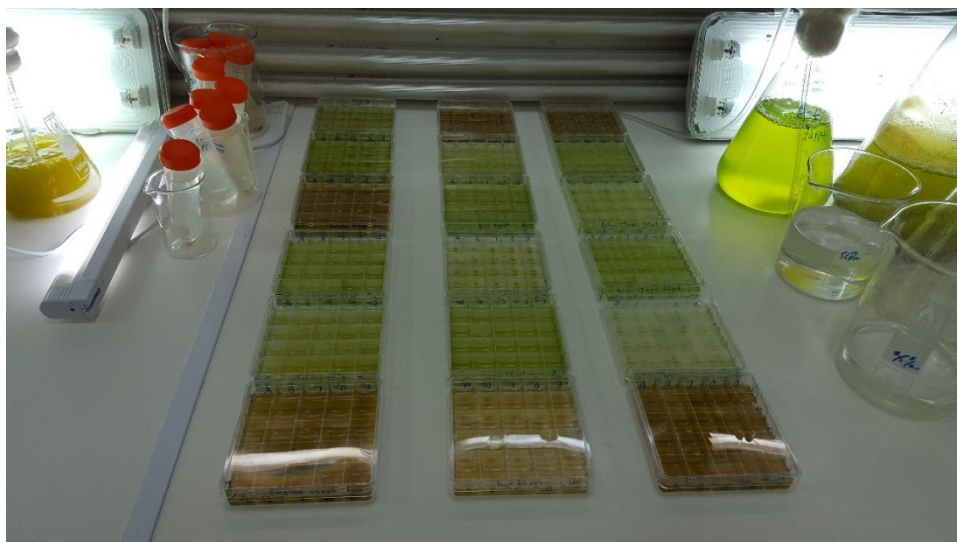
### Υλικά:

- Καθαρή καλλιέργεια φυκών (*Asteromonas gracilis*, *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*)
- Στερεοσκόπιο
- Τροχόζωα (*Rotifer*)
- Κωπήποδα (*Tisbe* sp.)
- Πρωτόζωο (*Fabrea salina*)
- Αυτόκαυστο
- Αποστειρωμένο λιπασμένο θαλασσινό νερό 35ppt και 50ppt
- Πλαστικά τετράγωνα των 25 θέσεων το κάθε ένα (18τμχ)
- Στερεοσκόπιο
- Τρυβλίο πέτρι
- Απιονισμένο νερό

- Πλαστικές πιπέτες μίας χρήσης
- Lugol
- Μαρκαδόρος
- Θερμόμετρο
- Ειδικά τροποποιημένη πιπέτα για την δειγματοληψία των τροχοζώων, κωπηπόδων και βλεφαριδωτών
- Αυτόματη πιπέτα
- Δρομέας
- Αλουμινόχαρτο
- Υδρόφιλο βαμβάκι

### Μεθοδολογία:

Αρχικά και εν συνεχεία του πρώτου πειράματος τοποθετήσαμε στα τετραγωνάκια 2 ml αποστειρωμένο θαλασσινό νερό 35ppt και 50 ppt αντίστοιχα στο κάθε ένα. Κατόπιν με το ειδικά τροποποιημένο σωληνάκι πήραμε από καθαρές καλλιέργειες των *Fabrea salina*, *Rotifers* και *Tisbe sp*, και τοποθετήσαμε από 2-3 σε κάθε ένα τετραγωνάκι καταγράφοντας πάντα τον αριθμό τους για την σωστή μετέπειτα καταμέτρηση. Εν συνεχεία τοποθετήσαμε με την αυτόματη πιπέτα 1 ml φύκος ( *Asteromonas gracilis*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* ) τόσο στο τετράγωνο με 35 ppt αλλά και στο τετράγωνο των 50 ppt ως τροφή, δημιουργώντας έτσι τετράγωνα με 35ppt *Fabrea salina* και ως τροφή *Asteromonas gracilis* και ούτω καθ' εξής μέχρι να έχουμε από όλους τους πιθανούς συνδυασμούς. Όσον αφορά τα τετράγωνα με τα *Rotifer* και *Tisbe* τοποθετήθηκαν από ένα αυγωμένο άτομο. Κατόπιν και αφού ολοκληρώσαμε την παραπάνω διαδικασία ξεκινήσαμε την καθημερινή καταμέτρηση η οποία διήρκησε 5 μέρες.



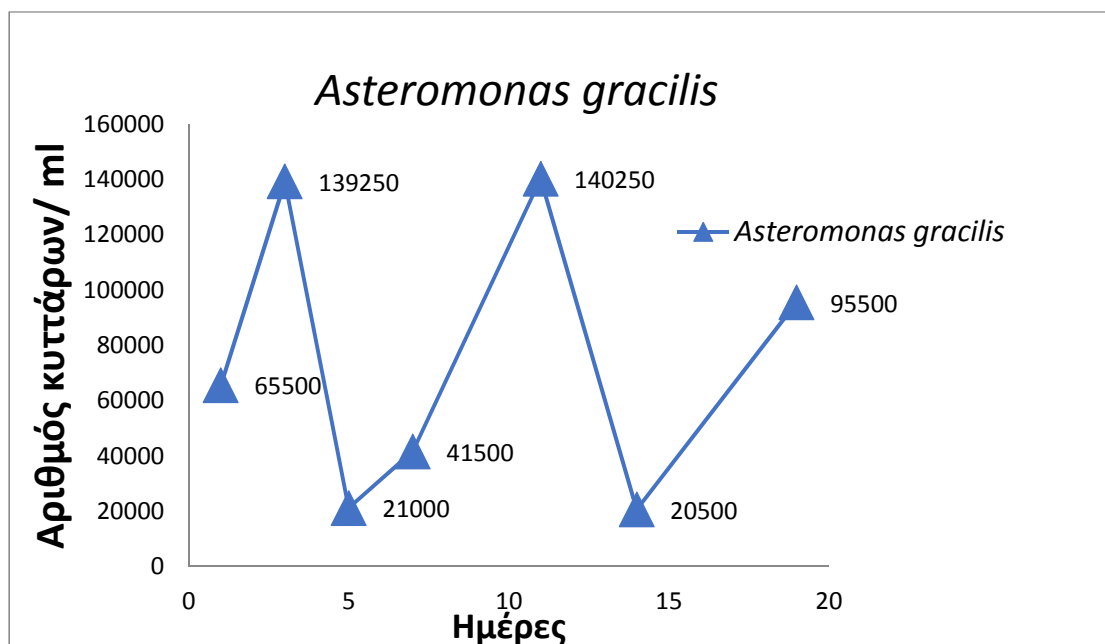
Σχήμα 24 Καλλιέργειες των *Rotifer*, *Tisbe sp*, *Fabrea salina* σε αλατότητες 35ppt και 50ppt



Σχήμα 25 Τοποθέτηση λιπασμένου νερού δύο αλατοτήτων (35ppt και 50ppt) στα τετραγωνάκια.

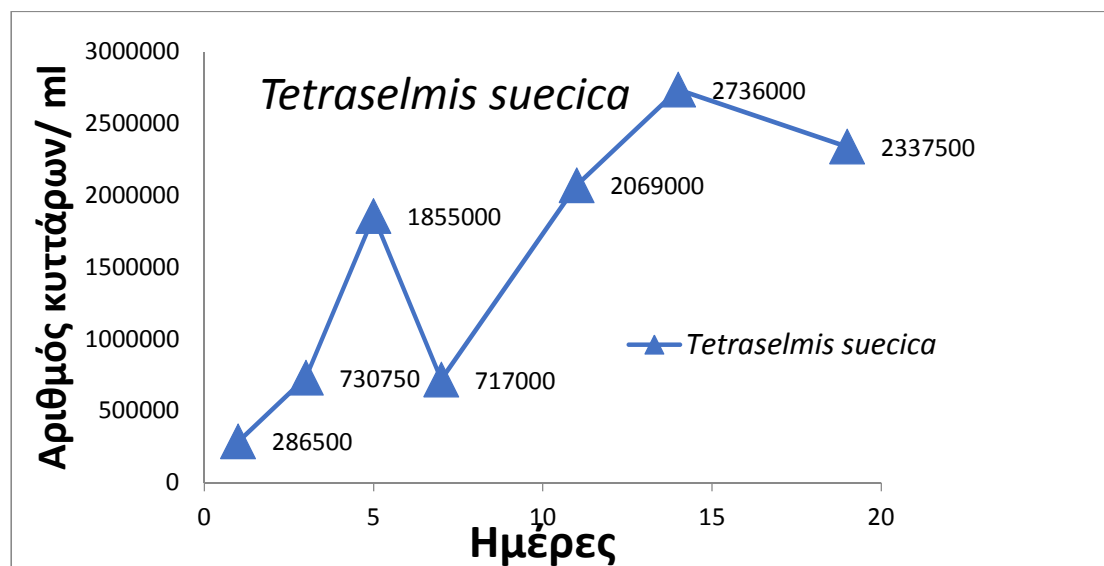
## Αποτελέσματα

### Αποτελέσματα 1<sup>ου</sup> πειράματος



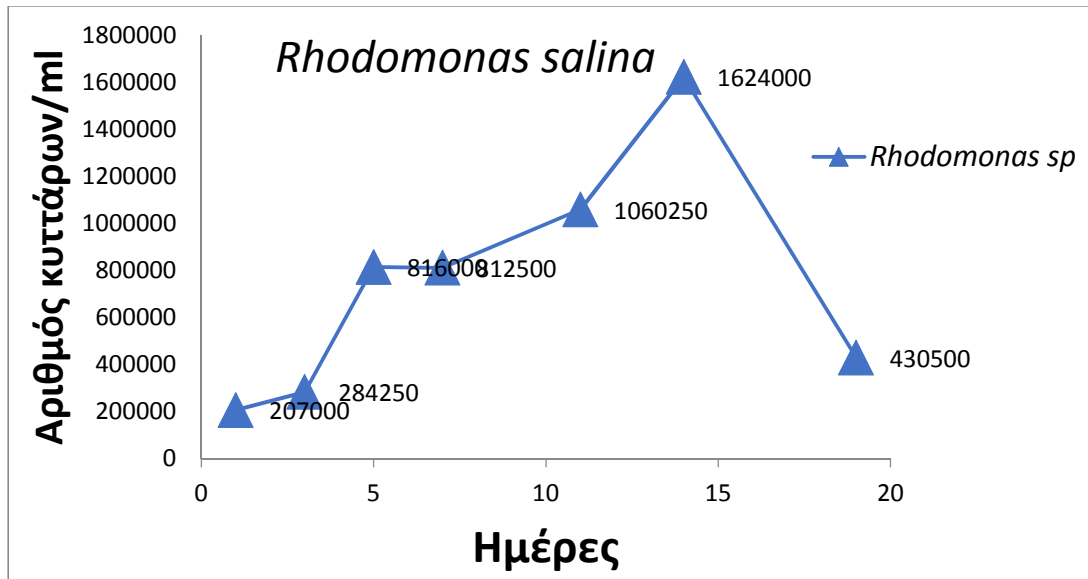
Σχήμα 26 Γράφημα ανάπτυξης του μικροφύκου *Asteromonas gracilis* σε κύτταρα/ ml στη διάρκεια της μονοκαλλιέργειάς του.

Στο παραπάνω γράφημα φαίνεται η ανάπτυξη της *Asteromonas gracilis* του μικροφύκου που απομονώσαμε σε καθαρή καλλιέργεια. Η καλλιέργεια ξεκίνησε στις 29 Νοέμβρη και τελείωσε στις 17 Δεκέμβρη. Από το παραπάνω γράφημα παρατηρείται επίσης και η μη σωστή ανάπτυξή της ή ακόμα και κάποιο λάθος το οποίο μπορεί να έγινε κατά την διάρκεια της εκτροφής της. Δεν αναμέναμε αυτά τα αποτελέσματα σχετικά με τα στάδια της ανάπτυξής της, καθώς θεωρείται από τα ανθεκτικά μικροφύκη.



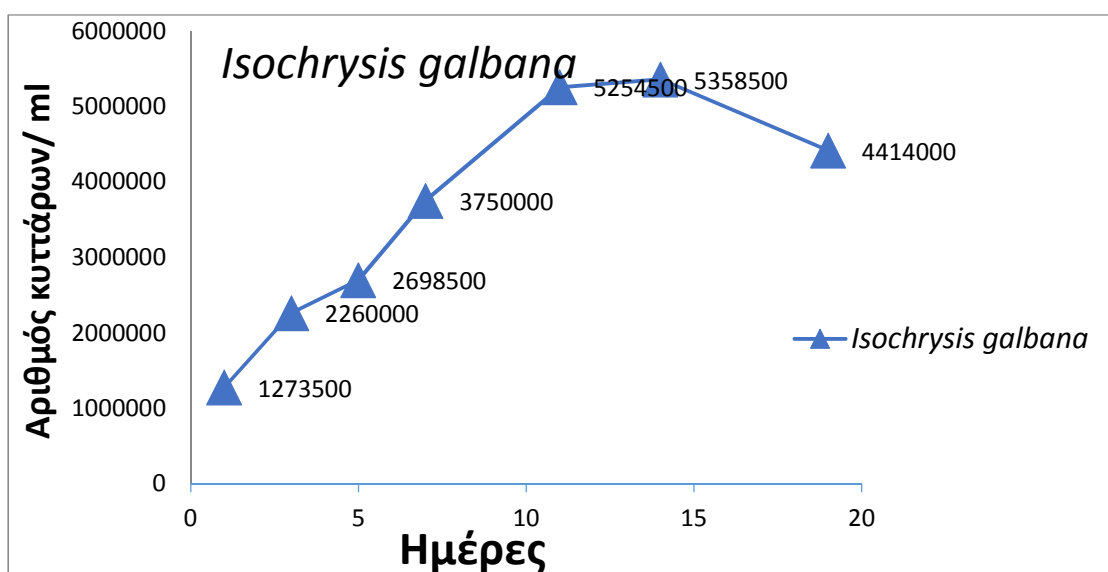
Σχήμα 27 Γράφημα ανάπτυξης του μικροφύκου *Tetraselmis suecica* σε κύτταρα/ ml στη διάρκεια της μονοκαλλιέργειάς του.

Στο παραπάνω γράφημα φαίνεται η ανάπτυξη της *Tetraselmis suecica* του μικροφύκου που απομονώσαμε σε καθαρή καλλιέργεια. Η καλλιέργεια ξεκίνησε στις 29 Νοεμβρίου και τελείωσε στις 17 Δεκέμβρη. Από το παραπάνω γράφημα παρατηρείται πως είχε μία έντονη φάση πτωτικής τάσης ρυθμού αύξησης. Από την οποία όμως γρήγορα επανήλθε και συνέχισε την πορεία της στις επόμενες φάσεις ομαλά χωρίς κάποιο ιδιαίτερο πρόβλημα.



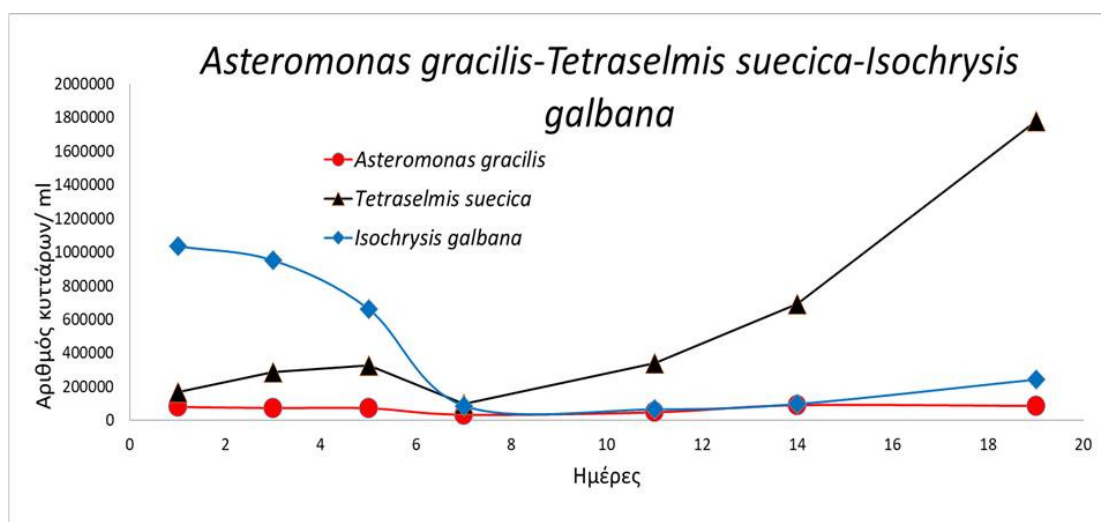
Σχήμα 28 Γράφημα ανάπτυξης του μικροφύκου *Rhodomonas salina* σε κύτταρα/ ml στη διάρκεια της μονοκαλλιέργειάς του.

Στο παραπάνω γράφημα φαίνεται η ανάπτυξη της *Rhodomonas salina* του μικροφύκου που απομονώσαμε σε καθαρή καλλιέργεια. Η καλλιέργεια ξεκίνησε στις 29 Νοεμβρίου και τελείωσε στις 17 Δεκέμβρη. Αυτό το οποίο παρατηρείται είναι πως ενώ αρχικά ξεκίνησε η καλλιέργειά της με ομαλούς ρυθμούς και πέρασε ομοιόμορφα από την φάση καθυστέρησης στην φάση εκθετικού ρυθμού αύξησης και έπειτα στην φάση πτωτικής τάσης ρυθμού αύξησης, υπήρξε ένα μικρό πρόβλημα κατά την στατική φάση η οποία παρουσίασε αύξηση ατόμων, κάτι το οποίο δεν ήταν αναμενόμενο.



Σχήμα 29 Γράφημα ανάπτυξης του μικροφύκου *Isochrysis galbana* σε κύτταρα/ ml στη διάρκεια της μονοκαλλιέργειάς του.

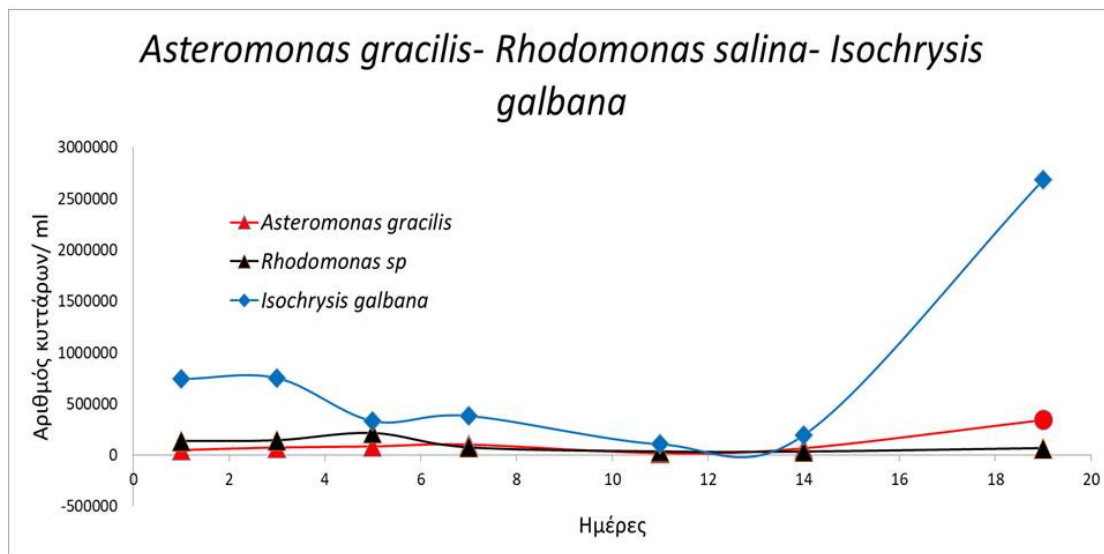
Στο παραπάνω γράφημα φαίνεται η ανάπτυξη της *Isochrysis galbana* του μικροφύκους που απομονώσαμε σε καθαρή καλλιέργεια. Η καλλιέργεια ξεκίνησε στις 29 Νοεμβρίου και τελείωσε στις 17 Δεκέμβρη. Αυτό το οποίο παρατηρείται είναι πως η *Isochrysis* είχε το καλύτερο αποτέλεσμα όσον αφορά την ανάπτυξη της καλλιέργειάς της καθώς πέρασε ομαλά από όλες τις φάσεις χωρίς να παρατηρηθεί κάποιο πρόβλημα στην εκτροφή της. Αυτό το οποίο αξίζει να σημειωθεί είναι ο αριθμός ατόμων ο οποίος καταμετρήθηκε κάθε φορά, κάτι το οποίο μας δείχνει πως υπήρχαν ορθές συνθήκες για την ευημερία του φύκου.



Σχήμα 30 Γράφημα ανάπτυξης μείγματος των μικροφυκών *Asteromonas gracilis*-*Tetraselmis suecica*-*Isochrysis galbana* σε κύτταρα/ ml στη διάρκεια της καλλιέργειάς των.

Στο παραπάνω γράφημα φαίνεται η ανάπτυξη της τριπλέτας *Asteromonas gracilis*- *Tetraselmis suecica*- *Isochrysis galbana*. Αυτό το οποίο παρατηρείται είναι πως καλύτερη ανάπτυξη είχε η *Tetraselmis suecica* ενώ παράλληλα η *Asteromonas gracilis* υπήρχε σε πολύ χαμηλά επίπεδα καθώς και όπως φαίνεται δεν επρόκειτο να ακολουθήσει τις 5 φάσεις της αύξησης της φυτοπλαγκτονικής καλλιέργειας. Παράλληλα η *Isochrysis galbana* ενώ στην αρχή φαίνεται ότι ξεκινάει να μας δίνει αποτελέσματα ενώ η *T. suecica* όχι τόσο, κατά την μέτρηση στις 5 Δεκέμβρη και έπειτα, η *Tetraselmis suecica* ξεκινάει και έχει αυξητική πορεία συνεχώς έως και την τελευταία μέτρηση ενώ η *Isochrysis galbana* αποκτά την ίδια χαμηλή ανάπτυξη την οποία αντιμετωπίζει η *Asteromonas gracilis*.





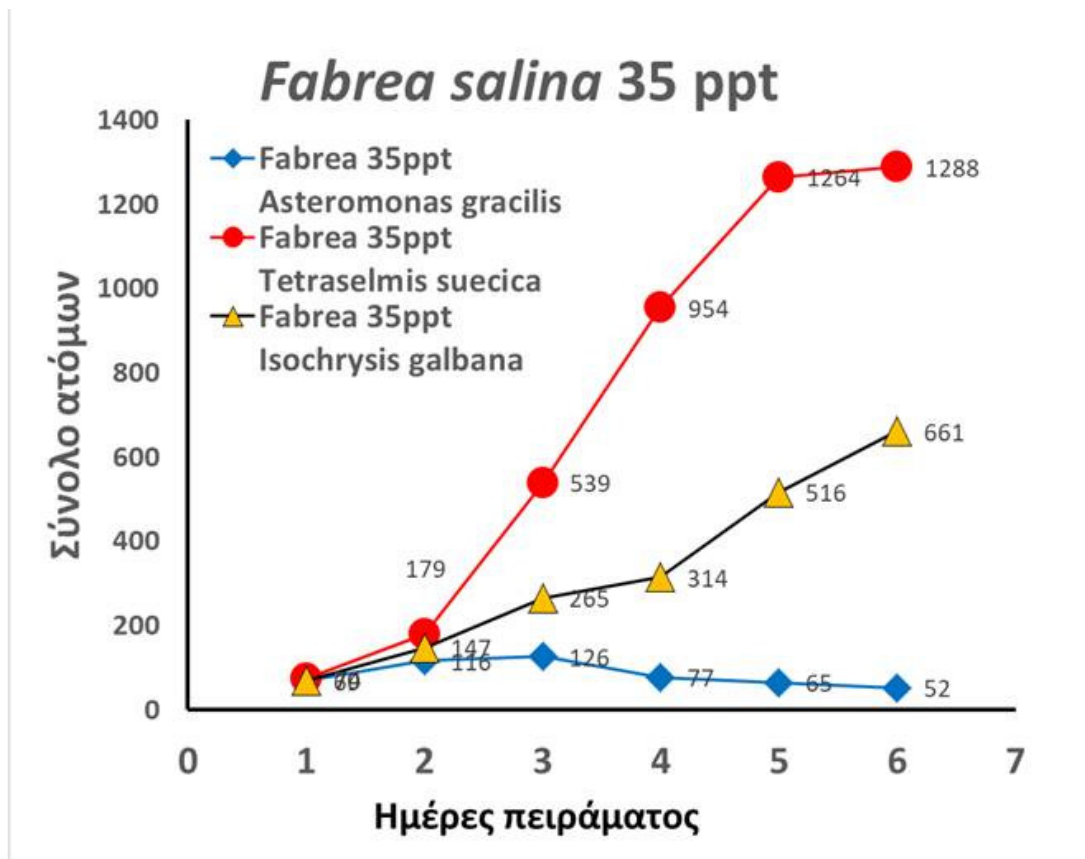
Σχήμα 31 Γράφημα ανάπτυξης μείγματος των μικροφυκών *Asteromonas gracilis*- *Rhodomonas salina*- *Isochrysis galbana* σε κύτταρα/ ml στη διάρκεια της καλλιέργειάς των.

Στο παραπάνω γράφημα φαίνεται η ανάπτυξη της τριπλέτας *Asteromonas gracilis*- *Tetraselmis suecica*- *Isochrysis galbana*. Αυτό το οποίο παρατηρείται με μία πρώτη ματιά είναι πως καλύτερη ανάπτυξη έχει η *Isochrysis*. Το ίδιο όπως και στην προηγούμενη τριπλέτα η *Asteromonas gracilis* είχε πολύ χαμηλή έως και καθόλου ανάπτυξη. Το ίδιο ισχύει και για την *Rhodomonas salina*, που ενώ ξεκίνησε, έστω και λίγο, την εκθετική αύξησή της, διακόπηκε απότομα και παρέμεινε σε πολύ χαμηλά επίπεδα πιο κάτω και από την *Asteromonas gracilis*.

Αυτό το οποίο αξίζει να σημειωθεί σε αυτό το σημείο είναι πως η *Asteromonas gracilis* που αναμέναμε να αναπτυχθεί και να ευημερήσει ανάμεσα στα άλλα είδη που επιλέχθηκαν δεν το έκανε, παρόλο που θεωρείται αρκετά ανθεκτικό και εύκολα αναπτυσσόμενο στις κατάλληλες συνθήκες φύκος.

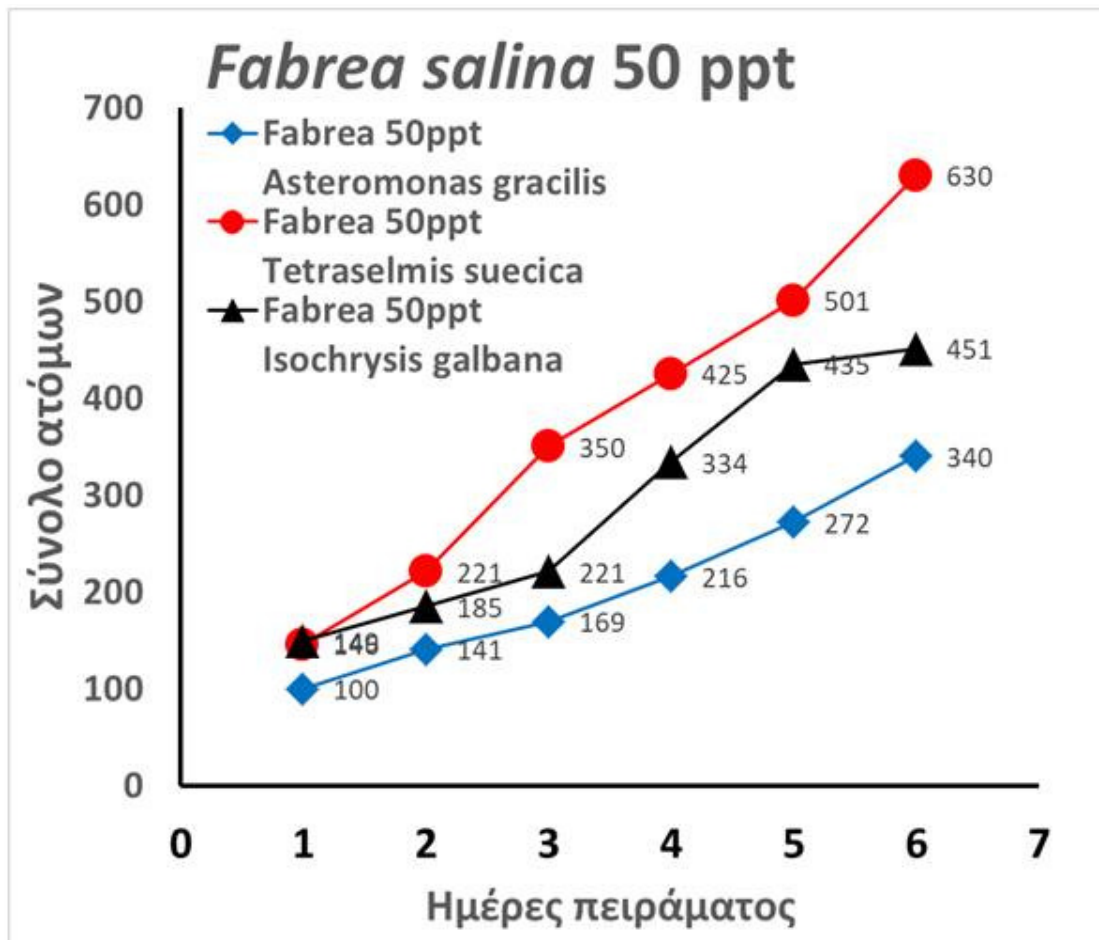
## Αποτελέσματα 2<sup>ου</sup> πειράματος

### Εξέλιξη αριθμού πυκνοτήτων



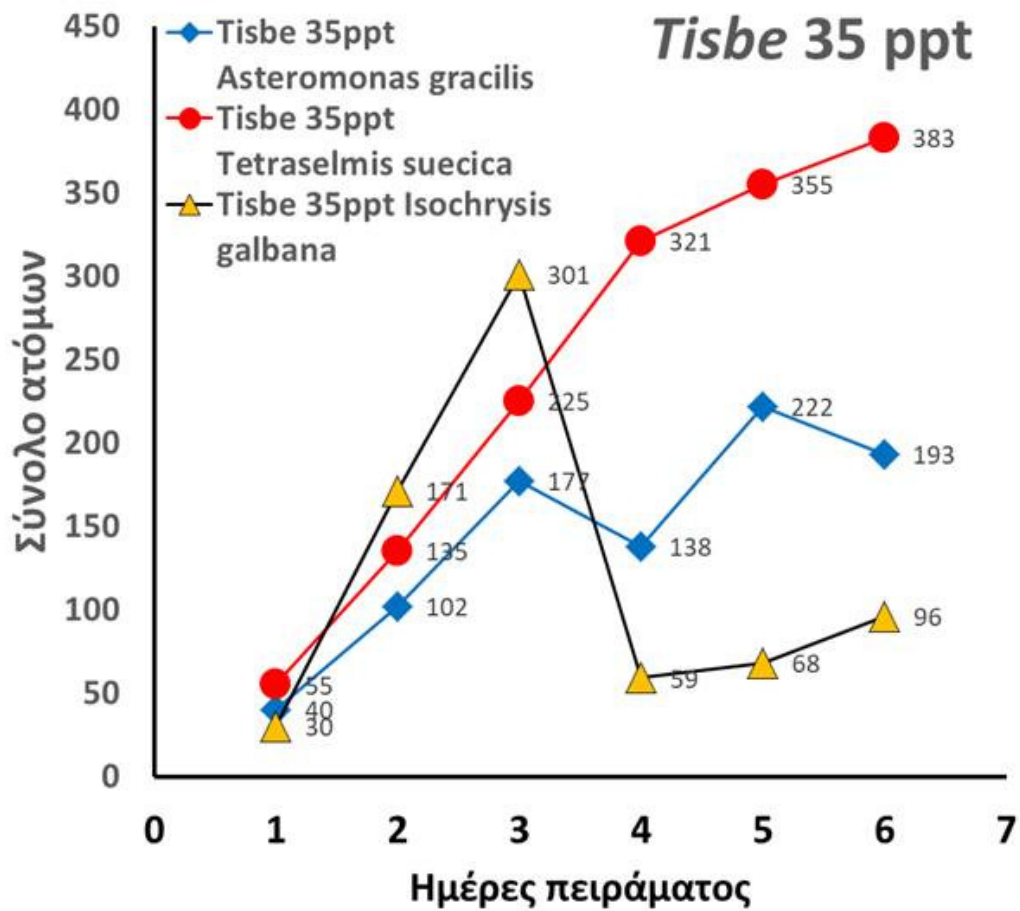
Σχήμα 32 Γράφημα εξέλιξης αριθμού πυκνοτήτων της *Fabrea salina* με αλατότητα 35ppt.

Στο παραπάνω γράφημα φαίνεται η εξέλιξη αριθμού πυκνοτήτων της *Fabrea salina* με αλατότητα 35ppt. Αυτό το οποίο διαπιστώνεται με μία πρώτη ματιά είναι η εξέλιξη της πυκνότητας της *Asteromonas gracilis*, η οποία κρατιέται σε αρκετά χαμηλά επίπεδα αλλά αυτό γιατί έχει καταναλωτική προτίμηση η *Fabrea salina* απέναντι σε αυτό το είδος. Την δεύτερη θέση της κατάταξης διαθέτει η *Isochrysis galbana* και την τρίτη η *Tetraselmis suecica* στην οποία δεν έχει κανένα απολύτως καταναλωτικό ενδιαφέρον η *Fabrea salina*, η οποία όχι μόνο αναπτύσσεται με πολύ μεγάλη ευκολία αλλά μπορούμε να διακρίνουμε και τις φάσεις της φυτοπλαγκτονικής καλλιέργειας.



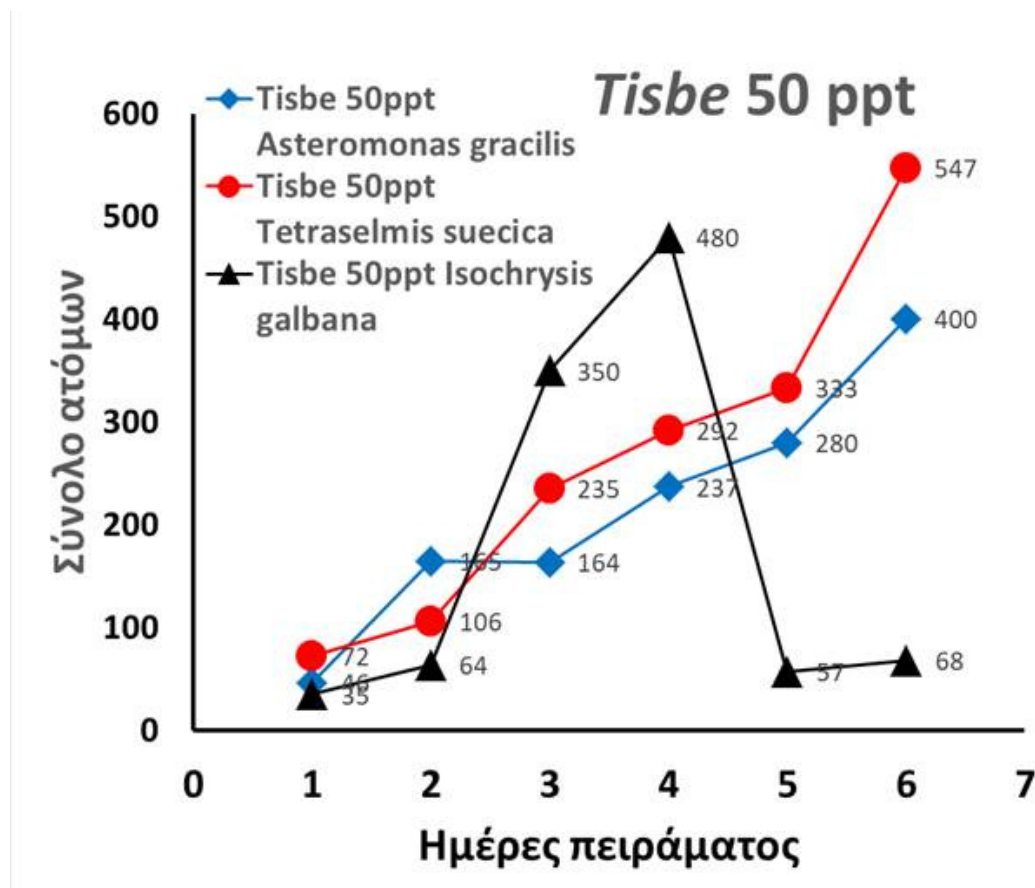
Σχήμα 33 Γράφημα εξέλιξης αριθμού πυκνοτήτων της *Fabrea salina* με αλατότητα 50ppt.

Στο παραπάνω γράφημα φαίνεται η εξέλιξη αριθμού πυκνοτήτων της *Fabrea salina* με αλατότητα 50ppt. Αυτό το οποίο διαπιστώνεται είναι πως δεν υπάρχει τόσο μεγάλη κατανάλωση σε σχεδόν κανένα από τα 3 είδη πέρα από την *Asteromonas gracilis*, η οποία και σε αυτή την αλατότητα κρατιέται σε αρκετά χαμηλά σε σχέση με τα άλλα φύκη επίπεδα. Αυτό ίσως και κυρίως για το γεγονός ότι η *Fabrea salina* δεν ευημερεί σε αυτή την αλατότητα.



Σχήμα 34 Γράφημα εξέλιξης αριθμού πυκνοτήτων για το *Tisbe sp* με αλατότητα 35ppt.

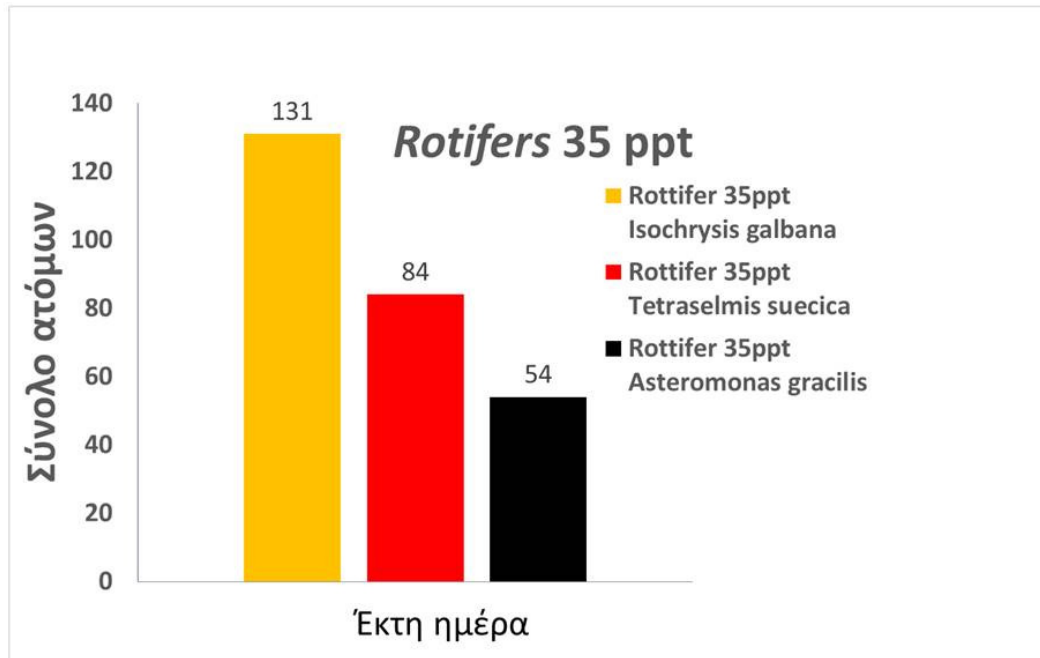
Σε αυτό το γράφημα φαίνεται η εξέλιξη του αριθμού των πυκνοτήτων για τα *Tisbe* με αλατότητα 35ppt. Αυτό το οποίο διαπιστώνεται είναι πως ενώ στην αρχή φαίνεται να πειραματίζεται με το ποια τροφή είναι κατάλληλη, ξεκινάει με την *Asteromonas gracilis* ενώ παράλληλα και με την *Isochrysis galbana*. Αυτή η τροφή η οποία του είναι τελείως αδιάφορη είναι η *Tetraselmis suecica*.



Σχήμα 35 Γράφημα εξέλιξης αριθμού πυκνοτήτων για το *Tisbe sp* με αλατότητα 50ppt.

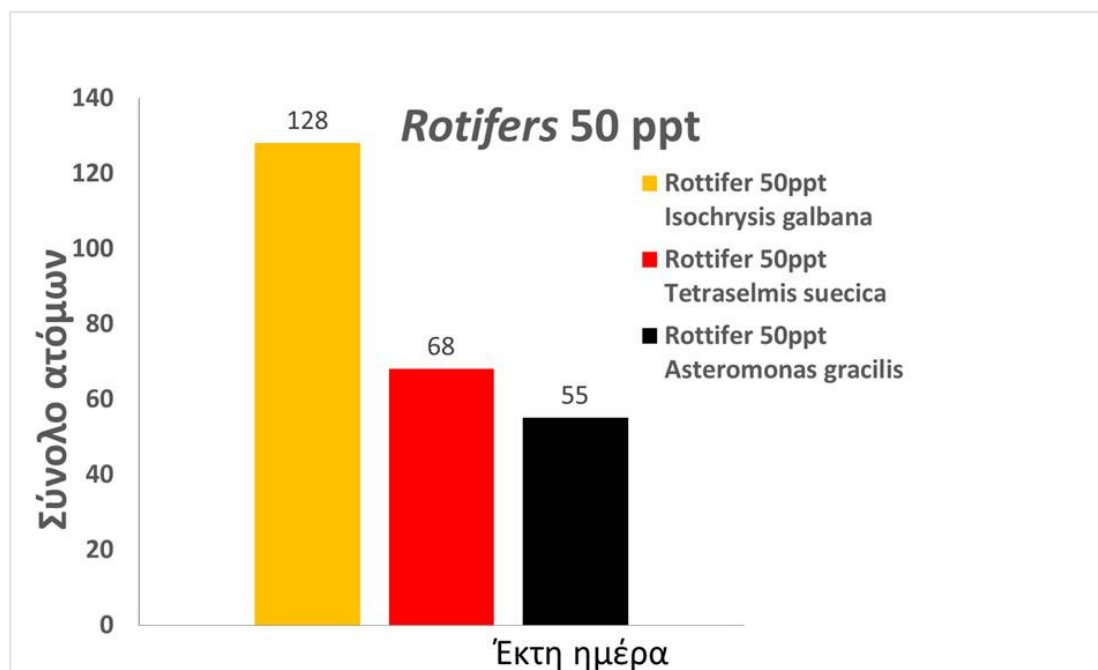
Σε αυτό το γράφημα φαίνεται η εξέλιξη του αριθμού των πυκνοτήτων για τα *Tisbe sp.* με αλατότητα 50ppt. Το συμπέρασμα το οποίο προκύπτει είναι πως δεν υπάρχει μεγάλη προτίμηση σε τροφή σε κανένα από τα τρία φύκη και μάλιστα μπορούμε να διακρίνουμε τις φάσεις αύξησης της φυτοπλαγκτονικής καλλιέργειας.

Εξχωριστή απόδοση



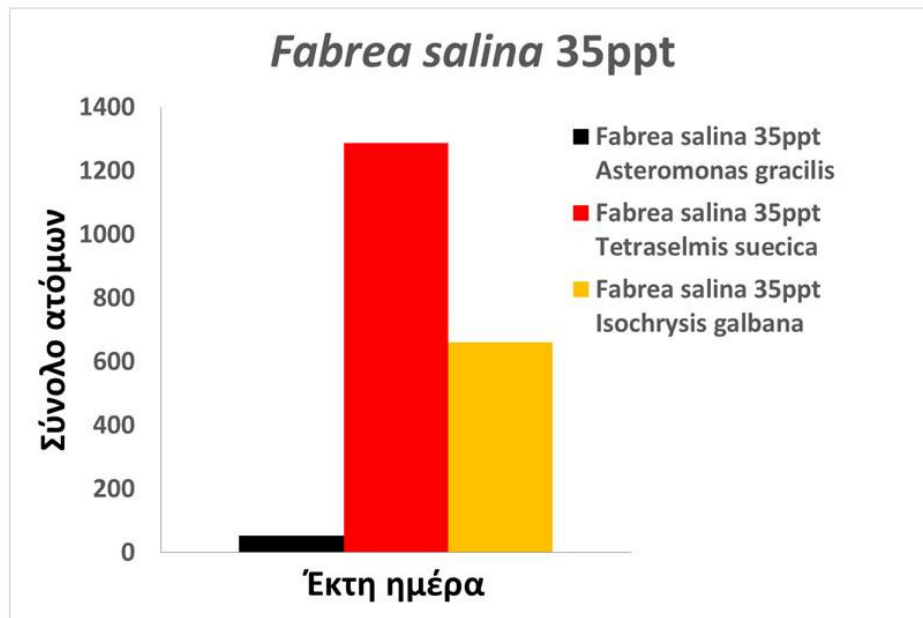
Σχήμα 36 Γράφημα εξέλιξης αριθμού πυκνοτήτων για τα *Rottifer* με αλατότητα 35ppt.

Σε αυτό το γράφημα φαίνεται η εξέλιξη αριθμού πυκνοτήτων για τα *Rottifer* με αλατότητα 35ppt. Αυτό το οποίο διαπιστώνεται είναι οι χαμηλές πυκνότητες και η προφανής προτίμηση σε φαγητό για την *Asteromonas gracilis* και για την *Tetraselmis suecica*, ενώ στην *Isochrysis galbana* δεν έδειξαν προτίμηση τα *Rottifer*, η οποία έφτασε σε αρκετά μεγάλες πυκνότητες και με αρκετά εμφανείς τις φάσεις της αύξησης της φυτοπλακτονικής καλλιέργειας.



Σχήμα 37 Γράφημα εξέλιξης αριθμού πυκνοτήτων για τα *Rottifer* με αλατότητα 50ppt.

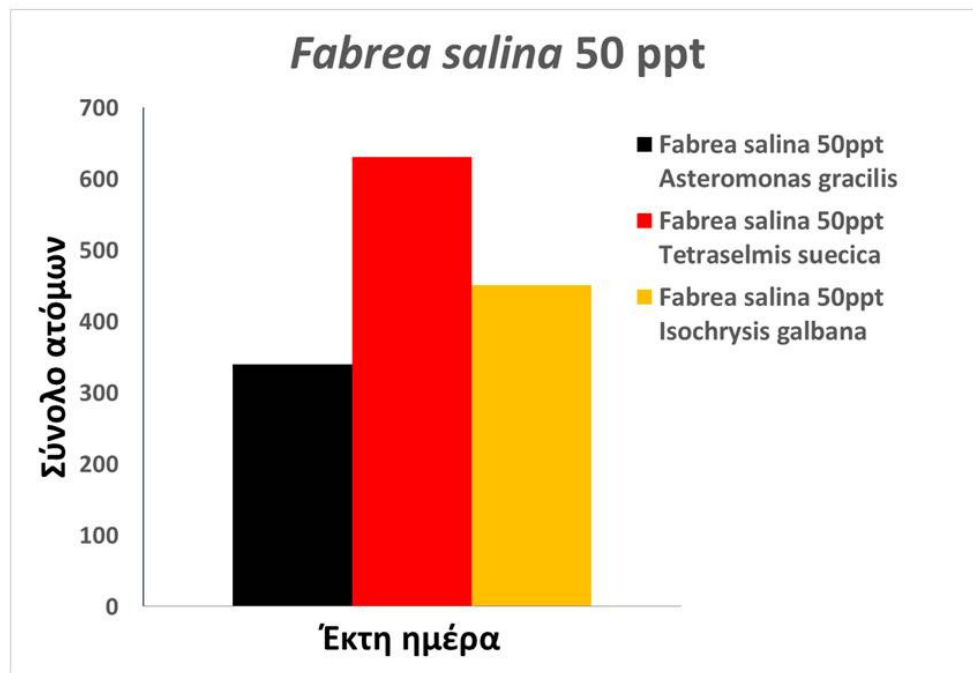
Σε αυτό το γράφημα φαίνεται η εξέλιξη αριθμού πυκνοτήτων για τα *Rottifer* με αλατότητα 50ppt. Τα συμπεράσματα που μπορούμε να βγάλουμε από αυτό είναι η ιδιαίτερη προτίμηση τόσο σε *Tetraselmis suecica* όσο και *Asteromonas gracilis*. Επίσης αυτό που παρατηρείται είναι πως και στην αλατότητα με 35ppt αλλά και στην 50ppt, ο αριθμός των πυκνοτήτων για την *Asteromonas gracilis* είναι ίδιος. Όσον αφορά την *Isochrysis galbana* δεν υπάρχει κάποια προτίμηση από τα *Rottifer*, όπου και εδώ διακρίνονται οι φάσεις της αύξησης της φυτοπλαγκτονικής καλλιέργειας.



Σχήμα 38 Γράφημα ξεχωριστής απόδοσης για την *Fabrea salina* με αλατότητα 35ppt.

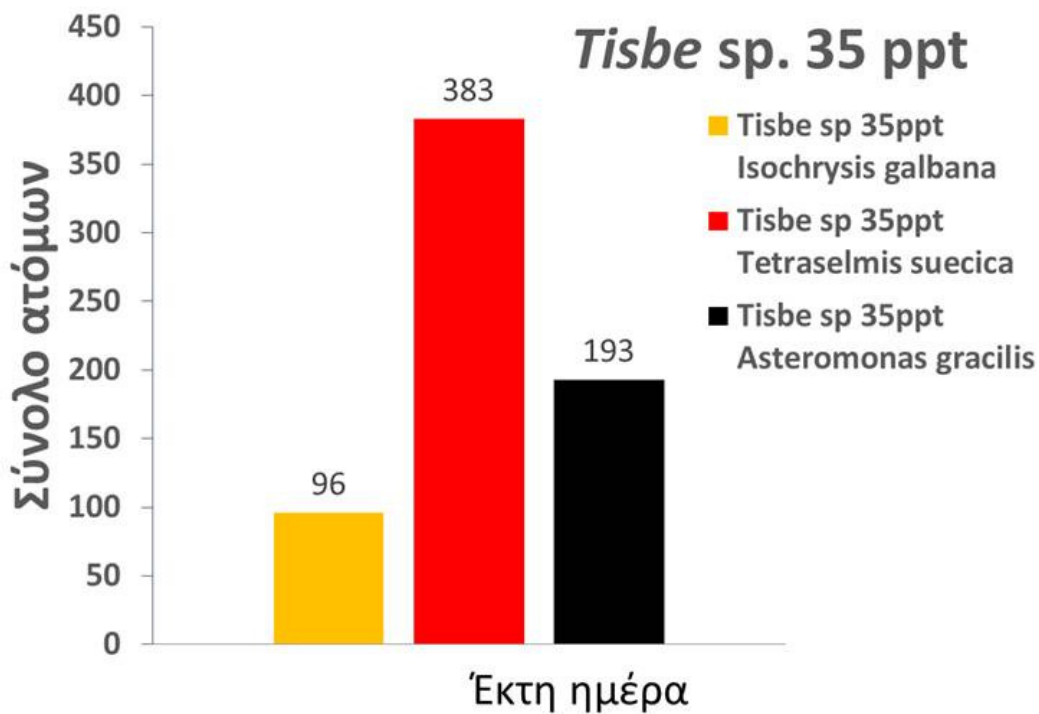
Σε αυτό το γράφημα φαίνεται η ξεχωριστή απόδοση των φυκών απέναντι στην *Fabrea salina* με αλατότητα 35 ppt. Αυτό το οποίο παρατηρείται είναι η ιδιαίτερη προτίμηση για την *Asteromonas gracilis*, η οποία είναι σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα άλλα δύο φύκη. Αυτή η οποία δεν έχει ιδιαίτερη προτίμηση είναι η *Tetraselmis suecica*, η οποία φαίνεται να αυξάνεται σε πολύ μεγαλύτερα επίπεδα μεταξύ των.





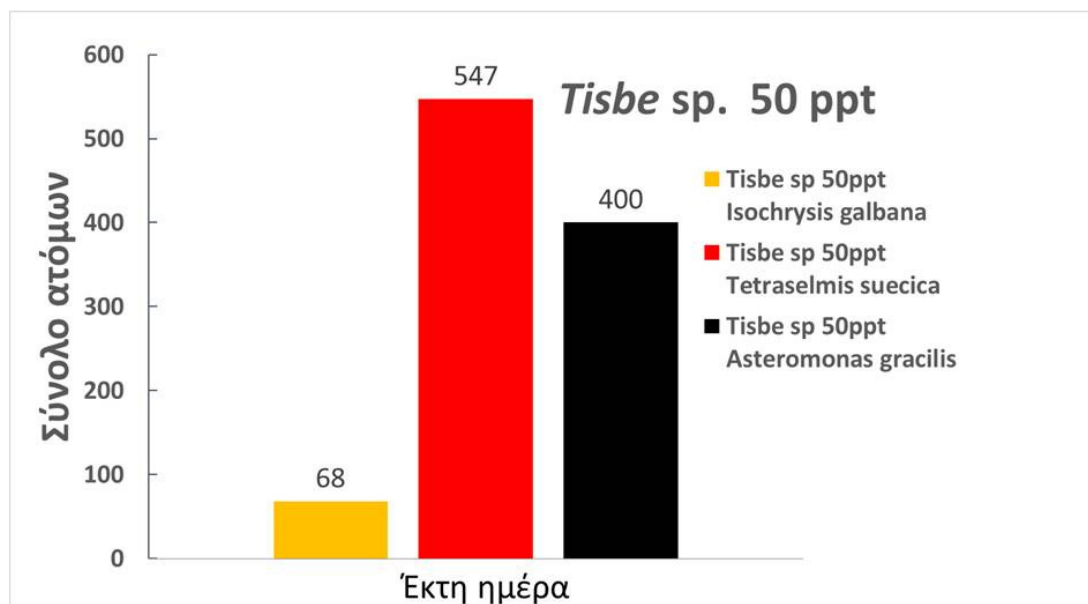
Σχήμα 39 Γράφημα ξεχωριστής απόδοσης για την *Fabrea salina* με αλατότητα 50ppt.

Σε αυτό το γράφημα φαίνονται οι συνολικές ξεχωριστές αποδόσεις για την *Fabrea salina* με αλατότητα 50ppt. Διαπιστώνεται και εδώ η προτίμησή της για την *Asteromonas gracilis*, αλλά βέβαια δεν φαίνεται να υπάρχει μεγάλη κατανάλωση όπως αυτή στα 35ppt.



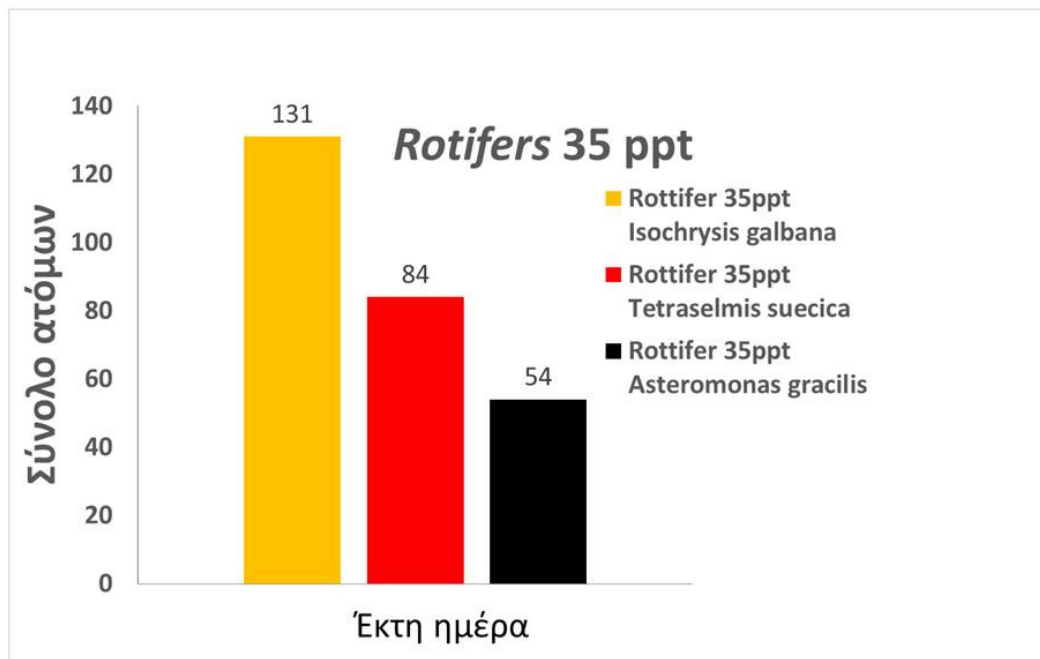
Σχήμα 40 Γράφημα ξεχωριστής απόδοσης για τα *Tisbe sp* με αλατότητα 35ppt.

Σε αυτό το γράφημα φαίνονται οι συνολικές ξεχωριστές αποδόσεις για τα *Tisbe sp* με αλατότητα 35ppt. Φαίνεται πως προτιμούν δύο τροφές τόσο την *Isochrysis galbana* όσο και την *Asteromonas gracilis*, ενώ η *Tetraselmis suecica* φαίνεται πως του είναι αδιάφορη.



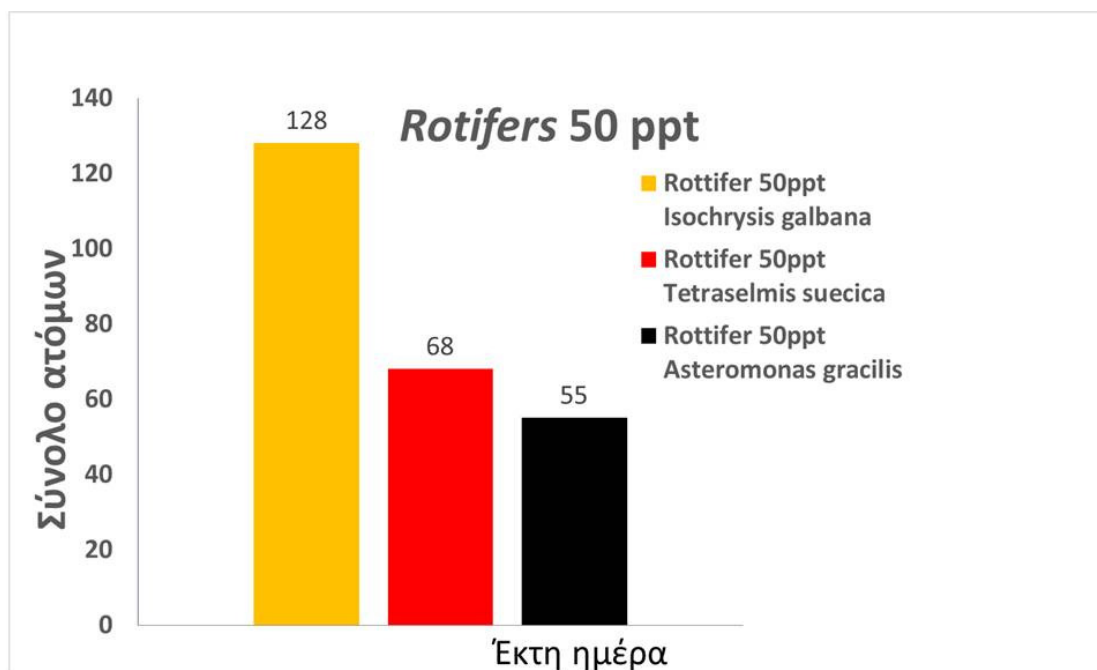
Σχήμα 41 Γράφημα ξεχωριστής απόδοσης για τα *Tisbe sp* με αλατότητα 50ppt.

Σε αυτό το γράφημα φαίνονται οι συνολικές ξεχωριστές αποδόσεις των φυκών για τα *Tisbe sp.* με αλατότητα 50ppt. Αυτό το οποίο παρατηρείται με πρώτη ματιά είναι η μη προτίμηση σε κανένα από τα τρία φύκη, εκτός από την *Isochrysis galbana*, η οποία παρουσίασε τις φάσεις της φυτοπλαγκτονικής καλλιέργειας και είχε μικρότερο αριθμό ατόμων σε σχέση με τα άλλα δύο φύκη.



Σχήμα 42 Γράφημα ξεχωριστής απόδοσης για τα *Rottifer 35ppt*.

Σε αυτό το γράφημα παρατηρείται η ξεχωριστή συνολική απόδοση των φυκών για τα *Rottifer* με αλατότητα 35ppt. Παρατηρείται η αρκετά μεγάλη κατανάλωση της *Tetraselmis suecica* και η ακόμα μεγαλύτερη της *Asteromonas gracilis*. Δεν υπήρξε καθόλου ενδιαφέρον για την *Isochrysis galbana*.



Σχήμα 43 Γράφημα ξεχωριστής απόδοσης για τα Rottifer με αλατότητα 50ppt.

Στο γράφημα αυτό παρατηρείται η ξεχωριστή συνολική απόδοση των φυκών για τα *Rottifer* με αλατότητα 50ppt. Διακρίνεται η σχεδόν ίδια και μεγάλη κατανάλωση των *Tetraselmis suecica* και *Asteromonas gracilis* ενώ και πάλι στην *Isochrysis galbana* δεν δείχνει ιδιαίτερη προτίμηση.

## Πίνακες λογιστικού προγράμματος past

Αρχικά θα ήταν πρέπον να αναφέρω δύο λόγια για το ποια tests χρησιμοποιήθηκαν. Το πρόγραμμα το οποίο μας δόθηκε για την πραγματοποίηση των παραπάνω test ήταν το Past. Είναι ένα πολύ εύκολο στη χρήση του πρόγραμμα και τα test τα οποία δουλέψαμε ήταν το T-test ανάμεσα σε πλήθος δύο μεταβλητών και πιο συγκεκριμένα ανάμεσα σε ένα φύκος μεταξύ των δύο αλατοτήτων που χρησιμοποιήσαμε, η επονομαζόμενη και παρακάτω κάθετη σύγκριση. Ανάμεσα σε ένα πλήθος 2 και παραπάνω μεταβλητών χρησιμοποιήσαμε την ANOVA και στη συνέχεια κάναμε Tukey's test το οποίο μας έδωσε και το επιθυμητό αποτέλεσμα, ή

αλλιώς οριζόντια σύγκριση, η οποία έγινε ανάμεσα στα 3 χρησιμοποιηθέντα φύκη για μία μόνο αλατότητα. Για να διαπιστώσουμε αν υπάρχει διαφορά ανάμεσα στις τιμές που βρήκαμε, έπρεπε να δούμε αν η τιμή  $p$  είναι μικρότερη ή μεγαλύτερη από το 0,05. Αν σε περίπτωση ήταν μικρότερη τότε υπήρχε λογιστική διαφορά στα δείγματα, ενώ αν ήταν μεγαλύτερη από 0,05 δεν υπήρχε λογιστική διαφορά. Σε αυτό το σημείο θα χρειαστεί να αναφέρω τον τρόπο με τον οποίο διατυπώσαμε τις λογιστικές διαφορές τις οποίες και βρήκαμε κατά την διαδικασία των tests. Αρχικά το κάθε φύκος έχει μετονομαστεί σε ένα γράμμα. Πιο συγκεκριμένα μπορούμε να θέσουμε ένα τυχαίο παράδειγμα. Αρχικά ας ονομάσουμε την *Tetraselmis suecica* με το γράμμα  $a$ , την *Asteromonas gracilis* με το γράμμα  $b$  και την *Isochrysis galbana* με το γράμμα  $c$ . Οπότε αν στο πινακάκι εμφανιστεί το παρακάτω:  $c^{(c-b)}$ , σημαίνει η *Isochrysis galbana* διαφέρει με την *Asteromonas gracilis* για την συγκεκριμένη αλατότητα που αναγράφεται και ούτω καθ' εξής ανάλογα με τους συνδυασμούς και αλατότητες που μπορεί να έχουμε.

Πίνακας 1 Στην πάνω σειρά αναγράφονται οι μέσοι όροι καθώς και η τυπική απόκλιση για το κάθε είδος φύκους. Ακολουθεί η οριζόντια σύγκριση η οποία έγινε ανάμεσα στα 3 φύκη ίδιας αλατότητας, και αμέσως μετά η κάθετη σύγκριση ανάμεσα σε ένα φύκος μεταξύ δύο αλατοτήτων.

Είδος φύκους	Αλατότητα ppt	<i>Tetraselmis suecica</i>	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Asteromonas gracilis</i>
	35	51,28 ± 26,62	26,2 ± 24,35	1,84 ± 1,29
<i>Fabrea salina</i>	50	24,96 ± 16,16	17,8 ± 7,00	13,36 ± 4,20
Είδος φύκους	Αλατότητα ppt	<i>Tetraselmis suecica</i>	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Asteromonas gracilis</i>
οριζόντια σύγκριση	35	$a^{(a-b)}$	$b$	$c^{(c-a)}$
<i>Fabrea salina</i>	50	$a$	$b$	$c$
Είδος φύκους	Αλατότητα ppt	<i>Tetraselmis suecica</i>	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Asteromonas gracilis</i>
κάθετη σύγκριση	35	$a$	$b$	$c$
<i>Fabrea salina</i>	50	$b$	$b$	$c$

Στον παραπάνω πίνακα αναγράφεται η οριζόντια και η κάθετη σύγκριση που πραγματοποιήθηκε για την *Fabrea salina* για τις αλατότητες 35ppt και 50ppt.

Αρχικά κατά την οριζόντια σύγκριση φαίνεται με την πρώτη ματιά πως στατιστικές συγκρίσεις υπάρχουν μόνο στην αλατότητα 35ppt και όχι στην αλατότητα 50ppt και αυτό γιατί η *Fabrea salina* δεν ευδοκιμεί τόσο καλά σε μεγάλες αλατότητες. Κατά την αλατότητα 35ppt οι στατιστικές διαφορές που υπάρχουν είναι

ανάμεσα στην *Tetraselmis suecica* και στην *Isochrysis galbana*, όπως και στην *Asteromonas gracilis* με την *Tetraselmis suecica*. Η *Isochrysis galbana* δεν διαφέρει στατιστικώς με κάποιο από τα άλλα δύο φύκη.

Όσον αφορά την κάθετη σύγκριση η οποία πραγματοποιείται ανάμεσα σε 2 αλατότητες για ένα είδος φύκους, παρατηρείται διαφορά στην *Tetraselmis suecica* ενώ τα δύο άλλα φύκη δεν παρουσιάζουν κάποια στατιστική διαφορά.

Πίνακας 2 Στην πάνω σειρά αναγράφονται οι μέσοι όροι καθώς και η τυπική απόκλιση για το κάθε είδος φύκους. Ακολουθεί η οριζόντια σύγκριση η οποία έγινε ανάμεσα στα 3 φύκη ίδιας αλατότητας, και αμέσως μετά η κάθετη σύγκριση ανάμεσα σε ένα φύκος μεταξύ δύο αλατοτήτων

Είδος φύκους	Αλατότητα ppt	<i>Tetraselmis suecica</i>	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Asteromonas gracilis</i>
	35	3,12 ± 2,50	5,0 ± 6,65	1,92 ± 2,21
<i>Rotifers</i>	50	2,48 ± 2,48	4,88 ± 5,61	1,96 ± 1,64
Είδος φύκους	Αλατότητα ppt	<i>Tetraselmis suecica</i>	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Asteromonas gracilis</i>
οριζόντια σύγκριση	35	a	b	c <sup>(c-b)</sup>
<i>Rotifers</i>	50	a	b	c
Είδος φύκους	Αλατότητα ppt	<i>Tetraselmis suecica</i>	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Asteromonas gracilis</i>
κάθετη σύγκριση	35	a	b	c
<i>Rotifers</i>	50	b	b	c

Στον παραπάνω πίνακα αναγράφεται η οριζόντια και η κάθετη σύγκριση που πραγματοποιήθηκε για τα *Rotifer* για τις αλατότητες 35ppt και 50ppt.

Κατά την οριζόντια σύγκριση η μόνη διαφορά που παρατηρείται είναι ανάμεσα στην *Asteromonas gracilis* με την *Isochrysis galbana*.

Στην κάθετη σύγκριση εδώ όπως και στην *Fabrea salina*, η διαφορά που παρατηρείται είναι στην *Tetraselmis suecica* ανάμεσα στις δύο αλατότητες ενώ τα άλλα φύκη παραμένουν ως έχουν χωρίς κάποια στατιστική διαφορά.

Πίνακας 3 Στην πάνω σειρά αναγράφονται οι μέσοι όροι καθώς και η τυπική απόκλιση για το κάθε είδος φύκους. Ακολουθεί η οριζόντια σύγκριση η οποία έγινε ανάμεσα στα 3 φύκη ίδιας αλατότητας, και αμέσως μετά η κάθετη σύγκριση ανάμεσα σε ένα φύκος μεταξύ δύο αλατοτήτων.

Είδος φύκους	Αλατότητα ppt	<i>Tetraselmis suecica</i>	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Asteromonas gracilis</i>
	35	15,08 ± 7,03	3,6 ± 3,15	7,48 ± 4,44
<i>Tisbe sp.</i>	50	21,64 ± 5,62	2,48 ± 1,72	15,76 ± 5,27
Είδος φύκους	Αλατότητα ppt	<i>Tetraselmis suecica</i>	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Asteromonas gracilis</i>
οριζόντια σύγκριση	35	a <sup>(a-b)</sup>	b	c <sup>(c-a), (c-b)</sup>
<i>Tisbe sp.</i>	50	a <sup>(a-b)</sup>	b	c <sup>(c-a), (c-b)</sup>
Είδος φύκους	Αλατότητα ppt	<i>Tetraselmis suecica</i>	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Asteromonas gracilis</i>
κάθετη σύγκριση	35	a	b	c
<i>Tisbe sp.</i>	50	b	b	c

Στον παραπάνω πίνακα αναγράφεται η οριζόντια και η κάθετη σύγκριση που πραγματοποιήθηκε για τα *Tisbe sp.* για τις αλατότητες 35ppt και 50ppt.

Στην οριζόντια σύγκριση παρατηρούμε αρκετές διαφορές τόσο στην αλατότητα 35ppt όσο και στην αλατότητα 50ppt. Αρχικά κατά την αλατότητα 35ppt οι διαφορές οι οποίες παρατηρούνται είναι ανάμεσα στην *Tetraselmis suecica* με την *Isochrysis galbana*. Στην *Asteromonas gracilis* με την *Tetraselmis suecica* και στην *Asteromonas gracilis* με την *Isochrysis galbana*. Κατά την αλατότητα 50ppt οι στατιστικές διαφορές είναι ανάμεσα στην *Tetraselmis suecica* με την *Isochrysis galbana*, στην *Asteromonas gracilis* με την *Tetraselmis suecica* και στην *Asteromonas gracilis* με την *Isochrysis galbana*, οι ίδιες δηλαδή διαφορές και στις δύο αλατότητες.

Κατά την κάθετη σύγκριση η διαφορά που παρατηρείται είναι ανάμεσα στην *Tetraselmis suecica* μεταξύ δύο αλατοτήτων.

## Συζήτηση

Το πεδίο της αλληλεπίδρασης διαφόρων ειδών φυκών μεταξύ των όταν βρίσκονται ταυτόχρονα πληθυσμοί των σε κάποιο υδάτινο χώρο είναι πολύπλοκο και πολύ λίγο διερευνημένο. Τα φυτοπλαγκτονικά είδη στον ίδιο χώρο ανταγωνίζονται για τα διαθέσιμα θρεπτικά και είτε έχοντας τις ίδιες ανάγκες για αυτά (τα θρεπτικά), είτε διαφορετικές, αυτό που είναι πιθανό είναι ότι κάποια είδη θα παρουσιάζουν μεγαλύτερο τάχος απορρόφησης θρεπτικών συνεπώς ταχύτερη αύξηση και ως εξ' αυτού ακόμα μεγαλύτερη απορρόφηση θρεπτικών και στέρησή τους από τα άλλα

υπάρχοντα είδη. Και ναι μεν αυτό το φαινόμενο ίσως να μην είναι τόσο έντονο στα φυσικά νερά με τον μεγάλο όγκο που προσφέρεται, όμως σε συνθήκες καλλιέργειας όπου τα καλλιεργούμενα είδη βρίσκονται περιορισμένα σε μικρό χώρο με όχι απεριόριστους πόρους θρεπτικών (αν δεν κάνουμε συνεχή πρόσθεση) αναμένεται να κάνει αισθητή την παρουσία του. Εκτός από τον ανταγωνισμό για τα θρεπτικά τα είδη του φυτοπλαγκτού είναι αποδεδειγμένο ότι παράγουν και ποικίλες ουσίες τις οποίες απελευθερώνουν στο περιβάλλον τους. Αυτές οι ουσίες (άγνωστες οι περισσότερες) μπορούν να είναι ιδιαίτερα άφθονες υπό ορισμένες συνθήκες (εν πολλοίς άγνωστες και αυτές) και μάλλον είναι χαρακτηριστικές ως προς το κάθε είδος φυτοπλαγκτού τόσο από ποιοτική όσο και από ποσοτική σκοπιά. Έχουν ανευρεθεί ουσίες βακτηριοκτόνες, μυκητοκτόνες και φυκο-πρωτόζωο-κτόνες. Δηλαδή ουσίες οι οποίες δρουν αρνητικά έναντι άλλων ειδών που τυχαίνει να συνυπάρχουν με τα εξεταζόμενα είδη των μικροφυκών. Στα φύκη παρουσιάζεται το φαινόμενο της αλληλοπάθειας όρος που σημαίνει ένα βιολογικό φαινόμενο με το οποίο ένας οργανισμός παράγει ένα ή περισσότερα βιομόρια τα οποία επηρεάζουν την αύξηση, επιβίωση και/ή την αναπαραγωγή άλλου/ων οργανισμού/ών. Τα βιομόρια αυτά γνωστά ως αλληλοχημικά είναι κυρίως δευτερογενείς μεταβολίτες και η παραγωγή τους έχει διαπιστωθεί σε ορισμένα είδη φυτών, φυκών, βακτηριδίων, μυκήτων και κοραλλιών. Μπορούν να έχουν είτε ωφέλιμη (θετική αλληλοπάθεια) είτε καταστροφική (αρνητική αλληλοπάθεια) στους οργανισμούς στόχους. Οι αλληλεπιδράσεις στα είδη λόγω της αλληλοπάθειας αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα που καθορίζει την κατανομή και την αφθονία των ειδών τόσο των φυτών όσο και των πλαγκτονικών βιοκοινωνιών. Στα φυτά και γενικώς στη γεωργία η αλληλοπάθεια έχει καθιερωθεί ως μια βιολογική μέθοδος για παραγωγή φυσικών ζιζανιοκτόνων και έχει τραβήξει την προσοχή της έρευνας από τους φυτολόγους. Στα μικροφύκη, αν και σε μικρότερο βαθμό απ' ότι στα φυτά, έχουν παρόλα αυτά διεξαχθεί ορισμένες μελέτες επί της αρνητικής κυρίως αλληλοπάθειας. Κυρίως έχουν μελετηθεί (19) οι αλληλοπάθειες των δινομαστιγωτών όπως το *Peridinium aciculiferum* που έχει αρνητική επίδραση στην αύξηση και επιβίωση άλλων ειδών μικροφυκών *Synura petersenii* (Χρυσοφύκη), *Peridinium inconspicuum* (Δινομαστιγωτό), *Cyclotella* sp. (Διάτομο), *Cryptomonas* sp., και *Rhodomonas lacustris* (Κρυπτοφύκη). Η αρνητική αλληλοπάθεια στις περιπτώσεις αυτές εκφράζεται μέσω της λύσης των κυττάρων που προκαλείται είτε από ένα ειδικό μακρομόριο ή μείγμα μακρομορίων που απελευθερώνει στο νερό το *Peridinium aciculiferum*. Η αλληλοπάθεια είναι ένα πεδίο που μπορεί να επιφέρει θετικά αποτελέσματα στην επιθυμητή παραγωγή μικροφυκών σε συνθήκες καλλιέργειάς των. Όταν καλλιεργούνται μικροφύκη προς παραγωγή διάφορων προϊόντων από τη φυκική βιομάζα, είτε αυτά είναι διατροφικές ουσίες, είτε αντιοξειδωτικά, είτε βιοκαύσιμα είναι ευκολοκατανόητο ότι επιθυμούμε τη γρήγορη και μεγάλη αύξηση της μάζας των μικροφυκών. Όμως σε συνθήκες μαζικής φυκοκαλλιέργειας είναι μάλλον δύσκολο να επιτύχουμε μονοειδικές καλλιέργειες (ιδιαίτερα στις ανοικτές δεξαμενές) καθώς στη μάζα του νερού εμφανίζονται και άλλα είδη (φύκη ή/και πρωτόζωα) με αποτέλεσμα πολύ συχνά η καλλιέργεια του επιθυμητού μικροφύκου είτε να αλλοιώνεται είτε να καταρρέει. Εδώ η αλληλοπάθεια μπορεί να βοηθήσει αν μπορέσουμε να κάνουμε το επιθυμητό είδος μικροφύκου να παράγει βιομόρια που θα καταστρέφουν τα ανεπιθύμητα είδη. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε πιθανώς να γίνει αν αλλάζαμε κατάλληλα τις συνθήκες



καλλιέργειας προκειμένου να ερεθίσουμε το επιθυμητό μικροφύκος να παράγει τέτοια αρνητικής αλληλοπάθειας βιομόρια. Όμως είμαστε ακόμα πολύ μακριά από τέτοια σενάρια καθώς η έρευνα σε αυτό το πεδίο είναι ακόμα υποτυπώδης. Μια άλλη λύση είναι να επιλέγουμε νέα είδη μικροφυκών προς καλλιέργεια τα οποία παράγουν τις ίδιες χρήσιμες ουσίες με τα καθιερωμένα και συνάμα εκφράζουν έντονα αλληλοπαθητικό δυναμικό. Βέβαια προκειμένου να γίνει κάτι τέτοιο απαιτείται εκτεταμένη και διαρκής έρευνα η οποία ως πρώτο βήμα πρέπει να έχει ξεκάθαρους στόχους. Σε πρώτο στάδιο λοιπόν τι πιο απλό από το να βρει ενδείξεις ένας ερευνητής για το αν υπάρχει αλληλοπάθεια, από το να καλλιεργεί μείγματα ειδών μικροφυκών και να μελετήσει αν με το πέρασμα του χρόνου κάποιο ή κάποια από αυτά επικρατούν έναντι των άλλων; Άλλωστε είναι γνωστό στους φυκολόγους το φαινόμενο της τελικής σχετικής ή απόλυτης επικράτησης ενός είδους φυτοπλαγκτού σε μια μικτή καλλιέργεια. Ίσως σε τέτοιες περιπτώσεις η αλληλοπάθεια να έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο. Ακριβώς με αυτό το σκεπτικό προσπαθήσαμε στην παρούσα εργασία να πάρουμε μια "πρώτη γεύση" για το πως θα συμπεριφερθεί το εξεταζόμενο χλωροφύκος *Asteromonas gracilis* όταν καλλιεργείται αναμειγμένο με άλλα μικροφύκη. Το συγκεκριμένο χλωροφύκος έχει μελετηθεί πολύ λίγο (11) και παρουσιάζει κάποιες ιδιαιτερότητες. Είναι πολύ αλοανθεκτικό και παρόλο που αναπτύσσεται και σε κανονική αλατότητα θαλασσινού νερού (35-37 ppt) (25) την καλύτερη αύξηση την παρουσιάζει σε αλατότητες άνω των 80 ppt. Όμως όπως φάνηκε σε εργασίες (9, 10) δίδει πολύ καλά αποτελέσματα στην αύξηση του πληθυσμού των τροχοζώων *Brachionus plicatilis* που χρησιμοποιείται ως ζωντανή τροφή για τις λάρβες των θαλασσινών ψαριών που παράγονται στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς. Γενικώς έχει διάφορα πλεονεκτήματα στην καλλιέργειά του καθώς είναι πολύ ανθεκτικό, με τις καλλιέργειές του να μην καταρρέουν εύκολα και ακόμα και σε μακρά διατήρηση όταν μετά από καιρό στο εξαντλημένο από θρεπτικά νερό της καλλιέργειας έχουν πάψει να υπάρχουν τα κινητικά μαστιγιοφόρα κύτταρά του, υπάρχει συσσώρευση σφαιρικών κύστεών του στο ίζημα οι οποίες ξαναδίνουν μαστιγιοφόρα κύτταρα σε φρέσκο λιπασμένο νερό. Το πως επηρεάζεται η αύξηση του πληθυσμού της *Asteromonas* παρουσία άλλων ειδών μικροφυκών προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε στην παρούσα εργασία. Οπωσδήποτε το εγχείρημα παρουσίαζε και μια εγγενή δυσκολία η οποία έχει να κάνει με την αλατότητα στην οποία διεξήχθησαν οι πειραματισμοί. Συγκεκριμένα η αλατότητα των 35 ppt στην οποία αναπτύχθηκαν τόσο οι μονοειδικές καλλιέργειες των υπολοίπων ειδών (*Tetraselmis*, *Rhodomonas*, *Isochrysis*) όσο και της *Asteromonas* μπορεί να είναι μεν μια τυπική και χρηστική αλατότητα για τα είδη αυτά όμως για την *Asteromonas* θεωρείται μάλλον οριακή. Αυτό φάνηκε και από το διάγραμμα του Σχήματος 26 όπου παρουσιάστηκαν έντονες διακυμάνσεις της πυκνότητας των κυττάρων και μικρή σχετικά τελική πυκνότητα (~96.000 κύτ./ml) κατά την 20η ημέρα της καλλιέργειας. Αποκλείοντας το λάθος στην εκτέλεση της καλλιέργειας μπορούμε να το αποδώσουμε στο ότι πολλά από τα παραγόμενα αναπαραγωγικώς κύτταρα της *Asteromonas* ευρισκόμενα σε ένα στρεσογόνο λόγω χαμηλής αλατότητας περιβάλλον περιέπιπταν σε κατάσταση κύστεων στον πυθμένα με αποτέλεσμα να μην καταγράφονται στις μετρήσεις που κάναμε με το αιμοκυττόμετρο. Έτσι ενώ ενδιάμεσως παρουσιάζονταν και μεγαλύτερες πυκνότητες της τάξεως των (~141.000 κύτ./ml) αμέσως μετά έπεφταν στα ~20.000 κύτ./ml και μετά ξαναέβαιναν.

Χρειάζεται περαιτέρω καλά σχεδιασμένος πειραματισμός προκειμένου να διαλευκανθεί αν αυτό είναι ένα φαινόμενο που ακολουθεί κάποιο πρότυπο ή έχει εντελώς τυχαία εμφάνιση. Πάντως στις 2 συνθέσεις μίγματος 3 μικροφυκών που έγιναν με την παρουσία *Asteromonas* βρέθηκε ότι σε καμία από αυτές δεν επικράτησε και στη μεν πρώτη (*Asteromonas-Tetraselmis-Isochrysis*) η *Tetraselmis* είχε έντονη αρνητική επίδραση τόσο στην αύξηση της *Asteromonas* όσο και της *Isochrysis*, ενώ στη δεύτερη περίπτωση (*Asteromonas-Isochrysis-Rhodomonas*) ήταν η *Isochrysis* που επέδρασε αρνητικά σε αμφότερες *Asteromonas* και *Rhodomonas*. Το φαινόμενο της επικράτησης μετά από αρκετό καιρό ενός είδους μικροφύκου έναντι άλλων σε μία καλλιέργεια ήταν έντονο και στις δύο πειραματικές σειρές μας και μας δημιουργεί την υπόνοια ότι όντως υπάρχουν "κώδικες" αλληλοπάθειας οι οποίες αξίζει να διερευνηθούν. Οχι μόνο με χρήση των γνωστών και χρησιμοποιούμενων στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς ειδών φυτοπλαγκτού αλλά και άλλων πολύ λίγο (ή και καθόλου) χρησιμοποιημένων ειδών.

Εξετάζοντας τώρα τη χρήση της *Asteromonas* ως θρεπτικό μέσο για 3 εντελώς διαφορετικούς ηθμοφάγους οργανισμούς ήτοι ένα πρωτόζωο (*Fabrea salina*), ένα τροχόζωο (*Brachionus plicatilis*) και ένα κωπήποδο (*Tisbe* sp.) παρουσιάστηκαν ενδιαφέροντα συμπεράσματα. Πριν από κάθε τι άλλο το μέγεθος του κυττάρου της *Asteromonas* είναι πολύ μεγαλύτερο από αυτό των άλλων χρησιμοποιηθέντων ειδών μικροφυκών δηλαδή της τάξεως των 20-25  $\mu\text{m}$  έναντι  $\sim 8 \mu\text{m}$  της *Isochrysis* και 8-12  $\mu\text{m}$  για τα *Tetraselmis* και *Rhodomonas*. Αυτό όμως δεν εμπόδισε κανέναν από τους ηθμοφάγους οργανισμούς να την καταναλώσουν. Μάλιστα σύμφωνα με τις μελέτες του Hotos (9, 10) βρέθηκε ότι το τροχόζωο *Brachionus plicatilis* καταναλώνει περισσότερη *Asteromonas* απ' ό τι τη μικροσκοπική *Chlorella* sp. ( $\sim 5 \mu\text{m}$ ) όταν αυτά τα δύο μικροφύκη προσφέρονται ανάμικτα στο συγκεκριμένο τροχόζωο δείχνοντας μια σαφή τάση επιλεκτικότητας από το τροχόζωο για το μεγαλύτερο σε μέγεθος κυττάρου φύκος (δηλαδή την *Asteromonas*). Στην περίπτωσή μας όμως δεν χρησιμοποιήσαμε μείγματα *Asteromonas* με άλλα φύκη αλλά τα δίναμε ξεχωριστά το καθένα για κατανάλωση από τους ηθμοφάγους και ήταν μικροφύκη πολύ μεγαλύτερα από την *Chlorella* σε κυτταρικό όγκο. Από τα Σχήματα 38 & 40 προκύπτει ότι στην αλατότητα των 35 ppt η αύξηση του πληθυσμού όλων των ηθμοφάγων οργανισμών ήταν κατώτερη από την αντίστοιχη των 50 ppt όταν αυτοί τρέφονταν με *Asteromonas*. Μάλιστα στην περίπτωση της *Fabrea salina* η διαφορά ήταν εντυπωσιακή με σχεδόν 15πλάσια απόδοση σε άτομα στην αλατότητα των 50 ppt συγκριτικά με την αλατότητα των 35 ppt. Ενδεχομένως αυτό να οφείλεται στο ότι τόσο η *Asteromonas* (κυρίως) όσο και η *Fabrea salina* είναι αλοανθεκτικοί και θα μπορούσαμε να πούμε αλόφιλοι οργανισμοί και η χαμηλότερη αλατότητα με κάποιο ανεξήγητο συνεργιστικό μηχανισμό δεν επέφερε κατανάλωση της *Asteromonas* από τη *Fabrea* με αποτέλεσμα στασιμότητα του πληθυσμού της τελευταίας. Στην αλατότητα των 50 ppt που είναι πιο "προσφιλής" στην *Asteromonas* η μετρηθείσα αύξηση του πληθυσμού της *Fabrea* ενισχύει την παραπάνω υπόθεση. Παρόλο όμως που η *Fabrea* είναι αλόφιλο πρωτόζωο ο πληθυσμός της αυξήθηκε εντυπωσιακά όταν ακόμα και στη χαμηλή αλατότητα των 35 ppt τράφηκε με *Isochrysis* ή *Tetraselmis* κάτι που επιβεβαιώνεται και από τα ευρήματα του Hotos (12) για αυτή την αλατότητα. Συνεπώς μπορούμε να πιθανολογήσουμε ότι η *Fabrea* μπορεί να καταναλώσει μικροφύκη που ζουν σε κανονική αλατότητα χωρίς αυτά να της

προκαλέσουν αρνητική επίδραση. Στη διατροφή του αρπακτικοειδούς κωπηπόδου *Tisbe* παρουσιάστηκε το αξιοπρόσεκτο φαινόμενο η αύξησή του να είναι καλύτερη όταν τρέφεται με *Asteromonas* στα 50 ppt έναντι των 35 ppt. Εδώ πάλι όπως και στην περίπτωση της *Fabrea* πιθανολογείται η μεγαλύτερη ελκυστικότητα της *Asteromonas* για το κωπήποδο λόγω του ότι όπως προαναφέρθηκε η υψηλότερη αλατότητα είναι καλύτερη για τη φυσιολογία της. Ομως από την άλλη πλευρά πως μπορεί να εξηγηθεί η καλύτερη αύξηση του *Tisbe* στην υψηλότερη αλατότητα και μάλιστα καθώς αυτό συνέβη και για την περίπτωση της *Tetraselmis*, όταν στη βιβλιογραφία πουθενά δεν αναφέρεται η υψηλή αλατότητα της τάξεως των 50 ppt ως ευνοϊκή για την αύξησή του; (το αντίθετο μάλιστα). Φαίνεται ότι στο πεδίο αυτό υπάρχουν πολλά κενά που πρέπει να συμπληρωθούν με προσεκτικά σχεδιασμένη έρευνα καθώς από προσωπική επικοινωνία (Χώτος, αδημοσίευτα στοιχεία) υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η υψηλότερη του θαλασσινού αλατότητα επιφέρει ευνοϊκότερες συνθήκες ανάπτυξης για πλήθος καλλιεργούμενων αρπακτικοειδών κωπηπόδων. Τέλος, σχετικά με την αύξηση των τροχοζών παρουσιάστηκε εκπληκτική στατιστική ομοιότητα και για την κάθε μία από τις 3 χρησιμοποιηθείσες τροφές (της *Asteromonas* συμπεριλαμβανομένης) μεταξύ των 2 αλατοτήτων. Η *Asteromonas* βάσει των ευρημάτων μας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θρεπτικό υπόστρωμα για την καλλιέργεια ηθμοφάγων οργανισμών και αν και παρουσιάζεται ποικιλία στα αποτελέσματα απόδοσης των πληθυσμών τους μόνο οι πολλές επαναλήψεις των πειραματισμών μπορούν να εξαλείψουν πιθανές αστοχίες που μπορεί να υπήρξαν στην παρούσα προκαταρκτική έρευνα.

## Βιβλιογραφία

1. Alonso, M., Lago, F.C., Vieites, J.M. and Espiñeira, M. (2012): Molecular characterization of microalgae used in aquaculture with biotechnology potential. *Aquaculture. Inter.* 20: 847-857. DOI: 10.1007/s10499-012-9506-8
2. Arora, M., Anil, A.C., Burgess, K., Delany, J. and Mesbahi, E. 2015: Asymmetric cell division and its role in cell fate determination in the green alga *Tetraselmis indica*. *J. Biosci.* 40: 921-927
3. Aurelyanna C.B. Ribiero, Lilia P. Souza- Santos (2011). Mass culture and offspring production of marine harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis*. *Aquaculture*, 321 (280-288).
4. Bam Deo Pandey, S.G. Yeragi (2004). Preliminary and mass culture experiments on a heterotrichous ciliate, *Fabrea salina*. *Aquaculture*, 232 (241-254)
5. Barsanti, Laura, and Paolo Gualtieri. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC press, 2014
6. Becker, B., Marin, B. and Melkonian, M. 1994: Structure, composition, and biogenesis of prasinophyte cell coverings. *Protoplasma.* 181: 233-244
7. Christian Lawrence, Erik Sanders, and Eric Henry (2012). Methods for Culturing Saltwater Rotifers (*Brachionus plicatilis*) for Rearing Larval Zebrafish. *Zebrafish*, Volume 9, Number 3.
8. Davis, T. A., Volesky, B., & Mucci, A. (2003). A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research*, 37(18), 4311-4330
9. **HOTOS, G.N.** (2002). Selectivity of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed mixtures of algal species with various cell volumes and cell densities. *Aquaculture Research*, 33 (12), 949-957.
10. **HOTOS, G. N.** (2003). Growth, filtration and ingestion rate of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed with large (*Asteromonas gracilis*) and small (*Chlorella* sp.) celled algal species. *Aquaculture Research*, 34 (10), 793-802.
11. **HOTOS, G.** (2019a). A short review on the halotolerant green microalga *Asteromonas gracilis* Artari with emphasis on its uses. *Asian Journal of Fisheries and Aquatic Research*, 4(3): 1-8. DOI: 10.9734/ajfar/2019/v4i330054..
12. Hotos, G., (2019c). Feeding with various microalgae the salt “loving” ciliate *Fabrea salina* in normal salinity 35 ppt. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 3(3):150-152. DOI: 10.26855/ijfsa.2019.07.00.
13. Induction of sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Monogononta, Rotifera) by a density-dependent chemical cue CP Stelzer, TW Snell - *Limnology and Oceanography*, 2003

14. Kim, Sang Min; Pan, Cheol-Ho (2012). "Fucoxanthin as a major carotenoid in *Isochrysis aff. galbana*: Characterization of extraction for commercial application". Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry
15. McNeill, J., Barrie, F. R., Buck, W. R., Demoulin, V., Greuter, W., Hawksworth, D. L., ... & Prud'homme Van Reine, W. F. (2012). International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants. Regnum Vegetabile, 154
16. Nanton, D. A., & Castell, J. D. (1998). The effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of the harpacticoid copepod, *Tisbe* sp., for use as a live food for marine fish larvae. Aquaculture, 163(3-4), 251-261
17. Pandey, B. D., Yeragi, S. G., & Pal, A. K. (2004). Nutritional Value of a heterotrichous ciliate, *Fabrea salina* with emphasis on its fatty acid profile. Asian Australasian Journal of Animal Sciences, 17(7), 995-999
18. Partridge, Eric (1983). "algae". Origins
19. Rengefors, K. & Legrand, C. (2007). Broad allelopathic activity in *Peridinium aciculiferum*. Eur. J. Phycol., 42(4):341-349.
20. Scott, S. A., Davey, M. P., Dennis, J. S., Horst, I., Howe, C. J., Lea-Smith, D. J., & Smith, A. G. (2010). Biodiesel from algae: challenges and prospects. Current Opinion in Biotechnology, 21(3), 277-286
21. Ugwu, C. U., Aoyagi, H., & Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. Bioresource Technology, 99(10), 4021-4028
22. Waggoner, Ben (1994-2008). "Introduction to the Phaeophyta: Kelps and brown "Algae University of California Museum of Palaeontology (UCMP)
23. Χώτος, Γ., (Hotos, G.) 2016. Καλλιέργειες Πλαγκτού (ζωντανή τροφή σε ιχθυοεκκολαπτήρια). Research Gate. DOI: 10.13140/RG.2.2.24664.03849. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/338103351\\_Kalliergeies\\_Planktou\\_zontane\\_trophe\\_se\\_ichthyoekkolapteria](https://www.researchgate.net/publication/338103351_Kalliergeies_Planktou_zontane_trophe_se_ichthyoekkolapteria)
24. Χώτος Γεώργιος, (2019b). Κωπήποδα (βασικά βιολογικά στοιχεία). Research Gate, DOI: 10.13140/RG.2.2.25424.46081. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/336315323\\_Kopepoda\\_basika\\_biologika\\_stoicheia](https://www.researchgate.net/publication/336315323_Kopepoda_basika_biologika_stoicheia)
25. ΧΩΤΟΣ, Γ. & Δ., ΑΒΡΑΜΙΔΟΥ (1995). Μελέτη της αύξησης του μονοκύτταρου αλόφιλου φύκου *Asteromonas gracilis* (Chlorophyta) σε συνθήκες μαζικής καλλιέργειας με τη χρήση διαφορετικών αλατοτήτων, φωτοπεριόδου και έλλειψης πρόσθετων βιταμινών. *Γεωτεχνικά Επιστημονικά Θέματα (Geotechnical Scientific Issues)*. 6(2): 37-45.

Βιβλιογραφία εικόνων:

1. <https://si.vwr.com/store/product/2991825/counting-chambers-fuchs-rosenthal>