

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 (σχεδίαση, οργάνωση, εποπτεία, φωτογράφιση, επεξεργασία δεδομένων, σύνταξη έκθεσης)

Δέσποινα Αβραμίδου, ΕΤΕΠ (μετρήσεις, βαθμονόμηση, συντήρηση καλλιεργειών, φωτογράφιση, χημικά)

Αθηνά Σαμαρά, ΕΤΕΠ (μετρήσεις, βαθμονόμηση)

Ιωάννης Κλαδάς, καθηγητής (προκαταρκτικές καλλιέργειες)

Σαββούλα Κολυροπούλου, γεωπόνος επί συμβάσει (μετρήσεις καλλιεργειών)

Θεόδωρος Αντωνιάδης, ιχθυολόγος ΤΕ, Μηχανολόγος ΤΕ, επί συμβάσει (μετρήσεις).

Παραδοτέο ενότητα εργασίας 1. Βελτιστοποίηση καλλιέργειας μικροφυκών - Έκθεση αποτελεσμάτων

Συντάκτης: Γεώργιος Χώτος, καθηγητής
Μεσολόγγι, Σεπτέμβριος 2021



Περιεχόμενα

Βελτιστοποίηση καλλιέργειας απομονωθέντων μικροφυκών

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	4
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	21
<i>Amphidinium carterae</i>	21
Αύξηση των καλλιεργειών	21
Απόδοση των καλλιεργειών	25
Γενικές παρατηρήσεις	26
<i>Nephroselmis</i> sp.	29
Αύξηση των καλλιεργειών	29
Απόδοση των καλλιεργειών	34
Γενικές παρατηρήσεις	35
<i>Tetraselmis</i> sp. (red var, rarpas).....	29
Αύξηση των καλλιεργειών	38
Απόδοση των καλλιεργειών	44
Γενικές παρατηρήσεις	44
<i>Dunaliella</i> sp.	47
Αύξηση των καλλιεργειών	47
Απόδοση των καλλιεργειών	53
Γενικές παρατηρήσεις	53
<i>Asteromonas gracilis</i>	56
Αύξηση των καλλιεργειών	56
Απόδοση των καλλιεργειών	61
Γενικές παρατηρήσεις	61
<i>Phormidium</i> sp.	65
Αύξηση των καλλιεργειών	65
Απόδοση των καλλιεργειών	70
Γενικές παρατηρήσεις	71
<i>Anabaena</i> sp.	78
Αύξηση των καλλιεργειών	78
Απόδοση των καλλιεργειών	84
Γενικές παρατηρήσεις	85
<i>Cyanothece</i> sp.	89
Αύξηση των καλλιεργειών	89
Απόδοση των καλλιεργειών	94
Γενικές παρατηρήσεις	94

Βελτιστοποίηση καλλιέργειας απομονωθέντων μικροφυκών

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα απομονωθέντα είδη μικροφυκών που διατηρούνται σε καθαρές καλλιέργειες στο εργαστήριο καλλιέργειας πλαγκτού, καλλιεργήθηκαν σε δοχεία μεσαίου μεγέθους (1 - 2 L) και σε διάφορες συνθήκες προκειμένου να διαπιστωθεί το βέλτιστο περιβάλλον που οδηγεί στην καλύτερη ανάπτυξη των καλλιεργειών τους τόσο ως προς το τάχος αύξησης, όσο και ως προς τη μέγιστη επιτυγχανόμενη πυκνότητά τους.

Τα είδη των μικροφυκών που εξετάστηκαν ήταν τα παρακάτω:

1. *Nephroselmis* sp.
2. *Amphidinium carterae*
3. *Tetraselmis* sp. (var. red pappas)
4. *Dunaliella* sp.
5. *Tetraselmis marina*
6. *Asteromonas gracilis*
7. *Phormidium* sp.
8. *Anabaena* sp.
9. *Cyanothece* sp.

Τα 6 πρώτα είναι ευκαρωτικά μονοκύτταρα μικροφύκη (το *Amphidinium carterae* δινομαστιγυτό, τα 5 υπόλοιπα χλωροφύκη) και τα 7, 8 & 9 κυανοβακτήρια, τα μεν *Phormidium* & *Anabaena* νηματοειδή το δε *Cyanothece* κοκκοειδές μονοκύτταρο.

Από τις προκαταρκτικές καλλιέργειες δοκιμών σε διάφορες συνθήκες διαπιστώθηκαν ορισμένα γεγονότα τα οποία τελικά οδήγησαν στην επιλογή των βασικών συνθηκών καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν για τους πειραματισμούς. Τα γεγονότα αυτά ήταν:

Αλατότητα: Διαπιστώθηκε ότι σε διαφορετικές αλατότητες παρουσιάζονται έντονες διαφορές στην αύξηση της καλλιέργειας του εκάστοτε καλλιεργούμενου μικροφύκου. Συνεπώς η αλατότητα ήταν ένας από τους παράγοντες που επελέγησαν να δοκιμαστούν. Επιλέχθηκαν μία χαμηλή αλατότητα (20 ppt), μία τυπικού θαλασσινού νερού (40 ppt) και μία υπεραλατότητας (60 ή 100 ppt κατά περίπτωση φύκους).

Ένταση φωτισμού: Οι διαφορετικές εντάσεις φωτισμού επέδρασαν καταλυτικά στην αύξηση των καλλιεργειών. Συνεπώς επιλέχθηκαν 2 περιβάλλοντα φωτισμού, ένα με χαμηλή ένταση (2000 lux-L) και ένα με υψηλή ένταση (8000 lux-XL).

Διάρκεια φωτισμού: Από τις 4 αρχικά δοκιμασθείσες φωτοπεριόδους φωτισμού, συνεχής φωτισμός (24hL:0hD), τυπικός (12hL:12hD), επικράτηση σκότους (8hL:16hD) και επικράτηση φωτός (16hL:8hD), βρέθηκε ότι η φωτοπερίοδος με 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι (16hL:8hD) ήταν η πιο αξιόπιστη δίδοντας τις

καλύτερες αποδόσεις, συνεπώς αυτή επελέγη ως σταθερό καθεστώς φωτισμού σε όλες τις καλλιέργειες.

Αερισμός. Αρχικά δοκιμάστηκαν καλλιέργειες σε δοχεία με αερισμό μέσω πιπέτας παροχής ατμοσφαιρικού αέρα από αεραντλία και αντίστοιχες καλλιέργειες του εκάστοτε φύκους σε δοχεία χωρίς καθόλου αερισμό παρά μόνο με περιοδική ανάδευση. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια έντονη διαφορά ανάπτυξης των καλλιεργειών στα δοχεία με παροχή αέρα συγκριτικά με τα δοχεία που δεν παρέχονταν αέρας όπου η ανάπτυξη ήταν από μηδενική έως πολύ φτωχή. Συνεπώς επελέγη η σταθερή και συνεχής παροχή αέρα σε όλα τα δοχεία και με όγκο παροχής ίσο με 1 όγκο δοχείου / min.

Διοξείδιο του άνθρακα (CO₂). Σε δοκιμαστικές καλλιέργειες με παροχή και άνευ παροχής διοξειδίου του άνθρακα, διαπιστώθηκε μεν μια ελαφρώς ταχύτερη ανάπτυξη των καλλιεργειών που δέχονταν διοξείδιο όμως αυτή δεν ήταν τόσο έντονη ώστε να αξίζει την εκ βάθρων τροποποίηση του συστήματος αερισμού με τρόπο τέτοιο που να επιτρέπει την ακριβή ρύθμιση της παροχής διοξειδίου σε πολλά δοχεία καλλιέργειας ταυτόχρονα. Έτσι αρκεστήκαμε στο διοξείδιο που παρέχονταν φυσικώς με τον ούτως ή άλλως επαρκή αερισμό των δοχείων.

pH. Η διατήρηση του pH σε προκαθορισμένα επίπεδα τιμών είναι μια πολύ δύσκολη διαδικασία και αυτό αποδείχθηκε κατά τις προκαταρκτικές καλλιέργειες. Σε αυτές επιχειρήθηκε η δια μέσω πρόσθεσης αραιού οξέως (HCl) ή αραιάς βάσεως (NaOH) ελεγχόμενη οξίνιση ή αλκαλοποίηση αντίστοιχα των καλλιεργειών σε τιμές στην περιοχή του όξινου 6-7 και πολύ αλκαλικού (9-10), όμως μετά την επιτυχία της επιθυμητής τιμής οι καλλιέργειες επανέρχονταν στο φυσιολογικό για αυτές pH (7,8 – 9,0). Καθώς η αναγκαστικά συνεχής επέμβαση στο pH προκειμένου αυτό να διατηρηθεί σε μια επιλεγόμενη τιμή είναι πολύ διαταρακτική της διαδικασίας της καλλιέργειας, επιλέχθηκε το pH να αφεθεί να σταθεροποιηθεί βάσει της φωτοσύνθεσης στην φυσιολογική του τιμή και απλώς να καταγράφεται καθημερινώς.

Θερμοκρασία. Καθώς η θερμοκρασία σε ένα χώρο καλλιέργειας δεν μπορεί να διατηρηθεί παρά μόνο ομοιόμορφα για όλα τα δοχεία, έπρεπε να επιλεγεί μία σταθερή τιμή της που θα διατηρούνταν καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Μία τιμή που θα είναι αφενός εύκολα επιτεύξιμη σε συνθήκες παραγωγής και αφετέρου ικανοποιητική για την αύξηση των καλλιεργειών. Από τα δεδομένα της βιβλιογραφίας είναι γνωστό ότι τα μικροφύκη αυξάνονται καλά σε εύρος θερμοκρασίας 20-28 °C. Έτσι έγιναν προκαταρκτικές δοκιμές αύξησης σε θερμοκρασίες 21, 25 και 28 °C. Βρέθηκε ότι στους 21 και 25 °C η διαφορά ήταν αμελητέα και στους 28 °C ήταν μεν η αύξηση πιο γρήγορη κατά περίπου 2 ημέρες (μέχρι την επίτευξη της μέγιστης πυκνότητας) αλλά η μέγιστη πυκνότητα ήταν η ίδια. Επιλέχθηκε έτσι η θερμοκρασία των 21 ± 1 °C ως η συμφερότερη ενεργειακώς τιμή.

Συνεπώς μετά τις προκαταρκτικές δοκιμές καταλήξαμε στις εξής συνθήκες καλλιέργειας με όλους τους πιθανούς συνδυασμούς μεταξύ των μεταβλητών.

Αλατότητα: Τρεις αλατότητες 20-40-60 ppt για όλα τα φύκη εκτός του *Asteromonas*, 40-60-100 ppt για το *Asteromonas gracilis* το οποίο κατά τις προκαταρκτικές καλλιέργειες παρουσίασε ανάπτυξη μόνο σε αλατότητες άνω των 40 ppt (απομονώθηκε άλλωστε από υπεράλμυρα νερά των αλυκών).

Ενταση φωτισμού: Μία χαμηλή των 2000 lux μετρούμενη στην επιφάνεια του δοχείου συμβολιζόμενη εντεύθεν ως «L» και μία υψηλή των 8000 lux συμβολιζόμενη εντεύθεν ως «XL».

Διάρκεια φωτισμού: Επελέγη φωτοπερίοδος με 16 ώρες φωτισμού και 8 ώρες σκοτάδι (16hL:8hD) για όλες τις καλλιέργειες.

Αερισμός. Παροχή αέρα συνεχής και σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της κάθε καλλιέργειας. Η παροχή σε κάθε δοχείο ρυθμίζονταν με μικροστρόφιγγα σε επίπεδο ένας όγκος αέρα ίσος με τον όγκο της καλλιέργειας ανά λεπτό (min). Η τροφοδοσία του αέρα γίνονταν από φυσητήρα (blower) τοποθετημένο σε εξωτερικό χώρο και του οποίου η παροχή πριν διαμειραστεί στα δοχεία διηθείτο από φίλτρο 0,45 μm προκειμένου να συγκρατηθεί κάθε έμβιο ή άβιο σωματίδιο (Σχήμα 1).



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).

Επισημαίνεται ότι για την επιλογή των παραπάνω μεταβλητών συνθηκών λήφθηκε υπ' όψιν η διαχειριστική πρακτική σε μονάδες φυκοκαλλιέργειας όπου οι συνθήκες που μπορούν πρακτικά να διαμορφωθούν σε λειτουργικό επίπεδο χωρίς να γίνουν δαπανηρές μετατροπές που θα καθιστούσαν ασύμφορη την όποια καλλιέργεια, είναι αυτές της αλατότητας και του φωτισμού. Η μεν αλατότητα εύκολα μεταβάλλεται προς τα κάτω με αραιώση του θαλασσινού νερού με γλυκό. Εάν δε απαιτηθεί υψηλότερη, τότε πλέον είτε διαλύεται στο νερό αλάτι, είτε εφόσον αποδειχθεί ότι η υψηλή αλατότητα είναι η καλύτερη για ένα είδος μικροφύκους τότε η μονάδα κατασκευάζεται σε επιλεγμένες θέσεις, π.χ. παραπλεύρως των αλυκών.

Συνεπώς για τους πειραματισμούς στη βελτιστοποίηση της παραγωγής καλλιεργούμενης βιομάζας μικροφυκών δημιουργήθηκαν οι κατωτέρω συνδυασμοί αλατότητας-φωτός. 20 ppt – L, 20 ppt – XL, 40 ppt -L, 40 ppt -XL, 60 ppt -L, 60 ppt -XL και για το *Asteromonas* επιπλέον 100 ppt -L και 100 ppt -XL.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα εξετασθέντα μικροφύκη που χρησιμοποιήθηκαν για τους πειραματισμούς αποτελούνται από είδη που απομονώθηκαν από τα λιμνοθαλάσσια νερά της περιοχής και τα οποία αφού υπέστησαν διαδικασίες απομόνωσης μονοειδικής καλλιέργειας από το νερό στο οποίο περιείχοντο ανάμικτα και με άλλα είδη, τελικά κατέληξαν σε δοχεία με θαλασσινό νερό που περιείχε μόνο το επιθυμητό είδος (Σχήμα 2B). Από αυτά τα δοχεία με διαδοχικές επεκτάσεις προέκυψαν οι μεγαλύτεροι όγκοι των 0,5, 1 και 2 L με τους οποίους έγιναν τα πειράματα.

Το κάθε φύκος καλλιεργήθηκε σε γυάλινες κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer (εκτός του *Amphidinium* που καλλιεργήθηκε σε κυλινδρικές φιάλες και του *Phormidium* σε κωνικές), σε νερό της επιθυμητής αλατότητας το οποίο είχε πρώτα αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο (Σχήμα 2A) στους 121 °C, πίεσης 2bar για 20 min. Κατόπιν το νερό αφήνονταν να κρυώσει για 24 ώρες και ήταν έτοιμο για χρήση. Με την αποστείρωση εξασφαλιζονταν τόσο η πλήρης απουσία ασπονδύλων, πρωτοζώων, φυκών και μυκήτων καθώς και των βακτηριδίων με τους σπόρους αυτών. Από τα δοχεία Nalgene 12 L (Σχήμα 14B) που περιείχαν το αποστειρωμένο και λιπασμένο με θρεπτικά μεταλλικά στοιχεία νερό λαμβάνονταν η απαιτούμενη ποσότητα στην οποία εμβολιάζονταν με δόση 10% κατ' όγκο, η καθαρή ποσότητα του εκάστοτε μικροφύκους και αφήνονταν να αυξηθεί.

Η πλέον σπουδαία παράμετρος για την αύξηση της καλλιέργειας είναι η λίπανση του νερού με τα αναγκαία στοιχεία τα οποία όπως αναφέρθηκε είχαν διαλυθεί στο προς αποστείρωση νερό. Στο εργαστήριο μεταξύ των αναφερομένων στη βιβλιογραφία συνταγών λίπανσης επιλέχθηκε η τροποποιημένη συνταγή Walne 1966 η οποία χρησιμοποιείται επί χρόνια στο εργαστήριο και καλύπτει πλήρως τις ανάγκες κάθε είδους φυκών. Η συνταγή αυτή συνίσταται στα παρακάτω:

ΜΕΤΑΛΛΙΚΑ ΑΛΑΤΑ

NaNO_3 : 300 g
 KH_2PO_4 : 30 g Διαλύονται σε 1 L αποσταγμένου νερού
 NH_4Cl : 20 g

Τοποθετείται για 30 λεπτά σε αυτόκαυστο (Σχήμα 12Α) στους 120 °C.

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

ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ

Πρόδρομα διαλύματα:

Διάλυμα Α

$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 30 g
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 25 g Διαλύονται σε 1 L αποσταγμένου νερού.
 $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 30 g
 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 20 g

Διάλυμα Β $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 50 g Διάλυση σε 1 L αποσταγμένου νερού.

Διάλυμα Γ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 25 g Διάλυση σε 1 L αποσταγμένου νερού.

Διάλυμα Δ $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 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 πρόδρομο 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

Πρόδρομα διαλύματα:

B_{12} : 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

B_{12} : 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.



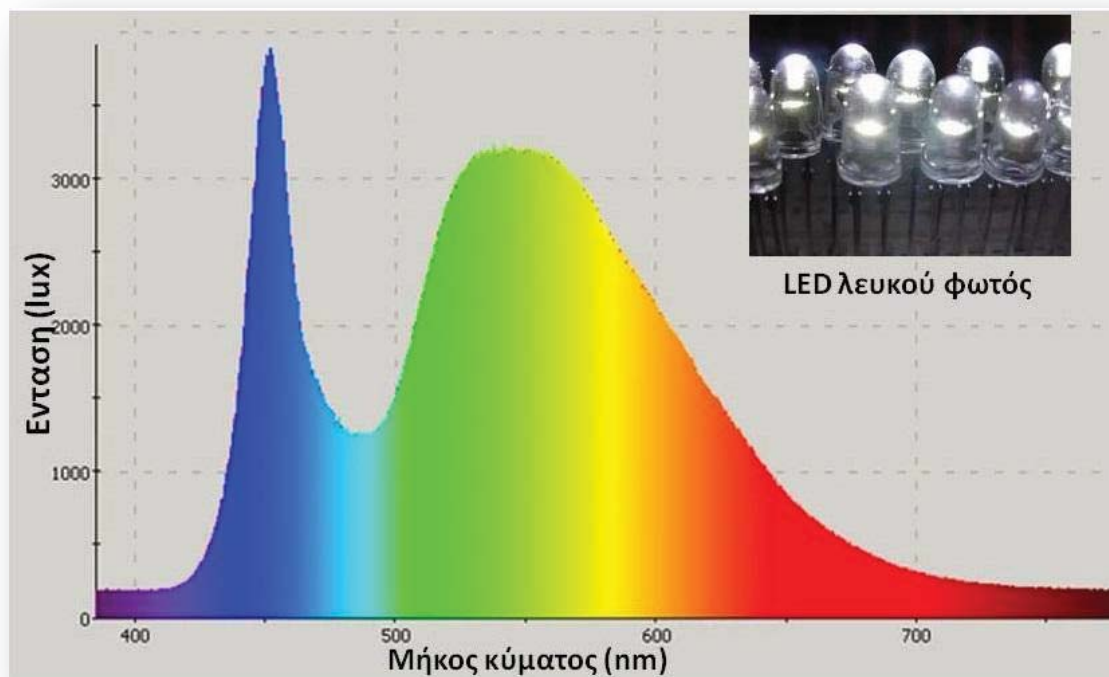
Σχήμα 2. Κλίβανος αποστείρωσης (A) υψηλής πίεσης (αυτόκαυστο) που χρησιμοποιήθηκε για την αποστείρωση του νερού των καλλιεργειών και των θρεπτικών διαλυμάτων. Θερμοθάλαμος (B) με τις καθαρές αποθεματικές καλλιέργειες των ειδών φυτοπλαγκτού.



Σχήμα 3. Το σύστημα των ραφιών για τα δοχεία με τις καλλιέργειες μικροφυκών και με συστοιχίες των λαμπτήρων LED και τις παροχές αέρα.

Το κάθε δοχείο καλλιέργειας τοποθετήθηκε σε ειδική τράπεζα εργασίας (Σχήμα 3) και φωτίζονταν από επιτοιχίως τοποθετημένες συστοιχίες λαμπτήρων τύπου LED λευκού φωτός κατάλληλου φάσματος (Σχήμα 4) και σε θέση τέτοια που στην επιφάνεια του δοχείου να καταγράφεται (Lux meter BIOBLOCK LX-101) φωτισμός έντασης είτε 2000 lux, είτε 8000 lux. Η διάρκεια του φωτισμού ελέγχονταν από χρονοδιακόπτη ρεύματος που είχε ρυθμιστεί να λειτουργεί για να δημιουργεί 16 ώρες φωτός και 8 ώρες σκοτάδι (16L:8D). Οι καλλιέργειες αναδεύονταν με παροχή ατμοσφαιρικού αέρα από μία γυάλινη πιπέτα των 2 mL που συνδέονταν μέσω πλαστικού σωληνίσκου εσωτερικής διαμέτρου 4 mm με τη σωλήνωση διαμοιρασμού του αέρα ο οποίος είχε περάσει πρώτα από ειδικό φίλτρο πόρων 0,45 μm προερχόμενος από αεραντλία-blower παροχής 40 m³/min. Με ειδικές στρόφιγγες ρυθμίστηκε η παροχή του αέρα στο κάθε δοχείο να είναι 1 όγκος δοχείου ανά λεπτό (min). Ο αέρας που παρείχετο στα δοχεία επιτελούσε δύο

λειτουργίες. Αφενός παρείχε το αναγκαίο διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) που χρειάζεται η φωτοσύνθεση και αφετέρου διατηρούσε την καλλιέργεια σε συνεχή ανάδευση έτσι ώστε τα κύτταρα να βρίσκονται περιοδικά και ομοιόμορφα κοντά στα τοιχώματα του δοχείου για να λαμβάνουν επαρκή ποσότητα φωτονίων καθώς όταν η καλλιέργεια γίνεται πυκνή το φως δεν μπορεί χωρίς βοήθεια (ανάδευση του νερού) να διεισδύσει μέχρι το κέντρο του δοχείου. Δηλαδή με τον αερισμό καταπολεμάται το φαινόμενο της αυτοσκίασης που υφίσταται η μάζα των φυκών που βρίσκεται στο κέντρο του δοχείου μιας πυκνής καλλιέργειας.



Σχήμα 4. Το χαρακτηριστικό φάσμα εκπομπής του φωτός που παράγουν οι λαμπτήρες τύπου LED.

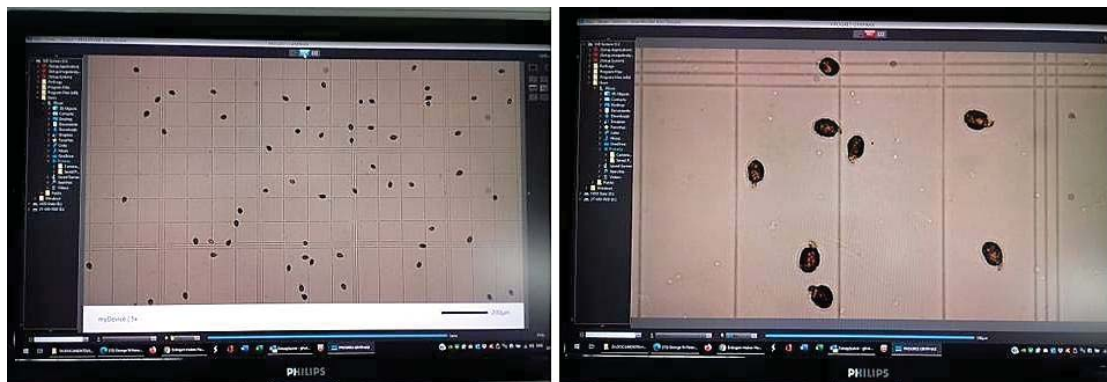
Περιοδικώς η πυκνότητα των μονοκύτταρων ειδών ελέγχονταν διά της καταμέτρησης των κυττάρων τους με αιμοκυττόμετρο. Για τα πολυκύτταρα νηματοειδή φύκη (*Phormidium* & *Anabaena*) η πυκνότητα ελέγχονταν με μετρήσεις του ξηρού τους βάρους (βλέπε στα επόμενα).

Η διαδικασία του αιμοκυττομέτρου συνίσταται στα εξής. Μικρή ποσότητα από την καλά αναδευόμενη καλλιέργεια αφαιρούνταν με αποστειρωμένη πιπέτα και με κατάλληλο τρόπο τοποθετούνταν μια σταγόνα της στην αντικειμενοφόρο πλάκα του αιμοκυττόμετρου είτε τύπου Neubauer, είτε τύπου Fuchs-Rosenthal (Σχήματα 5 & 6). Τα κύτταρα καταμετρούνταν σε μικροσκόπιο (Leica DM 1000) βάσει του πρωτοκόλλου καταμέτρησης για τον κάθε τύπο αιμοκυττόμετρου και ο αριθμός των κυττάρων της καταμέτρησης βάσει μαθηματικού τύπου ανάγονταν σε κύτταρα/mL καλλιέργειας. Για διασάφηση της πιστότητας της διαδικασίας

καταμέτρησης αξίζει να αναφερθεί ότι εφόσον οι χειρισμοί της τοποθέτησης του δείγματος γίνουν σωστά δεν υπάρχει κίνδυνος λανθασμένης καταμέτρησης καθώς η ποσότητα του δείγματος που θα απλωθεί στην αντικειμενοφόρο πλάκα και θα καλυφθεί από την καλυπτρίδα είναι δεδομένη και σταθερή και ο χώρος που θα περιορισθεί το δείγμα είναι οριοθετημένος σε εργοστασιακώς ορισμένο όγκο. Συνεπώς αρκεί να απλωθεί η σταγόνα του νερού του δείγματος επάνω στην αντικειμενοφόρο και να καλυφθεί από την καλυπτρίδα για να μετρηθεί ο αριθμός των κυττάρων σε αυτό το χώρο και κατόπιν με την προαναφερθείσα αναγωγή το νούμερο αυτό να μετατραπεί σε κύτταρα/mL.



Σχήμα 5. Δύο τύποι αιματοκυττομέτρων, αριστερά Neubauer, δεξιά Fuchs-Rosenthal που χρησιμοποιήθηκαν για τη μικροσκοπική καταμέτρηση των μικροφυκικών κυττάρων.

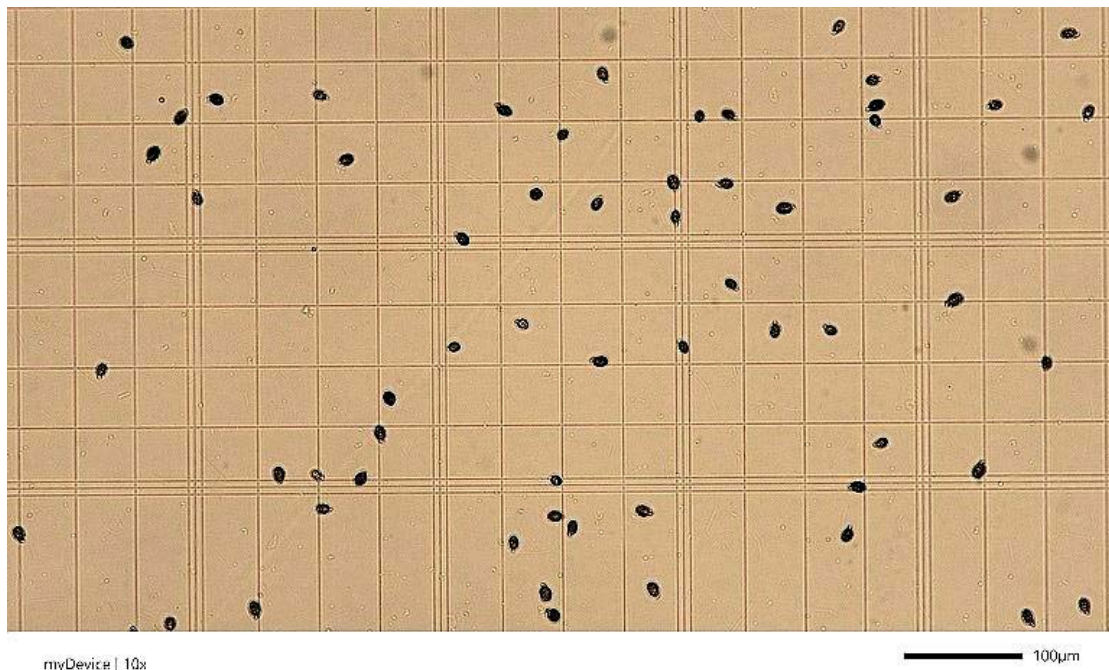


Σχήμα 6. Απεικόνιση σε οθόνη υπολογιστή μέσω βιντεοκάμερας μικροσκοπίου των κυττάρων φυτοπλαγκτού προς καταμέτρηση στην επιφάνεια του "πλέγματος" του αιμοκυττομέτρου, σε διαφορετικές μεγεθύνσεις.

Όμως για να είναι αντιπροσωπευτική η μέτρηση της πραγματικής πυκνότητας των κυττάρων στο δοχείο καλλιέργειας πρέπει να δοθεί προσοχή στη λήψη του δείγματος τόσο στην ποσότητα (~10 mL) που θα ληφθεί από το δοχείο καλλιέργειας όσο και σε αυτή που θα ληφθεί από το δείγμα αυτό για να τοποθετηθεί στην αντικειμενοφόρο πλάκα του αιμοκυττομέτρου. Η προσοχή συνίσταται στην ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων στο δοχείο και στην αντικειμενοφόρο και αυτό επιτυγχάνεται με ανάδευση του μέσου καλλιέργειας κατά τη λήψη του δείγματος και ανάδευση του δείγματος πριν τη λήψη της μικροποσότητας προς καταμέτρηση. Όλα τα κύτταρα των φυτοπλαγκτονικών ειδών αν αφεθούν σε ηρεμία (έλλειψη αερισμού) ακόμα και αυτά των μαστιγοφόρων κινητικών ειδών, θα υποστούν ένα βαθμό καθίζησης και μια ποσότητα από αυτά θα

συγκεντρωθεί στον πυθμένα του δοχείου. Αν ληφθεί λοιπόν δείγμα από ένα δοχείο σε ηρεμία η πυκνότητα των κυττάρων δεν θα αντιπροσωπεύει την πραγματική. Ο αερισμός αποτρέπει κάτι τέτοιο αλλά για να διασφαλίσουμε πλήρως την ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων όταν παίρνουμε δείγμα, συγχρόνως αναδεύουμε και χειροκίνητα το δοχείο.

Ειδικά για τα είδη φυτοπλαγκτού που είναι κινητικά δεν συνιστάται η καταμέτρησή τους σε ζωντανή κατάσταση καθώς η κίνησή τους στο δείγμα του μικροσκοπίου αποτρέπει την μέτρηση λόγω της συνεχούς αλλαγής θέσης των επάνω στο κατοπτρευόμενο μικροσκοπικώς γεωμετρικό γραμμωτό ειδικό πλέγμα που είναι χαραγμένο στο αιμοκυττόμετρο (Σχήμα 7). Ετσι λοιπόν τα κύτταρα ακινητοποιούνται πρώτα με την ενστάλαξη μιας μικροποσότητας διαλύματος Lugol (0,05 mL στα ~10 mL δείγματος) και κατόπιν λαμβάνεται η μικροποσότητα που θα τοποθετηθεί στο αιμοκυττόμετρο. Η μέθοδος αυτή όχι μόνο ακινητοποιεί τα κύτταρα αλλά και τα βάφει καφε-κόκκινα κάτι που διευκολύνει τον εντοπισμό τους στο οπτικό πεδίο και τα ξεχωρίζει από τυχόν άλλα ανόργανα μικροσωματίδια (σκουπίδια) και έτσι διευκολύνει την καταμέτρησή τους.



Σχήμα 7. Χαρακτηριστικό πεδίο αιμοκυτταρομέτρου τύπου Fuchs-Rosenthal με το χαραγμένο πλαίσιο και τα κύτταρα του φυτοπλαγκτού προς καταμέτρηση.

Κάτι άλλο που διευκολύνει την καταμέτρηση είναι η σωστή αραιώση του δείγματος. Αραιώση απαιτείται όταν το δείγμα είναι πολύ πυκνό και βρίθεται κυττάρων. Σε μια τέτοια περίπτωση η τοποθέτηση δείγματος στο αιμοκυττόμετρο θα παρουσιάσει στο οπτικό πεδίο του ερευνητή μια πυκνή μάζα κυττάρων που είναι αδύνατον να καταμετρηθούν επειδή αφενός πολλά κύτταρα καλύπτουν άλλα και αφετέρου ο χρόνος καταμέτρησης είναι πολύ μεγάλος. Αν λάβουμε επίσης υπόψη ότι για την πιστότητα της καταμέτρησης απαιτούνται αρκετές επαναλήψεις, τότε η

διάρκεια της διαδικασίας γίνεται απαγορευτική από πρακτική άποψη. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται με αραιώση του δείγματος με καθαρό νερό αλατότητας όμοιας με αυτή του δείγματος ούτως ώστε να δημιουργηθεί δείγμα με πολύ μικρότερη πυκνότητα κυττάρων άρα πολύ ευκολότερα καταμετρήσιμο. Φυσικά στον τελικό υπολογισμό της πυκνότητας θα υπολογιστεί και ο συντελεστής αραιώσης που δημιουργήσαμε (π.χ. για 1mL δείγματος + 4mL νερό θα έχουμε συντελεστή αραιώσης-d =5, για 1mL δείγματος + 9mL νερό θα έχουμε συντελεστή αραιώσης-d =10, κ.ο.κ.).

Όλα τα παραπάνω αφορούν τη διαδικασία καταμέτρησης των κυττάρων των μονοκύτταρων φυτοπλαγκτονικών ειδών που εξετάσαμε (*Nephroselmis*, *Amphidinium*, *Tetraselmis* [red], *Dunaliella*, *Asteromonas*, *Cyanothece*) αλλά όχι των νηματοειδών πολυκύτταρων κυανοβακτηριακών ειδών που στην περίπτωση μας ήταν το *Phormidium* sp. και το *Anabaena* sp.. Για τα κυανοβακτήρια αυτά η υπολογιζόμενη πυκνότητα καταγράφηκε όχι ως κύτταρα/mL αλλά ως γραμμάρια ξηρού βάρους μάζας κυττάρων ανά L (g d.w./L). Αυτό έγινε επειδή είναι αδύνατον να καταμετρηθούν τα μακριά νημάτιά τους επάνω στο αιμοκυττόμετρο για να μπορούν να καταμετρηθούν. Το ξηρό βάρος υπολογίστηκε ως εξής: Μία ορισμένη ποσότητα καλλιέργειας η οποία ποίκιλε ανάλογα με την αύξηση της φυκικής μάζας (μικρή πυκνότητα στην αρχή, ολόένα και μεγαλύτερη συν τω χρόνω) από 50 έως 300 mL (μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος στην αραιή καλλιέργεια, μικρότερη στην πυκνότερη) διηθούνταν σε αντλία κενού (Heto SUE 3Q) διά μέσου χάρτινου ηθμού Whatman πόρων 11 μm για το *Phormidium* ή φίλτρου GF/C πόρων 0,45 μm για το *Anabaena* και η μάζα των κυανοβακτηριακών νηματίων συγκρατούνταν στην επιφάνεια του ηθμού (Σχήμα 8). Ο κάθε ηθμός αφού αφυδατώνονταν πρώτα με ξήρανση 3 ωρών στους 105 °C σε κλίβανο (Termaks - Σχήμα 9) είχε προζυγιστεί σε ηλεκτρονική ζυγαριά (KERN-AU 220-4NM) ακριβείας της τάξεως του 0,0001 g (Σχήμα 10). Η υγρή μάζα των φυκών που παρέμενε στον ηθμό μετά τη φίλτρανση όλου του δείγματος ξεπλένονταν με 0,5 M φορμικό αμμώνιο ενώ η αντλία κενού λειτουργούσε, προκειμένου να αφαιρεθούν τα υπολείμματα άλατος από τη μάζα. Το φορμικό αμμώνιο έχει το πλεονέκτημα (συγκριτικά με το αποσταγμένο νερό) ότι δεν επιφέρει ωσμωτικό στρες στα κύτταρα (και έτσι δεν τα καταστρέφει με διάρρηξη των τοιχωμάτων τους) αλλά επιδρά μόνο στα άλατα διαλύοντάς τα. Κατόπιν ο υγρός ηθμός με λαβίδα αφαιρούνταν και τοποθετούνταν στον κλίβανο στους 60 °C για 24 ώρες προκειμένου να εξατμιστεί πλήρως όλο το νερό. Στη συνέχεια ο ηθμός με την ξηρή πλέον φυκομάζα (Σχήμα 11) ζυγίζονταν και η διαφορά με το αρχικό βάρος του ηθμού απέδιδε το ξηρό βάρος των φυκών που περιέχονταν στο δείγμα καλλιέργειας που διηθήθηκε. Με αναγωγή κατέληγε σε g/L.



Σχήμα 8. Αντλία κενού και φίλτρο προκειμένου να συλλεχθεί η υγρή μάζα των νηματοειδών κυανοβακτηριακών μικροφυκών.

Παράδειγμα:

V_1 : δείγμα καλλιέργειας προς διήθηση= 100 mL

W_1 : βάρος σε g αχρησιμοποίητου ηθμού

W_2 : βάρος σε g του αποξηραμένου ηθμού με την ξηρή μάζα των φυκών

$W_{d.w.}$ = ξηρό βάρος (σε g) μάζας φυκών στα 100 mL του δείγματος

Συνεπώς: $W_{d.w.}$ (g d.w./100 mL)= $W_2 - W_1$

Διαιρώντας την εκάστοτε ευρεθείσα τιμή του $W_{d.w.}$ με τα mL του δείγματος που διηθήσαμε υπολογίζουμε την πυκνότητα του φύκου σε g d.w./mL και με απλή αναγωγή και σε g d.w./ L.



Σχήμα 9. Κλίβανος για ξήρανση (αφυδάτωση) των ηθμών με τη μικροφυκική μάζα.



Σχήμα 10. Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας 0,0001 g που χρησιμοποιήθηκε για τη ζύγιση των ηθμών.



Σχήμα 11. Αποξηραμένα φίλτρα GF/C πόρων 0,45 μm, με την ξηρή μάζα μικροφυκών έτοιμα για ζύγιση.

Προκειμένου η διήθηση να γίνει απρόσκοπτα, συνιστάται η χρησιμοποίηση μικρής ποσότητας δείγματος καθώς μια πυκνή καλλιέργεια με τη διήθηση θα φράξει πολύ γρήγορα όλους τους πόρους του ηθμού και δεν θα είναι δυνατόν να διηθηθεί πλήρως το δείγμα με αποτέλεσμα στο χωνί διήθησης να λιμνάζει το επιπλέον νερό.

Ενα εγγενές χαρακτηριστικό των φυτοπλακτονικών καλλιεργειών είναι το πρότυπο ανάπτυξης του πληθυσμού των στην πορεία του χρόνου. Εφόσον οι συνθήκες (θερμοκρασία, φωτισμός, αερισμός, συγκέντρωση θρεπτικών) παραμένουν σε αποδεκτά και ει δυνατόν ιδανικά όρια για την ανάπτυξή τους, το πρότυπο της αύξησης της βιομάζας των διακρίνεται σε 4 φάσεις. Στην αρχή είναι η φάση καθυστέρησης όπου τα κύτταρα δεν διαιρούνται ή λίγα απ' αυτά διαιρούνται και η καλλιέργεια παρουσιάζει καθόλου ή ελάχιστη αύξηση. Το στάδιο αυτό διαρκεί ποικίλο χρόνο ανάλογα με το είδος και τις συνθήκες. Κατόπιν τα κύτταρα έχοντας πλήρως προσαρμοστεί στις συνθήκες επιταχύνουν το μεταβολισμό τους και διαιρούνται συνεχώς με αποτέλεσμα ο πληθυσμός τους να αυξάνεται με εκθετικό τρόπο. Είναι η λεγόμενη εκθετική φάση αύξησης και σε αυτή ο πληθυσμός θεωρείται ότι έχει τα βέλτιστα χαρακτηριστικά. Διαρκεί αρκετές ημέρες και αυτή είναι η φάση που θεωρητικά αντιστοιχεί σε δυνατότητα να μελετηθούν σωστά οι διάφορες βιοχημικές παράμετροι των κυττάρων. Η τρίτη φάση που ακολουθεί την εκθετική είναι η φάση στασιμότητας ή στατική φάση όπου τα κύτταρα έχουν εξαντλήσει τη δυναμική του έντονου μεταβολισμού τους, σταματούν να διαιρούνται και απλώς διατηρούνται στη μέγιστη πληθυσμιακή πυκνότητα που επετεύχθη στο τέλος της εκθετικής φάσης. Η στατική φάση οφείλεται στην εξάντληση των θρεπτικών ουσιών του μέσου καθώς και σε ουσίες ή βιοχημικά "σήματα" υπερπληθυσμού, παράγοντες που σταματούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Η φάση αυτή ανάλογα με το είδος μπορεί να διαρκεί λίγες ημέρες ή και εβδομάδες. Συν τω χρόνω τοξικά παραπροϊόντα συσσωρεύονται στο νερό και τα κύτταρα πεθαίνουν μαζικά σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Πρόκειται για τη φάση κατάρρευσης της καλλιέργειας από την οποία δεν υπάρχει επιστροφή (αδύνατη η ανανέωσή της).



Σχήμα 12. Φασματοφωτόμετρο UV-ορατού μονής δέσμης που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις της απορρόφησης των εξεταζομένων δειγμάτων. Αριστερά φαίνεται μια σειρά με κυψελίδες από δείγματα προς εξέταση, το δοχείο με το δείγμα φυτοπλαγκτού και η αυτόματη πιπέτα που χρησιμοποιήθηκε για να γίνουν οι επιθυμητές αραιώσεις.

Τα δείγματα που λαμβάνονταν για να καταμετρηθεί η πυκνότητα των κυττάρων συνάμα χρησιμοποιούνταν και για να μετρηθεί η οπτική τους απορρόφηση (ή οπτική πυκνότητα-optical density-O.D.) στο φασματοφωτόμετρο σε επιλεγμένα μήκη κύματος. Στο φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης Shimadzu UVmini-1240 (Σχήμα 12) χρησιμοποιήθηκαν τα μήκη κύματος 430, 680 και 750 nm για όλα τα φύκη (ευκαρυωτικά και κυανοβακτήρια) και επιπλέον 570 nm για το κυανοβακτήριο *Phormidium*.

Η διαδικασία αυτή γίνονταν καθημερινώς σε όλα τα δοχεία έτσι ώστε να καταγραφούν οι οπτικές απορροφήσεις των καλλιεργειών καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας. Κατόπιν βάσει του προκύπτοντος γραφήματος και της σχετικής εξίσωσης που συνδέει την οπτική απορρόφηση με την πυκνότητα των κυττάρων (καμπύλες βαθμονόμησης) καθίσταται δυνατή η όποια μετρούμενη τιμή οπτικής απορρόφησης να μεταφραστεί σε πυκνότητα κυττάρων (αναλυτικότερα παρακάτω). Πριν από κάθε μέτρηση στο εκάστοτε μήκος κύματος η ένδειξη μηδενίζονταν βάζοντας στον υποδοχέα το λεγόμενο "τυφλό" δείγμα που ήταν καθαρό νερό

καλλιέργειας (χωρίς κύτταρα) και μάλιστα νερό που προήλθε από προηγούμενη φυγοκέντρηση δείγματος καλλιέργειας προκειμένου τα κύτταρα να συγκεντρωθούν ως ίζημα στο σωλήνα και να ληφθεί το υπερκείμενο υγρό για να χρησιμοποιηθεί ως τυφλό. Η μέθοδος αυτή επιλέχθηκε επειδή στις καλλιέργειες προϊόντος του χρόνου στο νερό απελευθερώνονται και ποικίλες εξωκυτταρικές ουσίες οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την ακριβή μέτρηση της απορρόφησης (που επιθυμούμε να επηρεάζεται μόνο από την πυκνότητα των κυττάρων) αν δεν ληφθούν μέτρα για να αντισταθμιστεί ο "θόρυβος" που δημιουργούν αυτές οι εξωκυτταρικές ουσίες. Χαρακτηριστική περίπτωση αποτελεί το εξεταζόμενο είδος *Tetraselmis* sp. (var. red rarras) το οποίο παράγει αγνώστου φύσεως εξωκυτταρικές ουσίες οι οποίες χρωματίζουν το νερό κόκκινο. Αν φυγοκεντρηθεί δείγμα αυτού του μικροφύκου τα μεν κύτταρα του *Tetraselmis* θα σχηματίζουν ίζημα στον πυθμένα του δοχείου φυγοκέντρησης, όμως το υπερκείμενο αντί για διαυγές θα είναι κόκκινο (Σχήμα 13), συνεπώς ακριβώς αυτό το υπερκείμενο αποτελούσε το τυφλό για αυτό το φύκος προκειμένου το κόκκινο μέσον καλλιέργειας να μην επηρεάσει την οπτική πυκνότητα του μετρούμενου δείγματος η οποία επιθυμούμε να επηρεάζεται μόνο από την πυκνότητα των αιωρούμενων κυττάρων.

Τα παραπάνω μήκη κύματος επιλέχθηκαν κατόπιν παρατήρησης του φάσματος απορρόφησης του κάθε φύκου που προέκυψε από εξέταση δείγματος καλλιέργειας στην εκθετική φάση αύξησης. Το φάσμα απορρόφησης καταγράφηκε σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UV-Visible Shimadzu UV-1800 με τη χρήση κατάλληλου software H/Y.

Τα μήκη κύματος 430 και 680 nm αντιστοιχούν σε κορυφές (peaks) του φάσματος σε όλα τα φύκη που εξετάστηκαν και αν και με μικροαποκλίσεις ως προς την ακριβή τιμή της κορυφής ανά φύκος, θεωρούνται αντιπροσωπευτικά της διπλής κορυφής μέγιστης απορρόφησης των μορίων της χλωροφύλλης-α που υπάρχει σε όλα τα είδη.

Το μήκος κύματος των 570 nm αποτελεί μια ενδιάμεση τιμή της κλίμακας των μηκών κύματος που δεν αντιστοιχεί σε κάποια κορυφή στο κυανοβακτήριο *Phormidium* που να χαρακτηρίζει είτε τις χλωροφύλλες, είτε τα καρωτενοειδή, είτε τις βιλιπρωτεΐνες (φυκοκυανίνη-φυκοερυθρίνη) που μόνο αυτό (ως κυανοβακτήριο) περιέχει. Το μήκος κύματος των 750 nm που δεν αντιστοιχεί σε καμιά κορυφή του φάσματος σε κανένα φύκος επιλέχθηκε ως ένα "ουδέτερο" μήκος κύματος που δεν επηρεάζεται από τις μεταβολές της συγκέντρωσης των χρωστικών στις διάφορες φάσεις της καλλιέργειας.



Σχήμα 13. Δεξιός σωλήνας: Χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα του υπερκείμενου υγρού σε φυγοκεντρημένο δείγμα του μικροφύκου *Tetraselmis* sp. (red var rarras). Αριστερός σωλήνας: άχρωμο υπερκείμενο από άλλο είδος φύκους.

Πέραν της οπτικής απορρόφησης που καταγράφηκε για τα δείγματα των καλλιεργειών που λαμβάνονταν καθημερινά και των οποίων η συγκέντρωση των κυττάρων μετριόταν με το αιμοκυττόμετρο, έγιναν και καταγραφές της οπτικής πυκνότητας για δείγματα που προέρχονταν από πυκνές καλλιέργειες (προς το τέλος της εκθετικής φάσης) τα οποία υπέστησαν κατάλληλες αραιώσεις. Για το σκοπό αυτό ένα δείγμα καλλιέργειας μετρούνταν στο αιμοκυττόμετρο και η συγκέντρωση των κυττάρων σε κύτ./mL υπολογίζονταν. Κατόπιν το δείγμα αυτό υφίστατο αραιώσεις με νερό ίδιας αλατότητας έτσι ώστε να δημιουργηθούν 9 αραιότερα δείγματα, δηλαδή 9 μέρη φυτοπλαγκτού (ονομαζόμενο εντεύθεν "Δείγμα"- Δ) και 1 μέρος νερό (ονομαζόμενο εντεύθεν "Νερό"- N) = 10 μέρη αραιωμένου δείγματος με 0,9 φορές τη συγκέντρωση του αρχικού. Τοποθετούνταν σε δοκιμαστικό σωλήνα και ονομάζονταν 9Δ:1N. Κατά τον ίδιο τρόπο 8 μέρη δείγματος και 2 μέρη νερού (8Δ:2N) έδινε αραιώση 0,8 φορές αυτή του αρχικού. Συνεχίζοντας έτσι φτιάχονταν 9 αραιωμένα δείγματα (μέχρι 1Δ:9N) δηλαδή μια πλήρης ικανή σειρά αραιώσεων του αρχικού πυκνού δείγματος. Τα αραιωμένα κατά τα παραπάνω δείγματα αντιπροσώπευαν ως είναι ευνόητο ανάλογες του βαθμού αραιώσης πυκνότητες κυττάρων του αρχικού πυκνού δείγματος (10Δ:0N). Μετρούμενα ως προς την

οπτική τους πυκνότητα στα επιλεγθέντα μήκη κύματος (430, 680, 750 nm) απέδιδαν μια πολύ καλή αξιόπιστη σειρά μετρήσεων για ένα μεγάλο εύρος συγκέντρωσης κυττάρων / mL. Απαραίτητη προϋπόθεση για την αξιοπιστία και την ακρίβεια της μεθόδου ήταν η συνεχής και επαρκής ανάδευση του δείγματος έτσι που να μην υπάρχει περίπτωση να ληφθεί ποσότητα δείγματος προς αραιώση από μέσο καλλιέργειας που να έχει παραμείνει στο δοχείο αδιατάρακτο και κάποια κύτταρα να έχουν καθιζάνει. Οι κατά περίπτωση ποσότητες καλλιέργειας και νερού για να δημιουργηθούν οι παραπάνω αραιώσεις γίνονταν με χρήση αυτόματης πιπέττας Eppendorf και το δείγμα της καλλιέργειας από το οποίο λαμβάνονταν οι απαιτούμενες ποσότητες βρίσκονταν συνεχώς υπό ανάδευση σε δοχείο τοποθετημένο σε πλάκα αναδευτήρα.

Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης για το κάθε φύκος και για κάθε μήκος κύματος καταγράφονταν σε υπολογιστικά φύλλα excel και στη συνέχεια γίνονταν η παραγωγή των γραφημάτων που συνδέουν τη μετρούμενη πυκνότητα των κυττάρων ή το ξηρό τους βάρος (κυτό./mL ή g/L αντίστοιχα) με την οπτική πυκνότητα (σε αυθαίρετες μονάδες). Χρησιμοποιήθηκε το σύνολο των τιμών της απορρόφησης που προέκυψαν τόσο από τα δείγματα που υπέστησαν αραιώσεις όσο και από δείγματα που παρακολούθηθηκαν με εξέταση της κατάστασης της καλλιέργειας. Από τα προκύψαντα διαγράμματα έγινε η προσαρμογή της γραμμής τάσης στα σημεία του γραφήματος με την προοπτική να επιλεγεί αυτή που θα έδινε τον υψηλότερο συντελεστή συσχέτισης κατά Pearson (R^2).

Καθημερινώς και σε κάθε δοχείο μετρούνταν το pH με ηλεκτρονικό πεχάμετρο (Σχήμα 15) με ακρίβεια 2 δεκαδικών ψηφίων.

Η θερμοκρασία στο χώρο των καλλιεργειών διατηρούνταν μέσω συνεχούς χρήσης κλιματιστικού στους 21 ± 1 °C τιμή ικανοποιητική-ευνοϊκή για αύξηση φυτοπλαγκτονικών καλλιεργειών βάσει της βιβλιογραφίας και συνάμα σχετικά εύκολα επιτυγχανόμενη σε μονάδα παραγωγής.

Το τάχος αύξησης της εκάστοτε καλλιέργειας ως ειδικός ρυθμός αύξησης (r_{max}) υπολογίστηκε βάσει του τύπου:

$$r_{max} = \frac{\ln(D2) - \ln(D1)}{t2 - t1}$$

Όπου:

r_{max} = μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ως διπλασιασμοί ανά ημέρα

$\ln(D2)$ = ο φυσικός λογάριθμος της μετρηθείσας πυκνότητας κυττάρων (ή βάρους) την ημέρα t2.

$\ln(D1)$ = ο φυσικός λογάριθμος της μετρηθείσας πυκνότητας κυττάρων (ή βάρους) την ημέρα t1.

t2 = η μεταγενέστερη ημέρα της καλλιέργειας.

t1 = η αρχική ημέρα (ως προς τον υπολογισμό) της καλλιέργειας.

Με τον υπολογισμό του r_{max} γίνεται υπολογισμός του χρόνου γενεάς της καλλιέργειας (t_g) δηλαδή ο χρόνος (σε 24ωρα) που απαιτείται για να διπλασιαστεί ο πληθυσμός του μικροφύκου, βάσει του τύπου:

$$t_g = \frac{0.6931}{r_{max}}$$



Σχήμα 14. Η συσκευή του αυτόκαυστου (A) και (B) τα 12 L χωρητικότητας δοχεία Nalgene με το αποστειρωμένο και λιπασμένο αλμυρό νερό διαφόρων αλατοτήτων.



Σχήμα 15. Χρησιμοποιηθέντα όργανα. **A:** Φυγόκεντρος, **B:** Διαθλασίμετρο-αλατόμετρο, **C:** Μικροσκόπιο Leica, **D:** ηλεκτρονικό πεχάμετρο, **E:** Λουξόμετρο.

Στο ίδιο πλαίσιο της διασφάλισης ύπαρξης μόνο των επιθυμητών μικροφυκών (σε πιθανή ύπαρξη μείγματος 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.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

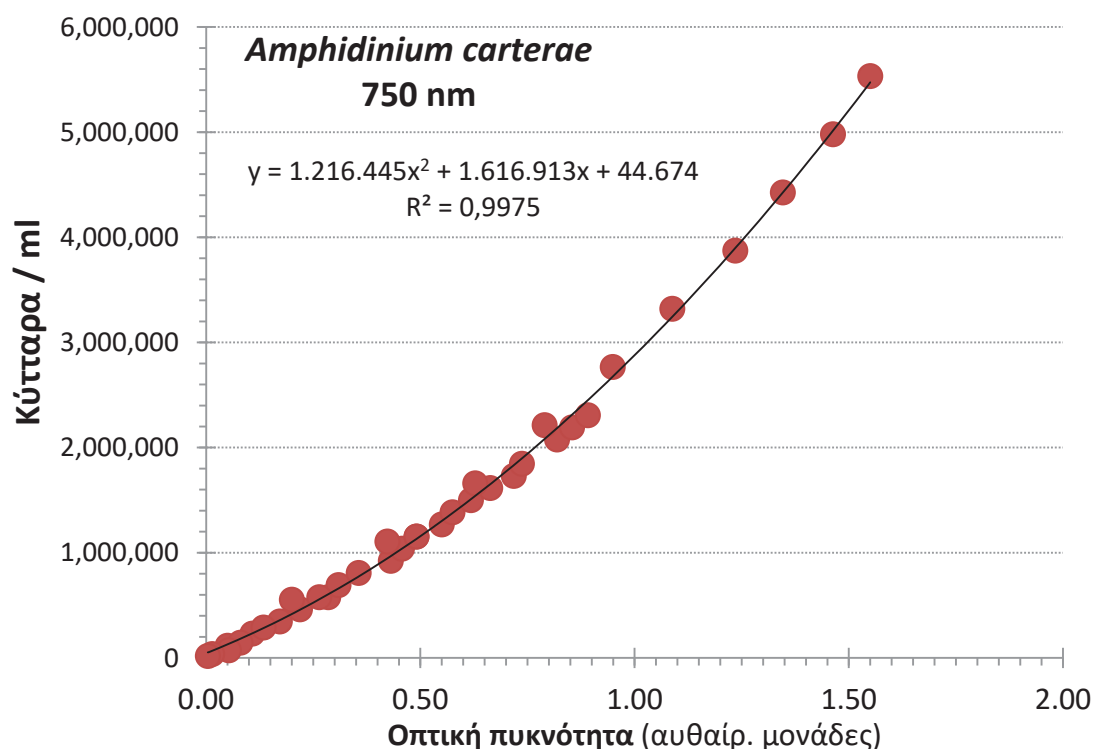
Amphidinium carterae



Αύξηση των καλλιεργειών

Για το δινομαστιγυτό *Amphidinium carterae* επελέγησαν προς καλλιέργεια οι αλατότητες 20, 40 και 50 ppt παραλείποντας την αλατότητα των 60 ppt καθώς οι προκαταρκτικές καλλιέργειες έδειξαν ότι δεν ανταποκρίνεται καλά σε αλατότητες άνω των 50 ppt.

Επίσης από προκαταρκτικά πειράματα φάνηκε ότι το είδος αυτό είναι ευαίσθητο στην υπερβολική καταπόνηση που προκαλείται από τον έντονο αερισμό οπότε αντί για τα πλατιά δοχεία Erlenmeyer στα οποία για να επιτευχθεί ομοιομορφία στην ανάδευση του νερού χρειάζεται έντονος αερισμός, κάτι που θα επέφερε καταπόνηση των κυττάρων, προτιμήθηκαν κυλινδρικές πλαστικές φιάλες του 1 L (Σχήματα 17, 18 & 19). Έτσι με τον ελάχιστο αλλά επαρκή αερισμό (παροχής ~ 0.5 L/min) εξασφαλίζονται και οι ανάγκες της φωτοσύνθεσης (συνεχής έκθεση όλου του όγκου της καλλιέργειας στο φως) αλλά και η ελάχιστη καταπόνηση των κυττάρων.



Σχήμα 16. Καμπύλη βαθμονόμησης των καλλιεργειών του *Amphidinium carterae* από πλήθος ζευγών τιμών οπτικής απορρόφησης-πυκνότητας κυττάρων.

Οι καλλιέργειες αυτού του δινομαστιγώτου προσαρμόστηκαν σε όλες τις αλατότητες και παρουσίασαν αύξηση (Σχήματα). Οι καταγραφείσες ημερησίως μετρήσεις ως τιμές οπτικής απορρόφησης στα 750 nm που αποδείχθηκε το καλύτερο μήκος κύματος (μεταξύ των δοκιμασθέντων) με συντελεστή Pearson $R^2 = 0,9975$, μεταφράστηκαν σε πυκνότητες κυττάρων/mL μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης (Σχήμα 16) η οποία κατασκευάστηκε τόσο από επεξεργασία δειγμάτων κατάλληλα αραιωμένων όσο και από περιοδικές μετρήσεις των καλλιιεργειών με αιμοκυττόμετρο.

Η εξίσωση βαθμονόμησης ήταν η δευτέρου βαθμού:

$$\text{Πυκνότητα} = 1.216.445(\text{O.D.})^2 + 1.616.913(\text{O.D.}) + 44.674$$

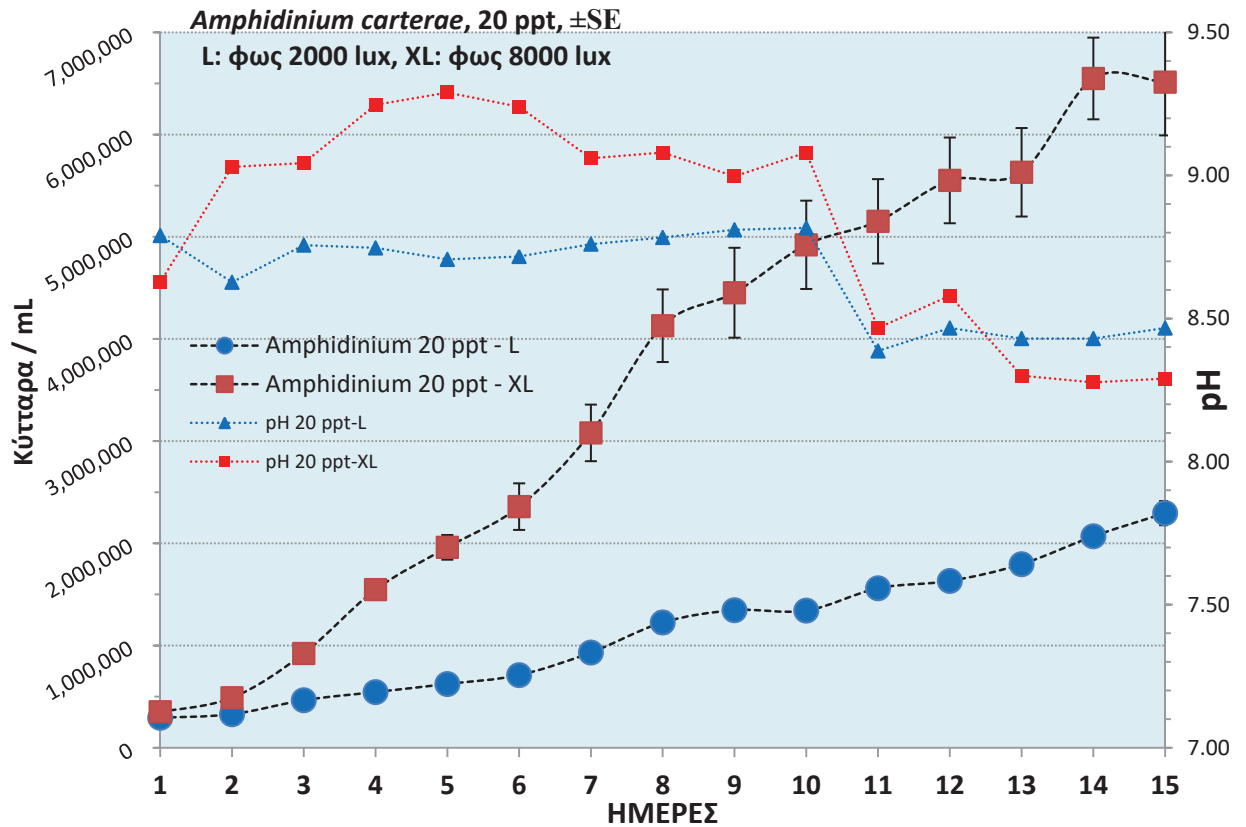
όπου: Πυκνότητα = κύτταρα/mL, O.D.= τιμές οπτικής απορρόφησης.

Οι καλλιέργειες διήρκεσαν 15 ημέρες καθώς ήδη από την 8^η ημέρα διαφάνηκε σε όλες τις συνθήκες η πτώση του ρυθμού αύξησης και η "είσοδος" στη στατική φάση της εκάστοτε καλλιέργειας (αν και με ποικίλο τρόπο στην καθεμιά).

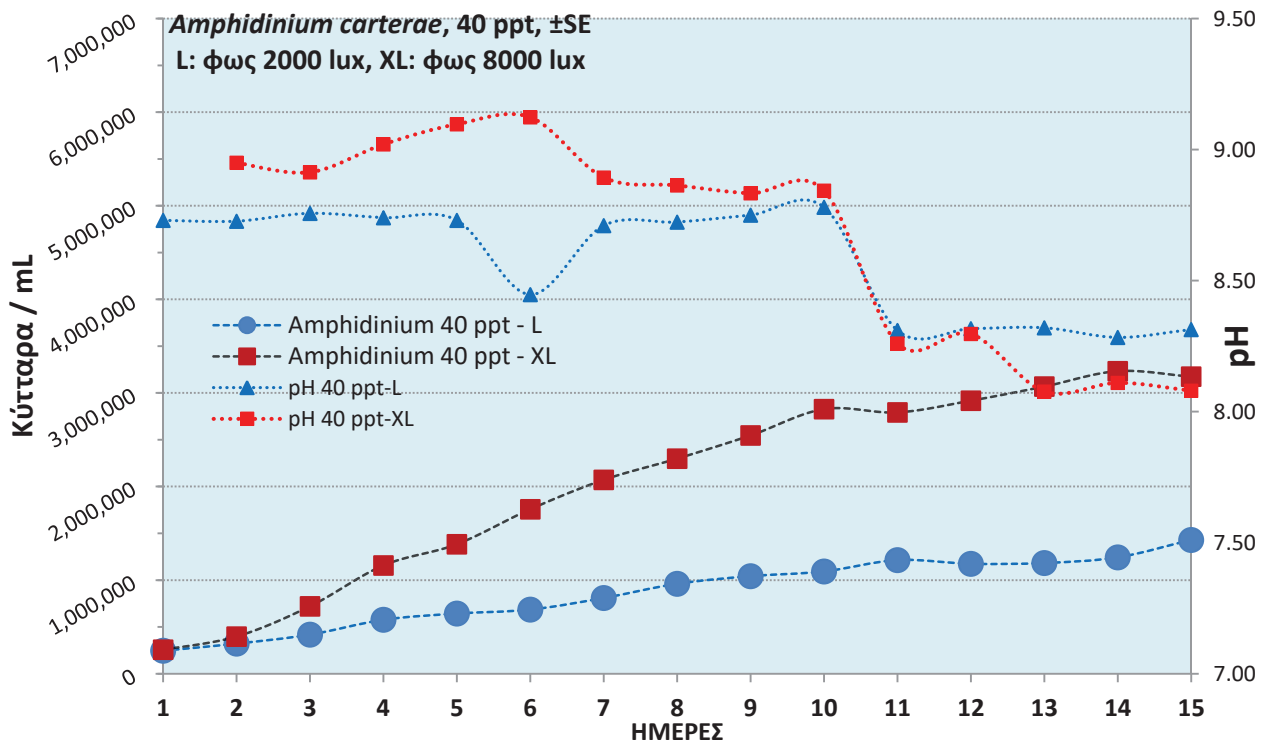
Στην αλατότητα των 20 ppt (Σχήμα 17) ήταν εμφανής η εξέλιξη της καλλιέργειας η οποία παρουσίασε πολύ εντονότερη αύξηση στον έντονο φωτισμό (8000 lux) συγκριτικά με τον ασθενή φωτισμό (2000 lux). Και στους δύο φωτισμούς παρουσιάστηκε μια πολύ σύντομη αρχική φάση (2 ημερών) καθυστέρησης-προσαρμογής μετά την οποία ιδιαίτερα στον έντονο φωτισμό η αύξηση έγινε έντονα εκθετική. Το pH κυμάνθηκε στο αλκαλικό επίπεδο με τιμές ~8,3 - ~9,3 και από την αρχή ήδη παρουσίασε υψηλότερες τιμές στον έντονο φωτισμό (δείγμα εντονότερης φωτοσύνθεσης) και κατόπιν (από την 11^η ημέρα), έντονη συγχρονισμένη πτώση (δείγμα γήρανσης) και στους δύο φωτισμούς.

Στην αλατότητα των 40 ppt (Σχήμα 18) επίσης η καλλιέργεια παρουσίασε πολύ εντονότερη αύξηση στον έντονο φωτισμό (8000 lux) συγκριτικά με τον ασθενή φωτισμό (2000 lux). Και στους δύο φωτισμούς παρουσιάστηκε μια πολύ σύντομη αρχική φάση (2 ημερών) καθυστέρησης-προσαρμογής μετά την οποία ιδιαίτερα στον έντονο φωτισμό η αύξηση έγινε μεν εκθετική αλλά όχι τόσο έντονα όσο στην αλατότητα των 20 ppt. Το pH κυμάνθηκε στο αλκαλικό επίπεδο με τιμές ~8,3 - ~9,0 και από την αρχή ήδη παρουσίασε υψηλότερες τιμές στον έντονο φωτισμό (δείγμα εντονότερης φωτοσύνθεσης) και κατόπιν (από την 11^η ημέρα), έντονη συγχρονισμένη πτώση (δείγμα γήρανσης) και στους δύο φωτισμούς.

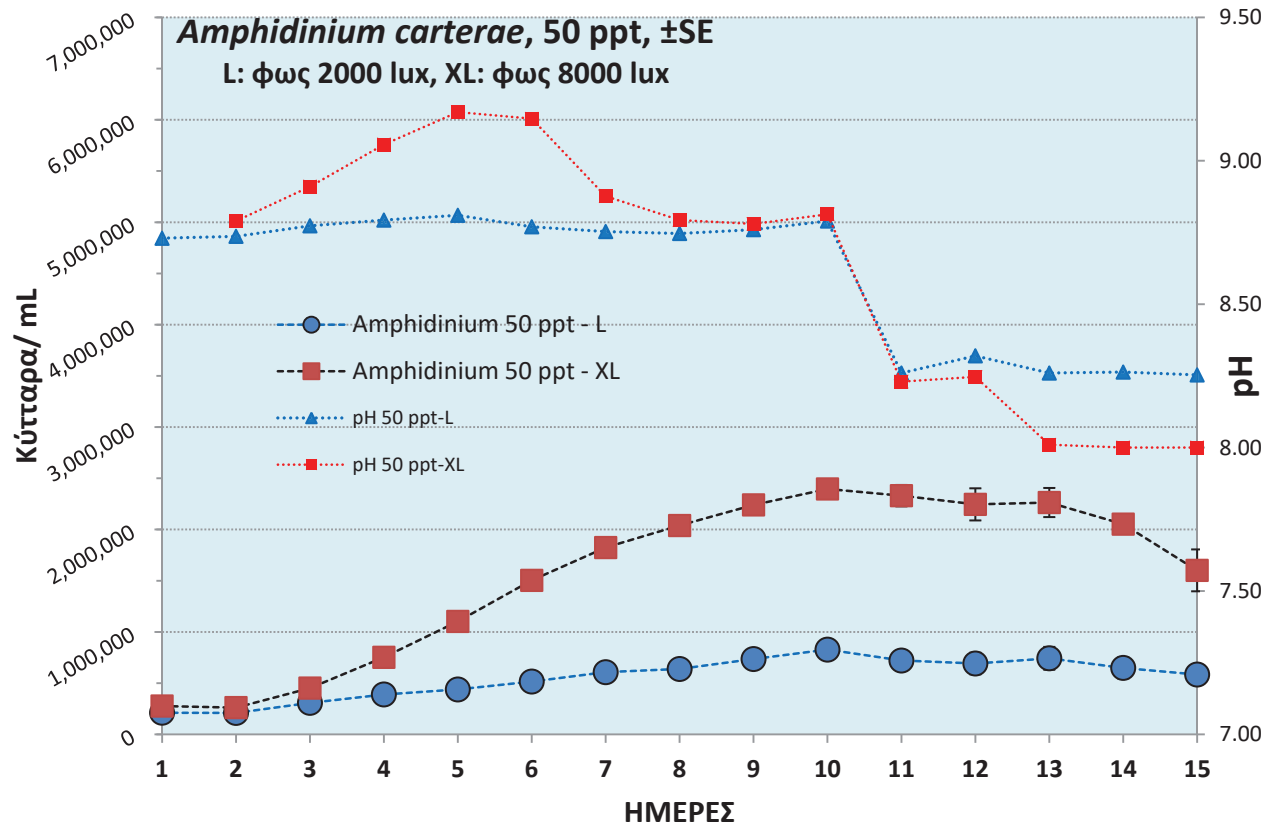
Στην αλατότητα των 50 ppt (Σχήμα 19) επίσης η αύξηση της καλλιέργειας παρουσίασε σχεδόν το ίδιο πρότυπο με αυτή των 40 ppt με τη μόνη διαφορά ότι η φάση στασιμότητας που ακολουθεί την εκθετική φάση επήλθε κατά τι νωρίτερα (10^η ημέρα) συγκριτικά με την 11^η ημέρα στην αλατότητα των 40 ppt και τη 13^η ημέρα στην αλατότητα των 20 ppt-XL. Και εδώ το pH κυμάνθηκε στο αλκαλικό επίπεδο με τιμές ~8,3 - ~9,0 και από την αρχή ήδη παρουσίασε υψηλότερες τιμές στον έντονο φωτισμό (δείγμα εντονότερης φωτοσύνθεσης) και κατόπιν (από την 11^η ημέρα) έντονη συγχρονισμένη πτώση (δείγμα γήρανσης) και στους δύο φωτισμούς.



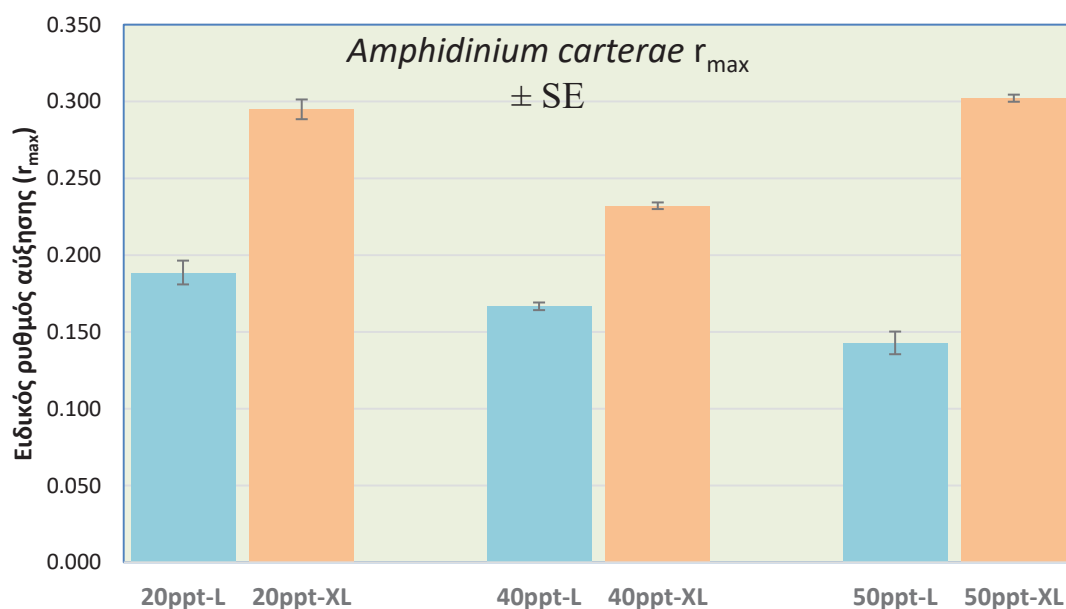
Σχήμα 17. Η καμπύλη αύξησης (σε κύτταρα/mL) της καλλιέργειας του *Amphidinium carterae* στην αλατότητα των 20 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.



Σχήμα 18. Η καμπύλη αύξησης (σε κύτταρα/mL) της καλλιέργειας του *Amphidinium carterae* στην αλατότητα των 40 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.



Σχήμα 19. Η καμπύλη αύξησης (σε κύτταρα/mL) της καλλιέργειας του *Amphidinium carterae* στην αλατότητα των 50 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.



Σχήμα 20. Οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης (r_{max}) \pm SE των καλλιεργειών του *Amphidinium carterae* στις αλατότητες των 20, 40 και 50 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux).

Πίνακας 1. Συγκεντρωτικά στοιχεία των ειδικών ρυθμών αύξησης (r_{max}) και του χρόνου γενεάς ή διπλασιασμού (t_g) των καλλιεργειών του *Amphidinium carterae* στις αλατότητες των 20, 40 και 50 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Οι διαφορετικοί παρατιθέμενοι εκθέτες σημαίνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά στο επίπεδο 0,05 (στατιστική επεξεργασία με ANOVA και κατόπιν σύγκριση κατά ζεύγη με Tukey's test). Οπου υπάρχει και δεύτερος εκθέτης σημαίνει στατιστικώς ίση τιμή με την συνθήκη του αντίστοιχου γράμματος.

Συνθήκες	20ppt-L	20ppt-XL	40ppt-L	40ppt-XL	50ppt-L	50ppt-XL
r_{max}	0,189 ^a	0,295 ^b	0,167 ^c	0,232 ^d	0,143 ^e	0,302 ^{f,b}
SE	0,0077	0,0064	0,0025	0,0022	0,0074	0,0023
Διάστημα (ημέρες)	3 ⁿ -8 ⁿ	3 ⁿ -8 ⁿ	3 ⁿ -8 ⁿ	3 ⁿ -8 ⁿ	3 ⁿ -8 ⁿ	3 ⁿ -8 ⁿ
n	27	27	27	27	27	27
t_g (24ωρα)	3,67	2,35	4,16	2,98	4,85	2,29
SE	0,185	0,049	0,062	0,028	0,323	0,018
n	27	27	27	27	27	27

Για τον υπολογισμό του τάχους της αύξησης (ειδικός ρυθμός αύξησης r_{max}) επελέγη τη διάστημα 3ⁿ - 8ⁿ ημέρα καθώς παρουσίασε ομοιομορφία στην καμπύλη αύξησης σε όλες τις αλατότητες. Το τάχος της αύξησης ως ειδικός ρυθμός αύξησης (r_{max}) και ο χρόνος διπλασιασμού ή γενεάς (t_g) αποτυπώνονται στο Σχήμα 20 και αναλυτικότερα στον Πίνακα 1. Προκύπτει σαφώς μεγαλύτερο τάχος αύξησης σε όλες τις αλατότητες με τον έντονο φωτισμό (0,295 - 0,232 - 0,302) για τις αλατότητες 20 - 40 - 50 ppt αντίστοιχα, συγκριτικά με τις τιμές (0,189 - 0,167 - 0,143) για το χαμηλό φωτισμό στις αντίστοιχες ίδιες αλατότητες. Στατιστικώς οι τιμές διέφεραν μεταξύ τους εκτός από αυτές των 20 και 50 ppt που στον έντονο φωτισμό (8000 lux) ήταν στατιστικώς ίσες.

Ως αντανάκλαση των παραπάνω ρυθμών αύξησης και οι χρόνοι γενεάς (t_g) ήταν συντομότεροι στη συνθήκη του έντονου φωτισμού (2,35 - 2,98 - 2,29 ημέρες για τις αλατότητες 20 - 40 - 50 ppt αντίστοιχα συγκριτικά με τις τιμές (3,67 - 4,16 - 4,85) για το χαμηλό φωτισμό στις αντίστοιχες ίδιες αλατότητες.

Απόδοση των καλλιεργειών

Για την απόδοση των καλλιεργειών (Σχήμα 21) σε βιομάζα ως ξηρό βάρος ανά λίτρο καλλιέργειας (g/L), υπολογίστηκαν οι τιμές τη 13ⁿ ημέρα. Αποδεικνύεται σαφώς και σε συμφωνία με την καμπύλη αύξησης του Σχήματος 17 που αφορά την αλατότητα των 20 ppt συγκριτικά με τις καμπύλες των Σχημάτων 18 και 19 για τις αλατότητες των 40 και 50 ppt αντίστοιχα, ότι η αλατότητα των 20 ppt και του έντονου φωτισμού (8000 lux) προκαλεί τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας (1,17 g/L) με όλες τις άλλες συνθήκες να δίδουν τιμές κατώτερες του 0,8 g/L.

Αξιοσημείωτες επίσης σε όλες της αλατότητες η πολύ μεγαλύτερη παραγωγή στις συνθήκες του έντονου φωτός (8000 lux) συγκριτικά με τις αντίστοιχες τους στον ασθενέστερο φωτισμό (2000 lux).

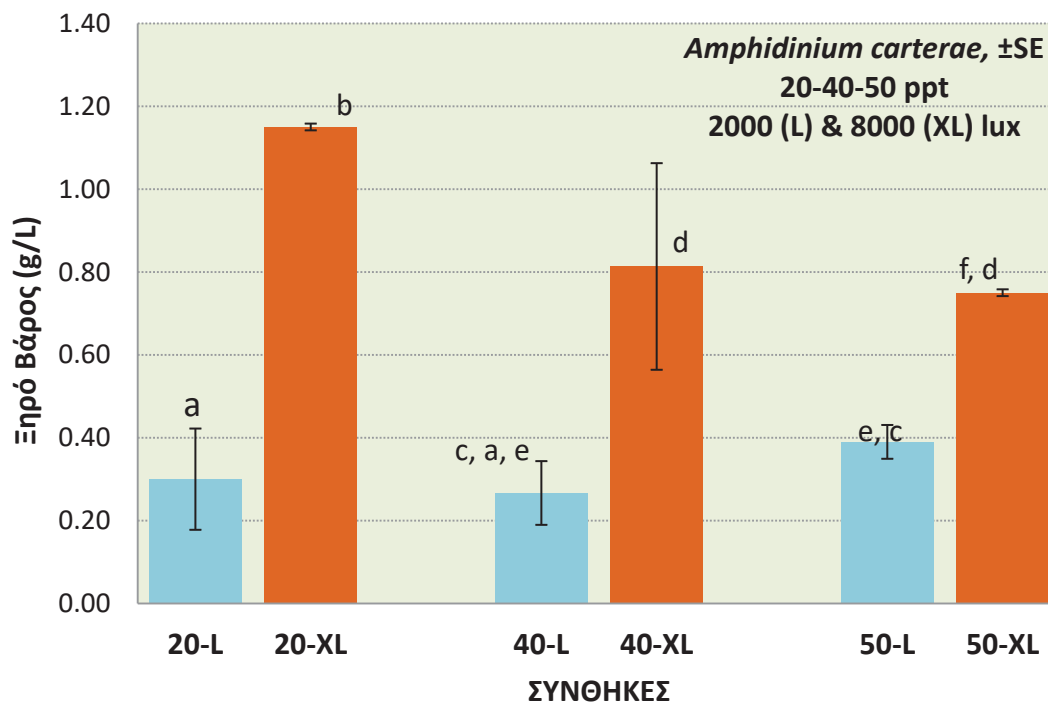
Γενικές παρατηρήσεις

Οι καλλιέργειες του *Amphidinium carterae* παρουσιάζουν ιδιαίτερο και μοναδικό χρωματισμό (Σχήματα 22, 23, 24 και 25) ο οποίος εξελίσσεται από ελαφρά κιτρινοπράσινος σε έντονα λαμπερό καφετί (προφανώς λόγω μοναδικής σύνθεσης σε καρωτενοειδή) με την πρόοδο της καλλιέργειας και τελικά στις πολύ ώριμες καλλιέργειες σε υποβαθμισμένο καφετί έως κιτρινωπό. Στην πλήρη άνθισή τους οι καλλιέργειες αναδίδουν μια μοναδική μυρωδιά σαπισμένης θαλάσσιας ύλης με μια ιδέα ιωδίου που σε ορισμένους είναι αρεστή.

Το *Amphidinium carterae* ως δινομαστιγυτό φέρει 2 μαστίγια στα κύτταρά του και ως εκ τούτου είναι κινητικό. Οι καλλιέργειές του ακόμα και με παντελή έλλειψη αερισμού δεν παρουσιάζουν καθίζηση και τα κύτταρα παραμένουν στη στήλη του νερού.

Τα αποτελέσματα της καλλιέργειάς του υποδεικνύουν προς μία προτίμησή του για χαμηλές αλατότητες, πλην όμως δεν παύει να δίνει καλά χαρακτηριστικά αύξησης και αποδόσεις και σε αλατότητες στο εύρος 20-50 ppt τουλάχιστον.

Στη βιβλιογραφία λείπουν παντελώς στοιχεία καλλιέργειάς του σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν, οπότε τις θεωρούμε ως βάση για μελλοντικούς πειραματισμούς.



Σχήμα 21. Απόδοση σε ξηρό βάρος φύκους (g/L) ± SE του *Amphidinium carterae* στις αλατότητες των 20, 40 και 50 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Η ύπαρξη σημαντικής στατιστικής διαφοράς στο επίπεδο 0,05 υποδεικνύεται με διαφορετικό γράμμα. Οι στατιστικώς ίσες τιμές υποδεικνύονται με την επανάληψη των ανάλογων δεικτών στις στήλες (στατιστική επεξεργασία με ANOVA και κατόπιν σύγκριση κατά ζεύγη με Tukey's test).



Σχήμα 22. Τα δοχεία καλλιέργειας του *Amphidinium carterae* κατά την αρχική φάση (2^η ημέρα) με το χαρακτηριστικό ομοιόμορφο κιτρινωπό χρώμα.



Σχήμα 23. Τα δοχεία καλλιέργειας του *Amphidinium carterae* κατά τη μέση φάση (8^η ημέρα) με το χαρακτηριστικό κιτρινοκαφετί χρώμα.



Σχήμα 24. Τα δοχεία καλλιέργειας του *Amphidinium carterae* κατά την τελική φάση (13-14^η ημέρα) με το χαρακτηριστικό καφετί χρώμα.



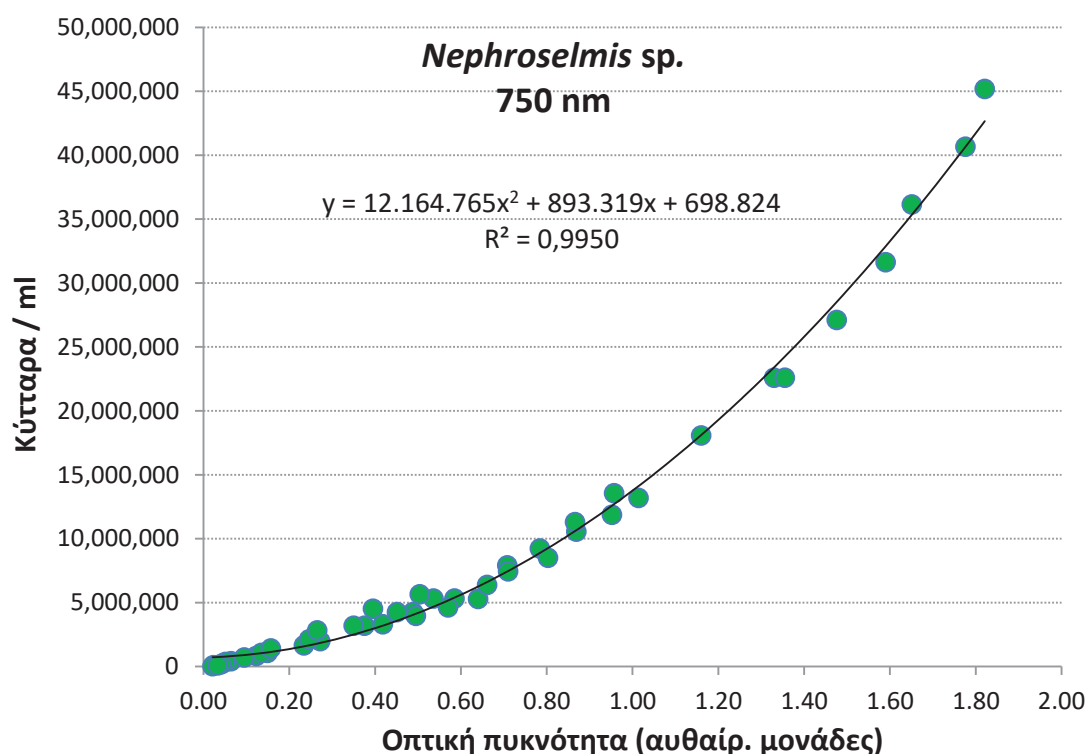
Σχήμα 25. Τα δοχεία του *Amphidinium carterae* μετά το τέλος της καλλιέργειας (15^η ημέρα) με τα χαρακτηριστικά «ξεπλυμένα» χρώματα.

Nephroselmis sp.



Αύξηση των καλλιεργειών

Για το χλωροφύκος *Nephroselmis* sp. επελέγησαν προς καλλιέργεια οι αλατότητες 20, 40 και 60 ppt καθώς οι προκαταρκτικές δοκιμές έδειξαν ότι ανταποκρίνεται καλά σε όλες τις παραπάνω αλατότητες.



Σχήμα 26. Καμπύλη βαθμονόμησης των καλλιεργειών του *Nephroselmis* sp. από πλήθος ζευγών τιμών οπτικής απορρόφησης-πυκνότητας κυττάρων.

Χρησιμοποιήθηκαν κωνικά γυάλινα δοχεία Erlenmeyer των 2L με 2 αντίγραφα για κάθε συνδυασμό αλατότητας και έντασης φωτός και συνεχή παροχή αέρα της τάξεως του 1 όγκου δοχείου/min (~2L/min). Οι καλλιέργειες του *Nephroselmis* sp. προσαρμόστηκαν σε όλες τις αλατότητες και παρουσίασαν αύξηση (Σχήματα 27, 28 & 29). Οι καταγραφείσες ημερησίως μετρήσεις ως τιμές οπτικής απορρόφησης στα 750 nm που αποδείχθηκε το καλύτερο μήκος κύματος (μεταξύ

των δοκιμασθέντων) με συντελεστή Pearson $R^2 = 0,995$, μεταφράστηκαν σε πυκνότητες κυττάρων/mL μέσω της εξίσωσης της καμπύλης βαθμονόμησης (Σχήμα 26) η οποία κατασκευάστηκε τόσο από επεξεργασία δειγμάτων κατάλληλα αραιωμένων όσο και από περιοδικές μετρήσεις των καλλιιεργειών με αιμοκυττόμετρο. Η εξίσωση βαθμονόμησης ήταν η δευτέρου βαθμού:

$$\text{Πυκνότητα} = 12.164.765(\text{O.D.})^2 + 893.319(\text{O.D.}) + 698.824$$

όπου: Πυκνότητα = κύτταρα/mL, O.D.= τιμές οπτικής απορρόφησης.

Οι καλλιέργειες διήρκεσαν 22 ημέρες και μετά από μία περίοδο προσαρμογής-καθυστέρησης 3-4 ημερών όλες παρουσίασαν μια έντονη και παρατεταμένη εκθετική φάση η οποία ήταν εντονότερη στον υψηλής έντασης φωτισμό (8000 lux). Η "είσοδος" στη στατική φάση της εκάστοτε καλλιέργειας έγινε με ποικίλο τρόπο στην κάθε συνθήκη και μετά την 17^η ημέρα για τις καλλιέργειες στον έντονο φωτισμό, ενώ στον ασθενέστερο φωτισμό (2000 lux) στις αλατότητες των 20 και 40 ppt πρακτικά για όλη την περίοδο της καλλιέργειας δεν παρατηρήθηκε κάμψη της εκθετικής καμπύλης αύξησης, κάτι που παρουσιάστηκε στην αλατότητα των 60 ppt από τη 17^η ημέρα (Σχήμα 29).

Στην αλατότητα των 20 ppt (Σχήμα 27) ήταν εμφανής η εξέλιξη της καλλιέργειας η οποία παρουσίασε πολύ εντονότερη αύξηση στον έντονο φωτισμό (8000 lux) φθάνοντας σε πυκνότητες περί τα 75.000.000 κύτταρα/mL την 22^η ημέρα συγκριτικά με τον ασθενή φωτισμό (2000 lux) όπου την 20^η ημέρα έφθασε τα 35.000.000 κύτ./mL (70.000.000 κύτ./mL την ημέρα αυτή στον έντονο φωτισμό).

Το pH κυμάνθηκε στο αλκαλικό επίπεδο με τιμές αρχικά ~7,9 που γρήγορα ανέβηκαν στο επίπεδο του ~8,5 και από την αρχή ήδη παρουσίασε υψηλότερες τιμές στον έντονο φωτισμό (δείγμα εντονότερης φωτοσύνθεσης) και κατόπιν (από τη 17^η ημέρα) συγχρονισμένη πτώση (δείγμα γήρανσης) και στους δύο φωτισμούς.

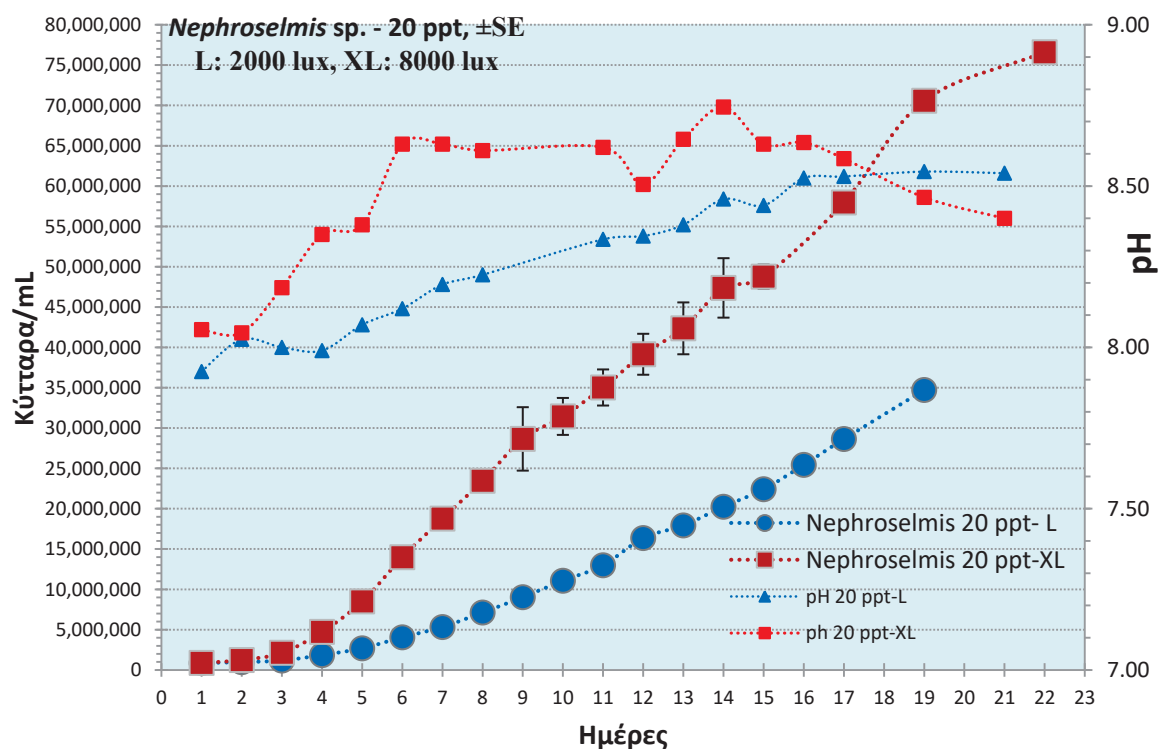
Στην αλατότητα των 40 ppt (Σχήμα 28) επίσης η αύξηση της καλλιέργειας παρουσίασε πολύ εντονότερη αύξηση στον έντονο φωτισμό (8000 lux) φθάνοντας πυκνότητα περί τα 67.000.000 κύτταρα/mL την 22^η ημέρα συγκριτικά με τον ασθενή φωτισμό (2000 lux) που έφθασε τα 41.000.000 κύτταρα/mL την ίδια ημέρα. Και στους δύο φωτισμούς μετά από μια πολύ σύντομη αρχική φάση (3-4 ημερών) καθυστέρησης-προσαρμογής η αύξηση έγινε έντονα εκθετική ιδιαίτερα στον έντονο φωτισμό. Το pH κυμάνθηκε στο αλκαλικό επίπεδο με τιμές ~8,2 - ~8,8 και από την αρχή ήδη παρουσίασε υψηλότερες τιμές στον έντονο φωτισμό (δείγμα εντονότερης φωτοσύνθεσης) και κατόπιν (από την 17^η ημέρα) συγχρονισμένη πτώση (δείγμα γήρανσης) και στους δύο φωτισμούς.

Στην αλατότητα των 60 ppt (Σχήμα 29) επίσης η αύξηση της καλλιέργειας παρουσίασε πολύ εντονότερη αύξηση στον έντονο φωτισμό (8000 lux) φθάνοντας πυκνότητα περί τα 50.000.000 κύτταρα/mL την 22^η ημέρα συγκριτικά με τον ασθενή φωτισμό (2000 lux) που έφθασε τα 30.000.000 κύτταρα/mL την ίδια ημέρα. Και στους δύο φωτισμούς μετά από μια πολύ σύντομη αρχική φάση (3-4 ημερών) καθυστέρησης-προσαρμογής, η αύξηση έγινε έντονα εκθετική ιδιαίτερα στον

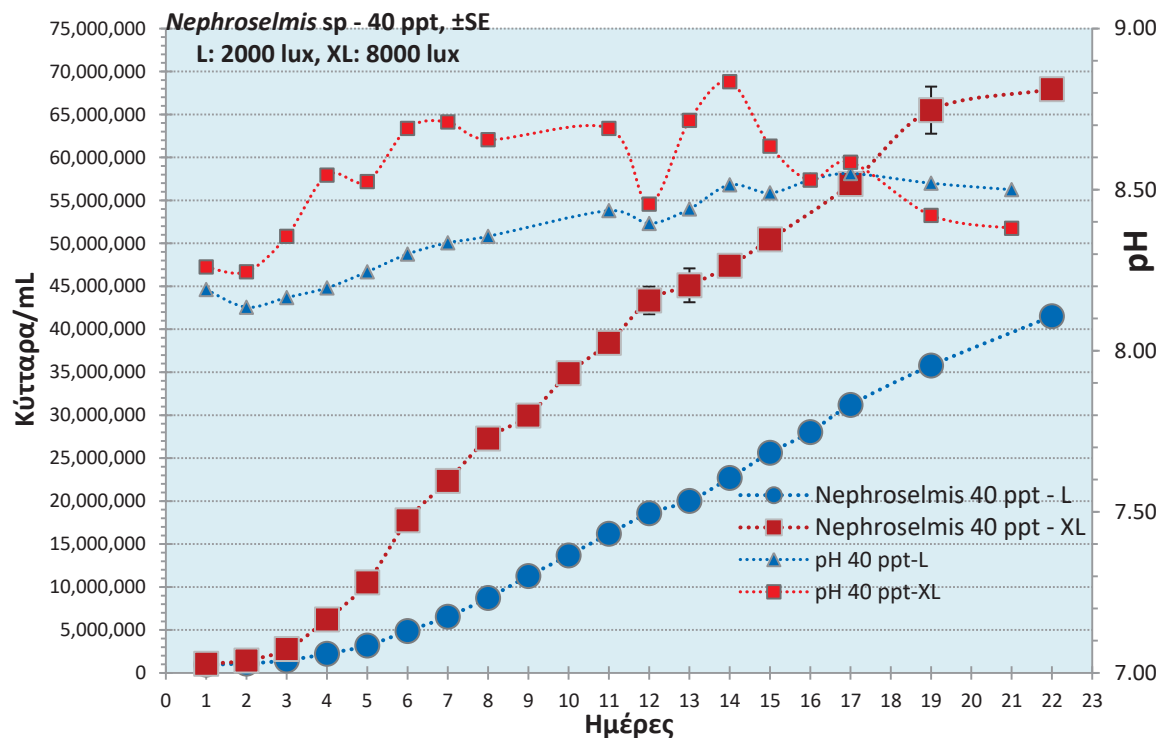
έντονο φωτισμό αλλά διήρκεσε μόνο μέχρι την 11^η ημέρα ενώ στον ασθενή φωτισμό μέχρι τη 17^η ημέρα. Κατόπιν οι καλλιέργειες εισήλθαν στη στατική φάση η οποία ήταν εμφανέστερη στον έντονο φωτισμό.

Το pH κυμάνθηκε στο αλκαλικό επίπεδο με τιμές ~8,2 - ~8,8 και από την αρχή ήδη παρουσίασε υψηλότερες τιμές στον έντονο φωτισμό (δείγμα εντονότερης φωτοσύνθεσης) και κατόπιν (από την 17^η ημέρα) συγχρονισμένη πτώση (δείγμα γήρανσης) και στους δύο φωτισμούς.

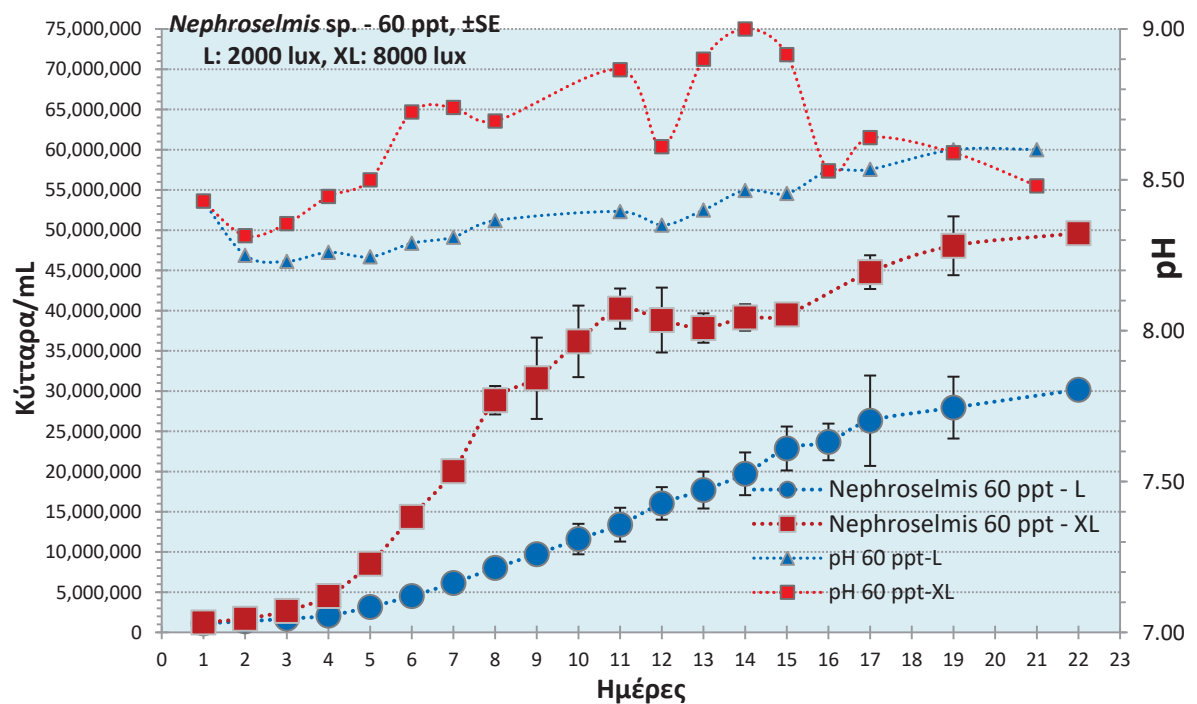
Για τον υπολογισμό του τάχους της αύξησης (ειδικός ρυθμός αύξησης r_{max}) επελέγη τη διάστημα 4^η - 8^η ημέρα καθώς παρουσίασε ομοιομορφία στην καμπύλη αύξησης σε όλες τις αλατότητες.



Σχήμα 27. Η καμπύλη αύξησης (σε κύτταρα/mL) της καλλιέργειας του *Nephroselmis* sp. στην αλατότητα των 20 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.



Σχήμα 28. Η καμπύλη αύξησης (σε κύτταρα/mL) της καλλιέργειας του *Nephroselmis* sp. στην αλατότητα των 40 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.

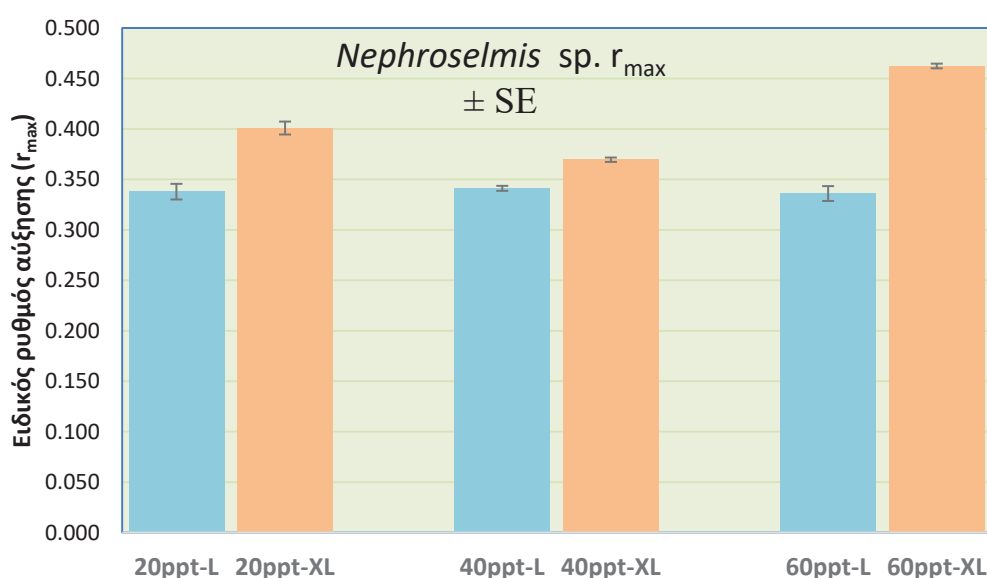


Σχήμα 29. Η καμπύλη αύξησης (σε κύτταρα/mL) της καλλιέργειας του *Nephroselmis* sp. στην αλατότητα των 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.

Το τάχος της αύξησης ως ειδικός ρυθμός αύξησης (r_{max}) και ο χρόνος διπλασιασμού ή γενεάς (t_g) αποτυπώνονται στο Σχήμα 30 και αναλυτικότερα στον

Πίνακα 2. Προκύπτει σαφώς μεγαλύτερο τάχος αύξησης σε όλες τις αλατότητες με τον έντονο φωτισμό (0,401 - 0,370 - 0,462) για τις αλατότητες 20 - 40 - 60 ppt αντίστοιχα συγκριτικά με τις τιμές (0,338 - 0,341 - 0,336) για το χαμηλό φωτισμό στις αντίστοιχες ίδιες αλατότητες. Στατιστικώς οι τιμές διέφεραν μεταξύ τους εκτός από αυτές του χαμηλού φωτισμού σε όλες τις αλατότητες οι οποίες παρουσίασαν μια εντυπωσιακή ομοιομορφία και ήταν στατιστικώς ίσες. Γενικώς η αλατότητα των 60 ppt στον υψηλό φωτισμό έδωσε τον υψηλότερο ρυθμό αύξησης.

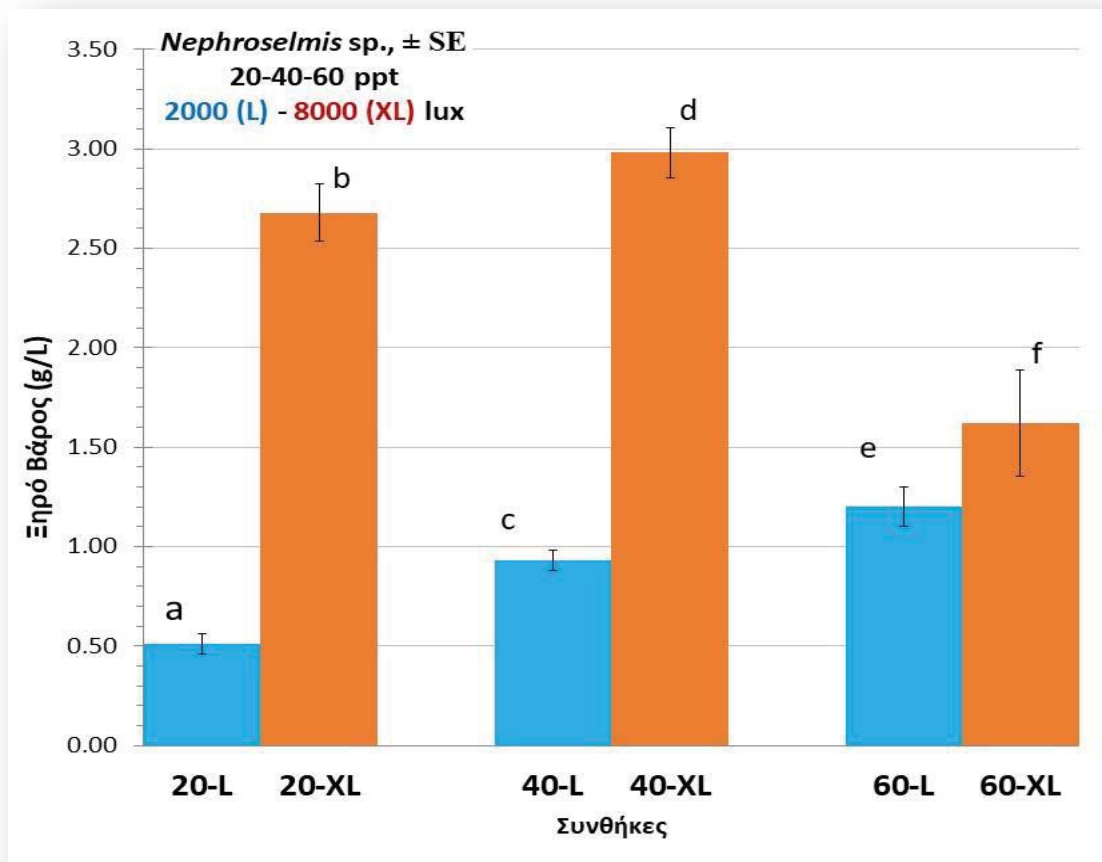
Ως αντανάκλαση των παραπάνω ρυθμών αύξησης και οι χρόνοι γενεάς (t_g) ήταν συντομότεροι στη συνθήκη του έντονου φωτισμού (1,729 - 1,875 - 1,449 ημέρες) για τις αλατότητες 20 - 40 - 60 ppt αντίστοιχα, συγκριτικά με τις τιμές (2,051 - 2,032 - 2,063) για τον χαμηλό φωτισμό στις αντίστοιχες ίδιες αλατότητες.



Σχήμα 30. Οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης (r_{max}) ± SE των καλλιεργειών του *Nephroselmis* sp. στις αλατότητες των 20, 40 και 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux).

Πίνακας 2. Συγκεντρωτικά στοιχεία των ειδικών ρυθμών αύξησης (r_{max}) και του χρόνου γενεάς ή διπλασιασμού (t_g) των καλλιεργειών του *Nephroselmis* sp. στις αλατότητες των 20, 40 και 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Οι διαφορετικοί παρατιθέμενοι εκθέτες σημαίνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά στο επίπεδο 0.05 (στατιστική επεξεργασία με ANOVA και κατόπιν σύγκριση κατά ζεύγη με Tukey's test). Οπου υπάρχει και δεύτερος εκθέτης σημαίνει στατιστικώς ίση τιμή με την συνθήκη του αντίστοιχου γράμματος.

Συνθήκες	20ppt-L	20ppt-XL	40ppt-L	40ppt-XL	60ppt-L	60ppt-XL
r_{max}	0,338 ^a	0,401 ^b	0,341 ^{c,a,e}	0,370 ^d	0,336 ^{e, a, c}	0,462 ^f
SE	0,001	0,0021	0,0016	0,0006	0,0008	0,0023
Διάστημα (ημέρες)	4 ⁿ -8 ⁿ	4 ⁿ -8 ⁿ	4 ⁿ -8 ⁿ	4 ⁿ -8 ⁿ	4 ⁿ -8 ⁿ	4 ⁿ -8 ⁿ
n	18	18	18	18	18	18
t_g (24ωρα)	2,051	1,729	2,032	1,875	2,063	1,499
SE	0,003	0,009	0,01	0,003	0,005	0,011



Σχήμα 31. Απόδοση σε ξηρό βάρος φυκούς (g/L) ± SE του *Nephroselmis* sp. στις αλατότητες των 20, 40 και 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Η ύπαρξη σημαντικής στατιστικής διαφοράς στο επίπεδο 0.05 υποδεικνύεται με διαφορετικό γράμμα. Οι στατιστικώς ίσες τιμές υποδεικνύονται με την επανάληψη των ανάλογων δεικτών στις στήλες (στατιστική επεξεργασία με ANOVA και κατόπιν σύγκριση κατά ζεύγη με Tukey's test).

Απόδοση των καλλιεργειών

Για την απόδοση των καλλιεργειών (Σχήμα 31) σε βιομάζα ως ξηρό βάρος ανά λίτρο καλλιέργειας (g/L), υπολογίστηκαν οι τιμές τη 17^η ημέρα. Αποδεικνύεται σαφώς και σε συμφωνία με τις καμπύλες αύξησης του Σχήματος 27 που αφορά την αλατότητα των 20 ppt και του Σχήματος 28 που αφορά την αλατότητα των 40 ppt συγκριτικά με την καμπύλη των Σχήματος 29 για την αλατότητα των 60 ppt, ότι οι αλατότητες των 20 ppt και 40 ppt του έντονου φωτισμού (8000 lux) αποδίδουν τη μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας (2,65 και 3 g/L αντίστοιχα), με όλες τις άλλες συνθήκες να δίδουν τιμές κυμαινόμενες από 0,5 έως 1,6 g/L.

Αξιοσημείωτες επίσης σε όλες της αλατότητες οι πολύ μεγαλύτερες παραγωγές στις συνθήκες του έντονου φωτός (8000 lux) συγκριτικά με τις αντίστοιχές τους στον ασθενέστερο φωτισμό (2000 lux). Ομως αξιοσημείωτη είναι και η υψηλότερη απόδοση (1,2 g/L) στο χαμηλό φωτισμό της αλατότητας 60 ppt

συγκριτικά με τις αντίστοιχες των 20 και 40 ppt. Ενδεχομένως η αργή ανάπτυξη της καλλιέργειας σε αυτή την αλατότητα να επιδρά θετικά στην υγεία των κυττάρων τα οποία διαιρούνται επί μακρότερον.

Γενικές παρατηρήσεις

Οι καλλιέργειες του *Nephroselmis* sp. παρουσιάζουν ιδιαίτερο και μοναδικό χρωματισμό (Σχήματα 32, 33, 34 και 35) ο οποίος εξελίσσεται από ανοικτό πράσινο σε λαμπερό πράσινο με την πρόοδο της καλλιέργειας και τελικά στις πολύ ώριμες καλλιέργειες σε ένα θαμπό πράσινο το οποίο διατηρείται अपαράλλαχτο για πολλές εβδομάδες. Στην πλήρη άνθισή τους οι καλλιέργειες αναδίδουν μια ευχάριστη μυρωδιά φρεσκοκομμένου γκαζόν η οποία διατηρείται συνεχώς.

Το *Nephroselmis* sp. φέρει 2 μαστίγια στα κύτταρά του και ως εκ τούτου είναι κινητικό. Οι καλλιέργειές του ακόμα και με παντελή έλλειψη αερισμού δεν παρουσιάζουν καθίζηση και τα κύτταρα παραμένουν στη στήλη του νερού.

Τα αποτελέσματα της καλλιέργειάς του υποδεικνύουν προς μία δυναμική ανάπτυξής του σε μεγάλο εύρος αλατοτήτων με κάποια ευνοϊκότερη συνθήκη στην αλατότητα της θάλασσας (~40 ppt). Οι αποδόσεις του σε βιομάζα σαφώς επηρεάζονται θετικότερα σε υψηλές εντάσεις φωτισμού.

Στη βιβλιογραφία λείπουν παντελώς στοιχεία καλλιέργειάς του σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν, οπότε τις θεωρούμε ως βάση για μελλοντικούς πειραματισμούς.



Σχήμα 32. Τα δοχεία καλλιέργειας του *Nephroselmis* sp. κατά την έναρξη (1^η ημέρα) με το χαρακτηριστικό ομοιόμορφο ελαφρώς πρασινωπό χρώμα.



Σχήμα 33. Τα δοχεία καλλιέργειας του *Nephroselmis* sp. την 4^η ημέρα με το χαρακτηριστικό ομοιόμορφο πρασινωπό χρώμα.

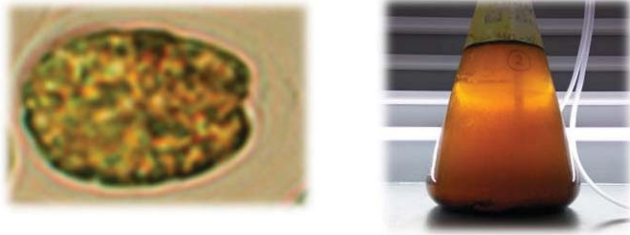


Σχήμα 34. Τα δοχεία καλλιέργειας του *Nephroselmis* sp. τη 10^η ημέρα με το χαρακτηριστικό ομοιόμορφο πράσινο χρώμα



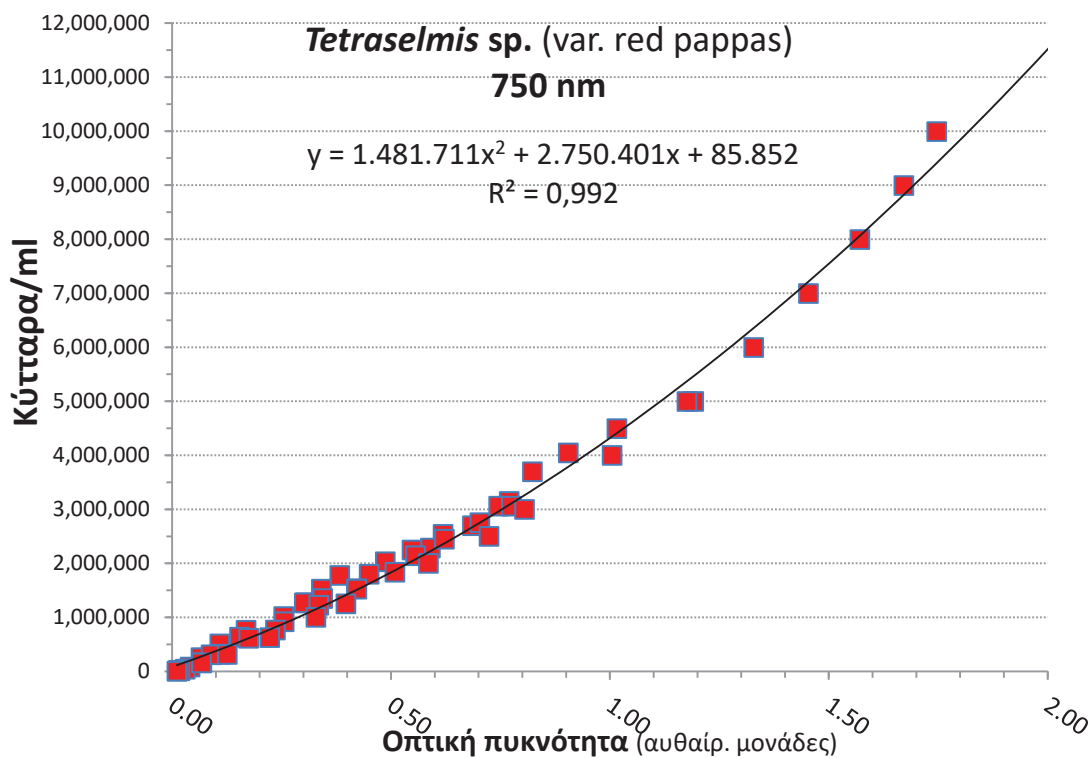
Σχήμα 35. Τα δοχεία καλλιέργειας του *Nephroselmis* sp. τη 17^η ημέρα με το χαρακτηριστικό ομοιόμορφο σκούρο-πράσινο χρώμα.

Tetraselmis sp. (red var. rappas)



Αύξηση των καλλιεργειών

Για το χλωροφύκος *Tetraselmis* sp. (red var. rappas) επελέγησαν προς καλλιέργεια οι αλατότητες 20, 40 και 60 ppt καθώς οι προκαταρκτικές δοκιμές έδειξαν ότι ανταποκρίνεται καλά σε όλες.



Σχήμα 36. Καμπύλη βαθμονόμησης των καλλιεργειών του *Tetraselmis* sp. (red var. rappas) από πλήθος ζευγών τιμών οπτικής απορρόφησης-πυκνότητας κυττάρων.

Χρησιμοποιήθηκαν κωνικά γυάλινα δοχεία Erlenmeyer των 2L με 2 αντίγραφα για κάθε συνδυασμό αλατότητας και έντασης φωτός και συνεχή παροχή αέρα της τάξεως του 1 όγκου δοχείου/min (~2L/min). Οι καλλιέργειες του *Tetraselmis* sp. (red var. rappas) προσαρμόστηκαν σε όλες τις αλατότητες και παρουσίασαν αύξηση (Σχήματα 37, 38 & 39). Οι καταγραφείσες ημερησίως μετρήσεις ως τιμές οπτικής απορρόφησης στα 750 nm που αποδείχθηκε το

καλύτερο μήκος κύματος (μεταξύ των δοκιμασθέντων) με συντελεστή Pearson $R^2 = 0,992$, μεταφράστηκαν σε πυκνότητες κυττάρων/mL μέσω της εξίσωσης της καμπύλης βαθμονόμησης (Σχήμα 36) η οποία κατασκευάστηκε τόσο από επεξεργασία δειγμάτων κατάλληλα αραιωμένων όσο και από περιοδικές μετρήσεις των καλλιέργειών με αιμοκυττόμετρο. Η εξίσωση βαθμονόμησης ήταν η δευτέρου βαθμού:

$$\text{Πυκνότητα} = 1.481.711(\text{O.D.})^2 + 2.750.401(\text{O.D.}) + 85.852$$

όπου: Πυκνότητα = κύτταρα/mL, O.D.= τιμές οπτικής απορρόφησης.

Οι καλλιέργειες διήρκεσαν 17 ημέρες και μετά από μία περίοδο προσαρμογής-καθυστέρησης 2-4 ημερών, όλες παρουσίασαν μια έντονη και παρατεταμένη εκθετική φάση η οποία ήταν πολύ εντονότερη στον υψηλής έντασης φωτισμό (8000 lux). Η "είσοδος" στη στατική φάση της εκάστοτε καλλιέργειας δεν ήταν εμφανής στις περισσότερες συνθήκες και γενικώς παρουσίασε μεγάλες διαφοροποιήσεις. Έτσι για τις καλλιέργειες στον έντονο φωτισμό μόνο στην αλατότητα των 60 ppt παρατηρείται εμφανής πτώση του ρυθμού αύξησης μετά τη 14^η ημέρα (Σχήμα 39). Στον ασθενέστερο φωτισμό (2000 lux) σε όλες τις αλατότητες πρακτικά για όλη την περίοδο της καλλιέργειας δεν παρατηρήθηκε κάμψη της εκθετικής καμπύλης αύξησης, παρά μόνο προσωρινές μειώσεις και κατόπιν ανάκαμψη (Σχήματα 37, 38 & 39).

Στην αλατότητα των 20 ppt (Σχήμα 37) η αύξηση στον έντονο φωτισμό (8000 lux) ήταν πολύ μεγάλη φθάνοντας σε πυκνότητες περί τα 10.000.000 κύτταρα/mL τη 17^η ημέρα συγκριτικά με τον ασθενή φωτισμό (2000 lux) όπου την ίδια ημέρα έφθασε τα 4.300.000 κύτ./mL.

Το pH κυμάνθηκε στο αλκαλικό επίπεδο με τιμές αρχικά ~8,0 και για τους 2 φωτισμούς που γρήγορα ανέβηκαν στο επίπεδο του >8,5 στον έντονο φωτισμό και διατηρήθηκαν εκεί, ενώ στο χαμηλό φωτισμό διατηρήθηκαν χαμηλότερα <8,5. Μόνο τη 17^η ημέρα με ελαφρό χαμήλωμα στον υψηλό φωτισμό και ελαφρά ανύψωση στον χαμηλό οι τιμές του pH εξομοιώθηκαν σε τιμή γύρω στο 8,5.

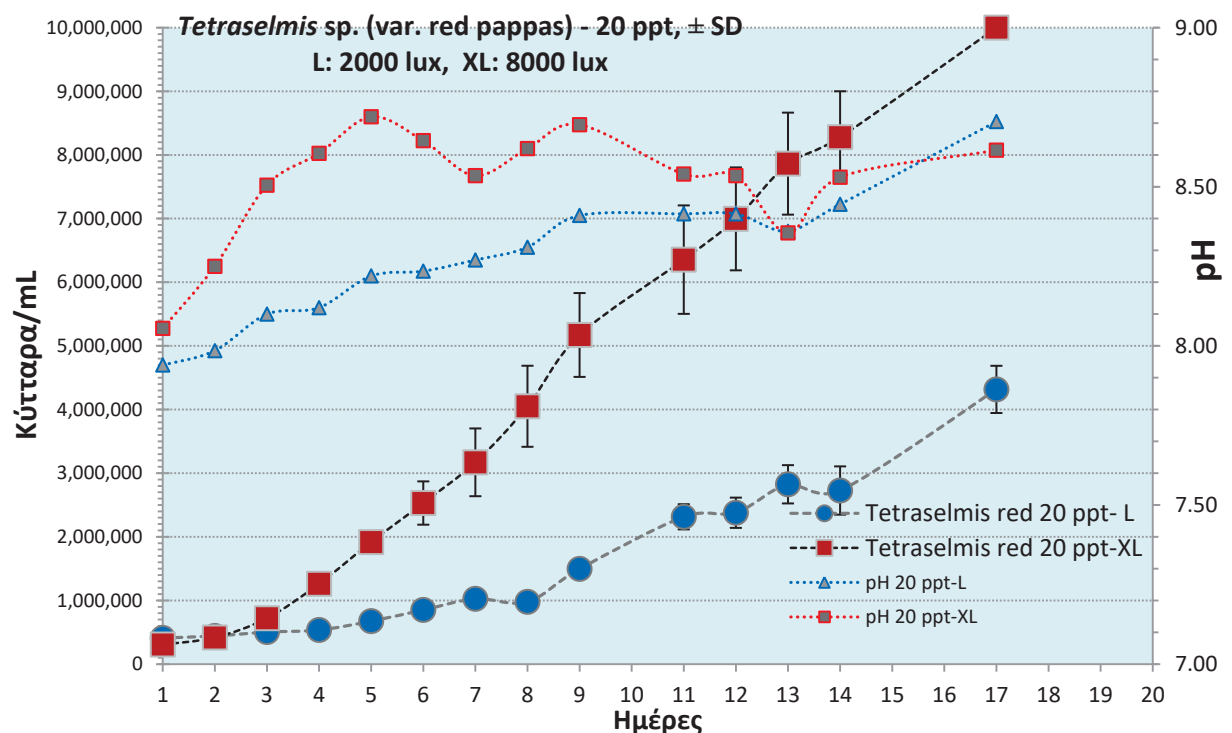
Στην αλατότητα των 40 ppt (Σχήμα 38) επίσης η αύξηση της καλλιέργειας παρουσίασε πολύ εντονότερη αύξηση στον έντονο φωτισμό (8000 lux) φθάνοντας πυκνότητα περί τα 9.600.000 κύτταρα/mL τη 17^η ημέρα συγκριτικά με τον ασθενή φωτισμό (2000 lux) που έφθασε τα 3.300.000 κύτταρα/mL την ίδια ημέρα. Και στους δύο φωτισμούς μετά από μια πολύ σύντομη αρχική φάση (3-4 ημερών) καθυστέρησης-προσαρμογής η αύξηση έγινε εκθετική ιδιαίτερα έντονη στον υψηλό φωτισμό, ενώ στον χαμηλό πολύ αργή, με διακυμάνσεις και εμφανής μόνο μετά τη 13^η ημέρα. Το pH κυμάνθηκε στο αλκαλικό επίπεδο με τιμές ~8,2 - ~8,8 και από την αρχή ήδη παρουσίασε υψηλότερες τιμές στον έντονο φωτισμό (δείγμα εντονότερης φωτοσύνθεσης) και κατόπιν σταδιακά με ελαφρό χαμήλωμα στον υψηλό φωτισμό και ελαφρά ανύψωση στον χαμηλό σχεδόν εξομοίωση.

Στην αλατότητα των 60 ppt (Σχήμα 39) επίσης η αύξηση της καλλιέργειας παρουσίασε πολύ εντονότερη αύξηση στον έντονο φωτισμό (8000 lux) φθάνοντας

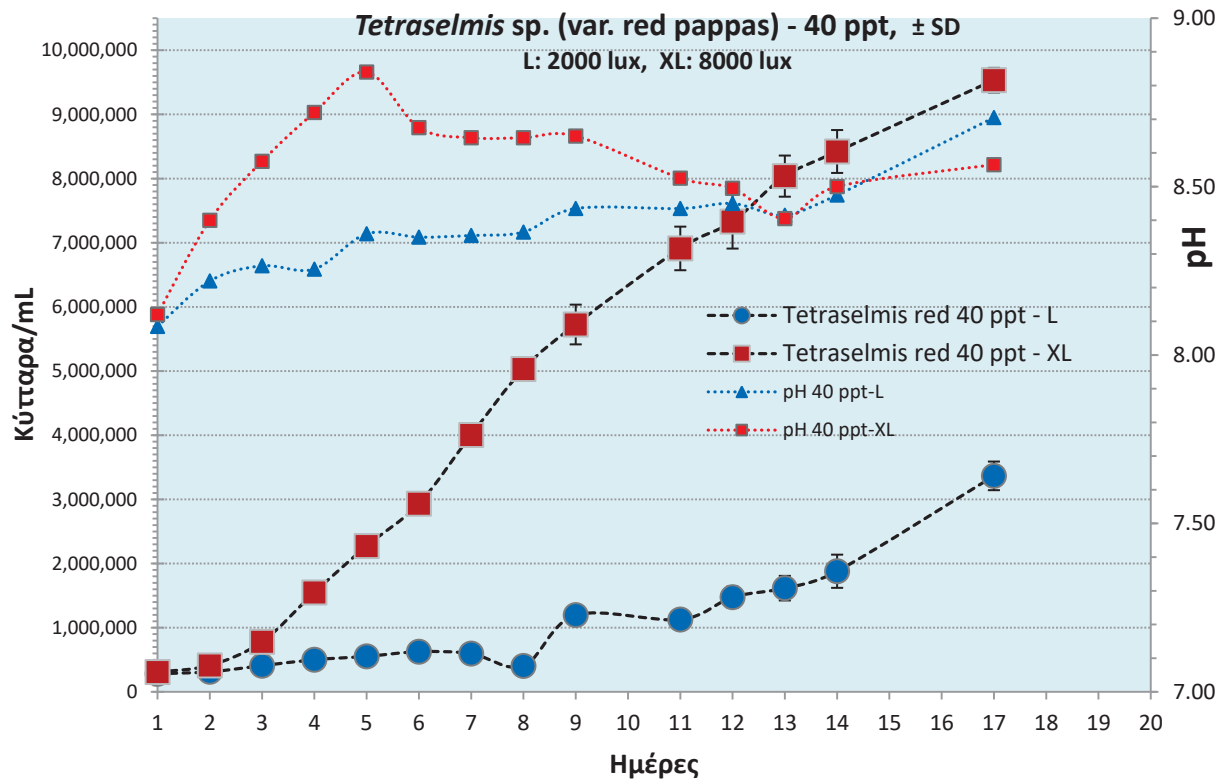
πυκνότητα περί τα 5.800.000 κύτταρα/mL τη 17^η ημέρα συγκριτικά με τον ασθενή φωτισμό (2000 lux) που έφθασε τα 2.200.000 κύτταρα/mL την ίδια ημέρα. Και στους δύο φωτισμούς μετά από μια πολύ σύντομη αρχική φάση (3-4 ημερών) καθυστέρησης-προσαρμογής, η αύξηση έγινε έντονα εκθετική ιδιαίτερα στον έντονο φωτισμό και διήρκεσε μέχρι τη 14^η ημέρα ενώ στον ασθενή φωτισμό ήταν αργή αλλά σταθερή.

Το pH κυμάνθηκε στο αλκαλικό επίπεδο με τιμές $\sim 8,5 \pm 0,2$ και από την αρχή ήδη παρουσίασε υψηλότερες τιμές στον έντονο φωτισμό (δείγμα εντονότερης φωτοσύνθεσης) και κατόπιν από την 11^η ημέρα παρόμοιες τιμές και στους δύο φωτισμούς.

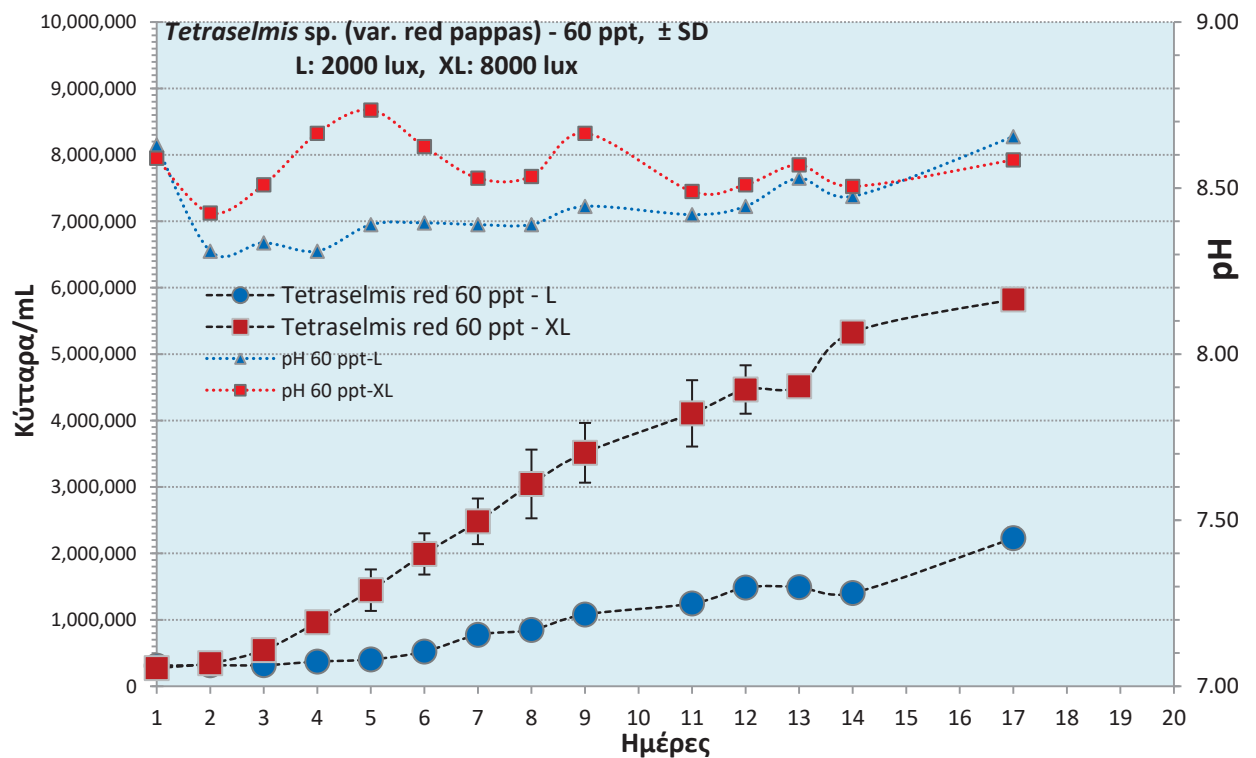
Για τον υπολογισμό του τάχους της αύξησης (ειδικός ρυθμός αύξησης r_{max}) επελέγη τη διάστημα 3^η - 9^η ημέρα ως το πλέον αντιπροσωπευτικό από άποψη ομοιομορφίας στις καμπύλες αύξησης σε όλες τις αλατότητες.



Σχήμα 37. Η καμπύλη αύξησης (σε κύτταρα/mL) της καλλιέργειας του *Tetraselmis* sp. (var. red pappas) στην αλατότητα των 20 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.



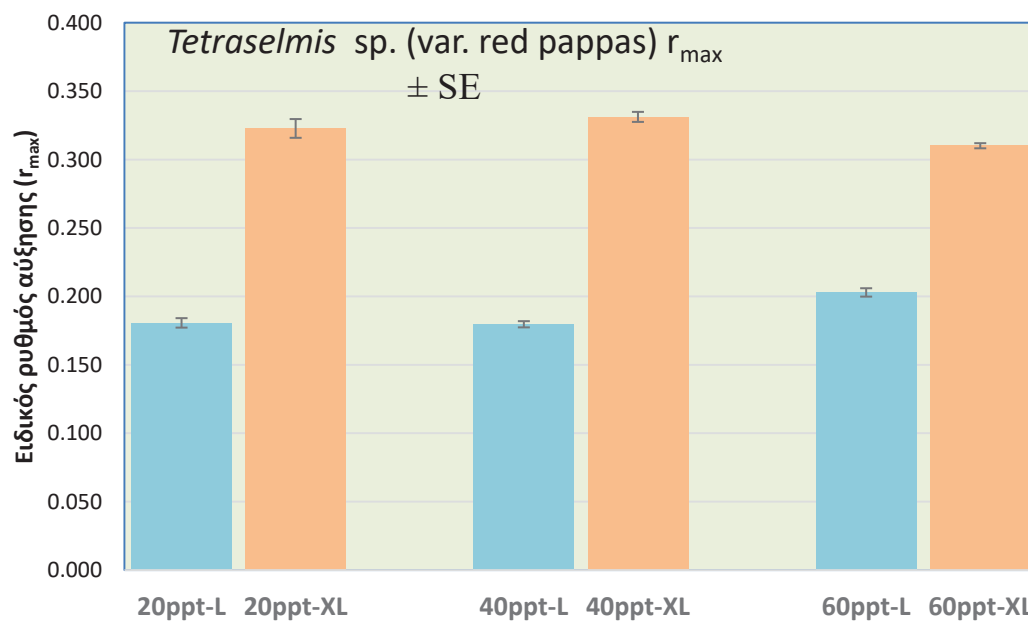
Σχήμα 38. Η καμπύλη αύξησης (σε κύτταρα/mL) της καλλιέργειας του *Tetraselmis* sp. (var. red pappas) στην αλατότητα των 40 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.



Σχήμα 39. Η καμπύλη αύξησης (σε κύτταρα/mL) της καλλιέργειας του *Tetraselmis* sp. (var. red pappas) στην αλατότητα των 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.

Το τάχος της αύξησης ως ειδικός ρυθμός αύξησης (r_{max}) και ο χρόνος διπλασιασμού ή γενεάς (t_g) αποτυπώνονται στο Σχήμα 40 και αναλυτικότερα στον Πίνακα 3. Προκύπτει σαφώς μεγαλύτερο τάχος αύξησης σε όλες τις αλατότητες με τον έντονο φωτισμό (0,323 - 0,331 - 0,310 για τις αλατότητες 20 - 40 - 60 ppt αντίστοιχα συγκριτικά με τις τιμές (0,181 - 0,180 - 0,203) για το χαμηλό φωτισμό στις αντίστοιχες ίδιες αλατότητες. Στατιστικώς οι τιμές διέφεραν μεταξύ τους εκτός από αυτές του υψηλού φωτισμού στις αλατότητες των 20 και 40 ppt οι οποίες παρουσίασαν μια εντυπωσιακή ομοιομορφία και ήταν στατιστικώς ίσες. Γενικώς στον υψηλό φωτισμό σε όλες τις αλατότητες παρουσιάστηκαν συγκριτικά με το χαμηλό φωτισμό πολύ υψηλότεροι ρυθμοί αύξησης.

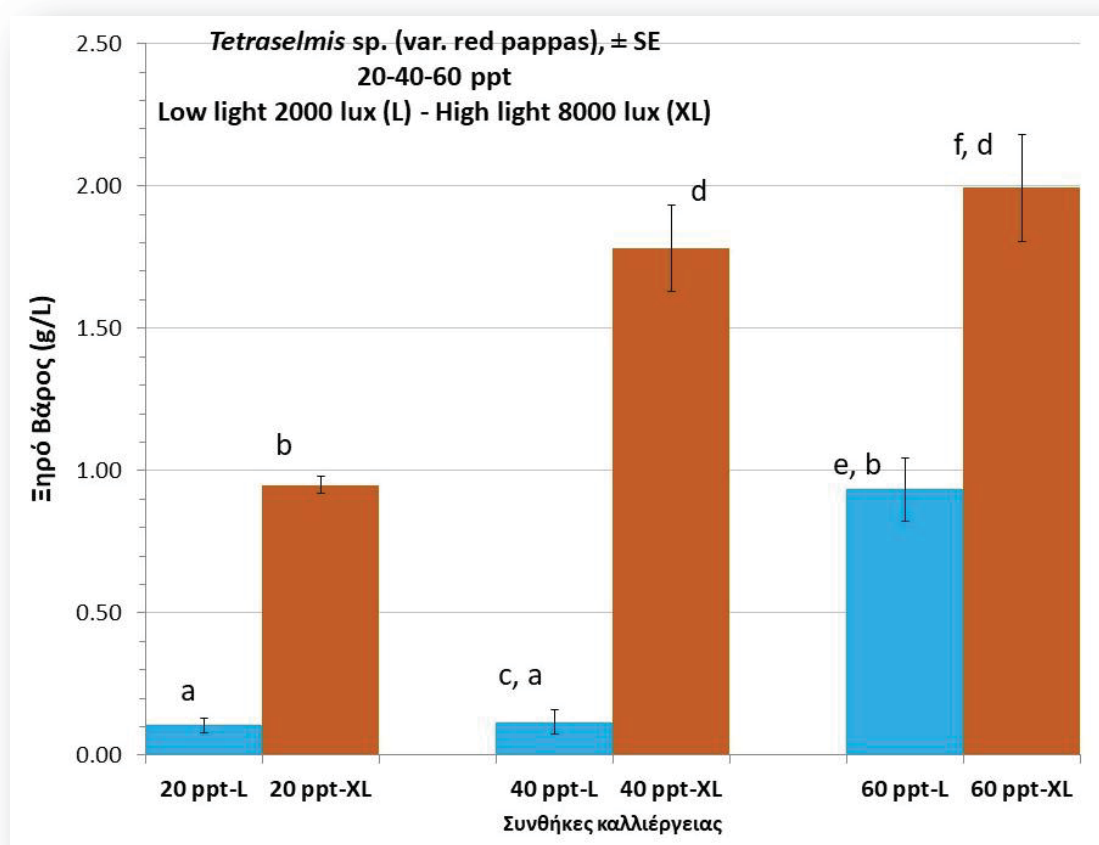
Ως αντανάκλαση των παραπάνω ρυθμών αύξησης και οι χρόνοι γενεάς (t_g) ήταν συντομότεροι στη συνθήκη του έντονου φωτισμού (2,163 - 2,097 - 2,236 ημέρες) για τις αλατότητες 20 - 40 - 60 ppt αντίστοιχα, συγκριτικά με τις τιμές (3,860 - 3,870 - 3,429 ημέρες) για τον χαμηλό φωτισμό στις αντίστοιχες ίδιες αλατότητες.



Σχήμα 40. Οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης (r_{max}) ± SE των καλλιεργειών του *Tetraselmis* sp. (var. red pappas) στις αλατότητες των 20, 40 και 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux).

Πίνακας 3. Συγκενρωτικά στοιχεία των ειδικών ρυθμών αύξησης (r_{max}) και του χρόνου γενεάς ή διπλασιασμού (t_g) των καλλιέργειών του *Tetraselmis* sp. (var. red pappas) στις αλατότητες των 20, 40 και 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Οι διαφορετικοί παρατιθέμενοι εκθέτες σημαίνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά στο επίπεδο 0,05 (στατιστική επεξεργασία με ANOVA και κατόπιν σύγκριση κατά ζεύγη με Tukey's test). Οπου υπάρχει και δεύτερος εκθέτης σημαίνει στατιστικώς ίση τιμή με την συνθήκη του αντίστοιχου γράμματος.

Συνθήκες	20ppt-L	20ppt-XL	40ppt-L	40ppt-XL	60ppt-L	60ppt-XL
r_{max}	0,181 ^a	0,323 ^b	0,180 ^{c,a}	0,331 ^{d, b}	0,203 ^e	0,310 ^f
SE	0,0035	0,0069	0,0023	0,0037	0,0031	0,0019
Διάστημα (ημέρες)	3 ⁿ -9 ⁿ	3 ⁿ -9 ⁿ	3 ⁿ -9 ⁿ	3 ⁿ -9 ⁿ	3 ⁿ -9 ⁿ	3 ⁿ -9 ⁿ
n	18	18	18	18	18	18
t_g (24ωρα)	3,860	2,163	3,870	2,097	3,429	2,236
SE	0,074	0,046	0,052	0,023	0,052	0,013
n	18	18	18	18	18	18



Σχήμα 41. Απόδοση σε ξηρό βάρος φυκούς (g/L) \pm SE του *Tetraselmis* sp. (var. red pappas) στις αλατότητες των 20, 40 και 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Η ύπαρξη σημαντικώς στατιστικής διαφοράς στο επίπεδο 0,05 υποδεικνύεται με διαφορετικό γράμμα. Οι στατιστικώς ίσες τιμές υποδεικνύονται με την επανάληψη των ανάλογων δεικτών στις στήλες (στατιστική επεξεργασία με ANOVA και κατόπιν σύγκριση κατά ζεύγη με Tukey's test).

Απόδοση των καλλιεργειών

Για την απόδοση των καλλιεργειών του *Tetraselmis* sp. (red var. rappas) (Σχήμα 41) σε βιομάζα ως ξηρό βάρος ανά λίτρο καλλιέργειας (g/L), υπολογίστηκαν οι τιμές την 22^η ημέρα, δηλαδή 5 ημέρες μετά το τέλος των μετρήσεων της πυκνότητας των καλλιεργειών. Αυτό έγινε καθώς παρατηρήθηκε σε όλες τις συνθήκες μια απουσία εμφανούς φάσης στασιμότητας και οι καλλιέργειες συνέχισαν να αυξάνουν.

Αξιοσημείωτη σε όλες τις αλατότητες η πολύ μεγαλύτερη παραγωγή στις συνθήκες του έντονου φωτός (8000 lux) συγκριτικά με τις αντίστοιχες τους στον ασθενέστερο φωτισμό (2000 lux). Την πλέον υψηλή παραγωγή (2 g/L) έδωσε η συνθήκη 60 ppt-XL, στατιστικώς ίση με την αντίστοιχη της 40 ppt-XL (1,65 g/L), μακράν υψηλότερες της αντίστοιχης συνθήκης 20 ppt-XL (0,9 g/L). Επίσης μεταξύ των αποδόσεων στο χαμηλό φωτισμό η συνθήκη 60 ppt-L έδωσε πολύ μεγαλύτερη στατιστικώς παραγωγή (0,9 g/L) από τις αντίστοιχες των 20 ppt-L (0,1 g/L) και 40 ppt-L (0,13 g/L). Συμπερασματικά για τη μέγιστη παραγωγή σε βιομάζα του *Tetraselmis* sp. (red var. rappas) απαιτούνται αλατότητα τουλάχιστον 40 ppt και φωτισμός υψηλής έντασης τουλάχιστον 8000 lux.

Γενικές παρατηρήσεις

Οι καλλιέργειες του *Tetraselmis* sp. (red var. rappas) παρουσιάζουν ιδιαίτερο και μοναδικό χρωματισμό (Σχήματα 42 και 43) ο οποίος εξελίσσεται από ξεπλυμένο πράσινο σε θολό πράσινο με την πρόοδο της καλλιέργειας και τελικά στις πολύ ώριμες καλλιέργειες σε ένα σκούρο πράσινο το οποίο μετά από αρκετές ημέρες σταδιακά (και χαρακτηριστικά πιο γρήγορα αν σταματήσει ο αερισμός στον έντονο φωτισμό) σε κοκκινωπό-ροζέ. Στην πλήρη άνθισή τους οι καλλιέργειες αναδίδουν μια ευχάριστη μυρωδιά θαλασσόχορτου η οποία διατηρείται συνεχώς.

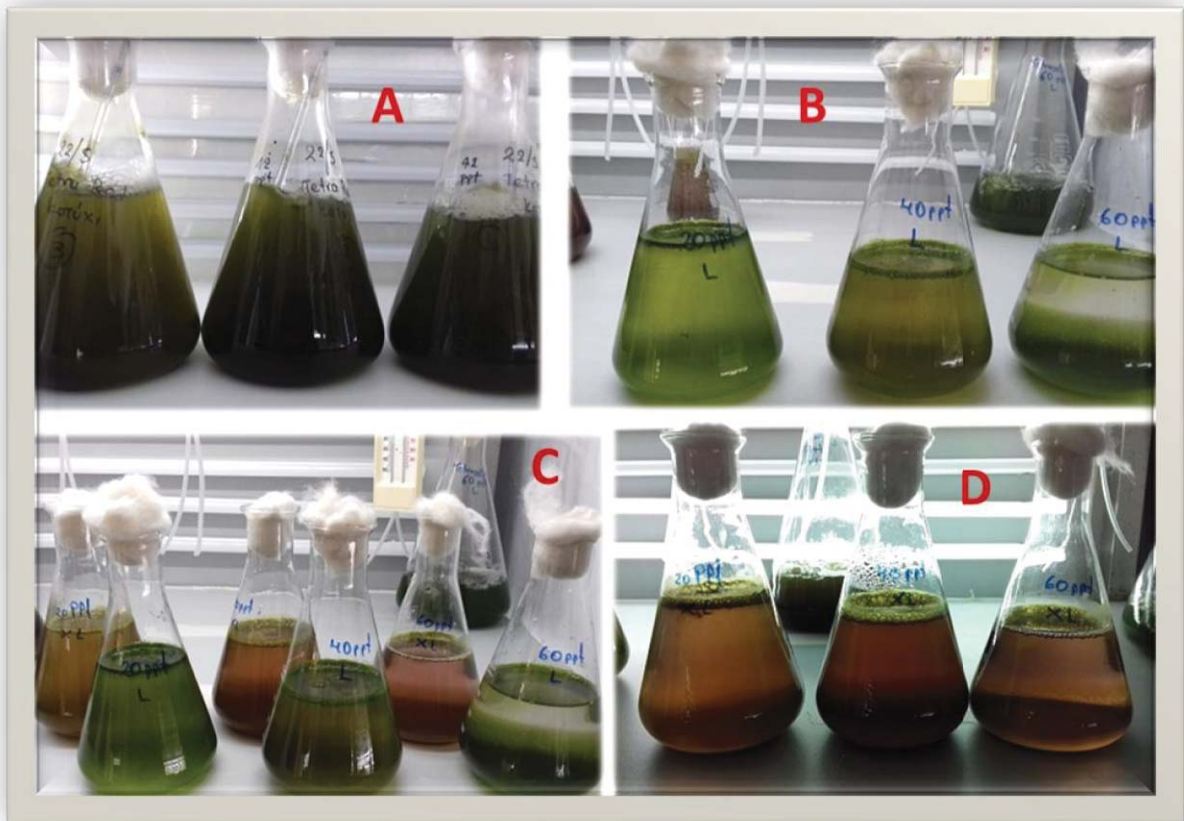
Το *Tetraselmis* sp. (red var. rappas) φέρει 4 μαστίγια στα κύτταρά του και ως εκ τούτου είναι κινητικό. Οι καλλιέργειές του όμως στην παντελή έλλειψη αερισμού παρουσιάζουν προοδευτικά καθίζηση και τα κύτταρα σταδιακά συσσωρεύονται σε χαλαρή μάζα στον πυθμένα του δοχείου.

Τα αποτελέσματα της καλλιέργειάς του υποδεικνύουν προς μία δυναμική ανάπτυξής του σε μεγάλο εύρος αλατοτήτων με ευνοϊκότερη συνθήκη στην αλατότητα της θάλασσας (~40 ppt) ή ανώτερη αυτής. Οι αποδόσεις του σε βιομάζα σαφώς επηρεάζονται θετικότερα σε υψηλές εντάσεις φωτισμού.

Στη βιβλιογραφία λείπουν παντελώς στοιχεία καλλιέργειάς του σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν, οπότε τις θεωρούμε ως βάση για μελλοντικούς πειραματισμούς.

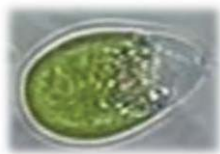


Σχήμα 42. Τα δοχεία καλλιέργειας του *Tetraselmis* sp. (var. red rappas) κατά τη 2^η ημέρα της καλλιέργειας (A), την 4^η ημέρα (B), και την 11^η ημέρα (C).



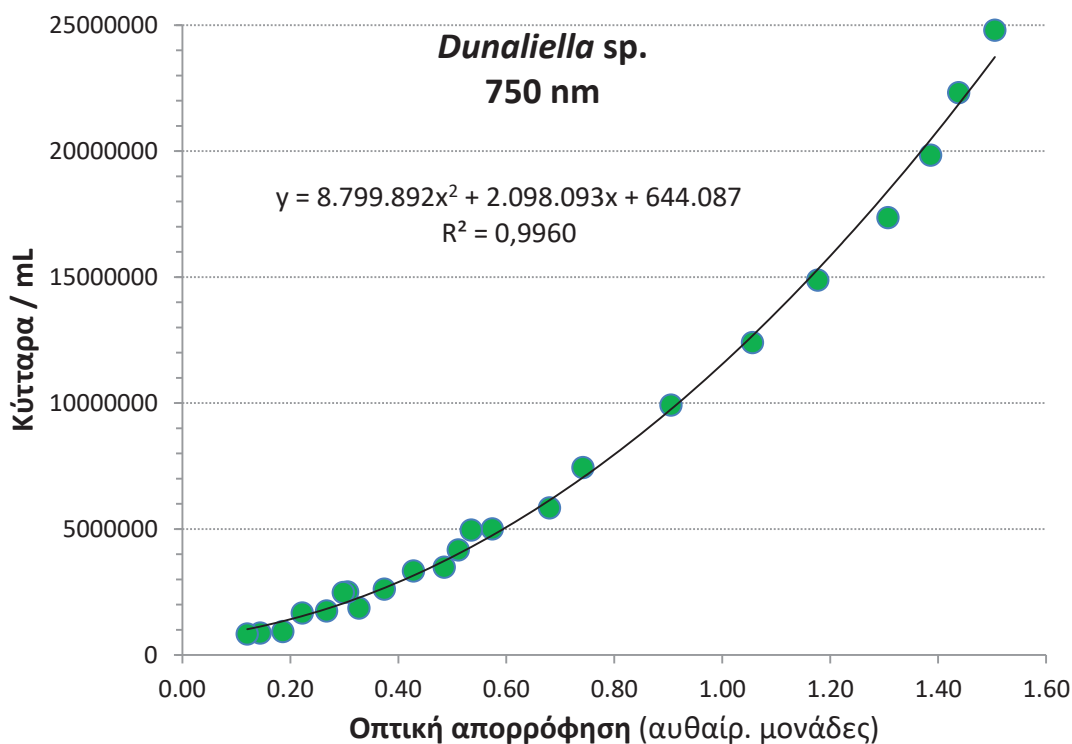
Σχήμα 43. Τα δοχεία καλλιέργειας του *Tetraselmis* sp. (var. red parras) σε διάφορες φάσεις αλλαγής του χρώματος. **A:** 15^η ημέρα με καλλιέργεια σε ανάδευση, ήδη το χρώμα έχει γίνει θαμπό σκουρο-πράσινο. **B:** 16^η ημέρα, καλλιέργειες σε ηρεμία, πολλά κύτταρα έχουν καθιζάνει το χρώμα αρχίζει να παίρνει κοκκινωπή χροιά. **C:** 17^η ημέρα, καλλιέργειες σε ηρεμία, η εμπρόσθια σειρά προέρχεται από φωτισμό 2000 lux η οπίσθια από 8000 lux και έχει σαφώς κοκκινίσει. **D:** 17^η ημέρα, καλλιέργειες 20-40-60 ppt (από αριστερά προς τα δεξιά) και από έντονο φωτισμό (8000 lux) σε ηρεμία με εμφανή πλέον το κοκκινωπό χρώμα τους.

Dunaliella sp.



Αύξηση των καλλιεργειών

Το χλωροφύκος *Dunaliella* sp. είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι απαντάται σε υπεράλμυρες λεκάνες (αλυκές, κλπ.) όπου η αλατότητα φθάνει ακόμα και 5 φορές αυτή του θαλασσινού νερού. Γενικώς όμως μπορεί και αντέχει σε ένα μεγάλο εύρος αλατοτήτων κάτι που φάνηκε και στις προκαταρκτικές δοκιμές που κάναμε, οπότε επελέγησαν προς καλλιέργεια οι αλατότητες 20, 40 και 60 ppt για να καλύψουν ένα πρακτικώς λειτουργικό εύρος.



Σχήμα 44. Καμπύλη βαθμονόμησης των καλλιεργειών του *Dunaliella* sp. από πλήθος ζευγών τιμών οπτικής απορρόφησης-πυκνότητας κυττάρων.

Χρησιμοποιήθηκαν κωνικά γυάλινα δοχεία Erlenmeyer των 2L με 2 αντίγραφα για κάθε συνδυασμό αλατότητας και έντασης φωτός και επιπλέον ένα ακόμα αντίγραφο σε κυλινδρικό πλαστικό δοχείο του 1L. Σε όλα παρείχεται αέρας της τάξεως του 1 όγκου δοχείου/min (~2L/min και ~1L/min). Οι καλλιέργειες του *Dunaliella* sp. προσαρμόστηκαν σε όλες τις αλατότητες και παρουσίασαν αύξηση (Σχήματα 45, 46 & 47). Οι καταγραφείσες ημερησίως μετρήσεις ως τιμές οπτικής απορρόφησης στα 750 nm που αποδείχθηκε το καλύτερο μήκος κύματος (μεταξύ

των δοκιμασθέντων) με συντελεστή Pearson $R^2 = 0,996$, μεταφράστηκαν σε πυκνότητες κυττάρων/mL μέσω της εξίσωσης της καμπύλης βαθμονόμησης (Σχήμα 44) η οποία κατασκευάστηκε τόσο από επεξεργασία δειγμάτων κατάλληλα αραιωμένων όσο και από περιοδικές μετρήσεις των καλλιέργειών με αιμοκυττόμετρο. Η εξίσωση βαθμονόμησης ήταν η δευτέρου βαθμού:

$$\text{Πυκνότητα} = 8.799.892(\text{O.D.})^2 + 2.098.093(\text{O.D.}) + 644.087$$

όπου: Πυκνότητα = κύτταρα/mL, O.D.= τιμές οπτικής απορρόφησης.

Οι καλλιέργειες διήρκεσαν 22 ημέρες και μετά από μία περίοδο προσαρμογής-καθυστέρησης 2-3 ημερών όλες παρουσίασαν μια έντονη και παρατεταμένη εκθετική φάση η οποία ήταν εντονότερη στον υψηλής έντασης φωτισμό (8000 lux). Η "είσοδος" στη στατική φάση της εκάστοτε καλλιέργειας έγινε με ποικίλο τρόπο στην κάθε συνθήκη και μετά την 14^η ημέρα σε όλες τις συνθήκες. Στην αλατότητα των 20 ppt (Σχήμα 45) η εξέλιξη της καλλιέργειας παρουσίασε πολύ εντονότερη αύξηση στον έντονο φωτισμό (8000 lux) φθάνοντας σε πυκνότητες περί τα 25.000.000 κύτταρα/mL την 22^η ημέρα συγκριτικά με τον ασθενή φωτισμό (2000 lux) όπου την ίδια ημέρα έφθασε τα 12.500.000 κύτ./mL.

Το pH κυμάνθηκε στο αλκαλικό επίπεδο με τιμές αρχικά ~7,9 που γρήγορα ανέβηκαν στο επίπεδο του ~8,5 και από την αρχή ήδη παρουσίασε υψηλότερες τιμές στον έντονο φωτισμό (δείγμα εντονότερης φωτοσύνθεσης), ενώ στο χαμηλό φωτισμό διατηρήθηκαν χαμηλότερα <8,5. Μόνο τη 17^η ημέρα με ελαφρό χαμήλωμα στον υψηλό φωτισμό και ελαφρά ανύψωση στον χαμηλό οι τιμές του pH εξομοιώθηκαν σε τιμή γύρω στο 8,3.

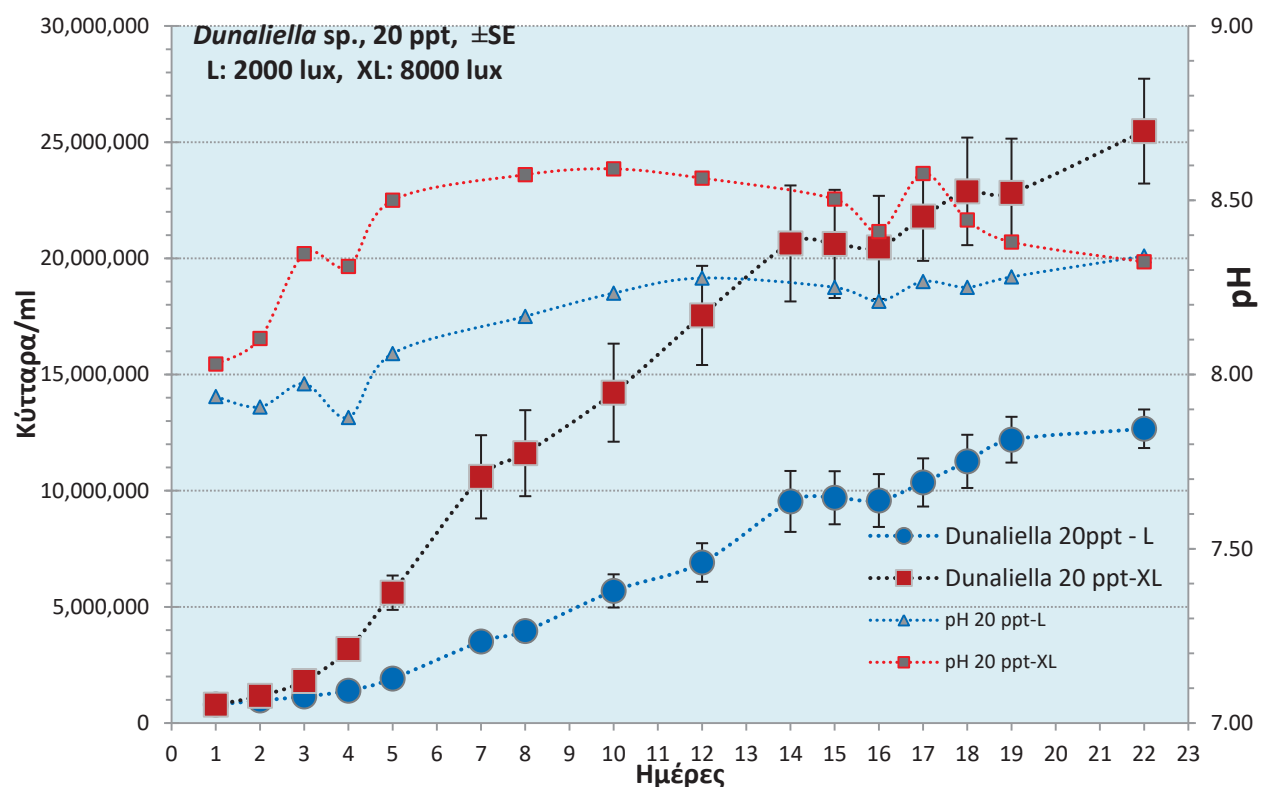
Στην αλατότητα των 40 ppt (Σχήμα 46) επίσης η αύξηση της καλλιέργειας παρουσίασε πολύ εντονότερη αύξηση στον έντονο φωτισμό (8000 lux) φθάνοντας πυκνότητα περί τα 29.000.000 κύτταρα/mL την 22^η ημέρα συγκριτικά με τον ασθενή φωτισμό (2000 lux) που έφθασε τα 16.000.000 κύτταρα/mL την ίδια ημέρα. Και στους δύο φωτισμούς μετά από μια πολύ σύντομη αρχική φάση (2-3 ημερών) καθυστέρησης-προσαρμογής, η αύξηση έγινε έντονα εκθετική ιδιαίτερα στον έντονο φωτισμό. Το pH κυμάνθηκε στο αλκαλικό επίπεδο με τιμές ~7,9 - ~8,6 και από την αρχή ήδη παρουσίασε υψηλότερες τιμές στον έντονο φωτισμό (δείγμα εντονότερης φωτοσύνθεσης) και κατόπιν (από τη 14^η ημέρα) συγχρονισμένη πτώση (δείγμα γήρανσης) και στους δύο φωτισμούς με τιμές γύρω στο 8,3 κατόπιν.

Στην αλατότητα των 60 ppt (Σχήμα 47) επίσης η αύξηση της καλλιέργειας παρουσίασε πολύ εντονότερη αύξηση στον έντονο φωτισμό (8000 lux) φθάνοντας πυκνότητα περί τα 25.000.000 κύτταρα/mL την 22^η ημέρα συγκριτικά με τον ασθενή φωτισμό (2000 lux) που έφθασε τα 12.000.000 κύτταρα/mL την ίδια ημέρα. Και στους δύο φωτισμούς μετά από μια πολύ σύντομη αρχική φάση (2-3 ημερών) καθυστέρησης-προσαρμογής, η αύξηση έγινε έντονα εκθετική ιδιαίτερα στον έντονο φωτισμό αλλά διήρκεσε μόνο μέχρι την 10^η ημέρα ενώ στον ασθενή φωτισμό η καλλιέργεια διατηρήθηκε συνεχώς αυξανόμενη. Στον έντονο φωτισμό παρατηρήθηκε ανεξήγητη κορύφωση της πυκνότητας τη 10^η ημέρα (28.000.000

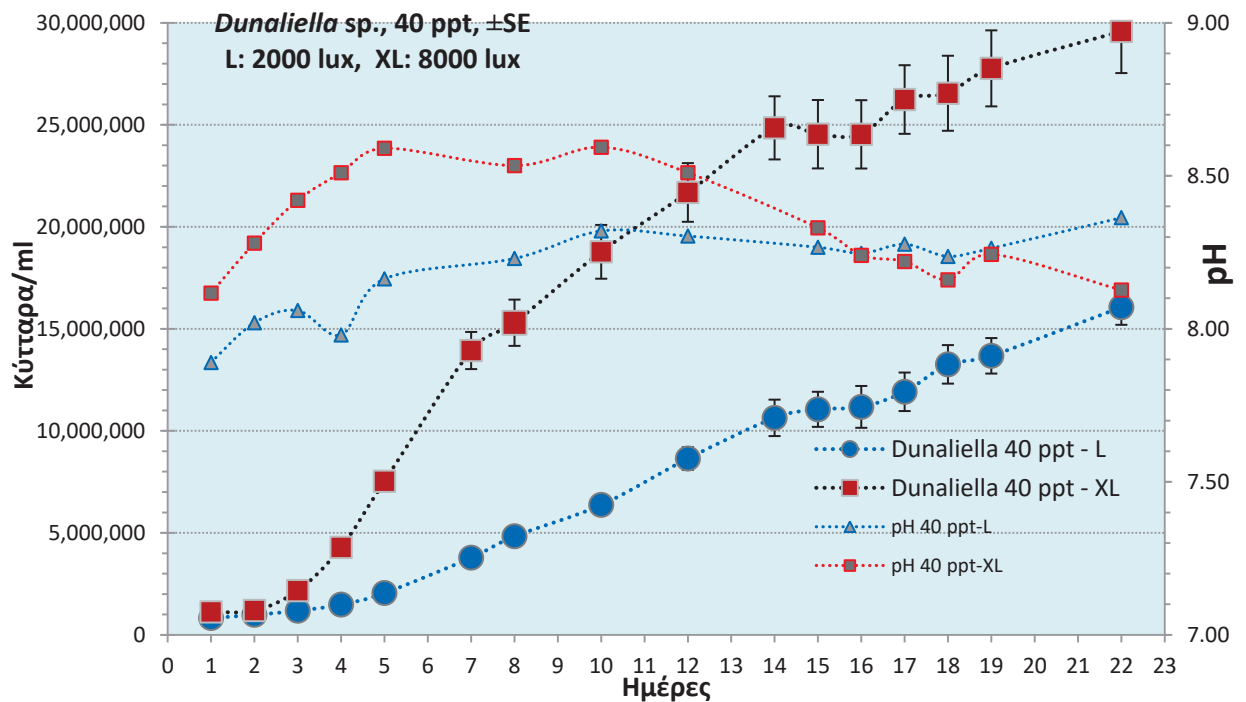
κύτταρα/mL) η οποία μετά 2 ημέρες έπεσε στα 18.000.000 κύτταρα/mL και κατόπιν επήλθε μια φάση στασιμότητας η οποία παρουσίασε ξανά αύξηση από τη 19^η ημέρα.

Το pH κυμάνθηκε στο αλκαλικό επίπεδο με τιμές ~8,2 - ~8,6 και από την αρχή ήδη παρουσίασε υψηλότερες τιμές στον έντονο φωτισμό οι οποίες διατηρήθηκαν μέχρι τη 12η ημέρα μετά την οποία οι τιμές του έντονου φωτισμού έγιναν χαμηλότερες αυτών του ασθενούς φωτισμού.

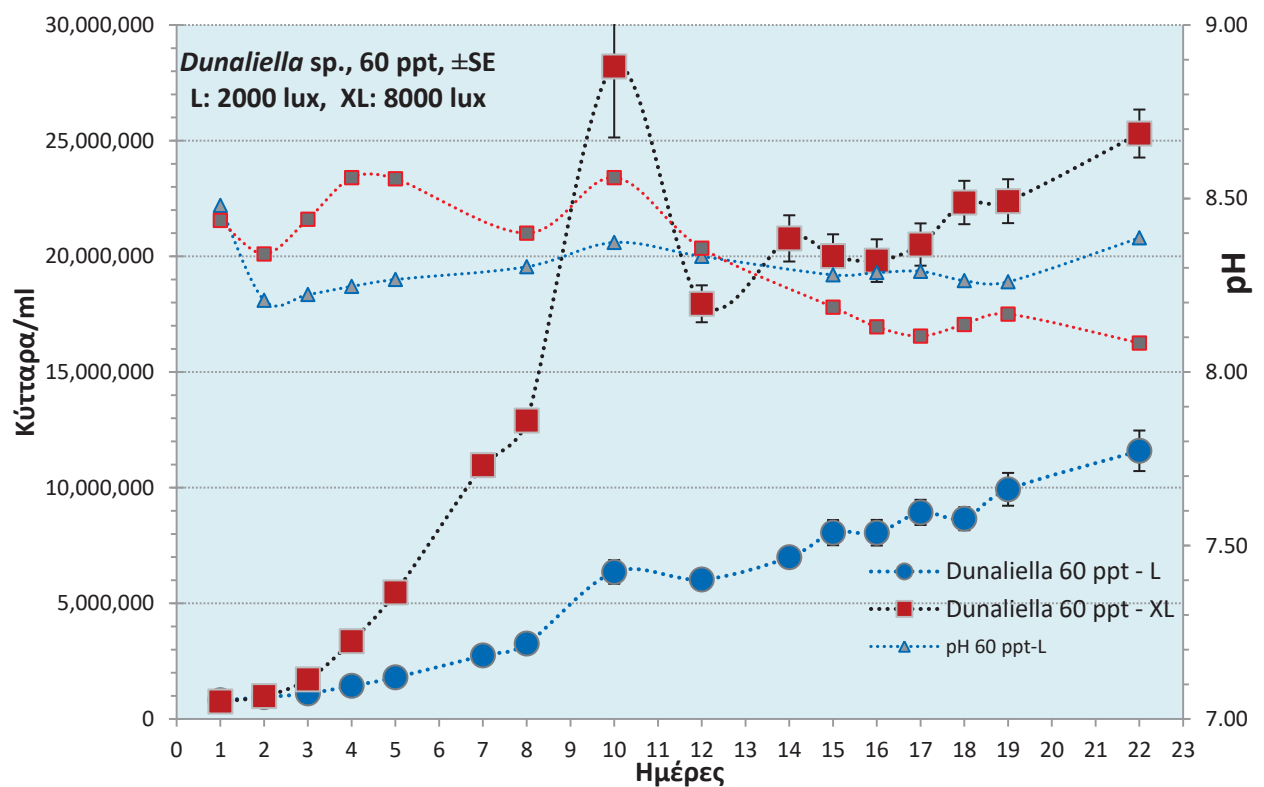
Για τον υπολογισμό του τάχους της αύξησης (ειδικός ρυθμός αύξησης r_{max}) επελέγη τη διάστημα 3^η - 8^η ημέρα καθώς παρουσίασε ομοιομορφία στην καμπύλη αύξησης σε όλες τις αλατότητες.



Σχήμα 45. Η καμπύλη αύξησης (σε κύτταρα/mL) της καλλιέργειας του *Dunaliella* sp. στην αλατότητα των 20 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.



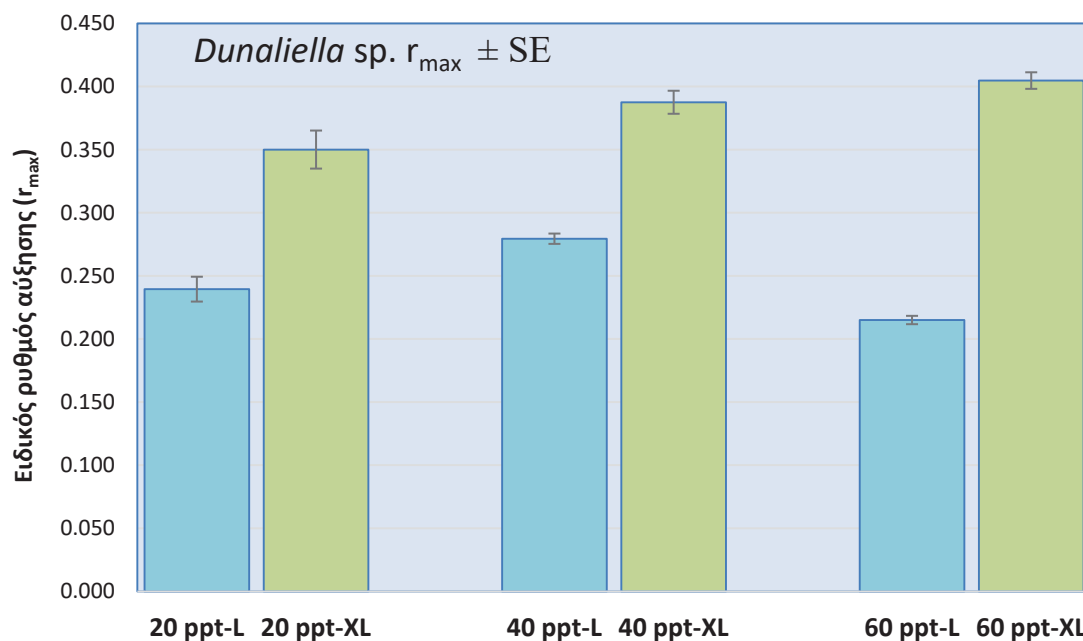
Σχήμα 46. Η καμπύλη αύξησης (σε κύτταρα/mL) της καλλιέργειας του *Dunaliella* sp. στην αλατότητα των 40 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.



Σχήμα 47. Η καμπύλη αύξησης (σε κύτταρα/mL) της καλλιέργειας του *Dunaliella* sp. στην αλατότητα των 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.

Το τάχος της αύξησης ως ειδικός ρυθμός αύξησης (r_{max}) και ο χρόνος διπλασιασμού ή γενεάς (t_g) αποτυπώνονται στο Σχήμα 48 και αναλυτικότερα στον Πίνακα 4. Προκύπτει σαφώς μεγαλύτερο τάχος αύξησης σε όλες τις αλατότητες με τον έντονο φωτισμό (0,350 - 0,387 - 0,405) για τις αλατότητες 20 - 40 - 60 ppt αντίστοιχα, συγκριτικά με τις τιμές (0,239 - 0,279 - 0,215) για το χαμηλό φωτισμό στις αντίστοιχες ίδιες αλατότητες. Στατιστικώς οι τιμές διέφεραν μεταξύ τους εκτός από αυτές του υψηλού φωτισμού στις αλατότητες των 40 και 60 ppt και αυτές του χαμηλού φωτισμού στις αλατότητες των 20 και 40 ppt οι οποίες παρουσίασαν μια εντυπωσιακή ομοιομορφία και ήταν στατιστικώς ίσες. Γενικώς στον υψηλό φωτισμό σε όλες τις αλατότητες παρουσιάστηκαν, συγκριτικά με το χαμηλό φωτισμό, σημαντικώς υψηλότεροι ρυθμοί αύξησης.

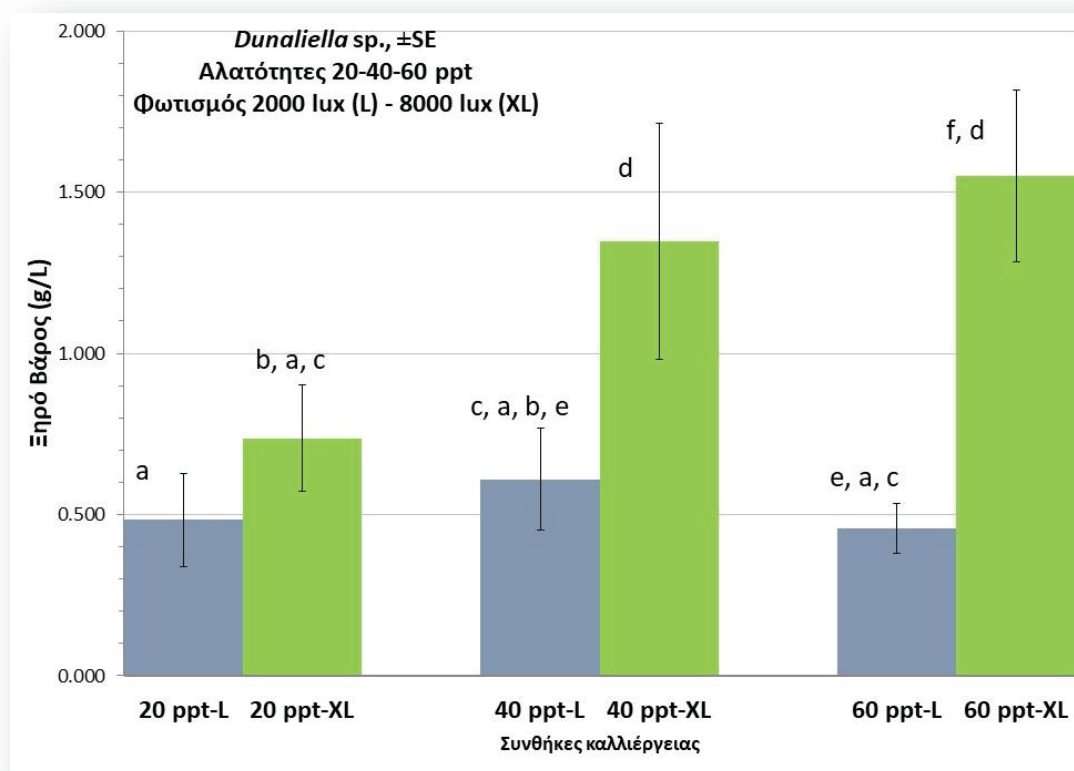
Ως αντανάκλαση των παραπάνω ρυθμών αύξησης και οι χρόνοι γενεάς (t_g) ήταν συντομότεροι στη συνθήκη του έντονου φωτισμού (2,09 - 1,815 - 1,774 ημέρες) για τις αλατότητες 20 - 40 - 60 ppt αντίστοιχα, συγκριτικά με τις τιμές (3,020 - 2,495 - 3,246 ημέρες) για τον χαμηλό φωτισμό στις αντίστοιχες ίδιες αλατότητες.



Σχήμα 48. Οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης (r_{max}) \pm SE των καλλιεργειών του *Dunaliella* sp. στις αλατότητες των 20, 40 και 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux).

Πίνακας 4. Συγκενρωτικά στοιχεία των ειδικών ρυθμών αύξησης (r_{\max}) και του χρόνου γενεάς ή διπλασιασμού (t_g) των καλλιεργειών του *Dunaliella* sp. στις αλατότητες των 20, 40 και 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Οι διαφορετικοί παρατιθέμενοι εκθέτες σημαίνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά στο επίπεδο 0,05 (στατιστική επεξεργασία με ANOVA και κατόπιν σύγκριση κατά ζεύγη με Tukey's test). Οπου υπάρχει και δεύτερος εκθέτης σημαίνει στατιστικώς ίση τιμή με την συνθήκη του αντίστοιχου γράμματος.

Συνθήκες	20ppt-L	20ppt-XL	40ppt-L	40ppt-XL	60ppt-L	60ppt-XL
r_{\max}	0,239 ^a	0,350 ^b	0,279 ^{c,a}	0,387 ^{d, b}	0,215 ^e	0,405 ^{f,d}
SE	0,010	0,015	0,004	0,0037	0,003	0,007
Διάστημα (ημέρες)	3 ⁿ -8 ⁿ	3 ⁿ -8 ⁿ	3 ⁿ -8 ⁿ	3 ⁿ -8 ⁿ	3 ⁿ -8 ⁿ	3 ⁿ -8 ⁿ
n	27	27	27	27	27	27
t_g (24ωρα)	3,020	2,09	2,495	1,815	3,246	1,774
SE	0,111	0,095	0,036	0,042	0,052	0,027
n	27	27	27	27	27	27



Σχήμα 49. Απόδοση σε ξηρό βάρος φυκούς (g/L) ± SE του *Dunaliella* sp. στις αλατότητες των 20, 40 και 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Η ύπαρξη σημαντικώς στατιστικής διαφοράς στο επίπεδο 0,05 υποδεικνύεται με διαφορετικό γράμμα. Οι στατιστικώς ίσες τιμές υποδεικνύονται με την επανάληψη των ανάλογων δεικτών στις στήλες (στατιστική επεξεργασία με ANOVA και κατόπιν σύγκριση κατά ζεύγη με Tukey's test).

Απόδοση των καλλιεργειών

Για την απόδοση των καλλιεργειών του *Dunaliella* sp. (Σχήμα 49) σε βιομάζα ως ξηρό βάρος ανά λίτρο καλλιέργειας (g/L), υπολογίστηκαν οι τιμές την 22^η ημέρα, Αξιοσημείωτο σε όλες τις αλατότητες η πολύ μεγαλύτερη παραγωγή στις συνθήκες του έντονου φωτός (8000 lux) συγκριτικά με τις αντίστοιχες τους στον ασθενέστερο φωτισμό (2000 lux). Την πλέον υψηλή παραγωγή (1,6 g/L) έδωσε η συνθήκη 60 ppt-XL, στατιστικώς ίση με την αντίστοιχη της 40 ppt-XL (1,35 g/L), μακράν υψηλότερες της αντίστοιχης συνθήκης 20 ppt-XL (0,72 g/L). Αντίθετα με την περίπτωση του έντονου φωτισμού, στο χαμηλό φωτισμό σε όλες τις αλατότητες οι τιμές ήταν στατιστικώς ίσες 20 ppt-L (0,48 g/L) - 40 ppt-L (0,51 g/L) - 60 ppt-L (0,42 g/L)

Συμπερασματικά για τη μέγιστη παραγωγή σε βιομάζα του *Dunaliella* sp. απαιτούνται αλατότητα τουλάχιστον 40 ppt και φωτισμός υψηλής έντασης τουλάχιστον 8000 lux.

Γενικές παρατηρήσεις

Οι καλλιέργειες του *Dunaliella* sp. παρουσιάζουν σταθερά πράσινο λαμπερό χρωματισμό (Σχήματα 50, 51, 52 και 53) ο οποίος εξελίσσεται από ανοικτό πράσινο σε σκούρο πράσινο στις πολύ ώριμες καλλιέργειες, χρώμα το οποίο διατηρείται για αρκετές εβδομάδες. Στην πλήρη άνθισή τους οι καλλιέργειες αναδίδουν μια ευχάριστη μυρωδιά φρεσκοκομμένου γκαζόν η οποία διατηρείται συνεχώς.

Το *Dunaliella* sp. φέρει 2 μαστίγια στα κύτταρά του και ως εκ τούτου είναι κινητικό. Οι καλλιέργειές του δεν καθιζάνουν εύκολα ακόμα και στην παντελή έλλειψη αερισμού.

Τα αποτελέσματα της καλλιέργειάς του υποδεικνύουν προς μία δυναμική ανάπτυξής του σε μεγάλο εύρος αλατοτήτων με ευνοϊκότερη συνθήκη στην αλατότητα της θάλασσας (~40 ppt) ή ανώτερη αυτής. Οι αποδόσεις του σε βιομάζα σαφώς επηρεάζονται θετικότερα σε υψηλές εντάσεις φωτισμού.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν μεν αρκετά στοιχεία καλλιέργειάς του όμως όχι σε συνθήκες όμοιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν, οπότε τις θεωρούμε ως βάση για μελλοντικούς πειραματισμούς.



Σχήμα 50. Τα δοχεία καλλιέργειας του *Dunaliella* sp. την 1^η ημέρα (έναρξη) με το χαρακτηριστικό ομοιόμορφο ανοικτό πράσινο χρώμα.



Σχήμα 51. Τα δοχεία καλλιέργειας του *Dunaliella* sp. την 4^η ημέρα με το χαρακτηριστικό ομοιόμορφο πράσινο χρώμα.

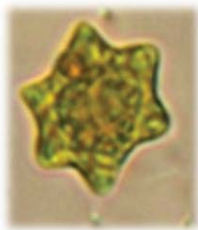


Σχήμα 52. Τα δοχεία καλλιέργειας του *Dunaliella* sp. τη 10^η ημέρα με το χαρακτηριστικό ομοιόμορφο λαμπερό πράσινο χρώμα.



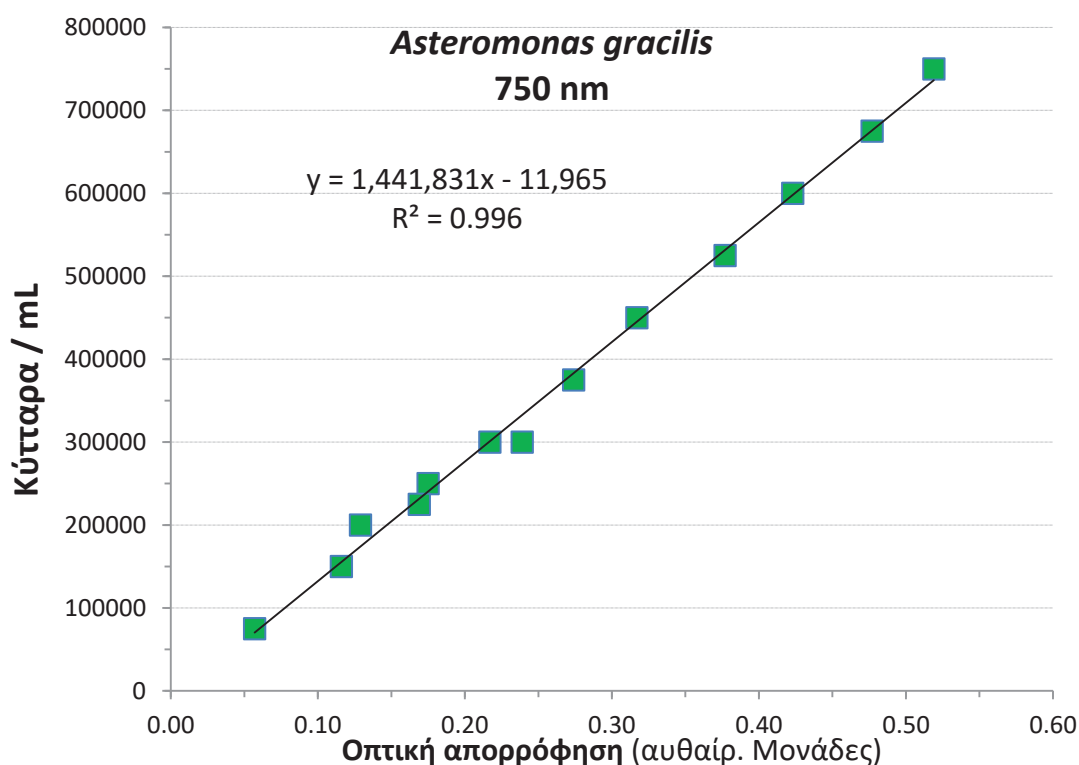
Σχήμα 53. Τα δοχεία καλλιέργειας του *Dunaliella* sp. τη 16^η ημέρα με το χαρακτηριστικό ομοιόμορφο σκουρο-πράσινο χρώμα.

Asteromonas gracilis



Αύξηση των καλλιεργειών

Η περίπτωση του χλωροφύκου *Asteromonas gracilis* είναι πολύ ιδιαίτερη καθώς το φυσικό του ενδιαίτημα αποτελούν αποκλειστικά υπεράλμυρες περιοχές σε πολλά μέρη της Γης. Είναι ένα είδος που μπορεί, προτιμά, και αυξάνεται σε αλατότητες πολύ υψηλότερες της θαλασσινής. Στη μελέτη μας το απομονώσαμε από τις υπεράλμυρες λεκάνες των αλυκών της λιμνοθάλασσας Μεσολογγίου και διατηρείται εύκολα σε αλατότητα περί τα 100 ppt (Hotos, 2021). Από τη βιβλιογραφία (Χώτος και Αβραμίδου, 1995) και από προκαταρκτικές δοκιμές φάνηκε ότι το είδος αυτό δεν αυξάνεται καθόλου σε αλατότητες περί το 20 ppt, οπότε οι καλλιέργειές μας διαμορφώθηκαν στα 40, 60 και 100 ppt.



Σχήμα 54. Καμπύλη βαθμονόμησης των καλλιεργειών του *Asteromonas gracilis* από πλήθος ζευγών τιμών οπτικής απορρόφησης-πυκνότητας κυττάρων.

Χρησιμοποιήθηκαν κωνικά γυάλινα δοχεία Erlenmeyer των 2L με 2 αντίγραφα για κάθε συνδυασμό αλατότητας και έντασης φωτός και επιπλέον ένα ακόμα αντίγραφο σε κυλινδρικό πλαστικό δοχείο του 1L. Σε όλα παρέιχτο αέρας

της τάξεως του 1 όγκου δοχείου/min (~2L/min και ~1L/min). Οι καλλιέργειες του *Asteromonas gracilis* προσαρμόστηκαν σε όλες τις αλατότητες και παρουσίασαν αύξηση (Σχήματα 55, 56 & 57). Οι καταγραφείσες ημερησίως μετρήσεις ως τιμές οπτικής απορρόφησης στα 750 nm που αποδείχθηκε το καλύτερο μήκος κύματος (μεταξύ των δοκιμασθέντων) με συντελεστή Pearson $R^2 = 0,996$, μεταφράστηκαν σε πυκνότητες κυττάρων/mL μέσω της εξίσωσης της καμπύλης βαθμονόμησης (Σχήμα 54) η οποία κατασκευάστηκε τόσο από επεξεργασία δειγμάτων κατάλληλα αραιωμένων, όσο και από περιοδικές μετρήσεις των καλλιεργειών με αιμοκυττόμετρο. Η εξίσωση βαθμονόμησης ήταν αντιπροσωπευτική γραμμικής σχέσης:

$$\text{Πυκνότητα} = 1.441.831 (\text{O.D.}) - 11.965$$

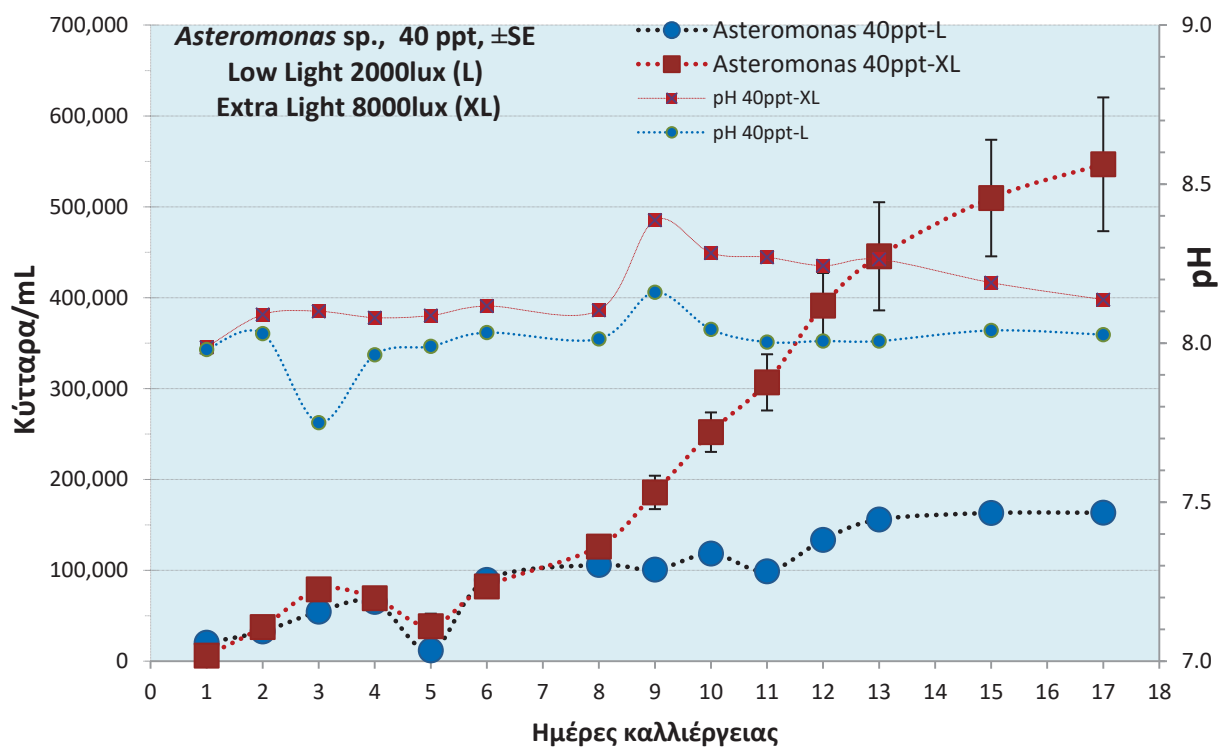
όπου: Πυκνότητα = κύτταρα/mL, O.D.= τιμές οπτικής απορρόφησης.

Οι καλλιέργειες διήρκεσαν 17 ημέρες και μετά από μία περίοδο προσαρμογής-καθυστέρησης 3-4 ημερών όλες παρουσίασαν μια παρατεταμένη εκθετική φάση η οποία ήταν εντονότερη στον υψηλής έντασης φωτισμό (8000 lux). Η "είσοδος" στην εκθετική φάση της εκάστοτε καλλιέργειας έγινε με ποικίλο τρόπο στην κάθε συνθήκη, πιο ενωρίς στις υψηλότερες αλατότητες των 60 και 100 ppt (6^η και 4^η ημέρα αντίστοιχα), αργότερα στην αλατότητα των 40 ppt (8^η ημέρα).

Στην αλατότητα των 40 ppt (Σχήμα 55) παρουσιάστηκε και στις δύο εντάσεις φωτισμού μια αξιοσημείωτη αρχική περίοδος 6 ημερών όπου οι πυκνότητες αυξομειώνονταν, προφανώς λόγω του στρες που επέφερε αυτή η χαμηλή για αυτό το είδος αλατότητα. Κατόπιν στην υψηλή ένταση φωτισμού παρουσιάστηκε μια έντονα αυξητική εκθετική φάση που κράτησε μέχρι τη 13^η ημέρα ακολουθούμενη από μια ηπιότερη αυξητική τάση που κατέληξε τη 17^η ημέρα σε πυκνότητα 550.000 κυτ./mL. Αντίθετα στο χαμηλό φωτισμό η εκθετική φάση μόλις που έγινε αισθητή και από τη 13^η ημέρα επήλθε σαφώς η στατική φάση με τελική πυκνότητα τη 17^η ημέρα 180.000 κυτ./mL. Το pH κυμάνθηκε γενικώς καθ' όλη τη διάρκεια στην περιοχή του 8,0 - 8,3 με σύντομες διακυμάνσεις και με τις τιμές στον έντονο φωτισμό διαρκώς ανώτερες από αυτές του χαμηλού φωτισμού.

Στην αλατότητα των 60 ppt (Σχήμα 56) παρουσιάστηκε επίσης και στις δύο εντάσεις φωτισμού μια αρχική περίοδος 6 ημερών όπου οι πυκνότητες αυξομειώνονταν, προφανώς πάλι λόγω του στρες που επέφερε και αυτή η μάλλον επίσης χαμηλή για αυτό το είδος αλατότητα. Κατόπιν στην υψηλή ένταση φωτισμού παρουσιάστηκε μια ηπιότερη απ' ότι στα 40 ppt αυξητική εκθετική φάση που διατηρήθηκε μέχρι τη 17^η ημέρα και κατέληξε σε πυκνότητα 490.000 κυτ./mL. Αντίθετα στο χαμηλό φωτισμό η εκθετική φάση ήταν πιο ήπια αλλά σταθερή μέχρι τέλους και κατέληξε σε πυκνότητα τη 17^η ημέρα 390.000 κυτ./mL. Το pH κυμάνθηκε γενικώς καθ' όλη τη διάρκεια στην περιοχή του 8,2 - 8,4 με σύντομες διακυμάνσεις και με τις τιμές στον έντονο φωτισμό ανώτερες από αυτές του χαμηλού φωτισμού μέχρι τη 10η ημέρα, κατόπιν με τιμές που έγιναν χαμηλότερες από του ασθενούς φωτισμού.

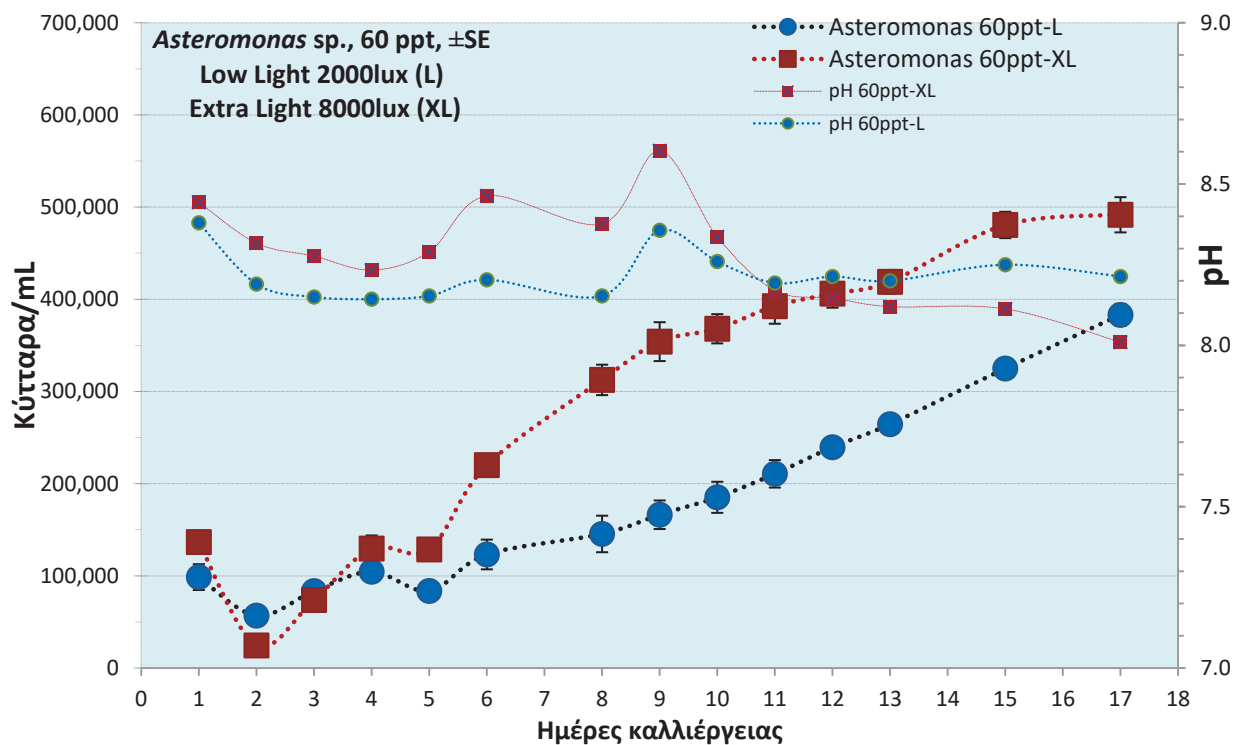
Το εκ πρώτους παράδοξο που παρατηρείται από τη σύγκριση των καμπυλών αύξησης των Σχημάτων 55 (για τα 40 ppt) και 56 (για τα 60 ppt), του να παρουσιάζεται δηλαδή σαφώς ανώτερη αυξητική τάση και τελική πυκνότητα στον ασθενή φωτισμό στα 60 ppt συγκριτικά με τα αντίστοιχα μεγέθη στην αλατότητα των 40 ppt, ενώ καταγράφηκε το αντίστροφο για τα μεγέθη αυτά στον υψηλό φωτισμό (δηλαδή ανώτερα στα 40 ppt απ' ό τι στα 60 ppt), φαίνεται να αντιβαίνει εν μέρει με την προτίμηση αυτού του είδους για υψηλότερες αλατότητες. Όμως μια προσεκτικότερη παρατήρηση στην καμπύλη του έντονου φωτισμού στο Σχήμα 55 των 40 ppt θα δείξει την πολύ μεγάλη διακύμανση των τιμών (\pm τιμές τυπικού σφάλματος) με τη σχεδόν απουσία τέτοιας διακύμανσης στην αντίστοιχη καμπύλη του Σχήματος 56 για τα 60 ppt. Ίσως η έντονη φωτοσύνθεση, η ύπαρξη κύστεων και πιθανόν άλλοι αδιευκρίνιστοι παράγοντες να συντελούν στο φαινόμενο αυτό.



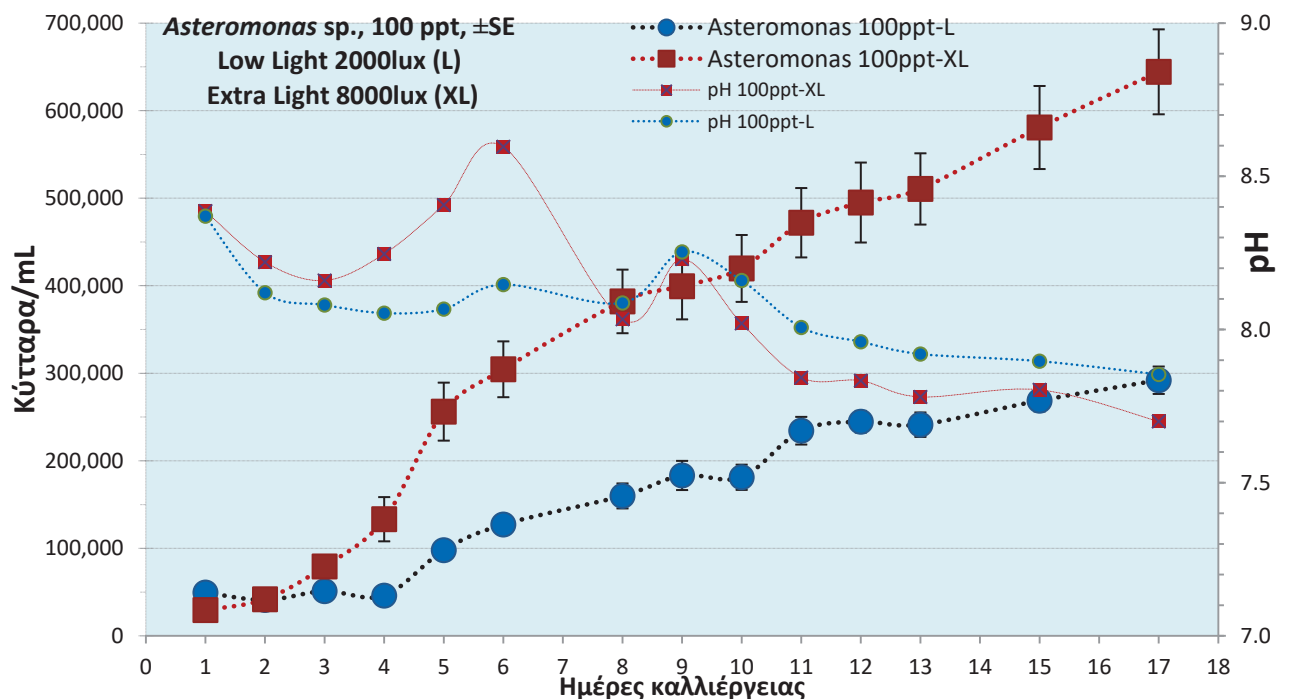
Σχήμα 55. Η καμπύλη αύξησης (σε κύτταρα/mL) της καλλιέργειας του *Asteromonas gracilis* στην αλατότητα των 40 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.

Στην πολύ υψηλή αλατότητα των 100 ppt (Σχήμα 57) τόσο το αρχικό διάστημα καθυστέρησης όσο και η μέγιστη πυκνότητα και στις δύο εντάσεις φωτισμού ήταν σαφώς διαφοροποιημένα από τις άλλες χαμηλές αλατότητες. Ήδη από την 3^η ημέρα στον έντονο φωτισμό και από την 4^η στον ασθενή άρχισε μια σταθερή εκθετική φάση η οποία διήρκεσε μέχρι το τέλος όπου τη 17^η ημέρα στον έντονο φωτισμό καταγράφηκε πυκνότητα 640.000 κυτ./mL και στον ασθενή 290.000 κυτ./mL αλλά πιθανόν αν οι καλλιέργειες διατηρούνταν ακμαίες (με πρόσθεση θρεπτικών) να έφτανε πολύ μεγαλύτερη τιμή. Το pH ενώ και στους 2 φωτισμούς

ξεκίνησε με τιμές 8,2 - 8,3, άρχισε να υψώνεται στον υψηλό φωτισμό σε τιμές ~8,5 και κατόπιν περί το μέσον της καλλιέργειας έπεσε σε τιμές γύρω στο 7,9 διατηρούμενες μέχρι το τέλος.



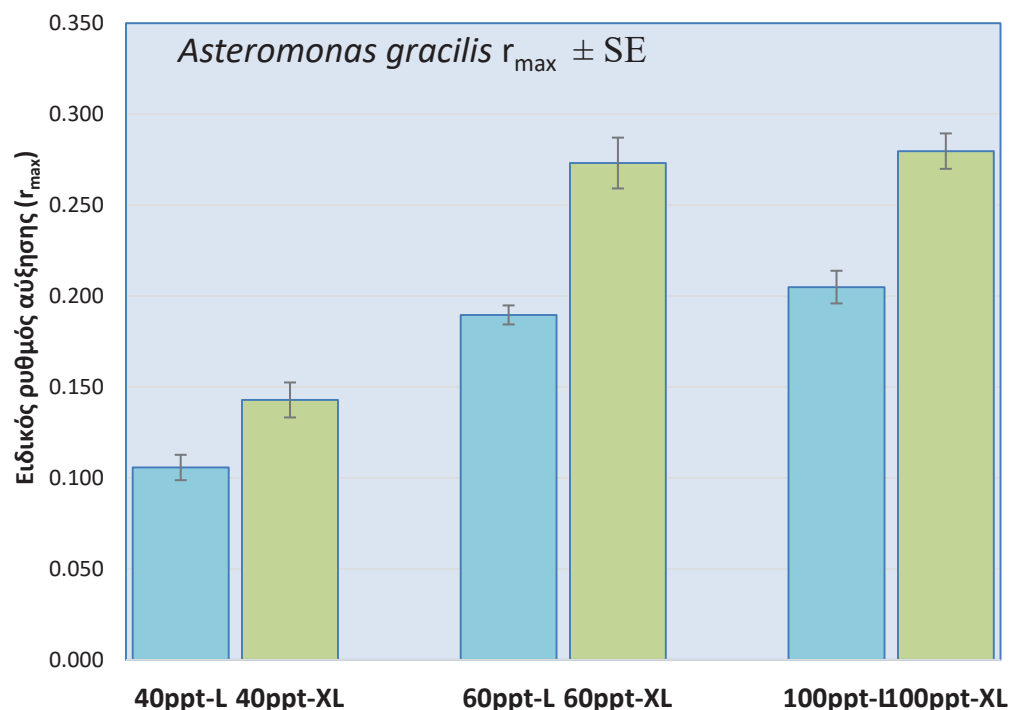
Σχήμα 56. Η καμπύλη αύξησης (σε κύτταρα/mL) της καλλιέργειας του *Asteromonas gracilis* στην αλατότητα των 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.



Σχήμα 57. Η καμπύλη αύξησης (σε κύτταρα/mL) της καλλιέργειας του *Asteromonas gracilis* στην αλατότητα των 100 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.

Το τάχος της αύξησης ως ειδικός ρυθμός αύξησης (r_{max}) μεταξύ των ημερών 3^η και 9^η και ο χρόνος διπλασιασμού ή γενεάς (t_g) αποτυπώνονται στο Σχήμα 58 και αναλυτικότερα στον Πίνακα 5. Προκύπτει σαφώς μεγαλύτερο τάχος αύξησης σε όλες τις αλατότητες με τον έντονο φωτισμό (0,143 - 0,273 - 0,280) για τις αλατότητες 40 - 60 - 100 ppt αντίστοιχα συγκριτικά με τις τιμές (0,106 - 0,190 - 0,205) για το χαμηλό φωτισμό στις αντίστοιχες ίδιες αλατότητες. Στατιστικώς οι τιμές διέφεραν μεταξύ τους εκτός από αυτές του υψηλού φωτισμού στις αλατότητες των 60 και 100 ppt και αυτές του χαμηλού φωτισμού στις ίδιες αλατότητες οι οποίες παρουσίασαν μια εντυπωσιακή ομοιομορφία και ήταν στατιστικώς ίσες. Γενικώς στον υψηλό φωτισμό σε όλες τις αλατότητες παρουσιάστηκαν συγκριτικά με το χαμηλό φωτισμό σημαντικώς υψηλότεροι ρυθμοί αύξησης.

Ως αντανάκλαση των παραπάνω ρυθμών αύξησης και οι χρόνοι γενεάς (t_g) ήταν συντομότεροι στη συνθήκη του έντονου φωτισμού (5,674 - 2,768 - 2,551 ημέρες) για τις αλατότητες 20 - 40 - 60 ppt αντίστοιχα συγκριτικά με τις τιμές (8,034 - 3,711 - 3,607 ημέρες) για το χαμηλό φωτισμό στις αντίστοιχες ίδιες αλατότητες. Γενικώς και σε σύγκριση με τις καλλιέργειες των άλλων ευκαρυωτικών φυκών του παρόντος, πρόκειται για είδος με αργή αύξηση.



Σχήμα 58. Οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης (r_{max}) \pm SE των καλλιεργειών του *Asteromonas gracilis*. στις αλατότητες των 40, 60 και 100 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux).

Πίνακας 5. Συγκενρωτικά στοιχεία των ειδικών ρυθμών αύξησης (r_{max}) και του χρόνου γενεάς ή διπλασιασμού (t_g) των καλλιεργειών του *Asteromonas gracilis* στις αλατότητες των 40, 60 και 100 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Οι διαφορετικοί παρατιθέμενοι εκθέτες σημαίνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά στο επίπεδο 0,05 (στατιστική επεξεργασία με ANOVA και κατόπιν σύγκριση κατά ζεύγη με Tukey's test). Οπου υπάρχει και δεύτερος εκθέτης σημαίνει στατιστικώς ίση τιμή με την συνθήκη του αντίστοιχου γράμματος.

Συνθήκες	40ppt-L	40ppt-XL	60ppt-L	60ppt-XL	100ppt-L	100ppt-XL
r_{max}	0,106 ^a	0,143 ^b	0,190 ^{c,e}	0,273 ^{d,f}	0,205 ^e	0,280 ^f
SE	0,007	0,010	0,005	0,014	0,009	0,010
Διάστημα (ημέρες)	3 ⁿ -9 ⁿ	3 ⁿ -9 ⁿ	3 ⁿ -9 ⁿ	3 ⁿ -9 ⁿ	3 ⁿ -9 ⁿ	3 ⁿ -9 ⁿ
n	30	30	20	30	30	30
t_g (24ωρα)	8,034	5,674	3,711	2,768	3,607	2,551
SE	0,773	0,426	0,101	0,154	0,175	0,070
n	30	30	20	30	30	30

Απόδοση των καλλιεργειών

Για την απόδοση των καλλιεργειών του *Asteromonas gracilis* (Σχήμα 59) σε βιομάζα ως ξηρό βάρος ανά λίτρο καλλιέργειας (g/L), υπολογίστηκαν οι τιμές τη 17^η ημέρα. Αξιοσημείωτη σε όλες τις αλατότητες η πολύ μεγαλύτερη παραγωγή στις συνθήκες του έντονου φωτός (8000 lux) συγκριτικά με τις αντίστοιχές τους στον ασθενέστερο φωτισμό (2000 lux). Την πλέον υψηλή παραγωγή (0,7 g/L) έδωσε η συνθήκη 100 ppt-XL, στατιστικώς μεγαλύτερη από κάθε άλλη συνθήκη, ακολούθησε αυτή της 60 ppt-XL (0,51 g/L), μακράν υψηλότερες της αντίστοιχης συνθήκης 40 ppt-XL (0,2 g/L).

Αντίθετα με την περίπτωση του έντονου φωτισμού, στο χαμηλό φωτισμό σε όλες τις αλατότητες οι τιμές ήταν πολύ χαμηλότερες και στατιστικώς διαφορετικές μεταξύ των 40 ppt-L (0,195 g/L) - 60 ppt-L (0,28 g/L) - 100 ppt-L (0,58 g/L). Αξιοσημείωτο οι στατιστικώς ίσες τιμές των δύο φωτισμών στη αλατότητα των 40 ppt.

Συμπερασματικά για τη μέγιστη παραγωγή σε βιομάζα του *Asteromonas gracilis* απαιτούνται αλατότητες ανώτερες των 60 ppt και φωτισμός υψηλής έντασης τουλάχιστον 8000 lux.

Γενικές παρατηρήσεις

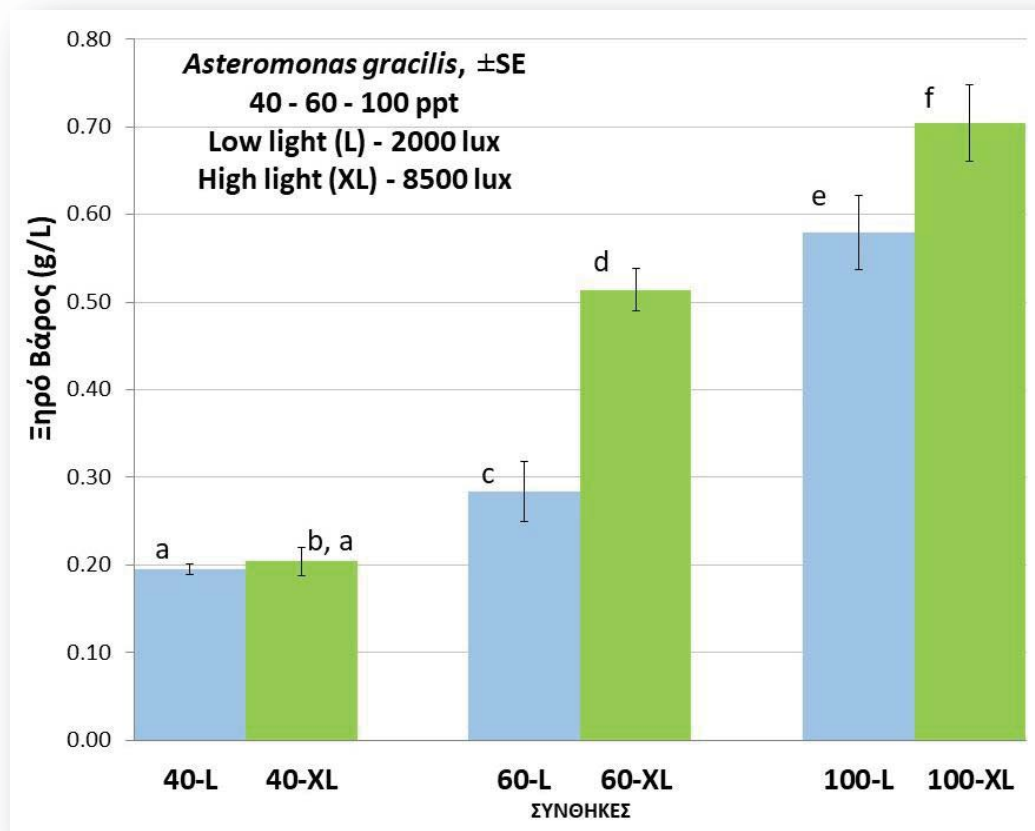
Οι καλλιέργειες του *Asteromonas gracilis* (όπως και του άλλου αλοανθεκτικού χλωροφύκου *Dunaliella* sp.) παρουσιάζουν σταθερά πράσινο λαμπερό χρωματισμό (Σχήματα 60, 61, 62 και 63) ο οποίος εξελίσσεται από ανοικτό πράσινο σε σκούρο πράσινο στις πολύ ώριμες καλλιέργειες, χρώμα το οποίο όμως δεν διατηρείται επί μακρόν καθώς μετά από 14-15 ημέρες περίπου αρχίζει να

κιτρινίζει στον έντονο φωτισμό (Σχήμα 63). Στην πλήρη άνθισή τους οι καλλιέργειες αναδίδουν μια ευχάριστη μυρωδιά φρεσκοκομμένου γκαζόν η οποία διατηρείται συνεχώς.

Το *Asteromonas gracilis* φέρει 2 μαστίγια στα κύτταρά του και ως εκ τούτου είναι κινητικό. Οι καλλιέργειές του όμως ιδιαίτερα αν αφεθούν χωρίς αερισμό είναι επιρρεπείς στην καθίζηση όταν ωριμάσουν.

Τα αποτελέσματα της καλλιέργειάς του υποδεικνύουν προς μία δυναμική ανάπτυξής του σε μεγάλο εύρος αλατοτήτων μεν αλλά σε πολύ υψηλές, ανώτερες των 60 ppt. Οι αποδόσεις του σε βιομάζα σαφώς επηρεάζονται θετικότερα σε υψηλές εντάσεις φωτισμού.

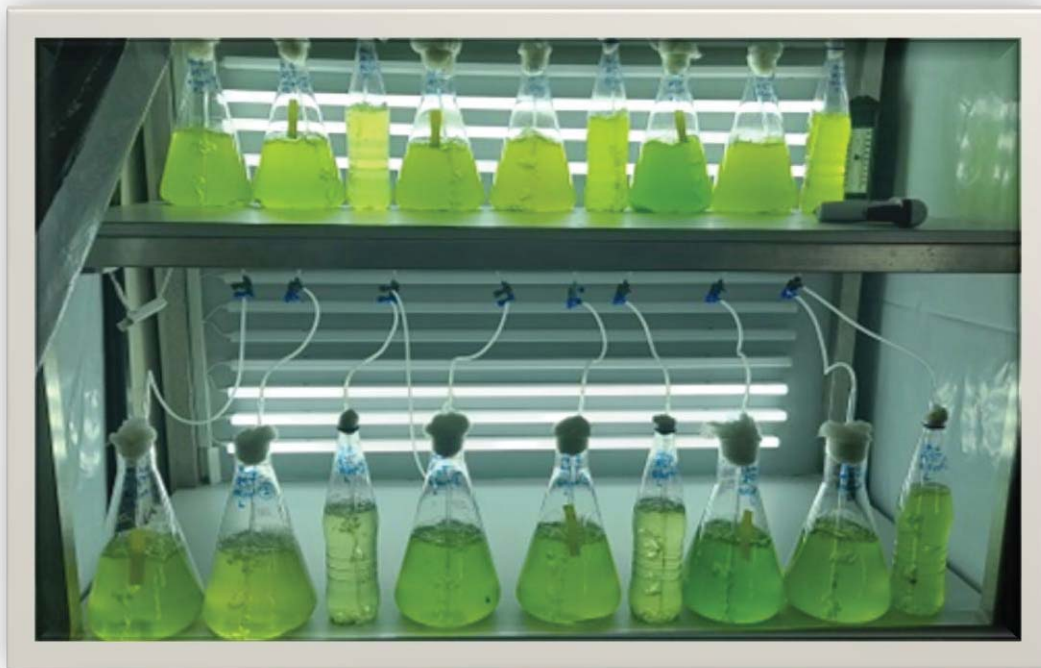
Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν στοιχεία καλλιέργειάς του (πλην της εργασίας των Χώτου, Αβραμίδου, 1995) όμως όχι σε συνθήκες όμοιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν, οπότε τις θεωρούμε ως βάση για μελλοντικούς πειραματισμούς.



Σχήμα 59. Απόδοση σε ξηρό βάρος φυκούς (g/L) ± SE του *Asteromonas gracilis* στις αλατότητες των 40, 60 και 100 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Η ύπαρξη σημαντικώς στατιστικής διαφοράς στο επίπεδο 0,05 υποδεικνύεται με διαφορετικό γράμμα. Οι στατιστικώς ίσες τιμές υποδεικνύονται με την επανάληψη των ανάλογων δεικτών στις στήλες (στατιστική επεξεργασία με ANOVA και κατόπιν σύγκριση κατά ζεύγη με Tukey's test).



Σχήμα 60. Τα δοχεία καλλιέργειας του *Asteromonas gracilis* την 1^η ημέρα (έναρξη) με το χαρακτηριστικό ομοιόμορφο ανοιχτό πράσινο χρώμα.



Σχήμα 61. Τα δοχεία καλλιέργειας του *Asteromonas gracilis* την 4^η ημέρα με το χρώμα τους να έχει αρχίσει να γίνεται λαμπερό πράσινο.



Σχήμα 62. Τα δοχεία καλλιέργειας του *Asteromonas gracilis* την 11^η ημέρα με το χρώμα τους να έχει γίνει έντονα βαθύ πράσινο.



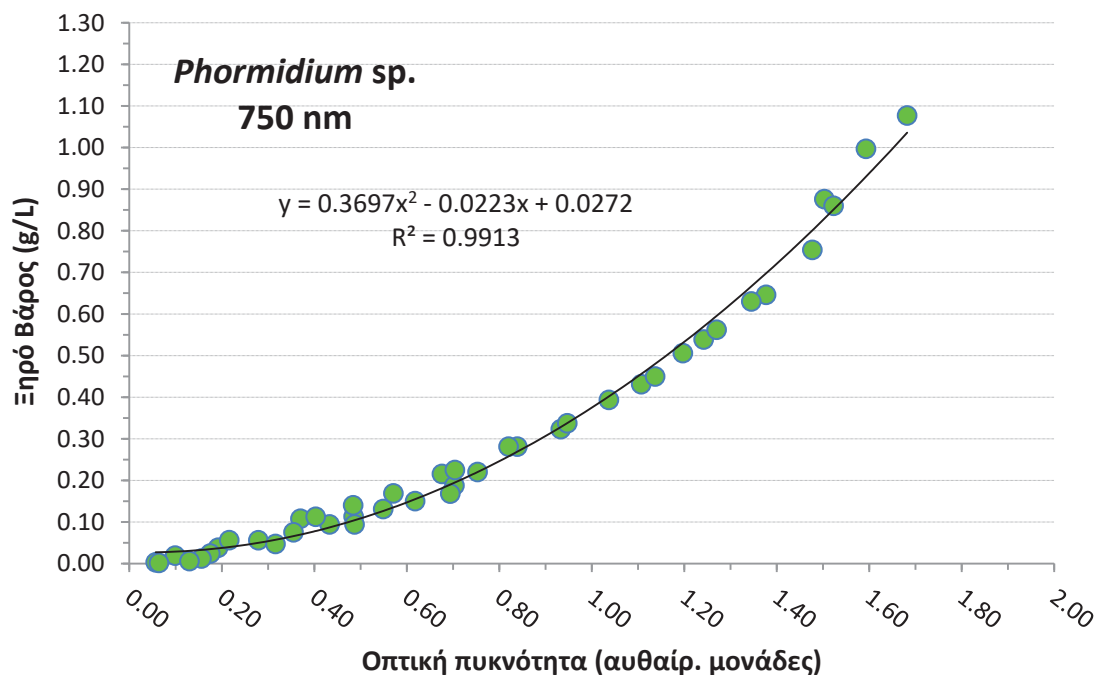
Σχήμα 63. Τα δοχεία καλλιέργειας του *Asteromonas gracilis* την 20^η ημέρα με το χρώμα τους να ποικίλλει ανάλογα με τη συνθήκη από κιτρινωπό στον έντονο φωτισμό (υπερώριμη καλλιέργεια, επάνω ράφι) έως ανοικτό πράσινο στον ασθενή φωτισμό (ωριμάζουσα καλλιέργεια, κάτω ράφι).

Phormidium sp.



Αύξηση των καλλιεργειών

Το νηματοειδές μη-αζωτοδεσμευτικό κυανοβακτήριο *Phormidium* sp. που απομονώθηκε από τη λιμνοθάλασσα Μεσολογγίου, αποδείχθηκε ένα πολύ ανθεκτικό είδος σε ποικίλες συνθήκες και ποτέ δεν κατέρρευσε η καλλιέργειά του ούτε ακόμα και αν είχε αφεθεί επί εβδομάδες αφρόντιστο (χωρίς ανανέωση του μέσου). Προσαρμόζονταν σε ένα ευρύ φάσμα αλατοτήτων, θερμοκρασιών και φωτισμού και λόγω της μοναδικής του ιδιότητας να καθιζάνουν τα νημάτιά του όταν αφεθεί για μερικές ώρες χωρίς αερισμό, προσέφερε πολύ πρακτική βοήθεια στη συλλογή της βιομάζας του και στην ανα-καλλιέργειά της.



Σχήμα 64. Καμπύλη βαθμονόμησης των καλλιεργειών του νηματοειδούς κυανοβακτηρίου *Phormidium* sp. από πλήθος ζευγών τιμών οπτικής απορρόφησης-πυκνότητας καλλιέργειας.

Με βάση τα παραπάνω το *Phormidium* sp. καλλιεργήθηκε σε 3 αλατότητες 20-40-60 ppt και 2 εντάσεις φωτισμού ανά αλατότητα, έντονης XL-8000 lux και ασθενούς L-2000 lux. Για τις καλλιέργειες δημιουργήθηκαν από 3 αντίγραφα για κάθε συνδυασμό αλατότητας-φωτός. Τα δοχεία που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ιδιοκατασκευή, κυλινδρικά με κωνική απόληξη (με στρόφιγγα) τοποθετημένη προς

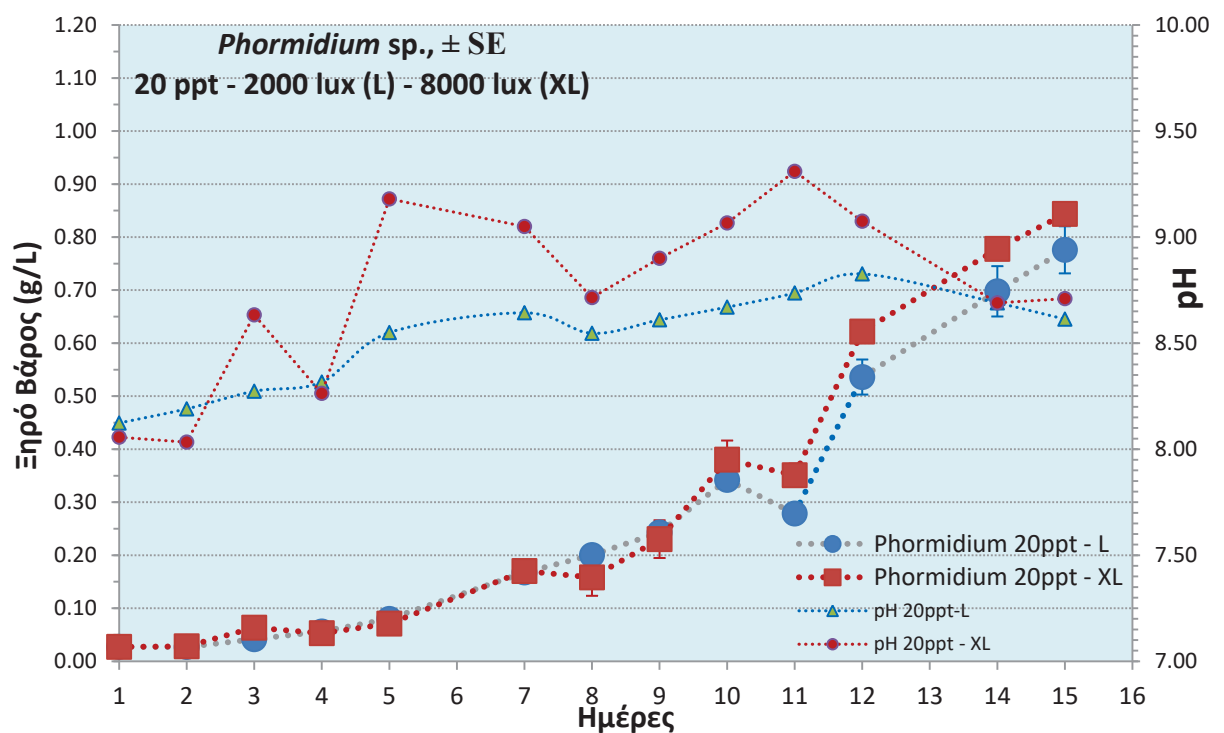
τα κάτω, χωρητικότητας 1,5 L ακριβώς για να εκμεταλλευθούμε την ιδιότητα της καθίζησης και την εξ' αυτής εύκολη συλλογή της βιομάζας, ως ένα μοντέλο μικρής κλίμακας που μπορεί να αποτελέσει έμπνευση για παραγωγή εμπορικού τύπου. Για κάθε συνδυασμό αλατότητας-φωτός χρησιμοποιήθηκαν 2 κυλινδροκωνικά δοχεία και ένα επιπλέον τύπου εργαστηριακής κυλινδρικής φιάλης χωρητικότητας 2-L.

Οι καλλιέργειες του *Phormidium* sp. προσαρμόστηκαν σε όλες τις αλατότητες και παρουσίασαν αύξηση (Σχήματα 65, 66 & 67). Οι καταγραφείσες ημερησίως μετρήσεις ως τιμές οπτικής απορρόφησης στα 750 nm που αποδείχθηκε το καλύτερο μήκος κύματος (μεταξύ των δοκιμασθέντων) με συντελεστή Pearson $R^2 = 0,9913$, μεταφράστηκαν σε g ξηρού βάρους/L μέσω της εξίσωσης της καμπύλης βαθμονόμησης (Σχήμα 64) η οποία κατασκευάστηκε τόσο από επεξεργασία δειγμάτων κατάλληλα αραιωμένων όσο και από περιοδικές μετρήσεις των καλλιεργειών με ζύγιση αποξηραμένων δειγμάτων από γνωστό όγκο δείγματος. Η καμπύλη βαθμονόμησης αντιπροσωπεύτηκε από εξίσωση δευτέρου βαθμού:

$$\text{Πυκνότητα} = 0,3697 (\text{O.D.})^2 - 0,0223(\text{O.D.}) + 0,0272$$

όπου: Πυκνότητα = κύτταρα/mL, O.D.= τιμές οπτικής απορρόφησης.

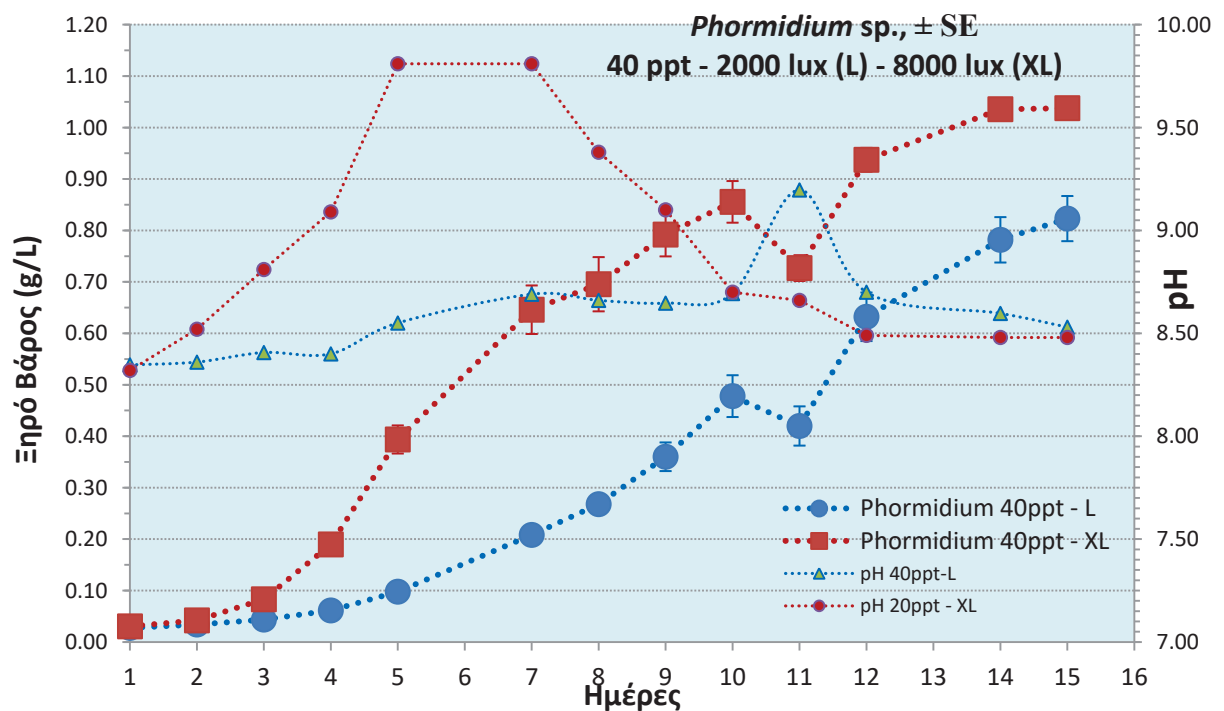
Οι καλλιέργειες διήρκεσαν 15 ημέρες και μετά από μία περίοδο προσαρμογής-καθυστέρησης 3-4 ημερών όλες παρουσίασαν μια παρατεταμένη εκθετική φάση η οποία ήταν εντονότερη στον υψηλής έντασης φωτισμό (8000 lux). Η "είσοδος" στην εκθετική φάση της εκάστοτε καλλιέργειας έγινε με ποικίλο τρόπο στην κάθε συνθήκη, πιο απότομα στις υψηλότερες αλατότητες των 40 και 60 ppt (από την 4^η ημέρα), πιο ήπια στην αλατότητα των 20 ppt (από την 5^η ημέρα).



Σχήμα 65. Η καμπύλη αύξησης (σε g/L) της καλλιέργειας του *Phormidium* sp. στην αλατότητα των 20 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.

Στην αλατότητα των 20 ppt (Σχήμα 65) παρουσιάστηκε μια αξιοσημείωτη ταύτιση σχεδόν των καμπυλών αύξησης και των 2 συνθηκών φωτός. Η εκθετική φάση αύξησης άρχισε από την 5^η ημέρα και από τη 10^η άρχισε να αντιπροσωπεύει ελαφρά υψηλότερες τιμές μάζας κυττάρων στον έντονο φωτισμό συγκριτικά με αυτές του ασθενούς φωτισμού. Τη 15^η ημέρα στον έντονο φωτισμό καταγράφηκε μάζα 0,83 g/L ενώ στον ασθενή 0,78 g/L. Μετά από μια χαρακτηριστική πτώση του ρυθμού αύξησης τη 10^η ημέρα και στις δύο καταστάσεις φωτισμού οι καμπύλες ανέκαμψαν έντονα την 11^η ημέρα και έκτοτε παρουσίασαν μια ελαφρά κάμψη του ρυθμού σημάδι της επερχόμενης φάσης στασιμότητας.

Το pH ξεκίνησε με τιμές γύρω στο 8,0 και κατόπιν αυξήθηκε πολύ περισσότερο στον υψηλό φωτισμό με τιμές γύρω στο 9,3 ενώ στον ασθενή διατηρήθηκε σε τιμές 8,5-8,7 καθ' όλη τη διάρκεια. Μετά τη 13^η ημέρα οι τιμές στον υψηλό φωτισμό παρουσίασαν έντονη πτώση και διατηρήθηκαν εντεύθεν σε παρόμοιες τιμές με τις αντίστοιχες του ασθενούς φωτισμού. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι υψηλές τιμές του pH τόσο σε αυτή όσο και στις άλλες αλατότητες είναι και χαρακτηριστικές της προτίμησης των κυανοβακτηρίων γενικά για υψηλό pH. Εικάζεται ότι όχι μόνο το προτιμούν αλλά και το προκαλούν.

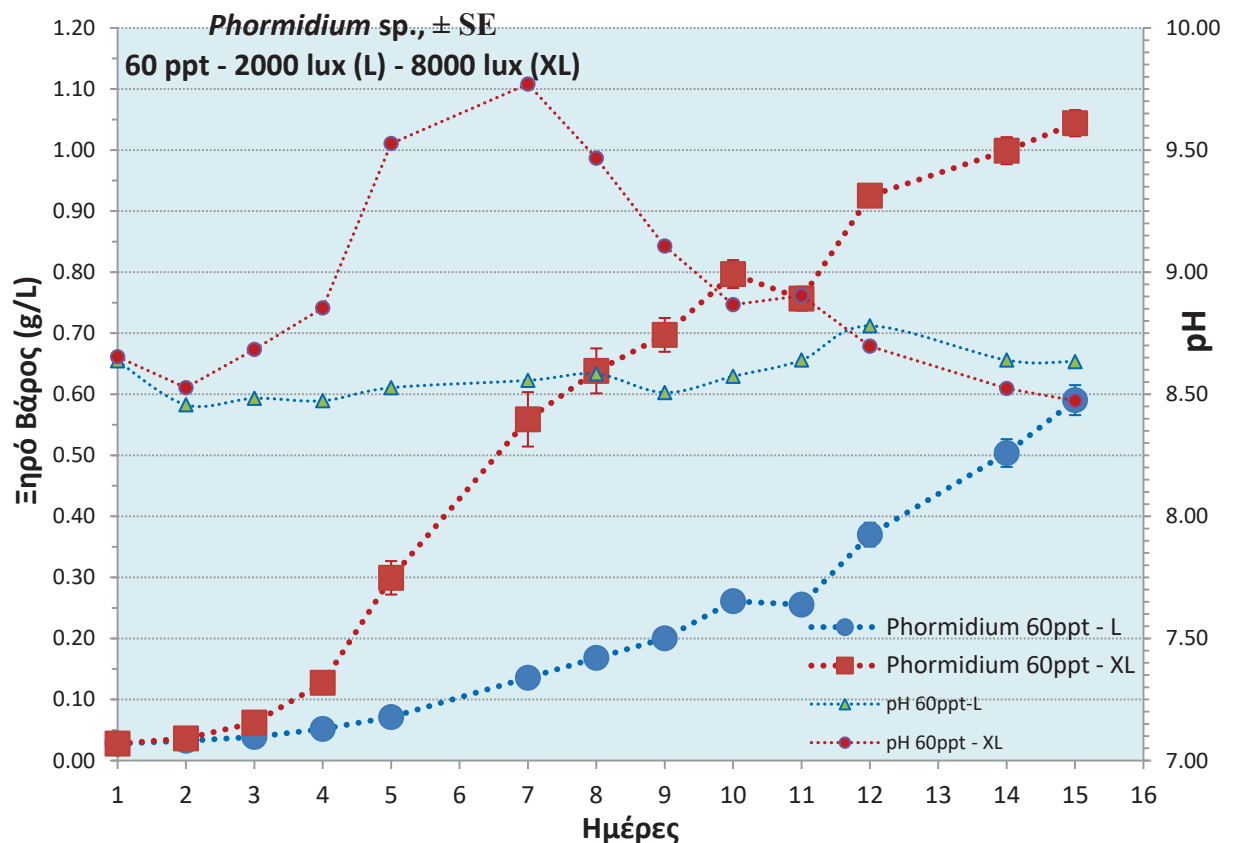


Σχήμα 66. Η καμπύλη αύξησης (σε g/L) της καλλιέργειας του *Phormidium* sp. στην αλατότητα των 40 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.

Στην αλατότητα των 40 ppt (Σχήμα 66) παρουσιάστηκε μια εμφανώς γρηγορότερης αύξησης και υψηλότερων τιμών φυκομάζας καμπύλη στον έντονο φωτισμό συγκριτικά με την καμπύλη του ασθενούς φωτισμού. Η εκθετική φάση αύξησης άρχισε και για τους δύο φωτισμούς μετά την 3^η ημέρα και άμεσα έγινε

έντονα εκθετική στον υψηλό φωτισμό διατηρούμενη έτσι μέχρι τη 10^η ημέρα, ενώ στον ασθενή φωτισμό διατηρήθηκε με λιγότερο μεν απότομη κλίση, αλλά πιο σταθερά. Τη 15^η ημέρα στον έντονο φωτισμό καταγράφηκε μάζα 1,03 g/L ενώ στον ασθενή 0,8 g/L. Μετά από μια χαρακτηριστική πτώση του ρυθμού αύξησης τη 10^η ημέρα και στις δύο καταστάσεις φωτισμού οι καμπύλες ανέκαμψαν έντονα την 11^η ημέρα και έκτοτε παρουσίασαν μια ελαφρά κάμψη του ρυθμού, σημάδι της επερχόμενης φάσης στασιμότητας.

Το pH ξεκίνησε με τιμές γύρω στο 8,3 και κατόπιν αυξήθηκε πολύ περισσότερο στον υψηλό φωτισμό με τιμές γύρω στο 9,6 ενώ στον ασθενή διατηρήθηκε σε εύρος 8,5-8,7 καθ' όλη τη διάρκεια. Μετά την 7^η ημέρα οι τιμές στον υψηλό φωτισμό παρουσίασαν έντονη πτώση και διατηρήθηκαν μετά τη 10^η ημέρα σε τιμές μικρότερες από τις αντίστοιχες του ασθενούς φωτισμού.

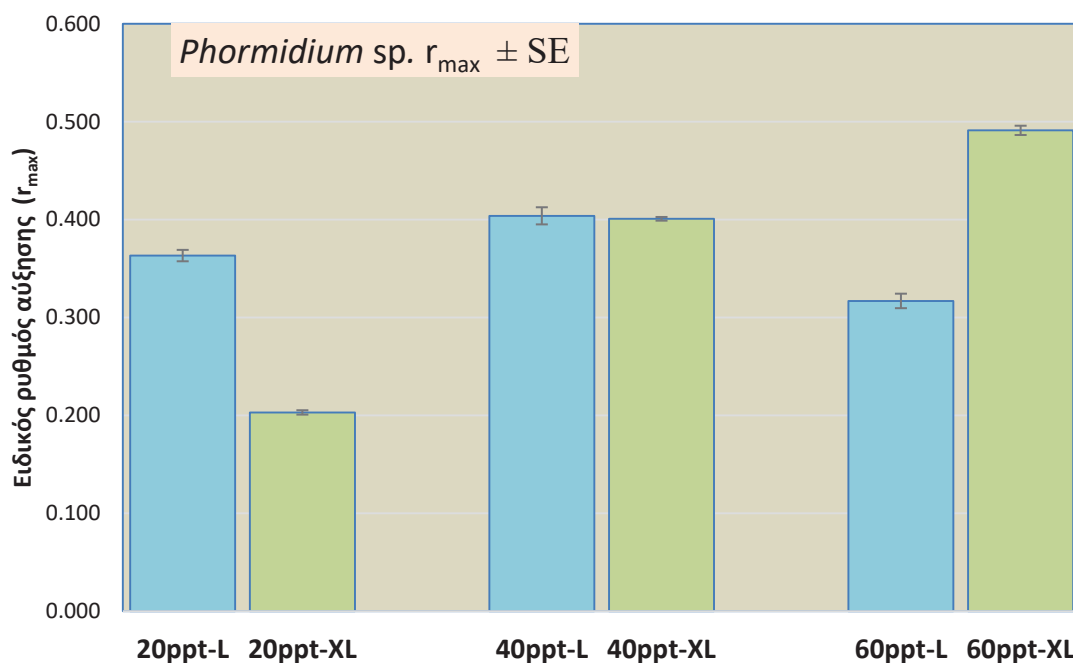


Σχήμα 67. Η καμπύλη αύξησης (σε g/L) της καλλιέργειας του *Phormidium* sp. στην αλατότητα των 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.

Στην αλατότητα των 60 ppt (Σχήμα 67) παρουσιάστηκε μια εμφανώς γρηγορότερης αύξησης και υψηλότερων τιμών φυκομάζας καμπύλη στον έντονο φωτισμό συγκριτικά με την καμπύλη του ασθενούς φωτισμού. Η εκθετική φάση αύξησης άρχισε και για τους δύο φωτισμούς μετά την 3^η ημέρα και άμεσα έγινε έντονα εκθετική στον υψηλό φωτισμό διατηρούμενη έτσι μέχρι τη 10^η ημέρα, ενώ

στον ασθενή φωτισμό διατηρήθηκε με λιγότερο μεν απότομη κλίση αλλά πιο σταθερά και συνεχώς ανοδική. Τη 15^η ημέρα στον έντονο φωτισμό καταγράφηκε μάζα 1,05 g/L ενώ στον ασθενή 0,6 g/L. Μετά από μια χαρακτηριστική πτώση του ρυθμού αύξησης τη 10^η ημέρα και στις δύο καταστάσεις φωτισμού (λιγότερο όμως έντονη από αυτή που παρουσιάστηκε στις αλατότητες των 20 και 40 ppt), οι καμπύλες ανέκαμψαν την 11^η ημέρα και μόνο στον έντονο φωτισμό η καμπύλη παρουσίασε μια ελαφρά κάμψη του ρυθμού, σημάδι της επερχόμενης φάσης στασιμότητας.

Το pH ξεκίνησε με τιμές γύρω στο 8,5 και στις δύο καταστάσεις φωτισμού και κατόπιν αυξήθηκε πολύ περισσότερο στον υψηλό φωτισμό με τιμές γύρω στο 9,75 ενώ στον ασθενή διατηρήθηκε σε τιμές 8,5-8,7 καθ' όλη τη διάρκεια. Μετά την 7^η ημέρα οι τιμές στον υψηλό φωτισμό παρουσίασαν έντονη πτώση και διατηρήθηκαν μετά τη 12^η ημέρα σε τιμές μικρότερες από τις αντίστοιχες του ασθενούς φωτισμού.



Σχήμα 68. Οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης (r_{max}) \pm SE των καλλιεργειών του *Phormidium* sp. στις αλατότητες των 20, 40 και 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux).

Το τάχος της αύξησης ως ειδικός ρυθμός αύξησης (r_{max}) και ο χρόνος διπλασιασμού ή γενεάς (t_g) αποτυπώνονται στο Σχήμα 68 και αναλυτικότερα στον Πίνακα 6. Ως διάστημα υπολογισμών τέθηκαν οι 3 ημέρες μεταξύ της 4^{ης} όπου άρχισε η εκθετική φάση σε όλες τις συνθήκες και της 7^{ης} όπου επίσης σε όλες η καμπύλη διατηρήθηκε ανοδική. Προκύπτει σαφώς μεγαλύτερο τάχος αύξησης στην αλατότητα των 60 ppt με τον έντονο φωτισμό (0,491, υψηλότερο κάθε άλλης συνθήκης) συγκριτικά με την τιμή των 0,317 για το χαμηλό φωτισμό στην ίδια αλατότητα. Στην αλατότητα των 40 ppt οι τιμές για το έντονο και ασθενές φως

(0,401 - 0,404 αντίστοιχα) ήταν στατιστικά ίσες ενώ στην αλατότητα των 20 ppt ο ασθενής φωτισμός παρουσίασε υψηλότερο τάχος (0,363) συγκριτικά με τον έντονο φωτισμό (0,203). Στατιστικώς οι τιμές διέφεραν μεταξύ τους εκτός από αυτές του υψηλού και του χαμηλού φωτισμού στην αλατότητα των 40 ppt.

Ως αντανάκλαση των παραπάνω ρυθμών αύξησης και ο χρόνος γενεάς (t_g) ήταν ο χαμηλότερος στη συνθήκη του έντονου φωτισμού στα 60 ppt (1,415 ημέρες) ακολουθούμενος από τις τιμές στην αλατότητα των 40 ppt με παρόμοιες τιμές μεταξύ τους για τον έντονο και ασθενή φωτισμό (1,792 - 1,739 ημέρες αντίστοιχα), ενώ στην αλατότητα των 20 ppt μόνο ο ασθενής φωτισμός έδωσε κατά τι παρόμοια τιμή (1,922 ημέρες) με τον έντονο φωτισμό να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή χρόνου διπλασιασμού μεταξύ όλων των συνθηκών (3,426 ημέρες). Γενικώς το κυανοβακτήριο *Phormidium* sp. παρουσίασε υψηλό τάχος αύξησης και γρήγορο διπλασιασμό σε αλατότητες υψηλότερες των 20 ppt αλλά χωρίς κάποιο ευδιάκριτο πρότυπο που να το συνδέει με το συνδυασμό συνθηκών αλατότητας-έντασης φωτισμού.

Πίνακας 6. Συγκεντρωτικά στοιχεία των ειδικών ρυθμών αύξησης (r_{max}) και του χρόνου γενεάς ή διπλασιασμού (t_g) των καλλιεργειών του *Phormidium* sp. στις αλατότητες των 20, 40 και 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Οι διαφορετικοί παρατιθέμενοι εκθέτες σημαίνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά στο επίπεδο 0,05 (στατιστική επεξεργασία με ANOVA και κατόπιν σύγκριση κατά ζεύγη με Tukey's test). Οπου υπάρχει και δεύτερος εκθέτης σημαίνει στατιστικώς ίση τιμή με τη συνθήκη του αντίστοιχου γράμματος.

Συνθήκες	20ppt-L	20ppt-XL	40ppt-L	40ppt-XL	60ppt-L	60ppt-XL
r_{max}	0,363 ^a	0,203 ^b	0,404 ^{c,d}	0,401 ^d	0,317 ^e	0,491 ^f
SE	0,006	0,002	0,009	0,002	0,007	0,005
Διάστημα (ημέρες)	4 ⁿ -7 ⁿ	4 ⁿ -7 ⁿ	4 ⁿ -7 ⁿ	4 ⁿ -7 ⁿ	4 ⁿ -7 ⁿ	4 ⁿ -7 ⁿ
n	27	27	27	27	27	27
t_g (24ωρα)	1,922	3,426	1,739	1,791	2,222	1,415
SE	0,032	0,038	0,040	0,069	0,056	0,013
n	27	27	27	27	27	27

Απόδοση των καλλιεργειών

Για την απόδοση των καλλιεργειών του *Phormidium* sp. (Σχήμα 69) σε βιομάζα ως ξηρό βάρος ανά λίτρο καλλιέργειας (g/L), υπολογίστηκαν οι τιμές τη 15^η ημέρα. Αξιοσημείωτη σε όλες τις αλατότητες η πολύ μεγαλύτερη παραγωγή στις συνθήκες του έντονου φωτός (8000 lux) συγκριτικά με τις αντίστοιχές τους στον ασθενέστερο φωτισμό (2000 lux). Την πλέον υψηλή παραγωγή (1,22 g/L) έδωσε η συνθήκη 60 ppt-XL, στατιστικώς ίση με αυτή της 40 ppt-XL (1,18 g/L), σχεδόν διπλάσια της αντίστοιχης συνθήκης 20 ppt-XL (0,62 g/L). Αντίθετα με την περίπτωση του έντονου φωτισμού, στο χαμηλό φωτισμό σε όλες τις αλατότητες οι τιμές ήταν

πολύ χαμηλότερες και στατιστικώς διαφορετικές με αυτές του έντονου φωτισμού. Όμως από στατιστική άποψη οι τιμές στον ασθενή φωτισμό παρουσίασαν ισότητα στις περιπτώσεις των ζευγών 40 ppt-L (0,72 g/L) και 20 ppt-XL (0,62 g/L), 60 ppt-L (0,54 g/L) και 20 ppt-L (0,45 g/L) και 60 ppt-L (0,54 g/L) - 40 ppt-L (0,72 g/L). Συμπερασματικά για τη μέγιστη παραγωγή σε βιομάζα του *Phormidium* sp. απαιτούνται αλατότητες ανώτερες των 20 ppt και φωτισμός υψηλής έντασης τουλάχιστον 8000 lux.

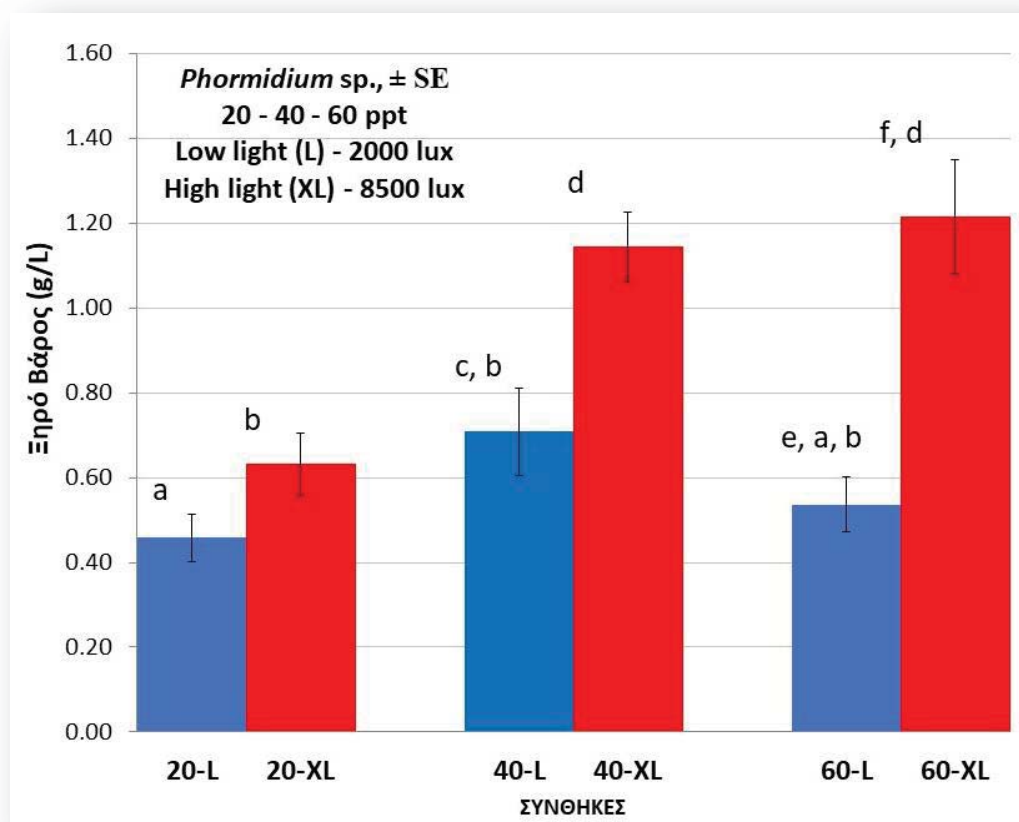
Γενικές παρατηρήσεις

Οι καλλιέργειες του *Phormidium* sp. παρουσιάζουν τον χαρακτηριστικό για τα κυανοβακτήρια κυανο-πράσινο λαμπερό χρωματισμό (Σχήματα 70, 71, 72 και 73) όταν βρίσκονται σε πλήρη ανάπτυξη. Ο χρωματισμός αυτός όμως με την ωρίμανση της καλλιέργειας χάνει σταδιακά το πράσινο χρώμα και αφού γίνει σκούρο πράσινο στις πολύ ώριμες καλλιέργειες αρχίζει να κιτρινίζει, πρώτα και πιο γρήγορα, στον έντονο φωτισμό (Σχήμα 73) και λίγο αργότερα και στον ασθενή. Αυτή η σειρά μεταβολής του χρώματος "κυανοπράσινο - σκούροπράσινο - λαδοπράσινο - λαδοκίτρινο - σκούροκίτρινο", ήταν σταθερή σε όλες τις συνθήκες διαφέροντας μόνο στο χρόνο που παρουσιάζονταν. Προφανώς στο κυανοβακτήριο αυτό στις αρχικές φάσεις ανάπτυξης επικρατεί η παραγωγή φυκοκυανίνης (Σχήμα 74) που δίνει το κυανοπράσινο χρώμα και κατόπιν αυξάνεται η φυκοερυθρίνη εις βάρος της φυκοκυανίνης και επέρχεται το κιτρίνισμα (Σχήμα 76). Στην πλήρη άνθισή τους οι καλλιέργειες αναδίδουν μια απαλή ευχάριστη μυρωδιά χορταριού η οποία διατηρείται συνεχώς.

Το *Phormidium* sp. ως κυανοβακτήριο δεν διαθέτει μαστίγια στα κύτταρά του τα οποία σχηματίζουν μακρά καμπυλωμένα νήματα και ως εκ τούτου δεν είναι κινητικό με τον τρόπο που είναι τα μαστιγοφόρα ευκαρυωτικά φύκη. Όμως τα νημάτιά του παρουσιάζουν μια αργή ολισθητικού τύπου κίνηση η οποία βέβαια δεν μπορεί να του προσδώσει αυτόνομη πλαγκτονική διασπορά στον όγκο του νερού. Οι καλλιέργειές του, ιδιαίτερα αν αφεθούν χωρίς αερισμό, είναι πολύ επιρρεπείς στην καθίζηση σε όλες τις φάσεις της ωρίμανσής του. Τα αποτελέσματα της καλλιέργειάς του υποδεικνύουν προς μία δυναμική ανάπτυξής του σε μεγάλο εύρος αλατοτήτων μεν αλλά με προτίμηση σε αλατότητες ανώτερες των 20 ppt. Οι αποδόσεις του σε βιομάζα σαφώς επηρεάζονται θετικότερα σε υψηλές εντάσεις φωτισμού. Το πλέον αξιοσημείωτο στην καλλιέργεια του *Phormidium* sp. είναι η ιδιότητά του να συσσωρεύει τη μάζα των νημάτων του σε συσσωματώματα όταν αυτά παραμείνουν σε ηρεμία (διακοπή του αερισμού) για σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα (περίπου 1 ώρα). Αυτή του η ιδιότητα είναι υψίστης σημασίας για την παραγωγή μια και ένα μεγάλο μέρος του κόστους στις μονάδες καλλιέργειας μικροφυκών είναι η συλλογή τους. Ετσι λοιπόν αν ένα μικροφύκος όπως το *Phormidium* sp. μπορεί να προσφέρει με φυσικό και ανέξοδο σχετικά τρόπο συσσωρευμένη τη βιομάζα του, η διαχείριση της καλλιέργειάς του αποκομίζει

μεγάλο όφελος, αποφεύγοντας τις ενεργοβόρες τεχνικές της φυγοκέντρησης, φιλτραρίσματος, κ.ά.

Ως προς τη συσσωμάτωση των νηματίων του σε πυκνή μάζα το *Phormidium* sp. παρουσιάζει τις περισσότερες φορές καθίζηση αυτής στον πυθμένα του δοχείου (Σχήματα 75, 77, 78 & 79) οπότε με την κωνική διαμόρφωση του δοχείου η συλλογή διευκολύνεται τα μέγιστα. Ομως μερικές φορές το φυκικό συσσωμάτωμα δεν καθιζάνει αλλά αντίθετα αιωρείται είτε στην επιφάνεια είτε στη στήλη του νερού (Σχήματα 75 & 78). Προφανώς σε αυτή την περίπτωση τα κύτταρα του κυανοβακτηρίου αυτού έχουν αναπτύξει εσωκυτταρικούς πλήθος αεροτοπιών (για άγνωστο λόγο), μια γνωστή ιδιότητα των κυανοβακτηρίων, γεγονός που προσφέρει στη φυκομάζα πλευστότητα. Ενδεχομένως σε αυτό να βοηθά και η σφιχτή συγκόλληση των νηματίων μεταξύ τους, βοηθούμενα από εκκρίσεις βλέννας που συχνά παράγουν τα κυανοβακτήρια. Οπότε με βάση τα παραπάνω ίσως είναι ορθότερο να ομιλούμε στην περίπτωση του *Phormidium* sp. για συγκόλληση-συσσωμάτωση παρά για καθίζηση μόνο.



Σχήμα 69. Απόδοση σε ξηρό βάρος φυκούς (g/L) ± SE του *Phormidium* sp. στις αλατότητες των 20, 40 και 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Η ύπαρξη σημαντικής στατιστικής διαφοράς στο επίπεδο 0,05 υποδεικνύεται με διαφορετικό γράμμα. Οι στατιστικώς ίσες τιμές υποδεικνύονται με την επανάληψη των ανάλογων δεικτών στις στήλες (στατιστική επεξεργασία με ANOVA και κατόπιν σύγκριση κατά ζεύγη με Tukey's test).



Σχήμα 70. Τα δοχεία καλλιέργειας του νηματοειδούς κυανοβακτηρίου *Phormidium* sp. την 1^η ημέρα (έναρξη) με το χαρακτηριστικό ομοιόμορφο ανοικτό πράσινο χρώμα.



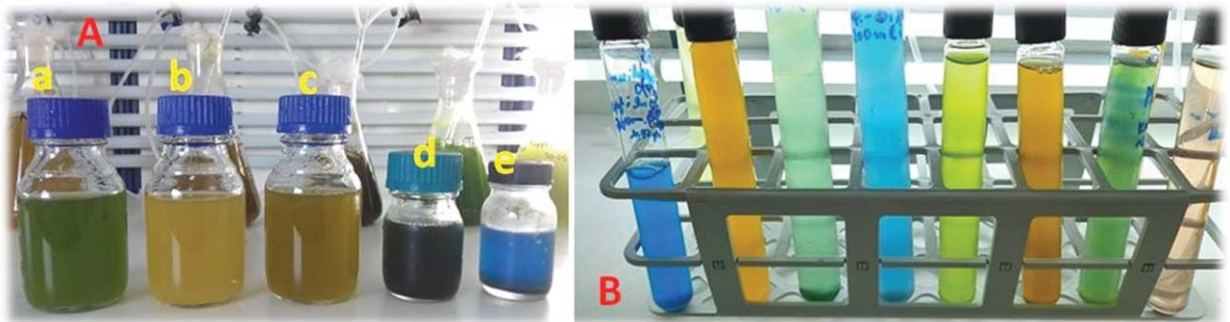
Σχήμα 71. Τα δοχεία καλλιέργειας του νηματοειδούς κυανοβακτηρίου *Phormidium* sp. την 4^η ημέρα με το χαρακτηριστικό ομοιόμορφο λαμπερό πράσινο χρώμα.



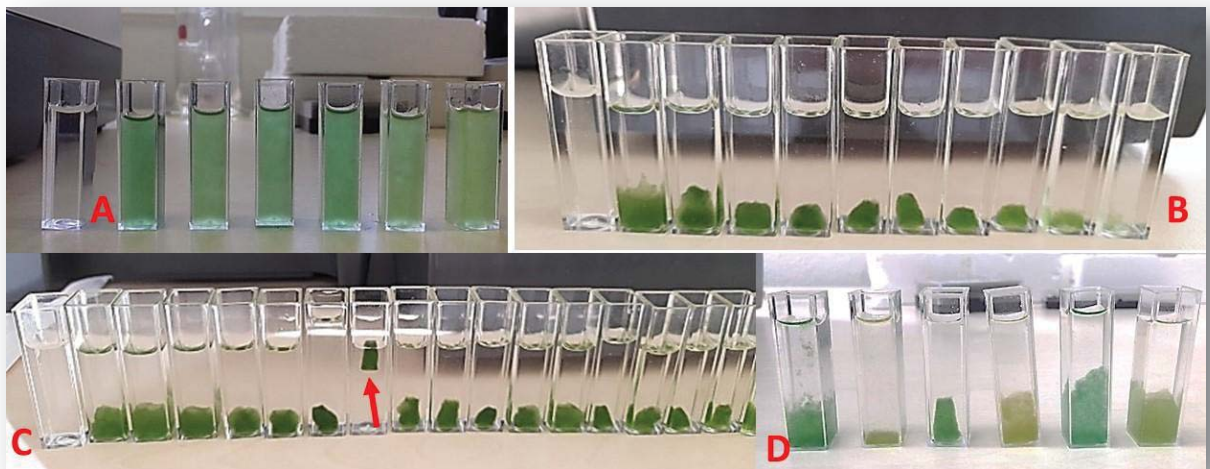
Σχήμα 72. Τα δοχεία καλλιέργειας του νηματοειδούς κυανοβακτηρίου *Phormidium* sp. τη 10^η ημέρα με το χαρακτηριστικό έντονα πράσινο χρώμα σε διαφορετική ένταση ανάλογα με τις συνθήκες.



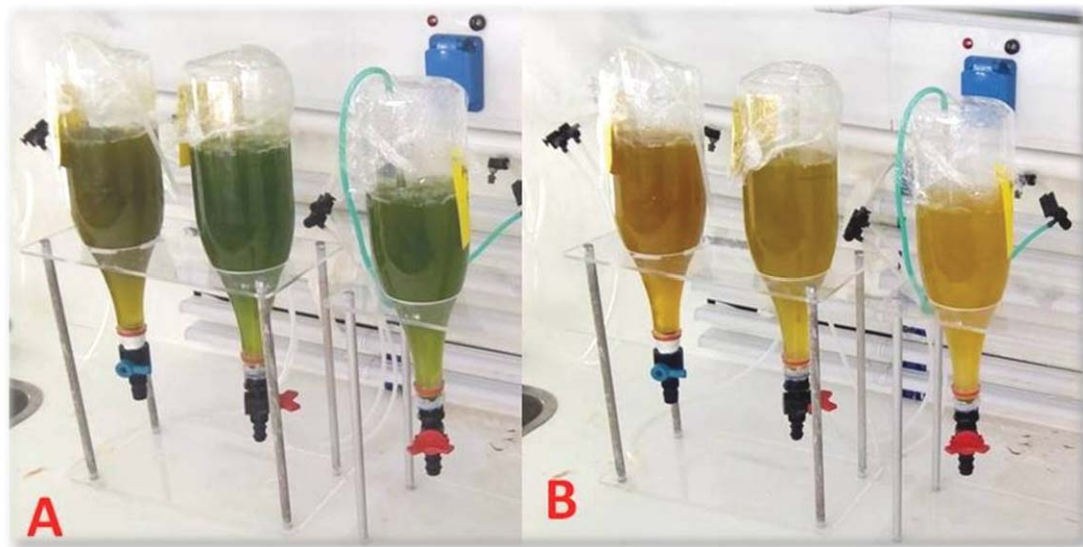
Σχήμα 73. Τα δοχεία καλλιέργειας του νηματοειδούς κυανοβακτηρίου *Phormidium* sp. κατά το τέλος της καλλιέργειας (15^η ημέρα) με το χαρακτηριστικό έντονα πράσινο χρώμα στα δοχεία με το χαμηλό φωτισμό (2000 lux, κάτω) και της επάνω σειράς που έχουν αρχίσει να κιτρινίζουν φωτιζόμενα με ένταση 8000 lux.



Σχήμα 74. Δείγματα από καλλιέργειες *Phormidium* sp.. **A**: a: από καλλιέργεια αρχικής φάσης με πράσινο χρώμα, b: ώριμη καλλιέργεια κίτρινου χρώματος, c: άλλη μία ώριμη καλλιέργεια, d: καλλιέργεια με σκούρο πράσινο χρώμα πριν την κατάψυξη, e: μετά από 24 ώρες στην κατάψυξη η μπλε χρώματος φυκοκυανίνη έχει απελευθερωθεί. **B**: Δείγματα με απελευθερωθείσες χρωστικές, μπλε-φυκοκυανίνη, τουρκουάζ-φυκοκυανίνη σε μικρή αναλογία, κιτρινωπά και κοκκινωπό-επικράτηση φυκοερυθρίνης, τα πράσινα από φρέσκιες καλλιέργειες.



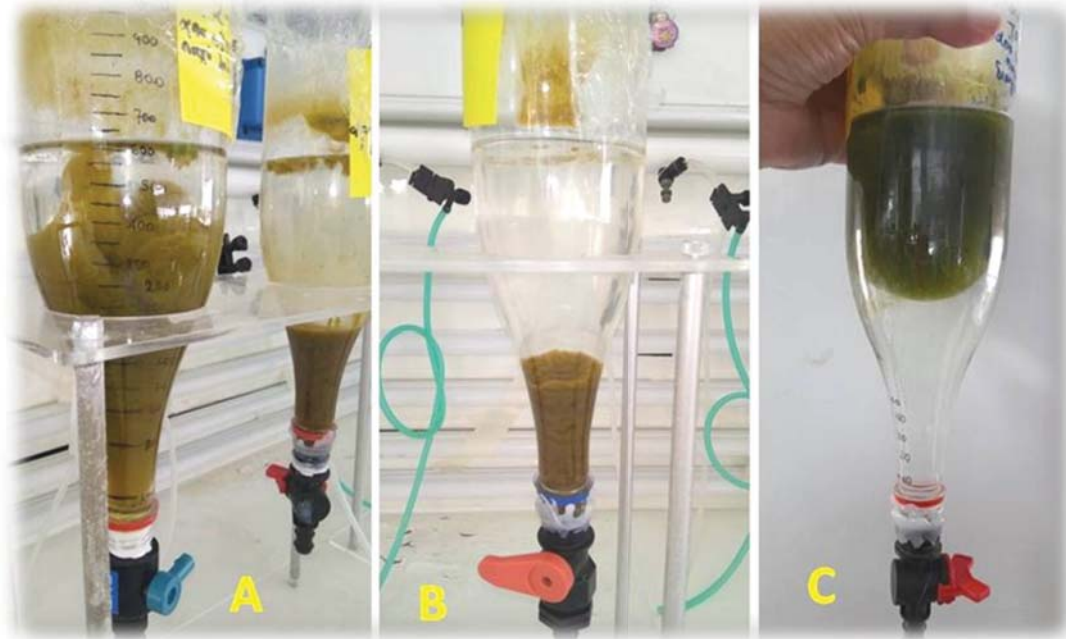
Σχήμα 75. Κυβέτες φασματοφωτόμετρου με προς μέτρηση δειγμάτων καλλιέργειας του *Phormidium* sp.. **A**: το τουρκουάζ χρώμα (λόγω φυκοκυανίνης) των δειγμάτων σε αιώρηση. **B**: Τα δείγματα που έχουν αφεθεί αρκετή ώρα αδιατάρακτα και στα οποία διακρίνεται η μάζα των κυττάρων ως ίζημα. **C**: Άλλα δείγματα που παρουσιάζουν ίζημα αλλά και ένα (κόκκινο βέλος) στο οποίο η μάζα των κυττάρων συμπαγής μεν αλλά επιπλέουσα. **D**: Κυβέτες με ιζήματα από καλλιέργειες *Phormidium* με διαφορετικά χρώματα ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας από τις οποίες προήλθαν.



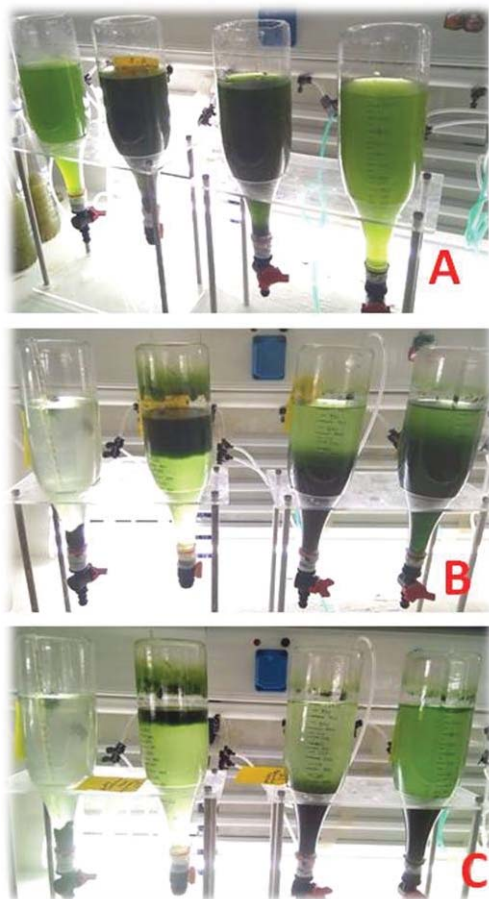
Σχήμα 76. Φωτογραφίες δειγμάτων καλλιέργειας του *Phormidium* sp. με διαφορετικό χρωματισμό. **A**: Πράσινος χρωματισμός από καλλιέργειες με φωτισμό έντασης 2000 lux. **B**: Σκούρο-κίτρινος χρωματισμός από ώριμες καλλιέργειες με έντονο φωτισμό 8000 lux.



Σχήμα 77. Μετά το τέλος της καλλιέργειας του *Phormidium* sp. οι καλλιέργειες στα ποικίλα δοχεία που χρησιμοποιήθηκαν αφέθηκαν χωρίς αερισμό για 3 περίπου ώρες και φαίνονται τα αποτελέσματα της καθίζησης της συσσωματωμένης φυκομάζας των νηματίων του. Χαρακτηριστικό το χρώμα των ιζημάτων και του υπερκείμενου υγρού καθώς προέρχονται από διαφορετικές συνθήκες φωτισμού. Αυτές με το καφε-κίτρινο χρώμα προέρχονται από έντονο φωτισμό (8000 lux), αυτές με το πράσινο από ασθενή (2000 lux).

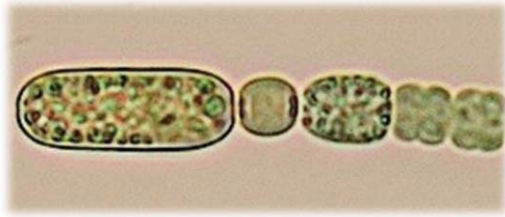


Σχήμα 78. Χαρακτηριστικές φωτογραφίες από τη συσσωμάτωση των νηματίων της φυκομάζας του *Phormidium* sp. σε ηρεμία. Στο **A** από μια ώριμη καλλιέργεια με λαδοκίτρινο χρώμα φαίνεται η πυκνή φυκομάζα να καθιζάνει. Στο **B** η καθίζηση έχει πλήρως ολοκληρωθεί και το υπερκείμενο νερό είναι απόλυτα διαυγές. Στο **C** από μια άλλη καλλιέργεια η συσσωματωμένη φυκομάζα επιπλέει.



Σχήμα 79. Τρεις διαφορετικές χρονικές φάσεις 4 διαφορετικών καλλιεργειών του κυανοβακτηρίου *Phormidium* sp. για να δείχτεί η προοδευτική συσσωμάτωση των νηματίων του σε συμπαγή μάζα που είτε καθιζάνει, είτε επιπλέει. **A**: Αρχή, φαίνονται οι διαφορετικοί χρωματισμοί των 4 φιαλών καθώς προέρχονται από καλλιέργειες διαφορετικού βαθμού ωρίμανσης. **B**: Μετά από 45 λεπτά έχει αρχίσει η συσσωμάτωση της φυκομάζας, στο 2^ο δοχείο από αριστερά η μάζα επιπλέει στα υπόλοιπα καθιζάνει. **C**: Μετά 1,5 ώρα η καθίζηση και η επίπλευση έχουν ολοκληρωθεί. Αξιοπρόσεκτο επίσης και το χρώμα του νερού στις διάφορες φιάλες μετά τη συσσωμάτωση. Στο άκρο αριστερά εντελώς διαυγές, στα υπόλοιπα με πράσινη απόχρωση.

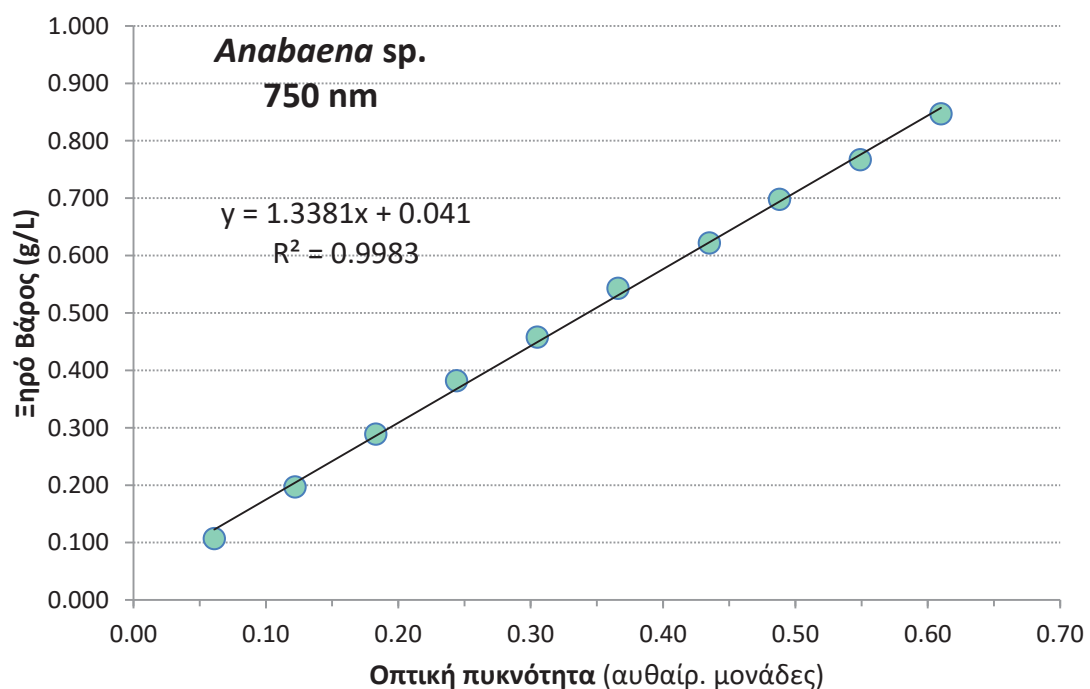
Anabaena sp.



Αύξηση των καλλιεργειών

Το νηματοειδές αζωτοδεσμευτικό κυανοβακτήριο *Anabaena* sp. που απομονώθηκε από τη λιμνοθάλασσα Κοτυχίου του νομού Ηλείας, καλλιεργήθηκε επανειλημμένα στο εργαστήριο "Καλλιέργειας Πλαγκτού" και αποδείχθηκε ανθεκτικό σε ποικίλλες συνθήκες αλατότητας, θερμοκρασίας, φωτός και έλλειψης θρεπτικών. Στη σφριγηλότητά του συμβάλλει προφανώς και η ικανότητά του να δεσμεύει και χρησιμοποιεί ως θρεπτικό (το βασικότερο όλων) το ατμοσφαιρικό άζωτο. Συνεπώς η καλλιέργειά του παρουσιάζει εξ' αιτίας αυτού μεγάλο πλεονέκτημα.

Σε αντίθεση με το *Phormidium* sp., το *Anabaena* sp. δεν καθιζάνει ούτε εύκολα ούτε γρήγορα, τα νημάτιά του τα οποία σημειωτέον δεν παρουσιάζουν ολισθητική κίνηση, παραμένουν σε αιώρηση ακόμα και απουσία αερισμού.



Σχήμα 80. Καμπύλη βαθμονόμησης των καλλιεργειών του νηματοειδούς κυανοβακτηρίου *Anabaena* sp. από πλήθος ζευγών τιμών οπτικής απορρόφησης-πυκνότητας καλλιέργειας.

Το *Anabaena* sp. καλλιεργήθηκε σε 3 αλατότητες 20-40-60 ppt και 2 εντάσεις φωτισμού ανά αλατότητα, έντονος XL-8000 lux και ασθενής L-2000 lux. Για τις καλλιέργειες δημιουργήθηκαν από 2 αντίγραφα για κάθε συνδυασμό αλατότητας-

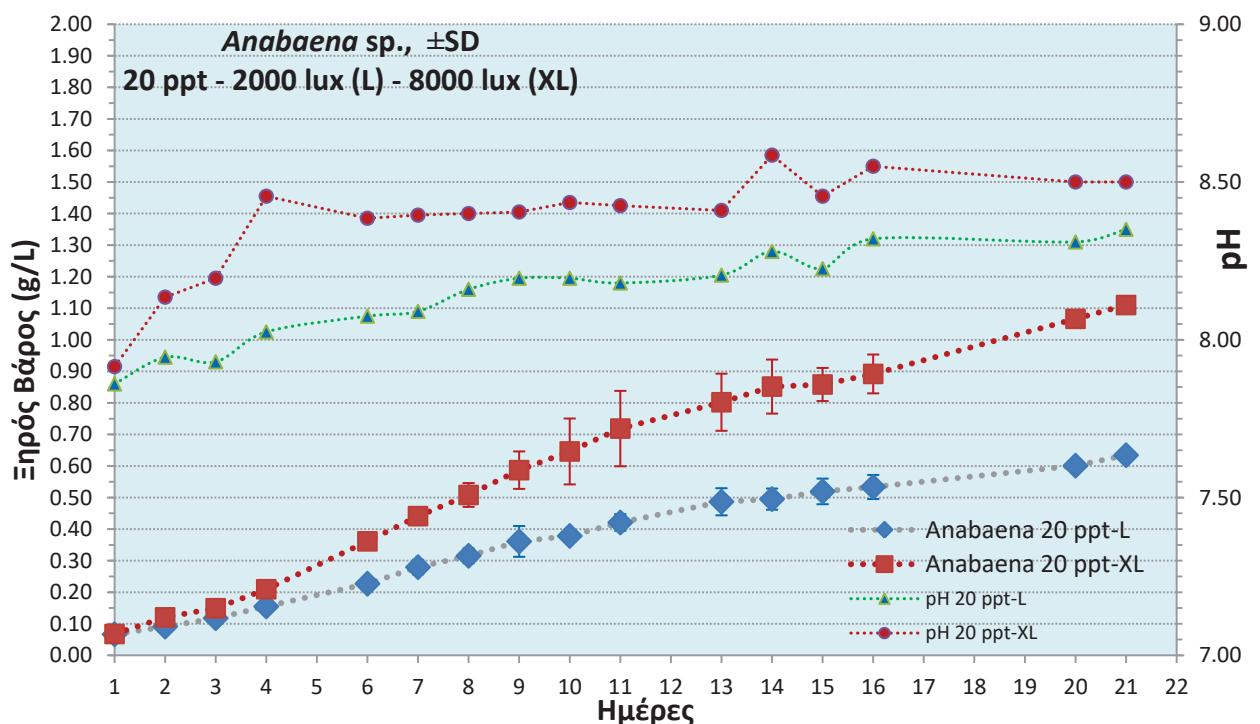
φωτός. Τα δοχεία που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τύπου Erlenmeyer γυάλινα κυλινδρικών 2 L.

Οι καλλιέργειες του *Anabaena* sp. προσαρμόστηκαν σε όλες τις αλατότητες και παρουσίασαν αύξηση (Σχήματα 81, 82 & 83). Οι καταγραφείσες ημερησίως μετρήσεις ως τιμές οπτικής απορρόφησης στα 750 nm που αποδείχθηκε το καλύτερο μήκος κύματος (μεταξύ των δοκιμασθέντων) με συντελεστή Pearson $R^2 = 0,9983$, μεταφράστηκαν σε g ξηρού βάρους/L μέσω της εξίσωσης της καμπύλης βαθμονόμησης (Σχήμα 80) η οποία κατασκευάστηκε τόσο από επεξεργασία δειγμάτων κατάλληλα αραιωμένων όσο και από περιοδικές μετρήσεις των καλλιεργειών με ζύγιση αποξηραμένων δειγμάτων από γνωστό όγκο δείγματος. Η εξίσωση βαθμονόμησης ήταν γραμμικού τύπου:

$$\text{Πυκνότητα} = 1,3381 (\text{O.D.}) + 0,041$$

όπου: Πυκνότητα = g ξηρού βάρους/L, O.D.= τιμές οπτικής απορρόφησης.

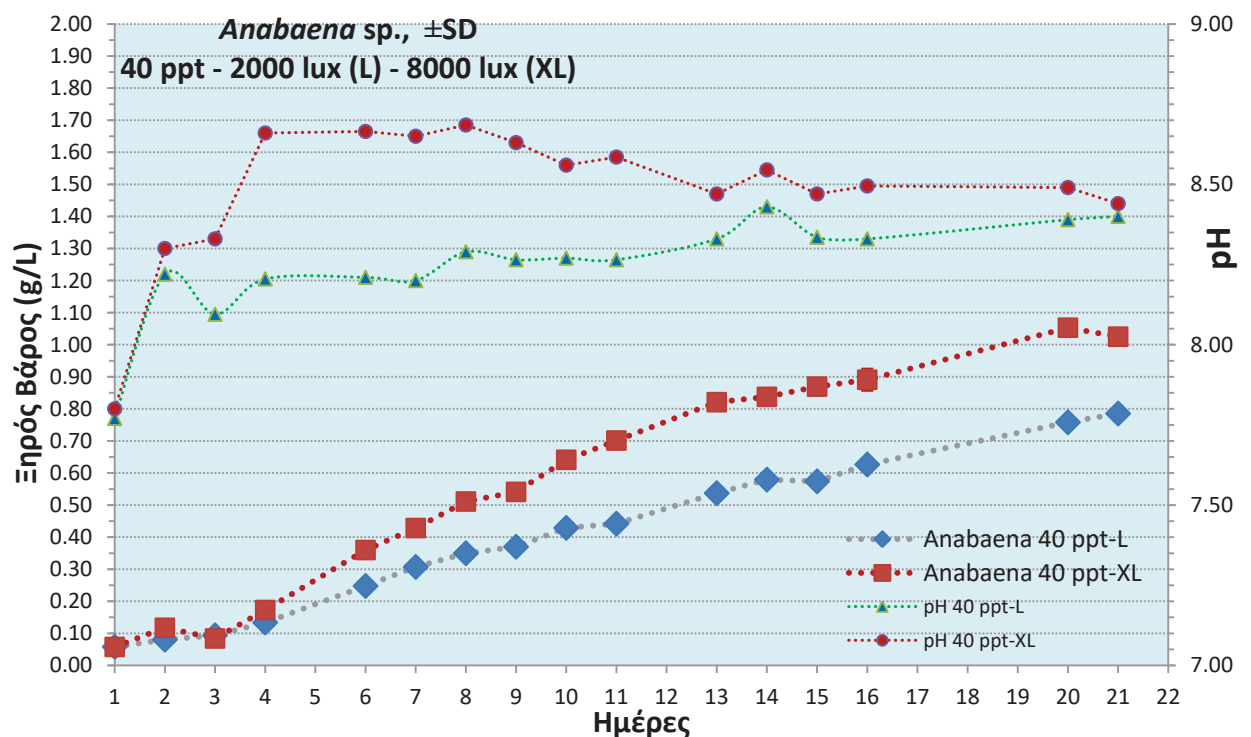
Οι καλλιέργειες διήρκεσαν 21 ημέρες και μετά από μία περίοδο προσαρμογής-καθυστερήσης 2-3 ημερών που καταγράφηκε μόνο στις αλατότητες των 40 και 60 ppt, όλες παρουσίασαν μια παρατεταμένη εκθετική φάση η οποία ήταν εντονότερη στον υψηλής έντασης φωτισμό (8000 lux). Η "είσοδος" στην εκθετική φάση της εκάστοτε καλλιέργειας έγινε με πανομοιότυπο τρόπο στην κάθε συνθήκη.



Σχήμα 81. Η καμπύλη αύξησης (σε g/L) της καλλιέργειας του *Anabaena* sp. στην αλατότητα των 20 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.

Στην αλατότητα των 20 ppt (Σχήμα 81) παρουσιάστηκε μια αξιοσημείωτη ομοιότητα στη μορφή των καμπυλών αύξησης και των 2 συνθηκών φωτός, με αυτή του έντονου φωτός εμφανώς υψηλότερων τιμών από την του ασθενούς. Η εκθετική φάση αύξησης άρχισε άμεσα από τη 2^η ημέρα και από τη 13^η άρχισε μια ελαφρά πτώση της ανόδου μεν αλλά όχι σε μορφή επιπεδοποίησης που θα αντιπροσώπευε μια εμφανή φάση στασιμότητας. Την 21^η ημέρα στον έντονο φωτισμό καταγράφηκε μάζα 1,10 g/L ενώ στον ασθενή 0,62 g/L.

Το pH ξεκίνησε με τιμές γύρω στο 7,9 και στους δύο φωτισμούς και κατόπιν αυξήθηκε πολύ περισσότερο στον υψηλό φωτισμό με τιμές γύρω στο 8,5 για να διατηρηθεί μέχρι τέλους σε αυτό το επίπεδο, ενώ στον ασθενή διατηρήθηκε σε τιμές 8,2-8,3 καθ' όλη τη διάρκεια. Προφανώς οι υψηλότερες τιμές του pH στον έντονο φωτισμό είναι ενδεικτικές της εντονότερης φωτοσύνθεσης. Και στην περίπτωση του *Anabaena* όπως και στο *Phormidium* επιβεβαιώνεται ότι οι υψηλές τιμές του pH τόσο σε αυτή όσο και στις άλλες αλατότητες είναι και χαρακτηριστικές της προτίμησης των κυανοβακτηρίων γενικά για υψηλό pH.

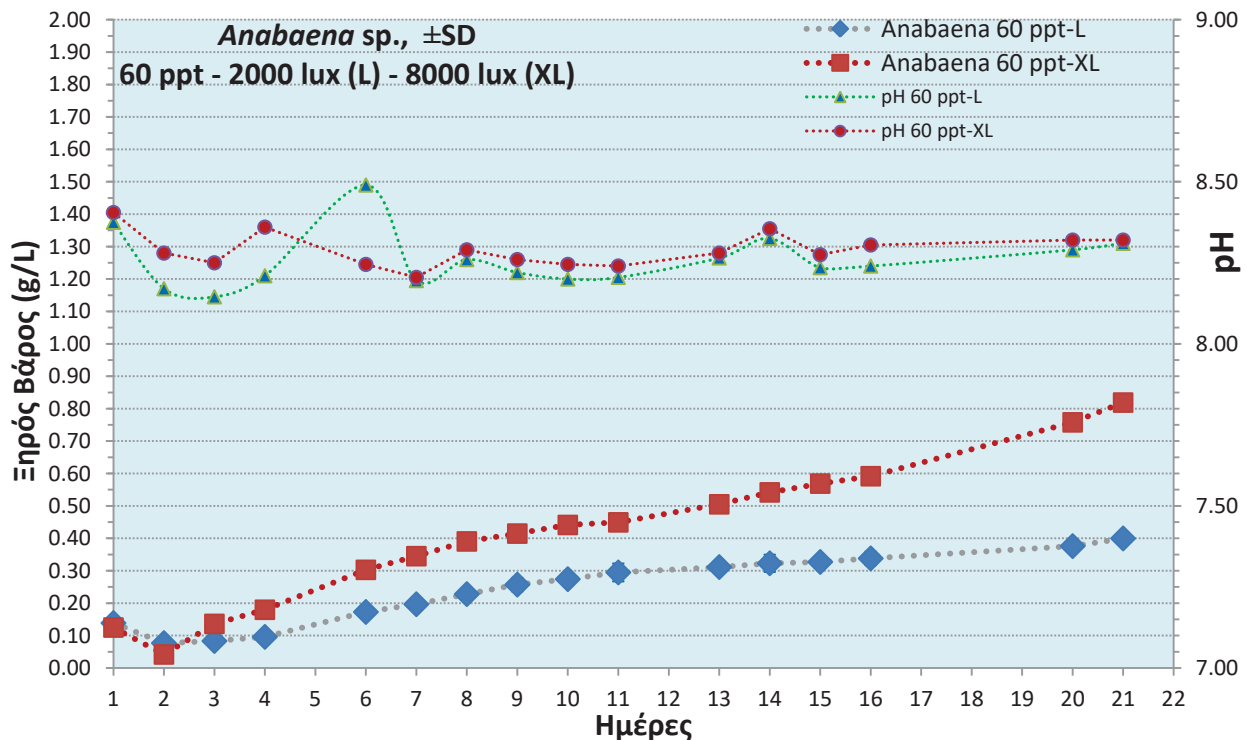


Σχήμα 82. Η καμπύλη αύξησης (σε g/L) της καλλιέργειας του *Anabaena* sp. στην αλατότητα των 40 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.

Στην αλατότητα των 40 ppt (Σχήμα 82) παρουσιάστηκε επίσης μια αξιοσημείωτη ομοιότητα στη μορφή των καμπυλών αύξησης και των 2 συνθηκών φωτός, με αυτή του έντονου φωτός εμφανώς υψηλότερων τιμών από την του ασθενούς. Η εκθετική φάση αύξησης άρχισε από την 3^η ημέρα και από τη 13^η άρχισε μια ελαφρά πτώση της ανόδου μεν αλλά όχι σε μορφή επιπεδοποίησης που

θα αντιπροσώπευε μια εμφανή φάση στασιμότητας. Την 21^η ημέρα στον έντονο φωτισμό καταγράφηκε μάζα 1,00 g/L ενώ στον ασθενή 0,79 g/L.

Το pH ξεκίνησε με τιμές γύρω στο 7,9 και στους δύο φωτισμούς και κατόπιν αυξήθηκε πολύ περισσότερο στον υψηλό φωτισμό με τιμές γύρω στο 8,7 για να πέσει στο 8,5 τη 13^η ημέρα και διατηρηθεί μέχρι τέλους σε αυτό το επίπεδο, ενώ στον ασθενή διατηρήθηκε σε τιμές 8,2-8,3 καθ' όλη τη διάρκεια. Και σε αυτή την αλατότητα προφανώς οι υψηλότερες τιμές του pH στον έντονο φωτισμό είναι ενδεικτικές της εντονότερης φωτοσύνθεσης.



Σχήμα 83. Η καμπύλη αύξησης (σε g/L) της καλλιέργειας του *Anabaena* sp. στην αλατότητα των 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.

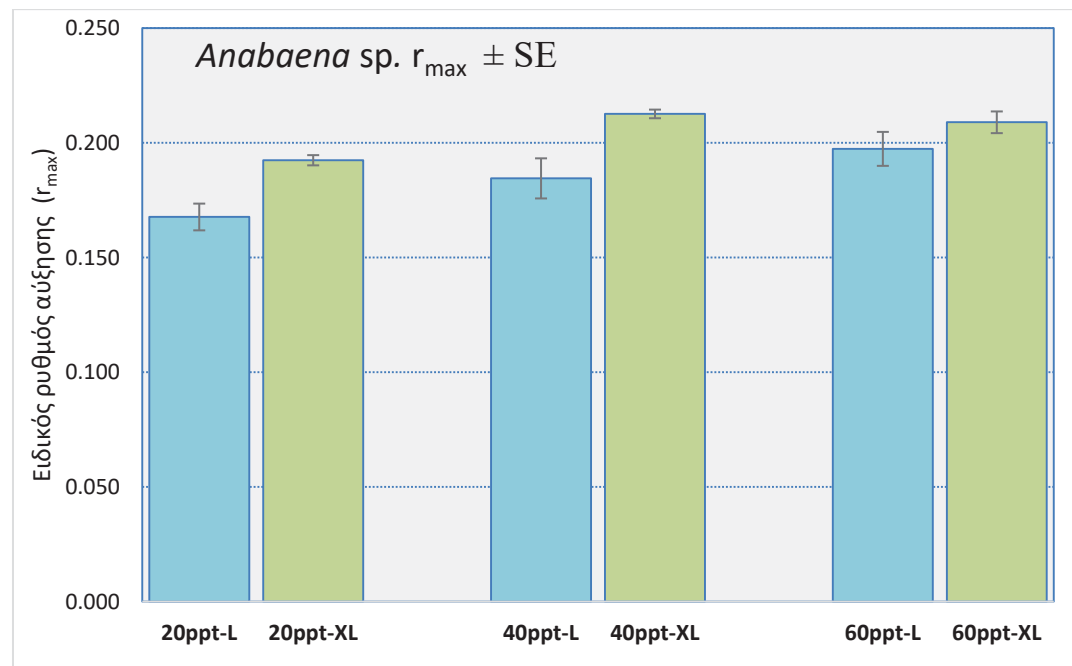
Στην αλατότητα των 60 ppt (Σχήμα 83) παρουσιάστηκε επίσης μια αξιοσημείωτη ομοιότητα στη μορφή των καμπυλών αύξησης και των 2 συνθηκών φωτός, με αυτή του έντονου φωτός εμφανώς υψηλότερων τιμών από την του ασθενούς. Η εκθετική φάση αύξησης άρχισε άμεσα από την 3^η ημέρα και στον έντονο φωτισμό δεν έδειξε σημείο καμψής ή πτώσης μέχρι τέλους, ενώ στον ασθενή από την 11^η ημέρα άρχισε μια επιπεδοποίηση η οποία ξαναέγινε ελαφρά ύψωση από τη 16^η ημέρα. Την 21^η ημέρα στον έντονο φωτισμό καταγράφηκε μάζα 0,82 g/L ενώ στον ασθενή 0,40 g/L.

Το pH στην αλατότητα αυτή παρουσίασε μια σχεδόν απόλυτη ταύτιση των τιμών και στους δύο φωτισμούς διατηρούμενο συνεχώς σε τιμές περί το 8,3.

Το τάχος της αύξησης ως ειδικός ρυθμός αύξησης (r_{max}) και ο χρόνος διπλασιασμού ή γενεάς (t_g) αποτυπώνονται στο Σχήμα και αναλυτικότερα στον

Πίνακα 7. Ως διάστημα υπολογισμών τέθηκαν οι 5 ημέρες μεταξύ της 4^{ης} όπου άρχισε η εκθετική φάση σε όλες τις συνθήκες και της 9^{ης} όπου επίσης σε όλες η καμπύλη διατηρήθηκε ανοδική. Από την εξέταση του Σχήματος 84 και του Πίνακα 7, προκύπτει μια μάλλον ομοιόμορφη κατάσταση στην αύξηση σε όλες τις αλατότητες με τιμές ελαφρώς υψηλότερες στον υψηλό φωτισμό. Γενικώς οι στατιστικώς ίσες μεταξύ τους τιμές των 60 ppt-XL και 40 ppt-XL (0,209 και 0,213 αντίστοιχα) ήταν οι υψηλότερες, όμως στα 60 ppt-XL και 60 ppt-L οι τιμές (0,209 - 0,197 αντίστοιχα) ήταν στατιστικώς ίσες.

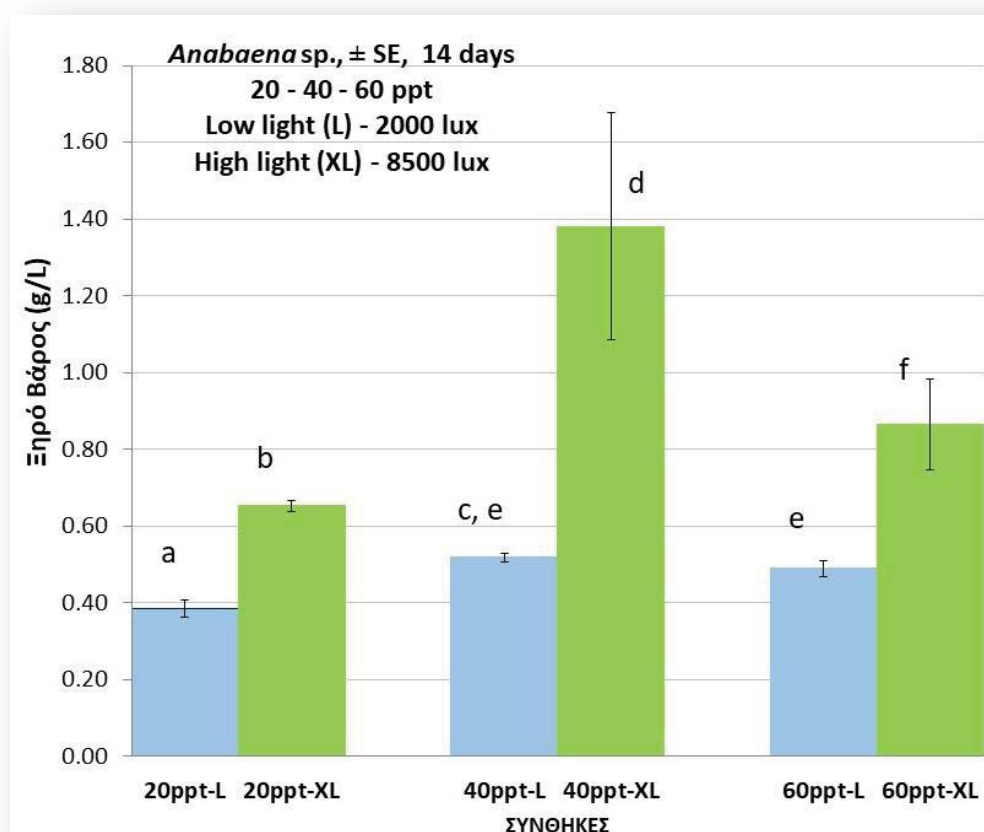
Ως απόρροια των παραπάνω ρυθμών αύξησης και οι χρόνοι γενεάς (t_g) ήταν παρόμοιοι σε όλες τις συνθήκες κυμαινόμενοι από 3,37 έως 4,21 ημέρες. Γενικώς το κυανοβακτήριο *Anabaena* sp. παρουσίασε χαμηλό τάχος αύξησης και χαμηλό διπλασιασμό σε όλες τις αλατότητες όμως αυτό συνδυάστηκε με μια αξιοπρόσεκτη συνεχή αύξηση σε όλες τις συνθήκες.



Σχήμα 84. Οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης (r_{max}) ± SE των καλλιεργειών του *Anabaena* sp. στις αλατότητες των 20, 40 και 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux).

Πίνακας 7. Συγκενρωτικά στοιχεία των ειδικών ρυθμών αύξησης (r_{max}) και του χρόνου γενεάς ή διπλασιασμού (t_g) των καλλιεργειών του *Anabaena* sp. στις αλατότητες των 20, 40 και 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Οι διαφορετικοί παρατιθέμενοι εκθέτες σημαίνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά στο επίπεδο 0,05 (στατιστική επεξεργασία με ANOVA και κατόπιν σύγκριση κατά ζεύγη με Tukey's test). Οπου υπάρχει και δεύτερος εκθέτης σημαίνει στατιστικώς ίση τιμή με την συνθήκη του αντίστοιχου γράμματος.

Συνθήκες	20ppt-L	20ppt-XL	40ppt-L	40ppt-XL	60ppt-L	60ppt-XL
r_{max}	0,168 ^a	0,192 ^b	0,185 ^{c,b,e}	0,213 ^{d,f}	0,197 ^{e,c,f}	0,209 ^f
SE	0,006	0,003	0,007	0,009	0,004	0,001
Διάστημα (ημέρες)	4 ⁿ -9 ⁿ	4 ⁿ -9 ⁿ	4 ⁿ -9 ⁿ	4 ⁿ -9 ⁿ	4 ⁿ -9 ⁿ	4 ⁿ -9 ⁿ
n	18	18	18	18	18	18
t_g (24ωρα)	4,212	3,371	3,416	3,052	3,534	4,148
SE	0,143	0,031	0,065	0,065	0,071	0,031
n	18	18	18	18	18	18



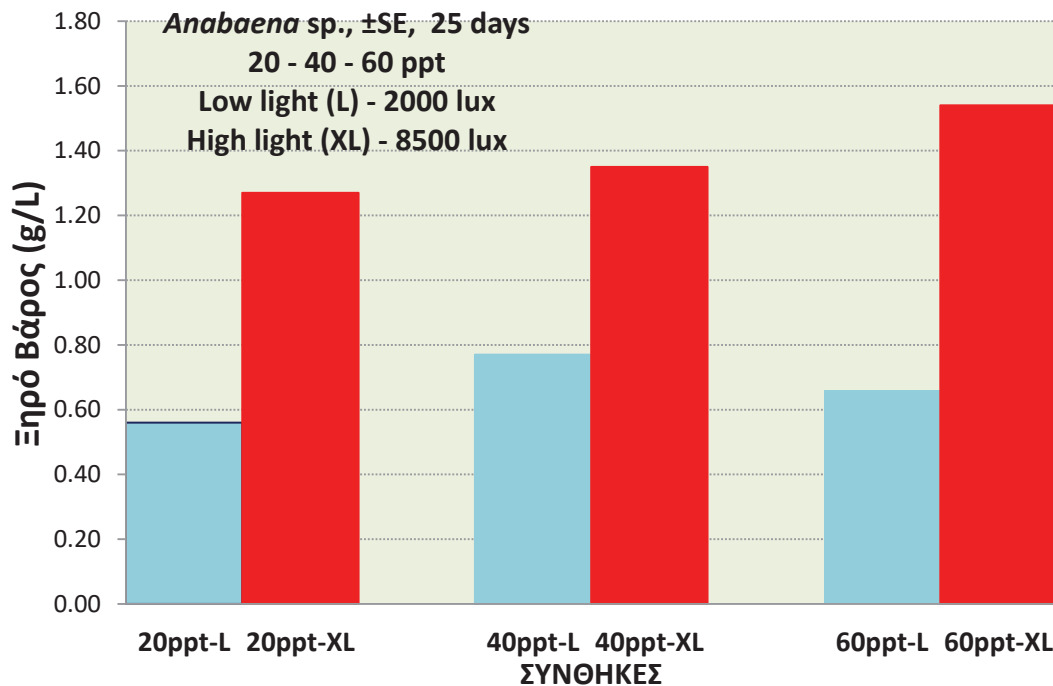
Σχήμα 85. Απόδοση σε ξηρό βάρος φυκούς (g/L) ± SE του *Anabaena* sp. τη 14^η ημέρα της καλλιέργειας στις αλατότητες των 20, 40 και 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Η ύπαρξη σημαντικώς στατιστικής διαφοράς στο επίπεδο 0,05 υποδεικνύεται με διαφορετικό γράμμα. Οι στατιστικώς ίσες τιμές υποδεικνύονται με την επανάληψη των ανάλογων δεικτών στις στήλες (στατιστική επεξεργασία με ANOVA και κατόπιν σύγκριση κατά ζεύγη με Tukey's test).

Απόδοση των καλλιεργειών

Για την απόδοση των καλλιεργειών του *Anabaena* sp. σε βιομάζα ως ξηρό βάρος ανά λίτρο καλλιέργειας (g/L), υπολογίστηκαν τιμές δύο φορές, η πρώτη τη 14^η ημέρα (Σχήμα 85) και η δεύτερη την 25^η ημέρα (Σχήμα 86), 4 ημέρες δηλαδή αργότερα από τότε που σταμάτησε η καταγραφή της πυκνότητάς του (21^η ημέρα). Αυτό έγινε για να διερευνηθεί αν υπάρχουν διαφοροποιήσεις στην απόδοση μεταξύ καλλιεργειών στην κορύφωση της εκθετικής φάσης και στη φάση της ωριμότητας.

Πράγματι διαπιστώθηκαν έντονες διαφορές. Στην περίπτωση της απόδοσης στην εκθετική φάση (Σχήμα 85) παρουσιάστηκε μια πολύ υψηλότερη όλων (και στατιστικώς διαφορετική) τιμή στον έντονο φωτισμό στα 40 ppt (40 ppt-XL, 8000 lux) με τιμή 1,39 g/L η οποία ήταν και πολύ μεγαλύτερη από την τιμή στην ίδια αλατότητα για το χαμηλό φωτισμό (0,53 g/L). Επόμενη μεγαλύτερη τιμή παρουσιάστηκε στη συνθήκη 60 ppt-XL (8000 lux) με τιμή 0,87 g/L και ακολούθως στη συνθήκη 20 ppt-XL (8000 lux) με τιμή 0,65 g/L. Σε όλες τις αλατότητες στο χαμηλό φωτισμό παρουσιάστηκε μια ομοιομορφία στην απόδοση που κυμάνθηκε σε επίπεδα 0,4 - 0,53 g/L πολύ χαμηλότερα από τα αντίστοιχα του υψηλού φωτισμού.

Η κατάσταση όμως διαφοροποιήθηκε έντονα όταν υπολογίστηκαν οι αποδόσεις στις ώριμες καλλιέργειες (Σχήμα 86), όπου και πάλι μεν οι τιμές ήταν έντονα υψηλότερες στον έντονο φωτισμό συγκριτικά με τον ασθενή σε όλες τις αλατότητες, όμως τώρα οι τιμές παρουσίασαν μικρότερες διαφορές μεταξύ των ανά συνθήκη φωτισμού συγκριτικά με τη 14^η ημέρα (Σχήμα ...). Έτσι οι αποδόσεις για τις συνθήκες 60 ppt-XL, 40 ppt-XL και 20 ppt-XL ήταν: 1,53 - 1,37 - 1,28 g/L αντίστοιχα, ενώ στις 60 ppt-L, 40 ppt-L και 20 ppt-L ήταν: 0,65 - 0,77 - 0,58 g/L αντίστοιχα. Αξιοσημείωτο σε όλες τις αλατότητες η πολύ μεγαλύτερη παραγωγή στις συνθήκες του έντονου φωτός (8000 lux) συγκριτικά με τις αντίστοιχές τους στον ασθενέστερο φωτισμό (2000 lux). Την πλέον υψηλή παραγωγή (1,22 g/L) έδωσε η συνθήκη 60 ppt-XL, στατιστικώς ίση με αυτή της 40 ppt-XL (1,18 g/L), σχεδόν διπλάσια της αντίστοιχης συνθήκης 20 ppt-XL (0,62 g/L). Αντίθετα με την περίπτωση του έντονου φωτισμού, στον ασθενή φωτισμό σε όλες τις αλατότητες οι τιμές ήταν πολύ χαμηλότερες και στατιστικώς διαφορετικές με αυτές του έντονου φωτισμού. Όμως από στατιστική άποψη οι τιμές στον ασθενή φωτισμό παρουσίασαν ισότητα στις περιπτώσεις των ζευγών 40 ppt-L (0,72 g/L) και 20 ppt-XL (0,62 g/L), 60 ppt-L (0,54 g/L) και 20 ppt-L (0,45 g/L) και 60 ppt-L (0,54 g/L) - 40 ppt-L (0,72 g/L).



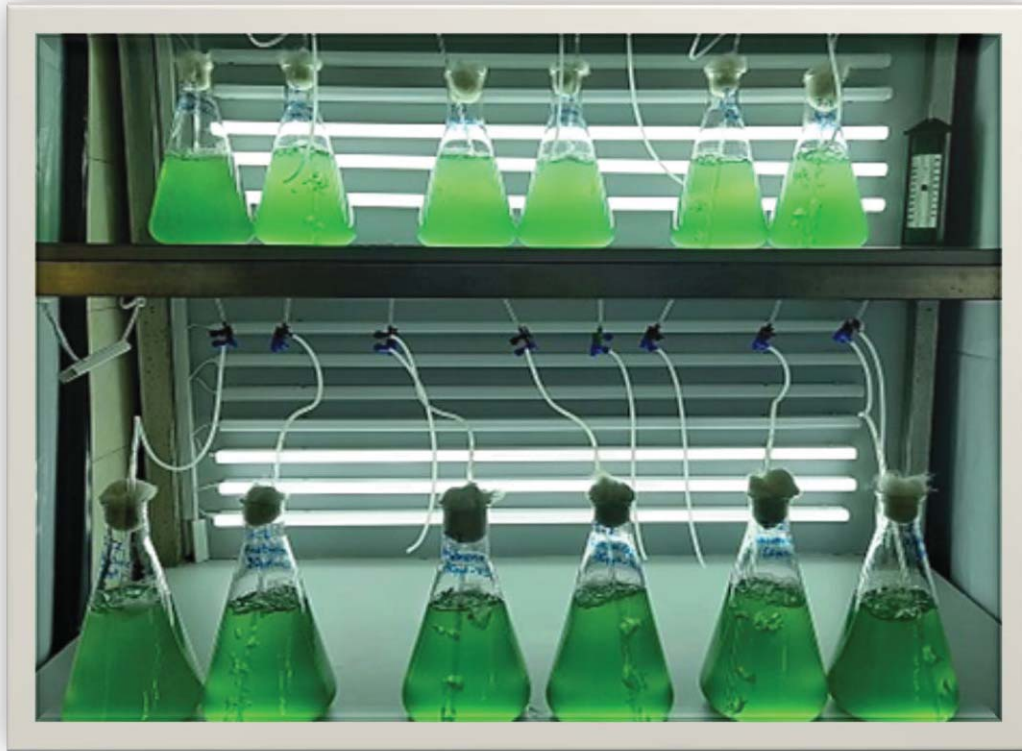
Σχήμα 86. Απόδοση σε ξηρό βάρος φυκούς (g/L) \pm SE του *Anabaena* sp. την 25^η ημέρα της καλλιέργειας στις αλατότητες των 20, 40 και 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Η ύπαρξη σημαντικώς στατιστικής διαφοράς στο επίπεδο 0,05 υποδεικνύεται με διαφορετικό γράμμα. Οι στατιστικώς ίσες τιμές υποδεικνύονται με την επανάληψη των ανάλογων δεικτών στις στήλες (στατιστική επεξεργασία με ANOVA και κατόπιν σύγκριση κατά ζεύγη με Tukey's test).

Γενικές παρατηρήσεις

Οι καλλιέργειες του *Anabaena* sp. παρουσιάζουν το χαρακτηριστικό για τα κυανοβακτήρια κυανο-πράσινο λαμπερό χρωματισμό (Σχήματα 87 και 88) όταν βρίσκονται σε πλήρη ανάπτυξη. Ο χρωματισμός αυτός όμως και σε αντίθεση με το άλλο νηματοειδές κυανοβακτήριο *Phormidium* sp., δεν μεταβάλλεται δραματικά με την ωρίμανση της καλλιέργειας (κιτρίνισμα) παρά μόνο παρουσιάζει διαφορετικές αποχρώσεις του πράσινου ανάλογα με την έκθεση σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού (Σχήμα 89). Στην πλήρη άνθισή τους οι καλλιέργειες αναδίδουν μια απαλή ευχάριστη μυρωδιά χορταριού η οποία διατηρείται συνεχώς.

Το *Anabaena* sp. ως κυανοβακτήριο δεν διαθέτει μαστίγια στα κύτταρά του τα οποία σχηματίζουν μακρά ευθύγραμμα νήματα (κατά πολύ όμως κοντύτερα από αυτά του *Phormidium* sp.) και ως εκ τούτου δεν είναι κινητικό με τον τρόπο που είναι τα μαστιγοφόρα ευκαρυωτικά φύκη. Τα νημάτιά του δεν παρουσιάζουν ολισθητικού τύπου κίνηση παρόλα αυτά όμως παραμένει σε αιώρηση στον όγκο του νερού. Οι καλλιέργειές του χωρίς αερισμό δεν είναι επιρρεπείς στην καθίζηση σε όλες τις φάσεις της ωρίμανσής του.

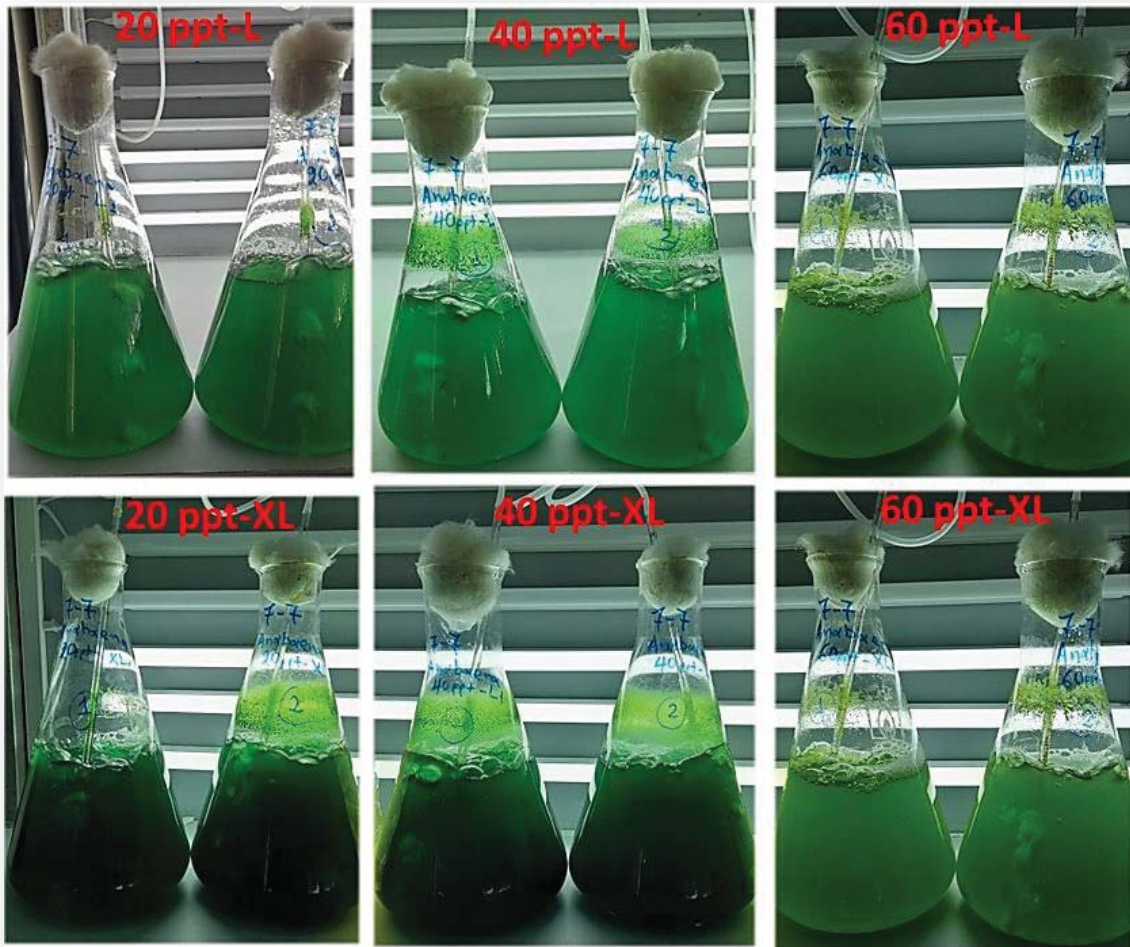
Τα αποτελέσματα της καλλιέργειάς του υποδεικνύουν προς μία δυναμική ανάπτυξής του σε μεγάλο εύρος αλατοτήτων μεν αλλά με προτίμηση σε αλατότητες ανώτερες των 20 ppt. Οι αποδόσεις του σε βιομάζα σαφώς επηρεάζονται θετικότερα σε υψηλές εντάσεις φωτισμού.



Σχήμα 87. Οι καλλιέργειες του *Anabaena* sp. στις διάφορες συνθήκες (άνω ράφι έντονος φωτισμός 8000 lux, κάτω ράφι ασθενής 2000 lux) την 4^η ημέρα της καλλιέργειας. Το πράσινο χρώμα έχει μια ελαφρά κυανή απόχρωση λόγω της φυκοκυανίνης.

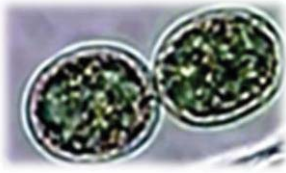


Σχήμα 88. Οι καλλιέργειες του *Anabaena* sp. στις διάφορες συνθήκες (άνω ράφι έντονος φωτισμός 8000 lux, κάτω ράφι ασθενής 2000 lux) τη 13^η ημέρα της καλλιέργειας. Το πράσινο χρώμα έχει σκουρύνει και ήδη κάποιες διαφορές στην απόχρωσή του ανάλογα με το φωτισμό έχουν αρχίσει να διακρίνονται.



Σχήμα 89. Σύγκριση της απόχρωσης του πράσινου χρώματος στις καλλιέργειες του *Anabaena* sp. τη 17^η ημέρα ανάλογα με την ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux) στις διάφορες αλατότητες που χρησιμοποιήθηκαν (20-40-60 ppt). Στις αλατότητες των 20 & 40 ppt το πράσινο είναι πιο βαθύ (πυκνό) στον έντονο φωτισμό συγκριτικά με τον ασθενή. Αντίθετα στα 60 ppt και στους δύο φωτισμούς η απόχρωση είναι παρόμοια.

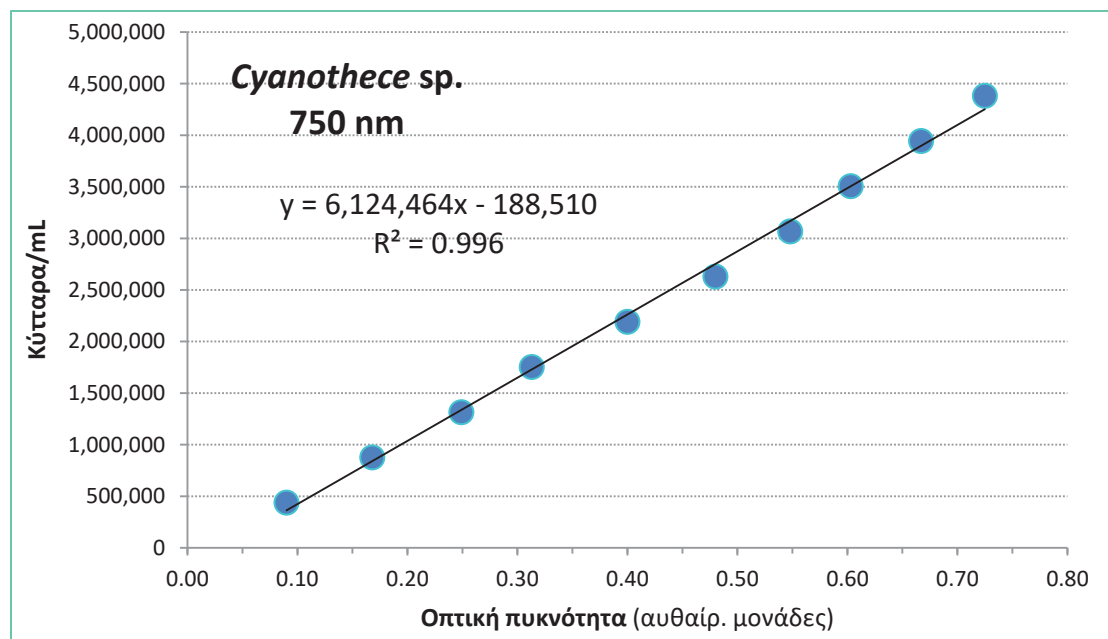
Cyanothece sp.



Αύξηση των καλλιεργειών

Το κοκκοειδές μη-αζωτοδεσμευτικό κυανοβακτήριο *Cyanothece* sp. που απομονώθηκε από τις αλυκές της λιμνοθάλασσα Μεσολογγίου καλλιεργήθηκε επανειλημμένα στο εργαστήριο "Καλλιέργειας Πλαγκτού" και αποδείχθηκε ανθεκτικό σε ποικίλλες συνθήκες αλατότητας, θερμοκρασίας, φωτός και έλλειψης θρεπτικών.

Σε αντίθεση με τα νηματοειδή κυανοβακτήρια *Phormidium* sp. και *Anabaena* sp., το *Cyanothece* sp. δεν καθιζάνει ποτέ και τα κύτταρά του τα οποία δεν κινούνται αυτόνομα (απουσία μαστιγίων), παραμένουν σε αιώρηση ακόμα και απουσία αερισμού.



Σχήμα 90. Καμπύλη βαθμονόμησης των καλλιεργειών του νηματοειδούς κυανοβακτηρίου *Cyanothece* sp. από πλήθος ζευγών τιμών οπτικής απορρόφησης-πυκνότητας καλλιέργειας.

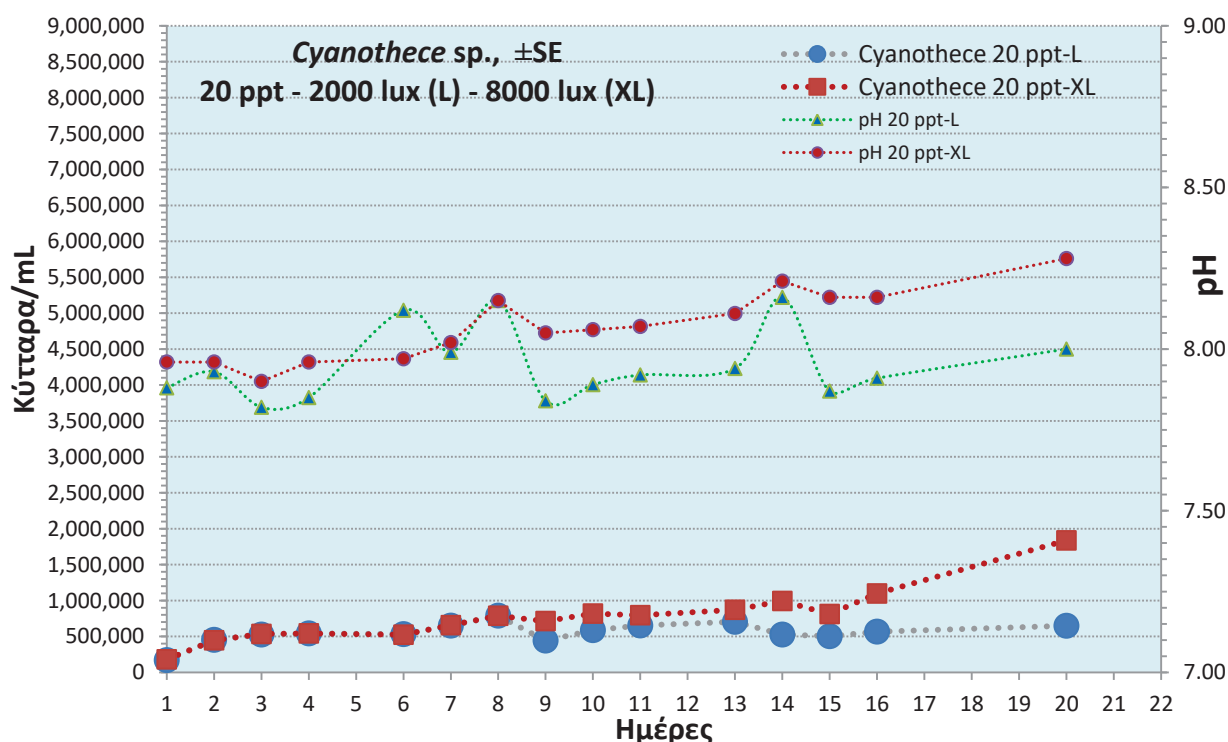
Το *Cyanothece* sp. καλλιεργήθηκε σε 3 αλατότητες 20-40-60 ppt και 2 εντάσεις φωτισμού ανά αλατότητα, έντονος XL-8000 lux και ασθενής L-2000 lux. Για τις καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν από 1 κυλινδρικό πλαστικό δοχείο 1-L για κάθε συνδυασμό αλατότητας-φωτός. Οι καλλιέργειες του *Cyanothece* sp. προσαρμόστηκαν σε ποικίλο βαθμό στις διαφορετικές αλατότητες και παρουσίασαν έντονη διαφοροποίηση μεταξύ αυτών (Σχήματα 91, 92 & 93). Οι καταγραφείσες ημερησίως μετρήσεις ως τιμές οπτικής απορρόφησης στα 750 nm που αποδείχθηκε

το καλύτερο μήκος κύματος (μεταξύ των δοκιμασθέντων) με συντελεστή Pearson $R^2 = 0,996$, μεταφράστηκαν σε κύτταρα/mL μέσω της εξίσωσης της καμπύλης βαθμονόμησης (Σχήμα 90), η οποία κατασκευάστηκε από επεξεργασία δειγμάτων κατάλληλα αραιωμένων. Η εξίσωση βαθμονόμησης ήταν γραμμικού τύπου:

$$\text{Πυκνότητα} = 6.124.464 (\text{O.D.}) - 188.510$$

όπου: Πυκνότητα = κύτταρα/mL, O.D.= τιμές οπτικής απορρόφησης.

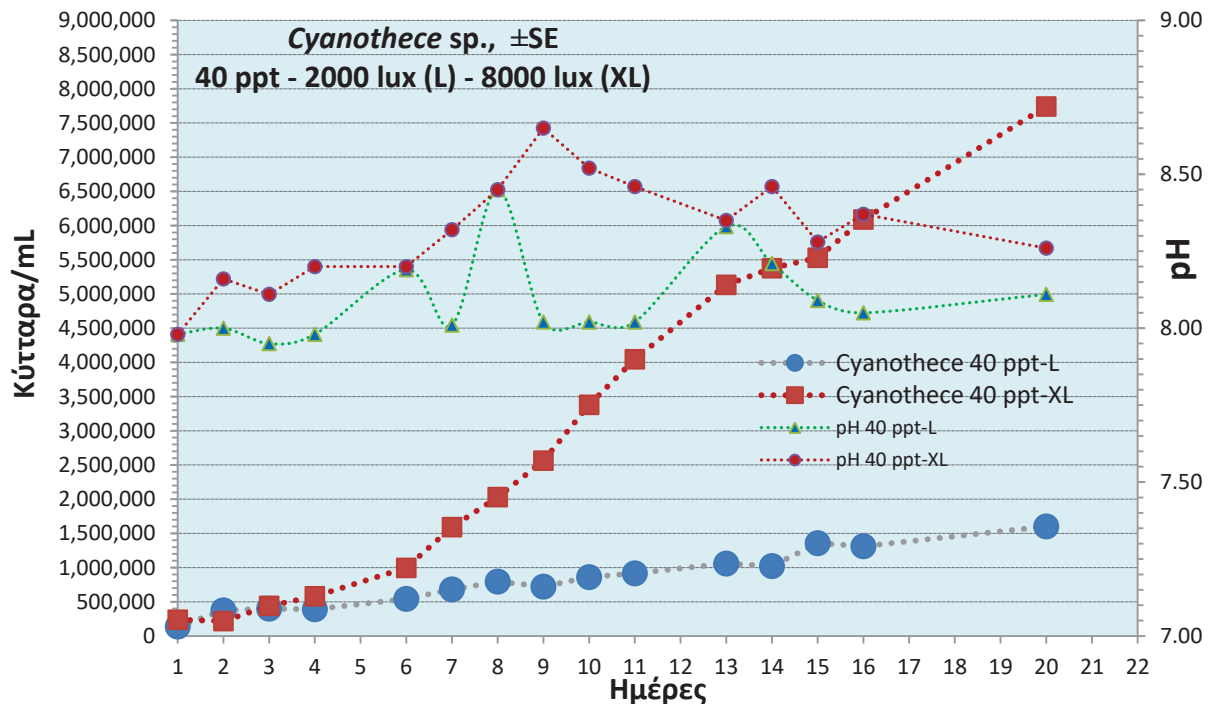
Οι καλλιέργειες διήρκεσαν 20 ημέρες και μετά από μια περίοδο προσαρμογής-καθυστέρησης 4 ημερών που καταγράφηκε στις αλατότητες των 40 και 60 ppt, παρουσίασαν μια παρατεταμένη εκθετική φάση η οποία ήταν εντονότερη στον υψηλής έντασης φωτισμό (8000 lux). Η "είσοδος" στην εκθετική φάση της εκάστοτε καλλιέργειας έγινε με πανομοιότυπο τρόπο στις δύο παραπάνω συνθήκες. Στην αλατότητα των 20 ppt η αρχική φάση καθυστέρησης πρακτικά διήρκεσε 16 ημέρες, δείγμα της μη προτίμησης αυτού του κυανοβακτηρίου για χαμηλές αλατότητες. Σε αυτή τη χαμηλή αλατότητα (Σχήμα 91), οι τιμές της καμπύλης ήταν ελαφρά υψηλότερες στον έντονο φωτισμό επιτυγχάνοντας πυκνότητα περί τα 1.700.000 κύτ./mL την 20^η ημέρα ενώ η αντίστοιχη πυκνότητα για τον ασθενή φωτισμό ήταν μόλις 600.000 κύτ./mL. Το pH στην αλατότητα των 20 ppt κυμάνθηκε στο ~7,9 - 8,3 με τιμές υψηλότερες στον έντονο φωτισμό.



Σχήμα 91. Η καμπύλη αύξησης (σε κύτταρα/mL) της καλλιέργειας του κυανοβακτηρίου *Cyanothecce* sp. στην αλατότητα των 20 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.

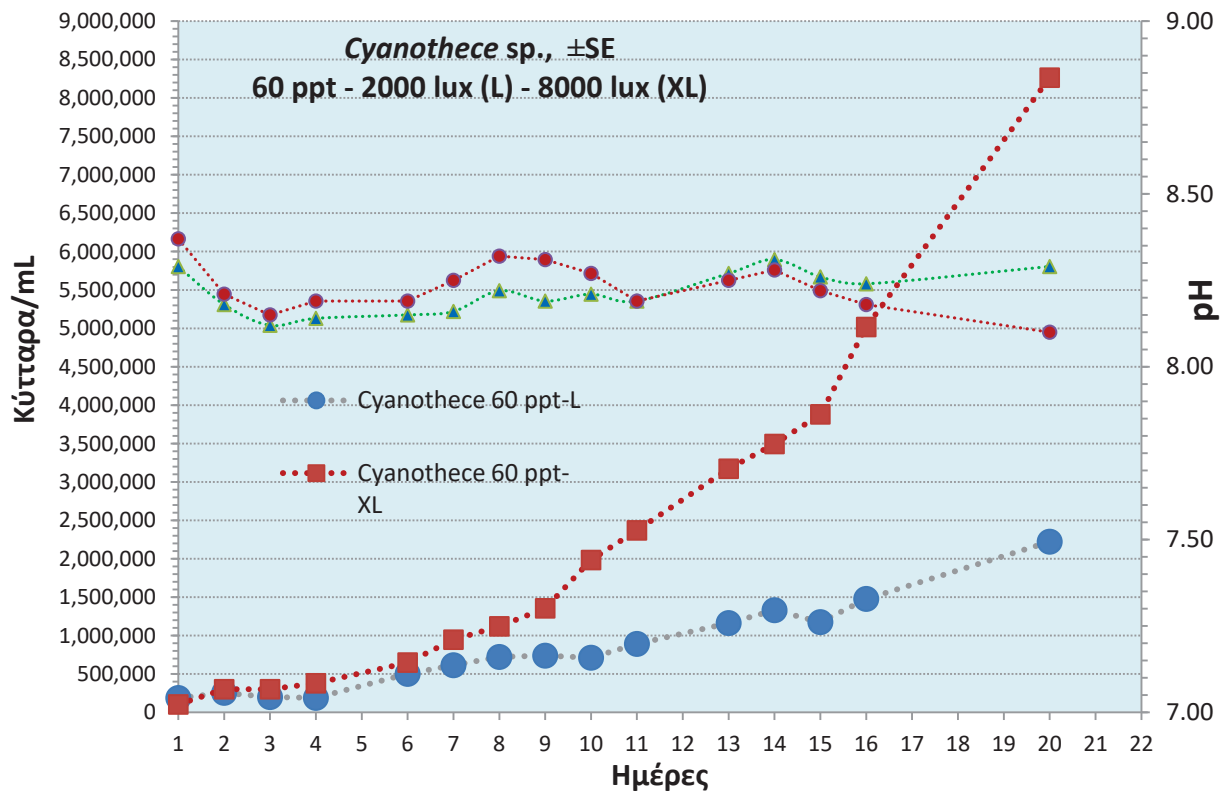
Η κατάσταση ήταν εντελώς διαφορετική στην αμέσως υψηλότερη αλατότητα των 40 ppt όπου παρουσιάστηκε εμφανής αύξηση των καλλιεργειών αμέσως μετά την αρχική φάση καθυστέρησης των 4 ημερών (Σχήμα 92). Η καμπύλη της αύξησης

έγινε έντονα ανοδική-εκθετική στον έντονο φωτισμό και διατηρήθηκε έτσι μέχρι τέλους χωρίς ένδειξη κάμψης ή επερχόμενης φάσης στασιμότητας, επιτυγχάνοντας πυκνότητα κυττάρων 7.700.000 κύτ./mL την 20^η ημέρα. Αντίθετα, στο χαμηλό φωτισμό η ανοδική τάση της καμπύλης ήταν σχεδόν ανεπαίσθητη παρόλο που και εδώ διατηρήθηκε συνεχώς ανοδική επιτυγχάνοντας όμως πολύ μικρότερη πυκνότητα κυττάρων την 20^η ημέρα (1.550.000 κύτ./mL). Το pH παρουσίασε έντονες διακυμάνσεις στο εύρος 8,0 - 8,7 με τιμές συνεχώς υψηλότερες στον έντονο φωτισμό συγκριτικά με τον ασθενή.

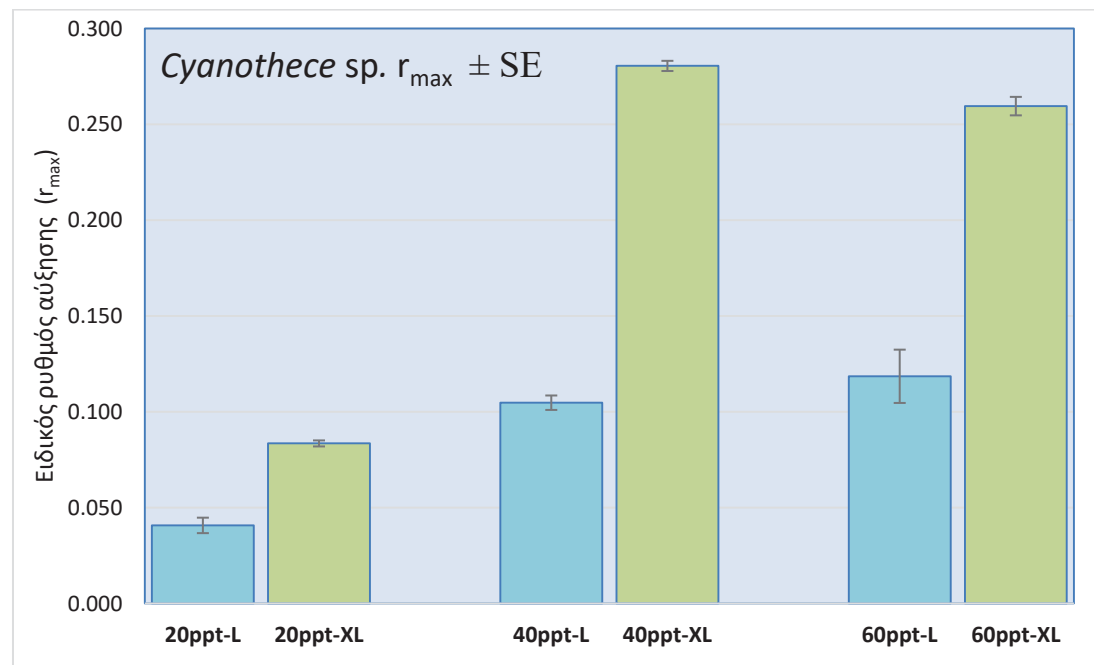


Σχήμα 92. Η καμπύλη αύξησης (σε κύτταρα/mL) της καλλιέργειας του κυανοβακτηρίου *Cyanothecce* sp. στην αλατότητα των 40 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.

Ακόμα πιο διαφορετική ήταν η κατάσταση στην υψηλότερη όλων αλατότητα των 60 ppt (Σχήμα 93), όπου παρουσιάστηκε έντονη αύξηση των καλλιεργειών αμέσως μετά την αρχική φάση καθυστέρησης των 4 ημερών. Η καμπύλη της αύξησης έγινε "εκρηκτικά" ανοδική-εκθετική στον έντονο φωτισμό και διατηρήθηκε έτσι (και ακόμα πιο ανοδικά από τη 15^η ημέρα) μέχρι τέλους, επιτυγχάνοντας πυκνότητα κυττάρων 8.300.000 κύτ./mL την 20^η ημέρα. Αντίθετα στο χαμηλό φωτισμό η ανοδική τάση της καμπύλης ήταν πολύ πιο ήπια, παρόλο που και εδώ διατηρήθηκε συνεχώς ανοδική, επιτυγχάνοντας όμως πολύ μικρότερη πυκνότητα κυττάρων την 20^η ημέρα (2.200.000 κύτ./mL). Το pH παρουσίασε ομοιόμορφη διακύμανση στην περιοχή ~8,2 - 8,3, με τιμές κατά τι υψηλότερες στον έντονο φωτισμό συγκριτικά με τον ασθενή.



Σχήμα 93. Η καμπύλη αύξησης (σε κύτταρα/mL) της καλλιέργειας του κυανοβακτηρίου *Cyanobacteria* sp. στην αλατότητα των 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Επίσης οι καμπύλες μεταβολής του pH στην κάθε συνθήκη.



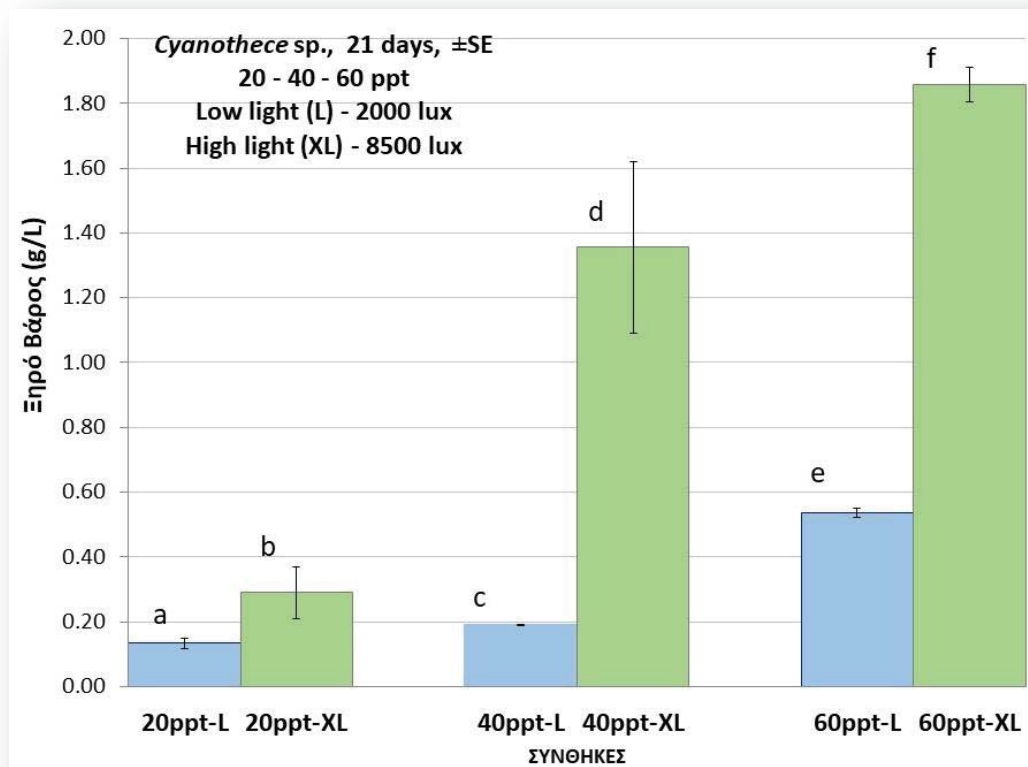
Σχήμα 94. Οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης (r_{max}) ± SE των καλλιεργειών του κυανοβακτηρίου *Cyanobacteria* sp. στις αλατότητες των 20, 40 και 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux).

Το τάχος της αύξησης ως ειδικός ρυθμός αύξησης (r_{max}) και ο χρόνος διπλασιασμού ή γενεάς (t_g) αποτυπώνονται στο Σχήμα 94 και αναλυτικότερα στον Πίνακα 8. Ως διάστημα υπολογισμών τέθηκαν οι 5 ημέρες μεταξύ της 4^{ης} όπου άρχισε η εκθετική φάση σε όλες τις συνθήκες και της 11^{ης} όπου επίσης σε όλες η καμπύλη διατηρήθηκε ανοδική. Προκύπτει σαφώς μεγαλύτερο τάχος αύξησης στην κατάσταση του έντονου φωτισμού (0,084 vs 0,041, 0,281 vs 0,105, 0,209 vs 0,119) για τις αλατότητες 20 - 40 - 60 ppt αντίστοιχα, συγκριτικά με τον ασθενή σε όλες τις αλατότητες. Όλες οι καταγραφείσες τιμές ήταν στατιστικώς ανόμοιες και με διαφορά η ταχύτερη αύξηση παρουσιάστηκε στις αλατότητες των 40 και 60 ppt.

Ως αντανάκλαση των παραπάνω ρυθμών αύξησης και ο χρόνος γενεάς (t_g) ήταν ο χαμηλότερος στη συνθήκη του έντονου φωτισμού στα 40 ppt και 60 ppt (2,471 και 2,670 ημέρες αντίστοιχα), με όλες τις άλλες τιμές στις αντίστοιχες συνθήκες να παρουσιάζουν πολύ μακρούς χρόνους διπλασιασμού της τάξεως των 6-17 ημερών κάτι που προδιαθέτει αρνητικά στη χρήση για παραγωγή. Γενικώς το κυανοβακτήριο *Cyanobacter* sp. παρουσίασε υψηλό τάχος αύξησης και γρήγορο διπλασιασμό σε αλατότητες υψηλότερες των 20 ppt και με σαφή προτίμηση για φωτισμό υψηλής έντασης.

Πίνακας 8. Συγκεντρωτικά στοιχεία των ειδικών ρυθμών αύξησης (r_{max}) και του χρόνου γενεάς ή διπλασιασμού (t_g) των καλλιεργειών του κυανοβακτηρίου *Cyanobacter* sp. στις αλατότητες των 20, 40 και 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Οι διαφορετικοί παρατιθέμενοι εκθέτες σημαίνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά στο επίπεδο 0,05 (στατιστική επεξεργασία με ANOVA και κατόπιν σύγκριση κατά ζεύγη με Tukey's test). Οπου υπάρχει και δεύτερος εκθέτης σημαίνει στατιστικώς ίση τιμή με την συνθήκη του αντίστοιχου γράμματος.

Συνθήκες	20ppt-L	20ppt-XL	40ppt-L	40ppt-XL	60ppt-L	60ppt-XL
r_{max}	0,041 ^a	0,084 ^b	0,105 ^c	0,281 ^d	0,119 ^{e,c}	0,209 ^f
SE	0,004	0,002	0,004	0,003	0,014	0,001
Διάστημα (ημέρες)	6 ⁿ -11 ⁿ	6 ⁿ -11 ⁿ	6 ⁿ -11 ⁿ	6 ⁿ -11 ⁿ	6 ⁿ -11 ⁿ	6 ⁿ -11 ⁿ
n	9	9	9	9	9	9
t_g (24ωρα)	16,997	8,296	6,614	2,471	5,845	2,670
SE	1,395	0,162	0,253	0,023	0,643	0,051
n	9	9	9	9	9	9



Σχήμα 95. Απόδοση σε ξηρό βάρος φυκούς (g/L) \pm SE του κυανοβακτηρίου *Cyanobacteria* sp. την 21^η ημέρα της καλλιέργειας στις αλατότητες των 20, 40 και 60 ppt και στην κάθε ένταση φωτισμού (L: 2000 lux, XL: 8000 lux). Η ύπαρξη σημαντικής στατιστικής διαφοράς στο επίπεδο 0,05 υποδεικνύεται με διαφορετικό γράμμα. Οι στατιστικώς ίσες τιμές υποδεικνύονται με την επανάληψη των ανάλογων δεικτών στις στήλες (στατιστική επεξεργασία με ANOVA και κατόπιν σύγκριση κατά ζεύγη με Tukey's test).

Απόδοση των καλλιεργειών

Για την απόδοση των καλλιεργειών του *Cyanobacteria* sp. σε βιομάζα ως ξηρό βάρος ανά λίτρο καλλιέργειας (g/L), υπολογίστηκαν τιμές μετρηθείσες την 21^η ημέρα (Σχήμα 95). Διαπιστώθηκαν έντονες διαφορές σε όλες τις συνθήκες με όλες τις τιμές να διαφέρουν στατιστικώς μεταξύ τους. Ενα πρώτο συμπέρασμα είναι οι πολύ υψηλότερες αποδόσεις στον έντονο φωτισμό συγκριτικά με τον ασθενή σε όλες τις αλατότητες (0,3 vs 0,14, 1,36 vs 0,2, 1,86 vs 0,53 g/L) για τις αλατότητες 20 - 40 - 60 ppt αντίστοιχα και ένα δεύτερο, η πολύ έντονη θετική επίδραση της υψηλότερης αλατότητας στην αυξημένη απόδοση σε βιομάζα.

Γενικά συμπεράσματα

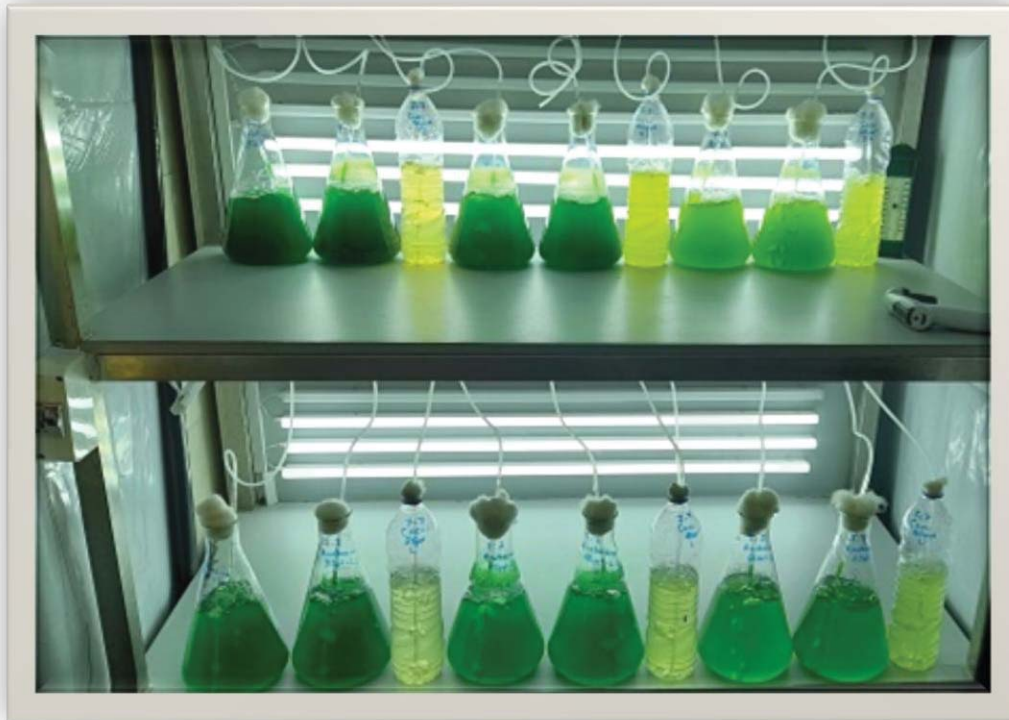
Η καλλιέργεια του κοκκοειδούς κυανοβακτηρίου *Cyanobacteria* sp. απέδειξε τον αλόφιλο χαρακτήρα του είδους το οποίο ως προερχόμενο από τις αλυκές προτιμά σαφώς για αξιόλογη αύξηση τις υψηλές αλατότητες. Το είδος αυτό παρουσιάζει έντονη ποικιλομορφία τόσο στο χρωματισμό του (πράσινο-κυανοπράσινο-σκουροπράσινο-πορτοκαλοκαφετί) στην καλλιέργεια (Σχήματα 96,

97, 98 & 99), ο οποίος επηρεάζεται τόσο από την αλατότητα, το φωτισμό και το βαθμό ωρίμανσης, όσο και από την υφή του μέσου στο οποίο καλλιεργείται, καθώς παράγει ενίοτε (μετά την καλή ωρίμανση των καλλιεργειών) μεγάλες ποσότητες πολυσακχαριτών οι οποίοι συσσωρευόμενοι εξωκυτταρικός προσδίδουν στο νερό μια βλενώδη παχύρρευστη ρευστότητα, η οποία αν διατηρηθεί ο αερισμός, δημιουργεί έντονο λευκό αφρό που συσσωρεύεται στην επιφάνεια του δοχείου και ξεχειλίζει.

Ενα άλλο χαρακτηριστικό του είναι η απουσία ιζηματοποίησης ακόμα και αν οι καλλιέργειες αφεθούν επί μήνες αφρόντιστες χωρίς αερισμό και με ελάχιστο ακόμα φωτισμό. Εικάζεται ότι η υπερβολική παραγωγή βλέννας που παραμένει στο νερό αυξάνει τόσο πολύ το ιξώδες του που η καθίζηση καθίσταται αδύνατη. Επιπλέον όπως έχει παρατηρηθεί μικροσκοπικώς, η μακροχρόνια διατήρηση των κυττάρων στο ίδιο νερό δεν επιφέρει σοβαρή μείωση στον πληθυσμό τους καθώς παραμένουν βιώσιμα και διαιρούνται ξανά όταν μεταφερθούν σε φρέσκο μέσο καλλιέργειας.



Σχήμα 96. Οι καλλιέργειες του κοκκοειδούς κυανοβακτηρίου *Cyanothese* sp. (στα κυλινδρικά δοχεία μόνο, τα κυλινδροκωνικά περιέχουν *Anabaena* sp.) την 7^η ημέρα της καλλιέργειας στις διάφορες συνθήκες αλατότητας-έντασης φωτισμού.



Σχήμα 97. Οι καλλιέργειες του κοκκοειδούς κυανοβακτηρίου *Cyanothece* sp. (στα κυλινδρικά δοχεία μόνο) τη 13^η ημέρα της καλλιέργειας στις διάφορες συνθήκες αλατότητας- φωτισμού.



Σχήμα 98. Οι καλλιέργειες του κοκκοειδούς κυανοβακτηρίου *Cyanothece* sp. (στα κυλινδρικά δοχεία μόνο) την 20^η ημέρα (τέλος) της καλλιέργειας στις διάφορες συνθήκες αλατότητας-έντασης φωτισμού.



Σχήμα 99. Χαρακτηριστικά διαφορετικό χρώμα την 20^η ημέρα των καλλιεργειών του κοκκοειδούς κυανοβακτηρίου *Cyanospora* sp. στους συνδυασμούς αλατότητας-φωτός 20ppt-L, 20ppt-XL, 40ppt-L, 40ppt-XL, 60ppt-L, 60ppt-XL (επάνω φωτογραφία και από αριστερά προς τα δεξιά). Στην κάτω φωτογραφία ξηρά δείγματα ηθμών από διήθηση των καλλιεργειών, φαίνονται επίσης έντονα οι διαφορές των χρωμάτων.