

Πρόγραμμα: Απομόνωση και καλλιέργεια τοπικών ειδών φυτοπλαγκτού για διερεύνηση δυνατοτήτων παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών, λιπαρών οξέων, χρωστικών και αντιοξειδωτικών, (MIS 5048496)

Ακρωνύμιο: ALGAVISION (Επιστ. Υπεύθυνος, Παύλος Μακρίδης, αναπλ. καθηγητής)

Ειδικές Δράσεις «Υδατοκαλλιέργειες»

Σύμπραξη εργαστηρίων Παν. Πατρών:

1. Καλλιέργειας πλαγκτού (Τμ. Ζωικής Παραγωγής, Αλιείας & Υδατοκαλλιεργειών),
2. Ζωολογίας (Τμ. Βιολογίας),
3. Βιοχημικής Μηχανικής και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος (Τμ. Χημικών Μηχανικών).

Επιστημονικός Υπεύθυνος Τμ. Ζωικής Παραγωγής, Αλιείας & Υδατοκαλλιεργειών:
Γεώργιος Χώτος, καθηγητής

Ερευνητική ομάδα:

Γεώργιος Χώτος, καθηγητής

Δέσποινα Αβραμίδου, ΕΤΕΠ

Αθηνά Σαμαρά, ΕΤΕΠ

Ιωάννης Κλαδάς, καθηγητής

Παραδοτέο ενότητα εργασίας 1. Απομόνωση, ταυτοποίηση και καλλιέργεια τοπικών ειδών μικροφυκών- Εκθεση παρουσίας των απομονωθέντων ειδών φυτοπλαγκτού

Συντάκτης: Γεώργιος Χώτος, καθηγητής



Μεσολόγιο Νοέμβριος 2020

Διαδικασία απομόνωσης φυτοπλαγκτονικών ειδών - καθαρές καλλιέργειες

Η αναζήτηση φυτοπλαγκτονικών ειδών (καλουμένων εντεύθεν μικροφυκών) προς απομόνωση τοπικών ειδών (υπό την έννοια του χώρου της ευρύτερης περιοχής της Δυτικής Ελλάδας αλλά και ευρύτερα της Νοτίου Ελλάδας) γίνεται με περιοδικές συνεχείς επισκέψεις στους παράκτιους υδροβιότοπους που χαρακτηρίζονται ως λιμνοθαλάσσιοι. Στο κάθε μέρος και σε κατά περίπτωση διαφορετικά σημεία σε ικανές αποστάσεις από την ακτή λαμβάνονταν δείγματα νερού σε αποστειρωμένα δοχεία των 2 L τα οποία κατόπιν μέσα σε ισοθερμικό δοχείο μεταφέρονταν στο εργαστήριο Καλλιέργειας Πλαγκτού του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής, Αλιείας και Υδατοκαλλιεργειών του Πανεπιστημίου Πατρών στις εγκαταστάσεις του στο Μεσολόγγι.

Από τις μέχρι τώρα 25 δειγματοληψίες που έγιναν στις λιμνοθάλασσες Μεσολογγίου, Αιτωλικού, Κοτυχίου, Καλογριάς (Αραξος), Πάππας (Αχαΐας), Γιάλοβας (Πύλος), Καϊάφα (Ζαχάρω), Αιγίου, Κουμουνδούρου (Αττική) και στις λεκάνες των αλυκών Μεσολογγίου (Ασπρης και Τουρλίδας) προέκυψαν είδη μικροφυκών τα οποία απομονώθηκαν, καλλιεργήθηκαν και διατηρούνται συνεχώς στο εργαστήριο σε συνήθεις συνθήκες (θερμοκρασία ~21 °C, λατότητα 35-40 ppt, φωτισμός ~5000 lux) ένδειξη ότι μπορούν να προσαρμοστούν στις τοπικές συνθήκες και να είναι διαθέσιμα για εμπορική εκμετάλλευση αν αποδώσουν χρήσιμα προϊόντα.

Η απομόνωση κάποιου είδους μικροφύκου από ένα δείγμα νερού είναι μια επίπονη διαδικασία η οποία απαιτεί ποικίλο χρόνο της τάξεως των εβδομάδων για να καταλήξει σε μονοειδική καλλιέργεια. Πρώτο βήμα αποτελεί η προκαλλιέργεια του δείγματος νερού που λήφθηκε από τον υδροβιότοπο. Η φάση αυτή είναι ουσιαστική διότι αφενός μετά από καιρό θα δείξει αν το δείγμα περιέχει μικροφύκη και αφετέρου αν υπάρχουν μικροφύκη που μπορούν να καλλιεργηθούν. Επιπλέον έχει και πιθανά άμεσα, διευκολυντικά της απομονωτικής διαδικασίας οφέλη, καθώς ενδέχεται προϊόντος του χρόνου να επικρατήσουν στο δοχείο ένα ή και λίγα ακόμη είδη τα οποία κατόπιν πιο εύκολα διαχωρίζονται σε μονοειδικές καλλιέργειες. Ετσι λοιπόν το αρχικό δείγμα τοποθετούνταν σε γυάλινα κυλινδρικών δοχεία τύπου Erlenmeyer του 1 L, τους παρείχετο συνεχής αερισμός από το γενικό σύστημα της αεραντλίας (Σχήμα 1) η οποία διοχετεύει φιλτραρισμένο (φίλτρο 0,45 μm) αέρα στα δοχεία μέσω πλαστικών σωλήνων που καταλήγουν σε γυάλινη πιπέτα των 2 ml (Σχήμα 3B&C). Ο φωτισμός μετρημένος στην επιφάνεια του δοχείου καλλιέργειας ήταν περί τα 5000 lux προερχόμενος από συστοιχίες λαμπτήρων LED. Η αλατότητα στην αρχική φάση της προκαλλιέργειας ήταν αυτή του νερού του συλλεχθέντος δείγματος και ανάλογα με τον υδροβιότοπο από τον οποίο προήλθε, κυμαίνονταν σε 10-40 ppt για τα λιμνοθαλάσσια δείγματα και 60-120 ppt για αυτά που προήλθαν από τις αλυκές.

Το νερό των προκαλλιεργειών λιπαίνονται κατάλληλα με όλα τα απαραίτητα ανόργανα λιπαντικά στοιχεία (μέταλλα, ιχνοστοιχεία, βιταμίνες) βάσει της παρακάτω τυποποιημένης σύνθεσης η οποία ονομάζεται "τροποποιημένη Walne-1966". Το θρεπτικό μέσο Walne έχει την παρακάτω σύνθεση.

ΜΕΤΑΛΛΙΚΑ ΑΛΑΤΑ

NaNO₃ : 300 g
 KH₂PO₄ : 30 g Διαλύονται σε 1 L αποσταγμένου νερού
 NH₄Cl : 20 g

Τοποθετείται για 30 λεπτά σε αυτόκαυστο (Σχήμα 2Α) στους 120 °C.

Το διάλυμα διατηρείται στη θερμοκρασία περιβάλλοντος, και είναι το πρώτο διάλυμα που χρησιμοποιούμε για τη λίπανση του νερού.

ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ

Βασικά διαλύματα:

Διάλυμα Α

ZnSO₄·H₂O : 30 g
 CuSO₄·5H₂O: 25 g Διαλύονται σε 1 L αποσταγμένου νερού.
 CoSO₄·7H₂O: 30 g
 MnSO₄·H₂O : 20 g

Διάλυμα Β FeCl₃·6H₂O : 50 g Διάλυση σε 1 L αποσταγμένου νερού.

Διάλυμα Γ Na₂MoO₄·2H₂O : 25 g Διάλυση σε 1 L αποσταγμένου νερού.

Διάλυμα Δ Na₂EDTA·2H₂O : 50 g Διάλυση σε 1 L αποσταγμένου νερού.

Τοποθετούνται για 30 λεπτά σε αυτόκαυστο στους 120 °C.

Διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Τελικό διάλυμα

Διάλυμα Δ : 100 ml από το βασικό διάλυμα
 Διάλυμα Α : 10 ml " " " "
 Διάλυμα Β : 10 ml " " " "
 Διάλυμα Γ : 10 ml " " " "

Προσθήκη 800 ml αποσταγμένου νερού.

Τοποθετούνται σε αυτόκαυστο για 30 λεπτά στους 120 °C.

Διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

Αυτό είναι το δεύτερο διάλυμα που χρησιμοποιούμε για τη λίπανση του νερού.

ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ

Βασικά διαλύματα:

B₁₂ : 100 mg σε 1 L αποσταγμένου νερού
 Βιοτίνη : 100 mg σε 1 L αποσταγμένου νερού
 Θειαμίνη : 10 mg σε 1 L αποσταγμένου νερού

Τα διαλύματα των βιταμινών δεν τοποθετούνται σε αυτόκαυστο διότι καταστρέφονται. Επίσης επειδή είναι φωτοευαίσθητα τοποθετούνται σε σκουρόχρωμες φιάλες. Διατηρούνται σε ψυγείο.

Τελικό διάλυμα

B₁₂ : 10 ml από το βασικό διάλυμα
 Βιοτίνη : 10 ml από το βασικό διάλυμα

Θειαμίνη: 10 ml από το βασικό διάλυμα

Διαλύονται σε 1 L αποσταγμένου νερού

Διατηρείται σε ψυγείο, και είναι το τρίτο διάλυμα που χρησιμοποιούμε για τη λίπανση του νερού.

Για τη λίπανση του θαλασσινού νερού προσθέτουμε 1 ml από κάθε ένα από τα τρία διαλύματα για κάθε 1 L θαλασσινού νερού.

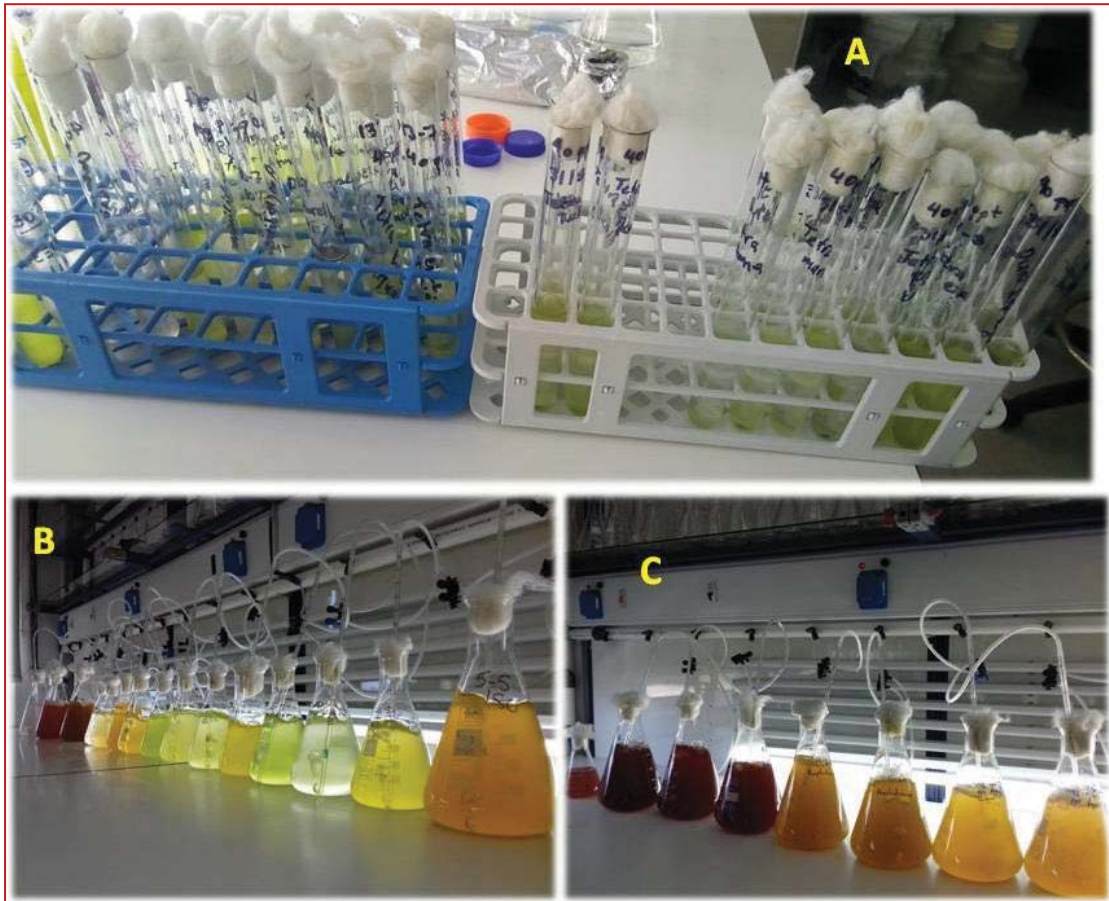
Τα αποθέματα του προς χρήση αλμυρού νερού (ποικίλων αλατοτήτων) που έχει αποστειρωθεί και λιπανθεί κατά τα παραπάνω διατηρούνται σε διάφανα δοχεία Nalgene σε ειδικό ράφι (Σχήμα 2B) και η απαιτούμενη κάθε φορά ποσότητα λαμβάνεται μέσω της κάνουλας των δοχείων.



Σχήμα 1. Η είσοδος στο δωμάτιο καλλιέργειας των μικροφυκών του σωλήνα παροχής αέρα από την εξωτερικώς ευρισκόμενη αεραντλία και η μέσω φίλτρου (0,45 μm, δείχνεται με το βέλος) διοχέτευσή του με τις κατάλληλες διακλαδώσεις στις διάφορες γραμμές παροχής αέρα στα δοχεία καλλιέργειας (δεν φαίνονται εδώ).



Σχήμα 2. Η συσκευή του αυτόκαυστου (A) και τα 12 L χωρητικότητας δοχεία Nalgene με το αποστειρωμένο και λιπασμένο αλμυρό νερό διαφόρων αλατοτήτων.



Σχήμα 3. Δοκιμαστικοί σωλήνες με νερό εμβολιασμένο με νερό που περιέχει φυτοπλαγκτόν (A) και διάφορες φάσεις ωρίμανσης φυτοπλαγκτονικών καλλιεργειών (B & C) σε δοχεία Erlenmeyer στα οποία φαίνονται οι σωληνώσεις παροχής αέρα μέσω πιπέτας του 1 ml.

Τα δοχεία με το λιπασμένο νερό υπό συνεχή φωτισμό και αερισμό στην αλατότητα του αρχικού δείγματος, η οποία (αλατότητα) ελέγχονταν και επαναφέρονταν στην αρχική με πρόσθεση κατάλληλης ποσότητας αποστειρωμένου και λιπασμένου αποσταγμένου νερού, αφήνονταν για αρκετό διάστημα (τουλάχιστον 2 εβδομάδες) για να αναπτυχθεί ο όποιος φυτοπλαγκτονικός πληθυσμός ήταν δυνατόν να αναπτυχθεί αλλά συνάμα (και χωρίς αυτό να μπορεί να αποφευχθεί) και διάφορα μικροσκοπικά βλεφαριδωτά (κυρίως) πρωτόζωα. Μεγαλύτεροι ζωικοί πλαγκτονικοί οργανισμοί (κωπήποδα, τροχόζωα, λάρβες μαλακίων) είχαν κατά τη φάση της προετοιμασίας των δειγμάτων αφαιρεθεί μέσω της φίλτρανσης του νερού με πλαγκτονικό δίχτυ με μάτι 50 μm . Σκοπός του εγχειρήματος ήταν να διαπιστωθεί άνθηση του φυτοπλαγκτού και τα όποια πρωτόζωα αναπτύσσονταν με αυτό θα αντιμετώπιζονταν (απομακρύνονταν) αργότερα.

Στα περισσότερα δείγματα νερού που υπέστησαν αυτή τη διαδικασία παρατηρήθηκε εμφανής αύξηση μικροφυκών μετά από ποικίλη διάρκεια καλλιέργειας. Σε άλλα η αύξηση ήταν εμφανής μετά από λίγες ημέρες σε άλλα μετά από εβδομάδες. Ορισμένα δεν παρουσίασαν καμιά αύξηση και απορρίφθηκαν. Στα δοχεία που άρχισαν να δείχνουν αύξηση φυτοπλαγκτού δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή και δείγματα εξ' αυτών λαμβάνονταν σχεδόν καθημερινώς και εξετάζονταν μικροσκοπικώς για να διαπιστωθεί το είδος των κυττάρων (ευκαρυωτικά ή

κυανοβακτήρια), ο τύπος των κυττάρων (μονήρη, νηματοειδή ή αποικίες), η κινητικότητα των κυττάρων (μαστιγιοφόρα ή σφαιροειδή) και μια γενική εκτίμηση για τον αριθμό των διαφορετικών ειδών. Προϊόντος του χρόνου αυτό που παρατηρήθηκε ως πρότυπο ήταν η μετά από καιρό επικράτηση (μεγαλύτερη ή μικρότερη) ενός, ή δύο και σπανιότερα 3 ειδών μικροφυκών στις καλλιέργειες. Σε αυτά τα είδη στρέψαμε την προσοχή μας και αυτά επιχειρήσαμε κατόπιν να απομονώσουμε.

Από τις καλλιέργειες που έδειξαν παρουσία μικροφυκών που αναπτύσσονται έγιναν δύο πράγματα:

1. Ανακαλλιέργεια σε καινούργια δοχεία με αποστειρωμένο (σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 30 min στα 2 bar) θαλασσινό νερό αλατότητας 40 ppt.
2. Διαδικασία απομόνωσης μικροφύκους με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων και με τη μέθοδο της επάλειψης σε τριβλία petri με εμπλουτισμένο άγαρ σε θρεπτικά και σε αλατότητα 40 ppt (Σχήματα 4, 5, 6 & 7).

Η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων συνοπτικώς είναι η εξής:

Ένα δείγμα νερού από τη φύση (γλυκό ή θαλασσινό) περιέχει πολλά είδη μικροφυκών. Αν ένα τέτοιο δείγμα το καλλιεργήσουμε σε λιπασμένο νερό σε καλές συνθήκες φωτισμού και θερμοκρασίας, μετά από λίγο καιρό τα μικροφύκη θα έχουν πολλαπλασιασθεί αλλά θα συνυπάρχουν πολλά είδη μαζί.

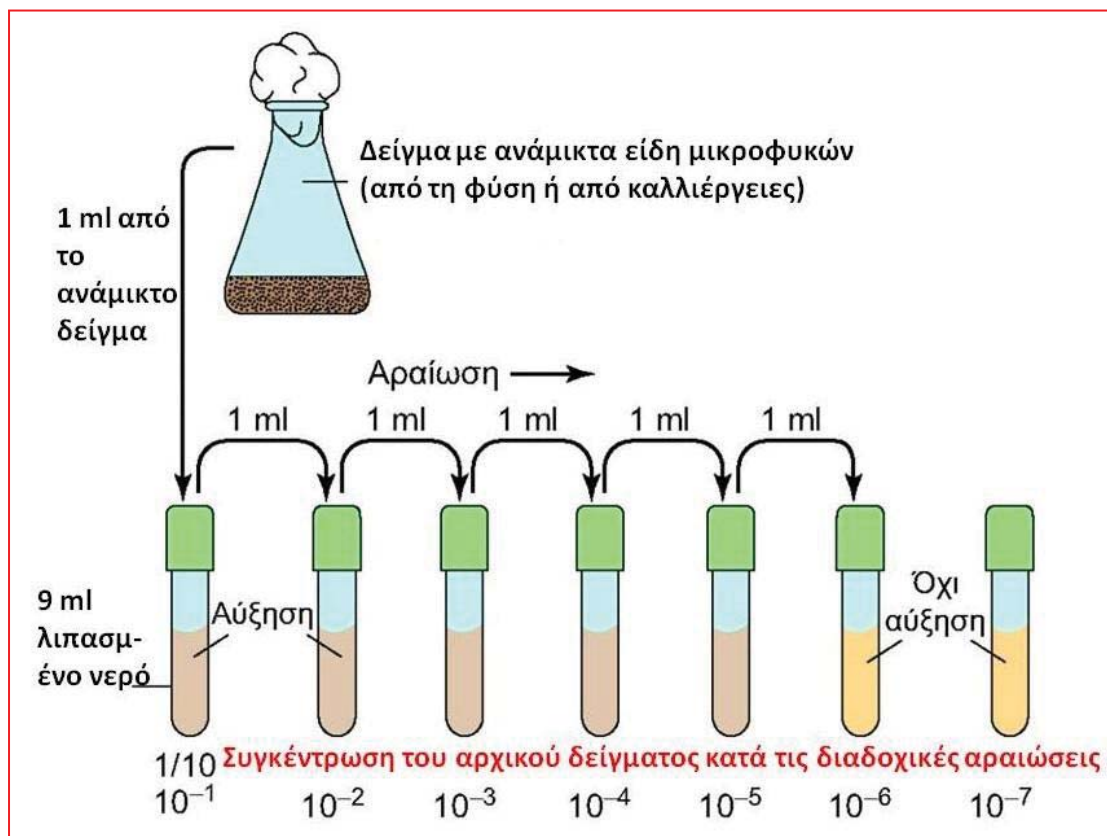
Όταν επιχειρούμε να απομονώσουμε ένα συγκεκριμένο είδος μικροφύκους από το μείγμα αυτό των ειδών, ή όταν επιχειρούμε να απομονώσουμε τυχαία μερικά από αυτά τα είδη σε μονοειδικές (καθαρές) καλλιέργειες, τότε ακολουθείται η τεχνική των διαδοχικών αραιώσεων και της ακόλουθης επώασης των αραιωμάτων.

Επειδή θα χρειαστούν αρκετά δοχεία, προτιμούμε δοκιμαστικούς σωλήνες έτσι ώστε σε καθένα από αυτούς να υπάρχουν 9 ml καθαρό λιπασμένο νερό και 1 ml εμβολίασμα. Τους βάζουμε στη σειρά. Ο πρώτος σωλήνας θα λάβει 1ml από το ανάμικτο αρχικό δείγμα (αραίωση 1/10). Από αυτόν το σωλήνα θα λάβουμε 1 ml και θα εμβολιάσουμε τον επόμενο σωλήνα (αραίωση 1/100) κ.ο.κ. Όσο περισσότερες φορές το κάνουμε τόσο αυξάνονται οι πιθανότητες να βρούμε στους σωλήνες με μεγάλη αραιώση μόνο ένα είδος μικροφύκους.

Φυσικά η ανεύρεση της μονοειδικής καλλιέργειας δεν θα γίνει άμεσα αλλά κατόπιν παρέλευσης αρκετών ημερών (~15-20) αφού οι σωλήνες έχουν τοποθετηθεί σε κατάλληλο μέρος με καλές συνθήκες φωτισμού και θερμοκρασίας (>1500 lux, ~ 20 °C) και τα μικροφύκη έχουν πλέον πολλαπλασιασθεί σε αυτούς.

Η μέθοδος αυτή βασίζεται καθαρά στις πιθανότητες και γίνεται σε υγρό μέσο. Λαμβάνοντας μια μικροποσότητα νερού από το δείγμα του μείγματος και επειδή ακριβώς έχουμε διαδοχικά αραιώσει αυτό το δείγμα πολλές φορές (εννοείται με νερό χωρίς φύκη), η μικροποσότητα που λάβαμε από τα αραιωμένα δείγματα κατόπιν ενδέχεται να περιέχει μόνο ένα είδος μικροφύκους.

Αντίστοιχη με την παραπάνω τεχνική απομόνωσης η καλλιέργεια σε άγαρ χρησιμοποιείται κυρίως για την απομόνωση και καλλιέργεια (επώαση) μονοειδικών αποικιών μικροφυκών και αποτελεί μια πιο βολική (μάλλον) εκδοχή της αντίστοιχης με υγρό μέσο. Κατ' αυτή κάνουμε επάλειψη μιας μικρής ποσότητας νερού που περιέχει μικροφύκη σε στερεοποιημένο σε τριβλία λιπασμένο άγαρ, το τοποθετούμε σε φωτιζόμενο θάλαμο και περιμένουμε να δούμε στο μέλλον αν αναπτύχθηκαν αποικίες μικροφυκών.



Σχήμα 4. Η διαδικασία απομόνωσης μικροφυκών από μείγμα ειδών με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων.

Η μέθοδος της απάλειψης σε άγαρ (Σχήματα 5, 6 & 7) συνοπτικώς είναι η εξής:

Η ανάπτυξη των φυκών χρειάζεται ενέργεια και ενώσεις απαραίτητες για την σύνθεση των κυτταρικών τους δομών. Τα στοιχεία που απαρτίζουν αυτές τις ενώσεις πρωτίστως άνθρακας, υδρογόνο, οξυγόνο, άζωτο, θείο, φωσφόρος και άλλα σε μικρότερες ποσότητες (ιχνοστοιχεία) αποτελούν το θρεπτικό τους μέσο. Τα κύτταρα των φυκών προσλαμβάνουν αυτά τα θρεπτικά και μεταφέροντάς τα δια μέσω των κυτταρικών τους μεμβρανών στο εσωτερικό του κυττάρου τα μετατρέπουν με ενζυμικές αντιδράσεις στις κατάλληλες ενώσεις για την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό τους.

Η καλλιέργεια των φυκών γίνεται είτε σε υγρό μέσο (νερό) είτε σε στερεό-πηκτωματικό. Η καλλιέργεια σε στερεό μέσο είναι ένας πολύ πρακτικός τρόπος καλλιέργειας όταν πρόκειται για δημιουργία καθαρών καλλιεργειών από τις οποίες κατόπιν θα ξεκινήσουν οι μαζικές καλλιέργειες σε νερό. Το στερεό μέσο καλλιέργειας παρασκευάζεται με την προσθήκη άγαρ σε ένα υγρό που έχει λιπανθεί με τα απαραίτητα θρεπτικά έτσι που το δημιουργούμενο υλικό να αποτελέσει θρεπτικό μέσο για τα φύκη.

Το άγαρ είναι ένας πολυσακχαρίτης που παράγεται από ροδοφύκη και παρουσιάζει το πλεονέκτημα να ρευστοποιείται μόνο σε θερμοκρασίες άνω των 45°C ενώ παραμένει στερεό (πήκτωμα) σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Το θρεπτικό μέσο (που συνοπτικώς καλείται άγαρ) στρώνεται σε τριβλία Petri.

Η καλλιέργεια των φυκών σε άγαρ δεν γίνεται για να πάρουμε μάζα φυκών αλλά για να δημιουργήσουμε και διατηρήσουμε καθαρές καλλιέργειες μικροφυκών

για μετέπειτα επέκταση αυτών στη διαδικασία της μαζικής καλλιέργειας σε νερό.

Με τη μέθοδο του άγαρ επιδιώκεται και η απομόνωση ειδών φυκών από μείγμα αυτών. Οι αποικίες των φυκών που θα αναπτυχθούν στο άγαρ επιθυμούμε να προέρχονται από ένα κύτταρο (δηλαδή μονοειδική αποικία) και για αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται τεχνικές διασποράς του αρχικού δείγματος επάνω στο θρεπτικό μέσο-άγαρ.

Όργανα και υλικά

- Λύχνος Bunsen
- Ανεξίτηλος μαρκαδόρος για το σημάδεμα
- Ηλεκτρονικός ζυγός
- Αλουμινόχαρτο
- Ποτήρι ζέσεως των 1000 ml
- Θαλασσινό νερό 1000 ml
- Ποτήρι ζέσεως των 50 ml
- Άγαρ σε σκόνη 15 g
- Αποστειρωμένα τριβλία petri
- Θρεπτικό υγρό υλικό Walne (1ml /L νερού)
- Βιταμίνες (βιοτίνη, θειαμίνη, B12)
- Σπάτουλα
- Αναπτήρας
- Γυάλινη ράβδος
- Σύρμα εμβολιασμού (λούπα ενοφθαλμισμού)
- Παραφίλμ
- Σαπούνι για τα χέρια

Προετοιμασία του χώρου

Η επιφάνεια εργασίας καθαρίζεται και απολυμαίνεται με χαρτί κουζίνας και οινόπνευμα. Ο λύχνος Bunsen παραμένει αναμμένος καθ' όλη τη διάρκεια των εργασιών προκειμένου να διευκολύνεται η δημιουργία μικρο-περιβάλλοντος ασηψίας.

Παρασκευή θρεπτικού υλικού

Σε κωνική φιάλη των 1000 ml ζεσταίνουμε 1000 ml αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και λίγο πριν αρχίσει να βράζει διαλύουμε 15 g άγαρ σιγά σιγά. Στη συνέχεια προσθέτουμε 1 ml θρεπτικό υλικό Walne. Αφήνουμε το διάλυμα να βράσει για 10 λεπτά ώστε να αποστειρωθεί. Κατεβάζουμε από τη φωτιά και καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο το στόμιο της κωνικής φιάλης.

ΠΡΟΣΟΧΗ. Κατά το βρασμό το διάλυμα φουσκώνει απότομα και μπορεί να ξεχειλίσει. Όταν κρυώσει (μετά περίπου 1,5 ώρα) και πριν στερεοποιηθεί προσθέτουμε τις βιταμίνες (όχι όταν είναι πολύ ζεστό επειδή καταστρέφονται με τη θέρμανση) σε δοσολογία 1 ml τελικού διαλύματος βιταμινών / L νερού (η παρασκευή του τελικού διαλύματος βιταμινών δίδεται παραπάνω).

Προετοιμασία των τριβλίων Petri

Τα τριβλία Petri σημαδεύονται κατάλληλα στη βάση τους (π.χ. είδος φύκος, όνομα ερευνητή, κ.λπ.) με ανεξίτηλο μαρκαδόρο. Μόλις κρυώσει λίγο το θρεπτικό υλικό και αρχίσει να στερεοποιείται (θερμοκρασία 45–50 °C) μεταφέρουμε προσεκτικά το θρεπτικό υλικό-άγαρ στα πλαστικά προ-αποστειρωμένα τριβλία Petri. Χύνουμε τόσο όσο να στρωθεί υλικό μέχρι το μέσο ύψος περίπου του τριβλίου. Κλείνουμε τα τριβλία και αφήνουμε το υλικό να κρυώσει.

Εμβολιασμός

Αφού κρυώσουν αρκετά τα τριβλία Petri, κάνουμε τις εξής ενέργειες (Σχήματα 5&6):

Με τη ράβδο-βρόγχο ενοφθαλμισμού αφού πρώτα την πυρακτώσουμε στη φλόγα και την ψύξουμε στο άγαρ, και αφού περάσουμε πάνω από τη φλόγα και το στόμιο του σωλήνα που περιέχει το δείγμα μικροφυκών, με απλή επαφή βυθίζουμε το βρόγχο στο δείγμα του φύκου και κατόπιν το υγρασμένο άκρο του το περνάμε με κατάλληλη κίνηση στην επιφάνεια του άγαρ στο τριβλίο. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε εμβολιασμό στα τριβλία.

Επάωση

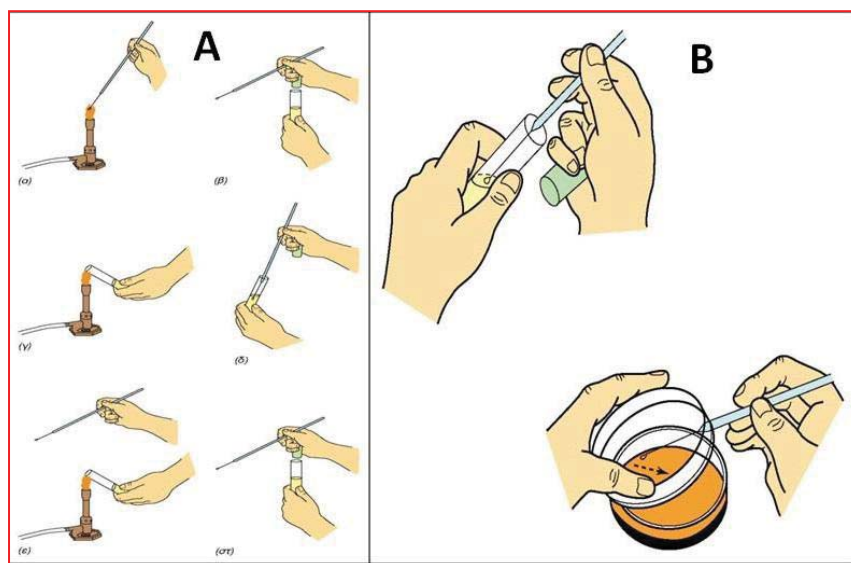
Το κάθε εμβολιασμένο τριβλίο το καλύπτουμε με το καπάκι του το οποίο κατόπιν ασφαλίζουμε περιφερειακά με φύλλο παραφίλμ και το τοποθετούμε στο θάλαμο-επωαστήρα σταθερής θερμοκρασίας 20 °C και με φωτισμό 1000-1500 lux. Για να διασφαλίσουμε το άγαρ από το να χάσει υγρασία λόγω εξάτμισης τοποθετούμε το τριβλίο αναποδογυρισμένο με το κάλυμμά του να βρίσκεται στη βάση.

Αποτελέσματα

Μετά από παρατηρήσεις που κάνουμε καθημερινώς αναμένεται σε 5-20 ημέρες να εμφανιστούν αποικίες μικροφυκών στο άγαρ (Σχήμα 8). Οι αποικίες ποικίλουν ως προς την πυκνότητά τους ανάλογα με την ποσότητα του δείγματος που είχε απλωθεί-εμβολιαστεί αρχικά.

Από τις αποικίες αυτές λαμβάνουμε μικρό δείγμα και το εξετάζουμε στο μικροσκόπιο για να διαπιστώσουμε αν υπάρχει μονοειδικότητα (δηλαδή ένα μόνο είδος μικροφύκων). Ανάλογα με τις παρατηρήσεις μας μπορούμε να κρίνουμε αν θα κάνουμε επέκταση της καλλιέργειας. Η επέκταση γίνεται με την μικροποσότητα που λαμβάνουμε από την αποικία του άγαρ την οποία τοποθετούμε σε δοκιμαστικό σωλήνα με κατάλληλα λιπασμένο νερό. Ο σωλήνας αυτός τοποθετείται κατόπιν στις κατάλληλες συνθήκες φωτισμού και θερμοκρασίας για να πολλαπλασιαστούν τα κύτταρα.

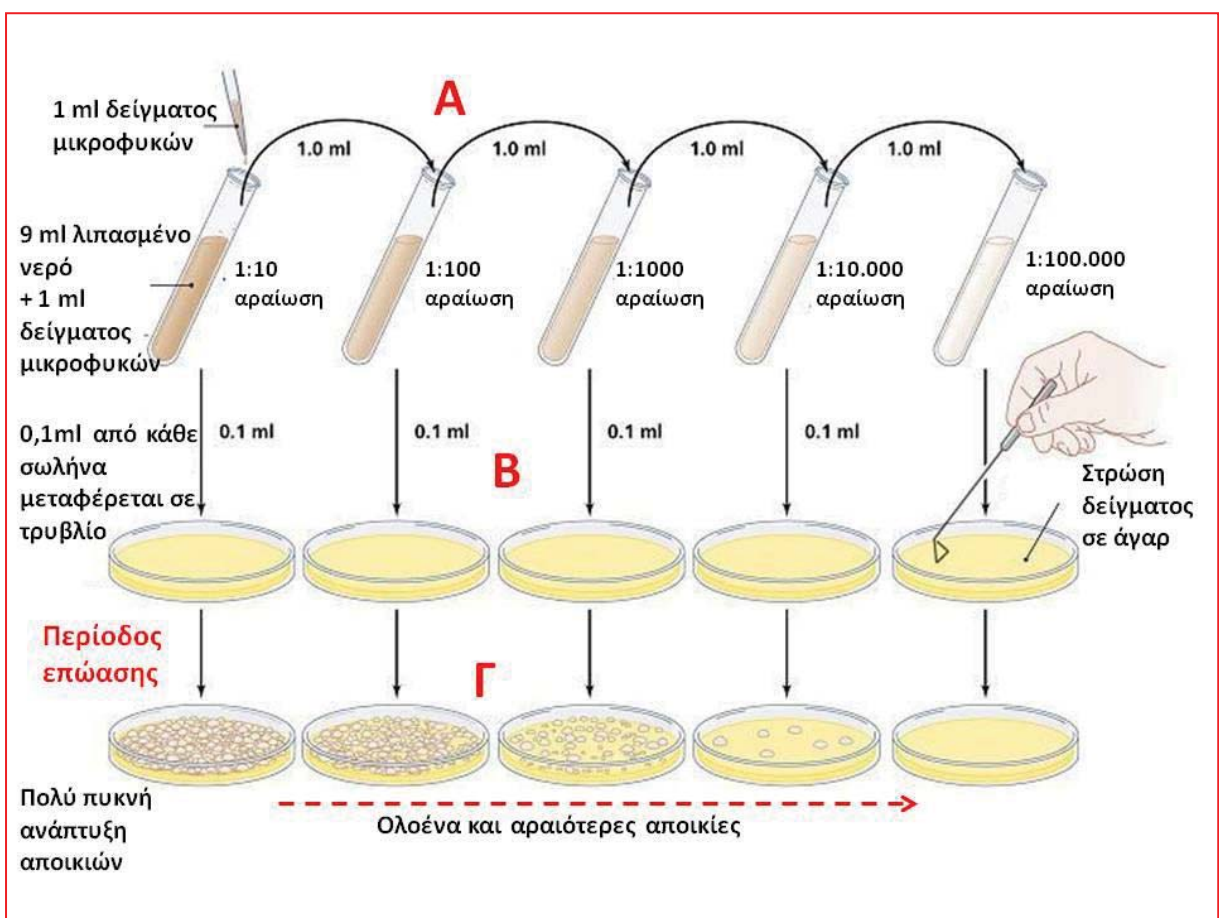
Σημείωση: Κατά τη διαδικασία της επάωσης πιθανόν να δημιουργηθούν και αποικίες από μύκητες. Οι μυκητιακές αποικίες διακρίνονται από αυτές των φυκών από την παρουσία υφών (μυκητιακών νημάτων) στις αποικίες των μυκήτων.



Σχήμα 5. Τρόπος αποστείρωσης της ράβδου ενοφθαλμισμού (A) και λήψης δείγματος για επάλειψη στο άγαρ του τριβλίου (B).



Σχήμα 6. Τρόποι απλώματος του εμβολιάσματος στο άγαρ.



Σχήμα 7. Συνδυασμός της μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων (Α) και παράλληλος εμβολιασμός σε τριβλία με άγαρ (Β).

Ανακεφαλαιώνοντας, η όλη πορεία από τη φάση της απομόνωσης μέχρι τις καθαρές καλλιέργειες συνίσταται συνοπτικώς στα παρακάτω:

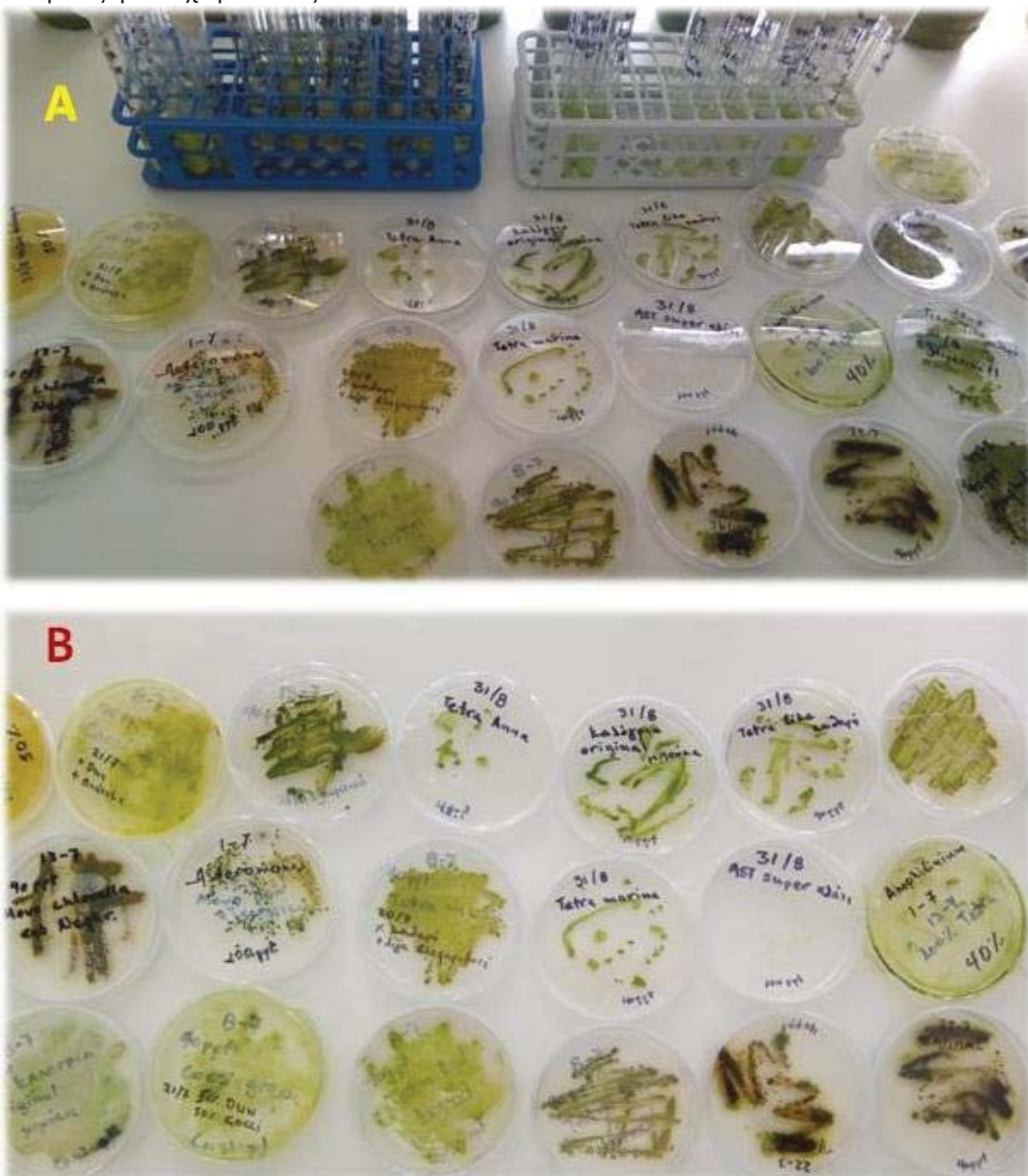
1. Δημιουργία αποθεμάτων αποστειρωμένου και λιπασμένου θαλασσινού νερού που τοποθετούνταν σε δοχεία των 12 L τύπου Nalgene με κάνουλα.
2. Πραγματοποίηση ανάπτυξης αποικιών μικροφυκών σε άγαρ και διαδοχικές αραιώσεις σε δοκιμαστικούς σωλήνες με αποστειρωμένο λιπασμένο θαλασσινό νερό του αρχικού δείγματος νερού. Τα τριβλία με το άγαρ και οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνταν για

ωρίμανση σε ειδικό (Σχήμα 9A) θερμορρυθμιζόμενο και φωτιζόμενο θάλαμο (20 °C, 2000 lux).

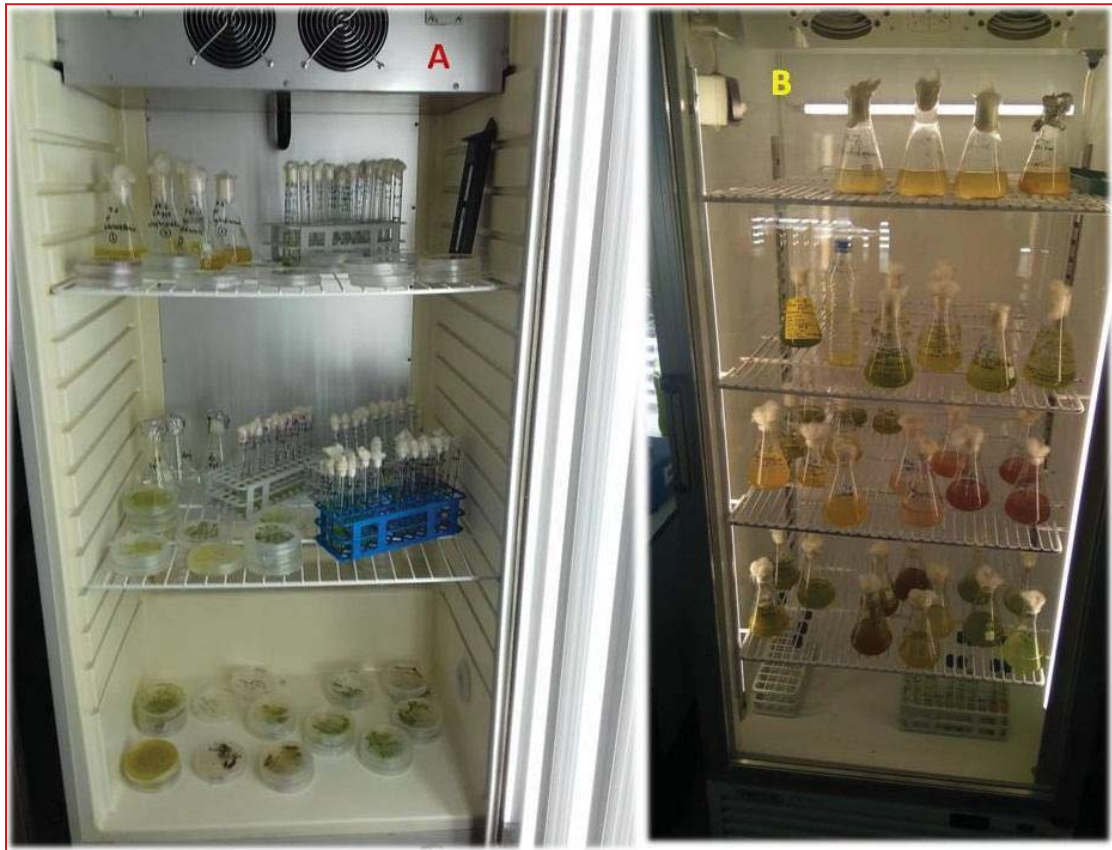
3. Μετά την ανάπτυξη αποικιών στα τριβλία με το άγαρ λαμβάνονταν και από εκεί δείγματα και τοποθετούνταν σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες για διαδοχικές αραιώσεις.

4. Από τους δοκιμαστικούς σωλήνες που έδειξαν κατόπιν μικροσκοπικού ελέγχου ότι περιείχαν μονοειδικές καλλιέργειες έγινε μετάγγιση σε δοχεία Erlenmeyer των 250 ml με λιπασμένο θαλασσινό νερό και τοποθετήθηκαν σε άλλο ειδικό (Σχήμα 9B) θερμορρυθμιζόμενο και φωτιζόμενο θάλαμο (20 °C, 2000 lux) χωρίς να λαμβάνουν αερισμό.

5. Από τα δοχεία Erlenmeyer των 250 ml που παρουσίασαν αύξηση της καλλιέργειας έγινε μετάγγιση σε μεγαλύτερα δοχεία Erlenmeyer των 500 και 1000 ml με λιπασμένο αποστειρωμένο θαλασσινό νερό τα οποία λάμβαναν αερισμό και φωτιζόνταν από συστοιχίες λαμπτήρων led με ένταση ~5000 lux στην επιφάνεια του δοχείου μέσα σε κλιματιζόμενο χώρο στους 21 °C.



Σχήμα 8. Διάφορα τριβλία με άγαρ και εμφανή ανάπτυξη αποικιών μικροφυκών.



Σχήμα 9. Οι θερμορυθμιζόμενοι και φωτιζόμενοι θάλαμοι διατήρησης καλλιεργειών μικροφυκών. Στο A ο θάλαμος όπου αναπτύσσονται οι καλλιέργειες στο άγαρ και στους δοκιμαστικούς σωλήνες. Στο B ο θάλαμος όπου γίνονται οι πρώτες αναπτύξεις των μονοειδικών καλλιεργειών.

Ιδιαίτερη μνεία πρέπει να γίνει εδώ για τη μέθοδο με την οποία διευκολύνθηκε τα μέγιστα η απομόνωση των νηματοειδών κυανοβακτηρίων και ιδιαίτερα του *Phormidium* sp. από το μέσον που περιείχε και μονοκύτταρα ευκαρυωτικά φύκη πολύ μικρού μεγέθους (π.χ. *Chlorella* sp., ~ 5 μm) ή μεγαλύτερα (π.χ. *Tetraselmis* sp., ~10-18 μm). Η διαδικασία απομόνωσης του *Phormidium* το οποίο αναπτύσσεται σε πυκνές μάζες περιπλεγμένων νηματίων έγκειται στη διήθηση του νερού που το περιέχει μαζί με άλλα πρώτιστα σε πλαγκτονικό δίκτυο με διάμετρο πόρων ~100 μm (Σχήμα 21). Οι πόροι αυτοί είναι πολύ μεγάλοι και μέσω αυτών περνούν με το νερό και απορρίπτονται ευκαρυωτικά μονοκύτταρα μικροφύκη και βλεφαριδωτά πρωτόζωα (π.χ. *Euplotes* sp., *Aspidisca* sp., *Strobidium* sp., κ.ά.). Το *Phormidium* όμως συγκρατείται στο δίκτυο υπό μορφή πυκνής μάζας και ακολούθως το δίκτυο ξεπλένεται με καθαρό νερό σε αποστειρωμένη φιάλη και η μάζα του *Phormidium* μπορεί κατόπιν να καλλιεργηθεί ως μονοειδική καλλιέργεια.

Στο ίδιο πλαίσιο της διαδικασίας διαχωρισμού των μικροφυκών (σε μείγμα ειδών στο νερό) σε κυανοβακτήρια μόνο ή σε ευκαρυωτικά κύτταρα μόνο εντάσσεται και η χρήση των παρακάτω χημικών ουσιών.

1. Αντιβιοτικά, ερυθρομυκίνη, οξυτετρακυκλίνη σε καθαρή χημική συσκευασία και αμοξίλ σε εμπορικό σκεύασμα καψουλών. Με τα αντιβιοτικά αυτά που προστίθενται είτε μόνα τους είτε ανάμικτα (κατά διάφορους συνδυασμούς) στο νερό σε ποσότητες περί τα 50-100 mg/L επιτυγχάνεται η βαθμιαία εξαφάνιση των κυανοβακτηρίων με αποτέλεσμα στο νερό να παραμένουν μόνο τα ευκαρυωτικά μικροφύκη.
2. Κυκλοεξαμίδιο (cycloheximide). Πρόκειται για μια χημική ένωση που εμποδίζει το σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου με αποτέλεσμα την αποτυχία της κυτταρικής μιτωτικής διαίρεσης στα ευκαρυωτικά μικροφύκη (και γενικά στα πρώτιστα και στους μύκητες). Στα κυανοβακτήρια δεν υφίσταται μιτωτική διαίρεση οπότε η παρουσία κυκλοεξαμιδίου στο νερό τους είναι αδιάφορη. Χρησιμοποιώντας περιοδικώς (κάθε 3-5 ημέρες) ~2 ml/L βασικού διαλύματος κυκλοεξαμιδίου συγκέντρωσης 0,5 mg/ml στις προς "θεραπεία" καλλιέργειες παρατηρείται σταδιακή μείωση του αριθμού των ευκαρυωτικών μικροφυκών μέχρι τελικής εξαφάνισής τους και παραμένουν μόνο τα κυανοβακτήρια.
3. Διοξείδιο του γερμανίου (Germanium dioxide-GeO₂). Η δράση του συνίσταται στην αναστολή της αύξησης των διατόμων διακόπτοντας τον μεταβολισμό του βασικού τους συστατικού που είναι το πυρίτιο. Δόσεις 1ml/L (βασικού διαλύματος - 0,9 g GeO₂ σε 200 ml αποσταγμένου νερού) επιφέρουν σαφή μείωση των αριθμού των κυττάρων των διατόμων σε μία περίπου εβδομάδα και αργότερα πλήρη εξαφάνισή τους από τις καλλιέργειες των άλλων φυκών στις οποίες μπορούν να εμφανιστούν και να τις κατακλύσουν.

Απομονωθέντα είδη φυτοπλαγκτού

Από όλες τις καλλιέργειες των διαφόρων ειδών φυτοπλαγκτού που συλλέχθηκαν στη φύση, αυτές που σταθεροποιήθηκαν στις συνθήκες του εργαστηρίου και διατηρούνται ανανεούμενες συνεχώς σε σφριγηλή κατάσταση είναι αυτές που τις αποτελούν τα παρακάτω είδη.

***Amphidinium* sp.**



Συστηματική κατάταξη

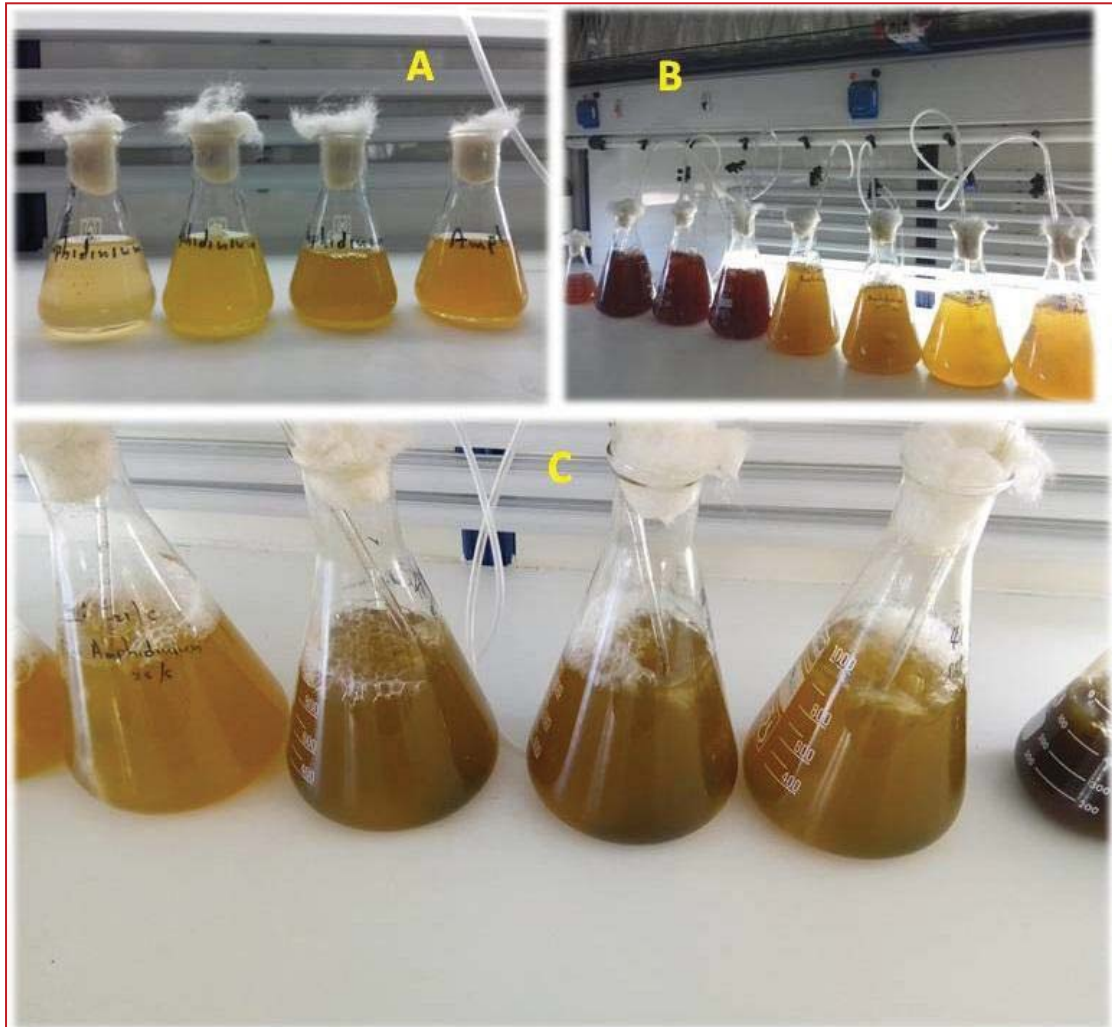
Υπερβασίλειο:	Ευκαρυωτικά
Βασίλειο:	Πρώτιστα
Φύλο:	Δινομαστιγωτά (Dinoflagellata)
Ομοταξία:	Dinophyceae
Τάξη:	Gymnodiniales
Οικογένεια:	Gymnodiniaceae
Γένος:	<i>Amphidinium</i>
Είδος:	<i>Amphidinium</i> sp.

Πλαγκτονικό είδος με μονήρη κύτταρα με ποικιλία μεγεθών που κυμαίνεται στα $11,93 \pm 1,3$ (sd) μm κατά τον επιμήκη άξονα και $8,64 \pm 0,92$ (sd) μm κατά το πλάτος. Κινητικά με χαρακτηριστική κίνηση ευθύγραμμου τύπου και συχνή απότομη αλλαγή κατεύθυνσης, Δεν στροβιλίζονται. Χωρίς "πανοπλία"-κέλυφος κυτταρίνης. Μερικές φορές τα κύτταρα παρουσιάζονται εντελώς ακίνητα μέσα σε υαλώδη κύστη. Η μορφή των κυττάρων (Σχήματα 12 & 13) ποικίλει μεταξύ σφαιροειδούς και ατρακτοειδούς και κατά τον μεγάλο άξονα συμπιεσμένα. Το χρώμα τους κυμαίνεται μεταξύ των αποχρώσεων του λαδοκίτρινου και κιτρινοπορτοκαλί με μια ελαφρά πρασινωπή απόχρωση ενίοτε. Η επιθήκη (epicone) πολύ μικρότερη από την υποθήκη και μοναδική στο σχήμα της μεταξύ των δινομαστιγωτών καθώς μοιάζει με καμπυλωτή "προβοσκίδα". Μεταξύ των κυττάρων παρουσιάζεται ποικιλία στο μέγεθος της επιθήκης, σε άλλα είναι ογκώδης και σε άλλα μικρότερη. Η εγκάρσια αύλακα (cingulum) δεν είναι τόσο εμφανής όσο σε άλλες κατηγορίες δινομαστιγωτών καθώς η επιθήκη μικρή όπως είναι σε σχέση με την υποθήκη (που καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του κυττάρου) δεν χωρίζεται απ' αυτή με μια μεγάλη σε διάμετρο αύλακα. Η κάθετη αύλακα (sulcus) εμφανής διατρέχοντας κάθετα στην εγκάρσια αύλακα όλο το μήκος της υποθήκης. Τόσο το εγκάρσιο όσο και το κάθετο μαστίγιο εμφανή με το εγκάρσιο να βρίσκεται εν μέρει μέσα στην εγκάρσια αύλακα και ένα μέρος του να προεξέχει με χαρακτηριστική κυματοειδή κίνηση και το επίμηκες να προβάλλει αρκετά από την κάθετη αύλακα και να κινείται λιγότερο κυματοειδώς σε σχέση με το εγκάρσιο. Ο πυρήνας βρίσκεται στο κάτω μέρος της υποθήκης. Ο χλωροπλάστης χρώματος λαδοπράσινου καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του πρωτοπλάσματος και είναι λοβοειδούς μορφής. Το κυτταρόπλασμα είναι υαλώδες με ποικιλία εγκλείστων σωματιδίων και ποικίλων αποχρώσεων ανάλογα με τη φάση ανάπτυξης των καλλιεργούμενων κυττάρων.

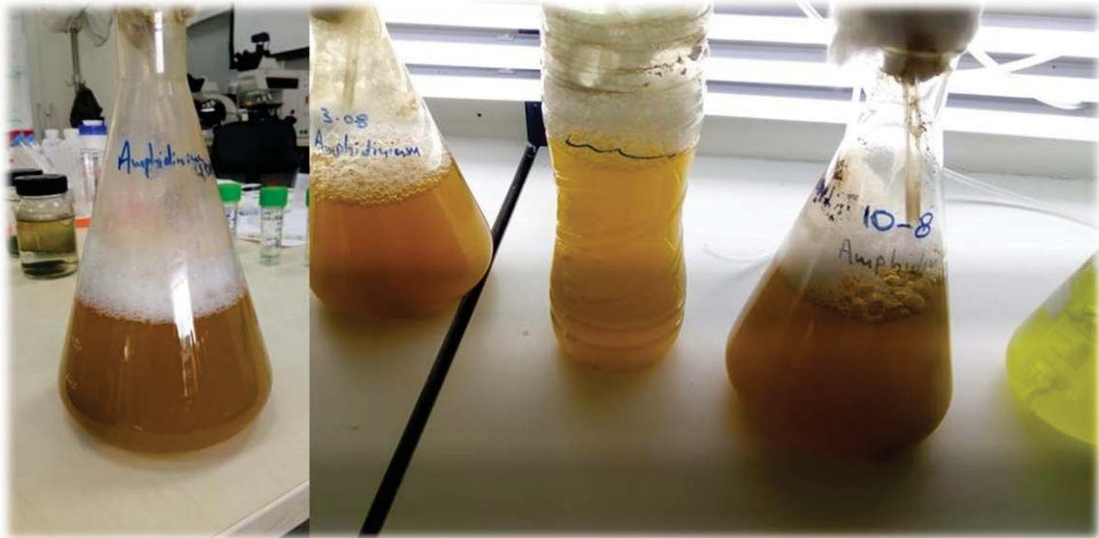
Ο πολλαπλασιασμός γίνεται με απλή κυτταρική διαίρεση και παρόλο που στη βιβλιογραφία αναφέρεται και αμφιγονική αναπαραγωγή και παραγωγή κύστεων κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε στο συγκεκριμένο είδος. Αναπτύσσεται καλά σε αλατότητες 35-55 ppt και το τυπικό χρώμα των καλλιεργειών του είναι πορτοκαλο-κίτρινο στην αρχή έως φαιο-πορτοκαλί στην ώριμη φάση.

Η καλλιέργειά του αναδίδει χαρακτηριστική οξεία μυρωδιά η οποία μοιάζει με σαπίζουσα θαλασσινή προέλευσης οργανική ύλη. Χαρακτηριστικό των ώριμων καλλιεργειών του είναι το φαιοκίτρινο χρώμα τους και το έντονο άφρισμά τους με τον αφρό να συσσωρεύεται στην επιφάνεια του νερού (Σχήματα 10 & 11). Εικάζεται ότι παράγει πολύ οργανική ύλη την οποία εκκρίνει στο νερό. Ενα άλλο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των καλλιεργειών του είναι ότι δεν παρατηρείται παρουσία διατόμων τα οποία πολύ εύκολα παρεισφρέουν και στις προσεκτικότερα διατηρημένες καλλιέργειες άλλων ειδών μικροφυκών. Ενδεχομένως να υφίσταται το φαινόμενο της αλληλοπάθειας και το *Amphidinium* να παράγει ουσίες τοξικές για τα διάτομα.

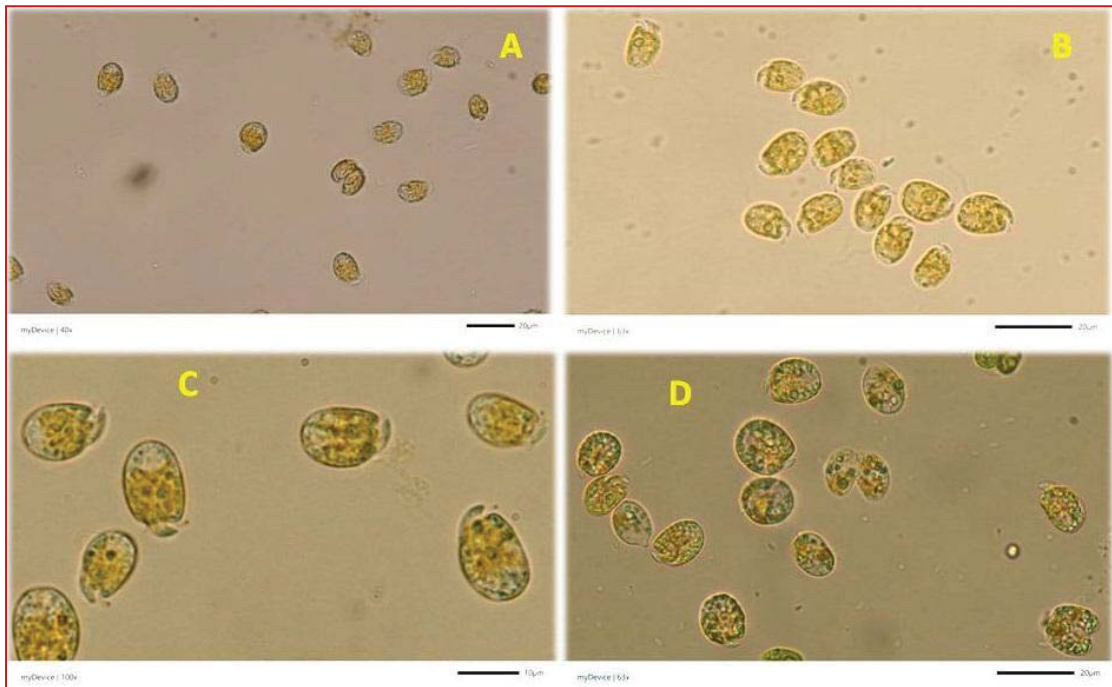
Ενα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό του *Amphidinium* είναι το συμπαγές του ιζήματος που προκύπτει όταν φυγοκεντρηθεί μια ποσότητα από την καλλιέργειά του. Το ίζημα είναι τόσο πυκνό και σφιχτό στο βυθό του σωλήνα μετά τη φυγοκέντρηση, που δεν επανα-αιωρείται όσο δυνατή ανάδευση και αν γίνει. Μόνο με την ανάμιξη με κάποια ράβδο διαλύεται. Προφανώς εξωκυτταρικές ουσίες που προέκυψαν από την καταπόνηση των κυττάρων λόγω της φυγοκέντρησης δρουν συγκολλητικά στη μάζα των κυττάρων.



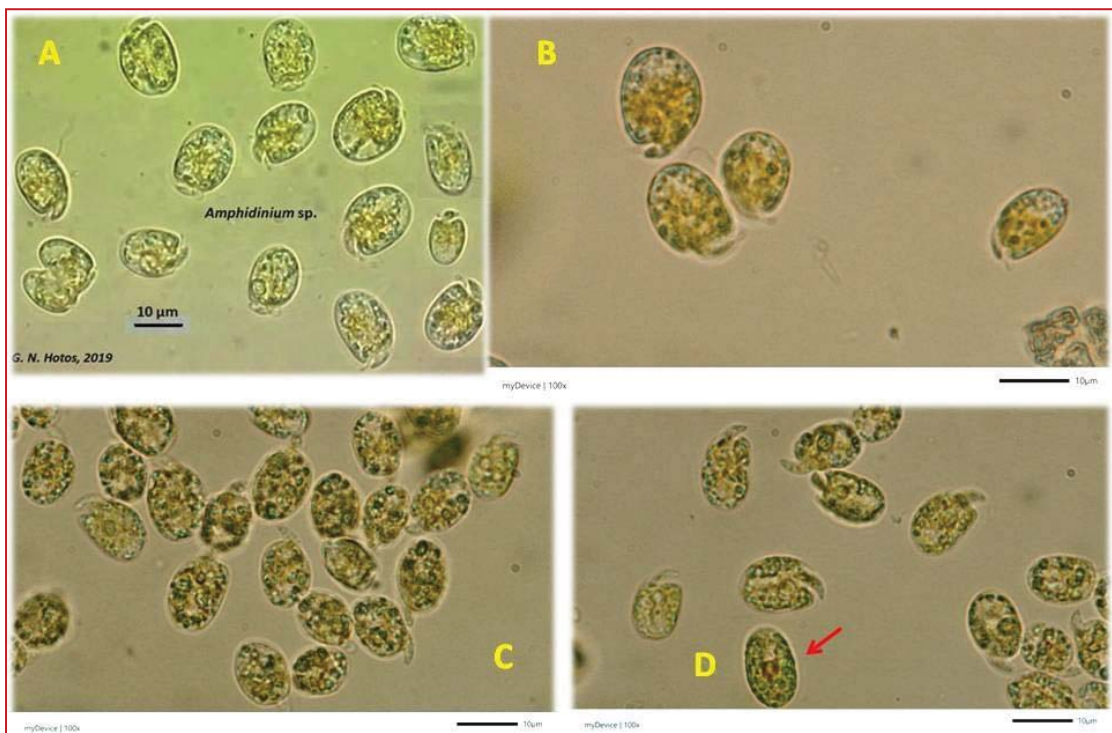
Σχήμα 10. Δοχεία Erlenmeyer των 500 ml με καλλιέργειες *Amphidinium* σε διάφορες φάσεις ωρίμανσης. Χαρακτηριστικό το φαιο-κίτρινο χρώμα του νερού καλλιέργειας.



Σχήμα 11. Το φαινόμενο της παραγωγής και συσσώρευσης λευκού αφρού στα δοχεία ώριμων καλλιεργειών του *Amphidinium*.



Σχήμα 12. Μικροσκοπικές φωτογραφίες κυττάρων *Amphidinium* από καλλιέργειες στην εκθετική φάση αύξησης. Χαρακτηριστικό το σχήμα της επιθήκης που μοιάζει με προβοσκίδα. Η κλίμακα δείχνεται με τη γραμμή στο κάτω δεξιά της κάθε φωτογραφίας. Α: 20 µm-400X, Β & D: 20 µm-630x, C: 10 µm-1000X.



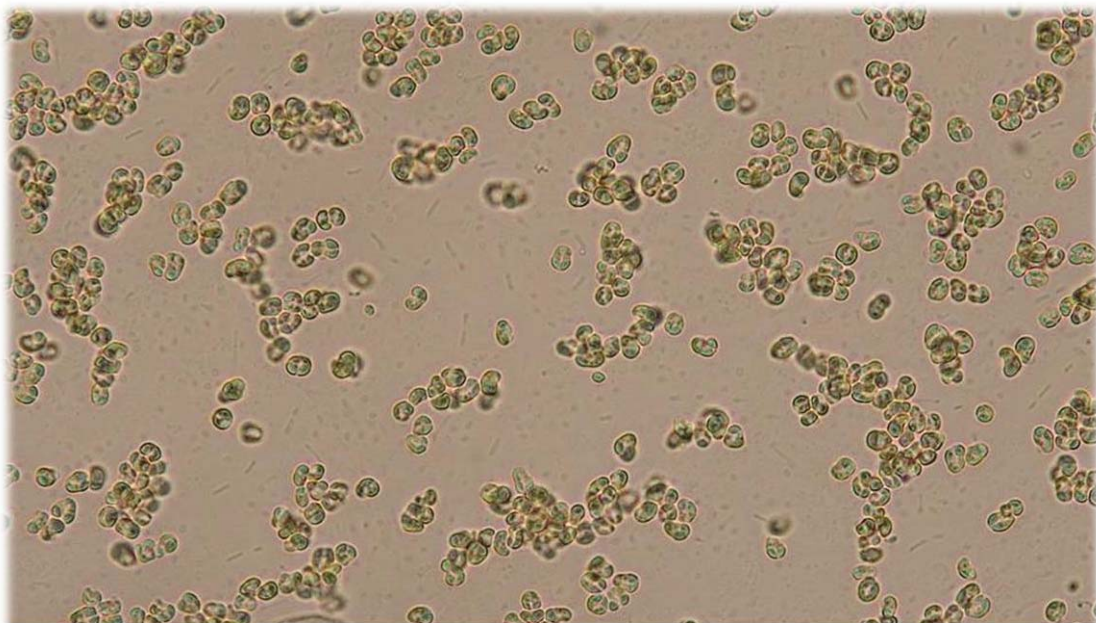
Σχήμα 13. Μικροσκοπικές φωτογραφίες κυττάρων *Amphidinium* από καλλιέργειες στην εκθετική φάση αύξησης. Χαρακτηριστικό το σχήμα της επιθήκης που μοιάζει με προβοσκίδα και το λαδοκίτρινο χρώμα των κυττάρων. Στη D με βέλος για σύγκριση δείχνεται ένα κύτταρο *Tetraselmis*. Η κλίμακα δείχνεται με τη γραμμή στο κάτω δεξιά της κάθε φωτογραφίας. Α, Β, C & D: 10 µm-1000X.

Nephroselmis sp.



Συστηματική κατάταξη

Βασίλειο: Πρώτιστα
 Φύλο: Χλωρόφυτα (Chlorophyta)
 Ομοταξία: Nephrophyceae
 Τάξη: Nephroselmidales
 Οικογένεια: Nephroselmidaceae
 Γένος: *Nephroselmis*
 Είδος: *Nephroselmis* sp.



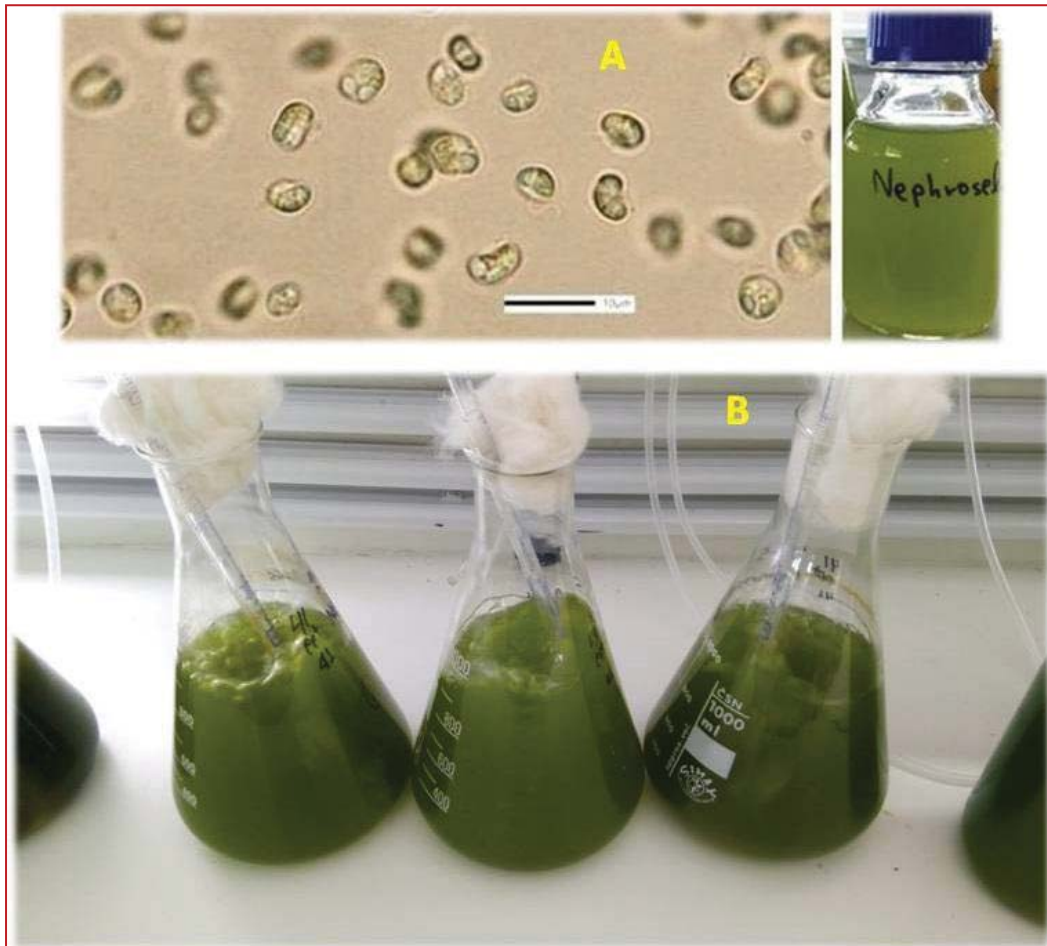
myDevice | 40x

20μm

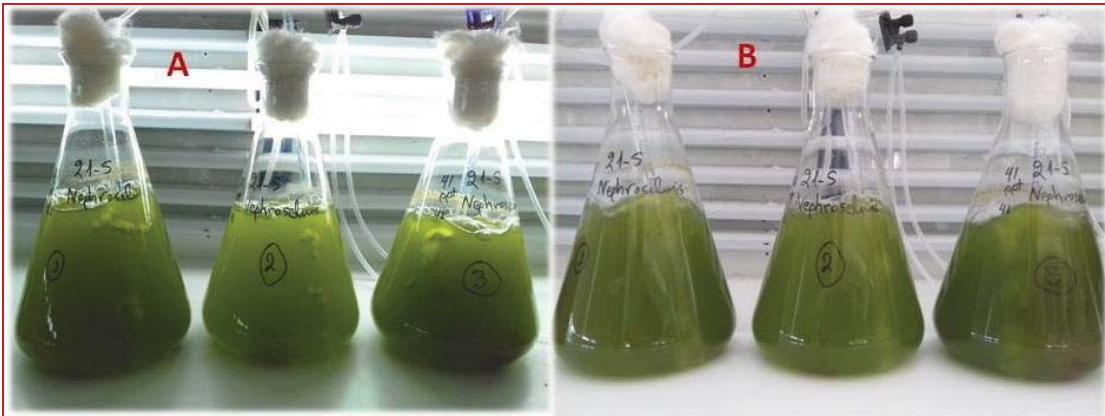
Σχήμα 14. Φωτογραφία μικροσκοπίου των κυττάρων του *Nephroselmis*. Τα κύτταρα έχουν πράσινη απόχρωση και τείνουν να συσσωρεύονται. Η κλίμακα δείχνεται με τη γραμμή στο κάτω δεξιά της κάθε φωτογραφίας. 20 μm-400X.

Μονοκύτταρο πλαγκτονικό χλωροφύκος (Σχήματα 14 & 17) με κύτταρα μονήρη σχήματος φασολίου πεπλατυσμένου κατά μήκος που το καθένα φέρει δύο άνισα μαστίγια τα οποία εκφύονται από το μεσαίο τμήμα του κοίλου τμήματος του κυττάρου. Τα κύτταρα δεν διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα και οι διαστάσεις τους κυμαίνονται σε $5,28 \pm 0,35$ (sd) μm κατά τον επιμήκη άξονα και $3,81 \pm 0,5$ (sd) μm κατά το πλάτος. Η κίνηση των μαστιγίων προσφέρει έντονη κινητικότητα στο κύτταρο με χαρακτηριστική ευθύγραμμη κίνηση ελαφρά στροβιλιστική και ελαφρά τρομώδη. Το κοντύτερο μαστίγιο κινείται κατά την εμπρόσθια κατεύθυνση και το μακρύτερο πάλλεται στο οπίσθιο μέρος. Το κάθε κύτταρο περιέχει ένα μεγάλο χλωροπλάστη σε πλευρική θέση μέσα στον οποίο βρίσκεται ένα πυρηνοειδές. Ο χλωροπλάστης καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας του κυττάρου και διαθέτει και μια φωτοευαίσθητη κηλίδα σε θέση που αντιστοιχεί στο κάτω

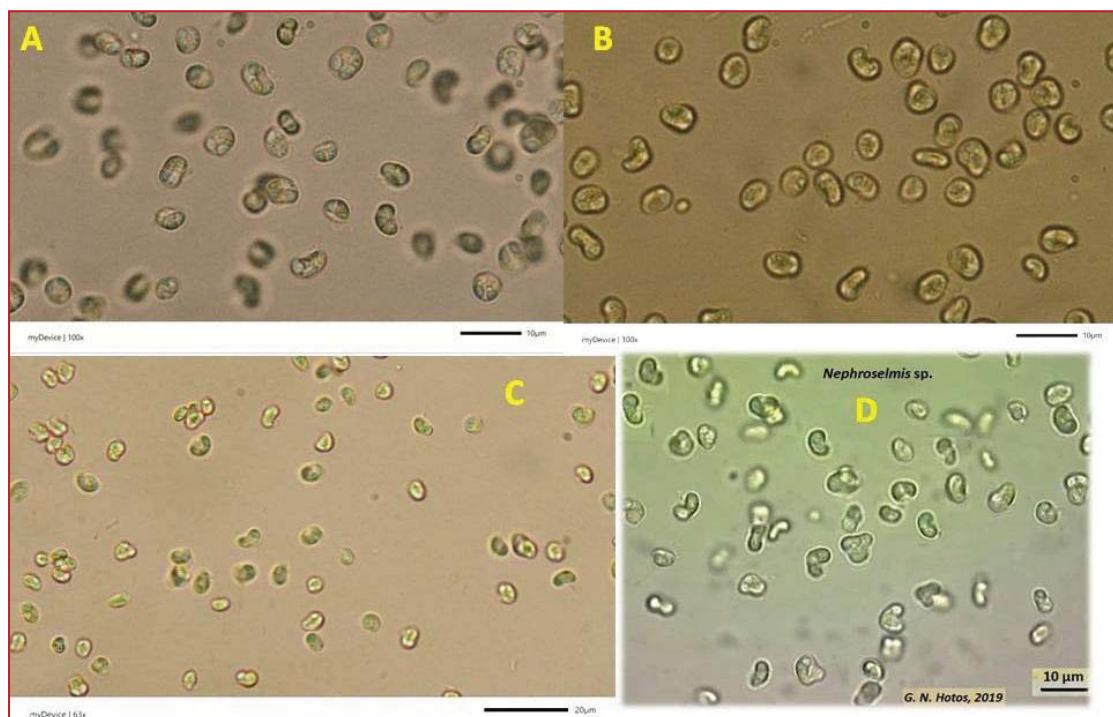
μέρος του τόπου έκφυσης του κοντού μαστιγίου. Το χρώμα των κυττάρων στο μικροσκόπιο είναι άτονο πράσινο ενώ στο δοχείο καλλιέργειας ανοικτό - θαμπό πράσινο (Σχήματα 15 & 16). Η αναπαραγωγή γίνεται είτε με κυτταρική διαίρεση (συνήθως), είτε αμφιγονικώς κατά των ολογαμικό τρόπο δηλαδή με σύντηξη δύο πανομοιότυπων βλαστητικών κυττάρων προς δημιουργία ζυγώτη, χωρίς όμως σχηματισμό κύστεων. Αναπτύσσεται καλά σε αλατότητες 35-65 ppt.



Σχήμα 15. Κύτταρα *Nephroselmis* (κλίμακα 10 μm) στο A και δίπλα το χρώμα της καλλιέργειας από την οποία προέρχονται. Στο B δοχεία Erlenmeyer των 500 ml με καλλιέργειες *Nephroselmis* περί το τέλος της εκθετικής φάσης αύξησης.

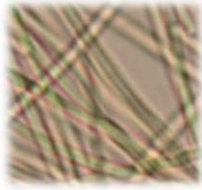


Σχήμα 16. Χρώμα καλλιεργειών *Nephroselmis*, πράσινο λαμπερό στην εκθετική φάση (A) και θαμπό πράσινο στην ώριμη στατική φάση (B).



Σχήμα 17. Χαρακτηριστικό νεφροειδές σχήμα των κυττάρων του *Nephroselmis* σε φωτογραφίες μικροσκοπίου. A, B & D: κλίμακα 10 μm, 1000X, C: 20 μm, 630X.

***Phormidium* sp.**



Συστηματική κατάταξη

Υπερβασίλειο:	Προκαρυωτικά
Βασίλειο:	Ευβακτήρια
Φύλο:	Κυανοβακτήρια
Ομοταξία:	Cyanophyceae
Τάξη:	Oscillatoriales
Οικογένεια:	Oscillatoriaceae
Γένος:	<i>Phormidium</i>
Είδος:	<i>Phormidium</i> sp.

Κυανοβακτήριο νηματοειδούς τύπου (Σχήματα 18, 19, 24 & 25). Νημάτια (τριχώματα) αδιακλάδωτα, γενικώς ευθύγραμμα πολύ μεγάλου μήκους χωρίς πολλές συστροφές παρά μόνο περιστασιακά, καμπτόμενα ελαφρώς όταν βρίσκονται σε μεγάλες μάζες. Ενίοτε ορισμένα νήματα βρίσκονται περιελιγμένα σε σπείρα. Τα νημάτια παρουσιάζουν λεία εμφάνιση και έχουν ικανότητα αργής ολισθητικής κίνησης. Το χρώμα τους ποικίλλει ανάλογα με τη φάση της καλλιέργειας από ανοιχτό πράσινο, σε πρασινο-λαδί έως λαδί-κίτρινο (Σχήματα 22 & 23). Τα τελικά μέρη των νηματίων (άκρες) όχι οξύληκτα αλλά ελαφρώς κυρτά. Η θήκη βλέννας που καλύπτει τα νημάτια είναι συμπαγής, πολύ μικρού πάχους και απουσιάζει στα κύτταρα των άκρων (τελικά κύτταρα).

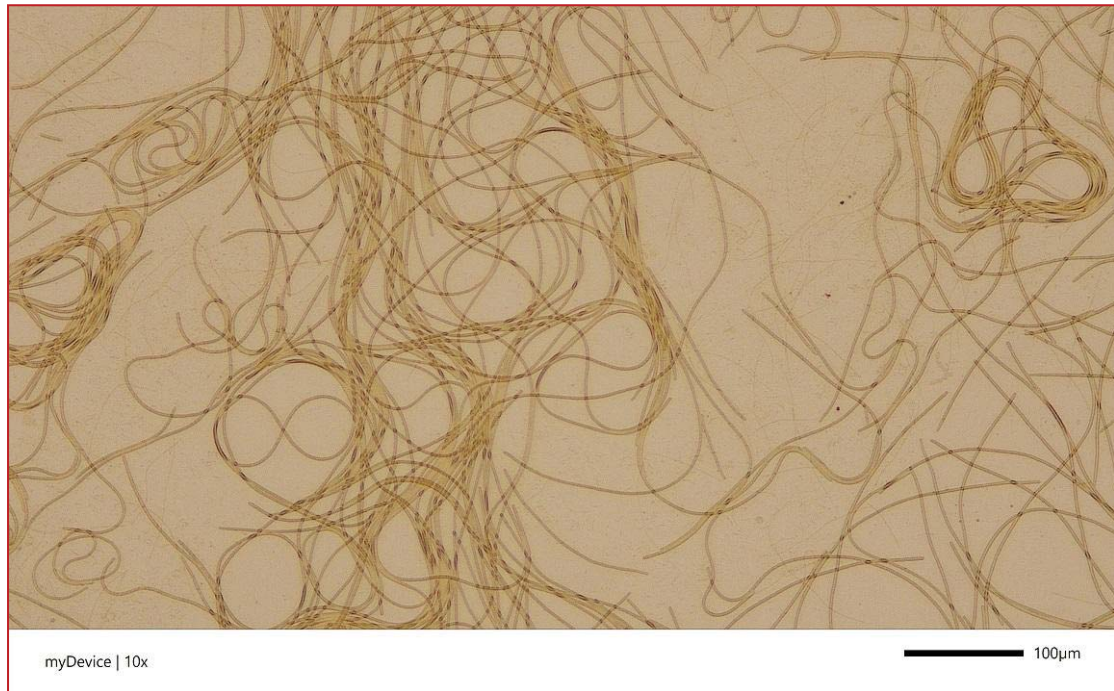
Το είδος δεν είναι αζωτοδεσμευτικό καθώς δεν παρουσιάζει ετερόκυτα (ειδικά κύτταρα δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου -N₂). Δεν σχηματίζει κύτταρα-ακινήτες. Τα νημάτια αποτελούνται από κυλινδρικού σχήματος κύτταρα με μήκος λίγο μεγαλύτερο από το πάχος τους [$2,37 \pm 0,2$ (sd) μm]. Τα γειτονικά κυτταρικά τοιχώματα στις θέσεις επαφής των κυττάρων δεν σχηματίζουν εμφανή χωρίσματα στη μικροσκοπική τους παρατήρηση στο δείγμα που απομονώθηκε από τις αλυκές της Τουρλίδας του Μεσολογίου, ενώ είναι αμυδρώς εμφανή στο δείγμα που απομονώθηκε από τη λιμνοθάλασσα Κοτυχίου.



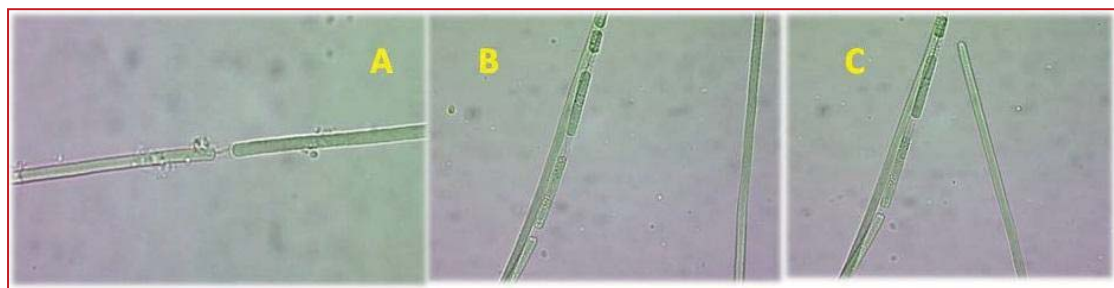
Σχήμα 18. Πυκνές μάζες μακρών νημάτων του κυανοβακτηρίου *Phormidium* sp. απομονωθέντος από τις αλυκές Τουρλίδας Μεσολογγίου. Στα νημάτια δεν υπάρχουν ετερόκυτα ούτε ακινήτες. Γραμμή κλίμακα: 100 μm, μεγέθυνση 100X.

Στα κύτταρα δεν παρατηρούνται συνήθως αεροτόπια όμως ενίοτε λίγα τον αριθμό μικρά αεροτόπια εμφανίζονται σε κάποια κύτταρα. Το περιεχόμενο του κυτταροπλάσματος σε μεγάλη μεγέθυνση εμφανίζεται κοκκώδες με πολύ μικρά κοκκία πράσινης-κυανοπράσινης απόχρωσης.

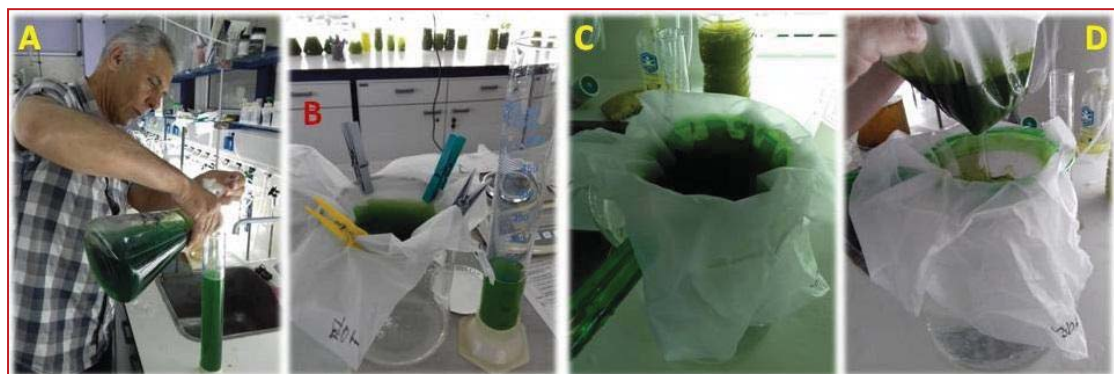
Ο πολλαπλασιασμός γίνεται με θραυσματοποίηση των νημάτων (Σχήμα 20) σε κομμάτια ποικίλου μήκους τα οποία κατόπιν με κυτταρικές διχοτομήσεις επιμηκύνονται. Οι κυτταρικές διαιρέσεις (διχοτομήσεις) των κυττάρων γίνονται εγκαρσίως δηλαδή κάθετα στον άξονα του νηματίου. Το κύτταρο αυξάνεται πρώτα στο κατάλληλο διπλάσιο μέγεθος και κατόπιν διαιρείται. Μόνο τα τελικά κύτταρα του νηματίου δεν έχουν τέτοια ικανότητα. Τα σημεία του νήματος όπου πρόκειται να πραγματοποιηθεί η θραύση αναπτύσσουν νεκρίδια δηλαδή κύτταρα που θα διαλυθούν για να επέλθει η θραύση και ο διαχωρισμός του νηματίου.



Σχήμα 19. Πυκνές μάζες μακρών νηματίων του κυανοβακτηρίου *Phormidium* sp. απομονωθέντος από τη λιμνοθάλασσα Κοτύχι Ηλείας. Στα νημάτια δεν υπάρχουν ετερόκυτα ούτε ακινήτες. Γραμμή κλίμακα: 100 μm, μεγέθυνση 100X.



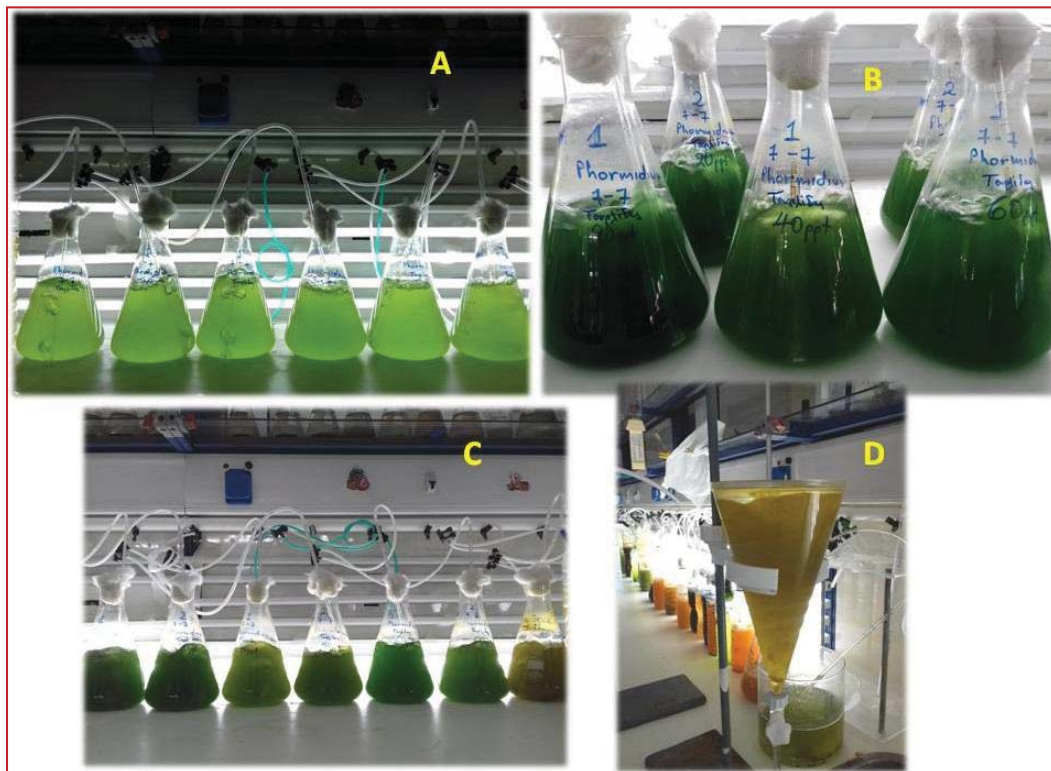
Σχήμα 20. Σημεία θραύσης του νήματος του κυανοβακτηρίου *Phormidium* από τα οποία με πολλαπλασιασμό των κυττάρων θα προκύψουν νέα μακρά νημάτια.



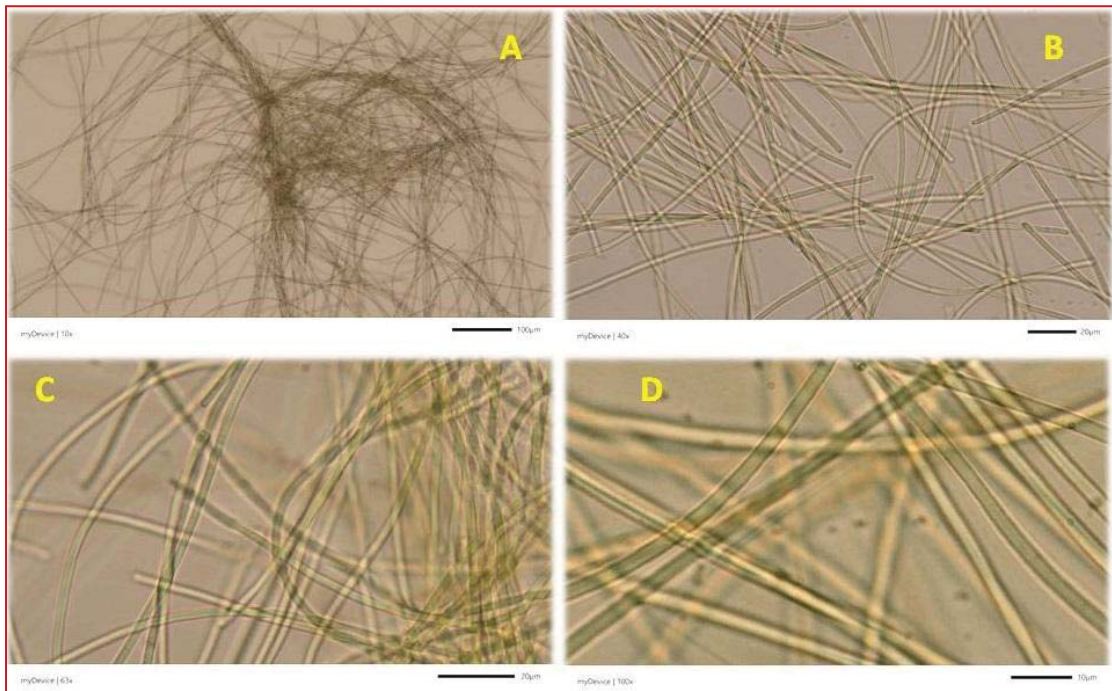
Σχήμα 21. Διαδικασία συμπύκνωσης της καλλιέργειας *Phormidium* (A) με χύσιμό της σε πλαγκτονικό δίκτυο ματιών 100 μm (B) και στράγγιση της καλλιέργειας (C) ώστε τελικά στο δίκτυο να μείνει μόνο πυκνή μάζα των νηματίων του *Phormidium* (D).



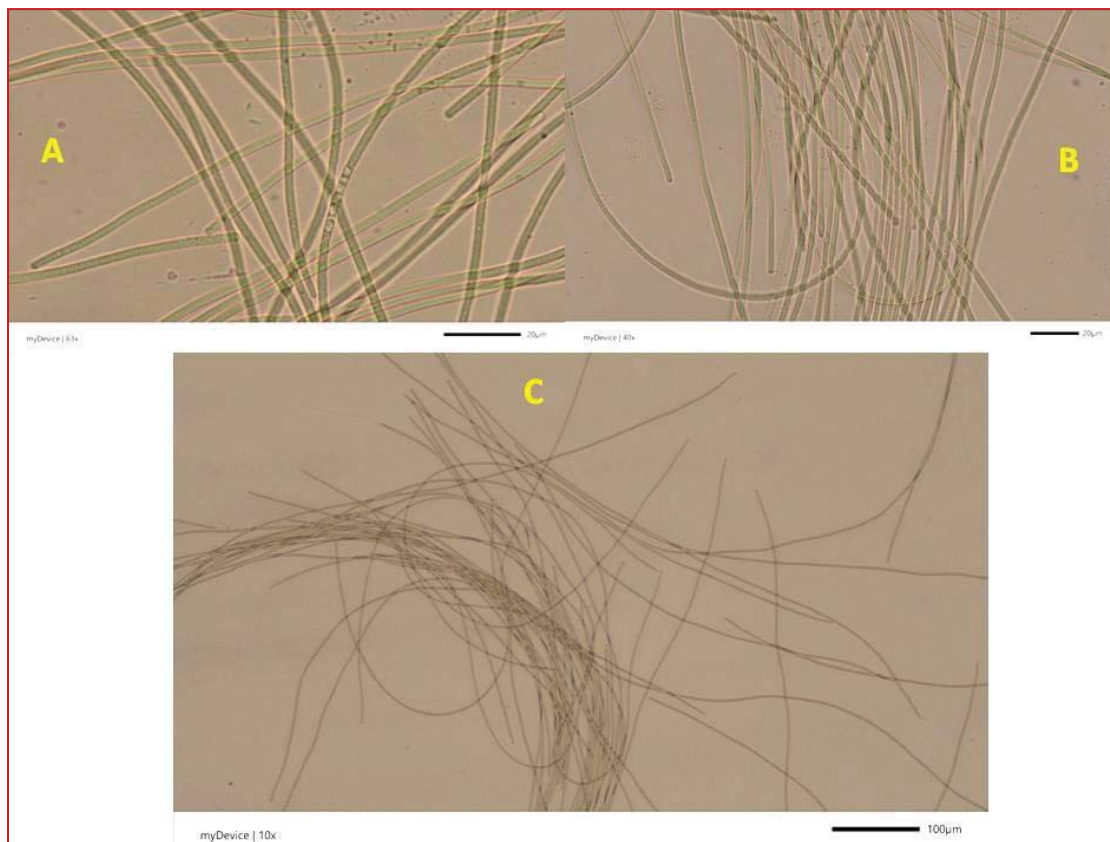
Σχήμα 22. Στο Α καλλιέργειες *Phormidium* σε διάφορα στάδια (αρχή-μέση-ώριμη) με τις χαρακτηριστικές διαβαθμίσεις του πράσινου και στο Β ώριμες καλλιέργειες με σκούρο πράσινο χρώμα και μία που έχει γίνει λαδοκίτρινη.



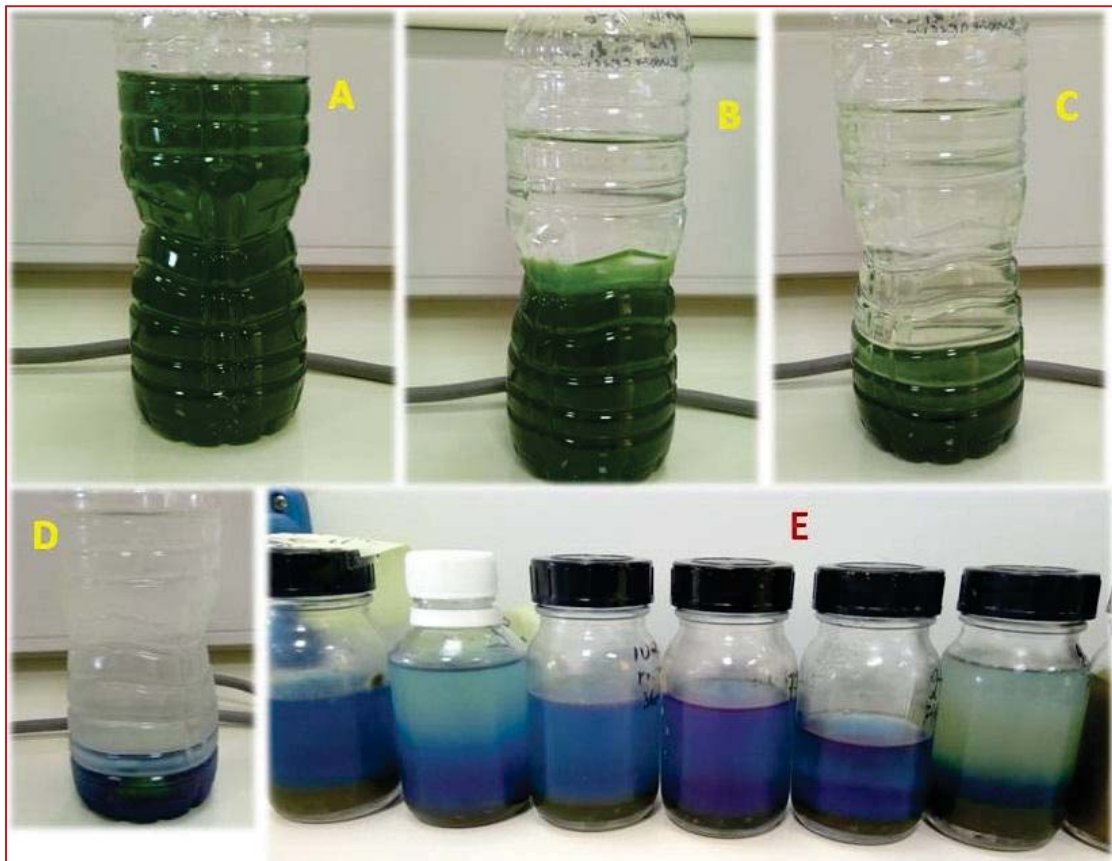
Σχήμα 23. Α, Β & C καλλιέργειες *Phormidium* στην πράσινη φάση, D στη λαδί φάση.



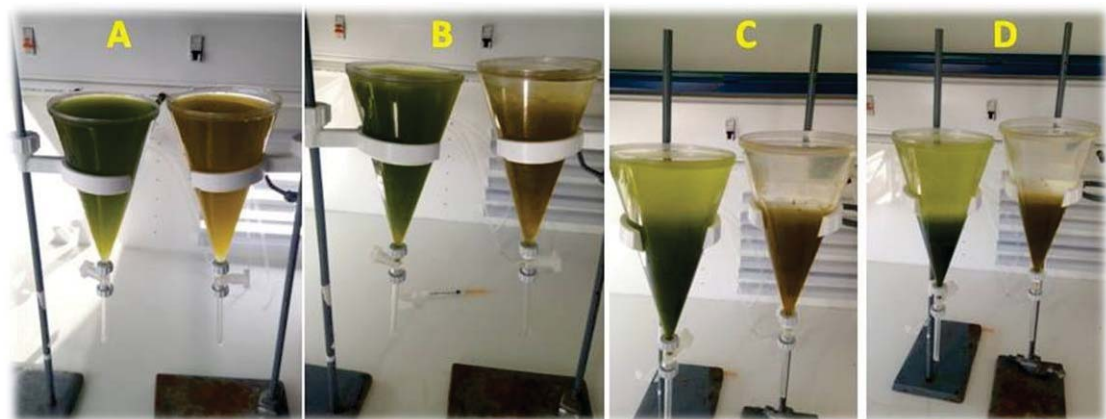
Σχήμα 24. Μάζες μακρών νηματίων του κυανοβακτηρίου *Phormidium* sp. απομονωθέντος από τις αλυκές Τουρλίδας Μεσολογγίου. Γραμμές κλίμακα: A: 100 µm, μεγέθυνση 100X, B: 20 µm, 400X, C: 20 µm, 630X, D: 20 µm, 1000X.



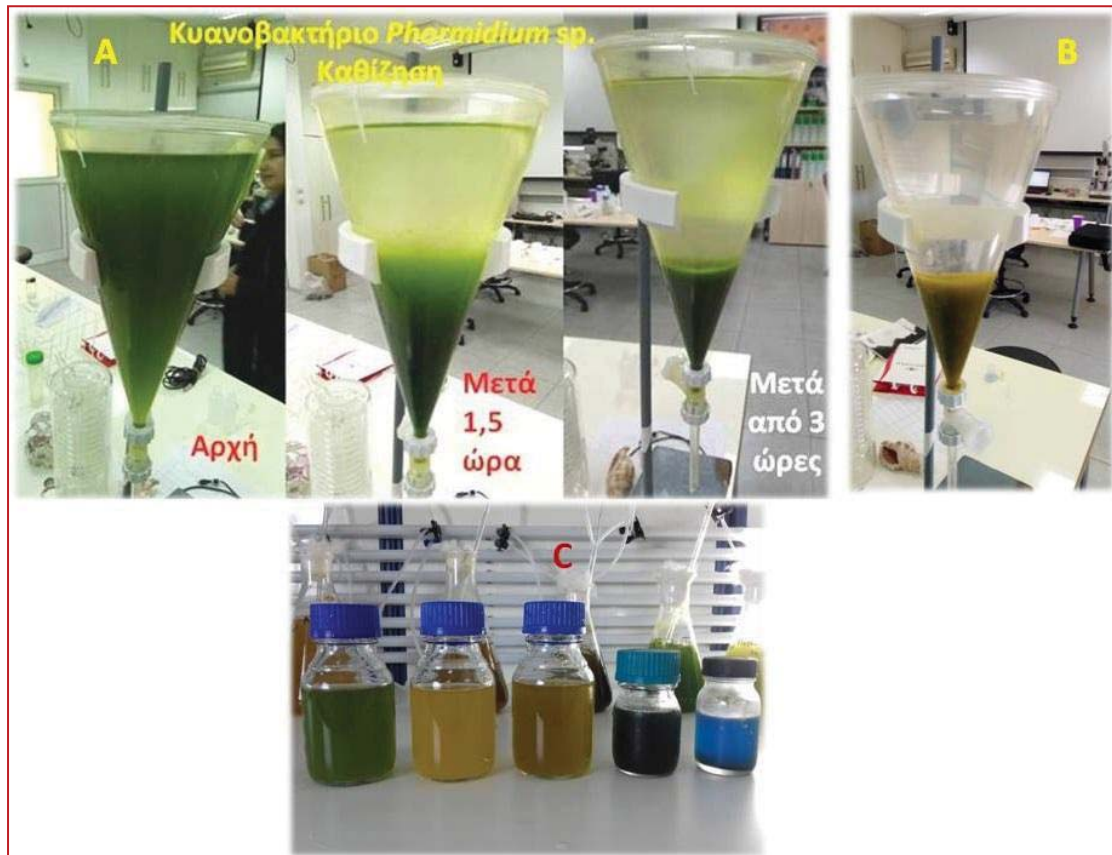
Σχήμα 25. Κυανοβακτήριο *Phormidium* sp. απομονωθέντος από τη Λ/Θ Κοτυχίου Ηλείας. A: 20 µm, 630X, B: 20 µm, 400X, C: 100 µm, 100X.



Σχήμα 26. Στα A, B, C & D καλλιέργεια *Phormidium* στην πράσινη φάση και η προϊόντος του χρόνου καθίζηση της μάζας των νημάτων του σχηματίζοντας παχύ πράσινο ίζημα (σε 3 περίπου ώρες). Στο D μετά από παραμονή 24 ωρών σε ψυγείο (~4 °C) το ίζημα απελευθέρωσε την υδατοδιαλυτή φυκοκυανίνη. Στο E δείγματα ιζημάτων με εντυπωσιακή απελευθέρωση ποσοτήτων φυκοκυανίνης που χρωματίζουν το νερό μπλε. Μόνο η πράσινη φάση απελευθερώνει αβίαστα φυκοκυανίνη όταν παραμένει στο ψυγείο.



Σχήμα 27. Καλλιέργειες *Phormidium* στην πράσινη και στη λαδί φάση τοποθετημένες σε φιάλες διαχωρισμού για να φανεί η εξελισσόμενη καθίζηση και στο D το τελικώς σχηματισθέν ίζημα, πράσινο για την πράσινη φάση, λαδί για τη λαδί.



Σχήμα 28. Κοντινό πλάνο από καλλιέργεια *Phormidium* στην πράσινη φάση τοποθετημένη σε φιάλη διαχωρισμού(A) στο οποίο φαίνεται η σε 3 περίπου ώρες κατακάθιση του πράσινου ιζήματος ενώ το υπερκείμενο νερό είναι σχεδόν διαυγές (χωρίς κυανοβακτηριακά νήματα δηλαδή) και στο Β το αντίστοιχο λαδί ιζήμα από παρόμοια καθίζηση καλλιέργειας *Phormidium* στη λαδί φάση. Στο C δείγματα καλλιεργειών *Phormidium* σε πράσινη, κιτρινο-λαδί, λαδί και λαδοπράσινη φάση με το δοχείο άκρη δεξιά να έχει απελευθερώσει φυκοκυανίνη μετά από 24ωρη ψύξη του.

Το *Phormidium* αναπτύσσεται γρήγορα σε κανονικές συνθήκες (20-22 °C, ~4000 lux) και είναι πολύ αλοανθεκτικό αντέχοντας σε ένα ευρύ εύρος αλατότητας 15-60 ppt με καλύτερη ανάπτυξη γύρω στα 40 ppt. Πολύ γρήγορα η αρχική του καλλιέργεια που έχει πράσινο χρώμα δημιουργεί μάζα νηματίων που είναι ορατά και με γυμνό οφθαλμό καθώς στροβιλίζονται με τον αερισμό στο δοχείο καλλιέργειας. Μετά από λίγες ημέρες η καλλιέργεια αποκτά λαδοπράσινο χρώμα και τελικώς λαδοκίτρινο όταν η ανάπτυξη καταλήξει σε μεγάλη βιομάζα. Το νερό με το *Phormidium* αφηρόμενο αδιατάρακτο για αρκετό διάστημα θα παρουσιάσει εντυπωσιακή καθίζηση των νηματίων δημιουργώντας συμπαγές ιζήμα με σχεδόν διαφανές το υπερκείμενο υγρό (Σχήματα 26, 27 & 28). Η καθίζηση ολοκληρώνεται σε 3 περίπου ώρες και συμβαίνει με τον ίδιο ρυθμό ανεξαρτήτως της χρωματικής φάσης της καλλιέργειας.

Αν το ιζήμα από την πράσινη φάση αφηθεί για πολύ καιρό και ιδιαίτερα στην ψύξη (~4 °C) θα εμφανιστεί στο υπερκείμενο νερό έντονο μπλε χρώμα (Σχήματα 26 & 28) λόγω απελευθέρωσης από τα κύτταρα της υδατοδιαλυτής χρωστικής

φυκοκυανίνης η οποία χρησιμοποιείται από τη βιομηχανία ως ισχυρό αντιοξειδωτικό. Συνεπώς το *Phormidium* προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα για τη μαζική καλλιέργειά του καθώς:

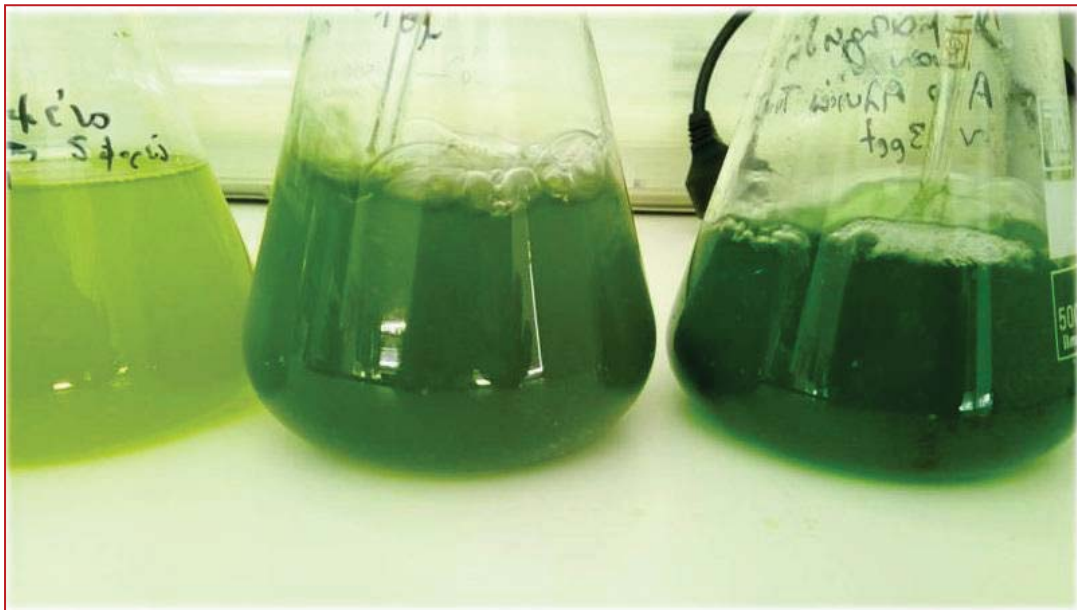
1. Αναπτύσσεται γρήγορα και φθάνει σε πυκνές συγκεντρώσεις.
2. Συλλέγεται εύκολα καθώς σχηματίζει σύντομα με αδιατάρακτη καθίζηση πυκνό ίζημα.
3. Παράγει πολλή φυκοκυανίνη.
4. Η καλλιέργειά του διευκολύνεται πολύ ως προς την επίτευξη της μονοειδικότητας καθώς τα νημάτιά του διατηρούνται μόνα αυτά μέσω περάσματος του μέσου καλλιέργειας από πλαγκτονικό δίκτυο πόρων $\sim 100 \mu\text{m}$ (Σχήμα 21).

***Tetraselmis* sp. (marina var messolonghi)**



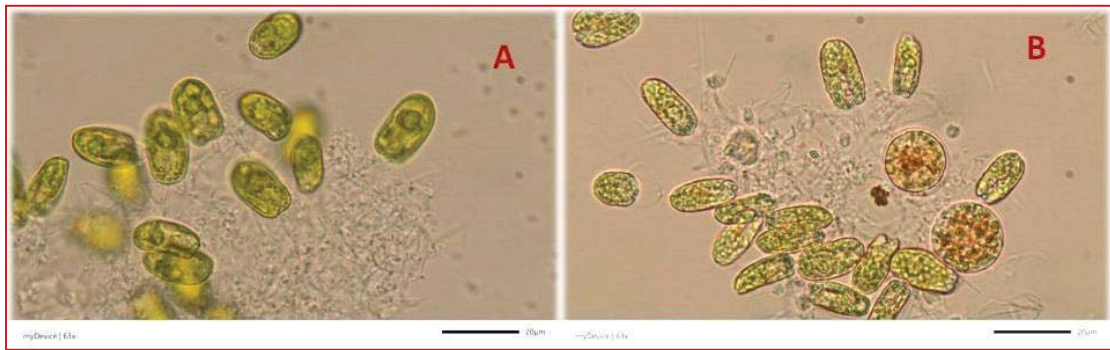
Συστηματική κατάταξη

Υπερβασίλειο: Ευκαρυωτικά
 Βασίλειο: Πρώτιστα
 Φύλο: Χλωρόφυτα (Chlorophyta)
 Ομοταξία: Chlorophyceae
 Τάξη: Volvocales
 Οικογένεια: Chlamydomonadaceae
 Γένος: *Tetraselmis*
 Είδος: *Tetraselmis* sp. (marina)



Σχήμα 29. Φιάλες Erlenmeyer των 500 ml με *Tetraselmis* sp. (marina var. messolonghi) σε διάφορες φάσεις ανάπτυξης για να δειχθεί το λαμπερό πράσινο χρώμα της καλλιέργειας.

Μονοκύτταρο πλαγκτονικό φύκος με έντονο πράσινο χρώμα (στα κύτταρα και στο μέσο καλλιέργειας-Σχήμα 29). Το κύτταρό του επίμηκες, κυλινδρικού σχήματος αλλά ελαφρά συμπιεσμένο και ελαφρά ελλειψοειδές (Σχήμα 30 A & B, Σχήμα 31 A & D). Το εμπρόσθιο μέρος του κυττάρου με χαρακτηριστική εγκόλπωση (Σχήμα 31 A & D, Σχήμα 33A), από την οποία εκφύονται 4 ισομήκη μαστίγια διακρινόμενα σε 2 ζεύγη αντικριστά τοποθετημένα (Σχήμα 31C). Τα μαστίγια προσδίδουν έντονη κινητικότητα στο κύτταρο το οποίο ακολουθεί ευθύγραμμη πορεία με στροβιλισμό κατά διαστήματα και συχνές αλλαγές κατεύθυνσης.



Σχήμα 30. Κύτταρα με *Tetraselmis* sp. (*marina* var. *messolonghi*) από νεαρή καλλιέργεια (A) με έντονο πράσινο χρώμα και από ώριμη καλλιέργεια (B) με κύτταρα με άτονο πράσινο χρώμα και 2 κύστεις κοκκινωπές λόγω συσσώρευσης καροτενοειδών. Γραμμή 20 μm, 630X.

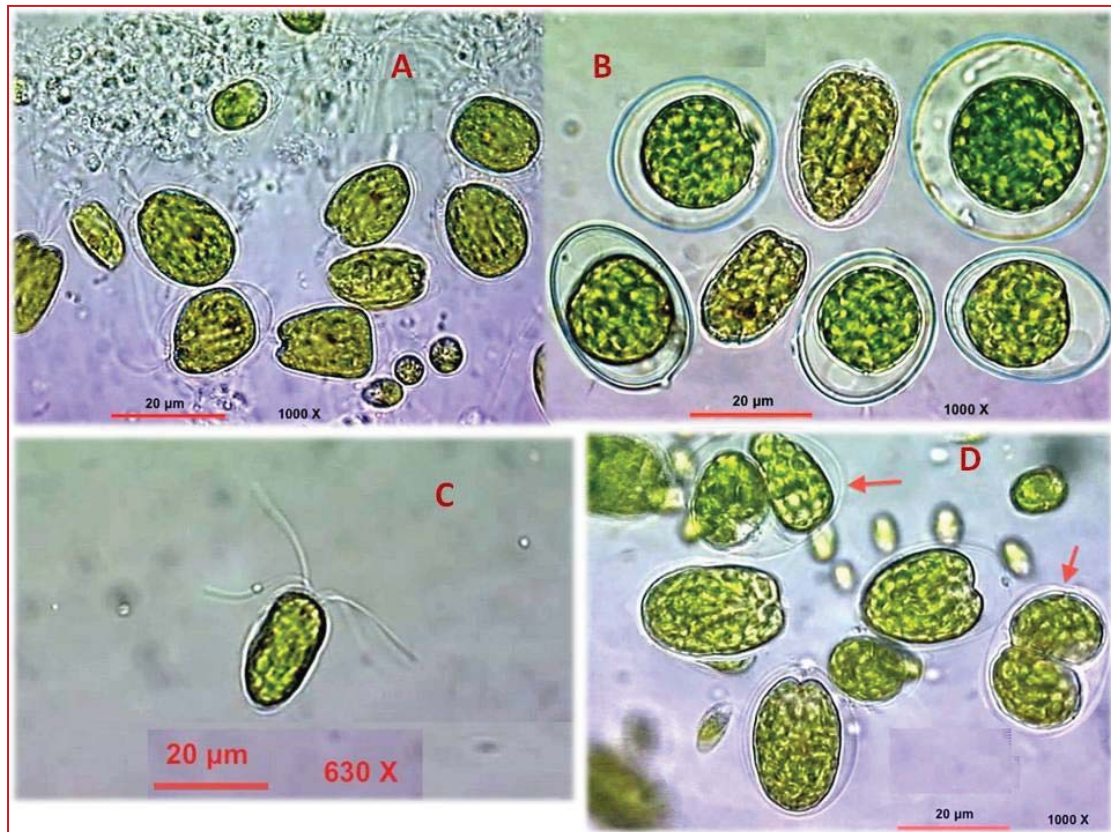
Μερικές φορές τα κύτταρα αποκτούν σφαιρική μορφή (Σχήμα 30B) αποβάλλουν τα μαστίγια και ακινητοποιούνται. Πολύ συχνά επίσης τα κύτταρα περικλείονται σε μια μεμβρανώδη, διάφανη σα φούσκα δομή με περιεχόμενο υδαρές και ενίοτε ελαφρώς κοκκώδες. Σε αυτή τη μορφή ονομάζονται παλμελλοειδή κύτταρα (Σχήμα 31B, Σχήμα 33B, Σχήμα 34 A, C & D)) και ενώ διατηρούν το έντονο πράσινο χρώμα τους είναι ακίνητα χωρίς μαστίγια και τις περισσότερες φορές γεμάτα με διακριτά σφαιρικά έγκλειστα προφανώς αποθηκευτικό υλικό (άμυλο ή έλαια). Ο μεταβολισμός τους κατά το παλμελλοειδές στάδιο φαίνεται να παραμένει ενεργός καθώς σε αρκετά από αυτά παρατηρούνται κυτταρικές διαιρέσεις.

Σε "γηρασμένες" καλλιέργειες τα κύτταρα παλμέλλα χάνουν εν μέρει ή ολοκληρωτικά το πράσινο χρώμα τους και φαίνονται γεμάτα με σφαιροειδή άχρα έγκλειστα (Σχήμα 32 A). Στο κύτταρο υπάρχει ένας μεγάλος κυπελλοειδούς σχήματος χλωροπλάστης με ένα πυρηνοειδές σε κεντρική θέση. Μια μεγάλη οφθαλμική κηλίδα πορτοκαλί χρώματος είναι εμφανής σε θέση προς το άνω μέσο του κυττάρου (κατά τον επιμήκη άξονα) και σε πλευρική θέση. Στο κέντρο του κυττάρου βρίσκεται ο πυρήνας που γειτνιάζει με την οφθαλμική κηλίδα.

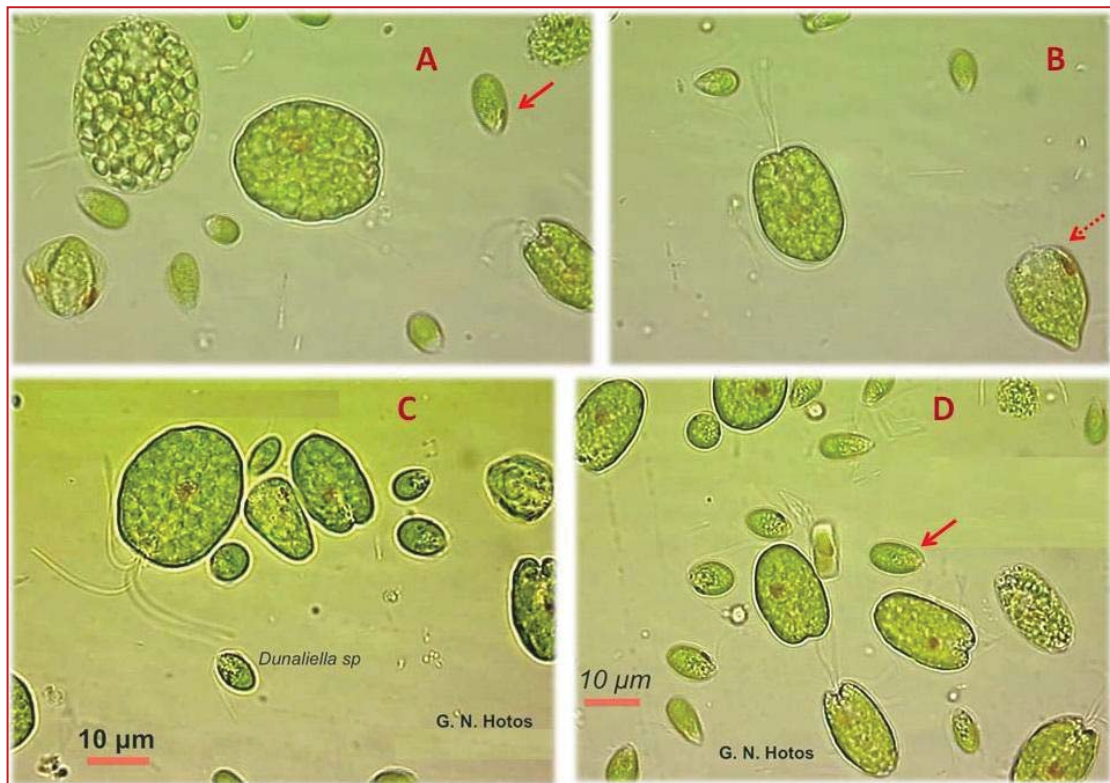
Η αναπαραγωγή γίνεται με απλή κυτταρική διαίρεση στο βλαστητικό κινητικό στάδιο καθώς και στο στάδιο της παλμέλλας. Δεν έχει παρατηρηθεί σεξουαλική αναπαραγωγή που να συνίσταται σε σύντηξη οιονεί γαμετών. Όμως συχνά σχηματίζονται σφαιροειδείς κύστεις με παχιά τοιχώματα, το κύτταρο διαιρείται σε 4 θυγατρικά κύτταρα (Σχήμα 33C, Σχήμα 34C) τα οποία κατόπιν απελευθερώνονται και αυξάνουν σε μέγεθος ως κινητικά βλαστητικά κύτταρα.

Το συγκεκριμένο είδος που ονομάζεται από εμάς *Tetraselmis marina* var. *messolonghi* είναι πολύ μεγάλων διαστάσεων συγκριτικά με τα γνωστά είδη του γένους *Tetraselmis* (*T. suecica*, *T. chui*, *T. tetrathele* κ.ά.) και παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία στο σχήμα, στα μεγέθη του, στην παρουσία του πυρηνοειδούς, στο σχήμα του χλωροπλάστη και στα διάφορα έγκλειστα του κυττάρου, γνωρίσματα που λίγο-πολύ χαρακτηρίζουν το συγκεκριμένο γένος και δυσκολεύουν την ταξινομική

διευθέτηση των ειδών του. Πάντως το μέγεθος του *Tetraselmis marina* var. *messolonghi* που κυμαίνεται σε $17,62 \pm 1,79$ (sd) μm κατά τον επιμήκη άξονα και $10,02 \pm 0,62$ (sd) μm κατά το πλάτος είναι πολύ μεγαλύτερο (ίσως το μεγαλύτερο από όλα τα είδη του γένους) καθώς και η μεγάλη του αντοχή σε πολύ υψηλές αλατότητες της τάξεως των 150 ppt το διαφοροποιούν εμφανώς από τα υπόλοιπα.



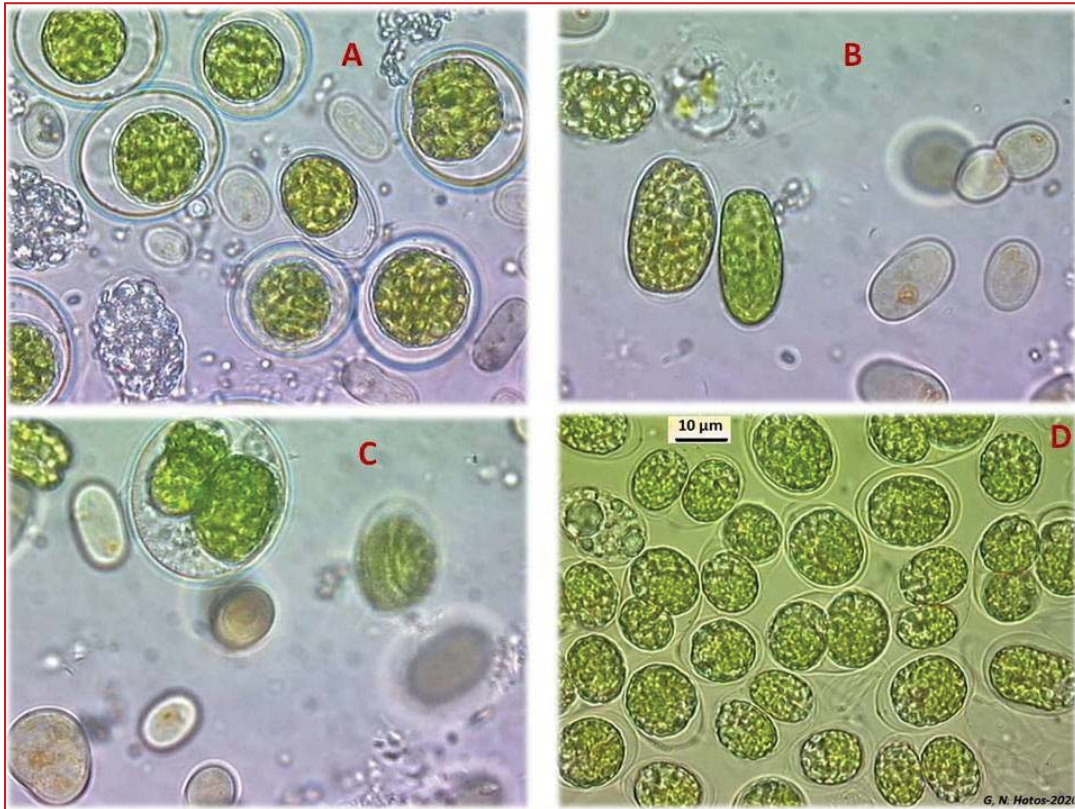
Σχήμα 31. Κύτταρα *Tetraselmis* sp. (*marina* var. *messolonghi*). A: Μεγάλα έντονου πράσινου χρώματος. B: σε φάση παλμέλλα σφαιρικά. C: τα 4 μαστίγια. D: τα βέλη δείχνουν κυτταρική διαίρεση σε φάση παλμέλλα, κύτταρα επίσης που μεταπίπτουν σε παλμέλλα, διακρίνονται επίσης μικρότερα κύτταρα που προέκυψαν μιτωτικώς.



Σχήμα 32. Κύτταρα *Tetraselmis* sp. (marina var. messolonghi). Στα A & D χάριν συγκρίσεως με βέλος δείχνεται κύτταρο *Dunaliella*, στο B με βέλος δείχνεται κύτταρο *Asteromonas*.

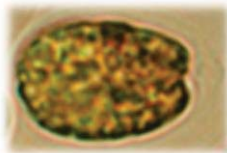


Σχήμα 33. Κύτταρα *Tetraselmis* sp. (marina var. messolonghi). A: βλαστητικά, B: παλμέλλα, C: κυτταρική διαίρεση σε παλμέλλα. D: βλαστητικό με τα 4 μαστίγια.



Σχήμα 34. Κύτταρα *Tetraselmis* sp. (*marina* var. *messolonghi*). A: Σφαιρικά σε παλμέλλα, B: βλαστητικά διαφορετικού χρώματος, C: κυτταρική διαίρεση σε παλμέλλα. D: Σφαιρικά σε παλμέλλα με κυτταρικές διαιρέσεις.

Tetraselmis sp. (red)



Συστηματική κατάταξη

Υπερβασίλειο:	Ευκαρυωτικά
Βασίλειο:	Πρώτιστα
Φύλο:	Χλωρόφυτα (Chlorophyta)
Ομοταξία:	Chlorophyceae
Τάξη:	Volvocales
Οικογένεια:	Chlamydomonadaceae
Γένος:	<i>Tetraselmis</i>
Είδος:	<i>Tetraselmis</i> sp. (red)

Μονοκύτταρο πλαγκτονικό χλωροφύκος παρόμοιας μορφολογίας με το *Tetraselmis marina* var. *messolonghi* που περιγράφηκε παραπάνω αλλά με εμφανώς μικρότερες διαστάσεις κυττάρου $10,52 \pm 1,2$ (sd) μm κατά τον επιμήκη άξονα και $8,11 \pm 1,08$ (sd) μm κατά το πλάτος για το είδος που απομονώθηκε από τη

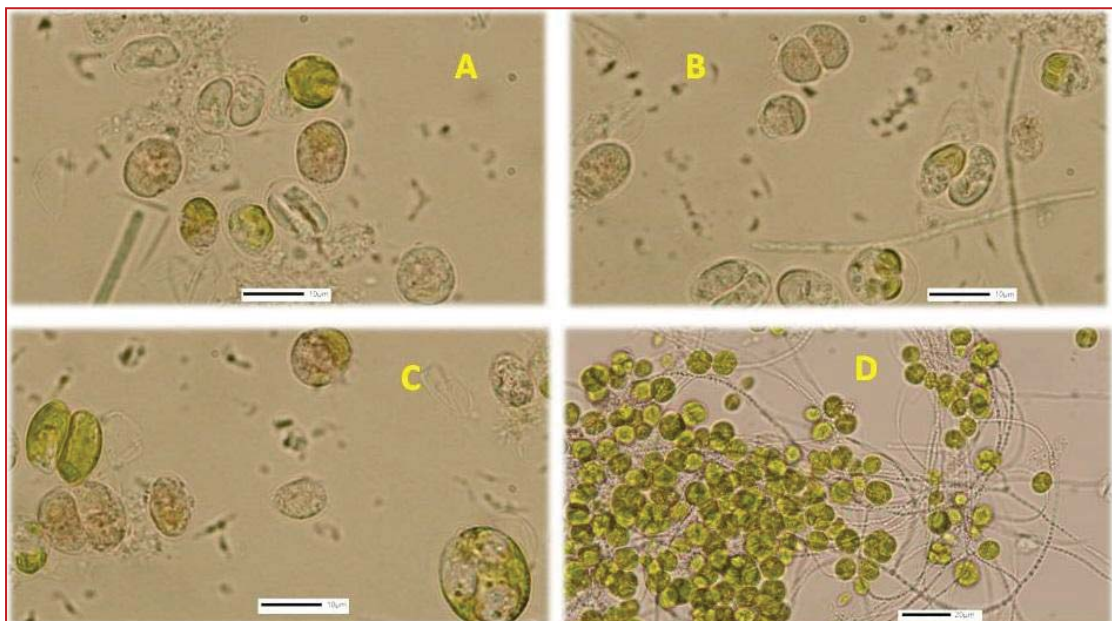
λιμνοθάλασσα Κοτυχίου και $11,32 \pm 0,78$ (sd) μm κατά τον επιμήκη άξονα και $7,95 \pm 1,06$ (sd) μm κατά το πλάτος για το είδος που απομονώθηκε από τη λιμνοθάλασσα Πάππας Αχαΐας. Το εξαιρετικά ενδιαφέρον χαρακτηριστικό όμως αυτού του μικροφύκου είναι ο σκουρο-κόκκινος χρωματισμός που αποκτά το νερό στο δοχείο καλλιέργειάς του όταν η καλλιέργεια ωριμάσει. Έτσι ενώ στην αρχική της φάση (χαμηλή συγκέντρωση κυττάρων) η καλλιέργεια είναι χρώματος σκουρο-πράσινου (Σχήμα 35) προϊόντος του χρόνου αποκτά φαιο-κόκκινο χρώμα (Σχήμα 37 A, B, C & F, Σχήμα 38A). Το κοκκινωπό χρώμα της καλλιέργειας οφείλεται φυσικά στο αντίστοιχο κοκκινωπό χρώμα των κυττάρων του (Σχήμα 36, Σχήματα 39, 40, 41, 42 & 43) το οποίο παρατηρείται στο μικροσκόπιο ως κοκκώδη ποικίλων διαμέτρων έγκλειστα σε όλη τη μάζα του κυττάρου ανάμικτο με αντίστοιχα πράσινης απόχρωσης.

Προφανώς πρόκειται για ποικίλα καρωτενοειδή τα οποία δεν απαντώνται σε τόση ένταση σε κανένα άλλο από τα γνωστά είδη *Tetraselmis*. Μάλιστα απομονώθηκαν δύο ποικιλίες αυτού του μικροφύκου, μία από τη λιμνοθάλασσα Κοτυχίου που παρουσιάζει πράσινο συνήθη χρωματισμό των κυττάρων όταν βρίσκονται στην αρχική εκθετική φάση αύξησης και κατόπιν όταν η καλλιέργεια ωριμάσει πολύ (στατική φάση) κοκκινίζουν ελαφρά και κατόπιν αποκτούν σκούρο μπορντό χρώμα και μία άλλη από τη λιμνοθάλασσα Πάππας Αχαΐας στην οποία τα κύτταρα εξ' αρχής είναι κοκκινωπά (Σχήμα 39A, Σχήματα 42 & 43). Την μεν πρώτη ποικιλία την ονομάζουμε *Tetraselmis red var. kotyhi* την δε δεύτερη *Tetraselmis red var. rappas*.

Αμφότερες οι ποικιλίες όταν υποστούν φυγοκέντρωση σε δείγμα που λαμβάνεται από τις καλλιέργειές τους, παρουσιάζουν το μοναδικό φαινόμενο το υπερκείμενο νερό στο δοχείο φυγοκέντρωσης να είναι κόκκινο το δε ίζημα (τα κύτταρα) να είναι πράσινο στο *Tetraselmis red var. kotyhi* (Σχήμα 38B) και σκουρο-κόκκινο στο *Tetraselmis red var. rappas*. Στη βιβλιογραφία δεν απαντήσαμε παρόμοια περίπτωση. Προφανώς το κόκκινο χρώμα του νερού στο υπερκείμενο οφείλεται σε απροσδιόριστες ουσίες που παράγουν τα κύτταρα και αποβάλλουν στο νερό με ποικίλη ένταση.



Σχήμα 35. Καλλιέργειες *Tetraselmis* sp. red σε δοχεία Erlenmeyer των 500 ml όπου φαίνεται το φαιοπράσινο χρώμα της καλλιέργειας με τη φιάλη αριστερά να έχει ήδη αποκτήσει φαιο-κόκκινο χρώμα.



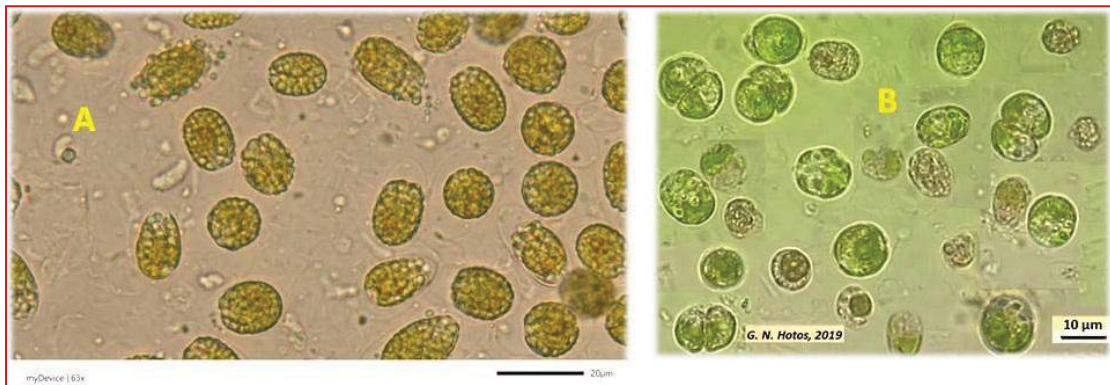
Σχήμα 36. Μικροφωτογραφίες *Tetraselmis* sp. red από τη λιμνοθάλασσα Κοτυχίου με κύτταρα πράσινα και φαιο-κόκκινα. Στα A, B & C γραμμή κλίμακας 10 μm, 1000X, στο D 20 μm, 400X.



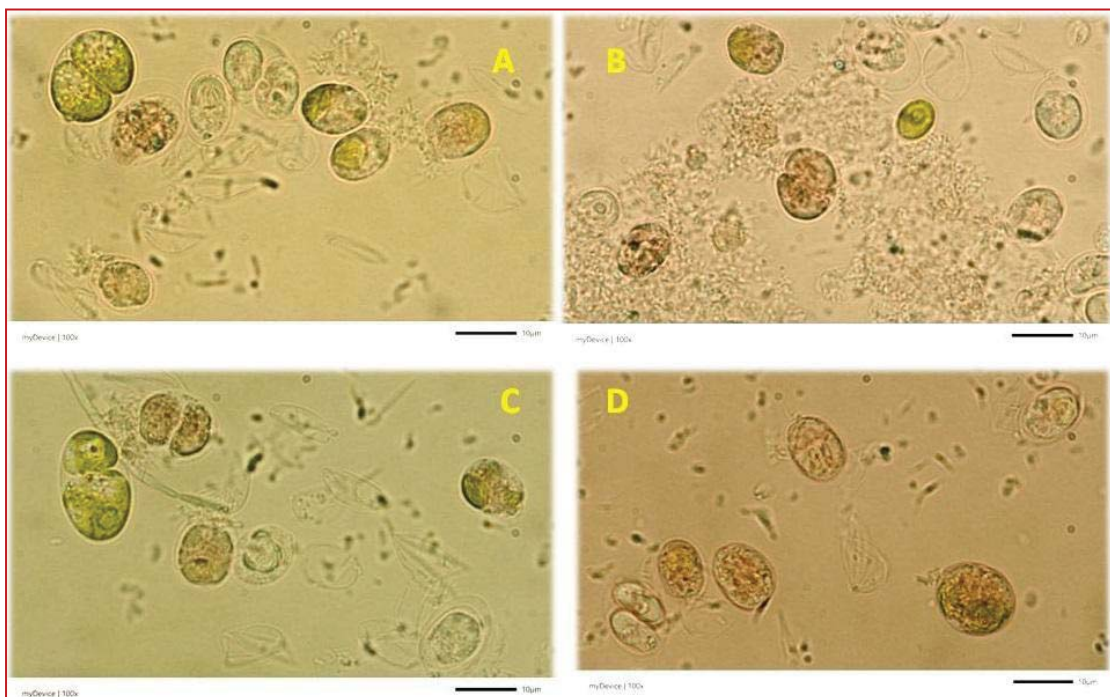
Σχήμα 37. Καλλιέργειες *Tetraselmis* sp. red που έχουν αποκτήσει έντονο κοκκινωπό χρώμα. Στο A και στο B (μπουκάλι δεξιά) το υγρό δεν περιέχει κύτταρα παρά μόνο το υπερκείμενο υγρό της φυγοκεντρημένης ποσότητας. Στο C φαίνονται καλλιέργειες σε διαφορετικές φάσεις ωρίμανσης για να φανεί η χρωματική μετάβαση από το καφετί αριστερά στο φαιοκόκκινο και στο κόκκινο (δεξιά). Στο D κύτταρα *Tetraselmis marina* var *messolonghi* για σύγκριση & με την *Tetraselmis* red στο E, γραμμή κλίμακας 20 µm, 630X.



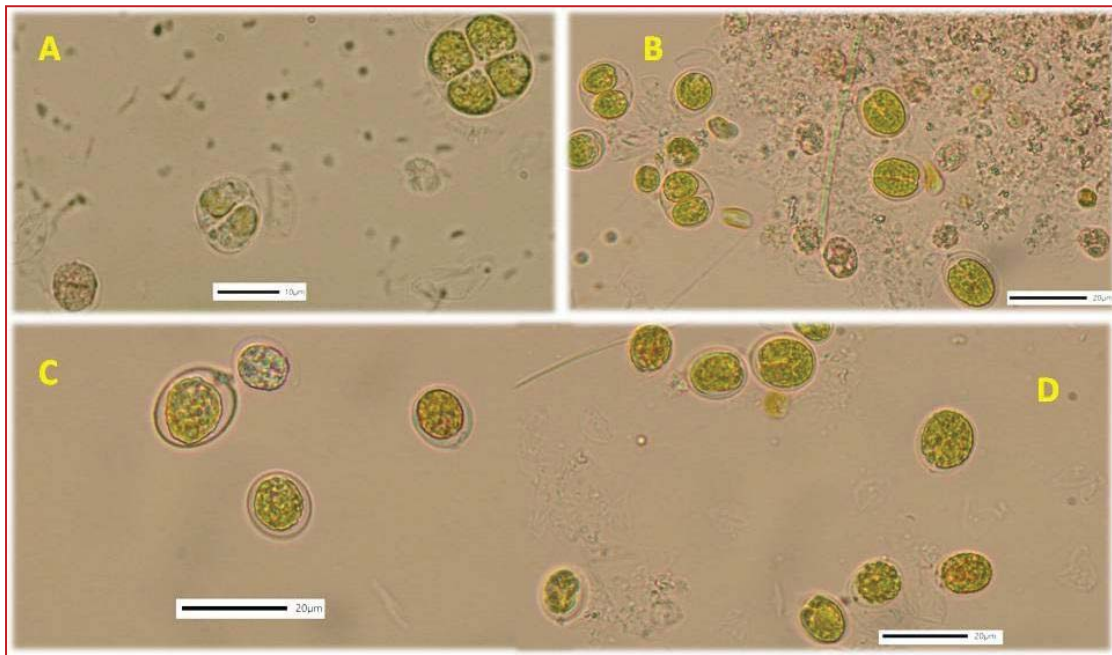
Σχήμα 38. Στο A υπερκείμενο κόκκινο νερό από φυγοκεντρημένη ποσότητα με την κυβέτα δίπλα που θα φωτομετρηθεί. Στο B οι σωλήνες με το φυγοκεντρημένο δείγμα όπου το υπερκείμενο είναι κοκκινωπό και το ίζημα που περιέχει τα κύτταρα είναι πρασινωπό.



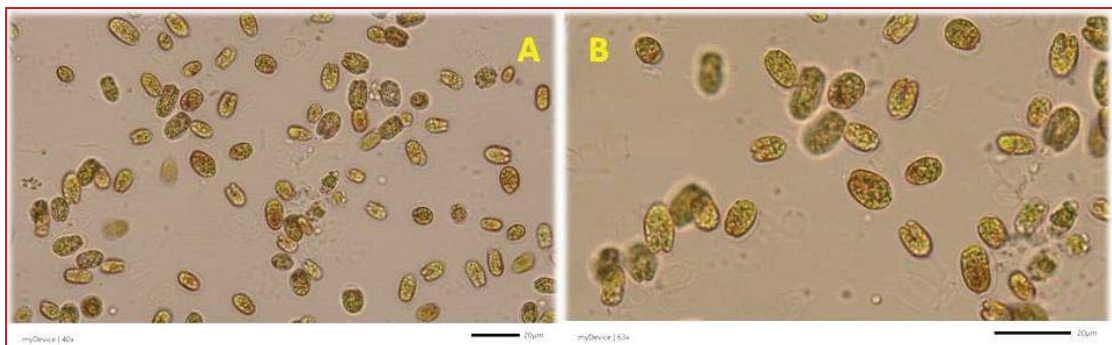
Σχήμα 39. Μικροφωτογραφίες *Tetraselmis* sp. red από τη λιμνοθάλασσα Πάππας (A), γραμμή κλίμακας 20 µm, 630X και Κοτυχίου (B). Στο A όλα τα κύτταρα κοκκινίζουν στο B πράσινα και κόκκινα.



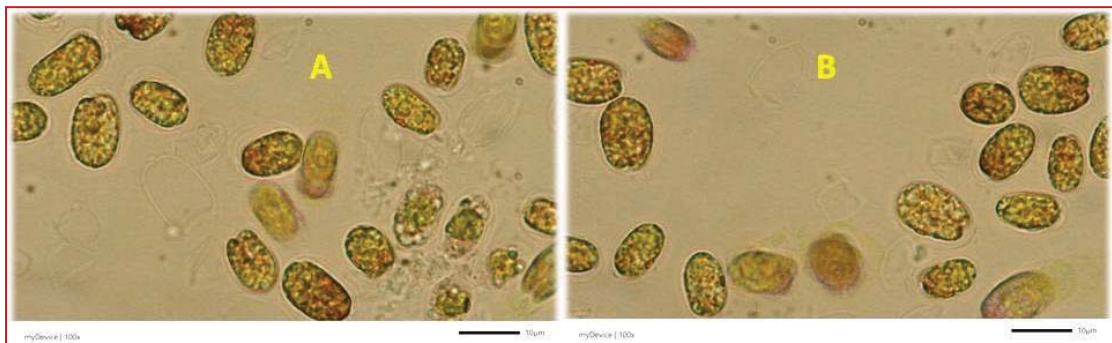
Σχήμα 40. Μικροφωτογραφίες *Tetraselmis* sp. red από τη λιμνοθάλασσα Κοτυχίου, γραμμή κλίμακας 10 µm, 1000X. Εμφανής η ποικιλία στα μεγέθη. Στα A και C πράσινα και κόκκινα κύτταρα σε διαίρεση.



Σχήμα 41. Μικροφωτογραφίες *Tetraselmis* sp. red από τη λιμνοθάλασσα Κοτυχίου. Στο Α κυτταρική διαίρεση με 4 θυγατρικά κύτταρα, γραμμή κλίμακας 10 μm , 1000X, στο Β μεγάλη ποικιλία μεγεθών και κυτταρική διαίρεση σε παλμέλλα, 20 μm , 630X, στο C ποικιλία μεγεθών παλμελλοειδών κυττάρων, 20 μm , 630X, στο D ποικιλία μεγεθών, 20 μm , 630X.



Σχήμα 42. Μικροφωτογραφίες *Tetraselmis* sp. red από τη λιμνοθάλασσα Πάππας με εμφανώς κοκκινισμένα κύτταρα, Α: 20 μm , 400X, Β: 20 μm , 630X.



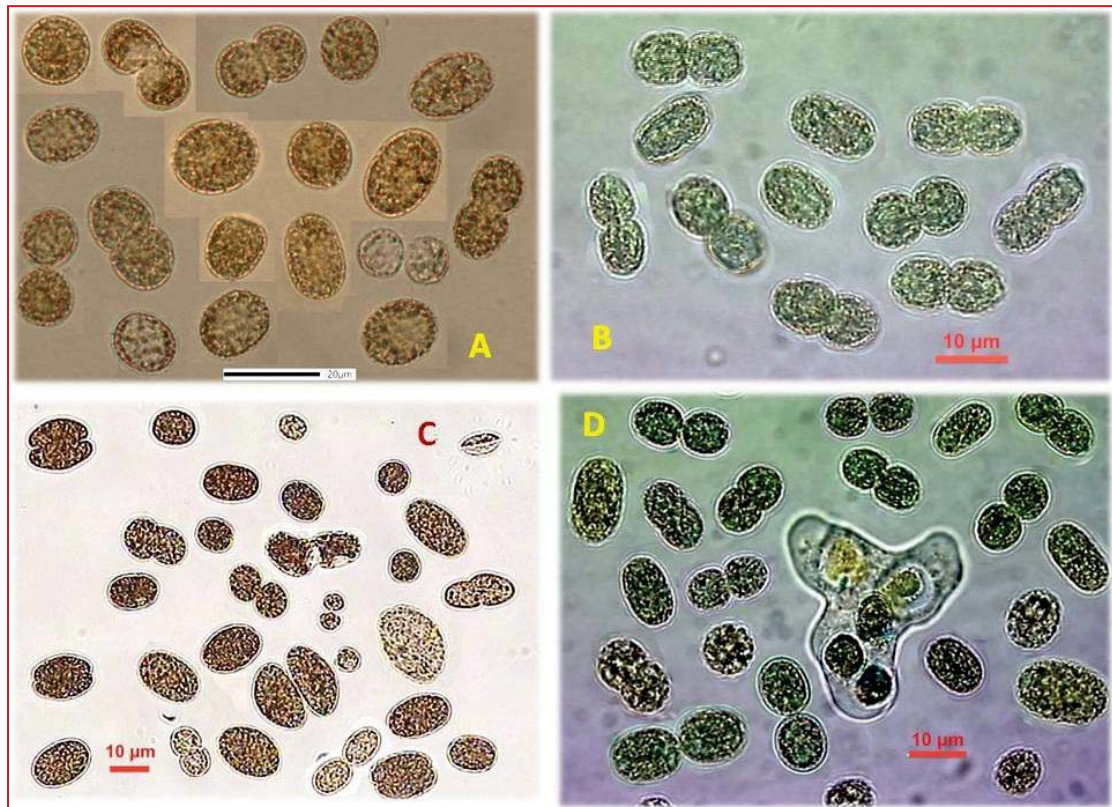
Σχήμα 43. Μικροφωτογραφίες *Tetraselmis* sp. red από τη λιμνοθάλασσα Πάππας με εμφανώς κοκκινισμένα κύτταρα, 10 μm , 1000X.

Synechococcus sp.



Συστηματική κατάταξη

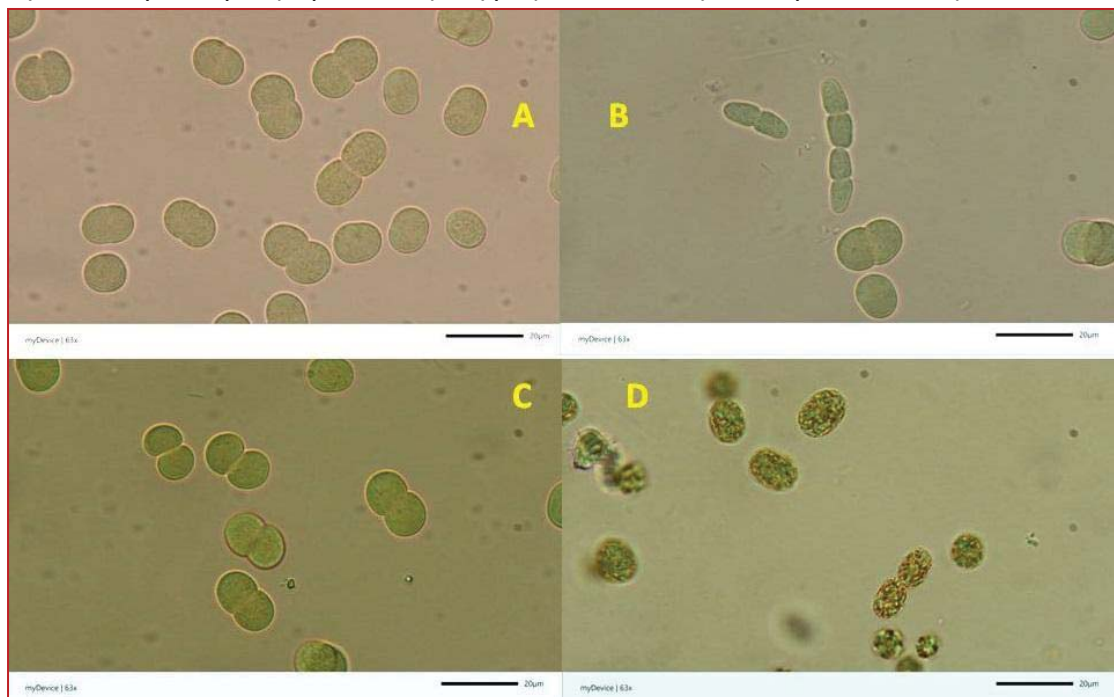
Υπερβασίλειο:	Προκαρυωτικά
Βασίλειο:	Ευβακτήρια
Φύλο:	Κυανοβακτήρια
Ομοταξία:	Cyanoophyceae
Τάξη:	Synechococcales
Οικογένεια:	Synechococcaceae
Γένος:	<i>Synechococcus</i>
Είδος:	<i>Synechococcus</i> sp.



Σχήμα 44. Εντονη ποικιλομορφία των κυττάρων του απομονωθέντος από τις αλυκές Μεσολογγίου κοκκοειδούς κυανοβακτηρίου *Synechococcus* sp. Στο A κολάζ κυττάρων με καφετί χρώμα, συμμετρικώς οβάλ και εμφανές κυτταρικό τοίχωμα, γραμμή κλίμακας 20 μm, 630X. Στο C καφετί χρώματος με μεγάλη ποικιλία μεγεθών και μορφών. Στα B και D κύτταρα κυανοπράσινα προφανώς λόγω μεγάλης ποσότητας της χρωστικής φυκοκυανίνης. Στο D μια αμοιβάδα έχει περικλείσει ορισμένα κύτταρα και πέψει κάποια απ' αυτά. Σε όλες τις φωτογραφίες εμφανές το κοκκώδες του κυτταροπλάσματος, το κυτταρικό τοίχωμα και διάφορα στάδια κυτταρικών σχάσεων.

Πλαγκτονικό κυανοβακτήριο με κύτταρα μονήρη (Σχήματα 44 & 45) και ποτέ αποικιακά. Ενίοτε όμως τα κύτταρα ενωμένα δημιουργούν αλυσίδες-σειρές μικρού μήκους και ενίοτε καμπυλωμένες (Σχήμα 47 B, C & D, Σχήμα 48 B & D) όμως σε καμία περίπτωση παρόμοιες με αυτές που χαρακτηρίζουν το *Anabaena* ή το *Nostoc*. Δεν παρατηρούνται επίσης σε αυτές τις περιστασιακές ως φαίνεται αλυσίδες κυττάρων ούτε ετερόκυτα, ούτε κύτταρα ακινήτες, συνεπώς το συγκεκριμένο είδος χαρακτηρίζεται ως μη αζωτοδεσμευτικό. Κίνηση των κυττάρων δεν παρατηρήθηκε και μάλλον η κίνηση δεν αποτελεί χαρακτηριστικό τους.

Όμως μία φορά παρατηρήσαμε και καταγράψαμε σε βίντεο (<https://www.youtube.com/watch?v=gR8yxSM9Yt4>) εμφανή αργή έστω κίνησή τους κάτι που μας οδηγεί στο να μην αποκλείσουμε εντελώς μια τέτοια δυνατότητά τους την οποία για λόγους άγνωστους εκφράζουν σπανίως και περιστασιακώς.



Σχήμα 45. Κοκκοειδή κυανοβακτήρια *Synechococcus* sp. με ποικιλία μεγεθών κυττάρων και πολλές κυτταρικές διαιρέσεις. Στα A, B & C το κοκκώδες του κυτταροπλάσματος έχει αντικατασταθεί από ομοιόμορφο περιεχόμενο μετά από φυγοκέντρηση για άγνωστο λόγο. Στο D τα κύτταρα δεν έχουν υποστεί φυγοκέντρηση και είναι κανονικά κοκκώδη. Στο B μια αλυσίδα κυττάρων κυλινδρικού σχήματος. Γραμμή κλίμακας 20 μm, 630X.

Το σχήμα των κυττάρων είναι άλλοτε σχεδόν σφαιρικό, άλλοτε οβάλ, άλλοτε ραβδόμορφο και μερικές φορές διογκωμένο ελαφρά καμπυλωτό ή ελαφρά σιγμοειδές πάντοτε όμως αποστρογγυλεμένο στα άκρα. Το μέγεθος ποικίλλει πολύ για κάθε δείγμα που εξετάσαμε και ανάλογα με τη φάση ωρίμανσης της καλλιέργειας. Σε γενικές γραμμές τα κύτταρα όταν είναι μονήρη και σφαιρικά έχουν διάμετρο 8-12 μm και όταν βρίσκονται ως θυγατρικά της διαίρεσης ενωμένα ~ 15 μm. Το περιεχόμενο του κυτοπλάσματος είναι ομοιογενές ή με πολυάριθμα ομοιόμορφα κατανεμημένα κοκκώδη έγκλειστα. Ο χρωματισμός του κυττάρου

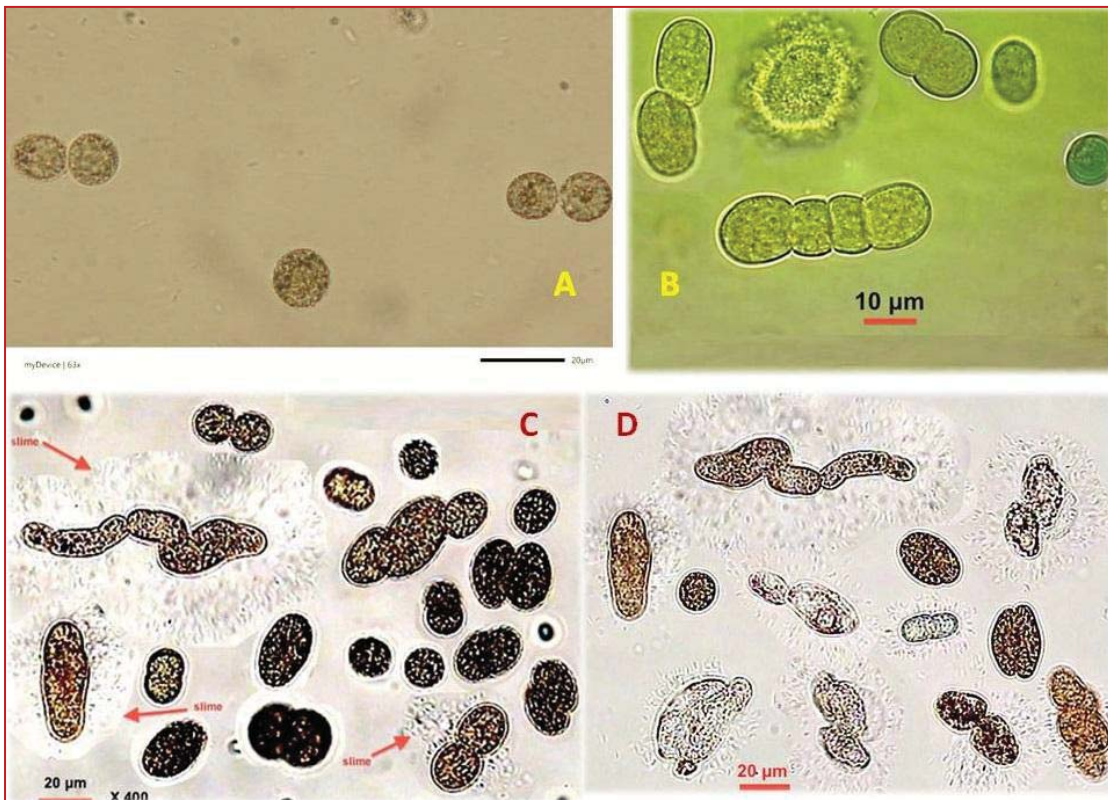
ποικίλλει ανάλογα με τις φυσικοχημικές συνθήκες του νερού, την ηλικία της καλλιέργειας και το χρώμα των προαναφερθέντων εγκλείστων. Έτσι παρουσιάζεται χρωματικός πολυμορφισμός με κύτταρα ανοιχτό μπλε-πράσινα (κυανοπράσινα), λαμπερό κυανοπράσινο, λαδοπράσινα, καφε-κόκκινο έως ελαφρά ροζέ. Σε μακροσκοπικό επίπεδο δηλαδή ως προς το χρώμα που παρουσιάζουν οι καλλιέργειες αυτού του κυανοβακτηρίου μπορούμε να παρατηρήσουμε καλλιέργειες άλλοτε κυανοπράσινου χρώματος, άλλοτε λαδοπράσινου και άλλοτε πορτοκαλόχρους αντίστοιχα. Δεν είναι ξεκάθαρο αν αυτή η ποικιλία του χρωματισμού του οφείλεται στη γνωστή χρωματική προσαρμογή που παρουσιάζεται στα κυανοβακτήρια ή είναι άλλου τύπου μεταβολική διεργασία. Δεν παρατηρήθηκαν εμφανή αεροτόπια.

Το κύτταρο καλύπτεται από μια ευδιάκριτη στοιβάδα κυτταρικού τοιχώματος. Εσωτερικός τα αμυδρά διακρινόμενα θυλακοειδή διατάσσονται ομόκεντρα ακολουθώντας το περίγραμμα του τοιχώματος. Τα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα παραγωγής βλέννας (Σχήμα 47 B, C & D) την οποία ενίοτε (ιδιαίτερα σε ώριμες καλλιέργειες) παράγουν και εκκρίνουν σε μεγάλες ποσότητες με αποτέλεσμα υπερβολική παραγωγή αφρού στην επιφάνεια (Σχήμα 46) και κρεμώδη υφή του νερού που περιέχει τα κύτταρα.

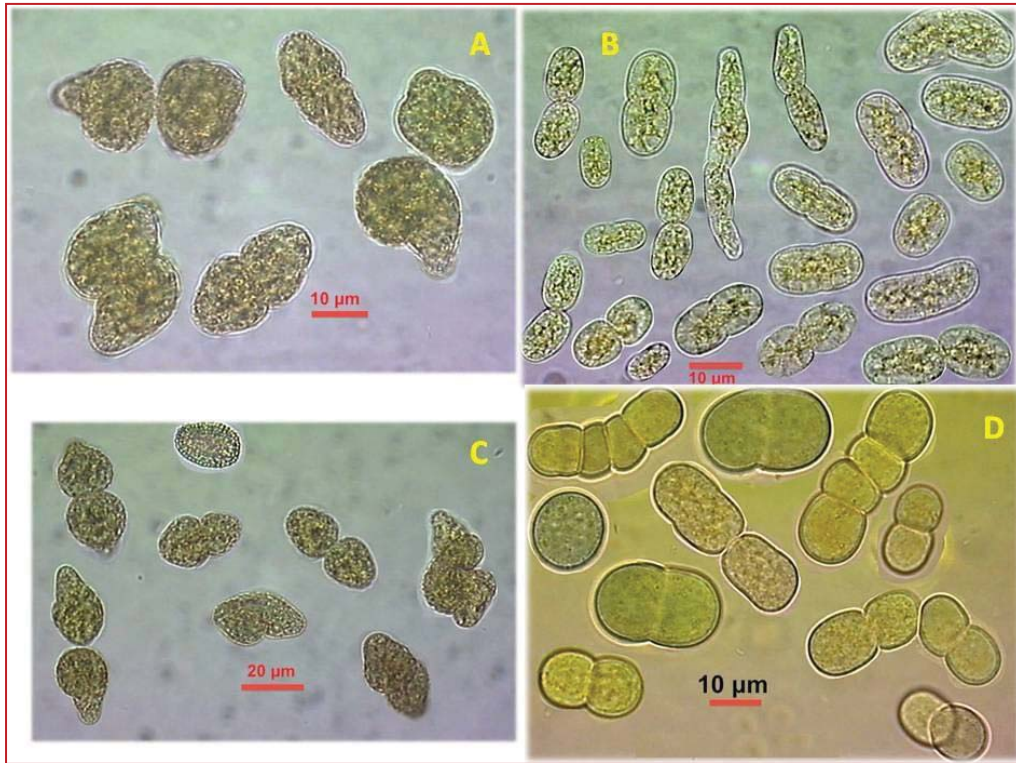
Αναπαράγεται με κυτταρική σχάση (πάντοτε 2 θυγατρικά κύτταρα) με κατεύθυνση κάθετη στον μακρύτερο άξονα του κυττάρου (Σχήμα 49). Τα απόλυτα συμμετρικά θυγατρικά κύτταρα αυξάνονται στο αρχικό μητρικό κύτταρο για να ξανα-διαιρεθούν. Με την ολοκλήρωση της κυτταρικής διαίρεσης τα προκύπτοντα κύτταρα είτε αποχωρίζονται πλήρως, είτε παραμένουν ενωμένα για αρκετό διάστημα σε κοντές αλυσίδες εν είδη νήματος (ψευδονημάτια). Όταν οι συνθήκες καλλιέργειας χειροτερέψουν (π.χ. εξάντληση θρεπτικών) τα κύτταρα παραμορφώνονται ελαφρώς (Σχήμα 48) χάνοντας τη συμμετρία τους (ασυμμετρικά) και διαιρούνται ασυμμετρικά.



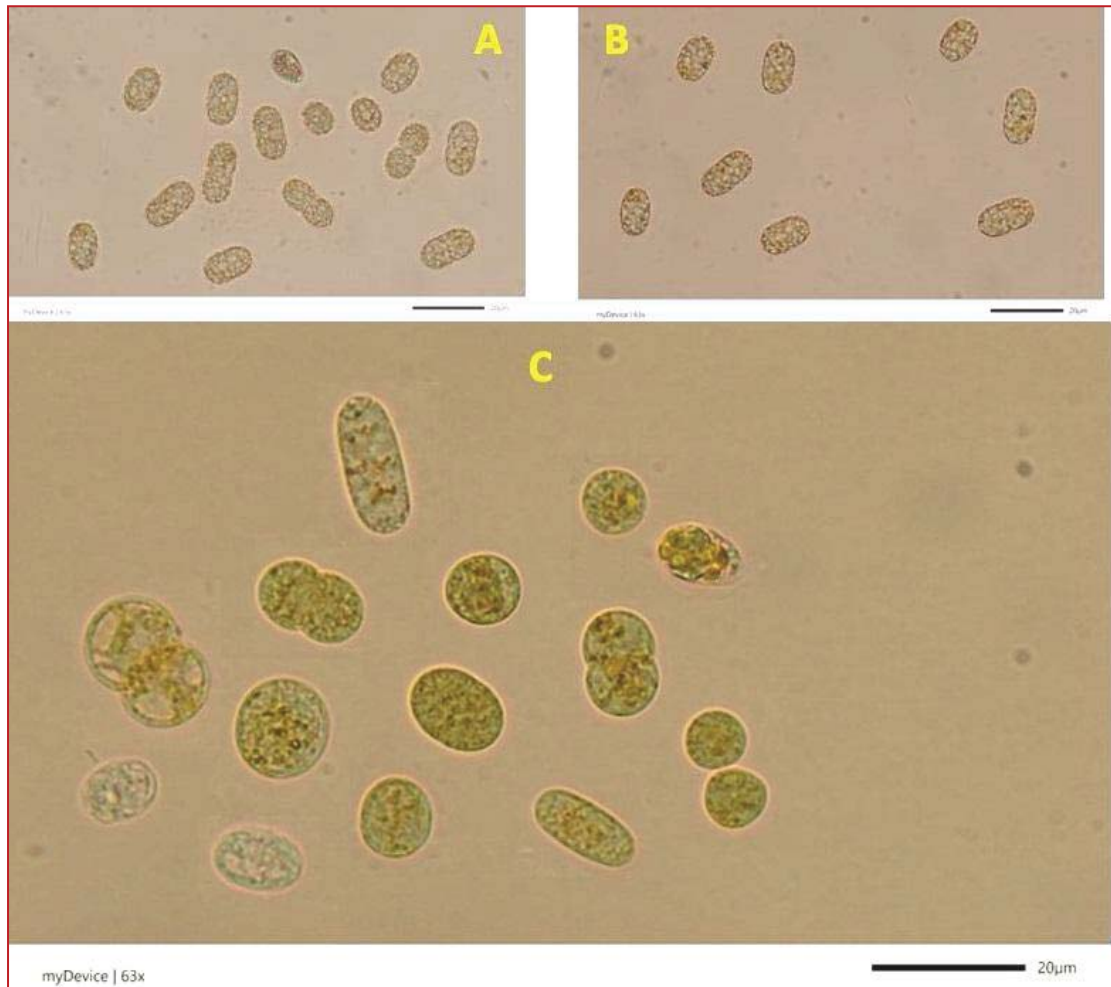
Σχήμα 46. Εντονος αφρισμός καλλιεργειών κυανοβακτηρίου *Synechococcus* sp.



Σχήμα 47. Εντονη ποικιλομορφία κυττάρων του κοκκοειδούς κυανοβακτηρίου *Synechococcus* sp. με μάζες βλέννας να καλύπτουν αρκετά από αυτά (βέλη στο C, όλα τα κύτταρα στο D). Ασύμμετρα κύτταρα και αλυσίδες κυττάρων στα B, C & D.



Σχήμα 48. Εντυπωσιακή ποικιλία μορφών ασυμμετρικών κυττάρων του κοκκοειδούς κυανοβακτηρίου *Synechococcus* sp.



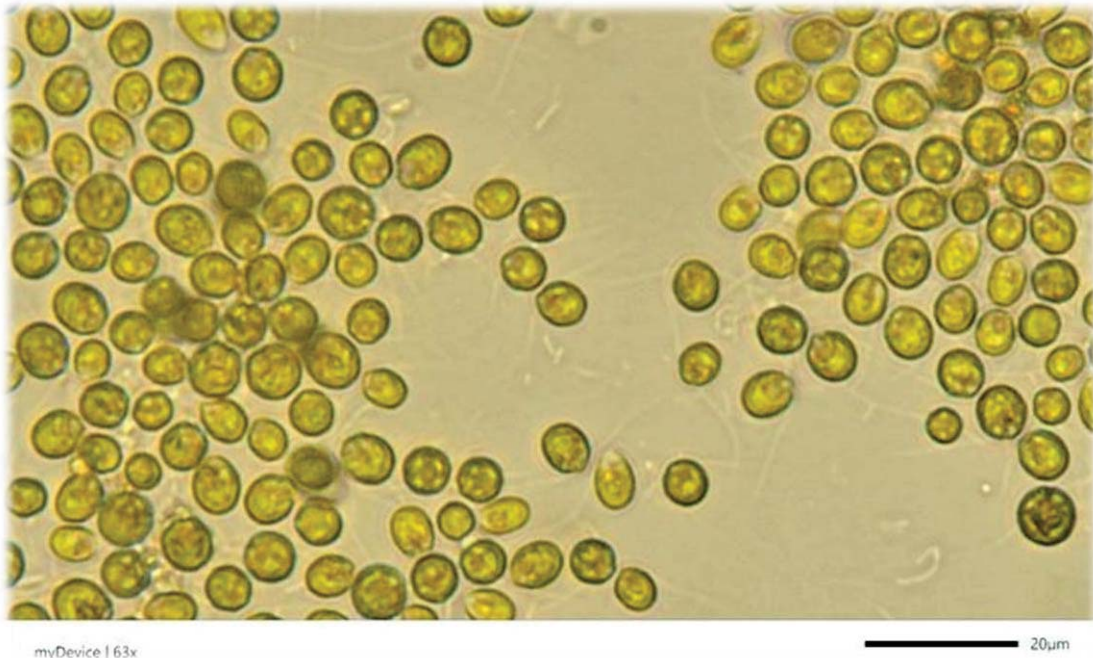
Σχήμα 49. Κύτταρα του κοκκοειδούς κυανοβακτηρίου *Synechococcus* sp. σε έντονη κυτταρική διαίρεση. Το κύτταρο πριν διαιρεθεί επιμηκύνεται και από σφαιρικό γίνεται κυλινδρικό και ακολουθεί σύσφιγξη περί το μέσον και κατόπιν διαχωρισμός των θυγατρικών κυττάρων. Τα θυγατρικά κύτταρα μπορεί να παραμείνουν επί μακρόν ενωμένα στο σημείο σύσφιγξης.

Dunaliella salina



Συστηματική κατάταξη

Υπερβασίλειο:	Ευκαρυωτικά
Βασίλειο:	Πρώτιστα
Φύλο:	Chlorophyta
Ομοταξία:	Chlorophyceae
Τάξη:	Chlamydomonadales
Οικογένεια:	Dunaliellaceae
Γένος:	<i>Dunaliella</i>
Είδος:	<i>Dunaliella salina</i>

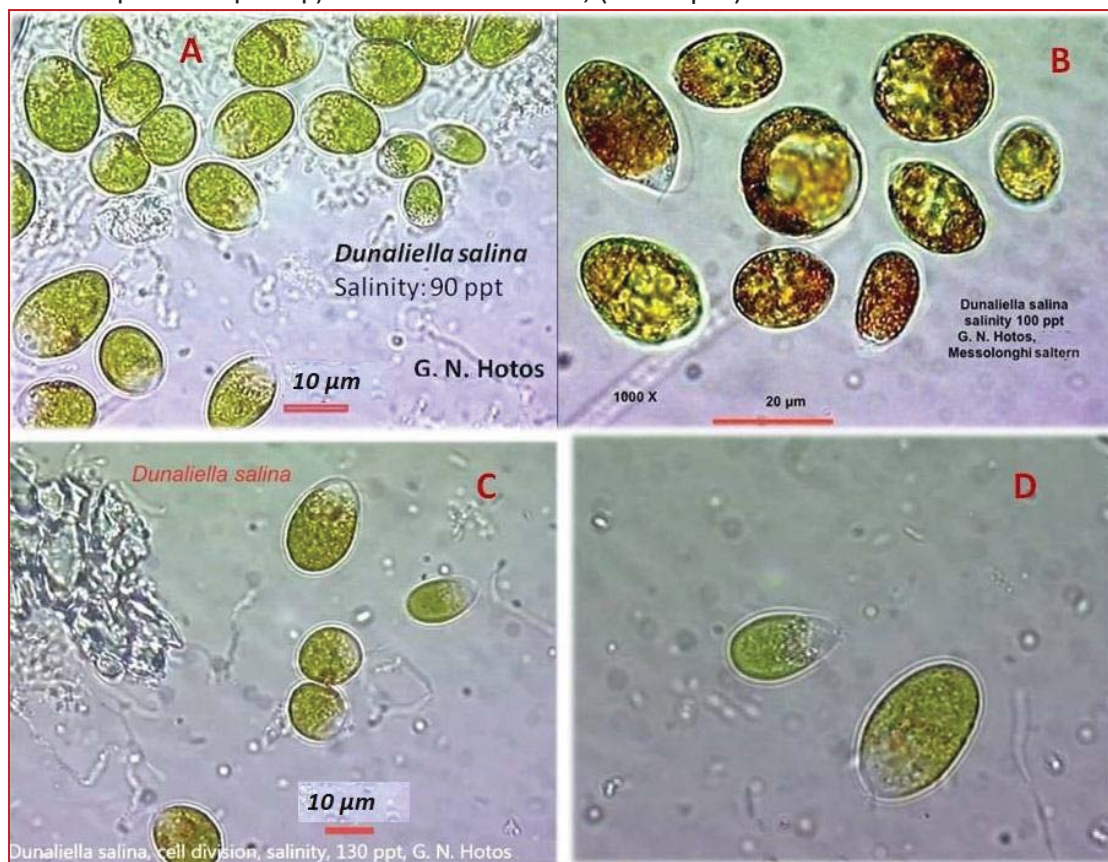


Σχήμα 50. Μάζα κυττάρων του αλοανθεκτικού χλωροφύκου *Dunaliella salina*.

Είδος μονοκύτταρο πλαγκτονικό (Σχήμα 50) χωρίς κυτταρικό τοίχωμα (γυμνό) και έντονου πράσινου χρώματος (Σχήμα 51 A, C & D) στη βλαστική φάση των κυττάρων (όχι κύστεις, όχι ακραίες αλατότητες). Το πιο χαρακτηριστικό γνώρισμα όλων των ειδών του γένους *Dunaliella* και ιδιαίτερα του *Dunaliella salina* που απομονώσαμε από τις αλυκές Μεσολογίου είναι η εξαιρετική αντοχή του στα υπεράλμυρα νερά.

Όλα τα είδη της *Dunaliella* είναι μονοκύτταρα, χωρίς κυτταρικό τοίχωμα (γυμνά) και διαθέτουν 2 ισομεγέθη μαστίγια μήκους μεγαλύτερου (1,5-2 φορές) από αυτό του θαλλού (κυττάρου) τους. Ο πυρήνας είναι ευμεγέθους βρίσκεται σε κεντρική θέση στο εμπρόσθιο μέρος (το μέρος όπου εκφύονται τα μαστίγια) του αχλαδοειδούς τυπικού σχήματος κυττάρου και ως εμπρόσθιο ονομάζουμε το στενό

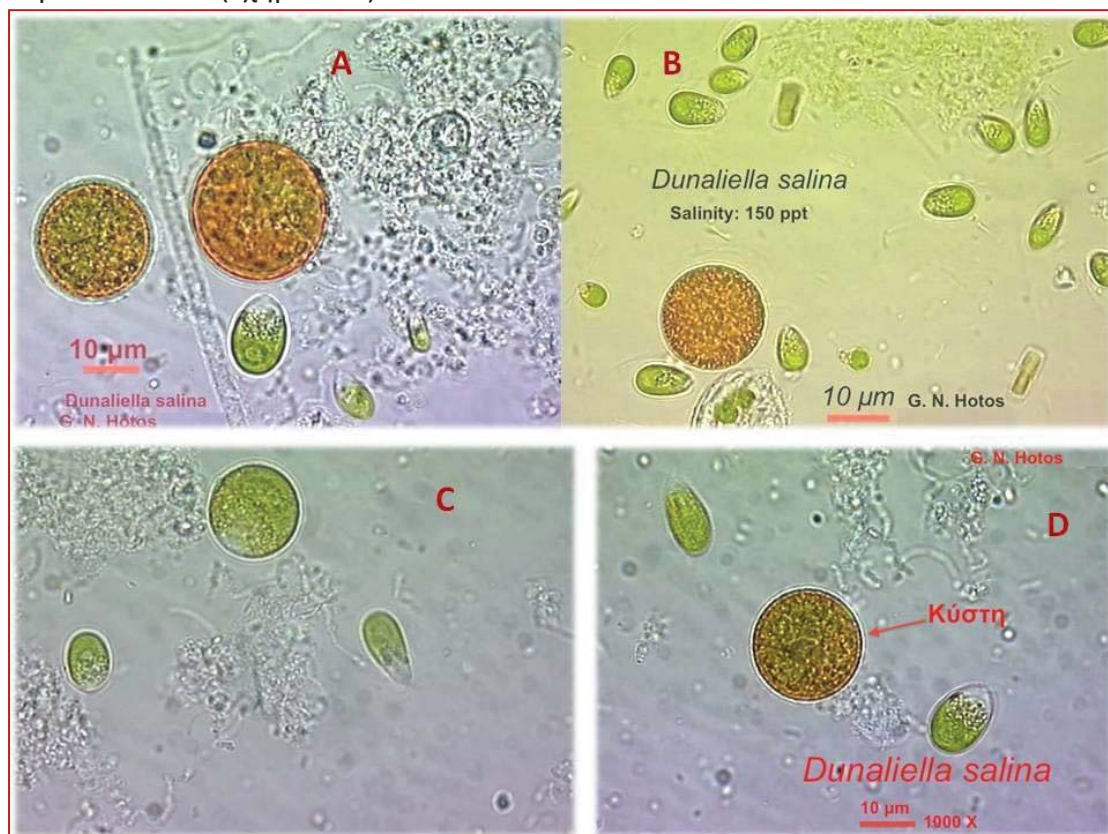
τμήμα ενώ ως οπίσθιο το αποστρογγυλεμένο στην απέναντι άκρη. Ο πυρήνας περιβάλλεται κατά το μεγαλύτερο μέρος του από τον μεγάλο χλωροπλάστη που γεμίζει σχεδόν το πρωτόπλασμα και από διάφορα μικρά κενοτόπια. Η ανυπαρξία κυτταρικού τοιχώματος δεν επιτρέπει την ακαμπτότητα (σταθερότητα) του κυτταρικού σχήματος το οποίο λόγω του ότι είναι πολύ εύπλαστο εύκολα επηρεάζεται από την ωσμωτική κατάσταση του περιβάλλοντος νερού και ανάλογα διογκώνεται ή συρρικνώνεται (μέχρι εκεί που πρέπει βέβαια διότι το κύτταρο έχει μηχανισμό ωσμωρύθμισης) ανάλογα με το αν το νερό είναι πολύ αραιότερο ή πυκνότερο σε σχέση με το κυτταρόπλασμα. Το μέγεθος του κυττάρου ποικίλλει πάρα πολύ τόσο ανάμεσα στα διάφορα είδη όσο και στο ίδιο το είδος ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν. Ένα τυπικό μέγεθος είναι αυτό των 7-12 μm κατά τον επιμήκη άξονά του αλλά πολύ συχνά απαντάται και σε μεγέθη 16-24 μm . Είναι πολύ κινητικό είδος και τα πολύ γρήγορα χτυπήματα των μαστιγίων του το προωθούν προς τα εμπρός σε μια χαρακτηριστική πορεία με απότομες και στριφογυριστές κινήσεις κατά τον οριζόντιο άξονα του κυττάρου. Το μέσου (τυπικού) μεγέθους κύτταρο της *Dunaliella* πάντως είναι αρκετά μικρότερο συγκριτικά με άλλα είδη μαστιγιοφόρων χλωροφυκών που απαντώνται στην υπεραλατότητα όπως αυτό της *Asteromonas gracilis* (18 -25 μm) ή της *Tetraselmis marina* (20 - 30 μm) ή σε κανονική αλατότητα της *Rhodomonas salina*, (10-15 μm).



Σχήμα 51. *Dunaliella salina* με ποικιλία στα μεγέθη κυττάρων και έντονο πράσινο χρώμα σε αλατότητες κάτω των 100 ppt (A, C & D) και διόγκωση με κοκκίνισμα λόγω συσσώρευσης β-καρωτίνης σε αλατότητες άνω των 100 ppt στο B.

Το σχήμα του κυττάρου της *Dunaliella* παρουσιάζει μεγάλη ποικιλότητα και ενώ η τυπική του μορφή είναι αχλαδοειδής μπορεί να γίνεται κυλινδρικό, οβάλ, ελλειψοειδές, ατρακτοειδές ή σφαιρικό ανάλογα (Σχήμα 52) με τις μεταβολές των συνθηκών, δηλαδή θερμοκρασία, φως, θρεπτικά και πάνω απ' όλα αλατότητα. Ως γενικό κανόνα πάντως μπορούμε να πούμε ότι σε δυσμενείς συνθήκες (κυρίως εξάντληση των θρεπτικών) μεταπίπτει στη σφαιρική μορφή.

Το μέγεθος του κυττάρου ποικίλλει επίσης πάρα πολύ και σε μια ακμάζουσα καλλιέργεια με κύτταρα στην εκθετική φάση αύξησης του πληθυσμού, παρατηρούνται ποικίλα μεγέθη (Σχήμα 51 A, C & D) με την πλειονότητα σε ένα τυπικό μέγεθος 8-10 μm (κατά τον επιμήκη άξονα) και 4-5 μm (κατά πλάτος), και ένα μικρότερο ποσοστό μικρότερων κυττάρων της τάξεως των 5-8 μm προφανώς προερχομένων από πρόσφατο πολλαπλασιασμό μέσω ζυγώτη ή απλανοσπορίων. Σε συνθήκες πολύ υψηλής αλατότητας όπου ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μειώνεται δραματικά τα κύτταρα μεγαλώνουν σε μέγεθος και μπορούν να φθάσουν και 15 μm ενώ συνάμα αρχίζουν να αποκτούν πορτοκαλί χροιά λόγω συσσώρευσης καρωτενοειδών (Σχήμα 51B).

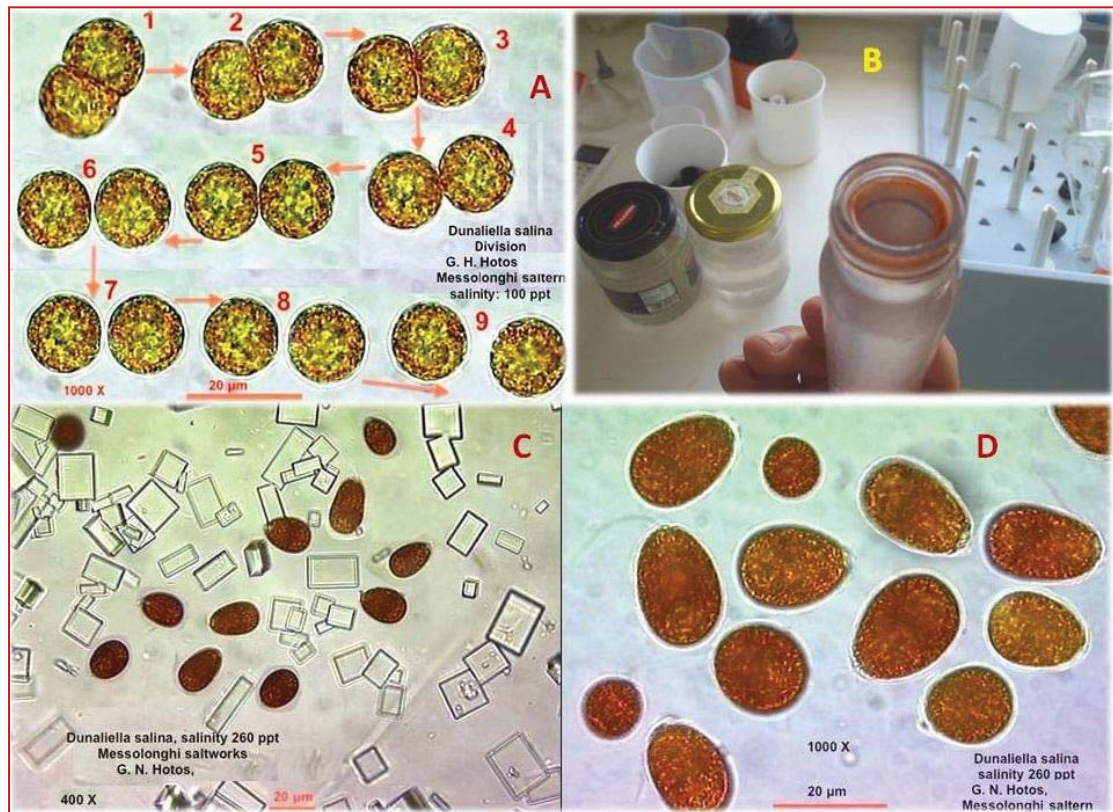


Σχήμα 52. *Dunaliella salina*. Κύστεις σφαιρικού σχήματος ανάμεσα σε πράσινα βλαστητικά κύτταρα και με έντονη συσσώρευση β -κρωτίνης (A, B & C). Στο C η κύστη είναι πράσινη και εικάζεται ότι είναι ζυγωτικό κύτταρο στη φάση να υποστεί μειωτική και μιτωτικές διαιρέσεις.

Υπάρχουν πολλές αναφορές ότι η *Dunaliella* σχηματίζει κύστεις είτε σε παλμελλοειδή μορφή (εγκλεισμός σε βλεννώδη κάψα, δεν το παρατηρήσαμε όμως)

είτε από μεταμόρφωση του βλαστητικού κυττάρου, είτε από το σχηματισμό ζυγώτη. Εκτός από την περίπτωση του ζυγώτη οι άλλες δύο περιπτώσεις ενκύστωσης φαίνεται ότι προκαλούνται από έντονες αλλαγές στα χαρακτηριστικά του νερού και μάλιστα ως προς τα δύο άκρα της αλατότητας δηλαδή είτε έντονη πτώση της αλατότητας είτε δραματική αύξησή της που ενίοτε καταλήγει στην πλήρη εξάτμιση της υδάτινης μάζας. Ομως και η παγωνιά μπορεί να προκαλέσει ενκύστωση όπως επίσης και η έλλειψη θρεπτικών. Οι κύστες αυτές βυθίζονται και εναποτίθενται στον πυθμένα όπου μπορούν να παραμείνουν για πολύ καιρό (άγνωστο πόσο) σε αδράνεια και να μεταμορφωθούν σε κινητικά (με μαστίγια) βλαστητικά κύτταρα όταν οι συνθήκες καλύτερέψουν. Στην κίνηση και στην κυτταρική εμφάνιση η *Dunaliella* αναφέρεται συχνά σε επιστημονικά κείμενα ότι μοιάζει με το πολυερευνημένο χλωρο-μικροφύκος *Chlamydomonas* όμως πέραν του ότι η *Chlamydomonas* διαθέτει κυτταρικό τοίχωμα, το σχήμα των κυττάρων τους διαφέρει δεδομένου ότι το μεν *Chlamydomonas* είναι σχεδόν σφαιρικού σχήματος ενώ το *Dunaliella* αχλαδοειδές. Αντί για άκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα η *Dunaliella* διαθέτει ένα αξιοπρόσεκτο βλεννώδες κάλυμμα αποτελούμενο κυρίως από γλυκοπρωτεΐνες.

Δεν διαθέτει σφυγμώδες κενοτόπιο (συνήθως στο εμπρόσθιο μέρος του κυττάρου) που βοηθά άλλα φύκη στην ωσμωρύθμιση διότι η *Dunaliella* έχει άλλη "στρατηγική" αντιμετώπισης των ωσμωτικών πιέσεων με το να παράγει και συσσωρεύει γλυκερόλη ενδοκυτταρικά. Μοιάζει όμως με τη *Chlamydomonas* στο ότι διαθέτουν και τα δύο ένα μεγάλο κυπελλοειδή χλωροπλάστη και διαφέρουν συνάμα στο ότι η *Dunaliella* που απαντάται στα αλμυρά και υπεράλμυρα νερά διαθέτει σε κεντρική θέση του χλωροπλάστη της και ένα πυρηνοειδές το οποίο περιβάλλεται από συσσωματώματα αμύλου (προϊόντα της φωτοσύνθεσης). Στο εμπρόσθιο άκρο του κυττάρου και ανάλογα με τη φυσιολογική κατάσταση διακρίνεται ποικίλος αριθμός κοκκίων (σταγονιδίων) ελαίου (λιπιδίων). Η γλυκερόλη (γλυκερίνη) που όπως προαναφέρθηκε παράγει η *Dunaliella* στις υψηλές αλατότητες, είναι ενίοτε τόσο μεγάλη σε ποσότητα που η περίσσειά της εκκρίνεται από το κύτταρο και το νερό της καλλιέργειας συσσωρεύει επιφανειακά πυκνό λευκό αφρό κρεμώδους υφής (Σχήμα 54 D).



Σχήμα 53. *Dunaliella salina*. Στο Α κολάζ από φωτογραφίες διαδοχικών φάσεων κατά τη διάρκεια της μιτωτικής διαίρεσης ενός σφαιρικού κυττάρου με μεγάλη ποσότητα β-καρωτίνιου. Στο C αχλαδοειδούς σχήματος έντονα χρωματισμένα από πολύ β-καρωτίνιο κύτταρα σε υψηλότερη αλατότητα >250 ppt ανάμεσα σε σχηματισθέντες ήδη κρυστάλλους αλατιού. Στο D μεγάλα αχλαδοειδή κύτταρα από υψηλή αλατότητα, σφύζοντα σε β-καρωτίνιο που κατακλύζει το κύτταρο. Στο Β μια χαρακτηριστική φωτογραφία από φυγοκέντρηση καλλιέργειας *Dunaliella* σε νερό αλατότητας > 200 ppt, το πολύ πυκνό νερό δεν επιτρέπει την καθίζηση των κυττάρων οπότε συμπυκνώνονται στην επιφάνεια του δοχείου ως κόκκινη στρώση.

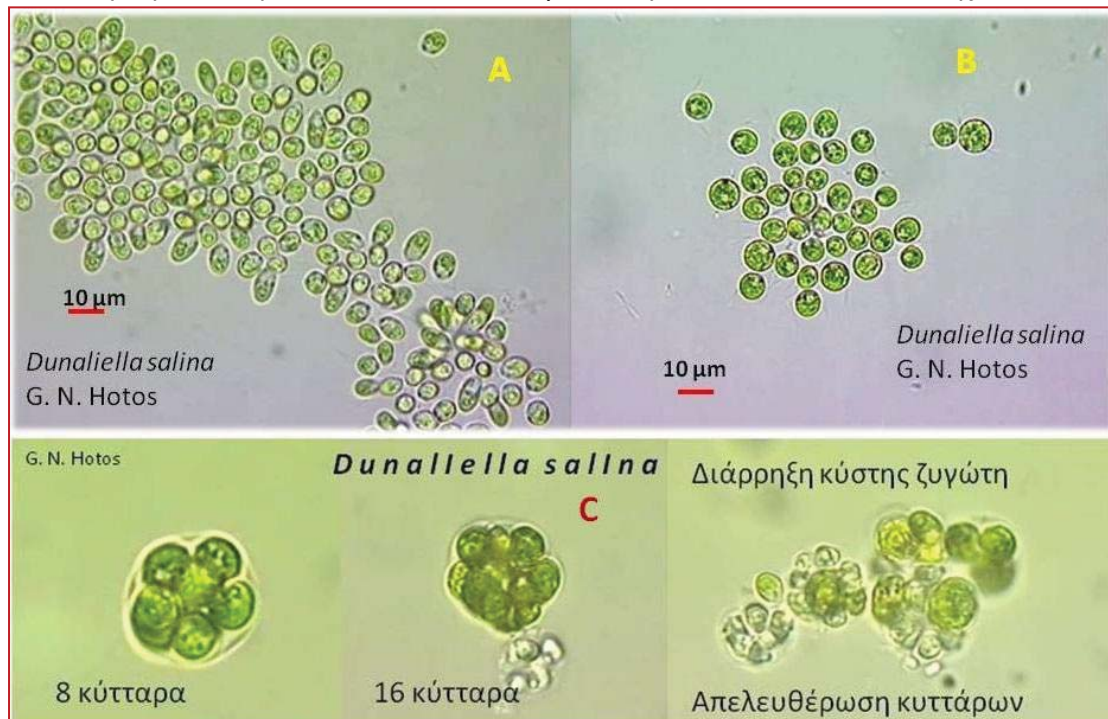
Το άλλο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των πολύ αλοανθεκτικών ειδών *Dunaliella salina* και *D. parva* είναι η σε υψηλές αλατότητες συσσώρευση εντός του χλωροπλάστη τους μεγάλων ποσοτήτων της χρωστικής β-καρωτίνιο η οποία υπό μορφή σταγονιδίων καταλαμβάνει την περιφέρεια του χλωροπλάστη και χρωματίζει το κύτταρο πορτοκαλο-κόκκινο (Σχήμα 53 C & D). Η αλλαγή του χρωματισμού του κυττάρου από πράσινο (όταν έχει λίγο β-καρωτίνιο) σε πορτοκαλο-κόκκινο (πολύ β-καρωτίνιο) οφείλεται στο ότι τα καρωτίνια σκεπάζουν την πράσινη χλωροφύλλη και επειδή ο χλωροπλάστης αποτελεί τη μεγαλύτερη μάζα του κυττάρου το χρώμα του κυττάρου καθορίζεται από τα καρωτίνια που καλύπτουν το χλωροπλάστη.



Σχήμα 54. *Dunaliella salina*. Συλλογή δείγματος από λεκάνη υψηλής αλατότητας των αλυκών Μεσολογίου με κοκκινωπό χρώμα λόγω ανάπτυξης αρχαίων βακτηριδίων *Halobacterium salinarum* και του χλωροφύκου *Dunaliella salina*. Στα Β & C καλλιέργεια *Dunaliella salina* σε πολύ υψηλή αλατότητα με κόκκινο χρώμα λόγω μεγάλων ποσοτήτων β-καρωτινίου ενδοκυτταρικά. Στο D καλλιέργεια *Dunaliella salina* σε χαμηλότερη αλατότητα με το τυπικό πράσινο χρώμα που όμως έχουν αρχίσει να υφίστανται τεχνητή ανύψωση της αλατότητας (πρόσθεση αλατιού) και παράγουν πολύ γλυκερόλη που συσσωρεύεται στην επιφάνεια ως λευκός αφρός.

Το φαινόμενο του πορτοκαλο-κόκκινου χρωματισμού βρίσκει την κλασική του και πλέον έντονη έκφραση στο είδος *D. salina* που ακμάζει στις λεκάνες με την πολύ υψηλή αλατότητα (αντέχει και 300 ppt), συνήθως στις αλυκές (Σχήμα 54 Α, Β & C) όπου επικρατεί βαθμιαία (με την ύψωση της αλατότητας) ως το μοναδικό μικροφύκος εκεί. Ο ρόλος του β-καρωτινίου πέραν του ότι δρα ως επικουρική χρωστική για τη χλωροφύλλη (μεταφέρει στη χλωροφύλλη-α του φωτοσυνθετικού κέντρου φωτόνια), είναι και η προστασία της χλωροφύλλης καθώς και του κυτταρικού DNA από την υπερβολική έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία (και από το μέρος του φάσματος της UV) στις συνθήκες που επικρατούν στις λουσιμένες στον ήλιο αβαθείς υπεράλμυρες λεκάνες. Δρα με άλλα λόγια ως μια ασπίδα ηλιοπροστασίας. Επιπλέον τα πολλά β-καρωτίνη δρουν και ως "αποθήκη" του πλεονάζοντος άνθρακα που δεσμεύεται από τα εντόνως φωτοσυνθέτοντα κύτταρα

τα οποία όμως σε αυτές τις συνθήκες δεν πολλαπλασιάζονται έντονα. Δηλαδή με άλλα λόγια ο υπάρχων πληθυσμός της *Dunaliella salina* σε υπεραλατότητα και έντονο φως δεν αυξάνεται αλλά τα κύτταρά του φωτοσυνθέτουν και "παχαίνουν".



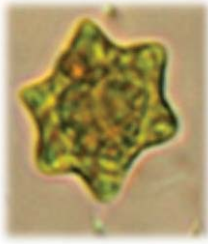
Σχήμα 55. *Dunaliella salina*. Στα A & B συσσωματώματα κυττάρων σε κανονικές αλατότητες (~40 ppt) με το χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα και σε αχλαδοειδή A) και σφαιρική μορφή (B). Στο C αποτυπώνονται 3 φάσεις της δημιουργίας 16 θυγατρικών κυττάρων από μια πράσινη κύστη ζυγώτη (σαν κι αυτή του Σχήματος 52C).

Η *Dunaliella* πολλαπλασιάζεται με κυτταρική κατά το μακρύ άξονα διαίρεση όταν ιδίως βρίσκεται στην κινητική της φάση (υπάρχει και φάση που στρογγυλεύει και δεν κινείται). Όταν η καλλιέργεια παρατηρείται μικροσκοπικώς και βρίσκεται σε ακμαία φάση τα κύτταρα είναι πολύ κινητικά, τα μαστίγια πάλλονται και η κίνηση είναι γρήγορη με κινήσεις μάλλον ακανόνιστες και διαστήματα "ανάπαυσης" με τρεμούλιασμα. Ενίοτε τα κύτταρα συγκεντρώνονται κατά μεγάλους αριθμούς σε συσσωματώματα που μοιάζουν με "τσαμπιά" σταφυλιού τα οποία είναι ακανονίστου σχήματος και μεγέθους. Αλλά αποτελούνται από λίγα κύτταρα και άλλα από εκατοντάδες. Στα τσαμπιά αυτά τα κύτταρα είναι διατεταγμένα με κάποιο τρόπο που φαίνεται να εξυπηρετεί κάποιο σκοπό. Οι οξύληκτες μεριές των κυττάρων εκεί δηλαδή όπου εκφύονται τα μαστίγια βρίσκονται προς το εσωτερικό του τσαμπιού ενώ η αντίθετη πλευρά τους (η διογκωμένη, μην ξεχνάμε ότι το κύτταρο είναι αχλαδοειδές) "βλέπει" προς τα έξω. Τα μαστίγια σε αυτά τα συσσωματώματα όσο και αν είναι πυκνά στριμωγμένα φαίνεται να διατηρούν κάποια κινητικότητα. Με προσεκτική παρατήρηση βλέπουμε ότι περιοδικώς νέα κύτταρα έρχονται να προστεθούν στο εκάστοτε τσαμπί, ενώ άλλες φορές κάποια κύτταρα αποσπώνται από αυτό απομακρύνονται και αποκτούν τη συνήθη μεγάλη

κινητικότητα τους. Ενίοτε πάλι η απομάκρυνση πολλών κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα διαλύει το συσσωμάτωμα. Η σημασία αυτού του φαινομένου για την επιβίωση του είδους παραμένει ανεξήγητη στη βιβλιογραφία (δεν έχει αναφερθεί καν εξ' όσων μελετήσαμε), αλλά αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι συμβαίνει σε σφριγηλές καλλιέργειες.

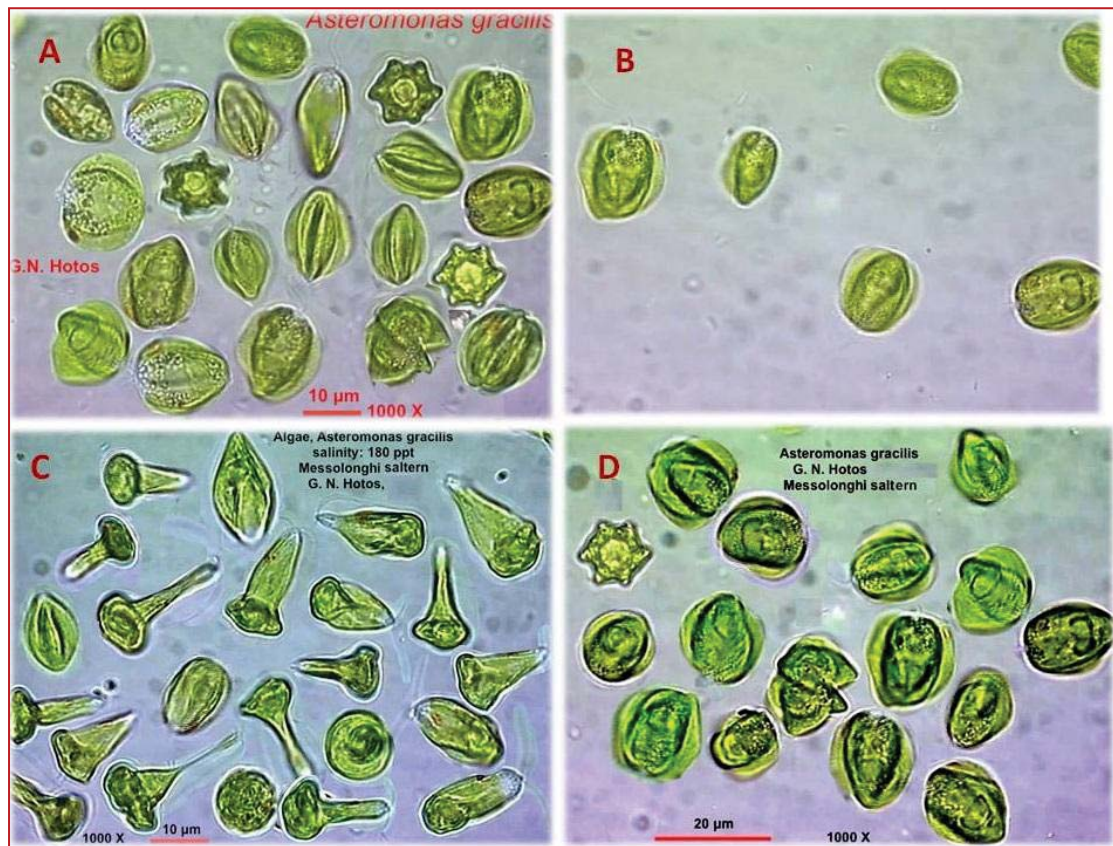
Αναφέρθηκε το φαινόμενο της συσσωμάτωσης (Σχήμα 55 A & B) για να περιγραφούν και οι ενώσεις των κυττάρων και πιο συγκεκριμένα αυτή που παρατηρείται κατά τη σύζευξη γαμετών (ισογαμία), δηλαδή της ένωσης δύο κυττάρων με το εμπρόσθιο οξύληκτο μέρος τους με σκοπό τη σύντηξη των απλοειδών πυρήνων τους και τη δημιουργία του διπλοειδούς ζυγώτη. Πρόκειται για τον άλλο τρόπο αναπαραγωγής τον αμφιγονικό όπου το κάθε συζευγνόμενο κύτταρο παίζει το ρόλο του "θηλυκού" ή "αρσενικού" γαμέτη. Κατά τη σύζευξη εκτός από τους πυρήνες δημιουργείται και κοινό μεγαλύτερο κυτταρόπλασμα και ο ζυγώτης που σχηματίζεται είναι στρογγυλός, έχει χάσει τα μαστίγια, είναι πράσινος ή κόκκινος και περιβάλλεται από ένα λείο και παχύ κυτταρικό τοίχωμα με κυρίαρχο συστατικό τη σποροπολενίνη. Ο ζυγώτης περιπίπτει αρχικά σε φάση αδράνειας (άγνωστη η ακριβής διάρκειά του) και κατόπιν αρχικώς με μία μειωτική διαίρεση και στη συνέχεια με μιτωτικές σχηματίζει μέχρι 32 απλοειδή μικροσκοπικά κύτταρα (Σχήμα 55C) τα οποία απελευθερώνονται μετά από διάρρηξη του μητρικού τοιχώματος και ελεύθερα πλέον κινούνται με τα μαστίγια τους και αυξάνονται μέχρι το κανονικό μέγεθος του είδους.

Asteromonas gracilis



Συστηματική κατάταξη

Υπερβασίλειο: Ευκαρυωτικά
 Βασίλειο: Πρώτιστα
 Φύλο: Chlorophyta
 Ομοταξία: Chlorophyceae
 Τάξη: Chlamydomonadales
 Οικογένεια: Asteromonadaceae
 Γένος: *Asteromonas*
 Είδος: *Asteromonas gracilis*



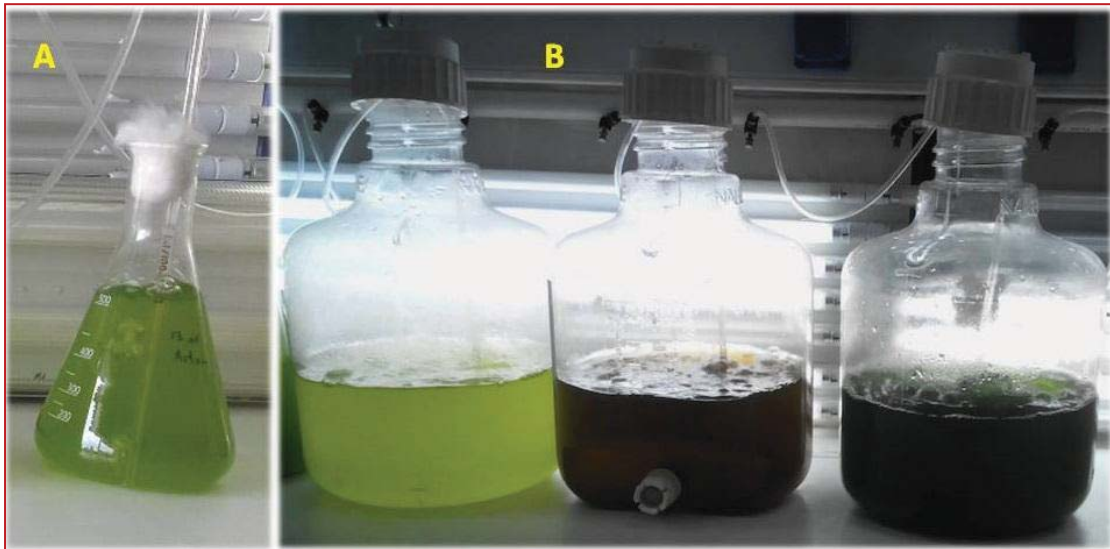
Σχήμα 56. Σύνθεση μικροφωτογραφιών όπου αποτυπώνεται ο εκπληκτικός πολυμορφισμός των κυττάρων της *Asteromonas gracilis*. Στο Α ποικιλία κυτταρικών μορφών με την τυπική ατρακτοειδή καθώς και την αστεροειδή. Στο Β τυπική ατρακτοειδής μορφή. Στο C κύτταρα σε ακραία παραμόρφωση (ζωντανά και κινητικά όμως) σε πολύ υψηλή αλατότητα (~ 180 ppt) και στο D τυπικά κύτταρα με το ζωηρό πράσινο χρώμα τους, ένα σε θέση που φαίνεται αστεροειδές και ένα σε φάση διαίρεσης.

Μονοκύτταρο πλαγκτονικό χλωροφύκος (Σχήμα 56) χωρίς κυτταρικό τοίχωμα (γυμνό). Τα πιο σημαντικά μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυσιολογικών, ώριμων κυττάρων (βλαστητικών) του είδους *Asteromonas gracilis*, με το οπτικό μικροσκόπιο είναι:

- ατρακτοειδές σχήμα, που είναι άλλοτε στενό και άλλοτε όχι (Σχήμα 56A, Σχήμα 59A),
- ενίοτε λόγω της χαρακτηριστικής τρομώδους κίνησης του κυττάρου αυτό τοποθετείται έτσι στο χώρο που φαίνεται αστεροειδές (Σχήμα 56A, Σχήμα 59B),
- 2 μαστίγια προσαρτημένα στο ανώτερο τμήμα τους, γέρνουν πλευρικά κάνοντας τη «θηλή», που βρίσκεται και αυτή στο ανώτερο τμήμα τους, άλλοτε περισσότερο και άλλοτε λιγότερο εμφανή,
- απουσία κυτταρικού τοιχώματος,
- 3 έως 6 (το πιο χαρακτηριστικό 6) «εγκοπές» (σαν καρίνα), που διατρέχουν κατά μήκος πλευρικά όλο το κύτταρο (Σχήμα 56B),
- μέσο μήκος $18,84 \pm 2,88$ (sd) μm κατά τον επιμήκη άξονα και $13,09 \pm 2,4$ (sd) μm κατά το πλάτος και με ακραία μεγέθη 12-22 μm κατά τον επιμήκη άξονα και 8,7 - 16,36 μm κατά το πλάτος,
- μήκος μαστιγίων ίσο με $1\frac{1}{2}$ έως 2 φορές το μήκος του θαλλού,
- εξωτερική επιφάνεια χωρίς φολίδα, παρ' όλα αυτά στην επιφάνεια του σώματος και των μαστιγίων συχνά διακρίνονται λεπτές ινώδεις αποθέσεις (χαρακτηριστικά ορατά με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο).
- Σε ένα ζωντανό κύτταρο του είδους *Asteromonas gracilis* διακρίνεται ένα σύνολο κυτταρικών οργανιδίων και σχηματισμών στο εσωτερικό του κυτταροπλάσματος. Ένα από τα βασικότερα είναι ο χλωροπλάστης με σχεδόν λεκανοειδή μορφή. Είναι λεπτός και ωχρός (χωρίς έντονο πράσινο χρώμα) στην μεγαλύτερή του επιφάνεια. Εκτείνεται μέχρι το πάνω τμήμα του κυττάρου, σχεδόν μέχρι τη βάση των μαστιγίων. Διαθέτει ένα ασύμμετρο πυρηνοειδές (ή pyrenoid, πρωτεϊνικό σώμα στο εσωτερικό του χλωροπλάστη, που είναι το κέντρο σχηματισμού του αμύλου), που συνδέεται άμεσα με το οπίσθιο τμήμα του μεγάλου πυρήνα. Στο ανώτερο τμήμα του σώματος και μέσα στον χλωροπλάστη διακρίνεται ένα πορτοκαλί στίγμα, η οφθαλμική κηλίδα (ή stigma). Ο πυρήνας είναι μεγάλος και περιέχει έναν ευδιάκριτο πυρηνίσκο. Είναι τοποθετημένος σχεδόν στο κέντρο του κυττάρου και το μπροστινό του τμήμα εκτείνεται σχεδόν μέχρι τη βάση των μαστιγίων
- Επιπλέον στην εσωτερική πλευρά του κυττάρου, στην επιφάνεια του κυτταροπλάσματος, διακρίνονται πολλά μικρά μιτοχόνδρια. Στο μπροστινό τμήμα του κυττάρου είναι κατανεμημένα περισσότερο ή λιγότερο συμμετρικά γύρω από τον πυρήνα αρκετά δικτυοσώματα 4-6 στον αριθμό, που όλα μαζί αποτελούν το σύστημα Golgi. Ο μεγάλος αριθμός μικρο-κυστιδίων, που διακρίνονται στο μπροστινό τμήμα του κυττάρου, μεταξύ των δικτυοσωμάτων, πιθανόν εξέρχονται από αυτά.

- Πολλές κύστει (Σχήμα 58) με λεπτό τοίχωμα συχνά συσσωρεύονται στον πυθμένα μιας παλιάς καλλιέργειας. Δεν έχει βρεθεί κάποιο στοιχείο, που να συνδέει το σχηματισμό των κύστεων με την αναπαραγωγική διαδικασία. Τα κύτταρα που πρόκειται να σχηματίσουν κύστει μεγεθύνονται σημαντικά, διατηρώντας σχετικά μικρό το πυρηνοειδές. Το τοίχωμα της κύστης μοιάζει αρχικά να επικάθεται, σαν ένα ασυνεχές στρώμα περιφερειακά του κυτταροπλάσματος, που στη συνέχεια λεπταίνει, ξεκινώντας από το εσωτερικό. Οι απόλυτα ώριμες κύστει έχουν διάμετρο, που κυμαίνεται από 13 έως 18μm και πάχος τοιχώματος από 2 έως 3 μm.

Αναπαράγεται με κυτταρική διαίρεση (Σχήμα 60) με διαχωρισμό των θυγατρικών κυττάρων κατά τον επιμήκη άξονα, δηλαδή τη νοητή γραμμή που συνδέει την ακραία περιοχή έκφυσης των μαστιγίων με το οπίσθιο εξόγκωμα του κυττάρου. Δεν παρατηρήθηκε σεξουαλική αναπαραγωγή συνεπώς ούτε ζυγώτης κάποιας μορφής (διογκωμένο κύτταρο, κύστη ή παλμέλλα) και φυσικά ούτε σπόρια (απλανοσπόρια ή πολλαπλές διαιρέσεις ζυγώτη).

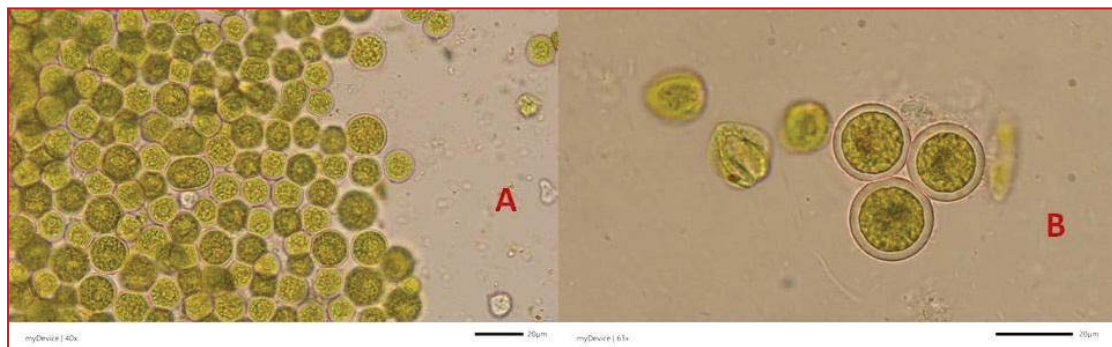


Σχήμα 57. Δοχεία με καλλιέργεια *Asteromonas gracilis* σε διάφορες φάσεις ωρίμανσης με το τυπικό λαμπερό πράσινο χρώμα που στις ώριμες καλλιέργειες γίνεται σκουρο-πράσινο (δεξιά δοχεία).

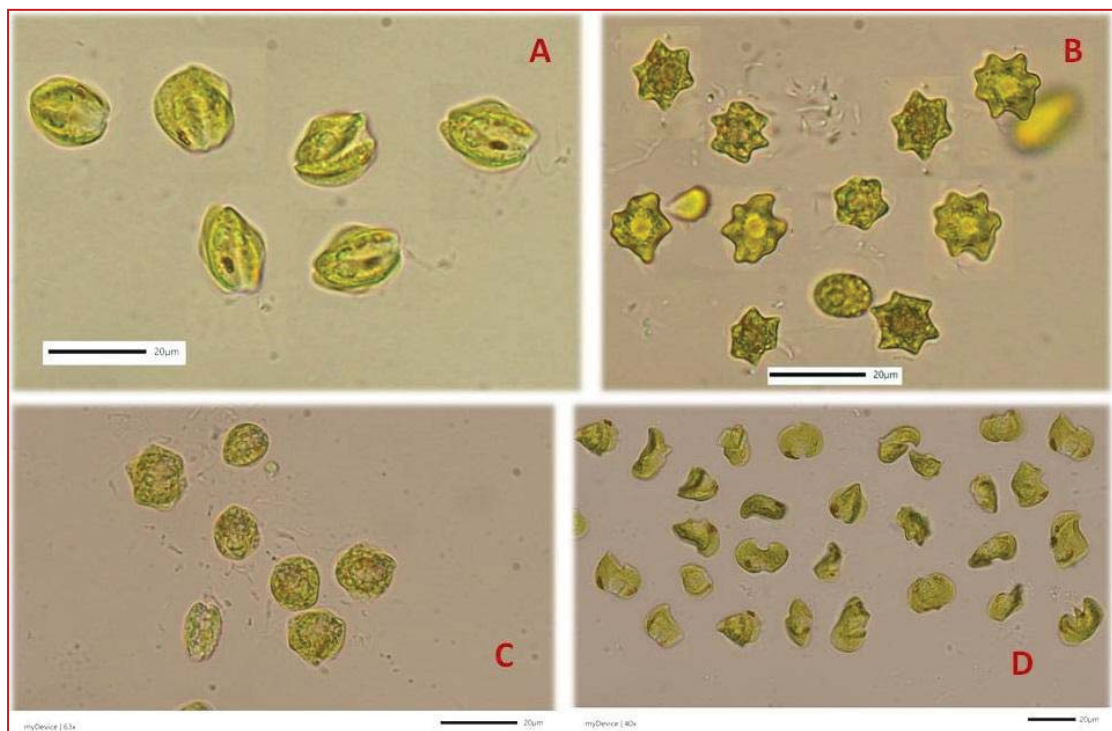
Η *Asteromonas gracilis* είναι από τα πιο αλοανθεκτικά ευκαρυωτικά φύκη και ενδεχομένως μαζί με τη *Dunaliella* από τα χλωροφύκη τα πιο ανθεκτικά στις πολύ υψηλές αλατότητες. Αλλωστε και τα δύο συλλέχθηκαν και απομονώθηκαν από τις αλυκές Μεσολογίου. Η καλλιέργειά του προχωρά καλά σε αλατότητες άνω των 90 ppt και "υποφέρει" σε αλατότητες του τυπικού θαλασσινού νερού (30-40 ppt) ενώ παρουσιάζει ασταθή ανάπτυξη στο εύρος 40-80 ppt. Το χρώμα των καλλιεργειών (Σχήμα 57) κυμαίνεται από ανοιχτό πράσινο (αρχική φάση) έως σκούρο πράσινο στην ώριμη φάση. Αν τα κύτταρα μεταφερθούν απότομα σε πολύ υψηλή αλατότητα τότε το σχήμα τους παραμορφώνεται χωρίς κάποιο πρότυπο

(Σχήμα 56C, Σχήμα 59D) αλλά παραμένουν ζωντανά με χαμηλή κινητικότητα. Προϊόντος όμως του χρόνου προσαρμόζονται στη νέα αλατότητα και ανακτούν το σύνθηες ατρακτοειδές-αστεροειδές σχήμα τους και την έντονη ευθύγραμμη τρομώδη κινητικότητά τους. Στις υψηλές αλατότητες η *Asteromonas* όπως και η *Dunaliella* για να αντεπεξέλθει το ωσμωτικό στρες συσσωρεύει ενδοκυτταρικά γλυκερόλη. Αντίθετα όμως με τη *Dunaliella* δεν φαίνεται να συσσωρεύει β-καρωτίνη.

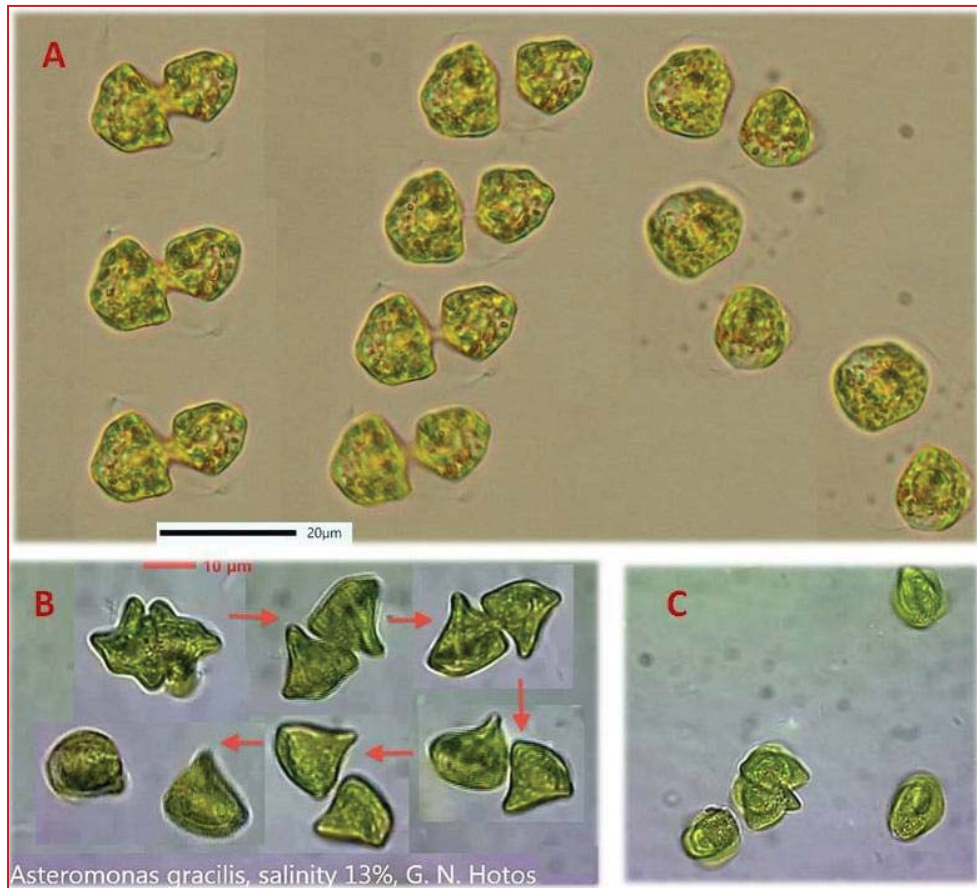
Αν αντιθέτως από υψηλή αλατότητα μεταφερθούν σε πολύ χαμηλότερη (π.χ. από 90 ppt σε 35 ppt) τότε τα κύτταρα διογκώνονται λόγω απορρόφησης νερού και γίνονται σφαιρικά και αργούν πολύ να ξαναπάρουν το κανονικό τους σχήμα.



Σχήμα 58. Μικροφωτογραφίες κύστεων *Asteromonas gracilis*. Στο A συσσωμάτωμα κύστεων, γραμμή κλίμακας 20 μm , 400X. Στο B 3 κύστεις με ευδιάκριτο το κυτταρικό τοίχωμα, 1 βλασθητικό κύτταρο και 2 κύτταρα σε πορεία να γίνουν κύστεις, 20 μm , 630X.

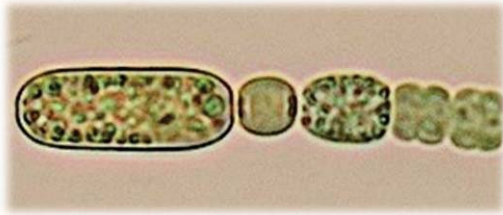


Σχήμα 59. Στα A, B & C βλασθητικά κύτταρα *Asteromonas gracilis*, με πολλά αστεροειδή στο B και έντονα παραμορφωμένα (όμως ζωντανά) λόγω ωσμωτικού στρες στο D. C & D, 20 μm , 630X.



Σχήμα 60. Κολάζ φωτογραφιών φάσεων κυτταρικής διαίρεσης στο *Asteromonas gracilis*.

Anabaena sp.



Συστηματική κατάταξη

Υπερβασίλειο:	Προκαρυωτικά
Βασίλειο:	Ευβακτήρια
Φύλο:	Κυανοβακτήρια
Ομοταξία:	Cyanophyceae
Τάξη:	Nostocales
Οικογένεια:	Nostocaceae
Γένος:	<i>Anabaena</i>
Είδος:	<i>Anabaena</i> sp.

Κυανοβακτήριο νηματοειδούς τύπου, αζωτοδεσμευτικό, με ευδιάκριτα τα κύτταρα που αποτελούν το νήμα. Τα νήματα είναι αδιακλάδωτα ευθύγραμμα ως επί το πλείστον, ποικίλου μήκους, από πολύ κοντά, της τάξεως λίγων κυττάρων (5-10 μήκους ~20-30 μm), έως πολύ μακρά (> 250 μm) της τάξεως των εκατοντάδων κυττάρων (Σχήμα 64). Τα μακρά νημάτια αναδιπλώνονται σχηματίζοντας μεγάλες καμπύλες (Σχήμα 64B). Δεν παρουσιάζονται συστροφές νημάτων ή περιπλεγμένα κύτταρα. Τα νήματα σε πυκνές καλλιέργειες διατάσσονται κατά κάποιο τρόπο σε παράλληλες γραμμές. Η ολισθητική κατάσταση των νημάτων είναι σχεδόν απύσχη και μόνο περιστασιακώς εμφανίζεται πολύ αργή ολισθητική κίνηση. Δεν παρουσιάζει εμφανή θήκη-κολεό που να καλύπτει το νημάτιο, αλλά μερικές φορές υπάρχει ένα λεπτό υαλώδες και άχρωμο κάλυμμα βλέννας.

Τα κύτταρα που αποτελούν το νημάτιο είναι εμφανώς διακριτά μεταξύ των με εμφανή σύσφιξη στα γειτονικά κυτταρικά τοιχώματα. Διακρίνονται 3 ειδών κύτταρα. Τα **βλαστητικά** που είναι τα περισσότερα και αποτελούν το "θαλλό" του φύκου, τα **ετερόκυτα** που είναι τα αζωτοδεσμευτικά και απαντώνται σποραδικώς κατά μήκος του νήματος και οι **ακινήτες** που είναι εμφανώς τα μεγαλύτερα κύτταρα και απαντώνται σε διάφορες θέσεις του νήματος.

Τα βλαστητικά κύτταρα είναι ομοιόμορφου μεγέθους κατά μήκος του νήματος και το σχήμα τους είναι κυλινδρικό σαν βαρέλι τείνοντας προς το σφαιροειδές με μήκος ελαφρά μεγαλύτερο από το πλάτος τους (~4,2 x 3,8 - 4,7 x 4,5 μm). Σε άλλα νημάτια τα κύτταρα είναι ομοιόμορφα και σε άλλα λόγω της κυτταρικής διαίρεσης διακρίνονται σε κανονικού μεγέθους και σε κύτταρα που έχουν το μισό μέγεθος του κανονικού λόγω της διαίρεσης που είναι εμφανής από τη σύσφιξη στο μέσον. Τα θυγατρικά κύτταρα με αύξηση θα μεγαλώσουν μέχρι το κανονικό μέγεθος του τυπικού βλαστητικού κυττάρου. Το χρώμα τους κυμαίνεται ανάλογα με τη φυσιολογική κατάσταση του νήματος από ανοιχτό πράσινο, έως

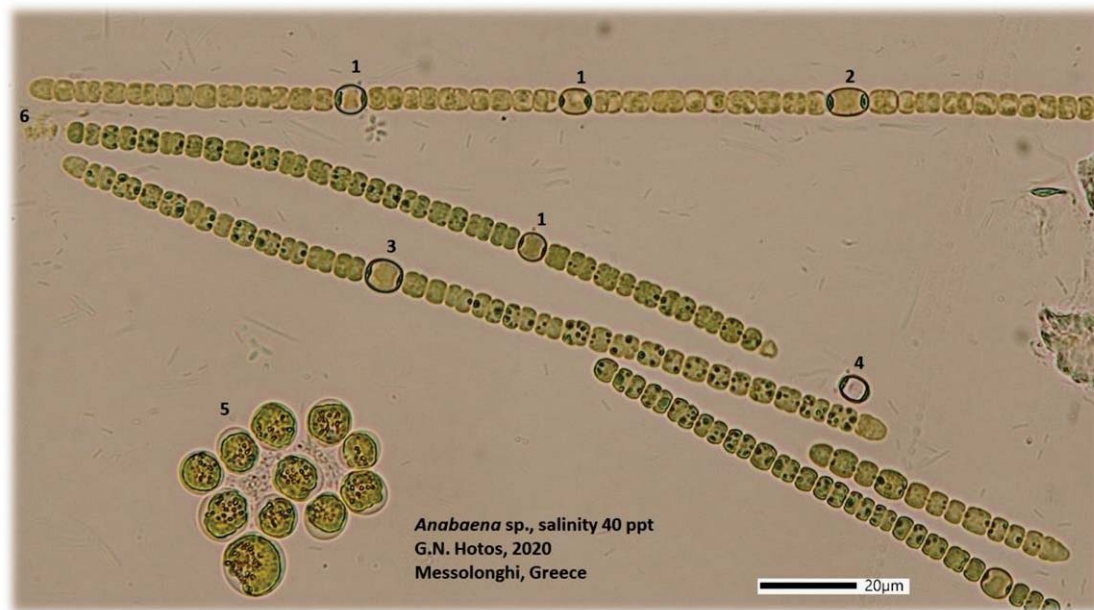
κυανοπράσινο ή λαδοπράσινο και λαδί (Σχήματα 61 & 62). Ότι χρώμα όμως και αν έχουν αυτό χαρακτηρίζει ολόκληρο το νημάτιο, δηλαδή δεν διακρίνονται ετερογενείς χρωματικές περιοχές στο ίδιο νημάτιο. Στο κυτταρόπλασμα των βλαστητικών κυττάρων υπάρχουν κοκκώδη συσσωματώματα και ενίοτε αεροτόπια. Τα τελικά κύτταρα των νηματίων (τα ακρινά) είναι κωνικά (Σχήματα 62 & 65B), πιο ανοικτού χρώματος και ελαφρώς μεγαλύτερα από τα άλλα και δεν παρουσιάζουν κοκκώδες περιεχόμενο ούτε αεροτόπια.

Τα ετερόκυτα είναι ευκρινώς διακριτά από τα βλαστητικά κύτταρα, έχουν σφαιρικό σχήμα προς το οβάλ και ενίοτε ελαφρώς κυλινδρικό, σπάνια εμφανώς κυλινδρικό (Σχήματα 61, 62 & 63). Πάντως σε κάθε περίπτωση είναι μεγαλύτερα από τα βλαστητικά (~5,6 μm τα σφαιρικά, ~6,3 x 5,7 μm τα κυλινδρικά). Χαρακτηρίζονται από ενισχυμένο πάχος του μέρους εκείνου του κυτταρικού τοιχώματος που εφάπτεται στα γειτονικά βλαστητικά. Ετερόκυτα εμφανίζονται σε ποικίλο αριθμό από 1 έως 3-9 σε κάθε νημάτιο και ποτέ δύο ετερόκυτα δεν συνορεύουν μεταξύ τους, πάντοτε παρεμβάλλονται αρκετά βλαστητικά κύτταρα. Μερικές φορές γειτονικά κύτταρα των ετερόκυτων είναι οι ακινήτες (Σχήματα 63 & 65A) προφανώς επειδή κάποιο γειτονικό τους βλαστητικό κύτταρο μετατράπηκε σε ακινήτη. Ενίοτε κάποιος γειτονικός τους ακινήτης μπορεί να αποκτήσει και γειτονικό ακινήτη.

Οι ακινήτες (Σχήματα 63, 65 & 67) είναι μεγάλα κύτταρα κυλινδρικού σχήματος πολύ μεγαλύτερα από τα βλαστητικά ή τα ετερόκυτα (~14,4 x 6,4 ή ~19,7 x 7 μm, δύο χαρακτηριστικά μεγέθη). Διαθέτουν παχύ κυτταρικό τοίχωμα και έντονα κοκκώδες κυτταρόπλασμα. Παρατηρούνται ως μονά κύτταρα παρεμβαλλόμενα στη σειρά των βλαστητικών ή και 2 (σπανίως 3) μαζί στη σειρά. Αρκετά νημάτια διαθέτουν ετερόκυτα που γειτονεύουν και από τις 2 μεριές τους με ακινήτες (Σχήματα 63 & 65A). Πολύ συχνά οι ακινήτες ελευθερώνονται από τα νήματα (αυτός άλλωστε είναι ο προορισμός τους) και υπάρχουν ως μονήρη κύτταρα στο νερό (Σχήματα 65B & 67B).

Τα νημάτια της *Anabaena* επιμηκύνονται με πολλές διαιρέσεις των βλαστητικών τους κυττάρων. Επιπρόσθετα τα νήματα σε ορισμένες θέσεις υφίστανται θραύση καθώς ορισμένα βλαστητικά κύτταρα μετατρέπονται σε νεκρίδια και αποσυντίθενται (Σχήμα 66B, C & D). Έτσι το νημάτιο σπάζει σε κομμάτια και αυτά τα θραύσματα επιμηκύνονται με πολλαπλασιασμούς των βλαστητικών τους κυττάρων.

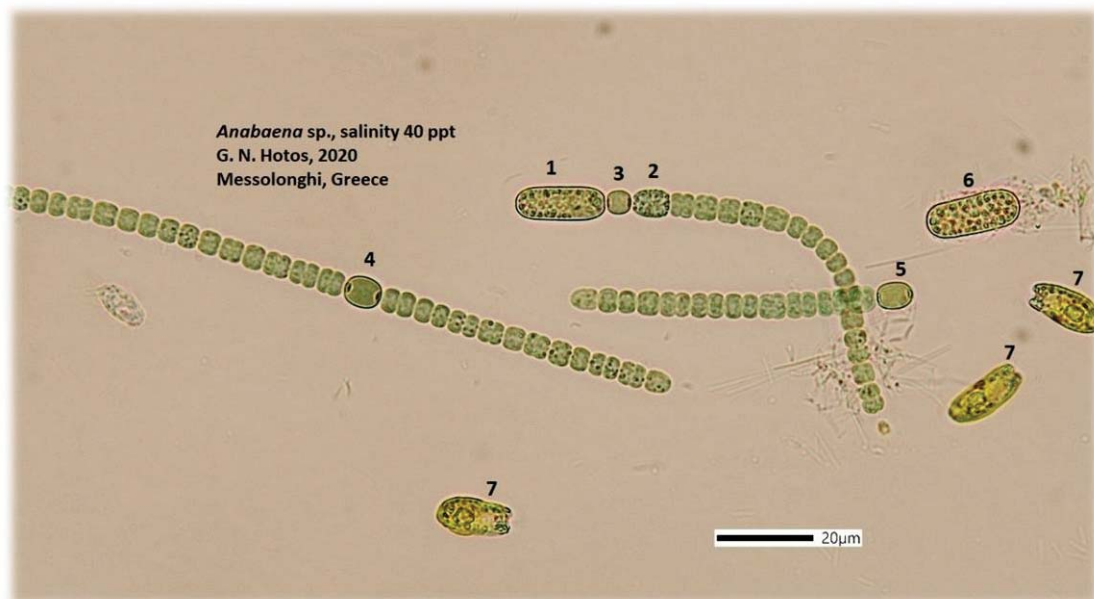
Στις καλλιέργειες του εργαστηρίου η *Anabaena* παρουσίασε μεγάλη ευαισθησία στο αντιβιοτικό ερυθρομυκίνη και μικρότερη στην οξυτετρακυκλίνη. Μετά από λίγες ημέρες από την εισαγωγή του αντιβιοτικού στο δοχείο καλλιέργειας (~100 mg/L) τόσο τα νημάτια όσο και όποιοι μονήρεις ακινήτες άρχισαν να αποσυντίθενται (Σχήματα 67B, 67C, 67D & 68D) και μετά 10 περίπου ημέρες εξαφανίστηκαν. Αξιοσημείωτη είναι επίσης και η ευαισθησία της στην ουρία καθώς έδειξε σαφή σημάδια αποσύνθεσης σε δόσεις ~0,5 g/L (Σχήματα 66A & 67A).



Σχήμα 61. Χαρακτηριστικά νημάτια του κυανοβακτηρίου *Anabaena* sp. Αξιοσημείωτη η ποικιλία του χρώματος των κυττάρων από λαδί έως λαδοπράσινο-πράσινο. 1= μικρά σφαιρικά ετερόκυτα, 2= οβάλ ετερόκυτο, 3= μεγάλο σφαιρικό ετερόκυτο, 4=αποσπασμένο ετερόκυτο, 5= κύτταρα-κύστες *Tetraselmis*, 6=αποσύνθεση του ακραίου κυττάρου (άγνωστο γιατί). Με προσεκτική παρατήρηση κατά μήκος των κυττάρων αχνοφαίνεται μια λεπτή διάφανη θήκη.



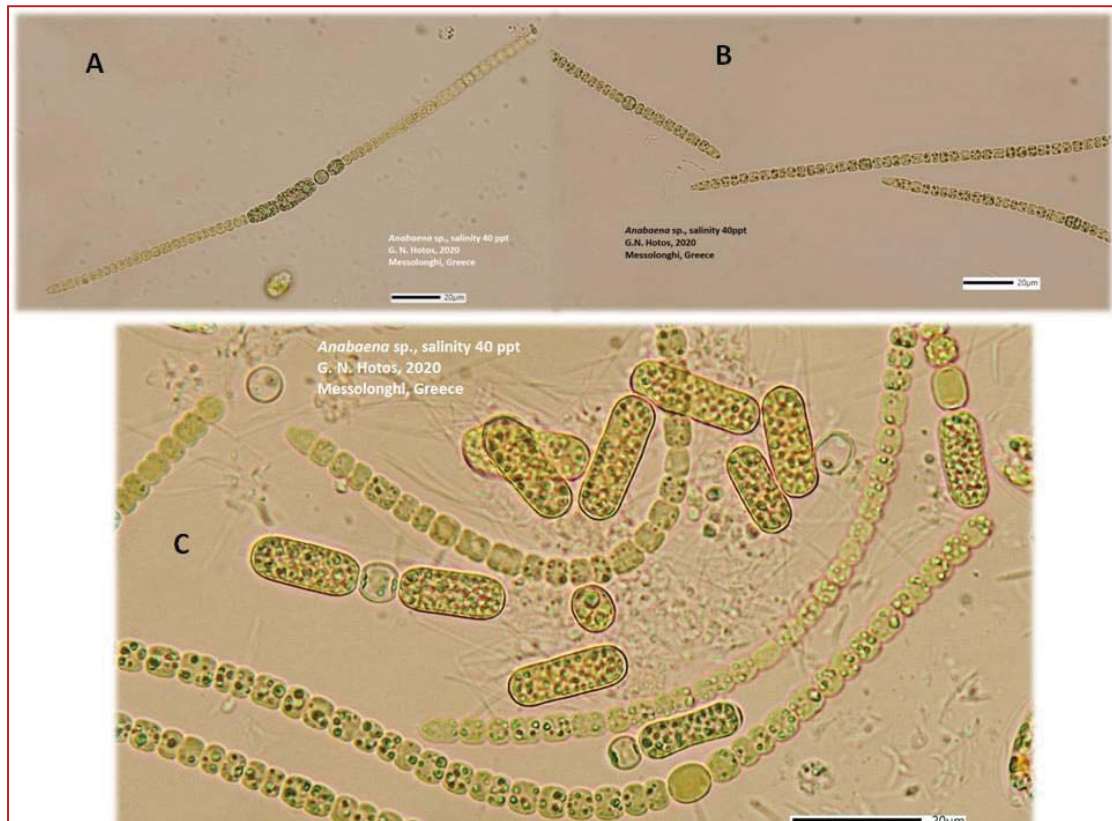
Σχήμα 62. Δύο σχετικά κοντά νημάτια του κυανοβακτηρίου *Anabaena* με έντονα διαφορετικό χρώμα. Το ένα κιτρινολαδί το άλλο πράσινο. 1=σφαιρικά ετερόκυτα, 2= ακραία κύτταρα κωνικού σχήματος. Δεν υπάρχουν ακινήτες. Αξιοσημείωτη η απόσταση μεταξύ των ετερόκυτων.



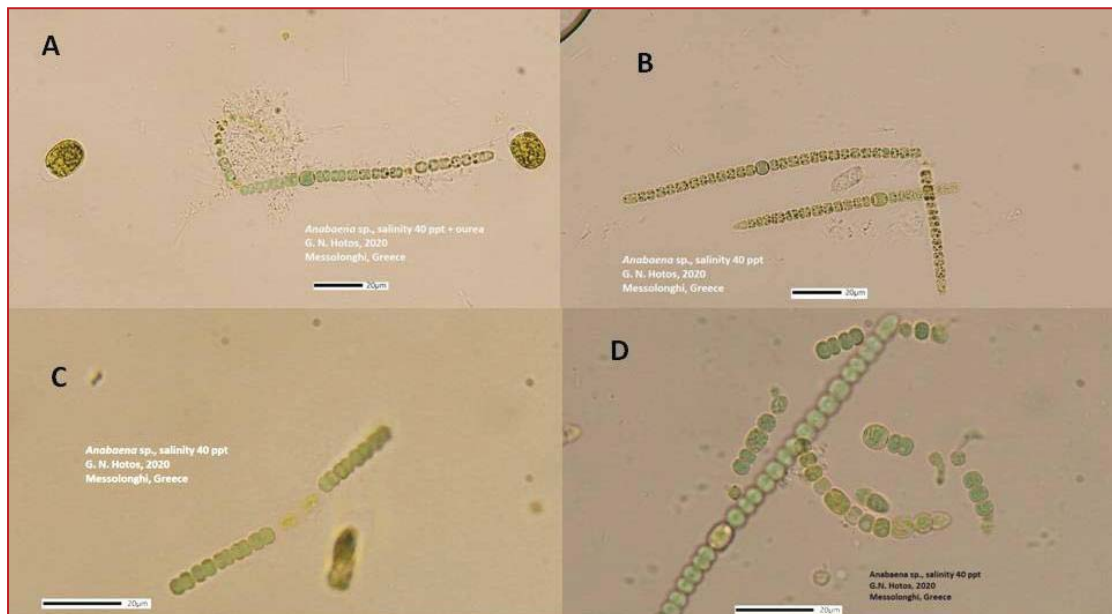
Σχήμα 63. Ενα μακρύ και δύο κοντά νημάτια του κυανοβακτηρίου *Anabaena*. 1= ακρινός μεγάλος επιμήκης ακινήτης. 2=βλαστητικό κύτταρο που μετατρέπεται σε ακινήτη, 3=σφαιρικό ετερόκυτο μεταξύ δύο ακινήτων, 4= μεγάλο σφαιρικό ετερόκυτο, 5= ακρινό σφαιρικό ετερόκυτο, 6= αποσπασμένος από το νημάτιο ακινήτης, 7= κύτταρα *Tetraselmis*. Πολύ χαρακτηριστικό το έντονα κοκκώδες κυτταρόπλασμα των ακινήτων.



Σχήμα 64. Διάφοροι σχηματισμοί νηματίων της *Anabaena*. A: Μάζα νηματίων περιπλεγμένων, B: Ένα πολύ μακρύ νημάτιο που σχηματίζει θηλιά. C: νημάτια σε παράλληλη διάταξη και ανοικτές καμπύλες. D: Πολλά κοντά ευθύγραμμα νημάτια.



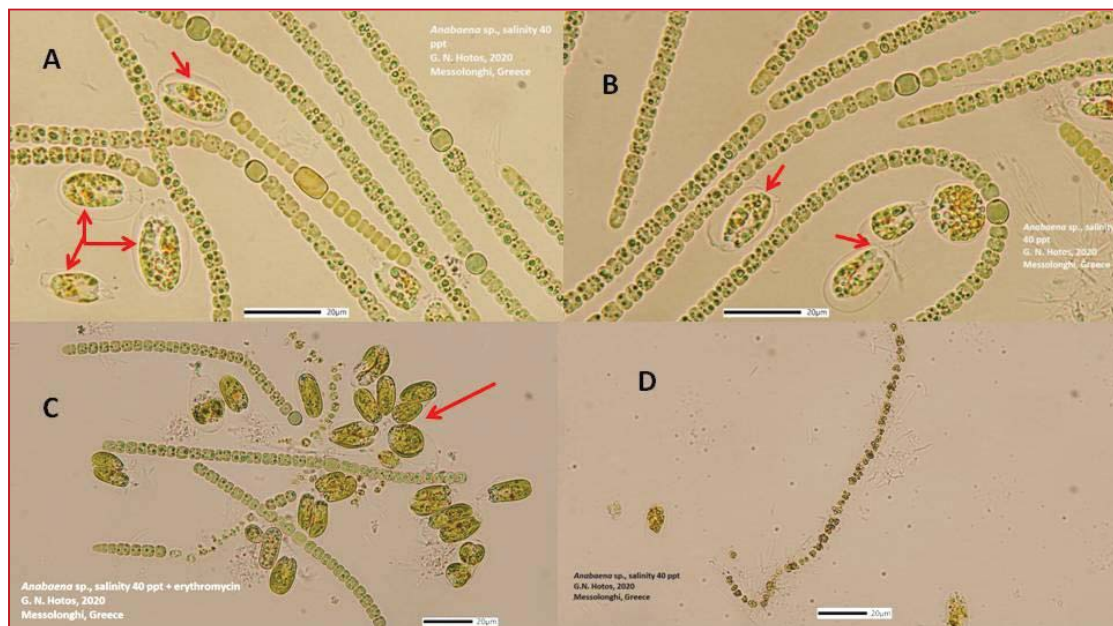
Σχήμα 65. A: Ένα νημάτιο *Anabaena* που σε κεντρική θέση έχει ένα σφαιρικό ετερόκυτο το οποίο γειτονεύει στο αριστερό του άκρο με δύο συνεχόμενους ακινήτες (μεγάλο και μικρό) και στο δεξί του με ένα βλασθητικό κύτταρο που μεταμορφώνεται σε ακινήτη. B: Νημάτια με εμφανή τα κωνικού σχήματος ακραία κύτταρα. C: Νημάτια *Anabaena* με κοκκώδη βλασθητικά κύτταρα ανάμεσα σε ελευθερωμένους έντονα κοκκώδεις ακινήτες μερικοί εκ των οποίων είναι ενωμένοι με ετερόκυτα ως κομμάτια αποσπασμένα από το νημάτιο.



Σχήμα 66. A: Νημάτιο *Anabaena* που έχει εκτεθεί σε ουρία και έχει αρχίσει να αποσυντίθενται στο αριστερό του άκρο. B & C: Θραυσματοποίηση νημάτων *Anabaena* σε θέσεις όπου τα βλασθητικά κύτταρα μεταμορφώνονται σε νεκρίδια. D: Θραύσματα νημάτων ποικίλου μήκους.



Σχήμα 67. Νημάτια *Anabaena* που έχουν εκτεθεί σε ουρία και έχουν αρχίσει να αποσυντίθενται. Β, C & D: Ακινήτες που έχουν εκτεθεί σε αντιβιοτικά με εμφανή την αποσύνθεσή τους.



Σχήμα 68. Α, Β & C: Νημάτια *Anabaena* ανάμεσα σε κύτταρα του μικροφύκου *Tetraselmis* τα οποία υποδεικνύονται με τα βέλη. D: Νημάτιο *Anabaena* σε φάση προχωρημένης αποσύνθεσης μετά από έκθεση λίγων ημερών σε αντιβιοτικά.