

ΤΕΙ Δ.Ελλάδας Τμήματος Τεχνολόγων Αλιείας- Υδατοκαλλιεργειών

Διαχείριση του μικροφύκου *Isocrysis T
galbana* GREEN στο Εργαστήριο Καλλιεργειών
Πλαγκτού



Φίλιππος Καϋμενάκης AM 11327

Επιβλέπων: Γιάννης Κλαδάς,
Καθηγητής

Μεσολόγγι, Ιούνιος 2014

Περίληψη

Η εργασία μας συνίσταται στην παρακολούθηση και καταγραφή της πληθυσμιακής αύξησης του μικροφύκου *Isocrysis T galbana* στις συνθήκες του Εργαστηρίου Καλλιιεργειών Πλαγκτού του Τμήματος Υδατοκαλλιιεργειών & Αλιευτικής Διαχείρισης του ΤΕΙ Μεσολογγίου. Σκοπός της ήταν ο καθορισμός κριτηρίων για τις αναβαθμίσεις των όγκων των καλλιιεργειών του συγκεκριμένου είδους, η χρήση του οποίου είναι ιδιαίτερα σημαντική στις εκτροφές ιχθυονομφών και θαλάσσιων ασπονδύλων. Ξεκινώντας από την ανάπτυξη μίας καλλιιεργείας, την οποία αναβαθμίσαμε σε εννέα αντίτυπα, εξετάσαμε την εξέλιξη των πληθυσμών σε όγκους 1, 5 και 10 λίτρων για μία χρονική περίοδο που ξεπερνούσε τον ένα μήνα. Τα αποτελέσματα μας υποδεικνύουν ότι η ανάπτυξη της καλλιιεργείας στον όγκο του ενός λίτρου είναι πιο απότομη από τις αντίστοιχες σε μεγαλύτερους όγκους (5 και 10 λίτρων). Επιπλέον η μέγιστη συγκέντρωση κυττάρων που επιτυγχάνεται από την πέμπτη ημέρα της καλλιιεργείας στον μικρότερο όγκο είναι περίπου διπλάσια των αντίστοιχων σε μεγαλύτερους όγκους. Η διαφορά αυτή διατηρείται για 10 περίπου ημέρες για τις καλλιιεργείες σε μικρό όγκο, σε αντίθεση με τις καλλιιεργείες σε μεγαλύτερους όγκους, οι πληθυσμοί των οποίων παραμένουν όμως σταθεροί, ακόμη και μετά από 30 ημέρες καλλιιεργείας.

Abstract

Our work consists in the monitoring and recording of the population growth of microalgae *Isocrysis T galbana* under the conditions of the Laboratory of Plankton Culture (Department of Aquaculture & Fisheries Management, TEI of Messolonghi). The purpose was the definition of the criteria for the upscaling in volume of the Cultures of the concerned species, the use of which is of particularly importance in the rearing of fish larvae and marine invertebrates. Starting from the development of a Culture, which upgraded in nine duplicate, we examined the evolution of populations in volumes of 1, 5 and 10 Liters for a period of over one month. Our results indicate that the growth of the Culture in one Liter is steeper from the respective in larger volumes (5 and 10 Liters). Furthermore, the maximum cell concentration obtained by the fifth day of Culture in a smaller volume is about twice of the respective in larger volumes. This difference is maintained for about 10 days for the Cultures in a small volume, in contrast to Cultures in larger volumes, the population of which remain stable even after 30 days of Culture.

Πρόλογος

Το μικροφύκος *Isocrysis T galbana* είναι ένα ιδιαίτερα σημαντικό είδος για τις Υδατοκαλλιέργειες. Λόγω της θρεπτικής του αξίας, χρησιμοποιείται ευρέως στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς θαλασσινών ειδών, καθώς και στους σταθμούς παραγωγής δίθυρων και γαρίδων.

Η διαχείριση της παραγωγής του στο Εργαστήριο Καλλιεργειών Πλαγκτού του Τμήματός μας προϋποθέτει τον έλεγχο της ανάπτυξής του σε διάφορους όγκους καλλιέργειας. Αντικείμενο της εργασίας μας ήταν λοιπόν η παρακολούθηση των βασικών παραμέτρων της πληθυσμιακής αύξησης σε παράλληλες καλλιέργειες 1, 5 και 10 λίτρων, οι οποίες ξεκίνησαν όλες από μία κοινή αρχική καλλιέργεια.

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν ο καθορισμός κριτηρίων για τις κάθετες αναβαθμίσεις των όγκων των καλλιεργειών του συγκεκριμένου είδους (αραιώσεις) σε σχέση με την ταχύτητα ωρίμανσης των καλλιεργειών, των βέλτιστων συγκεντρώσεων που θα μπορούσαν να επιτευχθούν στο συγκεκριμένο σύστημα καλλιέργειας (τεχνικές και χώρος) και τη διάρκεια της φάσης ωρίμανσης σε κάθε περίπτωση. Απώτερος στόχος, η σύνταξη ενός εγχειριδίου αναφοράς για την καλλιέργεια του συγκεκριμένου είδους στο εργαστήριο μας, προς όφελος των μελλοντικών χρηστών αλλά και του προσωπικού του εργαστηρίου.

Για την πραγματοποίηση της εργασίας στηρίχτηκα στον άρτιο εξοπλισμό και στα υλικά του εργαστηρίου Καλλιεργειών Πλαγκτού που διευθύνει ο Καθηγητής κ. Γ. Χώτος και επιμελείται το στέλεχος ΕΤΕΠ κα Δέσποινα Αβραμίδου, τους οποίους ευχαριστώ για τη βοήθεια και την συμπαράστασή τους, καθώς και για την προθυμία με την οποία μου πρόσφεραν πρόσβαση στο εργαστήριο της εκτός λειτουργίας του ΤΕΙ ώρες.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον Καθηγητή κ. Γ. Κλαδά, επιβλέποντα της πτυχιακής μου εργασίας για την συνεργασία του, τις χρήσιμες παρεμβάσεις κατά τη διάρκεια της υλοποίησης της Πτυχιακής μου εργασίας, καθώς και τις υποδείξεις του κατά τη συγγραφή του παρόντος κειμένου.

Τέλος, ένα θερμό ευχαριστώ στον Καθηγητή Εφαρμογών κ. Δ. Μουτόπουλο για την βοήθειά του στην στατιστική τεκμηρίωση των αποτελεσμάτων μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	2
Abstract	2
Πρόλογος.....	4
1 Εισαγωγή	7
1.1 Τα φύκη και η σημασία τους.....	7
1.2 Η παραγωγή μικροφυκών για χρήση στις υδατοκαλλιέργειες.....	8
1.3 Το είδος <i>Isochrysis T galbana</i>	12
2.1 Προέλευση των μικροφυκών	15
2.2 Παρασκευή θρεπτικών διαλυμάτων και μέσου καλλιέργειας	15
2.2.1 Παρασκευή διαλυμάτων θρεπτικών μέσων	16
2.2.2 Παρασκευή Τεχνητού Θαλασσινού Νερού	17
2.2.3 Απολυμάνσεις και αποστείρώσεις.....	19
2.3 Συντήρηση στελεχών και αναβάθμιση καλλιεργειών.....	20
2.4 Γενικές συνθήκες καλλιέργειας.....	22
2.4.1 Θερμοκρασία χώρου	22
2.4.2 Φωτισμός	23
2.4.3 Αερισμός.....	23
2.4.4 Αλατότητα	25
2.5 Εκτίμηση πυκνότητας κυττάρων στις καλλιέργειες	25
2.5.1 Το αιματοκυτταρόμετρο Neubauer	25
2.5.2 Διαδικασία δειγματοληψίας	27
2.5.3 Καταμέτρηση κυττάρων και υπολογισμοί	28
2.6 Σχεδιασμός πειράματος	29
2.7 Στατιστική επεξεργασία	32
3. Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	33
4 Βιβλιογραφία.....	41

4.1 Ξενόγλωση βιβλιογραφία	41
4.2 Ελληνική βιβλιογραφία	42

1 Εισαγωγή

1.1 Τα φύκη και η σημασία τους

Τα φύκη είναι υδρόβιοι οργανισμοί, που χαρακτηρίζονται κυρίως για τη φωτοσυνθετική τους ικανότητα (φωτο-αυτότροφοι). Σε αντίθεση με τα υδρόβια φυτά, τα φύκη δεν διαθέτουν ρίζες, μίσχους, φύλλα και αγγειακό σύστημα.

Υπάρχουν πάνω από 300 χιλιάδες είδη φυκών σε πολύ μεγάλη ποικιλία (Τζοβενής 2004). Υπάρχουν μονοκύτταρα είδη που ζουν ελεύθερα, ή οργανωμένα σε αποικίες, γνωστά και ως μικροφύκη, καθώς και άλλα πολυκύτταρα είδη, τα λεγόμενα μακροφύκη, πολλά από τα οποία εμφανίζουν δομές από αδιαμόρφωτο ιστό, που μοιάζουν με φύλλωμα και κοτσάνια (ονομάζονται θαλλός και στύπος αντίστοιχα) καθώς και δίσκο προσκόλλησης σε βράχους, ή άλλες σκληρές επιφάνειες για τη στήριξή τους.

Τα φύκη βρίσκονται παντού στα υδάτινα οικοσυστήματα. Υπάρχουν είδη αιωρούμενα, ως «πλάνητες» του υδάτινου μέσου, κάτω από τον γενικό όρο φυτοπλαγκτόν, άλλα προσκολλημένα στον πυθμένα, ή σε κάθε είδους επιφάνειας όπως σε πέτρες, υδρόβια ζώα και φυτά, αλλά και σε τοιχώματα δεξαμενής, ή ενυδρείου. Υπάρχουν επίσης ενδοσυμβιωτικά είδη, σε φυτά, αλλά και σε ζώα, όπως για παράδειγμα οι ζωοξανθέλες που δίνουν υπέροχα χρώματα στα κοράλλια και τις αχιβάδες των τροπικών περιοχών

Η οικολογική σημασία των φυκών είναι τεράστια επειδή παράγουν το μεγαλύτερο μέρος του οξυγόνου των ωκεανών και των άλλων φυσικών υδάτινων συστημάτων, συνιστούν το πρώτο τροφικό τους επίπεδο με ιδιαίτερα υψηλή απόδοση μεταφοράς ενέργειας και, σε συνεργασία με τους αποδομητές μικροοργανισμούς, ανακυκλώνουν το οργανικό υλικό στην υδάτινη στήλη. Από πολλούς πολιτισμούς τα μακροφύκη χρησιμοποιούνται ως τροφή. Τέλος μέσω καινοτόμων τεχνολογιών, μικροφύκη και μακροφύκη προτείνονται ως εναλλακτική πηγή ενέργειας (βιοκαύσιμα) (Κλαδάς 2012).

Η συστηματική 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 (π.χ. τα δινομαστιγωτά), άλλα είναι φυτά, όπως επίσης και άλλα όπως η γνωστή μας σπιρουλίνα, τα οποία ανήκουν στο βασίλειο των βακτηρίων.

Ο άνθρωπος εκμεταλλεύεται τα φύκη επεξεργάζοντάς τα για την εκχύλιση χρήσιμων ουσιών για προϊόντα διατροφής και για καλλυντικά, καθώς και για τη χρήση τους στην

εκτροφή υδρόβιων ζώων στις υδατοκαλλιέργειες, αλλά και στα ενυδρεία τροπικών υφάλων (Κλαδάς 2014) .

Όμως στη φύση υπάρχουν και τοξικά είδη που σποραδικά είναι δυνατόν να επηρεάσουν καίρια και την ανθρώπινη υγεία, μέσω της κατανάλωσης μυδιών και άλλων οστράκων που τα τρώγουν φιλτράροντάς τα από το θαλασσινό νερό.

Η υπερβολική ανάπτυξη των πληθυσμών των φυκιών μπορεί να προκαλέσει την ανισορροπία και τελικώς τη βλάβη ενός παράκτιου υδάτινου οικοσυστήματος. Το φαινόμενο, γνωστό ως **ευτροφισμός** συμβαίνει λόγω των μεγάλων ποσοτήτων των αγροτικών λιπασμάτων ή άλλων οργανικών αποβλήτων που μπορεί να καταλήγουν σε μία τέτοια περιοχή, σε συνδυασμό με τους άλλους παράγοντες που επικρατούν σε αυτήν (θερμοκρασία, ανέμους, κυκλοφορία του νερού) (Κλαδάς 1998).

Αλλά και στις εγκαταστάσεις εκτροφής ψαριών, όπως επίσης και στα διακοσμητικά ενυδρεία μπορούν εύκολα να προκληθούν εύτροφες συνθήκες λόγω των αποβλήτων των ψαριών, των υπολειμμάτων των τροφών και του υπερβολικού φωτισμού. Σαν αποτέλεσμα, διάφορα είδη μικροφυκών αυξάνονται ανεξέλεγκτα, άλλα προκαλώντας θολότητα του νερού, άλλα, όπως τα κόκκινα βλενώδη φύκη, καλύπτοντας με τις αποικίες τους τις διάφορες επιφάνειες στα τροπικά θαλασσινά ενυδρεία και άλλα σχηματίζοντας πυκνές πράσινες νηματοειδείς τούφες που καταλαμβάνουν μεγάλο χώρο στα ενυδρεία γλυκού νερού (Κλαδάς 2014).

1.2 Η παραγωγή μικροφυκών για χρήση στις υδατοκαλλιέργειες

Τα μονοκύτταρα μικροσκοπικά φύκη αποτελούν την κυρίως τροφή των δίθυρων, των νυμφικών σταδίων των γαρίδων και των ζωοπλαγκτικών οργανισμών με τους οποίους τρέφονται οι νύμφες των ψαριών, δηλαδή τα τροχόζωα, τα κωπήποδα, η *Artemia* κ.ά.

Τα μικροφύκη αναπτύσσονται σε μονοειδικές καλλιέργειες, που προκύπτουν αρχικά με απομόνωση κυττάρων από τα φυσικά νερά και πολλαπλασιασμό τους σε ιδανικές συνθήκες με εξαιρετικά λεπτές διαδικασίες.

Η ανάπτυξη και η συντήρηση των πληθυσμών αυτών των μικροσκοπικών φυκών γίνεται κάτω από αξενικές συνθήκες, προφυλάσσοντας τα δηλαδή από επιμολύνσεις και αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας βασικές μικροβιακές τεχνικές μετάγγισης και διατήρησής τους σε καλλιέργειες (Τζοβενής 2004). Καθαρά στελέχη από μία σειρά διαφορετικών ειδών

διατίθενται στο εμπόριο για χρήση από υδατοκαλλιεργητές, ή ενυδρείοφιλους (Κλαδάς 2014).

Με την ανάπτυξη της τεχνολογίας των υδατοκαλλιεργειών, κύρια του θαλασσινού νερού, έχουν πολλαπλασιαστεί οι επιστημονικές γνώσεις, οι οποίες αφορούν στη χημική σύσταση των διαφόρων ειδών των μικροφυκών, σε σχέση και με τις διατροφικές ανάγκες των εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών (Brown 2002). Η θρεπτική αξία είναι λοιπόν ένα από τα βασικά κριτήρια επιλογής του κατάλληλου φυτοπλαγκτικού είδους που πρέπει να χρησιμοποιηθεί σε κάθε περίπτωση. Τα άλλα δύο είναι το μέγεθος των κυττάρων του και φυσικά η ευκολία καλλιέργειάς του.

Η ανάπτυξη των πληθυσμών των μικροφυκών γίνεται με την μετάγγισή τους σε μεγαλύτερους όγκους νερού, όπου έχουν προστεθεί λιπάσματα, κατάλληλες βιταμίνες και άλατα μετάλλων (ιχνοστοιχεία), που υπάρχουν στο εμπόριο. Η ανάπτυξη των πληθυσμών γίνεται κάτω από ισχυρό φωτισμό μεγάλης διάρκειας, 16-24 ωρών την ημέρα, σε σχετικά σταθερές θερμοκρασίες και με τη βοήθεια συνεχούς αερισμού (Χωτος & Ρογδάκης 1992, Κλαδάς 2012). Η διοχέτευση διοξειδίου του άνθρακα είναι μερικές φορές αναγκαία για τη σταθεροποίηση της μαζικής φυτοπλαγκτικής παραγωγής, ως πηγής άνθρακα αλλά και ως ρυθμιστή της οξύτητας του νερού, αφού οι εντατικοί ρυθμοί φωτοσύνθεσης έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της τιμής του pH του νερού της καλλιέργειας.

Η δυσκολία αυτών των καλλιεργειών έγκειται στη διατήρηση της καθαρότητάς τους, αφού στο νερό μπορούν εύκολα να αναπτυχθούν πολλοί παθογόνοι μικροοργανισμοί, ή οργανισμοί ανταγωνιστές, όπως άλλα ανεπιθύμητα είδη μικροφυκών και βλεφαριδοφόρα παράσιτα. Για το λόγο αυτό, πριν τη χρήση του ο εξοπλισμός πρέπει να απολυμαίνεται με εμβάπτιση σε διάλυμα αλκοόλ ή χλωρίνης, ενώ συνήθως γίνεται και αποστείρωση του μέσου καλλιέργειας σε αυτόκαυστο. Ο αέρας μπορεί επίσης να μεταφέρει μολυσματικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι αναπτύσσονται λόγω συσσώρευσης υδρατμών μέσα στους σωλήνες του δικτύου του αερισμού. Το ζήτημα αντιμετωπίζεται με διάφορες μεθόδους που εφαρμόζονται ανεξάρτητα μεταξύ τους ή συνδυασμό, όπως η δημιουργία «παγίδων» υγρασίας σε θέσεις του δικτύου αερισμού, η χρησιμοποίηση φίλτρων αέρα ή/και αποξηραντικών φίλτρων με ζελ πυριτίου (silica gel), καθώς και η περιοδική απολύμανση του δικτύου (Κλαδάς 2012).

Μία καλλιέργεια μικροφυκών μπορεί να τροφοδοτείται συνεχώς με νερό και λίπασμα μέσω μιας περισταλτικής αντλίας, ενώ μία αντίστοιχη ποσότητα εναιωρήματος φυτοπλαγκτού

μπορεί να απομακρύνεται με τον ίδιο ρυθμό, σε δοχείο συγκέντρωσης της συγκομιδής. Αυτό το σύστημα παραγωγής ονομάζεται **συνεχής καλλιέργεια (continuous Culture)**.

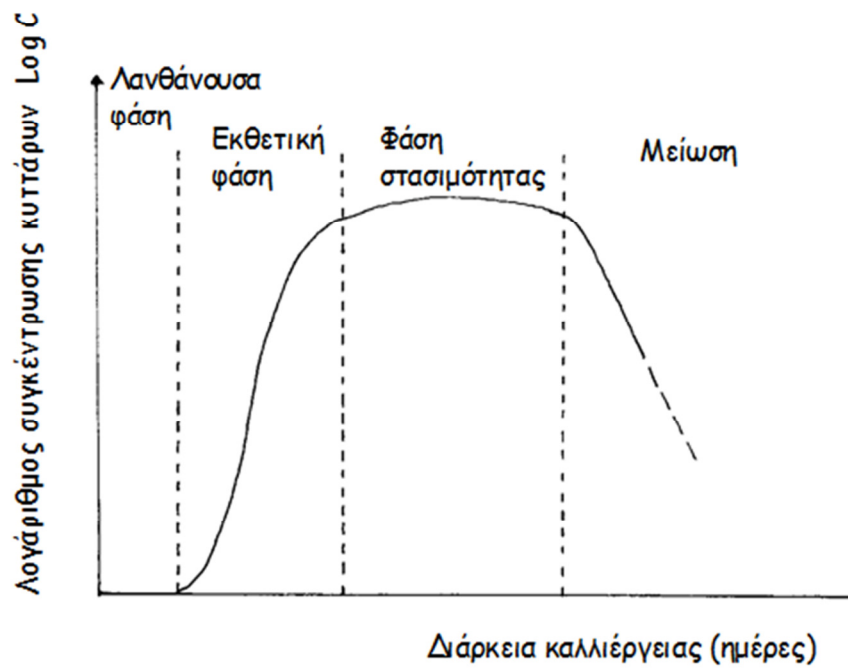
Σε αντίθεση, η **ημισυνεχής καλλιέργεια (semi-continuous Culture)** συνίσταται στη σποραδική συγκομιδή ενός μέρους του όγκου μιας ώριμης καλλιέργειας μικροφυκών και στη συνέχεια την επαναπλήρωσή της, με νερό και τα απαραίτητα λιπάσματα.

Οι **καλλιέργειες σε παρτίδες (ασυνεχείς καλλιέργειες, batch Cultures)** τέλος, συνίστανται στην ανάπτυξη καλλιεργειών που προέρχονται από καθαρά στελέχη και στην ολική συγκομιδή τους όταν θα έχουν ωριμάσει.

Σταθερότερες και μακροβιότερες είναι οι συνεχείς καλλιέργειες λόγω των αυτοματισμών, της συνεχούς τροφοδοσίας τους με θρεπτικά και του σταθερού ρυθμού αραιώσής τους. Οι ημισυνεχείς καλλιέργειες είναι οι πιο αποδοτικές, αλλά και οι πιο απρόβλεπτες στη διατήρησή τους, λόγω των σποραδικών αραιώσεων που καθιστούν δύσκολο τον έλεγχο της φυσιολογικής κατάστασης των κυττάρων, των συγκεντρώσεων των λιπασμάτων αλλά και της ανάπτυξης των παρασίτων και των ανταγωνιστών της καλλιέργειας. Οι καλλιέργειες σε παρτίδες, πιο αποδοτικές από τις συνεχείς και πιο σταθερές από τις ασυνεχείς, είναι αυτές που συνήθως χρησιμοποιούνται στις εταιρίες υδατοκαλλιεργειών (Κλαδάς 2012).

Η εξέλιξη του πληθυσμού ενός μικροφύκου σε καλλιέργεια σε παρτίδες (batch Cultures) περιγράφεται από 5 διαφορετικές φάσεις (εικ.1) Χώτος & Ρογδακης 1992, Τζοβενής 2004):

- **Λανθάνουσα (lag-phase)**, λίγο μετά τον εμβολιασμό, τα κύτταρα αυξάνονται σε μέγεθος, αλλά όχι σε αριθμό και αρχίζουν να απορροφούν τα θρεπτικά
- **Εκθετική (log-, ή exponential phase)**, γρήγορη αύξηση, εκθετική αύξηση του πληθυσμού
- **Μεταβατική (transitional, ή declining growth phase)**, ο ρυθμός αύξησης επιβραδύνεται
- **Στασιμότητας (stationary phase)**, ο αριθμός των κυττάρων παραμένει σταθερός, η αναπαραγωγή αντισταθμίζεται από τη θνησιμότητα
- **Πτωτική (decline phase)**, ο αριθμός των κυττάρων μειώνεται, ο ρυθμός θνησιμότητας υπερβαίνει την πληθυσμιακή αύξηση



Εικόνα 1: Η εξέλιξη του πυκνότητας των κυττάρων ενός μικροφύκου σε καλλιέργεια, σε λογαριθμική κλίμακα

Η συγκομιδή των φυτοπλαγκτικών κυττάρων που θα χρησιμεύσουν ως μπόλιασμα στον επόμενο όγκο συνίσταται να γίνεται κατά την εκθετική φάση, καθώς η νέα καλλιέργεια θα αυξηθεί πιο γρήγορα και ο πληθυσμός της θα είναι πιο βιώσιμος (Κλαδάς 2012).

1.3 Το είδος *Isochrysis T galbana*

Η συστηματική του κατάταξη του είδους με το οποίο εργαστήκαμε είναι η εξής (EOL):

Empire: Eukarya

Βασίλειο: Chromalveolata

Φύλο: Chrysophyta

Κλάση Haptophyceae

Τάξη: Isochrysidales

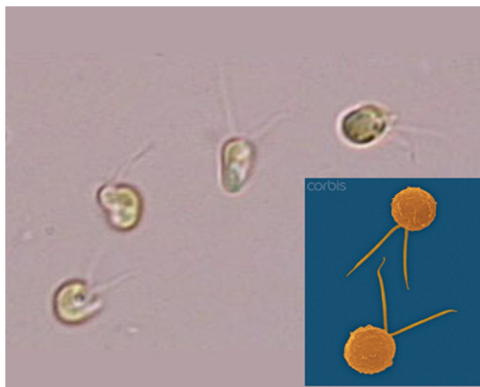
Οικογένεια: Isochrysidaceae

Γένος: *Isochrysis*

Είδος: *Isochrysis affinis galbana* Tahitian isolate

Ο όρος *affinis*, υποδηλώνει ξεχωριστό είδος της *Isochrysis*, παρόμοιο ή συγγενές με το *I.galbana*, αλλά όχι ακριβώς ίδιο με αυτό. Μια περαιτέρω μελέτη ταξινομική θα επιβεβαιώσει αν είναι το ίδιο είδος ή όχι.

Τα κύτταρα του είναι ελεύθερα (δεν σχηματίζουν δηλαδή αποικίες, εικ.1) , ελλειψοειδή σε σχήμα, μήκους 5-6 μm, πλάτους 2-4 μm και πάχους 2.5-3 μm. Διαθέτουν δύο λεία μαστίγια, σχεδόν ίδιου μήκους περίπου 7 μm (Liu & Lin 2001). Το ξηρό βάρος του κυττάρου του είδους ανάλογα με την φάση ωρίμανσης της καλλιέργειας (εικ.1) κυμαίνεται από 25 έως 30 pg (Tzovenis 2003b), το οποίο αντιστοιχεί σε περίπου 15 pg C ανά κύτταρο (Reynolds 2006)

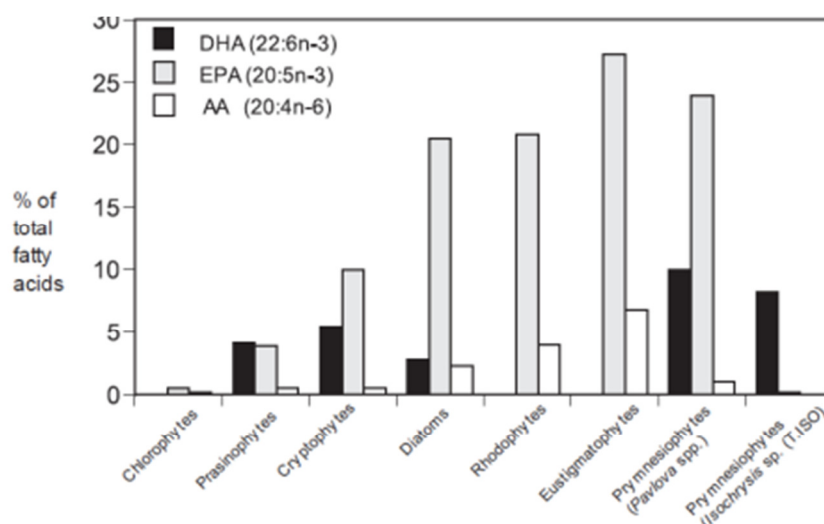


Εικόνα 2: Το μαστιγοφόρο αποτόφυκος *Isochrysis galbana*, όπως εμφανίζεται σε μικροσκοπικές λήψεις (αριστερά) και σε σακούλες μαζικής καλλιέργειας σε ιχθυογεννητικό σταθμό θαλασσινών ειδών (δεξιά)

Αρχικά, το *Isochrysis galbana* είχε επιλεγεί για χρήση στις εκτροφές ιχθυονυμφών, καθώς και στα εκκολαπτήρια δίθυρων και γαρίδων λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας του σε εικοσιδυοξεθενικό οξύ 22:6ω-3 (Docosahexaenoic acid, DHA). Το στέλεχος από την Ταϊτή *I. galbana* (T-ISO) αντικατέστησε το *I. galbana* Parke στις υδατοκαλλιέργειες αρχικά σε τροπικές και σταδιακά σε εύκρατες περιοχές, λόγω της καλής του ανάπτυξης σε ψηλές θερμοκρασίες (Nelson, 1992; Liu & Lin 2001, Tzovenis et al., 2003a).

Η περιεκτικότητα σε DHA είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες της ποιότητας της διατροφής των θαλασσινών ψαριών. Η μεγάλη περιεκτικότητα του στις μεμβράνες των κυττάρων του νευρικού συστήματος υποδηλώνει, ότι αυτό το λιπαρό οξύ έχει ένα κρίσιμο ρόλο στη διαμόρφωση του εγκεφάλου και των ματιών, τα οποία συνιστούν ένα μεγάλο ποσοστό της βιομάζας της νύμφης. Επίσης είναι γνωστό ότι η ενσωμάτωση των DHA βελτιώνει πολύ την επιβίωση των ιχθυονυμφών και την αντίσταση σε συνθήκες στρες κατά την εκτροφή (Mourente 2003).

Οι βέλτιστες συνθήκες αύξησης του είδους σε καλλιέργεια έχουν παρατηρηθεί σε pH = 6.8, ένταση φωτός (Irradiance) = 780 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, θερμοκρασία 30 °C (Marchetti et al. 2012) και αλατότητα 30 ppt (O'Shea et al. 2010).



Εικόνα 3: Fig 1. Σύνθεση εκφρασμένη σε μέσα ποσοστά των κυριότερων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs), εικοσιδυοξεθενικού (DHA; 22:6n-3), εικοσαπεντανοϊκού (EPA; 20:5n-3) και αραχιδονικού οξέως των μικροφυκών που χρησιμοποιούνται συνήθως στην ιχθυοκαλλιέργεια. Τα στοιχεία συγκεντρώθηκαν από πάνω από 40 είδη από το εργαστήριο CSIRO Marine Research, Hobart, Αυστραλία (γράφημα από Brown 2002). Να σημειωθεί ότι είδος χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το ευστιγματοφόρο *Nannochloropsis oculata*, το οποίο είναι πλουσιότερο σε EPA (20:5n-3).

Η πυκνότητα του *Isochrysis galbana* στις ώριμες μαζικές καλλιέργειες στους Ιχθυογεννητικούς Σταθμούς θαλασσινών ειδών μπορεί να φθάσει τα 17×10^6 κύτ /ml σε διαφανείς φιάλες ή νταμιζάνες (Κλαδάς 2012). Οι συγκεντρώσεις είναι πολύ χαμηλότερες στους μεγάλους όγκους 300 έως 800 λίτρων.

Σε καλλιέργειες σε πειραματικά συστήματα βιοαντιδραστήρων οι αποδόσεις ξεπερνούν τα 50×10^6 κύτ/ml (Falinski 2009).

2 Μεθοδολογία και Υλικά

2.1 Προέλευση των μικροφυκών

Το αρχικό στέλεχος του είδους *Isochrysis affinis galbana* T-ISO, προσφέρθηκε ευγενικά από τον Ιχθυογεννητικό σταθμό της εταιρείας ΝΗΡΕΑΣ που βρίσκεται στη Χιλιαδού Δωρίδος. Καθώς πρόκειται για ένα κύριο είδος για την λειτουργία του Ιχθυογεννητικού σταθμού που χρησιμοποιείται στην τεχνική των «πράσινων» νερών για τις εκτροφές ιχθυοσυμψύκτων, αλλά και κατευθείαν για τον εμπλουτισμό των θηραμάτων τους (τροχόζωα), υπάρχει εκεί ένα αυστηρό πρόγραμμα συντήρησης και αναπαραγωγής καθαρών (αξενικών) καλλιέργειών. Με τη σειρά του, ο Ιχθυογεννητικός σταθμός προμηθεύεται σε ετήσια βάση νέα καθαρά στελέχη του συγκεκριμένου είδους από το εξειδικευμένο εργαστήριο Culture Collection of Algae and Protozoa, Σκωτία (CCAP 2001).

Ένα ανάλογο πρωτόκολλο ακολουθήσαμε και εμείς για την συντήρηση του συγκεκριμένου στελέχους στο εργαστήριο μας, σύμφωνα με τις τεχνικές που περιγράφονται στις παραγράφους 2.2 και 2.3.

2.2 Παρασκευή θρεπτικών διαλυμάτων και μέσου καλλιέργειας

Όλοι οι ζώντες οργανισμοί χρειάζονται ορισμένα βασικά στοιχεία για να αναπτυχθούν. Η αύξηση της βιομάζας των μικροφυκών επιτυγχάνεται μέσω της σύνθεσης οργανικών ενώσεων. Το κύριο στοιχείο γι' αυτές, ο άνθρακας παρέχεται από το διαλυμένο στο νερό διοξείδιο, ενώ το οξυγόνο και το υδρογόνο από το νερό. Μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης τα τρία αυτά στοιχεία σχηματίζουν σάκχαρα και αργότερα πολύπλοκες οργανικές ενώσεις.

Έτσι, για την καλλιέργεια των μικροφυκών χρειάζονται λιπάσματα (κυρίως άζωτο και φωσφόρο), ιχνοστοιχεία και βιταμίνες. Ειδικότερα:

- Το **άζωτο** προστίθεται γενικά με τη μορφή NaNO_3 ή KNO_3 .
- Ο **φωσφόρος** χρησιμοποιείται συνήθως με τη μορφή NaH_2PO_4 .
- **Ανόργανα μικροστοιχεία.** Χρησιμοποιούνται με τη μορφή διαλυτών χλωριούχων ή θειικών αλάτων. Απαιτείται η προσθήκη παράγοντα συμπλοκοποίησης (π.χ. του Na_2EDTA). Κύρια χρησιμοποιούμενα μέταλλα: σίδηρος, κοβάλτιο, χαλκός, μαγγάνιο, μολυβδαίνιο και ψευδάργυρος.

- **Οργανικά μικροστοιχεία.** Γενικά χρησιμοποιούνται τρεις βιταμίνες σε διάλυμα: κυανοκοβαλαμίνη B12, θειαμίνη B1 & βιοτίνη H.

Τα στοιχεία αυτά περιέχονται σε θρεπτικά διαλύματα τα παράγονται πριν την εγκατάσταση των καλλιεργειών. Η παρασκευή των θρεπτικών διαλυμάτων γίνεται σε ασηπτικές συνθήκες (χρήση φιλτραρισμένου νερού, αποστείρωση διαλυμάτων).

Η αποστείρωση δεν αφορά την περίπτωση του διαλύματος των βιταμινών γιατί η θέρμανση τις καταστρέφει. Το διάλυμα αυτό προσθέτονταν στο μέσο καλλιέργεια λίγο πριν τον εμβολιασμό με σύριγγα, στην άκρη της οποίας είχε προσαρμοστεί ένα φίλτρο μεμβράνης millipor 0,22 μm για να αποφευχθεί τυχόν μόλυνση της καλλιέργειας.

2.2.1 Παρασκευή διαλυμάτων θρεπτικών μέσων

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων μας χρησιμοποιήθηκαν θρεπτικά διαλύματα, τα οποία χρησιμοποιούνται σε ιχθυογεννητικούς σταθμούς της περιοχής. Πρόκειται για ένα εμπειρικό πρωτόκολλο, το οποίο έχει προέλθει από τροποποίηση του βασικού πρωτοκόλλου Conway (Walne 1966) Ειδικότερα:

2.2.1.1 Θρεπτικά άλατα

300 g NaNO₃ (νιτρικό νάτριο)

30 g KH₂PO₄ (δισόξινο ορθοφωσφορικό κάλιο)

20 g NH₄Cl (χλωριούχο αμμώνιο)

Τα τρία άλατα τα διαλύονται σε 1 λίτρο αποσταγμένο νερό. Όταν τα συστατικά διαλυθούν εντελώς, φυλάσσονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, προφυλαγμένα από έκθεση σε άμεσο φώς.

2.2.1.2 Ιχνοστοιχεία

Παρασκευάζονται καταρχήν 4 βασικά διαλύματα, από τα οποία λαμβάνεται ορισμένη ποσότητα για να παρασκευαστεί το τελικό διάλυμα.

Διάλυμα 1 (σε 1 Lit 1 λίτρο αποσταγμένο νερό):

30 g ZnSO₄ ·H₂O (μονοένυδρος θειικός ψευδάργυρος)

25 g $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (μονοένυδρο θειικός χαλκός)

30 g $\text{CoSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (μονοένυδρο θειικό κοβάλτιο)

20 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (μονοένυδρο θειικό μαγγάνιο)

Διάλυμα 2 (σε 1 Lit αποσταγμένο νερό): 50 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (εξαένυδρο τριχλωριούχος σίδηρος)

Διάλυμα 3 (σε 1 Lit αποσταγμένο νερό): 25 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (διένυδρο μολυβδαινικό νάτριο)

Διάλυμα 4 (σε 1 Lit αποσταγμένο νερό): 50 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (διένυδρο αιθυλενοδιημιτιρλο τετραοξικό οξύ)

Όλα τα παραπάνω διαλύματα τοποθετούνται σε αυτόκαυστο στους 120°C για 30 λεπτά. Κατόπιν μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή ψυγείου προφυλαγμένα από έκθεση σε άμεσο φως.

Το τελικό διάλυμα ιχνοστοιχείων προκύπτει από την ανάμειξη 10 ml από κάθε διάλυμα σε 800ml αποσταγμένο νερό. Το τελικό διάλυμα αποστειρώνεται επίσης στο αυτόκαυστο στους 120°C για 30 λεπτά .

2.2.1.3 Βιταμίνες

Παρασκευάζονται τρία βασικά διαλύματα

Διάλυμα 1 : 100 mg βιταμίνης B12 (Κυανοκοβαλαμίνη) σε 1 Lit αποστειρωμένο νερό.

Διάλυμα 2: 100 mg βιταμίνης H (Βιοτίνη) σε 1 Lit αποστειρωμένο νερό.

Διάλυμα 3: 10 mg βιταμίνης B1 (Θειαμίνη) σε 1 Lit αποστειρωμένο νερό.

Όταν οι βιταμίνες διαλυθούν διαλυθούν εντελώς, φυλάσσονται σε ψυγείο μακριά από φως. Ειδικά το διάλυμα της B12 σκεπασμένο σε αλουμινόχαρτο.

2.2.2 Παρασκευή Τεχνητού Θαλασσινού Νερού

Το μέσο καλλιέργειας που χρησιμοποιήσαμε προήλθε από γλυκό νερό βρύσης φιλτραρισμένο σε συσκευή αντίστροφής όσμωσης, στο οποίο προσθέσαμε συνθετικό θαλασσινό αλάτι τύπου Tropic Marin Sea Salt, έως την επίτευξη αλατότητας 35 ‰.

Η μέθοδος διήθησης του νερού με αντίστροφη όσμωση συνίσταται στην αντιστροφή της ροής του νερού μέσα από μια ημιπερατή μεμβράνη, εξασκώντας πίεση μεγαλύτερη της ωσμωτικής. Οι ημιπερατές μεμβράνες, που ονομάζονται και ωσμωτικά διαφράγματα, επιτρέπουν τη δίοδο των μορίων του διαλύτη όχι όμως και των μορίων ή ιόντων της διαλυμένης ουσίας. Η ιδιότητα που έχει μια ημιπερατή μεμβράνη να μην επιτρέπει τη δίοδο των μορίων της διαλυμένης ουσίας δεν οφείλεται στη διάμετρο των πόρων της μεμβράνης ή στο μέγεθος των μορίων της διαλυμένης ουσίας, αλλά σε εκλεκτική παρεμπόδιση ηλεκτροχημικής κυρίως φύσης.

Για την καλή λειτουργία της συσκευής αντιστροφής όσμωσης (R/O) απαιτείται η προφίλτραση του νερού μέσω μηχανικής διήθησης και στη συνέχεια χημική κατακράτηση διαφόρων στοιχείων και ενώσεων με πέρασμα του νερού μέσα από φίλτρο ενεργού άνθρακα (εικ.2)



Εικόνα 4: Σύστημα αντιστροφής όσμωσης (R/O). Στο κάτω μέρος διακρίνονται τα φυσιγγία μηχανικής διήθησης, ενώ πάνω ο αντιδραστήρας με το ενεργό άνθρακα.

Το Τεχνητό Θαλασσινό Νερό είναι ένα σύνθετο μίγμα από πολλά καθαρά άλατα, με σύνθεση παρόμοια με αυτή του φυσικού θαλασσινού νερού, όταν αυτό διαλύεται σε γλυκό νερό. Για την επίτευξη της επιθυμητής αλατότητας πρέπει να έχουμε υπόψη μας ότι λόγω του ότι όλα τα σχετικά εμπορικά σκευάσματα έχουν μερικά ,ένυδρα άλατα χρειάζεται να προσθέσουμε λίγο περισσότερο αλάτι από εκείνο που προκύπτει από τον υπολογισμό της αλατότητας (Κλαδάς 2014). Για παράδειγμα χρειάζονται περίπου 40 g τεχνητού θαλασσινού αλατιού για κάθε λίτρο νερό για να έχουμε αλατότητα 35 ppt.

2.2.3 Απολυμάνσεις και αποστείρώσεις

Προαπαιτούμενο για τη καλλιέργεια μικροφυκών είναι η διατήρηση της καθαρότητάς τους. Στο νερό μπορούν εύκολα να αναπτυχθούν πολλοί παθογόνοι μικροοργανισμοί, ή οργανισμοί ανταγωνιστές, όπως άλλα ανεπιθύμητα είδη μικροφυκών και βλεφαριδοφόρα παράσιτα (Κλαδάς 2012). Για το λόγο αυτό, πριν τη χρήση του ο εξοπλισμός πρέπει να απολυμαίνεται με απόλυτες διαδικασίες, ενώ πρέπει να γίνεται και αποστείρωση του μέσου καλλιέργειας μαζί με τα εμπλουτιστικά του (θρεπτικά άλατα και τα ιχνοστοιχεία) σε αυτόκαυστο.

2.2.3.1 Αποστείρωση εξοπλισμού

Τα **μικρά γυαλικά** (δοκιμαστικοί σωλήνες, πιπέτες κλπ):

- βυθίζονται σε 2N HCL για 20 min
- ξεπλένουμε με απεσταγμένο νερό
- στεγνώνουμε στους 120 °C
- σκεπάζουμε με αλουμινόχαρτο και αποθηκεύουμε
- για αποστείρωση σε κλίβανο 160-200 °C για τουλάχιστον 2 h

Οι **φιάλες καλλιέργειας**, γυάλινες ή από πολυανθρακικό πλαστικό, πριν τη χρησιμοποίησή τους, πλένονταν καλά με ζεστό νερό, απορρυπαντικό και ξέβγαλμα με απεσταγμένο νερό.

2.2.3.1 Αποστείρωση μέσου καλλιέργειας

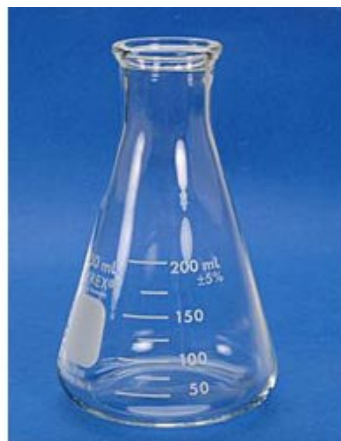
Για την αποστείρωση του μέσου καλλιέργειας και των θρεπτικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Υγρής Αποστείρωσης Ατμού (Αυτόκαυστο). Η αποστείρωση των όγκων που χρησιμοποιήσαμε πραγματοποιούνταν στους 120°C κάτω από πίεση 3 atm, επί 15 min



Εικόνα 5: Το αυτόκαυστο του Εργαστηρίου Καλλιιεργειών Πλαγκτού

2.3 Συντήρηση στελεχών και αναβάθμιση καλλιιεργειών

Η μαζική καλλιιεργεια μικροφυκών αρχίζει από καθαρά στελέχη των 120 ml σε γυάλινες φιάλες erlenmeyer 250 ml και συνεχίζει με αναβάθμιση των όγκων καλλιιεργειας τους, διαδοχικά σε φιάλες 0,5 Lit , του 1 λίτρου, των 5 λίτρων, έως τις μεγάλες νταμιτζάνες από πολυκαρβονικό πλαστικό (Nalgene® polycarbonate carboy) των 10 Lit (πιν.1).



Εικόνα 6: Τύποι δοχείων καλλιιεργειας. Αριστερά, φιάλη erlenmeyer, δεξιά νταμιτζάνα από πολυκαρβονικό πλαστικό (Nalgene®)

Οι καλλιέργειες μέχρι τον όγκο του 0,5 Lit γίνονται χωρίς αερισμό, ώστε από τις νεαρές καλλιέργειες να αποκλειστεί μία σίγουρη πηγή μόλυνσης. Σε αυτό το στάδιο, η ανταλλαγή αερίων του μέσου καλλιέργειας με την αέρια φάση γίνονται από την επιφάνεια του νερού, η οποία για το λόγο αυτό θα πρέπει να είναι σχετικά μεγάλη σε σχέση με τον όγκο του. Στους μεγαλύτερους όγκους εισάγεται ατμοσφαιρικός αέρας υπό πίεση, έτσι οι φιάλες είναι σχετικά περισσότερο γεμάτες.

Πίνακας 1: Σχέση όγκων φιαλών, εμβολιάσματος και μέσου καλλιέργειας μικροφυκών

Όγκος φιάλης σε ml	Όγκος αρχικού εμβολιάσματος σε ml	Τελικός όγκος μέσου καλλιέργειας σε ml	Κατάσταση
250	20	120	Χωρίς αερισμό
500	120	350	Χωρίς αερισμό
1000	200	800	Με αερισμό
5000	800	4000	Με αερισμό
10000	4000	9000	Με αερισμό

Η καλλιέργεια του καθαρού στελεχούς (αξενική καλλιέργεια) είναι το σημείο εκκίνησης της μαζικής παραγωγής κάθε είδους μικροφύκου. Η ποιότητα του είναι καθοριστικής σημασίας για την επιτυχία της. Έτσι, στη φάση των καλλιεργειών χωρίς αερισμό, είτε πρόκειται για ανανέωση των στελεχών, είτε για αναβάθμιση όγκου, η μεταφορά του εμβολιάσματος (inoculum) γίνονται πλησίον φλόγας, ώστε, με το ζεστό ανοδικό ρεύμα αέρα που δημιουργούνται στο εγγύς περιβάλλον, να υπάρχουν όσο το δυνατόν λιγότερες πιθανότητες εισόδου μικροβίων στις καλλιέργειες. Για τον λόγο αυτό ζεσταίναμε πάνω στη φλόγα το στόμιο των φιαλών, όσο είναι ακάλυπτες από το αυτοσχέδιο προστατευτικό πώμα (βαμβάκι και αλουμινόχαρτο).

Η ανανέωση των στελεχών και η αναβάθμισή τους σε μεγαλύτερους όγκους χωρίς αερισμό γίνονται ανά 8 ημέρες, ενώ η αναβάθμισή τους σε όγκους με αερισμό ανά 4 ημέρες.

2.4 Γενικές συνθήκες καλλιέργειας

2.4.1 Θερμοκρασία χώρου

Η θερμοκρασία του χώρου είναι αυτή που επηρεάζει καθοριστικά την αντίστοιχη των καλλιεργειών και αυτό είναι φυσικό γιατί πρόκειται για στάσιμες καλλιέργειες. Επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως:

- η κατασκευή του χώρου, η ύπαρξη μεγάλων παραθύρων, ο προσανατολισμός του και γενικά ότι επηρεάζει την θερμική του μόνωση
- τα χαρακτηριστικά κλιματισμού του χώρου και η σταθερότητα της θερμοκρασίας που επιτυγχάνεται
- η ακτινοβολία από τους λαμπτήρες φθορισμού και η θέση των καλλιεργειών ως προς αυτούς
- Η λειτουργία ή μη ανεμιστήρα για την ομογενοποίηση του αέρα και την αποφυγή στρωμάτωσης της θερμοκρασίας εντός του χώρου.

Οι βέλτιστες θερμοκρασίες για τη μαζική καλλιέργεια των περισσότερων ειδών μικροφυκών που χρησιμοποιούνται στην μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια, κυμαίνονται μεταξύ 20 και 24°C. Γενικά, κάτω από 16°C και πάνω από 27°C μειώνουν τους ρυθμούς αύξησης των πληθυσμών, πάνω από 30°C επιφέρουν θνησιμότητες. Το *Isocrysis T galbana*, σύμφωνα με πολλές εμπειρικές πηγές ευδοκμεί στο θερμοκρασιακό εύρος 18 έως 30 °C. Σίγουρα, η βέλτιστη θερμοκρασία για το *Isocrysis T galbana*, λόγω και της τροπικής του προέλευσης είναι αρκετά υψηλή. Κατά τους Marchetti et al. (2012) ανέρχεται στους 30 °C . Οι Abu-Reza et al. (1999) προσδιορίζουν τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης χωρίς την προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα στους 24–26 °C.

Ο χώρος του Εργαστηρίου Καλλιεργειών Πλαγκτού του Τμήματος ΥΔΑΑΔ, στον οποίο διεξάχθηκε το πείραμα ήταν κλιματιζόμενος στη θερμοκρασία των 21 °C. Στο εργαστήριο υπάρχουν μεγάλα παράθυρα και κατα συνέπεια η μεγάλη τους επιφάνεια είναι δυνατόν να προκαλέσει μεγάλη απώλεια θερμοκρασίας κυρίως τις πρώτες πρωινές ώρες τους εκτός καλοκαιριού μήνες. Ενδεικτικά παραθέτουμε ορισμένες μετρήσεις που καταγράψαμε με το θερμόμετρο μεγίστου ελαχίστου, κατά τη διάρκεια του πειράματος (πιν. 2).

Πίνακας 2: Ελάχιστες (Tmin) και μέγιστες θερμοκρασίες (Tmax)της αίθουσας του Εργαστηρίου Καλλιιεργειών Πλακτού κατά τη περίοδο του πειράματος

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	Tmin	T max
16/11	19	20
18/11	16	20
23/11	19	21
28/11	19	22

2.4.2 Φωτισμός

Το φως είναι η πηγή ενέργειας για τη φωτοσύνθεση και ως εκ τούτου στη μαζική καλλιέργεια φυκιών διατηρείται συνήθως σε 24ωρη βάση. Η βέλτιστη ένταση φωτός για την αύξηση των πληθυσμών του κάθε είδους είναι διαφορετική, αλλά, για πρακτικούς λόγους στις μαζικές καλλιέργειες η ένταση κρατείται στο εύρος 2 500-8 000 lux,

Οι λάμπες φθορίου που χρησιμοποιούνται στα ράφια του εργαστηρίου αποδίδουν στην απόσταση που τοποθετούσαμε τις καλλιέργειες, φωτισμό 1000 lux περίπου ανά λάμπα που είναι αναμμένη, ο οποίος ήταν ανοικτός όλο το εικοσιτετράωρο.

2.4.3 Αερισμός

Ο αερισμός χρησιμοποιείται για τη διατήρηση του πληθυσμού σε ανάδευση,

- εμποδίζοντας τη καθίζηση των κυττάρων,
- εμποδίζοντας τη δημιουργία νεκρών ζωνών στην καλλιέργεια,
- εκθέτοντας όλα τα κύτταρα στο φως και
- παρέχοντας διοξείδιο του άνθρακα (από την ατμόσφαιρα, είτε με εμπλουτισμό του πεπιεσμένου αέρα του δικτύου)

Επίσης με την αύξηση επιφάνειας επαφής αέρα-νερού (επιφάνεια φυσαλίδων και ανάβλυση απελευθερώνεται το παραγόμενο οξυγόνο, διατηρώντας έτσι σε ψηλά επίπεδα τον ρυθμό της φωτοσύνθεσης.

Στο εργαστήριο, η οξυγόνωση και η ομογενοποίηση της κάθε καλλιέργειας εξασφαλίζονταν με ήπια παροχέτευση πεπιεσμένου αέρα, από το στόμιο γυάλινου σωλήνα, \varnothing 4 mm (πιπέτα του 1 ml στην συγκεκριμένη περίπτωση εικ.6), στον οποίο κατέληγε ανάλογης διαμέτρου διαφανής πλαστικός σωλήνας, συνδεδεμένος με το δίκτυο αέρα του εργαστηρίου (εικ.7). Ο αέρας στο εργαστήριο παράγεται από φυγοκεντρικό φυσητήρα χαμηλής πίεσης (0.4 bar) SIEMENS 0.25 KW.



Εικόνα 7: Πιπέτα συνδεδεμένη με πλαστικό σωληνάκι για την παροχή αέρα στις καλλιέργειες. Αποσυνδέοντας προσωρινά τον εύκαμπτο πλαστικό σωλήνα από το δίκτυο αερισμού της αίθουσας, χρησιμοποιείται και ως σιφόνι για την λήψη δείγματος καλλιέργειας για μικροσκοπική παρατήρηση.



Εικόνα 8: Δίκτυο αερισμού με βανάκια φικς για τη ρύθμιση της παροχής αέρα στις καλλιέργειες

Με σκοπό την διευκόλυνση της ανταλλαγής των αερίων από τις βιολογικές διεργασίες, αλλά και τον περιορισμό της μόλυνσης από τον περιβάλλοντα χώρο, οι γυάλινες κωνικές φιάλες σφραγίζονταν με υδρόφοβο βαμβάκι, ενώ οι νταμιζάνες από πολυκαρβονικό πλαστικό, διέθεταν ειδικό καπάκι με ανοίγματα για την υποδοχή του αερισμού.

2.4.4 Αλατότητα

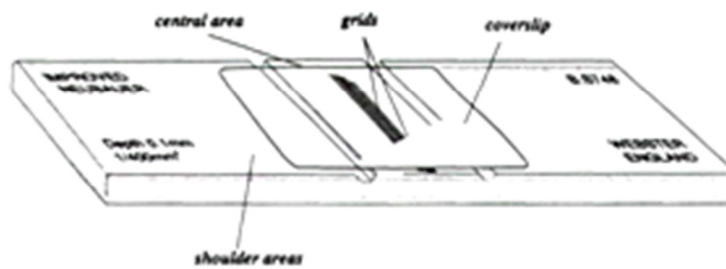
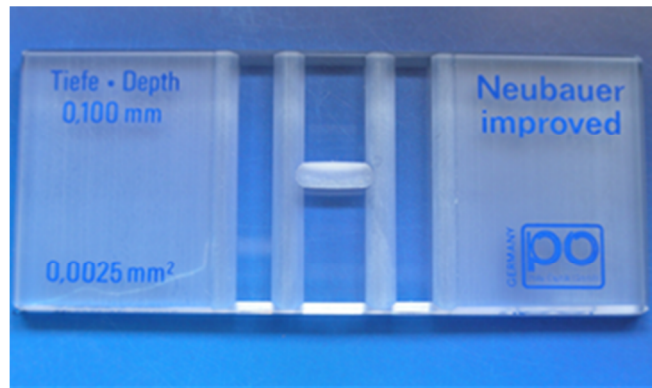
Το *Isocrysis T galbana* ευδοκimeί στο εύρος αλατοτήτων 25–35‰ (Abu-Rezq *et al.* 1999), ενώ οι O'Shea *et al.* (2010) προσδιορίζουν την βέλτιστη αλατότητα για την ανάπτυξη του στα 30 ‰.

Όπως προαναφέρθηκε τα πειράματά μας πραγματοποιήθηκαν με νερό αλατότητας 35 ‰. Λόγω του συνεχούς αερισμού, η εξάτμιση των καλλιεργειών ήταν σημαντική και κατά συνέπεια χρειαζόνταν η διόρθωση της αλατότητας με την προσθήκη αποστειρωμένου γλυκού νερού. Ένας εύκολος τρόπος για την αντιμετώπιση αυτού του ζητήματος είναι η επισήμανση με μαρκαδόρο του επιπέδου του νερού στην εξωτερική επιφάνεια της φιάλης και σποραδικά η αναπλήρωση των απωλειών λόγω εξάτμισης.

2.5 Εκτίμηση πυκνότητας κυττάρων στις καλλιέργειες

2.5.1 Το αιματοκυτταρόμετρο Neubauer

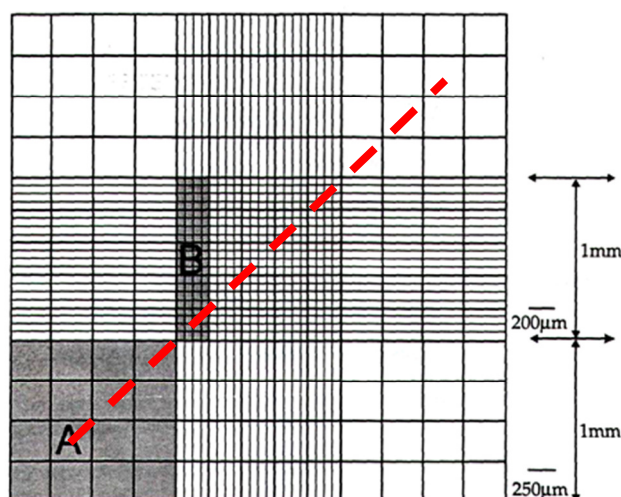
Το μέτρημα των κυττάρων του μικροφύκου, έγινε σε ειδική αντικειμενοφόρο πλάκα, στο αιματοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer. Το δείγμα της φυτοπλαγκτικής καλλιέργειας εγλωβίζεται σε δύο θαλάμους μέτρησης, οι οποίοι σχηματίζονται από το αιματοκυτταρόμετρο και μία ειδική επικαλυπτρίδα (εικ.8).



Εικόνα 9: Φωτογραφία (πάνω) και σχηματική αναπαράσταση (κάτω) αιματοκυτταρόμετρου τύπου Neubauer για την μέτρηση των φυτοπλαγκτικών κυττάρων των καλλιέργειών. Στην κεντρική περιοχή, διακρίνονται οι δύο θάλαμοι μέτρησης, ο επάνω και ο κάτω

Με την επικάλυπτιδα τοποθετημένη, ο «θάλαμος» που σχηματίζεται έχει βάθος 0,1 mm και συνολική έκταση 9 mm² (εικ.9). Η περιοχή αυτή σε 9 τετράγωνα επιφάνειας 1 mm². Τα τέσσερα τετράγωνα στις γωνίες αυτής της περιοχής (A) υποδιαιρούνται σε 16 μικρότερα, ενώ το κεντρικό τετράγωνο του θαλάμου (B), υποδιαιρείται σε 25 μικρότερα τετράγωνα, 0,2 mm x 0,2 mm, επιφάνειας 0,04 mm² το καθένα (FAO 1999).

Τα επιμέρους τετράγωνα A και B διαιρούν το δείγμα σε υπο-δείγματα. Τα μεγάλα τετράγωνα (A) χρησιμοποιούνται για την μέτρηση σχετικά μεγάλων κυττάρων, όπως είναι τα κύτταρα του *Isochrysis*, ενώ τα μικρά τύπου (B) στην περίπτωση μέτρησης ειδών με κύτταρα > 6 mm, οι καλλιέργειες των οποίων είναι κατά κανόνα πολύ πυκνές. Παρακάτω, θα εξηγηθεί η διαδικασία επιλογής του αριθμού αυτών των υπο-δειγμάτων προ καταμέτρησης.



Εικόνα 10: Σχηματική λεπτομέρεια θαλάμου αιματοκυτταρόμετρου Neubauer. Διακρίνονται οι διαφορετικοί τύποι των τετραγώνων καταμέτρησης A και B σε μπλοκ μεγαλύτερων τετραγώνων. Η κόκκινη διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει τα διαγώνια μπλοκ (βλ. κείμενο, παραγρ.2.4.3)

Το Neubauer μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση κυττάρων μικροφυκών μεγέθους από 2 έως 20 µm και σε πυκνότητες έως 500 εκατομμύρια κύτταρα / ml.

2.5.2 Διαδικασία δειγματοληψίας

Από κάθε καλλιέργεια αφαιρούσαμε μικρό όγκο για την εκτίμηση της πυκνότητάς της. Η χρησιμοποίηση εξοπλισμού γι' αυτή τη διαδικασία πρέπει να είναι επιμελώς σχεδιασμένη. Αυτό γιατί στους χώρους του Εργαστηρίου Καλλιέργειας Πλαγκτού που διεξάχθηκε το πείραμα, εκτός από το συγκεκριμένο είδος, καλλιεργούνταν και άλλα είδη μικροφυκών, καθώς και ζωοπλακτικοί οργανισμοί. Για να εξασφαλίσουμε ότι η καλλιέργεια μας δεν θα μολυνόταν, η δειγματοληψία γινόταν από το εύκαμπτο σωληνάκι του αερισμού της (εικ.6). Αφαιρώντας στο σωληνάκι από το δίκτυο του αέρα, το χρησιμοποιήσαμε στη συνέχεια για την αφαίρεση μέσω σιφωνισμού 20 ml περίπου καλλιέργειας σε ένα καθαρό πλαστικό δοχείο (ουροσυλλέκτη, ή μπέκερ).

Εάν η καλλιέργεια προς μέτρηση θεωρηθεί πολύ πυκνή, τότε την αραιώνουμε με νερό ίδιας αλατότητας και σημειώνουμε τον συντελεστή αραιώσης για να τον χρησιμοποιήσουμε στο τέλος για την τελική εκτίμηση της πυκνότητας.

Λόγω της κίνησης του συγκεκριμένου είδους, συνεχίζαμε με τη θανάτωση των κυττάρων του δείγματος προσθέτοντας μία σταγόνα διαλύματος Lugol αναδεύοντας καλά το δείγμα (η παρασκευή του διαλύματος Lugol γίνεται διαλύοντας σε 200 ml αποσταγμένο νερό, 20 g KIO_3 , 10 g I_2 , 20 ml CH_3COOH).

Με αποστειρωμένη πλαστική πιπέτα μιας χρήσης μεταφέρεται από μία σταγόνα καλά αναδευμένου εναιωρήματος φυκιών σε κάθε «θάλαμο» του αιματοκυταρομέτρου, η οποία επικαλύπτεται στη συνέχεια ώστε η σταγόνα με την καλλιέργεια να απλωθεί σε όλη την περιοχή.

Ακολουθεί γρήγορος έλεγχος κάτω από το μικροσκόπιο σε μικρή μεγέθυνση για να διαπιστωθεί η ομογενής κατανομή των κυττάρων, η απουσία φυσαλίδων και η πλήρης πλήρωση του χώρου των θαλάμων.

Στη συνέχεια τα κύτταρα αφήνονται να βυθιστούν για 5 λεπτά, ώστε να σταματήσει η κίνηση της καταβύθισης και να περιοριστεί το βάθος πεδίου για καλύτερη εστίαση.

2.5.3 Καταμέτρηση κυττάρων και υπολογισμοί

Για την καταμέτρηση των κυττάρων του δείγματος επιλέξαμε το γρήγορο μέτρημα του προτείνεται για τις μετρήσεις ρουτίνας στου ιχθυογεννητικούς σταθμούς (Τζοβενής 2003).

- Το πρώτο μέτρημα γίνεται στο κεντρικό μπλοκ των τετραγώνων Β. Καταμετρούνται τα κύτταρα που βρίσκονται στο εσωτερικό του και αυτά που είναι αγγίζουν, από τις τέσσερις, τις δύο μόνον γειτονικές εξωτερικές πλευρές.
 - Εάν σε αυτό το μεγάλο κεντρικό τετράγωνο, ο αριθμός των κυττάρων είναι $n < 150$, μετράμε και τα 9 μεγάλα μπλοκ του θαλάμου.
 - Εάν στο κεντρικό τετράγωνο $n = 150$ έως 250, μετράμε τα τρία διαγώνια (εικ.9).
 - Εάν στο κεντρικό τετράγωνο $n = 250$ έως 300 δεν μετράμε άλλο.
 - Εάν στο κεντρικό τετράγωνο $n > 300$ αραιώνουμε το δείγμα
- Επαναλαμβάνουμε το ίδιο και στον δεύτερο «θάλαμο».
- Υπολογίζουμε τη μέση τιμή ανά μπλοκ.
- Πολλαπλασιάζουμε επί 10000 για να έχουμε την πυκνότητα του δείγματος στο κυβικό εκατοστό.

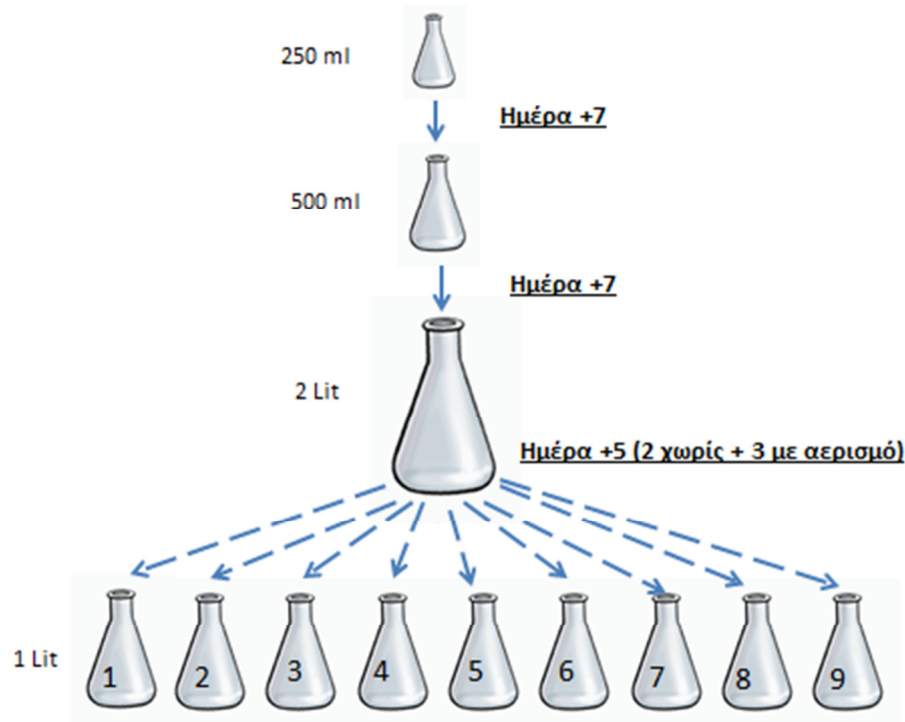
- Τέλος πολλαπλασιάζουμε με τον συντελεστή αραίωσης (αν έχει γίνει) για να έχουμε την εκτίμηση της πυκνότητας του δείγματος της καλλιέργειας.

2.6 Σχεδιασμός πειράματος

Ξεκινώντας από την ανάπτυξη μίας καλλιέργειας, την οποία αναβαθμίσαμε σε εννέα αντίτυπα, εξετάσαμε την εξέλιξη των πληθυσμών σε όγκους 1, 5 και 10 λίτρων για μία χρονική περίοδο που ξεπερνούσε τον ένα μήνα. Θελήσαμε να εξετάσουμε την δυναμική των πληθυσμών έτσι όπως αναβαθμίζονται στα προγράμματα μαζικής παραγωγής (λ.χ. των ιχθυογεννητικών σταθμών), να ελέγξουμε δηλαδή την κατάστασή τους από τη διαχειριστική σκοπιά και όχι να δούμε αυστηρά την επίδραση του όγκου (σε μία τέτοια περίπτωση θα έπρεπε να χρησιμοποιήσουμε φύκια καλλιέργειες ακριβώς ίδια ηλικίας ταυτόχρονα και στους τρεις όγκους).

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ταυτόχρονη τριπλή επανάληψη (triplicate).

Ξεκινήσαμε ετοιμάζοντας με εμβολιασμό ένα καθαρό στέλεχος *Isocrysis T galbana* σε κωνική φιάλη των 250 ml, η οποία περιείχε 120 ml καλλιέργειας (εικ. 10). Μετά από επτά μέρες επώασης στην αίθουσα του εργαστηρίου, αναβαθμίσαμε την σε κωνική φιάλη 500 ml (120 ml εμβολιάσματος και 230ml εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό). Ξανά, μετά από επώαση επτά ημερών, η ώριμη καλλιέργεια αναβαθμίστηκε σε φιάλη 2 Lit, σε συνολικό όγκο 1350ml.

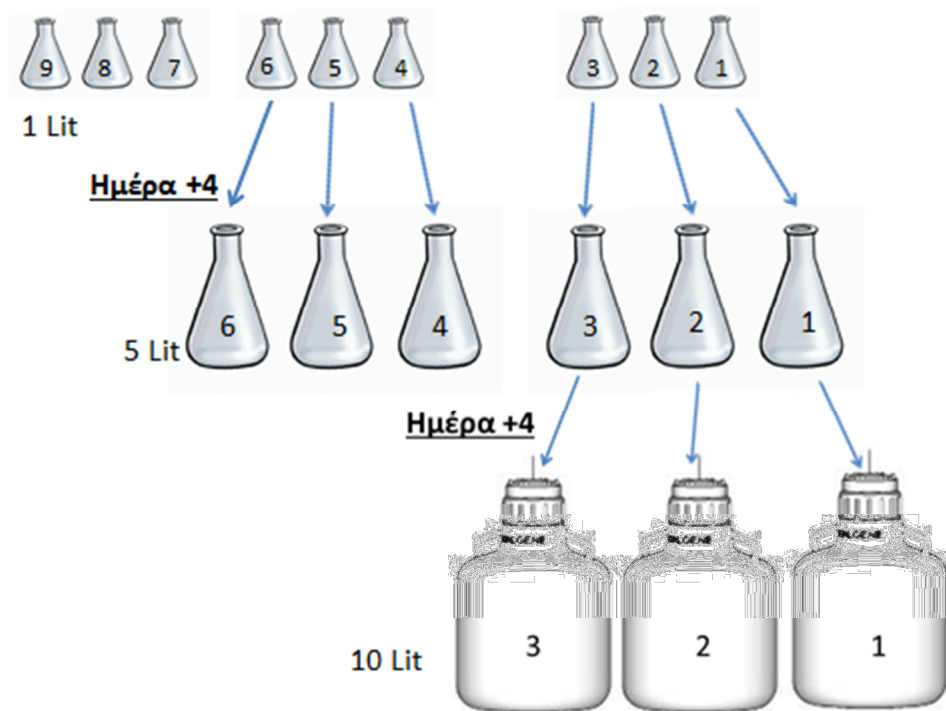


Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση της αναπαραγωγής των καλλιέργειών για τις ανάγκες των πειραμάτων. Με συνεχείς γραμμές γραμμές, οι κάθετες αναβαθμίσεις όγκων. Με διακοπτόμενες γραμμές το μοίρασμα της καλλιέργειας των 2 Lit σε όμοιες αρχικές καλλιέργειες, από 1 έως 9 (οριζόντια αναβάθμιση της καλλιέργειας).

Διατηρήσαμε την καλλιέργεια προστατευμένη από τον αερισμό για δύο ημέρες και την τρίτη προσθέσαμε 650 ml εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό και τοποθετήσαμε αερισμό. Μετά από 3 ημέρες ωρίμανσης, η καλλιέργεια μοιράστηκε, εμβολιάζοντας 9 φιάλες του 1 Lit (200 ml καλλιέργειας και 600 ml εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό) σε κάθε μια από αυτές.

Σε τρεις από τις φιάλες του 1 λίτρου (7, 8 και 9) , σε τρεις από τις φιάλες των 5 λίτρων (4, 5 και 6) και στις τρεις φιάλες των 10 λίτρων (1, 2 και 3) παρακολούθηθηκε η εξέλιξη της πυκνότητας των καλλιέργειών για ένα περίπου μήνα μήνα μετά τους αντίστοιχους εμβολιασμούς (εικόνα 11).

Για κάθε εξεταζόμενο όγκο προέκυψε μία εκτίμηση μέσης φυτοπλαγκτικής πυκνότητας ανά ημέρα.



Εικόνα 12: Κάθετες αναβαθμίσεις καλλιέργειών για τη δημιουργία των σειρών καλλιέργειών στα 5 και 10 Lit. Οι αριθμήσεις που επαναλαμβάνονται στους μεγαλύτερους όγκους υποδηλώνουν συνέχιση της καλλιέργειας.

2.7 Στατιστική επεξεργασία

Η σύγκριση των μέσων τιμών του αριθμού των κυττάρων ανά φιάλη διαφορετικού όγκου και ημερών καλλιέργειας έγινε με την ανάλυση διακύμανσης με δυο παράγοντες (Two-way ANOVA). Ο έλεγχος αυτός εξυπηρετεί δύο σκοπούς: α) επιτρέπει τον υπολογισμό ενός κοινού σφάλματος για τη σύγκριση των μέσων όρων των μεταβλητών και β) παρέχει τη δυνατότητα ενός προκαταρκτικού ελέγχου της ύπαρξης διαφορών μεταξύ των μέσων όρων με τη χρήση του κριτηρίου F (Zar 1999). Η ANOVA θεωρείται ως εξαιρετικά «ισχυρή» στατιστική δοκιμασία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε δείγματα που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή, αφού επηρεάζεται ελάχιστα από τυχόν αποκλίσεις από αυτήν και ειδικότερα στις περιπτώσεις σύγκρισης δειγμάτων με παραπλήσιο αριθμό μετρήσεων (Zar 1999). Ακόλουθα, στην περίπτωση που διαπιστώνονταν η ύπαρξη σημαντικών διαφορών ανάμεσα στους μέσους όρους κάθε παράγοντα αναφοράς, εφαρμόστηκε ο έλεγχος της ύστερης δοκιμασίας (post-hoc test) προκειμένου να διαπιστωθεί από ποιες παράμετροι προέρχεται η ύπαρξη διαφορών. Ο πιο αποτελεσματικός έλεγχος είναι των Ελαχίστων Σημαντικών Διαφορών (Least Significant Differences, LSD), ειδικότερα στις περιπτώσεις που έχουμε ίσο αριθμό δειγμάτων ανάμεσα στους παράγοντες που εξετάζουμε κάθε φορά.

Για τις στατιστικές μας αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο STATISTICA.

3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

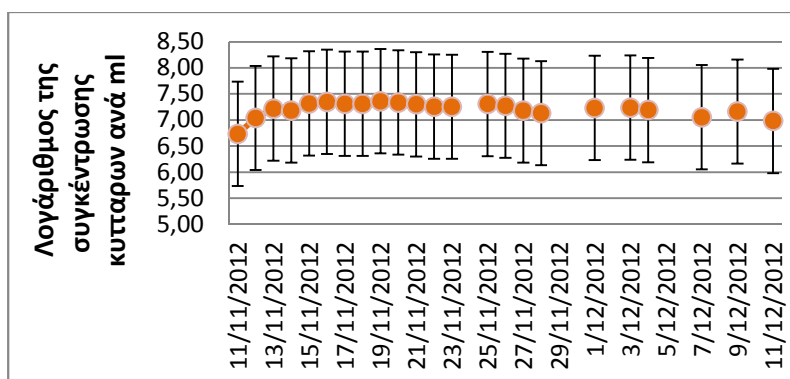
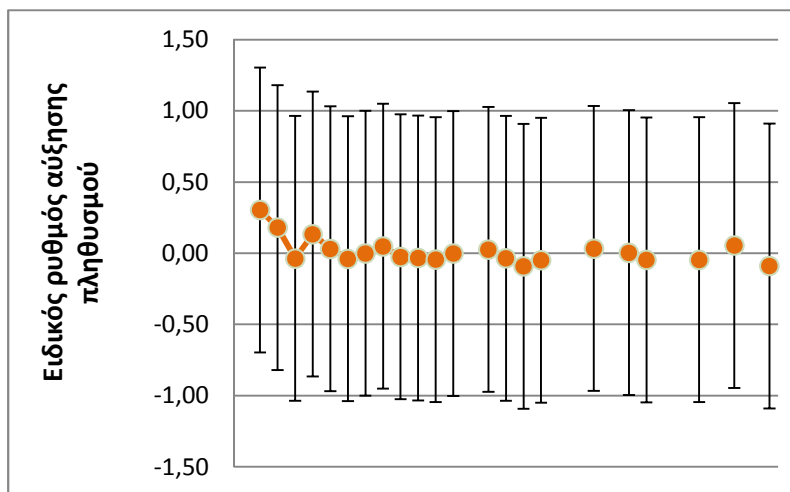
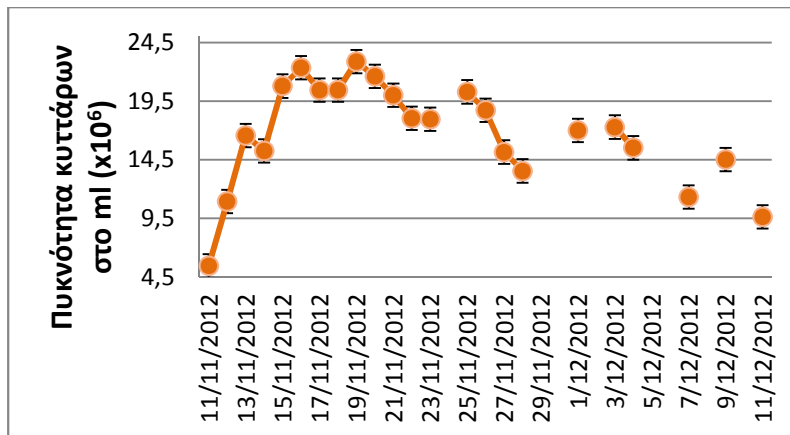
Και οι τρεις σειρές καλλιεργειών στους όγκους 1, 5 και 10 λίτρων (ωφέλιμοι όγκοι 0.8, 3.8 και 9 λίτρα αντίστοιχα) παρουσίασαν έντονη πληθυσμιακή αύξηση τις 5 πρώτες μέρες από το μπόλιασμα των καλλιεργειών, με τον Ειδικό ρυθμό αύξησης (SGR) να είναι γενικά υψηλότερος το πρώτο εικοσιτετράωρο της καλλιέργειας (εικ. 13 έως 15). Πρακτικά λοιπόν δεν παρατηρήθηκε λανθάνουσα φάση στις καλλιέργειές μας κάτι που σημαίνει ότι οι πληθυσμοί δεν ανέκοψαν την αυξητική τους πορεία στις καινούργιες πυκνότητες στο ανανεωμένο μέσο καλλιέργειας.

Η φάση στασιμότητας ξεκινά ουσιαστικά την 5^η ημέρα σε όλες τις καλλιέργειες. Αυτό σημαίνει ότι από διαχειριστική σκοπιά, η συνήθης πρακτική που εφαρμόζουμε στο εργαστήριο για αναβάθμιση των όγκων καλλιέργειας ανά 4 ημέρες (βλέπε 2.3) είναι σωστή.

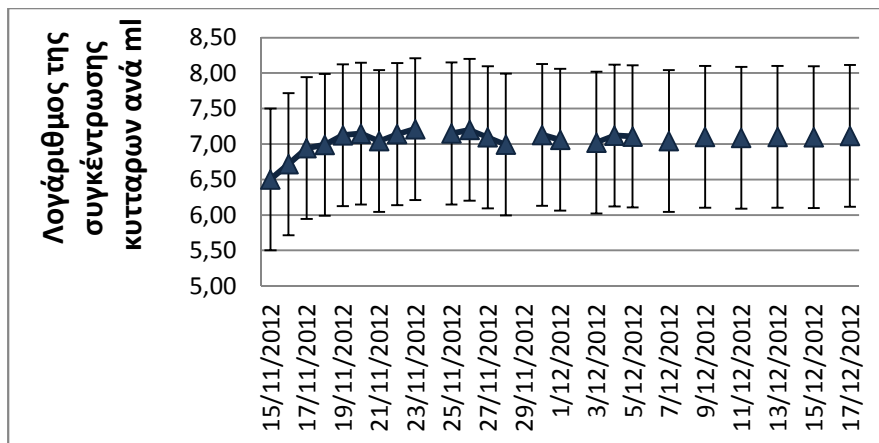
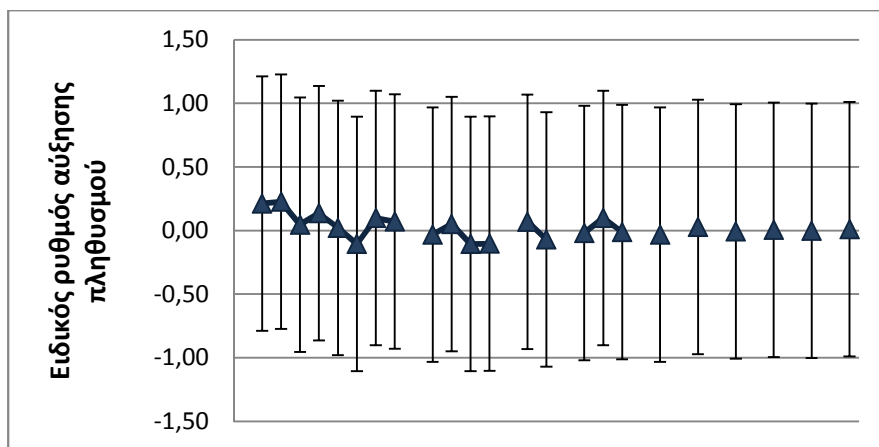
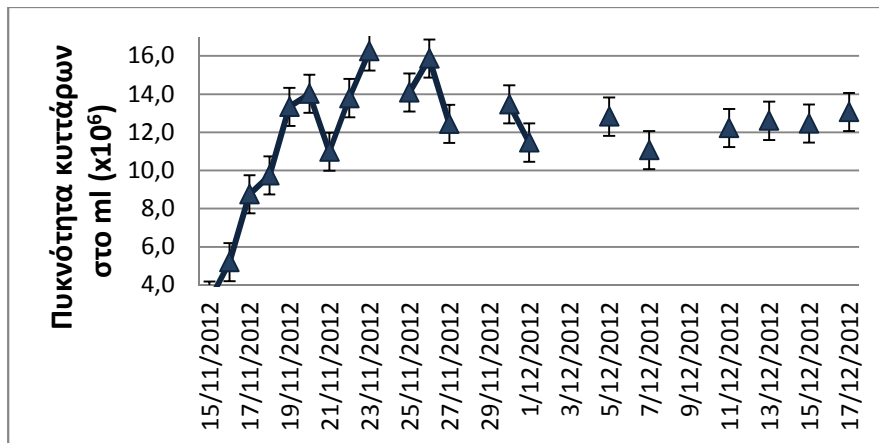
Η φάση στασιμότητας των καλλιεργειών διάρκεσε 8-10 ημέρες στους μικρούς όγκους και πάνω από 20 ημέρες στον όγκο των 10 λίτρων. Μετά την 20 ημέρα ο κινούμενος πτωτικά SGR τείνει να αυξηθεί (εικ.16), ωστόσο χωρίς αυτή η εξέλιξη να αποδεικνύεται στατιστικά.

Γενικά οι αποδόσεις των καλλιεργειών του *Isochrysis galbana* σε τεχνητό θαλασσινό νερό στις συνθήκες του εργαστηρίου κυμάνθηκαν σε ικανοποιητικά επίπεδα. Οι συγκεντρώσεις στις καλλιέργειες του 1 λίτρου ξεπέρασαν τα 20 εκατ. κύτταρα το κυβικό εκατοστό και τα 15 στους μεγαλύτερους όγκους .

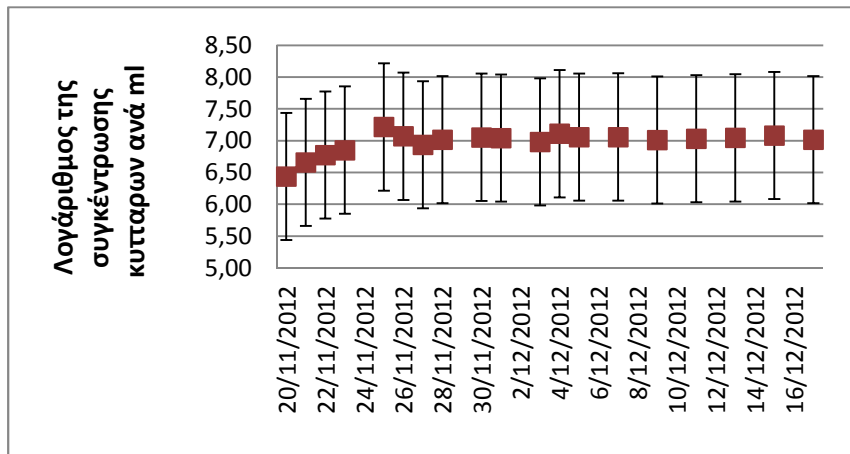
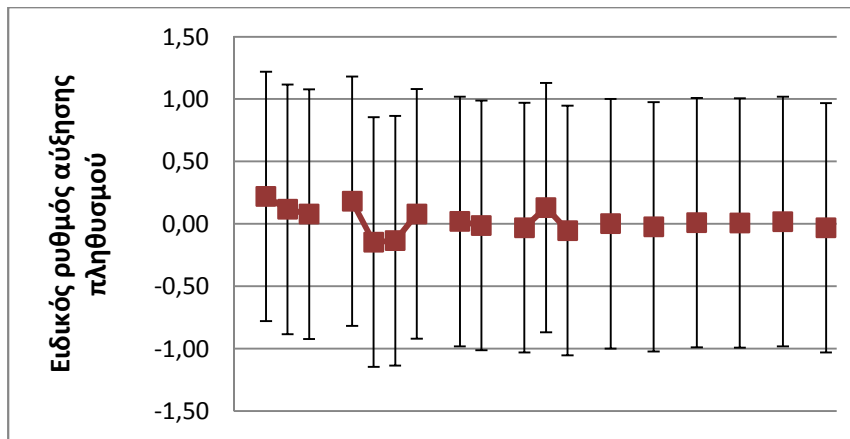
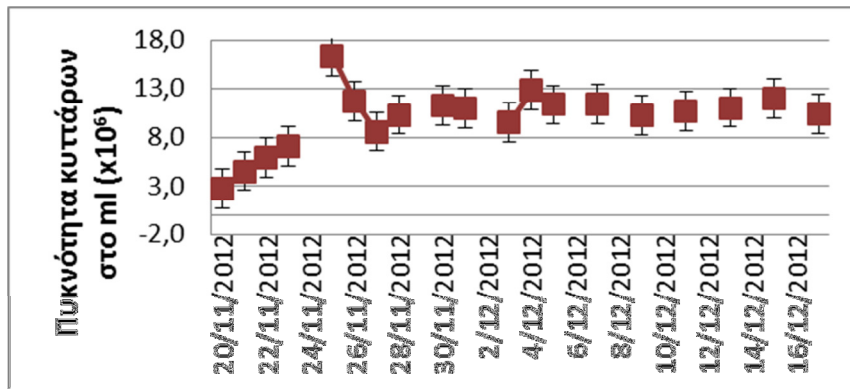
Επίσης παρατηρούμε ότι οι διακυμάνσεις των πυκνοτήτων παρουσίασαν μία εξαιρετική ομοιογένεια, κάτι που μας κάνει να πιστεύουμε ότι οι μετρήσεις των κυτταρικών συγκεντρώσεων ήταν τελικά αξιόπιστες.



Εικόνα 13: Εξέλιξη της μέσης πυκνότητας της καλλιέργειας του μικροφύκου *Isochrysis T galbana* συναρτήσει την διάρκειας της σε φιάλη χωρητικότητας 1 Lit (φιάλες 7 έως 9). Πάνω, εξέλιξη της πυκνότητας σε εκατομμύρια κύτταρα ανά ml καλλιέργειας. Στη μέση, μεταβολή του Ειδικού Ρυθμού Αύξησης (SGR) στη διάρκεια της καλλιέργειας. Κάτω, εξέλιξη της πυκνότητας σε λογαριθμικές τιμές. Με κάθετες μπάρες συμβολίζονται οι τυπικές αποκλίσεις των επαναλήψεων του πειράματος.



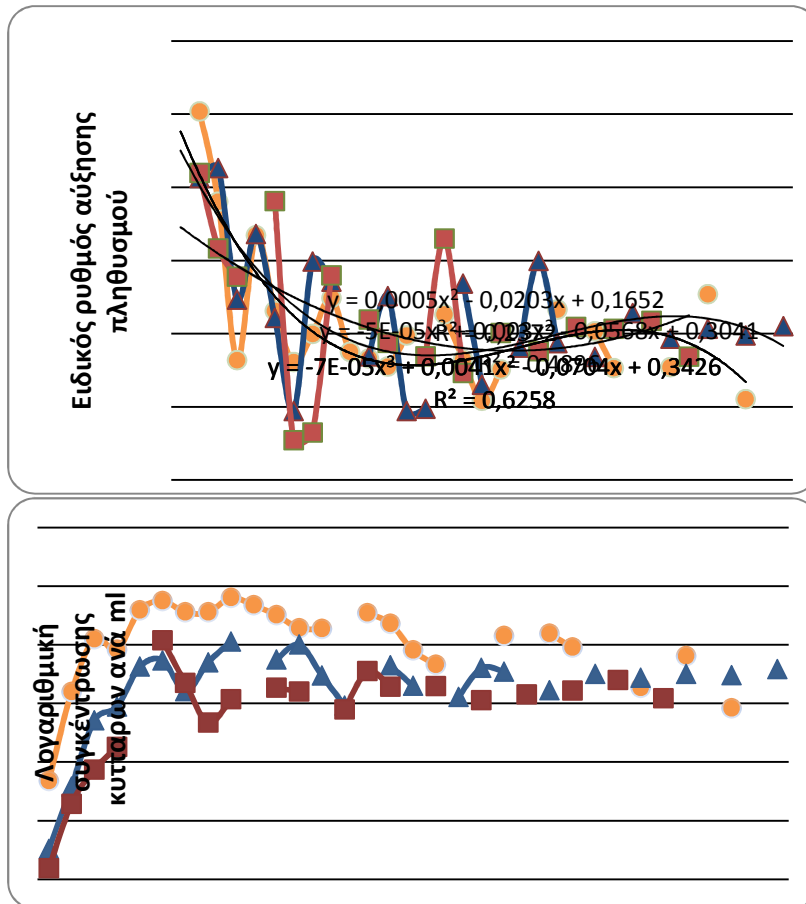
Εικόνα 14: Εξέλιξη της μέσης πυκνότητας της καλλιέργειας του μικροφύκου *Isochrysis T galbana* συναρτήσει την διάρκειας της σε φιάλη χωρητικότητας 5 Lit (φιάλες 4 έως 6). Πάνω, εξέλιξη της πυκνότητας σε εκατομμύρια κύτταρα ανά ml καλλιέργειας. Στη μέση, μεταβολή του Ειδικού Ρυθμού Αύξησης (SGR) στη διάρκεια της καλλιέργειας. Κάτω, εξέλιξη της πυκνότητας σε λογαριθμικές τιμές. Με κάθετες μπάρες συμβολίζονται οι τυπικές αποκλίσεις των επαναλήψεων του πειράματος.



Εικόνα 15:Εξέλιξη της μέσης πυκνότητας της καλλιέργειας του μικροφύκου *Isochrysis T galbana* συναρτήσει την διάρκειας της σε φιάλη χωρητικότητας 10 Lit (φιάλες 1 έως 3). Πάνω, εξέλιξη της πυκνότητας σε εκατομμύρια κύτταρα ανά ml καλλιέργειας, στη μέση, μεταβολή του Ειδικού Ρυθμού Αύξησης (SGR) στη διάρκεια της καλλιέργειας. Και κάτω, εξέλιξη της πυκνότητας σε λογαριθμικές τιμές. Με κάθετες μπάρες συμβολίζονται οι τυπικές αποκλίσεις των επαναλήψεων του πειράματος.

Στην εικόνα 16 παρουσιάζεται η ξανά η εξέλιξη των βασικών πληθυσμιακών παραμέτρων (SGR και πυκνότητας) ώστε να υπάρχει η δυνατότητα άμεσης σύγκρισης τους.

Παρατηρούμε, ότι η ανάπτυξη της καλλιέργειας στον όγκο του ενός λίτρου είναι πιο απότομη από τις αντίστοιχες των μεγαλύτερων όγκων (5 και 10 λίτρων), αλλά και της μέγιστης συγκέντρωσης που επιτυγχάνεται σε κάθε περίπτωση.



Εικόνα 16: Συγκριτική παρουσίαση της εξέλιξης της μέσης πυκνότητας της καλλιέργειας του μικροφύκου *Isochrysis T galbana* συναρτήσει την διάρκειας της στις φιάλες χωρητικότητας 1 (κύκλος), 5 (τρίγωνο) και 10 Lit (τετράγωνο), χωρίς τις τυπικές αποκλίσεις των επαναλήψεων του πειράματος (για παραστατικούς λόγους). Πάνω, εξέλιξη της πυκνότητας σε λογαριθμικές τιμές. Στη μέση, μεταβολή του Ειδικού Ρυθμού Αύξησης (SGR) στη διάρκεια της καλλιέργειας. Κάτω, εξέλιξη της πυκνότητας σε εκατομμύρια κύτταρα ανά ml καλλιέργειας.

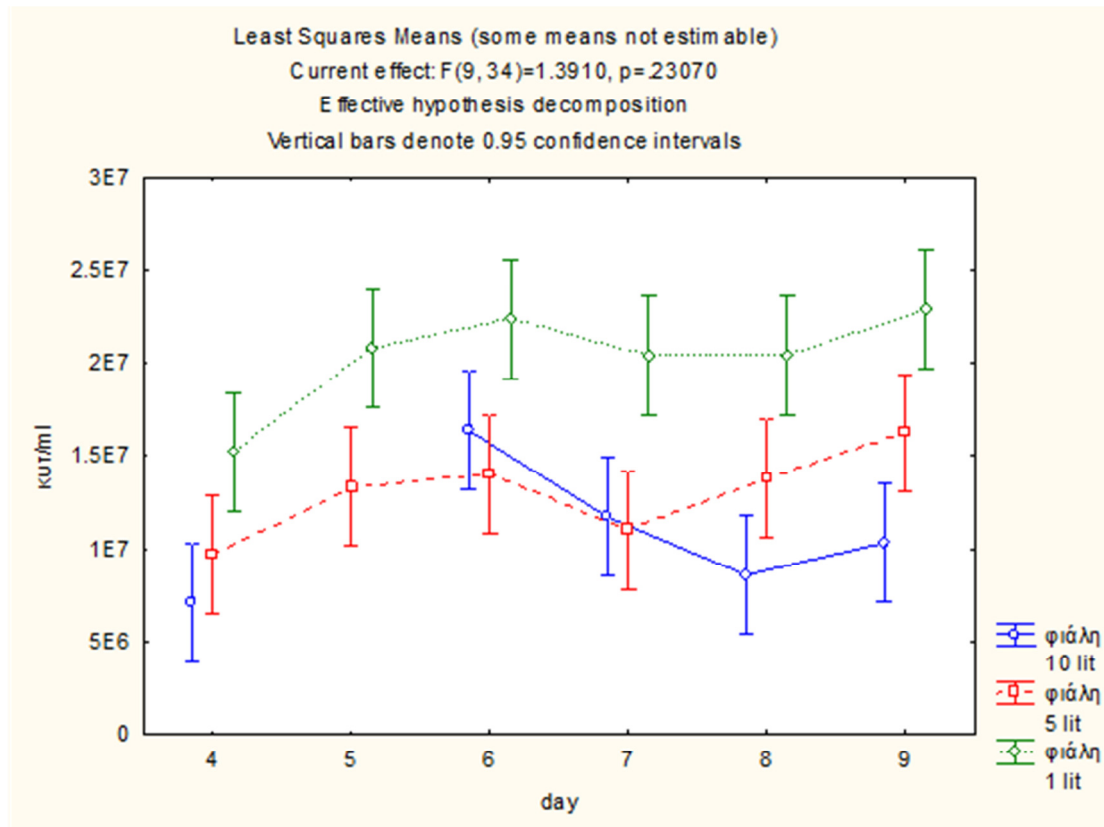
Στην εικόνα 10 παρουσιάζεται συγκριτικά η εξέλιξη των ίδιων παραμέτρων (εικ. 7,8,9). Παρατηρούμε, ότι η ανάπτυξη της καλλιέργειας στον όγκο του ενός λίτρου είναι πιο απότομη από τις αντίστοιχες των μεγαλύτερων όγκων (5 και 10 λίτρων), αλλά και της μέγιστης συγκέντρωσης που επιτυγχάνεται σε κάθε περίπτωση.

Η διαφορά αυτή επιβεβαιώνεται και στατιστικά καθώς τα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης με δυο παράγοντες έδειξε ότι η φιάλη του 1 λίτρου εμφάνισε στατιστικά (post-hoc LSD test) μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων για τις ημέρες καλλιέργειας από την 5η μέχρι την 9η ημέρα (πίν. 3 και εικ. 17).

Σκόπιμα το περιορίσαμε τον έλεγχο αυτό στις μέρες που μας ενδιαφέρουν ως προς την τη διαχείρισή του συγκεκριμένου φύκου, δηλαδή είτε την αναβάθμιση με επαναεμβολιασμό των καλλιεργειών, είτε τη χρησιμοποίησή τους προς κατανάλωση από ζωοπλαγκτικούς οργανισμούς.

Πίνακας 3: Αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης με δυο παράγοντες του αριθμού των κυττάρων ανά φιάλη διαφορετικού όγκου και ημερών καλλιέργειας. Οι στήλες με τους αριθμούς υποδεικνύουν την ομαδοποίηση των τιμών του αριθμού των κυττάρων σύμφωνα με την ύστερη δοκιμασία LSD. Οι τιμές με έντονη γραφή υποδεικνύουν τις σημαντικά διάφορες τιμές

Ημέρες καλλιέργειας	Φιάλη	κυτ/ml Mean	1	2	4
4	10 lit	7105556	****		
8	10 lit	8593889	****	****	
4	5 lit	9742222	****	****	
9	10 lit	10326667	****	****	
7	5 lit	10987778	****	****	
7	10 lit	11726667	****	****	
5	5 lit	13330556	****	****	
8	5 lit	13790000	****	****	
6	5 lit	14013333	****	****	
4	1 lit	15251111	****	****	****
9	5 lit	16240000		****	****
6	10 lit	16394444		****	****
8	1 lit	20440000			****
7	1 lit	20444444			****
5	1 lit	20783333			****
6	1 lit	22343889			****
9	1 lit	22880000			****



Εικόνα 17: Διακύμανση του αριθμού των κυττάρων ανά φιάλη διαφορετικού όγκου και ημερών καλλιέργειας.

Οι διαφορές αυτές μπορούν να αποδοθούν στο συνολικό εφέ του όγκου σε πρωτεύουσες συνθήκες καλλιέργειας, δηλαδή τις διαφορετικές δυνατότητες διείσδυσης το φωτός στο μέσο καλλιέργειας, ανάλογα με το πάχος της φιάλης, καθώς και στις διαφορετικές σχέσεις όγκου νερού/ρυθμού αερισμού που οδηγούν σε διαφορετικά μεγέθη επιφανειών επαφής αέρα νερού στις τρεις σειρές καλλιεργειών μας. Αυτός ο παράγοντας είναι σημαντικότερος στην απόδοση των καλλιεργειών (Falinski 2009).

Βέβαια δεν πρέπει να αποκλείουμε την ερμηνεία των διαφορών αυτών με βάση τη φυσιολογική κατάσταση και την υγεία των καλλιεργειών, καθώς οι καλλιέργειες στους μεγάλους όγκους ήταν συνολικά περισσότερες ημέρες εκτεθειμένες στον αερισμό κάτι που δεν ευνοεί την καθαρότητά τους (Κλαδάς 2012).

Για να επιβεβαιωθεί όμως κάτι τέτοιο και να αναδειχτεί ασφαλέστερα ο ρόλος του όγκου στην απόδοση των καλλιεργειών, θα έπρεπε να σχεδιάσουμε το πείραμα με συγχρονισμένες καλλιέργειες στους τρεις όγκους, οι οποίες να προέρχονταν από μία κοινή καλλιέργεια με την οποία θα τις εμβολιάζαμε.

Δεν το κάναμε, διότι σε αυτή την εργασία θέλαμε να διαπιστώσουμε συγκεκριμένα σε ποιες κυτταρικές συγκεντρώσεις οδηγεί το μοντέλο διαχείρισης της παραγωγής που έχουμε υιοθετήσει στο εργαστήριο.

4 Βιβλιογραφία

4.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Abu-Rezq TS, Al-Musallam L, Al-Shimmari J, Dias P (1999) Optimum production conditions for different high-quality marine algae. *Hydrobiologia*, 403: 97-107
- Brown MR (2002) Nutritional value of microalgae for aquaculture. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- CCAP (2001) UKNCC COLLECTION. Culture Collection of Algae and Protozoa [http://download.fa.itb.ac.id/filenya/Handout%20Kuliah/Pharmaceutical%20Microbiology%20\(FA2112\)/Katalog%20ALGAE&PR.PDF](http://download.fa.itb.ac.id/filenya/Handout%20Kuliah/Pharmaceutical%20Microbiology%20(FA2112)/Katalog%20ALGAE&PR.PDF), ημερομηνία πρόσβασης 17/6/2013
- EOL http://eol.org/pages/11818919/hierarchy_entries/50813025/overview Encyclopedia of Life, ημερομηνία πρόσβασης 17/6/2013
- Falinski KA (2009) Effects of different aeration conditions on *isochrysis galbana* (T-ISO) CCMP 1324 in a bench-scale photobioreactor. Thesis Presented for the Degree of Master of Science. Cornell University. <http://dspace.library.cornell.edu/bitstream/1813/13466/1/Falinski,%20Kim.pdf> ημερομηνία πρόσβασης 24/9/2013
- FAO (1999) Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream - Volume 1, <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/004/x3980e/x3980e00.pdf> , ημερομηνία πρόσβασης 17/6/2013
- Liu CP, Lin LP (2001) Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis galbana* CCMP1324. *A Quarterly Journal Containing Scientific Contributions from the Institute of Botany, Academia Sinica, Shanghai*, 42: 207-214
- Marchetti J, Bougaran G, Le Dean L, Mégrier C, Lukomska E, Kaas R, Olivo E, Baron R, Robert R, Cadoret JP (2012) Optimizing conditions for the continuous Culture of *Isochrysis affinis galbana* relevant to commercial hatcheries *AquaCulture* 326–329: 106–115
- Mourente G (2003) Accumulation of DHA (docosahexaenoic acid; 22:6n-3) in larval and juvenile fish brain. *The Big Fish Bang. Proceedings of the 26th Annual Larval Fish Conference*. Edited by Howard I. Browman and Anne Berit Skiftesvik Published by

the Institute of Marine Research, Postboks 1870 Nordnes, N-5817, Bergen, Norway.
ISBN 82-7461-059-8

Nelson JR, Guarda S, Cowell LE, Heffernan P (1992) Evaluation of microalgal clones for mass Culture in a subtropical greenhouse bivalve hatchery: growth rates and biochemical composition at 30°C. *Aquaculture* 106: 357– 377

O'Shea SK, Holland F, Bilodeau A (2010) Modeling the Effects of Salinity and pH on the Cadmium Bioabsorptive Properties of the Microalgae *Isochrysis galbana* (T-Iso) in Coastal Waters. *Journal of Coastal Research* 26 (1): 59-66

Reynolds CS (2006) *The Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press. ISBN-13 978-0-511-19094-0, 535pp

Tzovenis I, De Pauw N, Sorgeloos P (2003a) Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids. I. Effect of different light regimes on growth and biomass production. *Aquaculture* 216: 203–222

Tzovenis I, De Pauw N, Sorgeloos P (2003b) Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids: II. Effect of different light regimes on the production of fatty acids. *Aquaculture* 216: 223–242

Walne PR (1966) Experiments in the large-scale Culture of the larvae of *Ostrea edulis* L. *Fishery Invest., Lond., Ser II*, 25(4):1-53

Zar JH (1999) *Biostatistical Analysis*, 4th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, 662 pp., plus appendices.

4.2 Ελληνική βιβλιογραφία

Κλαδάς Ι (1998) Σημειώσεις στο Μάθημα της Υδροβιολογίας, Τμήμα Ιχθυοκομίας – Αλιείας ΤΕΙ Ηπείρου, Ηγουμενίτσα

Κλαδάς Ι (2012) Σημειώσεις Μαθήματος «Καλλιέργειες Πλαγκτού», Υδατοκαλλιεργειών & Αλιευτικής Διαχείρισης ΤΕΙ Μεσολογγίου (ημερομηνία πρόσβασης 24/5/2013)
https://eclass.teimes.gr/eclass/modules/document/file.php/IXTHAL160/%CE%942%CE%9C%CE%B1%CE%B6%CE%B9%CE%BA%CE%AE%20%CE%BA%CE%B1%CE%BB%CE%BB%CE%B9%CE%AD%CF%81%CE%B3%CE%B5%CE%B9%CE%B1%20%CE%BC%CE%B9%CE%BA%CF%81%CE%BF%CF%86%CF%85%CE%BA%CF%8E%CE%BD1_3.pdf

- Κλαδάς Ι (2014) Σημειώσεις Μαθήματος «Ενυδρεία», Τμήμα Τεχνολογίας Αλιείας & Υδατοκαλλιεργειών, ΤΕΙ Δυτικής Ελλάδας (ημερομηνία πρόσβασης 24/5/2013)
<https://openeclasse.teimes.gr/courses/YDAD106/>
- Τζοβενής Ι (2003) Πρωτόκολλο Μαζικής Καλλιέργειας Μικροφυκών. Σημειώσεις Εργαστηρίου Φυκοκαλλιεργειών. Τμήμα Ιχθυοκομίας – Αλιείας ΤΕΙ Ηπείρου, Ηγουμενίτσα Νοέμβριος 2003
- Τζοβενής Ι (2004) Εισαγωγή στην Φυκολογία. Σημειώσεις Μαθήματος Φυκοκαλλιέργειες. Τμήμα Ιχθυοκομίας – Αλιείας ΤΕΙ Ηπείρου, Ηγουμενίτσα
- Χώτος Γ, Ρογδάκης Ι (1992) "ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΥΡΥΑΛΩΝ ΨΑΡΙΩΝ". Λαβράκι-Τσιπούρα. Τεχνικές της αναπαραγωγής και πάχυνσης. Εκδόσεις ISBN 960-405-364-7.