

Τμήμα Τεχνολογίας Αλιείας και Υδατοκαλλιεργειών

Τ.Ε.Ι. Δυτικής Ελλάδος



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αξιολόγηση της καλλιεργητικής απόδοσης τριών στελεχών του φυτοπλαγκτικού γένους *Tetraselmis* απομονωμένων από αλυκές του Μεσολογγίου.

Πολυδούλη Μαρία



Επιβλέποντες Καθηγητές : Δρ. Ι. Κλαδάς & Ι. Τζοβενής

Μεσολόγγι 2014

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	4
Abstract	5
Εισαγωγή	5
Κεφάλαιο 1: Μικροφύκη	6
1.1 Τι είναι Μικροφύκη	6
1.2 Αναπαραγωγή φυτοπλαγκτού	6
1.2.1 Που συναντώνται	7
1.2.2 Ενδιαφέρον και η χρήση τους	7
1.3 Φύκη και υδατοκαλλιέργεια	8
1.3.1 Χρήση των καλλιεργούμενων μικροφυκών στις υδατοκαλλιέργειες, λόγω της αντιμικροβιακής τους δράσης, απέναντι σε παθογόνα βακτήρια των ψαριών	9
1.3.2 Τεχνική των «ψευδοπράσινων» νερών	9
1.3.3 Άνθιση του νερού	10
1.4 Μικροφύκη και Βιοκαύσιμα	10
1.5 Είδη φυκών που χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες	12
1.5.1 <i>Isochrysis</i> sp.	12
1.5.2 <i>Nannochloropsis</i> sp.	12
1.5.3 <i>Tetraselmis</i> sp.	13
1.5.4 Σχετικά με τα χρησιμοποιούμενα είδη στις υδατοκαλλιέργειες	15
1.6 Σκοπός και στόχοι της πτυχιακής εργασίας	15
Κεφάλαιο 2: Υλικά και μεθοδολογία	16
2.1 Εισαγωγή	16
2.2 Καλλιέργεια φυτοπλαγκτού	16
2.3 Πρωτόκολλο καλλιέργειας	16
2.4 Σχεδιασμός και οργάνωση πειράματος	18
2.5 Συνθήκες Βιοασφάλειας	19
2.6 Εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε.....	19
2.7 Συνθήκες καλλιέργειας	21
2.8 Ανάπτυξη καλλιέργειών πειράματος	22
2.9 Διαδικασία μέτρησης της κυτταρικής αύξησης	24
2.10 Προσδιορισμός βιοκινητικών παραμέτρων	25
2.10.1 Προσδιορισμός ειδικού ρυθμού αύξησης	25
2.10.2 Προσδιορισμός ξηρού βάρους	26
2.10.3 Προσδιορισμός απόδοσης και παραγωγικότητας	26
Κεφάλαιο 3: Πειραματικά αποτελέσματα	27

3.1 Αποτελέσματα αύξησης των στελεχών <i>Tetraselmis</i>	27
3.2 Αποτελέσματα επαναληπτικών- ασυνεχών καλλιεργειών των στελεχών <i>Tetraselmis</i>	30
3.3 Αποτελέσματα του μέσου όρου παραγωγικότητας	34
3.4 Αποτελέσματα του μέσου όρου αύξησης της βιομάζας και του ξηρού κυτταρικού βάρους	35
3.5 Πίνακες του μέσου όρου απόδοσης και παραγωγικότητας	38
Κεφάλαιο 4: Συζήτηση και συμπεράσματα	39
Βιβλιογραφία	42

Περίληψη

Η εργασία αυτή αφορά την μελέτη σε ασυνεχή καλλιέργεια (Batch Culture) στελεχών φυτοπλαγκτού του γένους *Tetraselmis*, τα οποία απομονώθηκαν από αλυκές του Μεσολογγίου σε υψηλή αλατότητα και δεν έχουν προσδιορισθεί ακόμη σε επίπεδο είδους.

Επιτεύχθηκε ο εγκλιματισμός τριών στελεχών με κωδική ονομασία Mes 5, Mes 17 και Mes 20 του γένους *Tetraselmis* σε συνθήκες εργαστηρίου.

Όλα τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 2 L, με βάση το φυσικό θαλασσίνο νερό (38%) στο οποίο διαμορφώσαμε την αλατότητα τους από 60% αρχική αλατότητα διηθημένο στα 0,02 μm, το οποίο πριν τον εμβολιασμό εμπλουτίζονταν με θρεπτικά άλατα και βιταμίνες σύμφωνα με το πρωτόκολλο Conway και με αρχική συγκέντρωση 1×10^5 cells/ml για το Mes 5 και Mes 17 ενώ για το Mes 20 $1,5 \times 10^5$ cells/ml.

Τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε διαδοχικούς κύκλους, ούτως ώστε να έχουν πλήρως προσαρμοστεί σε συνθήκες περιβάλλοντος. Οι καλλιέργειες, στις οποίες πραγματοποιήθηκε η τελική μέτρηση, ήταν των δέκα και τεσσάρων ημερών διαδοχικά και έγιναν εις τριπλούν.

Τα τρία στελέχη αξιολογήθηκαν ως προς την παραγωγικότητα (κύτταρα/ml/day), την απόδοση (κύτταρα/ml), τον ειδικό ρυθμό αύξησης και την μέγιστη πυκνότητα κυττάρων ($7^{\text{η}}$ - $9^{\text{η}}$ ημέρα στις δέκα ημέρες καλλιέργειας και $3^{\text{η}}$ - $4^{\text{η}}$ ημέρα στις τέσσερις ημέρες καλλιέργειας), ανά κυβικό εκατοστό.

Στην συνέχεια αξιολογήσαμε την καλλιεργητική τους απόδοση για να δούμε μήπως είναι πιο αποδοτικά από άλλα στελέχη του γένους *Tetraselmis*, με σκοπό τη χρήση τους στις Ελληνικές υδατοκαλλιέργειες.

Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν απ' την παρούσα εργασία και σε συνδυασμό με τα ευνοϊκά χαρακτηριστικά του γένους, τα στελέχη *Tetraselmis* Mes 5 και Mes 17 χαρακτηρίζονται κατάλληλα για χρήση στις θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες. Αντίθετα το στέλεχος Mes 20 είχε μεγάλο κυτταρικό βάρος, αλλά πολύ χαμηλή καλλιεργητική απόδοση.

ABSTRACT

This paper is about the study in batch culture (Batch Culture) of strains of the phytoplankton genus *Tetraselmis*, isolated from salt marshes of Missolonghi in high salinity and have yet to be determined at the species level.

First acclimatization these three strains Mes 5, Mes 17 and Mes 20 were achieved in laboratory conditions.

All strains were cultured in conical flasks of 2 L, based on natural seawater (38 ‰) in which we developed the salinity from 60 ‰ initially filtered at 0.02 µm, enriched with nutrients and vitamins according to the protocol Conway and initial concentration of 1×10^5 cells / ml for the Mes 5 and Mes 17 while for Mes 20 $1,5 \times 10^5$ cells / ml.

The strains were grown in two consecutive rounds of ten and four days in order to have fully adjusted to environmental conditions. The measured cultures were performed in triplicate.

After collecting and processing the results, the three strains were evaluated for productivity (cells/ml/day), efficiency (cells/ml), specific growth rate and maximum density of cells per milliliter.

Then we evaluated the performance of the strains to see if they are more efficient than other strains of the genus *Tetraselmis*, with a view to their use in Greek aquaculture.

Based on the experimental results obtained by the present study and in combination with the favorable characteristics of the genus, the strains *Tetraselmis* Mes 5 and Mes 17 were found suitable for use in marine aquaculture. In contrast, the strain Mes 20 had large cell weight but very slow growth.

Εισαγωγή

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε μελέτη παραγωγικής απόδοσης για τα τρία στελέχη του γένους *Tetraselmis* με κωδικούς Mes 5, Mes 17 και Mes 20. Τα στελέχη είχαν συλλεχθεί από τη μεγάλη αλυκή του Μεσολογίου, την Άνοιξη του 2009 και απομονωθεί από το Πανεπιστήμιο Αθηνών. Τηρούνταν στο εργαστήριο θαλασσοκαλλιέργειών ως καθαρές σειρές, καλλιεργούμενα σε τακτά χρονικά διαστήματα. Η εργασία είχε ως κύριο στόχο να διαπιστώσουμε ποια είναι η δυνατότητα των συγκεκριμένων στελεχών για εναλλακτική χρήση τους στις Ελληνικές θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες.

Κεφάλαιο 1: Μικροφύκη

1.1. Τι είναι Μικροφύκη

Η ταξινόμηση των φυκών είναι εξαιρετικά περίπλοκη. Τα φύκη δεν αποτελούν ένα κοινό φυλογενετικό σύνολο ειδών, αλλά μία οικολογική ομάδα με κοινό τους χαρακτηριστικό ότι είναι υδρόβιοι οργανισμοί που φωτοσυνθέτουν. Υπάρχουν είδη τα οποία ανήκουν στο ζωικό βασίλειο, άλλα είναι φυτά, όπως επίσης και άλλα όπως η γνωστή μας σπιρουλίνα, τα οποία ανήκουν στο βασίλειο των βακτηρίων. (Proksch et al., 2006).

Τα φύκη δεν έχουν βλαστούς, φύλλα, ρίζες και δεν σχηματίζουν σπέρματα, άνθη ή καρπούς. Σχηματίζουν σπόρια αντί σπέρμα. Ορισμένα έχουν πολύπλοκους βιολογικούς κύκλους ζωής (ΕΛ.ΦΕ, 2008). Λόγω του μικρού μεγέθους και της υδάτινης ύπαρξης τους, τα μικροφύκη δεν απαιτούν ένα άκαμπτο σκελετό για την αντιμετώπιση της δύναμης της βαρύτητας με τον τρόπο των ανώτερων φυτών (Støttrup et al., 2003). Τα πλαγκτικά μονοκύτταρα φύκη είναι αυτότροφοι οργανισμοί. Αντιπροσωπεύουν την αφετηρία της τροφικής αλυσίδας και συνιστούν το πρώτο επίπεδο της πρωτογενούς παραγωγής (Κλαδάς, 2006). Από πλευράς μορφολογίας υπάρχει εξαιρετική ποικιλία. Υπάρχουν φύκη μικροσκοπικά, αόρατα με γυμνό μάτι (μικροφύκη) και άλλα ορατά με γυμνό μάτι (μακροφύκη) (ΕΛ.ΦΕ, 2008) .

1.2. Αναπαραγωγή Φυτοπλαγκτού

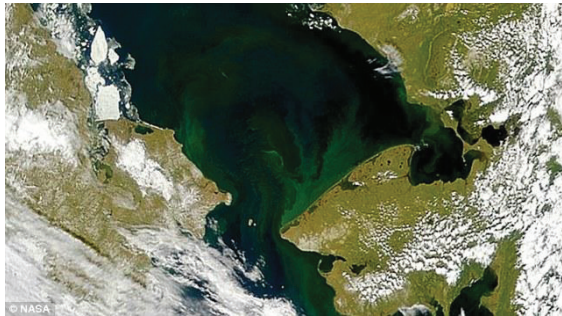
Τα φύκη αναπαράγονται με εκπληκτικά διαφορετικούς τρόπους. Κάποια αναπαράγονται αγενώς, άλλα χρησιμοποιούν τη φυλετική αναπαραγωγή (εγγενώς) και πολλά χρησιμοποιούν και τα δύο. Στην αγενή αναπαραγωγή ένα άτομο αναπαράγεται χωρίς να συνδυάζεται το γενετικό υλικό του με αυτό του άλλου ατόμου. Η απλούστερη μορφή της αγενούς αναπαραγωγής είναι η δυαδική σχάση, στην οποία ένα μονοκύτταρος οργανισμός απλώς διαιρείται σε δύο νέα άτομα.

Στην φυλετική αναπαραγωγή, το γενετικό υλικό ενός νέου οργανισμού προκύπτει από τον συνδυασμό γενετικού υλικού και των δύο ατόμων (Alan et al., 2000).

Ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η έλλειψη θρεπτικών συστατικών, μπορεί να πυροδοτήσει τα απλοειδή θυγατρικά κύτταρα να υποβληθούν σε σεξουαλική αναπαραγωγή. Αντί του σχηματισμού σε σπόρια, τα απλοειδή θυγατρικά κύτταρα σχηματίζουν αρσενικούς και θηλυκούς γαμέτες προερχόμενους από διαφορετικά στελέχη ζευγαρώματος. Σε κάθε ζευγάρι, τα δύο στελέχη είναι δομικά παρόμοια και ονομάζονται συν και μείον στελέχη. Τα αντίθετα στελέχη ζευγαρώματος συντήκονται σε μια διαδικασία γνωστή ως ισογαμία (isogamy) σχηματίζοντας ένα ζυγωτό διπλοειδές, το οποίο περιέχει δύο σύνολα χρωμοσωμάτων. Μετά από μια περίοδο λήθαργου, το ζυγωτό υφίσταται μείωση, ένας τύπος της κυτταρικής διαίρεσης που μειώνει το γενετικό περιεχόμενο ενός κυττάρου κατά το ήμισυ. Αυτή η κυτταρική διαίρεση παράγει τέσσερα γενετικά μοναδικά κύτταρα απλοειδή που τελικά αναπτύσσονται σε ώριμα κύτταρα (Alan et al., 2000).

1.2.1. Που συναντώνται

Τα μικροφύκη έχουν αποικίσει ποικίλα περιβάλλοντα. Από ζεστά νερά πηγών, σε πολικούς πάγους και ορισμένα είδη παρουσιάζουν μεγάλη αντοχή στην ξηρασία, υψηλή αλατότητα, συνθήκες χαμηλού φωτισμού κλπ. (Støttrup et al., 2003). Τα βρίσκουμε σε υψηλές συγκεντρώσεις των εύκρατων υδάτινων οικοσυστημάτων την Άνοιξη και το Φθινόπωρο, περίοδοι κατά τις οποίες οι συνθήκες θερμοκρασίας και αλατότητα είναι ευνοϊκότερες για την ανάπτυξη τους και όπου οι συγκεντρώσεις των διαλυμένων μεταλλικών αλάτων στο νερό είναι σημαντικές (Κλαδάς, 2006).



Εικόνα 2 : Μεγάλη συγκέντρωση φυτοπλαγκτού συναντάται στη θάλασσα Chukchi μεταξύ Αλάσκας και Ιαπωνίας.

(πηγή:<http://www.dailymail.co.uk/sciencetech/article-2157668/Shock-finding-massive-algal-bloom-Arctic-ice--global-warming-blame.html>)

1.2.2. Ενδιαφέρον και η χρήση τους

Το φυτοπλαγκτόν περιλαμβάνει είδη, που προέρχονται από διάφορες φυλογενετικές ομάδες (Κυανοβακτήρια, Διάτομα, Δινοφύκη, Κρυπτοφύκη, Πυριτιομαστιγωτά, Πρυμνεστοφύκη, Ραφιδιοφύκη, Πρασινοφύκη και Ευγληνοφύκη). Τα φύκη έχουν αναπτύξει διάφορες στρατηγικές για να ανταπεξέλθουν στην ελαχιστοποίηση των θρεπτικών όπως την παραγωγή ειδικών ενζύμων που κατασκευάζουν θρεπτικά και στη θήρευση (Σίνης, 2005).

Οι φυτοπλαγκτονικοί οργανισμοί, μέσω της λειτουργία της φωτοσύνθεσης παράγουν οργανικές ενώσεις. Ο ρυθμός με τον οποίον παράγονται είναι γνωστός ως πρωτογενής παραγωγικότητα (Λυκάκης, 1996).

Ο μεταβολισμός των μικροφυκών περιλαμβάνει πολλές βιοχημικές ενώσεις, όπου παρουσιάζουν ενδιαφέρον στη διατροφή, τα καλλυντικά και τη φαρμακευτική βιομηχανία (Støttrup et al., 2003).

Η αναζήτηση φαρμάκων από τη θάλασσα έχει αποφέρει έναν εντυπωσιακό κατάλογο φυσικών προϊόντων ως επί το πλείστον από ασπόνδυλα, όπως σφουγγάρια και άλλα που βρίσκονται, είτε σε προχωρημένα στάδια των κλινικών δοκιμών, ενώ μερικά έχουν ήδη εισέλθει στην αγορά (Proksch et al., 2006).

Η μεταβολική πλαστικότητα των μικροφυκών έχει μελετηθεί εκτενώς, ιδίως στην ικανότητα τους να συνθέτουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), ευεργετικά για την διατροφή των ζώων (Støttrup et al., 2003).

1.3. Φύκη και υδατοκαλλιέργειες

Η μείωση των αποθεμάτων των ψαριών και των αλιευμάτων από την αλιεία κατά τα τελευταία χρόνια έχει οδηγήσει σε μια ολοένα αυξανόμενη έμφαση στην υδατοκαλλιέργεια (Michael, 1997).

Τα μικροφύκη θεωρούνται ως οι κύριοι πρωτογενείς παραγωγοί των υδατικών συστημάτων. Τα μικροφύκη παράγουν μια ποικιλία από μεταβολίτες και διαφέρουν μεταξύ τους όσον αφορά τη χημική τους δομή και τη φυσιολογική τους λειτουργία. Τέτοιες μπορεί να είναι πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, αμινοξέα και πεπτίδια, αντιβιοτικές και τοξικές ουσίες (Cohen & Vonshak, 1991).

Τα πρώτα είδη μικροφυκών που χρησιμοποιήθηκαν στην υδατοκαλλιέργεια, είχαν επιλεγεί γιατί ήταν εύκολα καλλιεργήσιμα στο θαλασσινό περιβάλλον των αρχικών υδατοκαλλιεργειών. Στη συνέχεια άλλα είδη που συλλέχθηκαν, ερευνήθηκαν και αυτά που ήταν αποδοτικότερα και θρεπτικότερα διατηρήθηκαν (Moretiii et al., 1999).

Η θετική επίδραση των φυκών στην υδατοκαλλιέργεια περιλαμβάνει την παροχή οξυγόνου στο μέσο εκτροφής και μια φυσική βάση διατροφής για τα καλλιεργούμενα ζώα. Τα φύκη που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των ζωοτροφών καλλιεργούνται σε εντατικές μονοκαλλιέργειες για το προνυμφικό στάδιο των δίθυρων μαλακίων, τις γαρίδες, ορισμένα είδη ψαριών και σε εκτατικές καλλιέργειες για την ανάπτυξη εκτός των δίθυρων μαλακίων, κυπρίνων και γαρίδων (Priyadarshani et al., 2012).

Χρησιμοποιούνται επίσης για την μαζική παραγωγή του ζωοπλαγκτού (τροχόζωα, κωπήποδα, γαρίδες άλμης), τα οποία με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως τροφή για τις προνύμφες και πρώιμα στάδια των οστρακόδερμων και των ψαριών (Lavens & Sorgeloos, 1996).

Τα γένη μικροφυκών *Chaetoceros*, *Thalassiosira*, *Tetraselmis*, *Isochrysis* και *Nannochloropsis* περιλαμβάνονται στα πιο συνηθισμένα μικροφύκη που χρησιμοποιούνται για τροφές προνυμφών (Priyadarshani et al., 2012).



Εικόνα 3: Καλλιέργεια μικροφυκών σε μεγάλους όγκους
(πηγή:http://www.umbc.edu/marinebiotech/fisheries_tech.html)

1.3.1 Χρήση των καλλιεργούμενων μικροφυκών στις υδατοκαλλιέργειες, λόγω της αντιμικροβιακής τους δράσης απέναντι σε παθογόνα βακτήρια των ψαριών

Στις μονάδες εκτροφής ψαριών και καρκινοειδών, τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται ως παράγοντες βιοελέγχου για την καταπολέμηση παθογόνων και ευκαιριακών βακτηρίων του θαλάσσιου περιβάλλοντος (Vine et al., 2006).

Η τεχνική του «πράσινου νερού», που συνιστάται στην προσθήκη μικροφυκών στις δεξαμενές εκτροφής ιχθυονυμφών, έχει βρεθεί ότι έχει θετική επίδραση στη βιωσιμότητα των νυμφών (Oie et al., 1997) και στη σύνθεση των ειδών της εντερικής τους μικροχλωρίδας, ελαττώνοντας τους αριθμούς των ομορτομιστικών βακτηρίων (Salvesen et al., 1999).

Επιπλέον, τα μικροφύκη επιδρούν στην βακτηριακή κοινότητα των δεξαμενών εκτροφής (Salvesen et al., 1999) προάγοντας και εμποδίζοντας την ανάπτυξη των βακτηρίων με την παραγωγή μεταβολιτών (Duff et al., 1996). Ενώ ορισμένα είδη βακτηρίων που συμβιούν με μικροφύκη παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες ενάντια σε παθογόνα βακτήρια (Makridis et al., 2006).

Τέλος, από έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί σε θαλάσσια μικροφύκη (Katharios, 2005) διαπιστώθηκε ότι αποτελούν μια εξαιρετική πηγή βιολογικά ενεργών προϊόντων που μπορούν να χρησιμεύσουν ως προληπτικά και θεραπευτικά απέναντι σε βακτηριακές ασθένειες των ψαριών.

1.3.2. Τεχνική των «ψευδοπράσινων νερών» νερών

Η τεχνική των πράσινων νερών βασίζεται στη δημιουργία των βέλτιστων συνθηκών, για την ενδογενή άνθηση του φυτοπλαγκτού των οργανισμών (Papandroulakis et al., 2001).

Σε μικρής κλίμακας εργαστηριακά πειράματα, καθώς και σε μεγάλης κλίμακας εντατικών συστημάτων εκτροφής, η τεχνική των πράσινων νερών, με τη συμμετοχή του αιωρούμενου αδιάλυτου υλικού των φυκών στις δεξαμενές εκτροφής, ευνοείται από πολλούς υδατοκαλλιεργητές.

Τα προβλήματα που παρουσιάζονται από την τεχνική των πράσινων νερών είναι η αργή και ανάλογα την εποχή, εξαρτώμενη ανάπτυξη της ενδογενούς τροφικής αλυσίδας που μπορεί να προκαλέσει έλλειψη διαθεσιμότητας της τροφής για τις προνύμφες (Papandroulakis et al., 2001).

1.3.3. Ανθιση του νερού

Ο σημαντικός ρόλος του φυτοπλαγκτού σε μια μάζα νερού προκύπτει από το γεγονός ότι οι φωτοαυτότροφοι φυτοπλαγκτικοί οργανισμοί είναι οι παραγωγοί από τους οποίους εξαρτάται η υδρόβια ζωή. Μερικοί κατώτεροι φυτικοί οργανισμοί και μάλιστα φύκη συγκεντρώνονται στην επιφάνεια του νερού με μορφή πυκνών και ορατών επιστρωμάτων. Το φαινόμενο αυτό, γνωστό σαν «Ανθιση του νερού» (blooms) εξαιτίας της χρώσης των νερών, χαρακτηρίζεται από την άφθονη παραγωγή φυκών που κατανέμονται στο νερό ομοιόμορφα (Λυκάκης, 1996).

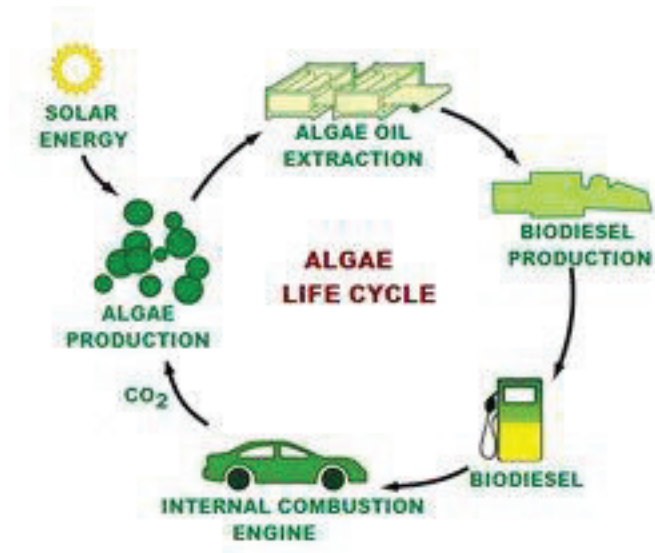
1.4. Μικροφύκη και Βιοκαύσιμα

Τα μικροφύκη έχουν πολύ σύντομη διάρκεια ζωής έτσι καθιστούν δυνατή την πολλαπλή και συνεχή συγκομιδή της ετήσιας βιομάζας σε αντίθεση με καλλιέργειες ελαιούχων σπόρων. Ταυτόχρονα έχουν υψηλότερη απόδοση ηλιακής ενέργειας, δίνει έτσι τη δυνατότητα επίτευξης απaráμιλλης παραγωγικότητας. Τα λιπίδια που παράγονται είναι γενικότερα ουδέτερα λιπίδια που έχουν ένα υψηλό επίπεδο κορεσμού καθιστώντας το ιδανική πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντίζελ. Η βιομάζα, ωστόσο, μπορεί να μετατραπεί σε βιοκαύσιμο λάδι μέσω μιας θερμοχημικής διαδικασία μετατροπής (Suali et al., 2012).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες στην ανάπτυξη τους τα φύκη απορροφούν το ηλιακό φως, αφομοιώνοντας το διοξείδιο του άνθρακα από τον αέρα και τα θρεπτικά από τα υδάτινα ενδαιτήματα (Suali et al., 2012).

Τα μικροφύκη έχουν ταχείς ρυθμούς ανάπτυξης και βραχείς χρόνους γενιάς. Επίσης είναι κοινώς γνωστό ότι διπλασιάζουν το βάρος τους σε σχέση με τη βιομάζα μέσα σε 24 ώρες. Τέλος απαιτούν λιγότερο νερό για την καλλιέργεια από τα χερσαία φυτά (Rawat et al., 2012).

Τα μικροφύκη μπορούν να συνθέσουν και να συσσωρεύσουν ταχύτατα σημαντικά υψηλότερες ποσότητες λιπιδίων από τα χερσαία φυτά λόγω των υψηλών ρυθμών ανάπτυξης τους, ταυτόχρονα μεταβάλλονται τα βιοσυνθετικά λιπίδια για την αποθήκευση πλέον των ουδέτερων λιπιδίων. Οι αποδόσεις των λιπιδίων και οι ρυθμοί αύξησης διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των διάφορων ειδών (Rawat et al., 2012).



Εικόνα 5: Παραγωγή βιοκαυσίμων από μικροφύκη (πηγή: <http://www.biodiesel-kits-online.com/algae-biodiesel.html>).

Όμως επί του παρόντος το ένα πέμπτο των εκπομπών CO₂ είναι από τον τομέα των μεταφορών. Οι προοπτικές για τη μείωση των εκπομπών από τον τομέα των μεταφορών δεν φαίνεται ευοίωνες, δεδομένου ότι ο αριθμός των μηχανοκίνητων οχημάτων στους δρόμους σε παγκόσμιο επίπεδο, εκτιμάται ότι θα αυξηθεί σε πάνω από δύο δισεκατομμύρια οχήματα μέχρι το 2050. Εξαιτίας της μείωσης της προσφοράς, το αργό πετρέλαιο θα εξακολουθήσει να αυξάνεται, καθιστώντας έτσι την παραγωγή καυσίμων από εναλλακτικές πηγές πιο εφικτή (Rawat et al., 2012)

1.5. Είδη φυκών που χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες

Πίνακας 1: Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα είδη στα εκκολαπτήρια των μαλακίων (πηγή: LeRoy, 2010).

Είδη	Μέσος κυτταρικός όγκος (Mm ³)	Οργανικό βάρος (pg)	Περιεκτικότητα σε λιπίδια (%)
Μαστιγοφόρα			
<i>Tetraselmis suecica</i>	300	200	6
<i>Dunaliella tertiolecta</i> *	170	85	21
<i>Isochrysis galbana</i> (T-ISO)	40-50	19-24	20-24
Διάτομα			
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	35	7	17
<i>Chaetoceros gracilis</i>	80	30	19
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	45	22	24
<i>Skeletonema costatum</i>	85	29	12
<i>Phaeodactylum tricorutum</i> *	40	23	12
*είδη που θεωρούνται χαμηλής θρεπτικής αξίας			

1.5.1. *Isochrysis* sp

Το *Isochrysis* sp. χρησιμοποιείται ευρέως στις υδατοκαλλιέργειες ως πηγή τροφής, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας του σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και κυρίως DHA. Μετά από μελέτη των Κόκκου και συνεργάτες (2009), φάνηκε από τα αποτελέσματα ότι το *Isochrysis* sp. εμποδίζει την ανάπτυξη των βακτηρίων μετά από 24 ώρες συγκαλλιέργειας.

Το θαλάσσιο Μικροφύκος *Isochrysis* sp. *galbana* Parke (Haptophyceae) είναι ένα γυμνό μαστιγωτό που παρέχει εξαιρετική διατροφή για τις προνύμφες και σήμερα χρησιμοποιείται ευρέως στην υδατοκαλλιέργεια (Fabregas et al., 1986).

1.5.2. *Nannochloropsis* sp

Το *Nannochloropsis* sp. θεωρείται υψηλής διατροφικής αξίας θαλάσσιο μικροφύκος, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στον κλάδο της υδατοκαλλιέργειας στα εκκολαπτήρια που καλλιεργούνται φυτοπλακτονοφάγα ζώα, όπως προνύμφες ιχθυδίων, δίθυρα μαλάκια, κ.α. (Alsull and Wan Omar, 2012).

Μετά από μελέτη των Asluss and Wan Omar (2012), παρατήρησαν ότι το *Nannochloropsis* sp. δεν επηρεάζεται από τη διακύμανση της αλατότητας αλλά σε σχέση με το *Tetraselmis* sp. το *Nannochloropsis* sp. έχει μικρότερη περιεκτικότητα σε λιπίδια και μικρότερο ποσοστό χλωροφύλλης α.

1.5.3. *Tetraselmis* sp

Αρκετές πρόσφατες μελέτες έχουν εντοπίσει είδη φυκών ιδιαίτερα κατάλληλα για τροπικές υδατοκαλλιέργειες με υψηλά-λιπίδια που περιέχουν στελέχη *Tetraselmis* που ενισχύουν την ανάπτυξη των νυμφών στρειδιών (Borowitzka, 1997).

Το θαλάσσιο Μικροφύκος *Tetraselmis suecica* είναι γνωστό για την ικανότητα του να ανέχεται ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων άλατος. Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του είναι μεταξύ 25 και 35 ‰ αλατότητας και θρεπτικών συγκεντρώσεων των 2,4 mM (203,99 mg/ L) και 8 mM (679,98 mg/ L) από NaNO₃ και μέγιστη πυκνότητα 1,3 x10⁶ κύτταρα/ml. Παραλλαγές της αλατότητας και της συγκέντρωσης σε θρεπτικά έχουν μεγαλύτερη επίδραση στην τελική βιομάζα από ότι στην ταχύτητα ανάπτυξης. Η συνολική πρωτεΐνη και η πρωτεΐνη ανά κύτταρο αυξάνεται όταν η περιεκτικότητα σε αλάτι αυξάνεται για μια δεδομένη συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών. Η συνολική πρωτεΐνη των καλλιέργειών μειώνεται όταν η συγκέντρωση θρεπτικών αυξήθηκε για μια δεδομένη αλατότητα. Η αλατότητα και οι συγκεντρώσεις θρεπτικών ουσιών έχουν μικρή επίδραση στην ταχύτητα ανάπτυξης σε σύγκριση με την παραγωγή βιομάζας (Fabregas, 1984).

Συμπυκνώματα *T. suecica* αποθηκεύθηκαν στους 4 °C για τουλάχιστον 7 ημέρες και το πολύ 14 ημέρες πριν από τη χρήση αξιολογήθηκαν ως πηγή τροφής για προνύμφες του στρειδιού (*Saccostrea commercialis*) (Montaini et al., 1995).

Επιπρόσθετα οι ερευνητές έχουν εστιάσει την προσοχή τους σε μικροφύκη που μπορούν να διατηρηθούν ως εναλλακτικές διατροφές με διαφορετικές τεχνικές διατήρησης πχ κατεψυγμένες συμπυκνωμένες καλλιέργειες (Montaini et al., 1995).

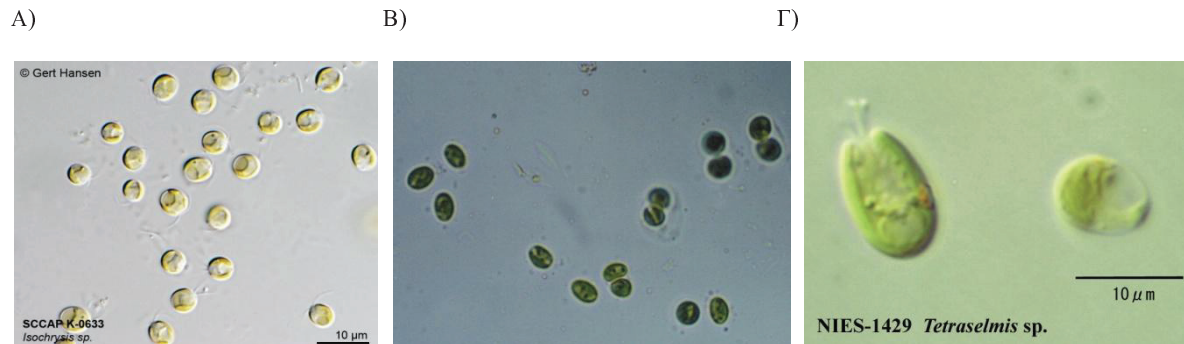
Σύμφωνα με μελέτη των Montaini et al., 1995 παρουσιάζουν τις επιδράσεις της διατήρησης του *Tetraselmis suecica* με κατάψυξη με και χωρίς κρυοπροστατευτικό, κατάψυξης σε υγρό άζωτο και τη συντήρηση των συμπυκνωμένων καλλιέργειών στους 4 °C για βιωσιμότητα και προφίλ λιπαρών οξέων. Για τη μακροπρόθεσμη διατήρηση (21 μήνες), το πάγωμα μπορεί να κρατήσει το προφίλ των λιπαρών οξέων ως έχουν, αν και με αποτέλεσμα την πλήρη απώλεια της βιωσιμότητας των κυττάρων (Montaini et al., 1995).

Επιπλέον, η διαθεσιμότητα του οξυγόνου επηρεάζει την επιβίωση των κυττάρων.

Παρατηρήθηκε μετά από μελέτη του Κόκου και των συνεργατών (2009), ότι το μικροφύκος *T. chuii* εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση, αναστέλλοντας την ανάπτυξη των παθογόνων μετά από 24 συγκαλλιέργειες. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα ίδια πειράματα που πραγματοποιήθηκαν in vivo δοκιμές με το αξενικό είδος *T. suecica* χρησιμοποιώντας το ως πηγή τροφής σε εκκολαπτήριο της λευκής γαρίδας *Fenneropenaus indicus*.

Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και σε καλλιέργεια του καρκινοειδούς *Artemia franciscana* , όταν τρεφόταν με το μικροφύκος *Tetraselmis* sp. , το οποίο συνέβαλλε στην ελάττωση του αριθμού των οπορτουμιστικών βακτηρίων στο νερό και στο έντερο των ζώων και ειδικά του παθογόνου *Vibrio alginolyticus* , που κυριαρχεί στις καλλιέργειες

της *Artemia*. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι το μικροφύκος *T. chuii* αποτελεί ένα ιδανικό είδος για την εφαρμογή της τεχνικής των «πράσινων νερών» στην εκτροφή νυμφών, ελαττώνοντας το μικροβιακό φορτίο και την ανάπτυξη παθογόνων στελεχών (Κόκου και συνεργάτες, 2009).



Εικόνα 6: Α) *Isochrysis sp.* Β) *Nannochloropsis sp.* Γ) *Tetraselmis sp.* (πηγή: Α) <http://www.sccap.dk/pix/K-0633.jpg>
Β) http://www.kmmcc.re.kr/pop_bimg.php?coodcode=9-4-54&mode=mall Γ)
<http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/images/strainsimage/nies-1429.jpg>

Εκτός από τη χρησιμοποίησή του στις καλλιέργειες των τροχόζωων, το είδος χρησιμοποιείται και στην αναπαραγωγή δίθυρων μαλακίων. Σύμφωνα με τον Συμεωνίδη (2010), συνδυάζοντας *Isochrysis galbana* με *Tetraselmis suecica* στη τροφή, η ανάπτυξη του στρειδιού *Ostrea edulis* ήταν μεγαλύτερη, σε σχέση με αυτήν που παρατηρήθηκε όταν το *Isochrysis galbana* χρησιμοποιήθηκε ως η αποκλειστική τροφή. Η χρήση του *Tetraselmis suecica* σε συνδυασμό με άλλα μικροφύκη, είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή σημαντικά μεγαλύτερων νυμφών και περισσότερων ατόμων στο στάδιο εμφάνισης της οφθαλμικής κηλίδας μετά από οκτώ ημέρες, σε σχέση με άτομα στα οποία δόθηκε ένα μόνο στέλεχος ως τροφή.

1.5.4 Σχετικά με τα χρησιμοποιούμενα είδη στις υδατοκαλλιέργειες

Παρά τα προβλήματα που παρουσιάζουν οι καλλιέργειες στο φυσικό περιβάλλον, η παραγωγή γόνου στα εκκολαπτήρια των δίθυρων μαλακίων αυξάνεται συνεχώς, αντιπροσωπεύοντας ένα μεγάλο ποσοστό της συνολικής παραγωγής γόνου σε διάφορες περιοχές του πλανήτη (π.χ το 80% στη δυτική ακτή ΗΠΑ, το 10-20% στη Γαλλία). Η επιτυχία και η βιωσιμότητα αυτών των μονάδων εξαρτώνται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τη μαζική παραγωγή μικροφυκών, τα οποία χρησιμοποιούνται ως η αποκλειστική τροφή των γεννητόρων, των νυμφών και των νεαρών ατόμων των οστρακοειδών (Συμεωνίδης, 2010).

Επιλεγμένα στελέχη μικροφυκών και ειδικότερα τα θαλάσσια είδη, παίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών. Αποτελούν τροφή εξαιρετικής θρεπτικής αξίας για πολλά εκτρεφόμενα είδη και κυρίως για τις νύμφες και τα νεαρά άτομα δίθυρων μαλακίων. Τα *Chaetoceros sp.*, *Isochrysis sp.*, *Skeletonema sp.* και *Tetraselmis sp.* είναι ορισμένα από τα είδη μικροφυκών που χρησιμοποιούνται συχνά στην εκτροφή θαλάσσιων οργανισμών, όπως φαίνεται και στον πίνακα 1 (Συμεωνίδης, 2010).

Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με τις επιδράσεις διαφόρων παραμέτρων όσον αφορά την ανάπτυξη του *Tetraselmis suecica* (Sen et al., 2005).

Το *T. suecica* θεωρείται ένα στέλεχος υψηλής παραγωγικότητας, με μέση παραγωγικότητα λιπιδίου $32 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Το θαλάσσιο αυτό μικροφύκος είναι μεταξύ των καλύτερων παραγωγών βιομάζας και είναι αρκετά ανθεκτικό (Montero et al., 2011).

Το *Tetraselmis suecica* επιλέχθηκε στην εργασία των Montero et al. (2011), λόγω της ταχείας του ανάπτυξης, την υψηλή πηγή βιομάζας και την παρουσία λιπιδίων καθ' όλη τη διάρκεια εξέλιξης του πολιτισμού.

1.6. Σκοπός και στόχοι της πτυχιακής εργασίας

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής ήταν ο εγκλιματισμός και η αξιολόγηση της καλλιεργητικής απόδοσης τριών στελεχών του φυτοπλαγκτικού γένους *Tetraselmis* με κωδικούς Mes 5, Mes17 και Mes 20, καθώς και η προσαρμογή τους σε αλατότητα 40‰ (Κεφάλαιο 2.1 Εισαγωγή). Τα στελέχη αυτά απομονώθηκαν από αλυκές του Μεσολογίου, με στόχο την διερεύνηση της προοπτικής χρήσης τους στις Ελληνικές θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες.

Κεφάλαιο 2: Υλικά και μεθοδολογία

2.1. Εισαγωγή

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο ΤΕΙ Ηπείρου (Παράρτημα Ηγουμενίτσας), στο εργαστήριο Θαλασσινών Ειδών του Τμήματος Ιχθυοκομίας –Αλιείας, στο χρονικό διάστημα 22/03/2011 – 10/06/2011.

Τα φύκη είχαν συλλεγθεί από τη μεγάλη αλυκή του Μεσολογγίου, την Άνοιξη του 2009 , σε αλατότητα 60‰ και απομονωθεί από το Πανεπιστήμιο Αθηνών. Τηρούνταν στο εργαστήριο θαλασσοκαλλιέργειών ως καθαρές σειρές, καλλιεργούμενα σε τακτά χρονικά διαστήματα.

2.2. Καλλιέργεια φυτοπλαγκτού

Οι καλλιέργειες που αναπτύσσονται σε άριστες συνθήκες προάγουν υψηλές συγκεντρώσεις δηλαδή βρίσκονται σε οριστική φυσιολογική κατάσταση και η παραμικρή απόκλιση κάποιου παράγοντα οδηγεί σε κατάρρευση (Τζοβενής, 2003). Καλλιέργειες μεγάλου όγκου αποκτώνται με διαδοχική αναβάθμιση μικρότερων όγκων (καλλιέργειες σε παρτίδες, batch). Οι τελικές συγκεντρώσεις εξαρτώνται από το στέλεχος και το περιβάλλον που παρέχει το σύστημα καλλιέργειας. Όλα τα στάδια απαιτούν κατάλληλα θρεπτικά μέσα, άριστες συνθήκες φωτός, αερισμό για ανάδευση και εμπλουτισμό CO₂. Σε όλα τα στάδια η εργασία γίνεται κάτω από συνθήκες ασηπτικές ή ημιασηπτικές (απολυμάνσεις, περιορισμένη έκθεση στον αέρα, διήθηση νερού, αερισμού) (Τζοβενής, 2003).

2.3. Πρωτόκολλο καλλιέργειας

Πήραμε τα στελέχη σε αποστειρωμένους πλαστικούς σωλήνες (Falcon) των 20 ml από το Πανεπιστήμιο Αθηνών και τα εμβολιάσαμε σε μικρές στατικές καλλιέργειες (starters) των 40 ml σε 60‰ αλατότητα. Μετά από τέσσερις ημέρες φτιάξαμε starters σε δοκιμαστικούς σωλήνες στην ίδια αλατότητα.

Στη συνέχεια πήραμε από τα πρώτα και εμβολιάσαμε νέα starters, όμως σε 40‰ αλατότητα (χρησιμοποιώντας απεσταγμένο νερό, διηθημένο στα 0,2 μm) για αν δούμε αν μπορούν να αντέξουν. Αφού προσαρμόστηκαν εμβολιάσαμε από το καθένα τρία νέα starters των 60 ml σε αλατότητα 40‰.

Μετά από πέντε ημέρες κρατήσαμε το καλύτερο από τα τρία starters και το εμβολιάσαμε σε φιάλη 500 ml σε 40‰ αλατότητα. Με το επόμενο καλύτερο φτιάξαμε τρία νέα στελέχη (starters) στον πάγκο με φωτισμό σαν εφεδρικά.

Μετά από τέσσερις ημέρες, από μία καλλιέργεια των 500 ml φτιάξαμε τρεις φιάλες των 2 L με αερισμό (παράγραφος 2.4).

Οι φιάλες ξεκινούσαν με αρχική συγκέντρωση κυττάρων 1×10^5 cells/ml. Η κυτταρική συγκέντρωση των καλλιεργειών μετρούνταν από την πρώτη μέρα και για τις επόμενες δέκα ημέρες, ώστε να φτιαχτεί καμπύλη ανάπτυξης.

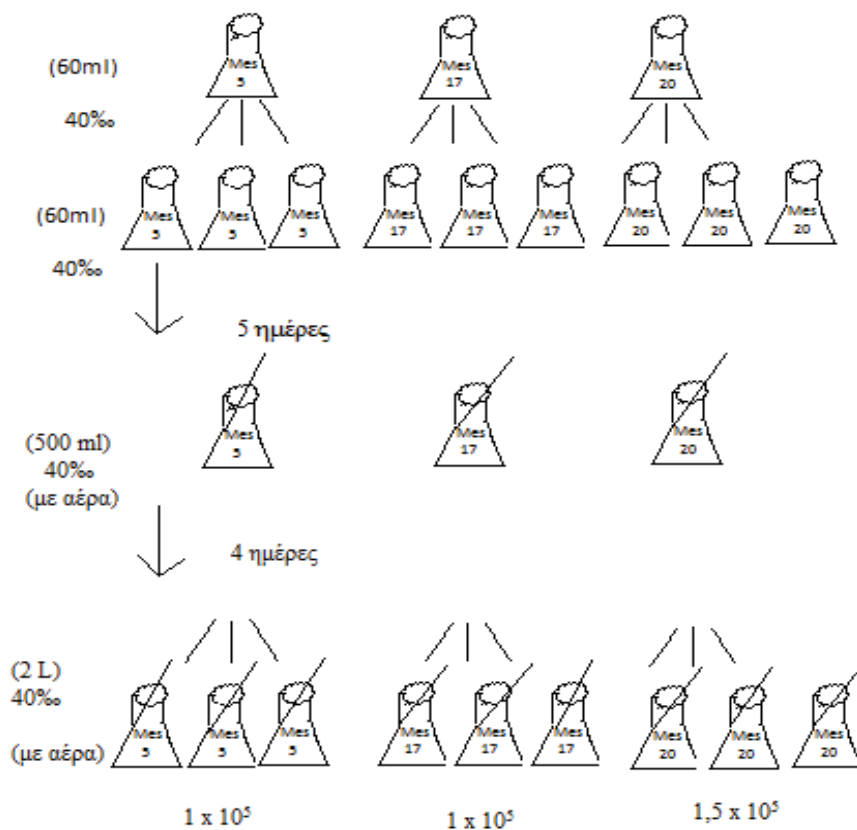
Εν τω μεταξύ γίνονταν ανανέωση των στελεχών και ξεκίνημα νέων καλλιεργειών 500 ml, που στη συνέχεια αναβαθμίζονταν με τον ίδιο τρόπο στα 2 L.

Μετρούσαμε την κυτταρική τους συγκέντρωση κάθε μέρα για δέκα ημέρες αρχικά (πρώτος κύκλος μετρήσεων) και στις επόμενες μετρήσεις για τέσσερις ημέρες (δεύτερος κύκλος μετρήσεων). Την τέταρτη ημέρα μετά την μέτρηση πήραμε δείγματα από τις καλύτερες φιάλες που είχαμε στο κάθε είδος χωριστά για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους.



Εικόνα 7: Τοποθετημένα στον πάγκο τρία στελέχη (καθαρές καλλιέργειες startes) των 60 ml σε 40% για το κάθε είδος χωριστά (πηγή: φωτογραφία από την συγγραφέα).

2.4. Σχεδιασμός και οργάνωση πειράματος



Στο σχεδιάγραμμα αυτό παρουσιάζεται η οργάνωση του πειράματος, μετά την προσαρμογή των στελεγχών σε 40‰ αλατότητα και την δημιουργία τριών starters από το κάθε είδος στα 60 ml, καθώς και η διαδοχική αλλαγή όγκων μέχρι τα 2 L όπως παρουσιάζεται αναλυτικά στο πρωτόκολλο καλλιέργειας (παράγραφος 2.3).

2.5. Συνθήκες βιοασφάλειας

Για την αποφυγή μολύνσεων τηρήθηκαν οι εξής συνθήκες:

- Στο δωμάτιο εργασίας οι πόρτες και τα παράθυρα ήταν κλειστά κατά τη διάρκεια εμβολιασμών και δειγματοληψιών ώστε να μην δημιουργείται ρεύμα.
- Χρησιμοποιήθηκε Λυχνία Bunsen για να αποστειρώνεται ο αέρας του χώρου εμβολιασμού.
- Ο πάγκος εργασίας και τα χέρια απολυμαίνονταν με οινόπνευμα
- Τα εργαλεία που χρησιμοποιούνταν καθαρίζονταν και αποστειρώνονταν κάθε φορά στο αυτόκαυστο και τοποθετούνταν σε ειδικά ράφια στον πάγκο εργασίας.
- Το κάλυμμα από τις κωνικές φιάλες αφαιρούνταν προσεκτικά κοντά στην φλόγα.
- Ο κάθε εμβολιασμός γίνονταν με διαφορετική αποστειρωμένη πιπέτα
- Απαγορεύονταν σε άτομα χωρίς αρμοδιότητα να εισέρχονται στον χώρο
- Όταν οι εργασίες τελείωναν, ο πάγκος απολυμαίνονταν ξανά με οινόπνευμα και τα εργαλεία τοποθετούνταν στην θέση τους.

2.6. Εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε:

- Θάλαμος σταθερής θερμοκρασίας
- Θερμόμετρο δωματίου
- Αυτόκαυστο
- Μικροσκόπιο
- Αιματοκυτταρόμετρο και καλυπτρίδες για την μέτρηση των κυττάρων των μικροφυκών
- Πιπέτες Eppendorf
- Πιπέτες Paster
- Ογκομετρικές πιπέτες
- Αλατόμετρο
- Αναδευτήρας δοκιμαστικού σωλήνα
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Ογκομετρικές φιάλες
- Κωνικές φιάλες
- Δοκιμαστικούς σωλήνες και στατό (υποστήριγμα δοκιμαστικών σωλήνων)
- Υδροφοβο βαμβάκι
- Αλουμινόχαρτο
- Ψυγείο
- Φούρνος
- Νεροχύτης και πάγκος εργασίας για τον εμβολιασμό

- Φίλτρο με μεμβράνη τύπου «multipore» διαμέτρου πόρων 0,45 ή 0,22 μm για σύριγγες
- Λυχνία Bunsen
- Κλιματιστικό
- Ζυγαριά ακριβείας
- Σύριγγες
- Θαλασσινό νερό
- Απεσταγμένο νερό
- Θρεπτικά
- Βιταμίνες
- Αποστακτήρας
- Lugol



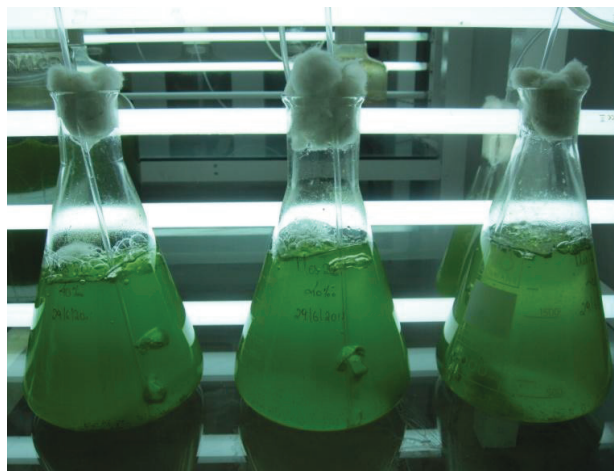
Εικόνες 8,9,10 : Από τον χώρο του εργαστηρίου (πηγή: φωτογραφίες από την συγγραφέα).

2.7. Συνθήκες καλλιέργειας

Οι καλλιέργειες ήταν μονοειδικές σε κωνικές φιάλες των 2 L. Αναπτύχθηκαν σε θερμορρυθμιζόμενο χώρο θερμοκρασίας 20 °C (που συνήθως επιλέγεται έτσι ώστε να ικανοποιηθούν στο μέγιστο οι απαιτήσεις σχεδόν όλων των καλλιεργούμενων ειδών), με συνεχή φωτισμό στα 10 klux από λαμπτήρες φθορισμού (cool day-light) και αερισμό από εξωτερική αεραντλία (διηθημένο από φίλτρο 0,02 μm). Οι καλλιέργειες ήταν εμπλουτισμένες με θρεπτικά άλατα και βιταμίνες με βάση το φυσικό θαλασσινό νερό (38%), αραιωμένο στα 0,2 μm, σύμφωνα με τη συνταγή Conway (Walne, 1966).

Οι καθαρές καλλιέργειες ανακαλλιεργούνταν σε τακτά χρονικά διαστήματα (2 εβδομάδες) για να διασφαλίζεται η βιωσιμότητα και η ποιότητα τους. Πραγματοποιούνταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες, χωρίς αερισμό, σε χαμηλό φωτισμό και θερμοκρασία 16-17 °C. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες ήταν καλυμμένοι με υδρόφοβο βαμβάκι, για να αποφεύγονται οι επιμολύνσεις από τον αέρα του περιβάλλοντος χώρου.

Η εκτίμηση της αριθμητικής αύξησης γινόταν με δειγματοληψία 0,5 ml, σταθεροποίηση με διάλυμα Lugol, κατάλληλη αραιώση και καταμέτρηση της κυτταρικής συγκέντρωσης σε αιμοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer Improved και παρατήρηση στο μικροσκόπιο.



Εικόνα 11: Φιάλη των δύο λίτρων με συνεχή αερισμό (πηγή: φωτογραφία από την συγγραφέα).

2.8. Ανάπτυξη καλλιιεργειών πειράματος

Όπως προαναφέραμε μεταφέραμε την καλλιέργεια από αποστειρωμένους πλαστικούς σωλήνες (Falcon) των 20 ml μετά σε starters των 40 ml, μετά των 60 ml και τέλος σε γυάλινες κωνικές φιάλες των 500 ml και ολοκληρώσαμε στα 2 L (παρ. 2.4). Από την προηγούμενη ημέρα αποστειρώναμε τις κωνικές φιάλες στο αυτόκαυστο έτσι ώστε να μην υπάρχουν μικρόβια και μολύνουν τις καλλιέργειες μας.

Αφού πρώτα αναδεύαμε στον αναδευτήρα (vortex) τα starters, στη συνέχεια τα αποστειρώναμε με την χρήση φωτιάς (Εικόνα 12). Έπειτα μεταφέραμε την καλλιέργεια στις κωνικές φιάλες. Οι κωνικές φιάλες πριν τον εμβολιασμό εμπλουτίζονταν με θρεπτικά (πίνακας 2), τοποθετούνταν στο στόμιο τους υδρόφοβο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο σαν πώμα και αποστειρώνονταν στο αυτόκαυστο (121 °C, 15 PSI, 20 min). Έπειτα τοποθετούνταν για 24 ώρες στο δωμάτιο που διεξάγονταν το πείραμα για να επανέλθει το μέσο καλλιέργειας στη θερμοκρασία του χώρου, ώστε στη συνέχεια να εμβολιασθούν. Μετά τον εμβολιασμό στις κωνικές φιάλες των 500ml και 2L τοποθετούνταν σε συγκεκριμένα σημεία του πάγκου για να επιτευχθεί η ανάπτυξη των κυττάρων με τον κατάλληλο αερισμό και φωτισμό.

Πίνακας 2: Συστατικά θρεπτικού μέσου Conway (Κλαδάς, 2006)

Συστατικά	Ποσότητα	Δόση ανά λίτρο φυτοπλακτονικής καλλιέργειας
A. ΚΥΡΙΟ ΔΙΑΛΥΜΑ (παρασκευή 1L διαλύματος)		1ml
Na ₂ EDTA	45g	
NaNO ₃	116g	
H ₃ BO ₃	33.6g	
NaH ₂ PO ₄	20g	
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.36g	
FeCl ₃ .6H ₂ O	1.3g	
Διάλυμα μετάλλων (B)	1ml	
B. ΔΙΑΛΥΜΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ (παρασκευή 100ml διαλύματος)		
ZnCl ₂	2,1g	
CuSO ₄ .5H ₂ O	2g	
CoCl ₂ .6H ₂ O	2g	
(NH ₄) ₆ Mo7O ₂ .4H ₂ O	0.9g	
HCL (έως την επίτευξη διαηγούς διαλύματος)	0.3ml	
Γ. ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ (παρασκευή 100ml διαλύματος)		0,1ml
Biotine (Βιταμίνη H)	100mg	
Cyanocobalamine (βιταμίνη B ₁₂)	10mg	
Thiamine HCL (βιταμίνη B ₁)	200mg	



Εικόνα 12: Αποστειρωμένος χώρος εργασίας. Δοακρίνεται στη βάση, η φιάλη υγραερίου για τη χρήση του αυτόκαυστου (πηγή: φωτογραφία από την συγγραφέα).

Ασυνεχής καλλιέργεια (batch culture).

Η καλλιέργεια εμβολιαζόταν σε σταθερό όγκο και συγκομιζόταν όταν είχε αναπτυχθεί στην μέγιστη συγκέντρωση (περίπου στην έναρξη της στατικής φάσης).

Οι καλλιέργειες στους μικρούς όγκους (40 ml και 60 ml) αναδεύονταν χειροκίνητα μία φορά την ημέρα, καθώς και πριν από κάθε εμβολιασμό και δειγματοληψία, ενώ στους μεγαλύτερους όγκους (500 ml και 2 L) εφαρμόζονταν συνεχής αερισμός.

Αφού ολοκληρώθηκαν οι μετρήσεις της αύξησης των κυττάρων στο κάθε είδος χωριστά παίρναμε δείγματα από τις καλύτερες φιάλες που είχαμε για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους.

Για την εκτίμηση του αποτελέσματος της καλλιέργειας σε κάθε δέσμη συνθηκών αλλά και για την σύγκριση των καλλιεργειών μεταξύ τους υπολογίστηκαν οι εξής δείκτες:

Ρυθμός αύξησης (d^{-1}) εκθετική φάση

$\mu = [\ln(N_t/N_0)] / (t-t_0)$, όπου t_0 ο χρόνος έναρξης της εκθετικής φάσης (days), t ο χρόνος λήξης (days), N_t η συγκέντρωση κυττάρων την στιγμή λήξης της εκθετικής φάσης, N_0 η συγκέντρωση κυττάρων κατά την έναρξη της εκθετικής φάσης.

Τελική παραγωγή (σε κύτταρα) των τεσσάρων και δέκα ημερών

$Y_c = N_4 - N_0$ cells/ml και $Y_c = N_{10} - N_0$ cells/ml

Η ημερήσια παραγωγικότητα τεσσάρων και δέκα ημερών

$P_c = Y_{d4}/4$ cells/ml/day και $P_c = Y_{d10}/10$ cells/ml/day

Η παραγωγή τεσσάρων και δέκα ημερών ανά κύτταρο

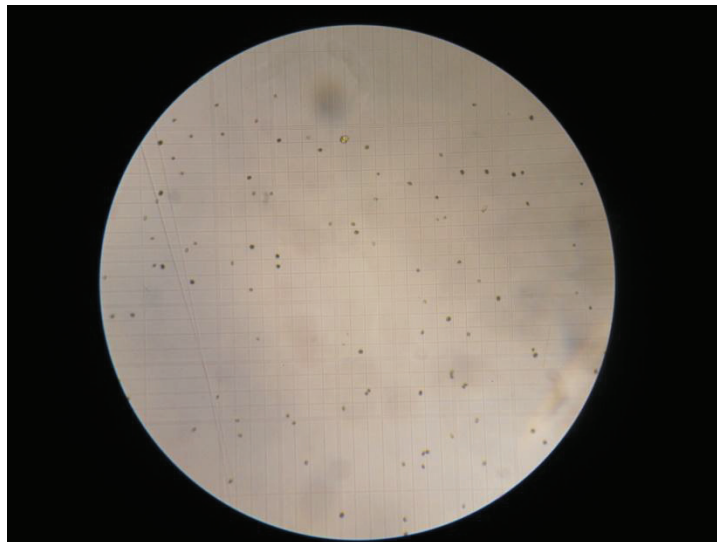
$P_{0d4} = (N_4 - N_0)/N_0$ cells/cell/day (4days cell yield normalized per cell)

$P_{0d10} = (N_{10} - N_0)/N_0$ cells/cell/day (10 days cell yield normalized per cell)

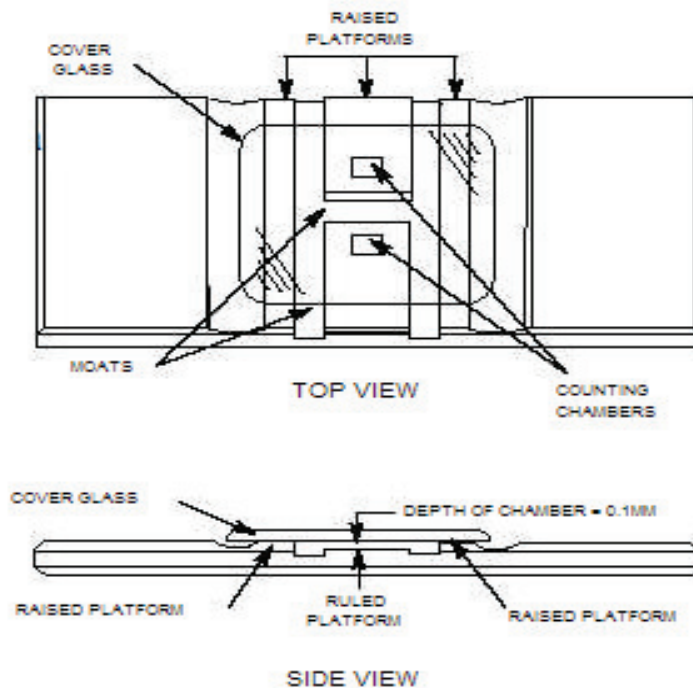
2.9. Διαδικασία μέτρησης της κυτταρικής αύξησης

Η παραγωγή κυττάρων είναι ο κύριος παράγοντας αξιολόγησης καλλιέργειών μικροφυκών. Η παραγωγή (P) εκφράζει την αύξηση της βιομάζας ανά μονάδα χρόνου (Yuehua et al., 2006).

Κατά την δειγματοληψία αναδεύονταν οι κωνικές φιάλες, ώστε η καλλιέργεια να είναι ομοιογενής. Το δείγμα λαμβάνονταν με αποστειρωμένη πιπέτα μιας χρήσεως και τοποθετούνταν σε δοκιμαστικό σωλήνα. Ανάλογα με το πόσο πυκνό ήταν γίνονταν αραιώση και σταθεροποίηση με lugol. Στη συνέχεια αφού αναδεύαμε τον δοκιμαστικό σωλήνα για να ομογενοποιηθεί το δείγμα, μεταφέραμε με μια αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur ποσότητα δείγματος στο αιματοκυτταρόμετρο. Συγκεκριμένα, τοποθετούνταν σταγόνες στις δύο ζώνες καταμέτρησης υπό γωνία 45^0 έως ότου γεμίσουν οι θάλαμοι του κυτταρόμετρου (εικόνες 10,11). Τα αποτελέσματα καταγράφονται σε πίνακα και γίνονταν αναγωγή στην αρχική συγκέντρωση της καλλιέργειας.



Εικόνα 13: Πανοραμική λήψη των κυττάρων του μικροφύκου *Tetraselmis* sp. στο αιματοκυτταρόμετρο μέσω μικροσκοπίου (πηγή: φωτογραφία από την συγγραφέα).



Εικόνα 14: Επάνω και πλευρική όψη του αιματοκυτταρόμετρου (πηγή: www.medical.tpub.com)

2.10. Προσδιορισμός βιοκινητικών παραμέτρων

2.10.1. Προσδιορισμός ειδικού ρυθμού αύξησης

Έλεγχος αύξησης, μέτρηση και προσδιορισμός ειδικού ρυθμού αύξησης, απόδοσης, παραγωγικότητας, προσδιορισμός ξηρού βάρους.

Για τον προσδιορισμό του ειδικού ρυθμού αύξησης (μ, d^{-1}) καταγράψαμε καθημερινά την ίδια ώρα την πυκνότητα των μικροφυκών με τη χρήση αιματοκυτταρόμετρου Neubauer Improved σε φωτονικό μικροσκόπιο Zeiss, μετά από ακινητοποίησης των κυττάρων με διάλυμα Lugol δεδομένου ότι τα μαστιγοτά κύτταρα κινούνται συνεχώς και επιπλέον η παρουσία του ιωδίου βάφει χαρακτηριστικά τα κύτταρα στα σημεία που περιέχουν άμυλο ώστε να διακρίνονται εύκολα σε σχέση με άχρηστα υλικά σε μικρή μεγέθυνση. Η μεγέθυνση που χρησιμοποιήθηκε 400 x. Με τα δεδομένα αυτά προσδιορίστηκε ο ειδικός ρυθμός σύμφωνα με τον τύπο:

2.10.2. Προσδιορισμός ξηρού βάρους

Την τέταρτη και δέκατη ημέρα πραγματοποιήσαμε και την τελευταία μέτρηση της συγκέντρωσης των φυκών, κάνοντας δειγματοληψία για ξηρό βάρος με τετραπλά δείγματα σε ηθμούς Whattman GF/C που τα τοποθετούσαμε στη συνέχεια για όλο το βράδυ στο φούρνο στους 60 °C.

Διηθήθηκαν εις τριπλούν σε προζυγισμένους ηθμούς υάλινων ινών (GF/C, Whattman, UK), με την χρήση διηθητικής συσκευής (Millipore, USA) και αντλίας κενού. Για την απομάκρυνση των αλάτων από τον ηθμό έγιαναν πλύσεις με φορμικό αμμώνιο 4 % (HCOONH₃, Riedel Heine) και τα φίλτρα τοποθετήθηκαν σε πλαστικά τρυβλία Petri (50 mm, Corning) τα οποία με την σειρά τους τοποθετήθηκαν για ξήρανση σε κλίβανο (Binder) στους 60 °C, για 24 ώρες. Οι ηθμοί ζυγίστηκαν σε ζυγό υψηλής ακρίβειας πέντε δεκαδικών ψηφίων (Mettler, Tuledo xs 105, Germany).

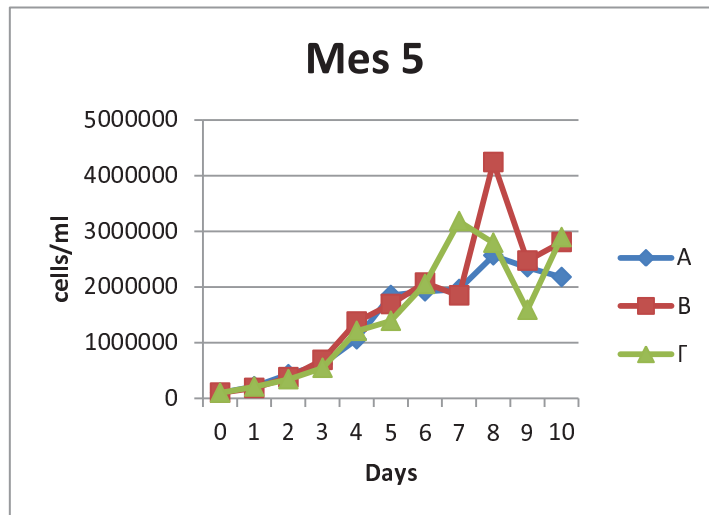
2.10.3 Προσδιορισμός Απόδοσης και Παραγωγικότητας

Η τελική συγκέντρωση που επιτυγχάνεται σε μια καλλιέργεια μείον την αρχική συγκέντρωση ορίζεται ως απόδοση της καλλιέργειας (cells/ml). Στην περίπτωση που αυτή η μέτρηση γίνεται νωρίτερα (4 ημέρες) τότε αφορά την απόδοση τεσσάρων ημερών καλλιέργειας. Η απόδοση για του χρόνου που μεσολάβησε από την έναρξη ορίζεται ως παραγωγικότητα (cells/ml/day).

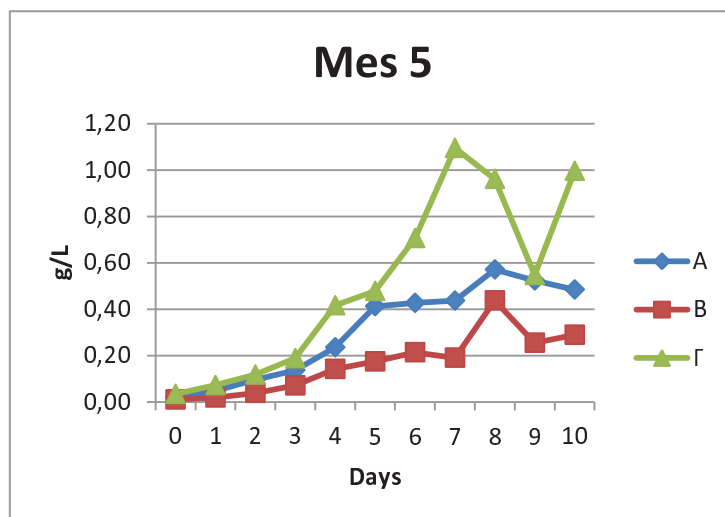
Κεφάλαιο 3: Πειραματικά Αποτελέσματα

3.1 Αποτελέσματα αύξησης των στελεχών *Tetraselmis*

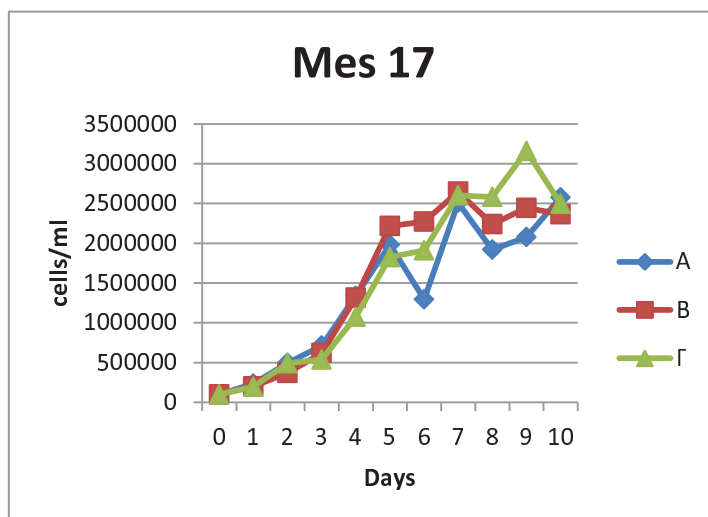
Αποτελέσματα αύξησης των στελεχών *Tetraselmis* (γραφικές παραστάσεις αφθονίας (κυτταρικής συγκέντρωσης, (cells/ml) και βιομάζας (g/L)).



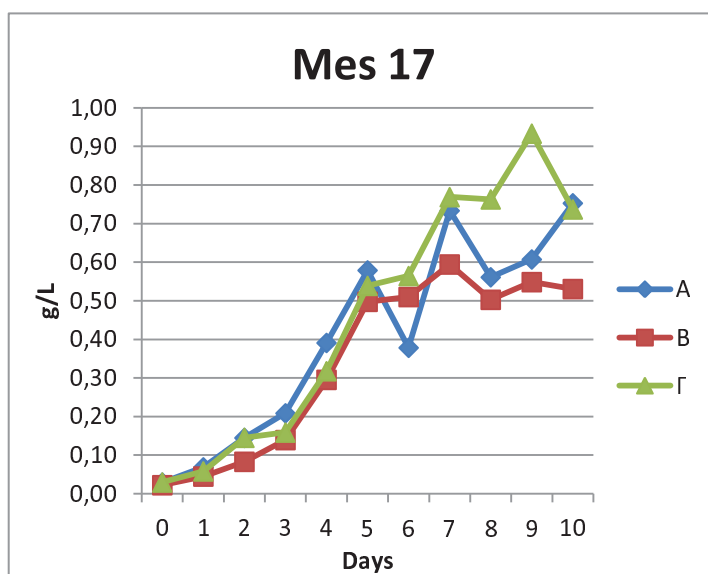
Γράφημα 1α: καμπύλη αύξησης της κυτταρικής συγκέντρωσης (αφθονίας) του στελέχους *Tetraselmis* Mes 5 (cells/ml). Οι καμπύλες Α,Β,Γ αντιπροσωπεύουν τις τρεις φιάλες.



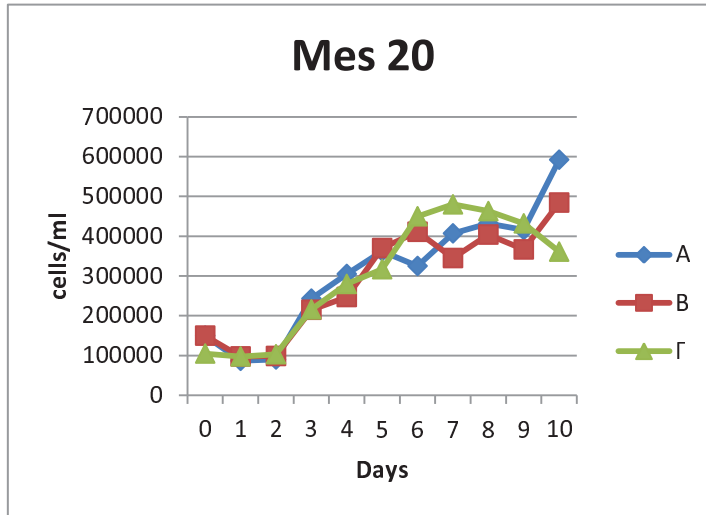
Γράφημα 1β2: καμπύλη αύξησης της βιομάζας του στελέχους *Tetraselmis* Mes 5 (g/L). Καμπύλες Α,Β,Γ αντιπροσωπεύουν τις τρεις επαναλήψεις.



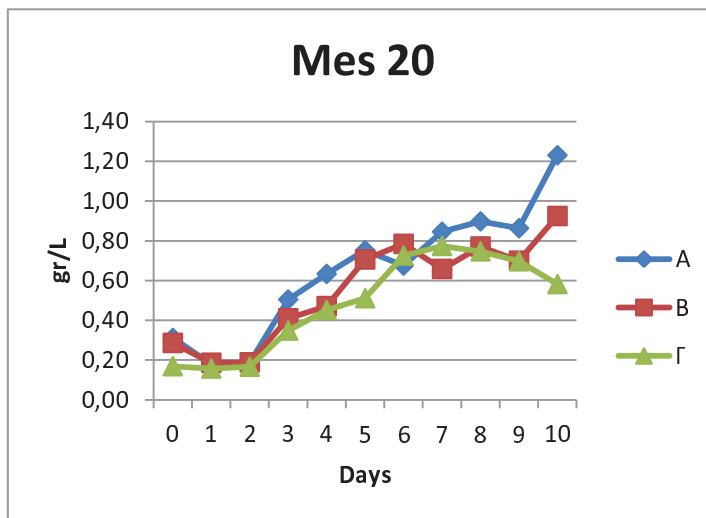
Γράφημα 2α3: καμπύλη αύξησης της κυτταρικής συγκέντρωσης (αφθονία) του στελέχους *Tetraselmis* Mes 17 (cells/ml). Οι καμπύλες Α,Β,Γ αντιπροσωπεύουν τις τρεις φιάλες



Γράφημα 2β4: καμπύλη αύξησης της βιομάζας του στελέχους *Tetraselmis* Mes 17 (g/L). Καμπύλες Α,Β,Γ αντιπροσωπεύουν τις τρεις επαναλήψεις.



Γράφημα 3α5: καμπύλη αύξησης της κυτταρικής συγκέντρωσης (αφθονία) του στελέχους *Tetraselmis* Mes 20 (cells/ml). Οι καμπύλες Α,Β,Γ αντιπροσωπεύουν τις τρεις φιάλες

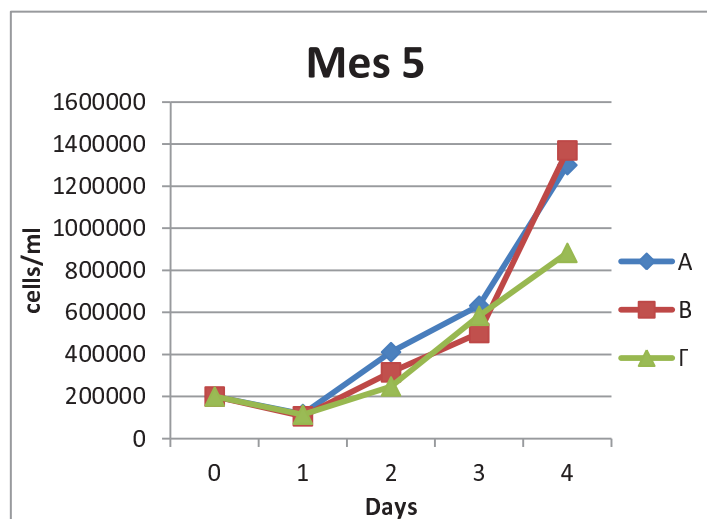


Γράφημα 3β6: : καμπύλη αύξησης της βιομάζας του στελέχους *Tetraselmis* Mes 20 (g/L). Καμπύλες Α,Β,Γ αντιπροσωπεύουν τις τρεις επαναλήψεις

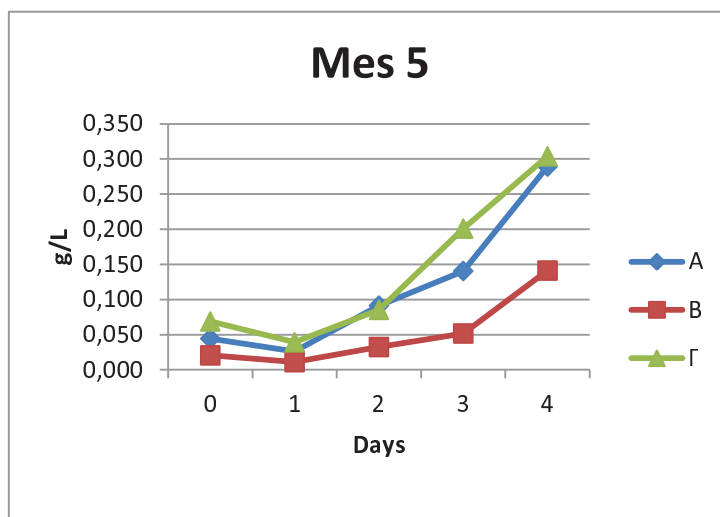
Στα γραφήματα παρατηρούμε ότι στα στελέχη *Tetraselmis* Mes 5 και Mes 17 η αφθονία αρχίζει σταδιακά να αυξάνεται από την πρώτη ημέρα της καλλιέργειας. Αντίθετα στο στέλεχος *Tetraselmis* Mes 20 παρατηρούμε από την πρώτη κιόλας ημέρα μεγάλη συγκέντρωση σε σχέση με τα στελέχη *Tetraselmis* Mes 5 και Mes 17. Τις επόμενες δυο ημέρες υπάρχει μια σταθεροποίηση των τιμών και μεταξύ τρίτης με πέμπτης ημέρας παρατηρείται αύξηση της κυτταρικής συγκέντρωσης. Συγκρίνοντας τον μέσο όρο του ειδικού ρυθμού αύξησης της βιομάζας παρατηρείται το στέλεχος *Tetraselmis* Mes 17 να έχει την υψηλότερη απόδοση και στη συνέχεια ακολουθούν τα στελέχη Mes 5 και Mes 20. Μελετώντας και τα τρία στελέχη στο μικροσκόπιο, διακρίνουμε ότι το στέλεχος *Tetraselmis* Mes 20 είναι το μεγαλύτερο σε μέγεθος κύτταρο.

3.2 Αποτελέσματα των επαναληπτικών- ασυνεχών καλλιιεργειών των στελεχών *Tetraselmis*.

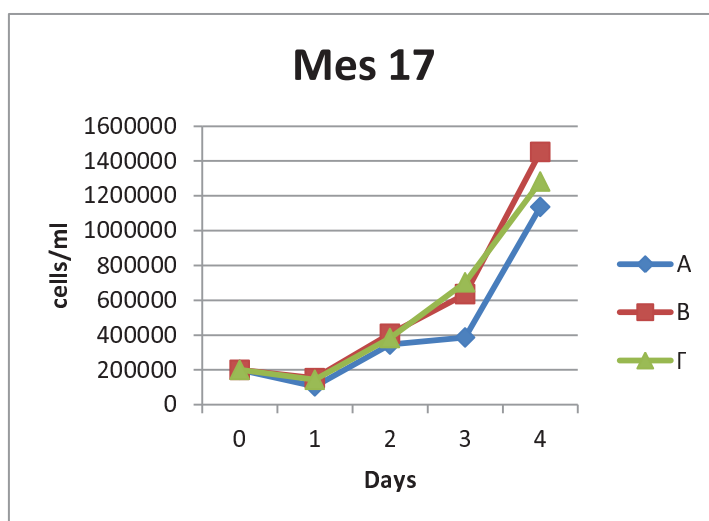
Αποτελέσματα επαναληπτικών- ασυνεχών καλλιιεργειών (batch) (γραφικές παραστάσεις κυτταρικής συγκέντρωσης (cell/ml) και βιομάζας (g/L)).



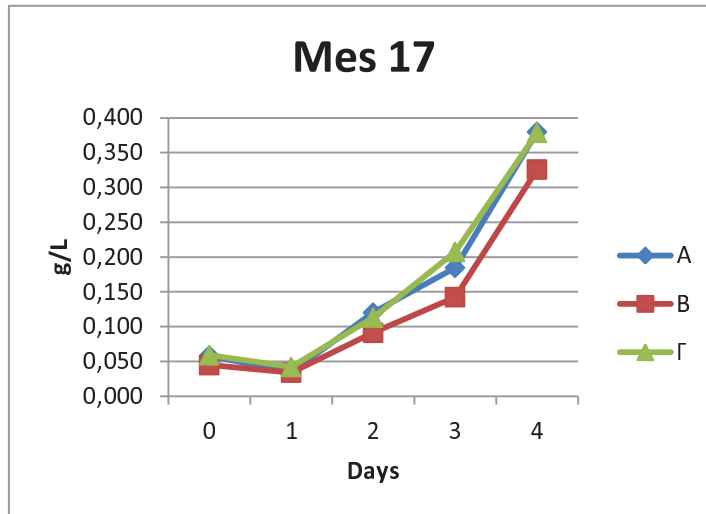
Γράφημα 4α : καμπύλη αύξησης της κυτταρικής συγκέντρωσης (αφθονίας) του στελέχους *Tetraselmis* Mes 5 (cells/ml) οι καμπύλες A,B,Γ αντιπροσωπεύουν τρεις φιάλες.



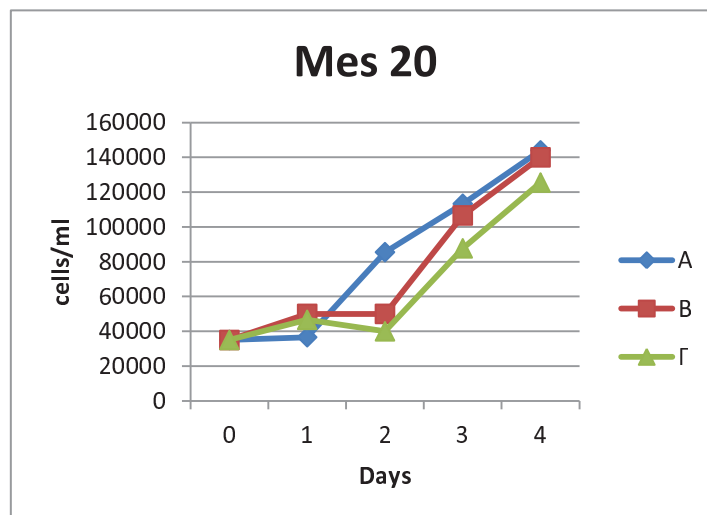
Γράφημα 4β2: καμπύλη αύξησης της βιομάζας του στελέχους *Tetraselmis* Mes 5 (g/L). Οι καμπύλες A,B,Γ αντιπροσωπεύουν τις τρεις επαναλήψεις.



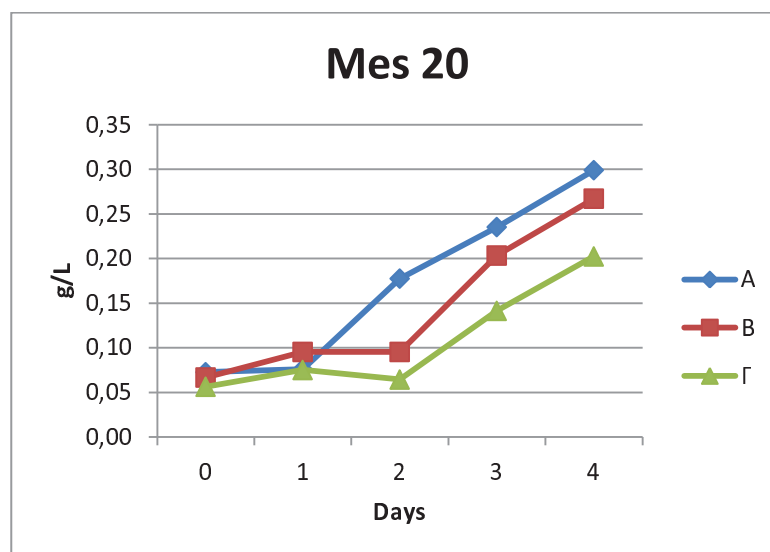
Γράφημα 5α3 : καμπύλη αύξησης της κυτταρικής συγκέντρωσης (αφθονίας) του στελέχους *Tetraselmis* Mes 17 (cells/ml) οι καμπύλες A,B,Γ αντιπροσωπεύουν τρεις φιάλες.



Γράφημα 5β4: καμπύλη αύξησης της βιομάζας του στελέχους *Tetraselmis* Mes 17 (g/L). Οι καμπύλες Α,Β,Γ αντιπροσωπεύουν τις τρεις επαναλήψεις



Γράφημα 6α5 : καμπύλη αύξησης της κυτταρικής συγκέντρωσης (αφθονία) του στελέχους *Tetraselmis* Mes 20 (cells/ml) οι καμπύλες Α,Β,Γ αντιπροσωπεύουν τρεις φιάλες.



Γράφημα 6β6: καμπύλη αύξησης της βιομάζας του στελέχους *Tetraselmis* Mes 20 (g/L). Οι καμπύλες Α,Β,Γ αντιπροσωπεύουν τις τρεις επαναλήψεις.

Στα γραφήματα 4-6 παρουσιάζονται οι καμπύλες αύξησης του πληθυσμού. Σε καλλιέργειες μέχρι την μετά-εκθετική φάση για επαλήθευση του ειδικού ρυθμού αύξησης. Την μέγιστη αφθονία την βλέπουμε στο στέλεχος *Tetraselmis* Mes 17 ακολουθώντας με μικρή διαφορά τιμών το στέλεχος *Tetraselmis* Mes 5. Αντίθετα το στέλεχος *Tetraselmis* Mes 20 παρουσιάζει πολύ χαμηλές τιμές σε σχέση με τα άλλα δύο είδη. Ταυτόχρονα μελετώντας το μέσο όρο του ειδικού ρυθμού αύξησης, (οι τιμές του οποίου παρουσιάζονται στο πίνακα 4 Γ,Δ), παρατηρήσαμε ότι το στέλεχος *Tetraselmis* Mes 17 είναι πιο αποδοτικό στην εκθετική φάση αύξησης, ακολουθεί το στέλεχος *Tetraselmis* Mes 5 και τέλος το στέλεχος *Tetraselmis* Mes 20 με τη μικρότερη τιμή. Η χαμηλότερη παραγωγικότητα εμφανίζεται στο στέλεχος *Tetraselmis* Mes 20 οι τιμές παραγωγικότητας παρουσιάζονται στο πίνακα 3 Α,Β.

3.3 Αποτελέσματα του μέσου όρου παραγωγικότητας

Πίνακας 3: Μέσος όρος παραγωγικότητας των τριών φιαλών του κάθε στελέχους *Tetraselmis* χωριστά σε κύτταρα/ml/day. Α) μετά από 4 ημέρες καλλιέργειας Β) μετά από 10 ημέρες καλλιέργειας.

Α)

Είδος	Φιάλη	Μέσος όρος κύτταρα/ml	Μέσος όρος κύτταρα/ml
Mes 5	A	$5,32 \times 10^5$	$4,79 \times 10^5$
	B	$4,99 \times 10^5$	
	Γ	$4,06 \times 10^5$	
Mes 17	A	$4,34 \times 10^5$	$5,15 \times 10^5$
	B	$5,69 \times 10^5$	
	Γ	$5,42 \times 10^5$	
Mes 20	A	$8,29 \times 10^4$	$7,54 \times 10^4$
	B	$7,63 \times 10^4$	
	Γ	$6,70 \times 10^4$	

Β)

Είδος	Φιάλη	Μέσο όρος κύτταρα/ml	Μέσος όρος κύτταρα/ml
Mes 5	A	$1,39 \times 10^6$	$1,50 \times 10^6$
	B	$1,62 \times 10^6$	
	Γ	$1,48 \times 10^6$	
Mes 17	A	$1,39 \times 10^6$	$1,49 \times 10^6$
	B	$1,53 \times 10^6$	
	Γ	$1,54 \times 10^6$	
Mes 20	A	$3,10 \times 10^5$	$3,00 \times 10^5$
	B	$2,90 \times 10^5$	
	Γ	$3,00 \times 10^5$	

Πίνακας 4: Μέσος όρος του ειδικού ρυθμού αύξησης (μd^{-1}) των τριών φιαλών του κάθε στελέχους *Tetraselmis* χωριστά. Γ) μετά από 4 ημέρες καλλιέργειας Δ) μετά από 10 ημέρες καλλιέργειας.

Γ)

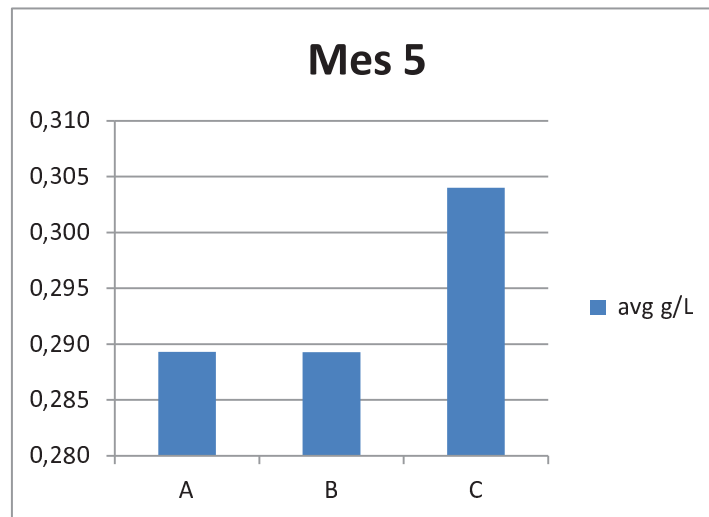
Είδος	Φιάλη	Μέσος όρος μ	Μέσος όρος μ
Mes 5	A	0,37	0,35
	B	0,38	
	Γ	0,3	
Mes 17	A	0,35	0,37
	B	0,4	
	Γ	0,37	
Mes 20	A	0,28	0,27
	B	0,28	
	Γ	0,26	

Δ)

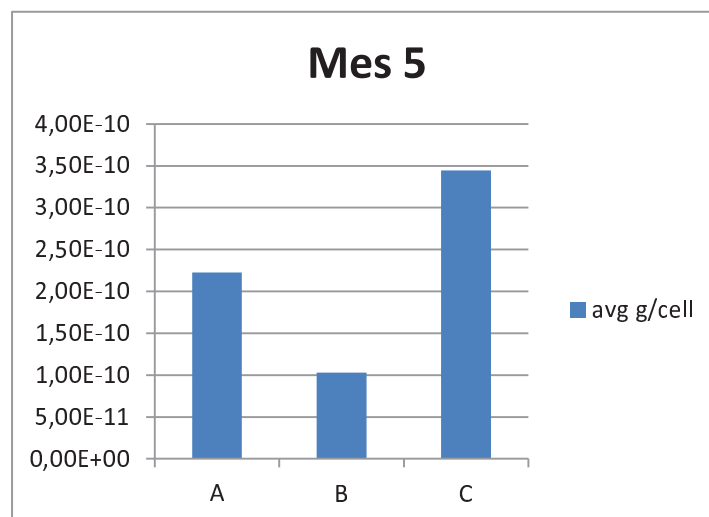
Είδος	Φιάλη	Μέσος όρος μ	Μέσος όρος μ
Mes 5	A	0,28	0,3
	B	0,3	
	Γ	0,31	
Mes 17	A	0,3	0,29
	B	0,29	
	Γ	0,29	
Mes 20	A	0,12	0,11
	B	0,11	
	Γ	0,11	

3.4 Αποτελέσματα του μέσου όρου αύξησης της βιομάζας και του ξηρού κυτταρικού βάρους

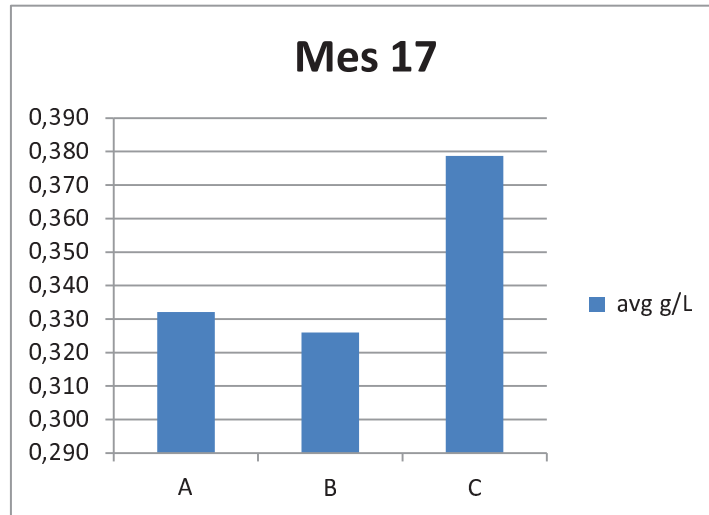
Αποτελέσματα των καλλιεργειών όσον αφορά τον μέσο όρο αύξησης της βιομάζας και του ξηρού κυτταρικού βάρους των στελεχών *Tetraselmis* Mes 5, Mes 17, Mes 20.



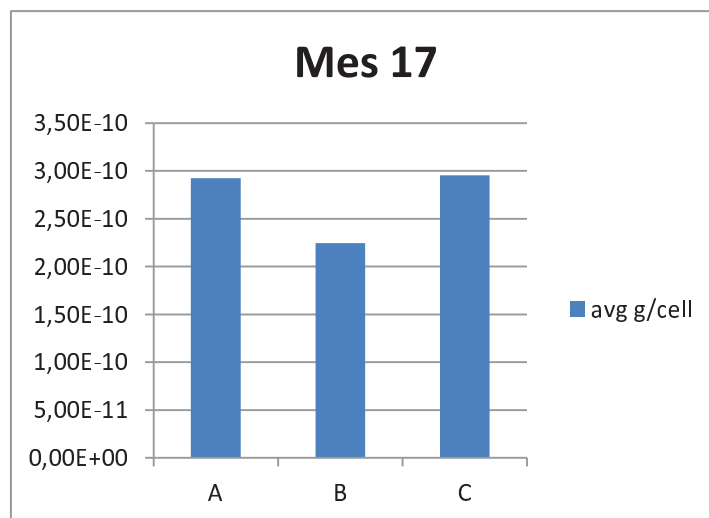
Διάγραμμα 1: Τελική βιομάζα του στελέχους *Tetraselmis* Mes 5 (g/L).



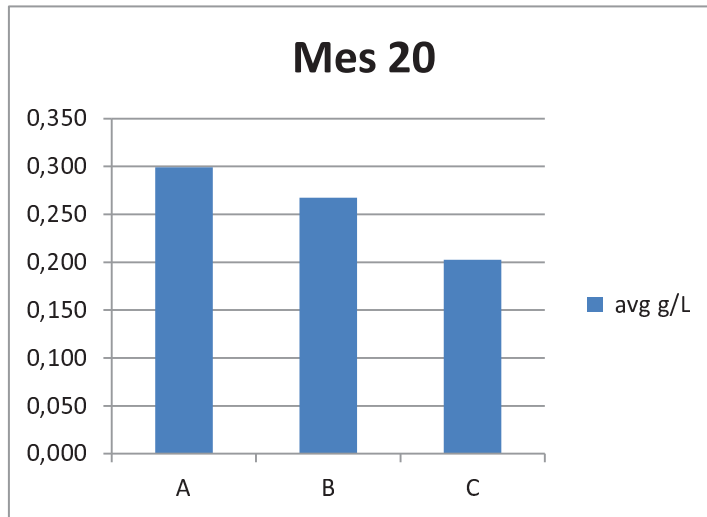
Διάγραμμα 2: Ξηρού κυτταρικού βάρους του στελέχους *Tetraselmis* Mes 5 (g/cell).



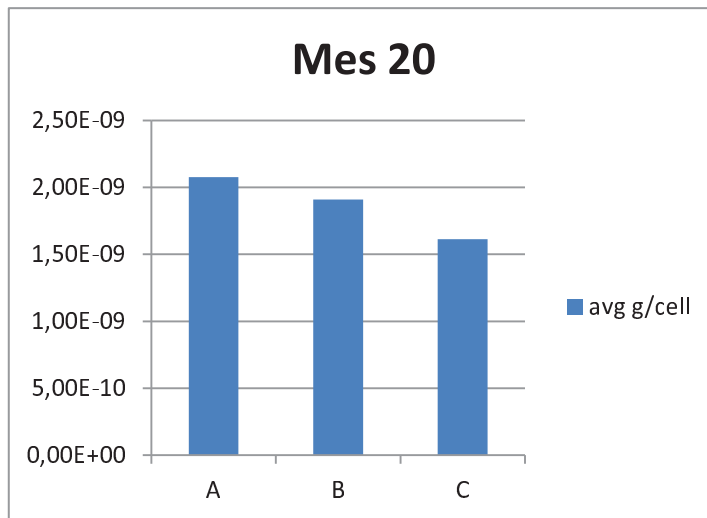
Διάγραμμα 3: Τελική βιομάζα του στελέχους *Tetraselmis* Mes 17 (g/L).



Διάγραμμα 4: Ξηρού κυτταρικού βάρους του στελέχους *Tetraselmis* Mes 17 (g/cell).



Διάγραμμα 5: Τελική βιομάζα του στελέχους *Tetraselmis* Mes 20 (g/L).



Διάγραμμα 6: Ξηρού κυτταρικού βάρους του στελέχους *Tetraselmis* Mes 20 (g/cell).

3.5 Πίνακες του μέσου όρου απόδοσης και παραγωγικότητας

Πίνακας 5: Μέσος όρος απόδοσης (Ycells) cells/ml και παραγωγικότητας (Pcells) cells/ml/day για κάθε φιάλη σε τέσσερις ημέρες καλλιέργειας.

4 Ημέρες καλλιέργειας				
Είδος	Ycells A	Ycells B	Ycells Γ	Μέσος όρος Ycells
Mes 5	$1,10 \times 10^6$	$1,17 \times 10^6$	$6,83 \times 10^5$	$0,98 \times 10^6$
Mes 17	$9,36 \times 10^5$	$1,25 \times 10^6$	$1,08 \times 10^6$	$1,09 \times 10^6$
Mes 20	$1,09 \times 10^5$	$1,05 \times 10^5$	$9,05 \times 10^4$	$0,10 \times 10^6$
Είδος	Pcells A	Pcells B	Pcells Γ	Μέσος όρος Pcells
Mes 5	$2,75 \times 10^5$	$2,93 \times 10^5$	$1,71 \times 10^5$	$2,46 \times 10^5$
Mes 17	$2,34 \times 10^5$	$3,13 \times 10^5$	$2,71 \times 10^5$	$2,73 \times 10^5$
Mes 20	$2,73 \times 10^4$	$2,63 \times 10^4$	$2,26 \times 10^4$	$0,25 \times 10^5$

Πίνακας 6: Μέσος όρος απόδοσης (Ycells) cells/ml και παραγωγικότητας (Pcells) cells/ml/day για κάθε φιάλη σε δέκα ημέρες καλλιέργειας.

10 Ημέρες καλλιέργειας				
Είδος	Ycells A	Ycells B	Ycells Γ	Μέσος όρος Ycells
Mes 5	$2,47 \times 10^6$	$4,14 \times 10^6$	$3,08 \times 10^6$	$3,23 \times 10^6$
Mes 17	$2,48 \times 10^6$	$2,55 \times 10^6$	$3,06 \times 10^6$	$2,70 \times 10^6$
Mes 20	$4,42 \times 10^5$	$3,34 \times 10^5$	$3,75 \times 10^5$	$0,38 \times 10^6$
Είδος	Pcells A	Pcells B	Pcells Γ	Μέσος όρος Pcells
Mes 5	$2,47 \times 10^5$	$4,14 \times 10^5$	$3,08 \times 10^5$	$3,23 \times 10^5$
Mes 17	$2,48 \times 10^5$	$2,55 \times 10^5$	$3,06 \times 10^5$	$2,60 \times 10^5$
Mes 20	$4,42 \times 10^4$	$3,34 \times 10^4$	$3,75 \times 10^4$	$0,38 \times 10^5$

Παρατηρώντας τα διαγράμματα 1-6 του μέσου όρου αύξησης της βιομάζας και του ξηρού κυτταρικού βάρους καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως τα στελέχη *Tetraselmis* Mes 5 και *Tetraselmis* Mes 17 είναι πιο παραγωγικά και αποδοτικά, σε αντίθεση με το στέλεχος

Tetraselmis Mes 20. Επίσης παρατηρώντας τον πίνακα 5 διαπιστώνουμε πως το στέλεχος Mes 17 έχει την καλύτερη απόδοση και παραγωγικότητα από τα τρία στελέχη που μελετήσαμε. Στη συνέχεια ακολουθεί το στέλεχος Mes 5 και τέλος το στέλεχος Mes 20 με την χαμηλότερη απόδοση και παραγωγικότητα. Αντίθετα στον πίνακα 6 που οι ημέρες καλλιέργειας ήταν περισσότερες το στέλεχος Mes 5 εμφανίζει καλύτερη απόδοση και παραγωγικότητα από το στέλεχος Mes 17 με μικρή διαφορά βέβαια. Το στέλεχος Mes 20 και στους δύο πίνακες (5,6) παρουσιάζει τη χαμηλότερη απόδοση και παραγωγικότητα. Όσον αφορά το μέσο όρο αύξησης της βιομάζας, όπως φαίνεται και στα διαγράμματα 1,3,5, το στέλεχος *Tetraselmis* Mes 17 έχει την καλύτερη απόδοση. Αντίθετα από τα διαγράμματα 2,4,6 βλέπουμε ότι το *Tetraselmis* Mes 20 έχει το μεγαλύτερο ξηρό κυτταρικό βάρος.

Κεφάλαιο 4: Συζήτηση και συμπεράσματα

Μελετώντας τα πειραματικά αποτελέσματα των τριών αυτών στελεχών του γένους *Tetraselmis*, που δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμα σε επίπεδο είδους, συμπεράναμε ότι τα στελέχη καλλιεργήθηκαν και προσαρμόστηκαν χωρίς προβλήματα σε χαμηλότερη αλατότητα από 60 ‰ σε 40 ‰. Όπως φαίνεται και στους πίνακες 5 και 6 τα στελέχη *Tetraselmis* Mes 5 και Mes 17 παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη απόδοση και παραγωγικότητα ακολουθώντας με μικρή διαφορά στις τιμές το στέλεχος *Tetraselmis* Mes 5. Όσον αφορά την απόδοση βιομάζας το στέλεχος *Tetraselmis* Mes 17 με μικρή διαφορά από το στέλεχος *Tetraselmis* Mes 5 παρουσιάζει τη μέγιστη τιμή. Αυτό που παρουσιάζει τη χαμηλότερη παραγωγικότητα σε σχέση με τα άλλα δύο στελέχη είναι το στέλεχος *Tetraselmis* Mes 20. Κατά τη διάρκεια του πειράματος παρατηρήθηκε πιο έντονη προσκόλληση του στελεχούς *Tetraselmis* Mes 20 στα τοιχώματα και στο πάτο της φιάλης σε σχέση με τα άλλα δύο στελέχη, παρόλο που υπήρχε συνεχή ανάδευση με την παροχή αερισμού, με αποτέλεσμα να επηρεάσει τη δειγματοληψία και τις μετρήσεις. Μελετώντας και τα τρία στελέχη στο μικροσκόπιο διακρίνουμε πως το στέλεχος *Tetraselmis* Mes 20 έχει το μεγαλύτερο μέγεθος, όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα 2,4,6 ξηρού κυτταρικού βάρους.

Στην παρούσα διπλωματική εκτός από τον εγκλιματισμό, την αξιολόγηση της καλλιεργητικής απόδοσης των τριών στελεχών του γένους *Tetraselmis* και την προσαρμογή του σε αλατότητα 40 ‰, στόχος ήταν και η διερεύνηση της προοπτικής χρήσης τους στις Ελληνικές θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες. Οι τιμές των παραμέτρων (αλατότητα, θερμοκρασία, φωτεινή ένταση), που επιλέχθηκαν έτσι ώστε να είναι συμβατές με τη βιολογία των *Tetraselmis* και εφικτές για τις Ελληνικές θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες (Τζοβενής et al., 2011).

Η εργασία των Τζοβενή et al. (2011), στόχο είχε την διερεύνηση των βέλτιστων επιπέδων τριών παραγόντων που επηρεάζουν την αύξηση των μικροφυκών (φωτεινή ένταση,

θερμοκρασία, αλατότητα) σε τρία είδη μικροφυκών *Tetraselmis* από τη λιμνοθάλασσα Ροδιά (R 1-2, R 1-3 & R 9-2) με σκοπό την χρήση τους στις Ελληνικές θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες (πίνακας 8).

Πίνακας 8: Βιοκινητικοί δείκτες για στελέχη *Tetraselmis* απομονωμένα από τη λιμνοθάλασσα Ροδιά (Αμβρακικός κόλπος) (πηγή: Τζοβενής et al., 2011).

Set-up	Ycells x 10 ⁶			Pcells x 10 ⁵		
	R9-2	R1-2	R1-3	R9-2	R1-2	R1-3
18°C x 15Klux x 38 ‰ 4 ημέρες καλλιέργειας	3,10	2,34	2,62	7,74	5,84	6,54
18°C x 5Klux x 38 ‰ 4 ημέρες καλλιέργειας	1,15	1,15	2,04	2,87	2,87	5,09

Πίνακας 9: Μέσος όρος απόδοσης (Ycells) και παραγωγικότητας (Pcells) για τα τρία στελέχη σε τέσσερις και δέκα ημέρες καλλιέργειας.

Set-up	Ycells x 10 ⁶			Pcells x 10 ⁵		
	Mes 5	Mes 17	Mes 20	Mes 5	Mes 17	Mes 20
20°C x 10Klux x 40 ‰ 4 ημέρες καλλιέργειας	0,98	1,09	0,10	2,46	2,73	0,25
20°C x 10Klux x 40 ‰ 10 ημέρες καλλιέργειας	3,23	2,70	0,38	3,23	2,60	0,38

Με βάση τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής, η ευνοϊκότερη φωτεινή ένταση φαίνεται να είναι στα 15 Klux, που σε συνδυασμό με τη χαμηλότερη θερμοκρασία 18 °C αντιστοιχεί το μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης. Στην δική μας διπλωματική οι τιμές που επιλέχθηκαν, ως φωτεινή ένταση 10 Klux και θερμοκρασία 20 °C, αρκετά κοντά στις ευνοϊκές τιμές του *Tetraselmis suecica*.

Παρατηρώντας τον πίνακα 8 και σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα της εργασίας των Τζοβενής et al. (2011), οι μέσοι όροι είναι χαμηλότεροι στα 5 Klux και υψηλότεροι στα 15 Klux. Παρατηρώντας τα δικά μας αποτελέσματα στον πίνακα 9 βλέπουμε ότι στις δέκα ημέρες καλλιέργειας των τριών στελεχών, οι τιμές είναι καλύτερες από ότι στις τέσσερις ημέρες καλλιέργειας. Οι τιμές απόδοσης στις δέκα ημέρες καλλιέργειας στα στελέχη Mes 5 και Mes 17 είναι αρκετά καλές σε σύγκριση με τα στελέχη R 9-2, R1-2, R1-3 (18 °C x 15 Klux x 38 ‰), αντίθετα η απόδοση του Mes 20 είναι αρκετά χαμηλή. Από την άλλη παρατηρώντας τον πίνακα 8 η παραγωγικότητα των στελεχών R 9-2, R 1-2, R1-3 είναι καλύτερη σε σύγκριση με τα δικά μας αποτελέσματα παραγωγικότητας πίνακας 9. Σύμφωνα με τον Τζοβενής et al. (2011), με βάση τη χημική τους σύσταση τα στελέχη R 1-2, R 1-3, R 9-2 φαίνεται να αποτελούν πιθανή εναλλακτική λύση για τα

συνήθη εισαγόμενα εμπορικά στελέχη που χρησιμοποιούνται στη Μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια.

Στην εργασία μας, η παραγωγικότητα των στελεχών Mes 5, Mes 17 και Mes 20 είναι αρκετά χαμηλές.

Παρατηρώντας τις τιμές απόδοσης των στελεχών της δικής μας εργασίας πίνακας 9, τα στελέχη Mes 5 και Mes 17 επιτυγχάνουν ικανοποιητικές αποδόσεις και έτσι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στις υδατοκαλλιέργειες. Τα αποτελέσματα που πήραμε από τα στελέχη *Tetraselmis* Mes 5 και Mes 17 είναι αρκετά κοντά με τα αποτελέσματα της εργασίας των Τζοβενή et al. (2011) και ίσως να μπορούσαν και αυτά να χρησιμοποιηθούν στη Μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια, αποτελώντας πιθανή εναλλακτική λύση σε σχέση με τα εισαγόμενα εμπορικά στελέχη που χρησιμοποιούνται συνήθως.

Έτσι με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα που πήραμε όσον αφορά την απόδοση κ παραγωγικότητα και συγκρίνοντας τα με την μελέτη που πραγματοποίησαν με στελέχη του γένους *Tetraselmis* ο Τζοβενής et al. (2011) και συγκρίνοντας τα με το στέλεχος *Tetraselmis suecica*, τα στελέχη *Tetraselmis* Mes 5 και *Tetraselmis* Mes 17 θα μπορούσαν να δοκιμαστούν ως τροφή στις θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες.

Σύμφωνα με τον Fabregas et al. (1984), οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του *Tetraselmis suecica* είναι μεταξύ 25 και 35 ‰ αλατότητα και μέγιστη πυκνότητα $1,3 \times 10^6$ κύτταρα/ml και στην δική μας διπλωματική με αλατότητα 40 ‰ η μέγιστη πυκνότητα έφτασε τα $1,5 \times 10^6$ κύτταρα/ml και $1,49 \times 10^6$ κύτταρα/ml των στελεχών Mes 5 και Mes 17 αντίστοιχα, μετά από δέκα ημέρες καλλιέργειας. Αντίθετα το στέλεχος *Tetraselmis* Mes 20, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί γιατί η μέγιστη πυκνότητα έφτασε στα $0,3 \times 10^6$ κύτταρα/ml. Σύμφωνα με τον Ronquillo et al, είδη *Tetraselmis* μπορούν να καλλιεργηθούν σε ποικίλες θερμοκρασίες (eurhythmal) και αλατότητες (euryhaline) (Ronquillo et al., 1997).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alan D. Steinman, South Florida, 2000. Journal of Phycology. Algae: III Reproduction.
- B.SEN, M.A.T Kocer and M.T. Alp., 2005. Studies on Growth of Marine Microalgae in Batch Cultures: IV. *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher (Prasinophyta). Asian journal of Plant Sciences 4(6) :645
- Borowitzka Michael A.. 1997. Microalgae for aquaculture : Opportunities and constraints. Journal of Applied Phycology. 9:393-401. Belgium.
- Cohen, Z. & Vonshak, A., 1991. Fatty acid composition of Spirulina and Spirulina-like cyanobacteria in relation to their chemotaxonomy. Phytochemistry 30: 205-206.
- Duff. D.C.B., Bruce, D.L. & Anita, N.J., 1966. The antibacterial activity of marine planktonic algae. Canadian journal of Microbiology 12: 877-884.
- Fabregas Jaime, Concepcion Herrero, Buenaventura Cabezas and Julio Abalde. Biomass production and Biochemical Composition in mass cultures of the marine microalga *Isochrysis galbana* parke at varying nutrient concentrations. Aquaculture 53(1986) 101-113. Amsterdam.
- Fabregas Jaime, Julio Abalde, conception Herrero, Buena Ventura Cabezas and Manuel Veiga. (1984). Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in bath cultures with different salinities and nutrient concentrations. Aquaculture 42: 207-217. Amsterdam.
- Josianne, G. Støttrup and Lesley A. McEvoy, 2003. Live feeds in marine aquaculture. Blackwell Publishing Company. General characteristics of microalgae 6: 207p.
- K.E. Naas, T. Naess and T. Harboe, 1992. Enhanced first feeding of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in green water. Aquaculture, 105: 143-156.
- Katharios, P. Papadakis, I.E., Prapas, A., Drmon, A.C., Ampatzis, k., & Divanach, P., 2005. Mortality control of viral encephalopathy and retinopathy on o+ grouper *Epinephelus* after prolonged bath in dense *Chlorella minutis*. Sima culture. Bulletin of European Association Fish Pathology 25: 28-31.
- LeRoy Creswell, 2010. Phytoplankton Culture for Aquaculture Feed. SRAC (SOUTHERN REGIONAL AQUACULTURE CENTER) Publication No. 5004.
- Makridis. P., Costa, R.A., Dinis, T., 2006. Microbial condition and antimicrobial activity in cultures of two algal species, *Tetraselmis chuii* and *Chlorella minutissima* and effect on bacterial load of enriched *Artemia metanauplii*. Aquaculture 255: 76-81.

- Maria F. Montero, Manvela Aristizabal, Guillermo Garcia Reina, 2011. Isolation of high-lipid Content Strains of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* for biodiesel production by flow cytometry and single-cell sorting. *J Appl Phycol* 23: 1053-1054.
- Michael A. Borowitzka, 1997. *Journal of Applied Phycology* 9. Microalgae for aquaculture: Opportunitiew and constraints. 1p.
- Mohamed Alsull and Wan Maznah Wan omour. 2012. Responses of *Tetraselmis* sp. and *Nannochloropsis* sp.. Isolated from Penag National Park Coastal Waters, Malaysia, to the Combined Influences of Salinity, Light and Nitrogen Limitation. International Conference on Chemical, Ecology and Environmental Sciences. Bangkok.
- Montaini, E., G.Chini Zittelli, MR.Tredici, E.Molina Grima, J.M.Fernandez Sevilla, J.A, Sanchez Perez. (1995) Long-term preservation of *Tetraselmis suecica* : influence of storage on viability and fatty acid profile. *Aquaculture* 134: 81-90.
- Moretii, A., Pedini Fernandez- Criado, M., Cittolin, G., Guidastrri, R. Manual on Hatcery Production of Seabass and Gilthead Seabream (book). –Rome: FAO,1999- Τόμος 1.
- Oie, G., Makridis, P., Reitan, K.I. & Olsen, Y., 1997. Protein and carbon utilization of rotifers (*Brachionus plicatilis*) in first feeding of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) . *Aquaculture* 153: 103-122.
- Papandoulakis, N., P. Divanach, P. Anastasiadis and M. Kentouri, 2001. The pseudo-green water technique for intensive rearing of sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture International* 9: 205-216.
- Patrick Lavens and Patrick Sorgeloos, Manual on the production and use of live food for aquaculture, FAO FISHERIES TECHNICAL PAPER 361, Rome,1996.
- Priyadarshani I., Sahu D., Rath B., 2012. Algae in Aquaculture. *International Journal of health Sciences and Research*. Odisha. 109p.
- Proksch,P. , Werner, E. and Muller, G. ,2006. *Frontiers in Marine Biotechnology*. 1. edition Taylor & Francis 6: 368p.
- Rawat, I., R. Ranjith Kumar, T. Mutandas, F. Bux, 2012. Biodiesel from microalgae: Acritical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied energy* 103: 444-467.
- Ronquillo Jesse D., Matias Jonathan R. and Yamasaki Toshio & Shigehisa, 1997. Culture of *Tetraselmis tetrathele* and its utilization in the hatchery production of different penaeid shrimps in Asia in Hagiwara A. and T.W. Snell E. Lubzens & C. S. Tamaru (eds).- *Hydrobiologia*, Belgium: Kluwer Academic Publishers.
- Salvesen I. Skjermo, J. & Vadstein, O. 1999. Growth of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) during first feeding in relation to the proportion of r/K strategists in the bacterial community of the rearing water. *Aquaculture* 175: 337-350

- Suali Emma and Rosalam Sarbatly, 2012. Conversion of microalgae to Biofuel. Renewable and Sustainable Energy Reviews 16: 4316-4342.
- Tett P. and Barton E.D. 1995. Why are there about 5000 species of phytoplankton in the sea? J.Plankton Research 17:1693-1704
- Vine, N.G., Leukes, W.D & Kaiser. H., 2006. Probiotics in marine larviculture. FEMS Microbiol.
- Walne P. R.. Large scale culture of larvae of *Ostrea edulis*. [βιβλίο]. –London: Minist. Agric., Fish. Invest., 1966.
- Yuehua C., Zhu. J., Wu R., 2006. Functional mapping for genetic control of programmed cell death. Physiological Genomics. -25pp. 458-469pp.
- ΕΛ.ΦΕ. Γνωρίζοντας τα φύκη (βιβλίο).- Αθήνα:[s.n], 2008. Σελ.11.
- Κλαδάς Ι. Καλλιέργεια μικροφυκών. ΤΕΙ Ηπείρου.- Ηγουμενίτσα, 2006. Σελ 8.
- Κλαδάς Ι. Καλλιέργεια μικροφυκών. ΤΕΙ Ηπείρου.- Ηγουμενίτσα, 2011. Σελ 20.
- Κόκου Φ., Μακρίδης Π., Κεντούρης Μ., Divanach P. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΕ ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ VIBRIO. 9^ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Ωκεανογραφίας και Αλιείας 2009-Πρακτικά τόμος 2: 1267-1271 σελ.
- Λυκάκης, Σ., Πάτρα 1996. Υδροβιολογία, Θαλάσσια Βιολογία και στοιχεία λιμνολογίας, 7^ο κεφάλαιο :127 σελ,165 σελ.
- Σίνης, Α.Ι., Θεσσαλονίκη, 2005. Λιμνολογία, τρίτο μέρος: ΒΙΟΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ, Σελ. 166.
- Συμεωνίδης Ο., Χρήστος, 2010. Διδακτορική Διατριβή: "ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΝΤΑΤΙΚΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΛΕΠΙΔΟΒΡΑΓΧΙΩΝ (ΔΙΘΥΡΑ ΜΑΛΑΚΙΑ)". Κτηνιατρική Σχολή, Τομέας Ζωικής Παραγωγής, Οικολογίας και Προστασίας Περιβάλλοντος. Σελ 27,51,111.
- Τζοβενής Ι., Πρωτόκολλο μαζικής καλλιέργειας μικροφυκών. ΤΕΙ ΗΠΕΙΡΟΥ. ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ- ΑΛΙΕΙΑΣ. Ηγουμενίτσα Νοέμβριος, 2003. Σελ 4.
- Τζοβενής Ι., Νικούλη Ε., Σαμαρά Α., Ηγουμενίτσα,2011. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *TETRASELMIS* (PRASINOPHYCEAE) ΑΠΟ ΤΗ ΛΙΜΝΟΘΑΛΑΣΣΑ ΡΟΔΙΑ (ΙΟΝΙΟ ΠΕΛΑΓΟΣ). 4^ο Διεθνές Συνέδριο "Υδροβιολογίας - Αλιείας", Βόλος 2011.