



Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών  
National and Kapodistrian  
University of Athens

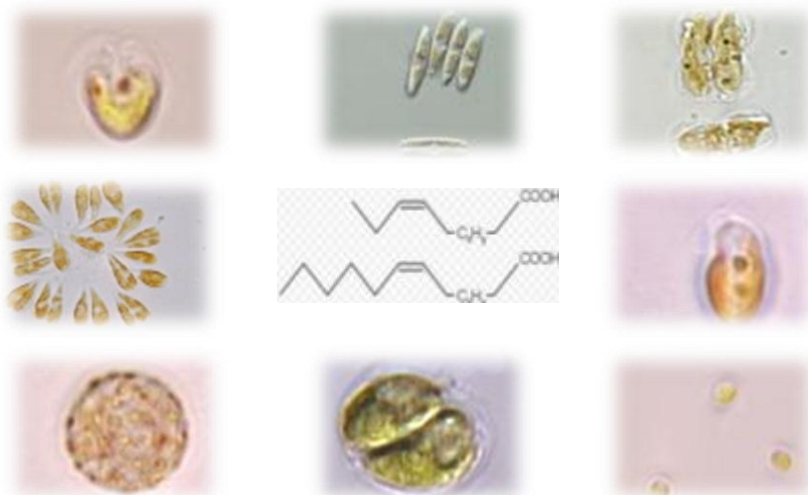
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΩΚΕΑΝΟΓΡΑΦΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΘΑΛΑΣΣΙΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗΣ



**«Ανάπτυξη μικτών πληθυσμών θαλάσσιου φυτοπλαγκτού για την παραγωγή  
λιπαρών απαραίτητων προς χρήση στις υδατοκαλλιέργειες»**

Ελένη Ευρυγένη

ΑΜ: 214012

Επιβλέπουσα: Οικονόμου-Αμίλλη Α. (Ομότιμη Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ)

ΑΘΗΝΑ 2017

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΩΚΕΑΝΟΓΡΑΦΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΘΑΛΑΣΣΙΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ανάπτυξη μικτών πληθυσμών θαλάσσιου φυτοπλαγκτού για την παραγωγή  
λιπαρών απαραίτητων προς χρήση στις υδατοκαλλιέργειες»**

Ελένη Ευρυγένη

ΑΜ: 214012

Επιβλέπουσα: Οικονόμου-Αμίλλη Α. (Ομότιμη Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ-ΑΜΙΛΛΗ Α. (Ομ. Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ)

ΠΑΡΜΑΚΕΛΗΣ Α. (Αναπλ. Καθηγητής, ΕΚΠΑ)

ΦΟΥΝΤΟΥΛΑΚΗ Ε. (Ερευνήτρια Β, ΕΛΚΕΘΕ)

ΑΘΗΝΑ 2017

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στον Τομέα Οικολογίας και Ταξινόμικης, στο «εργαστήριο» Εφαρμοσμένης Φυκολογίας, του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ).

Κατά πολλούς το κεφάλαιο των «ευχαριστιών» είναι ένα πολύ σημαντικό τμήμα κατά τη συγγραφή μιας διατριβής ή και γενικότερα οποιασδήποτε μορφής εργασίας. Αυτό συμβαίνει επειδή το παραπάνω τμήμα είναι ίσως το μοναδικό, όπου δεν χρησιμοποιούνται κυτταρικές μετρήσεις, μοριακές τεχνικές, προσδιορισμοί χρωστικών, μέσοι όροι, τυπικές αποκλίσεις ή οποιοδήποτε άλλο στατιστικό εργαλείο! Στην ουσία, ο συγγραφέας καλείται να αποδώσει τα πράγματα, δηλαδή τις ευχαριστίες, όσο πιο αναλυτικά μπορεί, συμπεριλαμβάνοντας ακόμη και τις πιο μικρές πράξεις οι οποίες υπό άλλες συνθήκες θα ήταν οι «ελάχιστες τιμές».

Έχοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην υπεύθυνη της εργασίας μου, Καθηγήτρια του Τομέα Οικολογίας και Ταξινόμικης, Αθηνά Οικονόμου-Αμίλλη, η οποία μου εμπιστεύτηκε την εκπόνηση αυτής της εργασίας και μαζί με τον συνεργάτη της κ. Ιωάννη Τζοβενή, διδάκτορα του Gent University του Βελγίου, αποτέλεσαν τους στυλοβάτες αυτής της προσπάθειας και με στήριξαν καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της.

Θα ήταν αγνωμοσύνη μου αν δεν ευχαριστούσα την κα Ελένη Φουντουλάκη, ερευνήτρια Β' του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσιών Ερευνών και μέλος της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής της παρούσης εργασίας, για τη βοήθειά της στο σκέλος των βιοχημικών αναλύσεων, καθώς και τις συνεργάτιδες του εργαστηρίου, Αντιγόνη Βασιλάκη και Χρυσούλα Νικολουδάκη.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τομέα Οικολογίας & Ταξινόμικης κ. Παρμακέλη Α. για τη συμμετοχή του στην εξεταστική επιτροπή, καθώς και για τη βοήθειά του στο τμήμα των μοριακών αναλύσεων. Ένα μεγάλο και ειλικρινές ευχαριστώ και στον προπτυχιακό φοιτητή του εργαστηρίου Μανώλη Μεραμβελιωτάκη για την πραγματικά πολύτιμη βοήθειά του. Ευχαριστώ επίσης την υποψήφια διδάκτορα Πένυ Λάμπρη και τις φοιτήτριες του εργαστηρίου Ράνια και Χριστίνα.

Ιδιαίτερη αναφορά θα ήθελα να γίνει στο πρόσωπο του εκλιπόντος Αναπληρωτή Καθηγητή του Τομέα Οικολογίας & Ταξινομικής Δανιήλ Δανηλίδη, ο οποίος υπήρξε σπουδαίος Επιστήμονας και αποτέλεσε στήριγμα και πηγή έμπνευσης για την εκπόνηση της παρούσης διπλωματικής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Χαντζηστρούντσιου Ξανθή του Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής για την πολύτιμη βοήθειά της, για την καλή διάθεση, τις συμβουλές αλλά και τη συνεχή ενθάρρυνση για την περάτωση του παρόντος πονήματος.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ και σε όλους τους συναδέλφους μου του «εργαστηρίου» Εφαρμοσμένης Φυκολογίας (Α.Ρ.Υ) του Τομέα, Ειρήνη Γρατσία, Ντζουβάρα Αλέξανδρο, Κώστα Πανταζή για την πολύ καλή συνεργασία, την υποστήριξη αλλά και την άψογη ατμόσφαιρα συνεργασίας στο εργαστήριο.

Ευχαριστώ και την Δρ. Ιωάννα Λούβρου (μέλος των ΕΔΠΠ του Τομέα Ταξινομικής και Οικολογίας) για την καλή διάθεση και τη βοήθειά της όποτε τη χρειάστηκε.

Φυσικά θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους δικούς μου ανθρώπους, οι οποίοι μου προσέφεραν απλόχερα στήριξη και βοήθεια και με πολλή υπομονή στάθηκαν δίπλα μου στη διαδρομή αυτή: Δημήτρη, Γιώργο, Δένα, Μαρίνα, Αντρέα, Σίλκα, Κώστα, Έμμου, Μαρία, Αστέριε, σας ευχαριστώ ειλικρινά.

Πολύ μεγάλο και ειλικρινές να είναι το ευχαριστώ μου προς τους γονείς μου, Πέτρο και Δέσποινα, καθώς και την αδερφή μου Παυλίνα, για την αγάπη τους και τη στήριξή τους σε κάθε απόφαση της ζωής μου. Αποτελούν δύναμη για μένα και χωρίς αυτούς δε θα είχα φτάσει έως εδώ.

*Στους γονείς μου Πέτρο & Δέσποινα*

## Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
1.1 Σημασία και εφαρμογές των μικροφυκών .....	13
1.2 Λιπαρά Οξέα .....	15
1.3 Η Περιεκτικότητα των λιπιδίων στα μικροφύκη.....	17
1.4 Η βιομάζα των μικροφυκών .....	20
1.5 Η χρήση των μικροφυκών στις υδατοκαλλιέργειες .....	21
1.6 Καλλιέργεια μικροφυκών .....	23
1.6.1 Συστήματα καλλιέργειας .....	24
1.6.1.1 Ανοιχτού / κλειστού τύπου καλλιέργειες .....	24
1.7 Φυσικοχημικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών .....	26
1.7.1 Φως .....	26
1.7.2 Θερμοκρασία .....	27
1.7.3 Αλατότητα.....	27
1.7.4 pH.....	28
1.7.5 CO <sub>2</sub> .....	28
1.7.6 Θρεπτικά στοιχεία.....	29
1.8 Φάσεις της Κυτταρικής Ανάπτυξης .....	31
1.9 Μικτές καλλιέργειες μικροφυκών .....	32
1.10 Οικονομικότητα και αιφορία.....	33
1.11 Μέτρηση της βιομάζας του φυτοπλαγκτού.....	34
1.12 Ταξινόμηση των μικροφυκών .....	35
1.12.1 Μέθοδοι ταξινόμησης των μικροφυκών .....	39
1.12.1.1 Κλασική ταξινομική.....	39
1.12.1.2 Φυλογενετική ανάλυση των μικροφυκών – μοριακές τεχνικές.....	40
2. ΣΚΟΠΟΣ .....	42
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	43
3.1 Περιοχές συλλογής θαλασσινού νερού.....	43
3.2 Εργαστηριακή μέθοδος καλλιέργειας φυκών .....	45
3.2.1 1 <sup>η</sup> Συλλογή θαλασσινού νερού - Αγ. Κοσμάς, Αττικής (Σαρωνικός κόλπος) 46	

3.2.2	2 <sup>η</sup> συλλογή θαλασσινού νερού - Λίμνη (Ν. Ευβοίας, Ευβοϊκός Κόλπος)	48
3.2.3	3 <sup>η</sup> συλλογή θαλασσινού νερού.....	49
<b>3.3</b>	<b>Εργαστηριακή μέθοδος παρακολούθησης φυτοπλαγκτού .....</b>	<b>50</b>
3.3.1	Ποιοτική μελέτη φυτοπλαγκτού .....	50
3.3.1.1	<i>Κλασική ταξινόμική .....</i>	<i>51</i>
3.3.2	Ποσοτική μελέτη φυτοπλαγκτού .....	52
3.3.2.1	<i>Ποσοτικοποίηση βιομάζας φυκών .....</i>	<i>52</i>
3.3.2.2	<i>Συνοπτικά οι μέθοδοι της ποσοτικής μελέτης του φυτοπλαγκτού .....</i>	<i>53</i>
<b>3.4</b>	<b>Μέθοδοι απομόνωσης των κυρίαρχων στελεχών μικροφυκών στις καλλιέργειες .....</b>	<b>55</b>
3.4.1	Μέθοδος επίστρωσης σε τρυβλίο .....	55
3.4.2	Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων .....	56
<b>3.5</b>	<b>Συντήρηση των απομονωμένων στελεχών .....</b>	<b>57</b>
<b>3.6</b>	<b>Παρασκευή θρεπτικών διαλυμάτων .....</b>	<b>57</b>
3.6.1	Παρασκευή θρεπτικού μέσου Walne.....	57
3.6.2	Παρασκευή διαλύματος βιταμινών .....	58
<b>3.7</b>	<b>Φυλογενετική Ανάλυση .....</b>	<b>59</b>
3.7.1	Μοριακές αναλύσεις των κυρίαρχων απομονωθέντων ειδών .....	59
3.7.1.1	<i>Μοριακοί δείκτες .....</i>	<i>59</i>
3.7.1.2	<i>Πρωτόκολλο απομόνωσης γονιδιωματικού DNA .....</i>	<i>59</i>
3.7.1.3	<i>Αλυσιδωτή Αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain reaction, PCR)</i>	<i>61</i>
3.7.1.4	<i>Τα συστατικά της PCR .....</i>	<i>61</i>
3.7.1.5	<i>Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης και απεικόνιση των μορίων DNA.....</i>	<i>64</i>
3.7.1.6	<i>Διαλύματα ανάλυσης δεσοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) .....</i>	<i>66</i>
3.7.1.7	<i>Δείκτης («μάρτυρας») μοριακών βαρών .....</i>	<i>66</i>
3.7.1.8	<i>Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης..</i>	<i>66</i>
3.7.1.9	<i>Αλληλούχιση προϊόντων PCR .....</i>	<i>68</i>
3.7.1.10	<i>Επεξεργασία αλληλουχιών .....</i>	<i>68</i>
3.7.1.11	<i>Στοίχιση αλληλουχιών.....</i>	<i>68</i>
3.7.1.12	<i>Εύρεση ομόλογων αλληλουχιών.....</i>	<i>68</i>
<b>3.8</b>	<b>Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων .....</b>	<b>69</b>

3.8.1	Μέθοδος Σύνδεσης Γειτόνων NJ (Neighbour Joining) .....	69
3.8.2	Ανάλυση κατά Bayes .....	69
<b>3.9</b>	<b>Βιοχημικές αναλύσεις.....</b>	<b>70</b>
3.9.1	Εργαστηριακή μέθοδος για την άμεση εστεροποίηση των λιπαρών οξέων 70	
3.9.2	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (Thin Layer Chromatography - TLC) με χρήση πλακιδίων σιλικόνης .....	71
3.9.3	Διαδικασία προσδιορισμού χλωροφύλλης α (Chl-a) .....	74
<b>4.</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>76</b>
<b>4.1</b>	<b>Πειράματα μικτών καλλιιεργειών.....</b>	<b>76</b>
4.1.1	Πείραμα καλλιέργειας – Λιμάνι Αγίου Κοσμά (Σαρωνικός κόλπος) 76	
4.1.2	Πείραμα καλλιέργειας – Λίμνη Ευβοίας (Ευβοϊκός κόλπος) .....	77
4.1.3	Πείραμα καλλιέργειας – Κυμάσι – Μαντουδίου (Αιγαίο πέλαγος) .79	
<b>4.2</b>	<b>Επανάληψη του πειράματος με σκοπό τη μέτρηση των λιπαρών και του ξηρού βάρους των καλλιιεργειών.....</b>	<b>82</b>
<b>4.3</b>	<b>Ξηρό βάρος καλλιιεργειών.....</b>	<b>84</b>
<b>4.4</b>	<b>Βιοχημικές αναλύσεις.....</b>	<b>84</b>
4.4.1	Χλωροφύλλες.....	84
4.1.1	Χημική Ανάλυση του Προφίλ Λιπαρών Οξέων FAME (Fatty Acids Methylesters) .....	85
<b>4.2</b>	<b>Κυρίαρχα είδη των μικτών καλλιιεργειών.....</b>	<b>88</b>
<b>4.3</b>	<b>Μορφολογική περιγραφή των κυρίαρχων στελεχών των μικτών καλλιιεργειών.....</b>	<b>88</b>
4.3.1	Περιοχή Δειγματοληψίας Άγιος Κοσμάς – Σαρωνικό Κόλπος .....	88
4.3.2	Περιοχή Δειγματοληψίας Λίμνη Ευβοίας – Ευβοϊκός Κόλπος .....	91
4.3.3	Περιοχή Δειγματοληψίας Κυμάσι Μαντουδίου - Αιγαίο Πέλαγος .....	93
<b>4.4</b>	<b>Μοριακές αναλύσεις.....</b>	<b>98</b>
4.4.1	Πολλαπλασιασμός των γονιδίων-στόχων μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).....	98
4.4.1.1	Επιλεγμένοι εκκινητές ( <i>primers</i> ) .....	99
4.4.2	Ενίσχυση <i>rbcl</i> από το συνολικό γονιδίωμα των απομονωμένων μικροφυκών - Συνθήκες PCR.....	99
4.4.3	Ενίσχυση 18S από το συνολικό γονιδίωμα των απομονωμένων μικροφυκών – Συνθήκες PCR .....	100



4.4.4	Καθαρισμός προϊόντος της PCR.....	101
4.4.5	Φυλογενετικά δέντρα .....	103
4.4.5.1	Ανάλυση κατά Bayes ( <i>Bayes Inference, BI</i> ).....	103
4.1.1.1	Ανάλυση Neighbor - Joining ( <i>NJ</i> ) .....	112
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	117
5.1	Σύνθεση της βιοκοινωνίας των καλλιεργειών και εναλλαγή των ειδών .	117
5.2	Ταξινόμηση των κυρίαρχων στελεχών .....	118
5.3	Σύγκριση της παραγωγικότητας των καλλιεργειών .....	121
5.4	Ανάλυση του προφίλ των λιπαρών οξέων των μικτών καλλιεργειών.....	122
6.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	125
7.	ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ .....	126
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	127
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ I&II&III .....	141

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη σύνθεση των φυτικών κοινωνιών των υδατικών οικοσυστημάτων, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν οι διακυμάνσεις των ειδών του φυτοπλαγκτού. Οι καλλιέργειες ειδών φυτοπλαγκτού όταν επιχειρούνται στο εργαστήριο απαντούν στην ανάγκη για παραγωγή βιομάζας θαλάσσιων μικροφυκών και τη χρήση τους σε θεωρητικό και εφαρμοσμένο επίπεδο. Ειδικότερα οι μικτές καλλιέργειες μικροφυκών είναι κατάλληλες για την αντιμετώπιση των προβλημάτων κόστους και μολύνσεων που υφίσταται η διατήρηση των μονοκαλλιεργειών. Επίσης, η μεγάλη ποικιλία των «ανθίσεων» μικροφυκών στις μικτές καλλιέργειες είναι χρήσιμη για την εκτροφή διαφορετικών θαλάσσιων ζωικών ειδών.

Σκοπός της παρούσης μελέτης είναι η παραγωγή βιομάζας θαλάσσιων μικροφυκών με τις κατάλληλες τεχνικές ανάπτυξης μικτής καλλιέργειας φυτοπλαγκτού (natural algal bloom, NAB) για χρήση στις οστρακοκαλλιέργειες και καλλιέργειες ζωοπλαγκτού καθώς και η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των κυρίαρχων ειδών μικροφυκών. Ο πειραματικός σχεδιασμός στηρίζεται στη συλλογή θαλασσινού νερού από εν δυνάμει εύτροφα παράκτια συστήματα με απομάκρυνση μέσω διήθησης μεσο/μακρο-φυτο/ζωο-πλαγκτού και εμπλουτισμού με θρεπτικά (ανόργανα άλατα) για την πρόκληση τεχνητού ευτροφισμού και περαιτέρω διαχείρισής του σε μικτή εντατική καλλιέργεια νανο-φυτοπλαγκτού.

Πραγματοποιήθηκαν τρεις συλλογές θαλασσινού νερού από διαφορετικά σημεία δειγματοληψίας (Σαρωνικός κόλπος, Ευβοϊκός κόλπος, ΒΑ της Εύβοιας – Αιγαίο πέλαγος) σε διαφορετικές χρονικές περιόδους (Φθινόπωρο, Άνοιξη, Καλοκαίρι) και σε δύο διαφορετικές αναλογίες ( $1,18 - 2,36 - \text{mM NO}_3^-$ ,  $0,145-0,29 \text{ mM PO}_4^{3-}$ ) του ίδιου θρεπτικού μέσου (Conway, Walne, 1970) σε φιάλες του 1,5 L. Οι καλλιέργειες αφήνονται σε συνθήκες χαμηλού διάχυτου φυσικού φωτισμού για διάστημα έως τριών μηνών και έπειτα οι βέλτιστες μεταφέρονται σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας και φωτισμού ( $65 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , φωτοπερίοδος 12:12h L:D, θερμοκρασία  $20\pm 1^\circ\text{C}$ , θρεπτικό μέσο Conway, φυσική αλατότητα 38). Στη συνέχεια από τις καλλιέργειες με τους βέλτιστους ρυθμούς ανάπτυξη έγινε επανάληψη του πειράματος σε τρεις φιάλες. Μετά την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας ακολούθησε η διήθηση των δειγμάτων υπό κενό σε φίλτρα γνωστού

βάρους CF/C και πραγματοποιήθηκε η μέτρηση του ξηρού βάρους σε ζυγό ακριβείας. Στη συνέχεια έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών λιπαρών και η ανάλυση της σύστασής τους σε λιπαρά οξέα μετά από άμεση εστεροποίηση.

Ταυτόχρονα έγινε προσπάθεια απομόνωσης των ειδών που επικράτησαν στις μικτές καλλιέργειες με τη βοήθεια διάφορων τεχνικών. Για την ταυτοποίηση των ειδών του φυτοπλαγκτού χρησιμοποιήθηκαν κυρίως μορφομετρικά χαρακτηριστικά. Στα κυρίαρχα είδη που απομονώθηκαν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ταξινομική διευθέτηση με τη χρήση μοριακών τεχνικών (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης – PCR).

Οι μικτές καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν εργαστηριακά από τη συλλογή θαλάσσιου φυτοπλαγκτού και από διαφορετικά θαλάσσια ύδατα και σε διαφορετικές εποχές, ήταν σταθερές και κρίθηκαν παραγωγικές. Σε μεγάλη κλίμακα, αυτή η τεχνική μπορεί να προσφέρει φθηνή βιομάζα μικροφυκών, η οποία απαιτείται σε υδατοκαλλιέργειες αλλά και σε άλλες εφαρμογές.

#### Λέξεις-κλειδιά

μικτή καλλιέργεια θαλάσσιων μικροφυκών, υδατοκαλλιέργειες, NAB (natural algal bloom), απομόνωση, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, λιπαρά οξέα

#### **ABSTRACT**

Marine phytoplankton is used widely in intensive cultures of bivalves, rotifer rearing and pseudo-green waters in marine fin-fish hatcheries as well as in other minor applications in terms of volumes. Normally these cultures are based on one selected species with high cost to keep the cultures unialgal indoors while the options to deploy them outdoors are very limited due to high risks of crashing due to contamination and/or large fluctuations of environmental conditions. A cheap alternative is to use natural inflows of seawater, coarse filtered to avoid predators and seaweeds, enriched with nutrients and let to thrive until high concentrations.

The phytoplankton species, which can be found in the natural populations, in most cases, have grown together and survived for periods of 15-20 days before one or two species becoming overwhelmingly dominant.

In theory, mixed cultures satisfy the need of a cost-effective marine microalgae production. They are suitable solutions against the high cost and contamination effects caused by monoculture production. Additionally, the large variety of blooms in mixed cultures is usable for the development of different species.

Objective of the current study is the production of marine microalgae biomass for further use in aquacultures by applying appropriate techniques of natural algal bloom development and the isolation and characterization of the domain species.

In this study, water was used as described above from three locations in the South Aegean Sea (Saronic Gulf, Euboic Gulf, Aegean part of Evia Island) at two distinct media strengths (1.18 - 2.36 mM NO<sup>3-</sup>; 0.145-0.29 mM PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), all the rest as in Conway medium, Walne 1970) in 1.5 L bottles. Phytoplankton present in the water was left to thrive until a dense bloom occurred. Successful blooms were then diluted in triplicates and left to bloom repeatedly monitoring the biomass production and species composition (dry weight, abundance and biovolume of each species apparently present in daily sampling). Bottles were placed under sufficient light (65 μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) of 12:12 h L:D photoperiod, 20±1°C and nutrients as in Conway medium at natural salinity of 38 units. Dominating species were isolated, identified to the most possible taxonomic level and characterised (kinetics, chemical composition). The overall score of each bloom was then characterised in terms of abundance, biomass and fatty acid profile.

Stable and adequately productive natural blooms of marine phytoplankton were produced in lab scale cultures from sea water collected in different locations of the Aegean Sea at different seasons. At large scale this technique might provide cheap algae biomass needed for several applications in aquaculture and other uses.

### **Key Words**

Natural Algae Blooms - NAB, fatty acid, PCR, isolation, aquaculture, mixed culture

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι φυτοπλαγκτικοί οργανισμοί είναι η κυριότερη ομάδα πρωτογενών παραγωγών στα υδάτινα οικοσυστήματα του πλανήτη, ελευθερώνοντας σχεδόν το μισό διαθέσιμο οξυγόνο της ατμόσφαιρας (Castro & Huber 1999).

Η συνολική ποσότητα της οργανικής ύλης που παράγεται φωτοσυνθετικά συναρτήσκει του χρόνου στην επιφάνεια της θάλασσας, εκφράζει τον ρυθμό της πρωτογενούς παραγωγής, η οποία καλείται και παραγωγικότητα (Λυκάκης 1996, Castro & Huber 1999). Η καθαρή πρωτογενής παραγωγή των οικοσυστημάτων (συνολική πρωτογενής παραγωγή, χωρίς την αναπνοή των ίδιων των οργανισμών που φωτοσυνθέτουν), αποτελεί την αύξηση της βιομάζας και συνεπώς τη διαθέσιμη τροφή των φυτοφάγων πελαγικών οργανισμών. Ένα σημαντικό μέρος των οργανικών ουσιών που παράγονται με τη φωτοσύνθεση διαφεύγει από τα κύτταρα του φυτοπλαγκτού στον θαλάσσιο χώρο και προστίθεται στο απόθεμα των διαλυμένων οργανικών ουσιών που υφίστανται στο υδάτινο περιβάλλον (Raymond 1980).

Κατά τις τελευταίες δεκαετίες εκτεταμένες συλλογές μικροφυκών έχουν δημιουργηθεί από ερευνητές σε διάφορες χώρες (Raja et al. 2008, Mata et al. 2010).

### 1.1 Σημασία και εφαρμογές των μικροφυκών

Η καλλιέργεια των μακρο- και μικρο- φυκών αποτελεί παγκοσμίως μία σημαντική οικονομική δραστηριότητα (Borowitzka et al. 1997).

Τα φύκη καλλιεργούνται για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων. Αρκετά είδη χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τροφής και συμπληρωμάτων διατροφής, όπως για παράδειγμα η παραγωγή πρωτεΐνης, λιπαρών οξέων, βιταμινών, ανόργανων στοιχείων κτλ. Τα προϊόντα αυτά έχουν εφαρμογή στην ανθρώπινη διατροφή, στη διατροφή ζώων, ψαριών κτλ. (Brennan & Owede 2010).

Τα μικροφύκη παρουσιάζουν αντιοξειδωτική και αντιγηραντική δράση (*Spirulina*, *Chlorella*). Η εφαρμογή τους είναι σημαντική στη φαρμακοβιομηχανία με τη παραγωγή αντικών φαρμάκων, την αντιμετώπιση καρδιαγγειακών παθήσεων (διάτομα, χλωροφύκη) και με την επιπλέον αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση τους (Brennan & Owede 2010).

Ένα από τα χαρακτηριστικά των μικροφυκών που τα καθιστά σημαντικά είναι η ικανότητά τους να βιοσυνθέτουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μεταξύ των οποίων το εικοσιπεντανοϊκό οξύ (eicosapentanoic acid – EPA) και το εικοσιδυεξανοϊκό οξύ (docosahexanoic – DHA). Τα EPA και DHA ανήκουν στην οικογένεια των ω-3 λιπαρών οξέων (Mata et al. 2010).

Τα φύκη καλλιεργούνται επίσης και για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων για γενική βιομηχανική χρήση. Τα διάφορα αυτά προϊόντα μπορεί να είναι πολυμερή, όπως άγαρ, αλγινικά άλατα, καραγενάσες κτλ., χρωστικές ουσίες όπως η χλωροφύλλη, φυκοκυανίνη, ξανθοφύλλες, καροτινοειδή κτλ. Άλλη μια σημαντική εφαρμογή τους είναι η παραγωγή λιπασμάτων και εδαφοβελτιωτικών προϊόντων (Grewe & Pulz 2012, Metting 1996).

Επίσης επειδή παράγουν βιοαιθανόλη και βιοέλαια αποτελούν κατάλληλη πηγή βιοκαυσίμων (Li et al. 2008, Sheehan 1998, Chisti 2007, Tsukahara & Sawayama 2005). Τα μικροφύκη παρουσιάζουν χαμηλό κόστος παραγωγής, απαιτούν μόνο φως και ανόργανο άνθρακα για τη παραγωγή μεγάλης ποσότητας βιομάζας σε σύντομο χρονικό διάστημα χωρίς να απαιτούν μεγάλες καλλιεργήσιμες εκτάσεις γης. Ο ρόλος τους στην επιστήμη είναι αξιοσημείωτος. Χρησιμοποιούνται σε μελέτες οικολογίας, βιοποικιλότητας, βιοχημείας, εξελικτικής βιολογίας, βιοτεχνολογίας, τοξικολογίας.

Μικροφύκη έχουν χρησιμοποιηθεί και για την απομάκρυνση βαρέων μετάλλων από διάφορα περιβάλλοντα, ειδικά σε περιοχές με βιομηχανικά απόβλητα (Khummongkol et al. 1982).

Τέλος, μεγάλη είναι η εφαρμογή των μικροφυκών στη βιομηχανία των υδατοκαλλιεργειών. Τα μικροφύκη έχουν σημαντικό διατροφικό ρόλο στα θαλάσσια ζώα του ανοικτού ωκεανού και συνεπώς αποτελούν τη φυσική τροφή πολλών εκτρεφόμενων ειδών με υψηλή θρεπτική αξία και ειδικά θρεπτικά συστατικά (λιπαρά οξέα, βιταμίνες). Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν στην καλλιέργεια διαφόρων ειδών ζωοπλαγκτού (τροχόζωα, κλαδοκεραιωτά, κωπήποδα κτλ.), όπως επίσης και ως ζωντανή τροφή στα καρκινοειδή (De Pauw 1984, Borowitzka et al. 1997).

## 1.2 Λιπαρά Οξέα

Οι ζωικοί οργανισμοί όπως τα ψάρια και δη τα θαλασσινά χαρακτηρίζονται από έλλειψη των κατάλληλων ενζύμων επιμήκυνσης και αποκορεσμού έτσι ώστε να είναι δυνατή η σύνθεση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Polyunsaturated Fatty Acids – PUFAs) με αλυσίδες που υπερβαίνουν, σε μήκος, τα 18 άτομα άνθρακα. Συγκεκριμένα τα ω-3 και ω-6 πολυακόρεστα αποτελούν τα απαραίτητα λιπαρά οξέα για αυτούς τους οργανισμούς και θα πρέπει να λαμβάνονται μέσω της τροφής. Τα ψάρια και τα ιχθυέλαια είναι κοινές πηγές πολυακόρεστων λιπαρών οξέων όμως το τελευταίο διάστημα, ανησυχίες έχουν εγείρει οι τοξίνες που αφομοιώνονται από τα ψάρια. Όσον αφορά στα ιχθυέλαια, αυτά παρουσιάζουν ορισμένα προβλήματα κατά τη χρήση τους ως πρόσθετα τροφίμων, λόγω της οσμής, της γεύσης και της πτωχής οξειδωτικής σταθερότητας που παρουσιάζουν. Οπότε, τα μικροφύκη που προέρχονται από τη θάλασσα ενδέχεται να αποτελέσουν μία νέα πηγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων για τους οργανισμούς αυτούς (Spolaore et al. 2006).

Διάφορες βιομηχανίες εκμεταλλεύονται τα μικροφύκη για να παράγουν έλαια, τα οποία χρησιμοποιούνται σαν συμπληρώματα σε διάφορα τρόφιμα και ποτά που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, αλλά και ως ενισχυτικά σε ζωοτροφές. Παραδείγματα τέτοιων τροφών είναι διάφορα τυριά, γιαούρτια, δημητριακά κτλ. (Ratledge 2004).

Τα λιπαρά οξέα είναι μονοκαρβοξυλικά οξέα με μακριά ανθρακική αλυσίδα. Διακρίνονται σε κορεσμένα λιπαρά οξέα (saturated fatty acids, SFA) αν δεν διαθέτουν διπλούς δεσμούς στην αλειφατική αλυσίδα και σε ακόρεστα λιπαρά οξέα (unsaturated fatty acids, UFA). Όταν τα τελευταία διαθέτουν ένα διπλό δεσμό ονομάζονται μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (monounsaturated fatty acids, MUFA) και όταν διαθέτουν δύο ή περισσότερους διπλούς δεσμούς ονομάζονται πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated fatty acids – PUFAs) (Ruiz-Rodriguez et al 2010). Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα διακρίνονται σε τέσσερις ομάδες (ω-3, ω-6, ω-7 και ω-9). Τα λιπαρά οξέα που ανήκουν στις ομάδες ω-6 και ω-3, αποτελούν τα απαραίτητα λιπαρά οξέα (Essential fatty acids – EFAs).

Ο γενικός τύπος των κορεσμένων λιπαρών οξέων είναι  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ , όπου  $n$  είναι ακέραιος αριθμός μεταξύ 2 και 26.

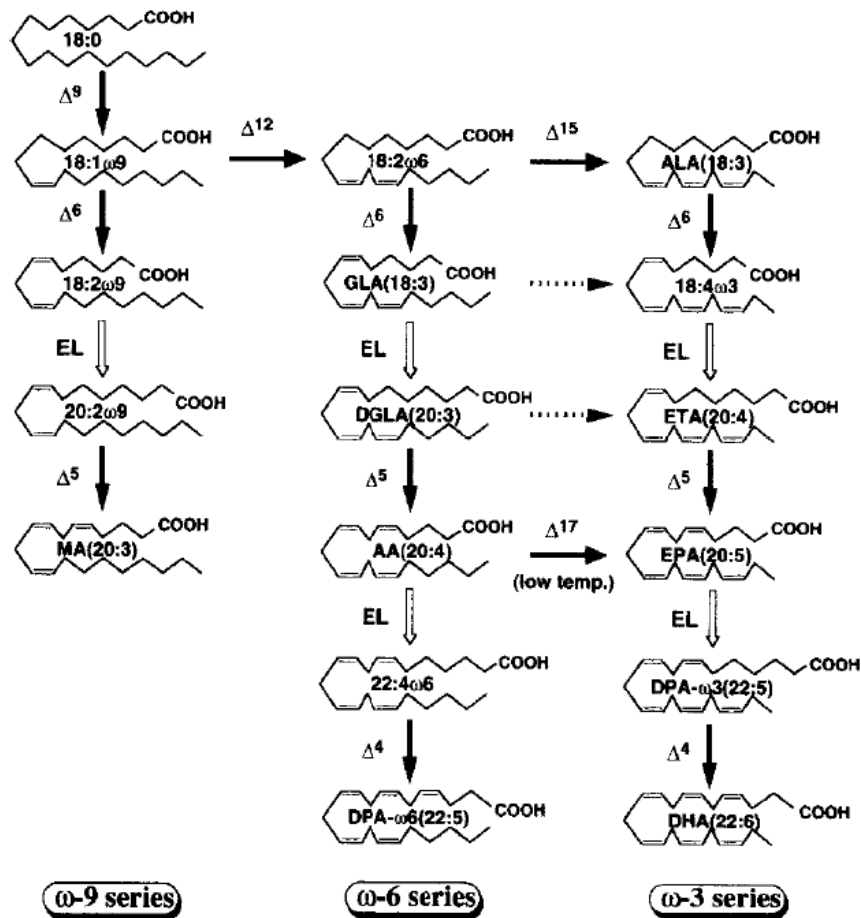
Τα λιπαρά οξέα συνήθως είναι γνωστά με τα εμπειρικά τους ονόματα αλλά χρησιμοποιείται και η συστηματική τους ονομασία προκειμένου να περιγραφεί η θέση και ο αριθμός των διπλών δεσμών. Ακόμη μπορεί να χρησιμοποιείται και η στερεοειδική αρίθμηση (πρόθεμα sn-) όπου δηλώνεται η στερεοχημεία του μορίου και σε συνδυασμό και με την προτεραιότητα των υποκαταστατών χαρακτηρίζονται τα διάφορα παράγωγα.

Πολύ συνηθισμένη γραφή επίσης είναι αυτή που βασίζεται στον αριθμό των ατόμων άνθρακα στο μόριο (π.χ. αριθμός διπλών δεσμών στο μόριο), δηλαδή το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ συμβολίζεται ως C18:1, αφού περιέχει έναν μόνο διπλό δεσμό στο μόριό του, το λινελαϊκό οξύ το οποίο περιέχει δύο διπλούς δεσμούς συμβολίζεται ως C18:2 και το λινολενικό οξύ, με τρεις διπλούς δεσμούς συμβολίζεται ως C18:3.

Στη διεθνή βιβλιογραφία, τα λιπαρά οξέα αναφέρονται με μια ιδιότυπη συντομογραφία. Για παράδειγμα το λινολεϊκό οξύ, των οποίων η συστηματική ονομασία είναι 9,12-οκταδεκαδιενοϊκό οξύ, πιο συχνά αναφέρεται ως 18:2ω-6. Ο πρώτος αριθμός (π.χ. το 18) υποδηλώνει το συνολικό αριθμό ατόμων άνθρακα της ανθρακικής αλυσίδας, ο δεύτερος αριθμός (π.χ. το 2) υποδηλώνει τον αριθμό των διπλών δεσμών, ενώ ο αριθμός μετά το πρόθεμα ω ή («n» όπως έχει επικρατήσει στη διεθνή βιβλιογραφία) καθορίζει τη θέση του πρώτου διπλού δεσμού σε εκείνο το άτομο άνθρακα της αλυσίδας αριθμώντας από την τελευταία μεθυλική ομάδα (CH<sub>2</sub>). Συγκεκριμένα για το λινολενικό οξύ η συντομογραφία 18:2ω-6 υποδηλώνει ότι το λιπαρό οξύ διαθέτει 18 άτομα άνθρακα στην αλυσίδα του και δύο διπλούς δεσμούς (πολυακόρεστο), εκ των οποίων ο πρώτος υπάρχει στο 6<sup>ο</sup> ω-άτομο άνθρακα. Το λινολενικό οξύ διαθέτει 18 άτομα άνθρακα στην αλυσίδα, τρεις διπλούς δεσμούς, ο πρώτος εκ των οποίων ανευρίσκεται στο 3<sup>ο</sup> ω-άτομο άνθρακα.

Το λινολενικό οξύ (LA, C18:2ω6) αποτελεί πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση του γ-λινολενικού (GLA, C18:3ω6) και αραχιδονικού οξέος (AA, C20:4ω6), ενώ το α-λινολενικό οξύ (ALA, C18:3ω3) αποτελεί τον προάγγελο για τη σύνθεση του εικοσιπεντενοϊκού (EPA, C20:5ω3) και του εικοσιδυοεξενοϊκού οξέος (DHA, C22:6ω3) (Tapiero et al. 2002). Η βάση της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων είναι το στεατικό οξύ (C18:0). Οι βιοχημικές αντιδράσεις σύνθεσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων παρουσιάζονται στην ακόλουθη Εικόνα 1.1:





**Εικόνα 1.1:** Βιοσυνθετική οδός *de novo* της γένεσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) (Certik & Shimizu 1999)

### 1.3 Η Περιεκτικότητα των λιπιδίων στα μικροφύκη

Στα μικροφύκη η *de novo* σύνθεση των λιπαρών οξέων συμβαίνει κυρίως στους χλωροπλάστες.

Πλήθος ειδών μικροφυκών δύνανται να χρησιμοποιηθούν για τη συλλογή μεγάλων ποσοτήτων λιπιδίων, με αποτέλεσμα την παραγωγή αντίστοιχων ποσοτήτων ελαίων. Το κατά μέσο όρο λιπιδιακό περιεχόμενο ποικίλλει από 1-70%, όμως υπό ορισμένες συνθήκες, είδη μικροφυκών ενδέχεται να φτάσουν το 90% του ξηρού βάρους (Mata et al. 2010). Τα μικροφύκη τα οποία συσσωρεύουν λιπίδια σε ποσοστό μεγαλύτερο του 20 – 25% της κυτταρικής τους μάζας, χαρακτηρίζονται ως ελαιογόνα.

Σε γενικές γραμμές, τα πολυακόρεστα και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα είναι κυρίαρχα στα περισσότερα εξετασθέντα μικροφύκη (Borowitzka 1988).

Η “de novo” βιοσύνθεση λιπιδίων και η συσσώρευση αυτών στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς είναι δευτερογενής μεταβολική διεργασία, καθώς λαμβάνει χώρα μετά την εξάντληση του αζώτου και σε θρεπτικό μέσο όπου ο άνθρακας είναι εν περισσειά. Όταν το άζωτο της καλλιέργειας εξαντληθεί, οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί, όπως τα μικροφύκη, συνεχίζουν να αφομοιώνουν την πηγή άνθρακα μετατρέποντας αυτήν σε Τριγλυκερίδια (Triacylglyceride - TAG's), τα οποία συσσωρεύονται εντός των κυττάρων (Hu et al. 2008). Υπάρχουν πολλές έρευνες με σκοπό τη βελτιστοποίηση συσσώρευσης λιπιδίων στα μικροφύκη. Οι έρευνες αυτές αναφέρονται σε μείωση του αζώτου ή του φωσφόρου στις καλλιέργειες, στο pH, στη θερμοκρασία κτλ. (Sharma et al. 2012). Στον Πίνακα 1.1, παρουσιάζονται τα βασικά λιπαρά οξέα που περιέχονται στα μικροφύκη.

Τα πιο συνήθη είδη φυκών, όπως *Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Cylindrotheca*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Schizochytrium* και *Tetraselmis* έχουν μικρό λιπιδιακό περιεχόμενο (μεταξύ 20% και 50%), όμως η παραγωγικότητά τους σε λιπίδια και βιομάζα παρουσιάζει υψηλές τιμές συγκριτικά με είδη που παρουσιάζουν υψηλό λιπιδιακό περιεχόμενο όπως το *Botryococcus braunii* (Mata et al. 2010).

Αναλύσεις, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε επτά είδη μικροφυκών του γλυκού νερού, έδειξαν ότι αυτά συνθέτουν λιπαρά οξέα με αναλογίες αριθμού ατόμων άνθρακα προς αριθμό ακόρεστων δεσμών (C:D) ίσες με C14:0, C16:0, C18:1, C18:2, C18:3. Ακόμη, η «σχετική ένταση» (relative intensity) των υπολοίπων αλυσίδων λιπαρών οξέων εξαρτάται από το είδος του μικροφύκου που χρησιμοποιείται, για παράδειγμα οι αλυσίδες C16:4 και C18:4 εμφανίζονται εντονότερα στο *Ankistrodesmus* sp., οι C18:4 και C22:6 στο *Isochrysis* sp., οι C16:2, C16:3 και C20:5 στο *Nannochloris* sp. και οι C16:2, C16:3 και C20:5 στο *Nitzschia* sp. (Mata et al. 2010).

Τα λιπίδια που παράγονται από τα μικροφύκη, δύνανται να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες, τα λιπίδια αποθήκευσης (μη-πολικά λιπίδια) και τα δομικά λιπίδια (πολικά λιπίδια). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα τριγλυκερίδια. Όσον αφορά στα δομικά λιπίδια, αυτά αποτελούν τα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης και

χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία αποτελούν απαραίτητα θρεπτικά συστατικά (Sharma et al. 2012).

**Πίνακας 1.1: Βασικά λιπαρά οξέα που περιέχονται στα μικροφύκη**

Συντομογραφία	Χημικός τύπος	Ονομασία	Σημείο τήξης (°C)
C 12:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	Δαφνικό (Λαυρικό) οξύ	44.2
C 14:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	Μυριστικό οξύ	52
C 16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	Παλμιτικό οξύ	63.1
C 16:1ω7	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Παλμιτελαϊκό οξύ	-0.5
C 18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	Στεατικό οξύ	69.6
C 18:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ελαϊκό οξύ	13.4
C18:2ω6	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	Λινελαϊκό οξύ (L)	-9
C18:3ω3	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	α – λινολενικό οξύ (ALA)	-17
C18:3ω6	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	γ – λινολενικό οξύ (GLA)	
C18:4ω3	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	Στεαριδοντικό (SDA)	
C18:5ω3	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_5\text{COOH}$	-	
C 20:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	Αραχιδικό οξύ	75.4
C 20:4ω6	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	Αραχιδονικό οξύ	-49.5
C 20:5ω3	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_5(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	Τιμνοδοντικό (EPA)	-54
C 22:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	Βεχενικό οξύ	81
C 22:6ω3	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_6\text{CH}_2\text{COOH}$	Κλουπανοδοντικό (DHA)	
C 24:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	Λιγνοκηρικό οξύ	84.2
C 24:1ω9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=(\text{CH}(\text{CH}_2)_{13})\text{COOH}$	Νερβονικό οξύ	39

(Πηγή: Tzovenis, 2001- τροποποιημένο)

Το παλμιτικό οξύ (C16:0) είναι το κυρίαρχο λιπαρό οξύ στα περισσότερα μικροφύκη. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα καταλαμβάνουν μόνο ένα ποσοστό (περίπου 1-2%) των λιπιδίων των μικροφυκών σε σχέση με τα μόρια γλυκερόλης που αποτελούν τις ακυγλυκερόλες (Nascimento et al. 2012).

Υπάρχουν μεγάλες διαφορές στη σύσταση των λιπαρών οξέων των λιπιδίων που συσσωρεύονται στα διάφορα είδη μικροφυκών, δεδομένου ότι η σύσταση επηρεάζεται και από τις διάφορες συνθήκες καλλιέργειας, τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών καθώς και από τους φυσικούς παράγοντες (θερμοκρασία, αλατότητα, φως) (Guschina & Harwood 2006).

#### **1.4 Η βιομάζα των μικροφυκών**

Η βιομάζα των μικροφυκών είναι μια πηγή πλούσια σε πρωτεΐνες, βιταμίνες, θρεπτικά συστατικά (micronutrients) και καρωτινοειδή (Kroes et al. 2003).

Τοξικολογικές μελέτες και αναλύσεις των θρεπτικών συστατικών παρουσιάζουν τη βιομάζα των μικροφυκών ως κατάλληλη για χρήση ως πρόσθετο ζωοτροφών αφού αποτελεί σημαντική πηγή πρωτεϊνών, ενώ ταυτόχρονα δεν παρουσιάζει οξεία τοξικότητα. Ακόμη, τοξικολογικές μελέτες όσον αφορά στα βαρέα μέταλλα, έδειξαν ότι δεν υπάρχει κίνδυνος από τη χρήση μικροφυκών σε ζωοτροφές (Becker 2007). Στη ζωική παραγωγή των χερσαίων ζώων υπάρχει η δυνατότητα πλήρους αντικατάστασης συμβατικών ζωοτροφών από μικροφύκη. Ενδεικτικές ζωοτροφές που μπορούν να αντικατασταθούν από μικροφύκη αποτελούν το σογιάλευρο, το ιχθυάλευρο και το πίτουρο του ρυζιού για την εκτροφή πουλερικών, χοίρων, προβάτων και ποντικών ενώ στις ιχθυοκαλλιέργειες μπορεί να χρησιμοποιηθούν είτε στα αρχικά στάδια ανάπτυξης των ψαριών (προνύμφες - νύμφες) είτε σαν συστατικό της τροφής σε μεγαλύτερες ηλικίες. Τέλος, εκτιμάται ότι περίπου το 30% της παγκόσμιας παραγωγής φυκών πωλείται ως ζωοτροφή και περισσότερο από το 50% της παγκόσμιας παραγωγής του είδους *Arthrospira* χρησιμοποιείται ως πρόσθετο στις ζωοτροφές (Becker 2004, De la Noue 1988, Spolaore 2006).

Τα κριτήρια υγιεινής και η συνεπακόλουθη νομοθεσία δεν είναι τόσο αυστηρή για τα παραπάνω όσο για την κατανάλωση των μικροφυκών ως τροφή, ή πρόσθετο σε αυτήν, στην περίπτωση του ανθρώπου (De la Noue 1988).

## 1.5 Η χρήση των μικροφυκών στις υδατοκαλλιέργειες

Τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται ως ζωντανή τροφή σε όλα τα στάδια ανάπτυξης των δίθυρων μαλακίων (π.χ. μύδια, στρείδια, χτένια κτλ.) καθώς επίσης και στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης των προνυμφών των ψαριών. Επίσης αποτελούν το μέσον εμπλουτισμού του ζωοπλαγκτού, που χρησιμοποιείται για την εκτροφή υδρόβιων οργανισμών (Brown 2002).

Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά που πρέπει να έχουν ορισμένα είδη μικροφυκών όταν καταναλώνονται ως τροφή, είναι καθορισμένα. Γενικά, τα φύκη πρέπει να είναι: μη τοξικά, να έχουν ένα αποδεκτό μέγεθος για κατάποση, το κυτταρικό τοίχωμα πρέπει να είναι εύπεπτο, και να διαθέτουν επαρκή θρεπτικά συστατικά, ενώ σημαντικό ρόλο στη διατροφική αξία των μικροφυκών αποτελεί η ποιότητα των λιπιδίων και όχι η ποσότητα. Ανάλογα με την ποσότητα και την αναλογία των απαραίτητων λιπαρών οξέων (ιδιαίτερα των ω6 και ω3) οι προνύμφες των ψαριών είναι υγιείς ή παρουσιάζουν παραμορφώσεις καθώς οι απαιτήσεις τους για τα συγκεκριμένα λιπαρά οξέα είναι πολύ συγκεκριμένες (De Pauw et al. 1984).

Εκτός από πρωτεΐνες, απαραίτητα λιπαρά οξέα και ενέργεια συνολικά τα μικροφύκη, μέσω της τροφικής αλυσίδας, μεταφέρουν βιταμίνες, χρωστικές, και στερόλες. Με την προσθήκη καλλιέργειας μικροφυκών στις δεξαμενές εκτροφής ψαριών, η παραγωγή αυξάνεται. Αυτό γίνεται μέσω ενός συνδυασμού διαφόρων μηχανισμών που σχετίζονται με τη διατήρηση της θρεπτικής ποιότητας του ζωοπλαγκτού, την έκκριση διάφορων βιταμινών από τα μικροφύκη και την προβιοτική τους επίδραση στα ψάρια (Brown 2002).

Τα ψάρια περιέχουν μεγάλες συγκεντρώσεις σε DHA (22:6ω-3), EPA (20:5ω-3) και ArA (20:4ω-6) στα φωσφογλυκερίδια των κυτταρικών τους μεμβρανών. Ειδικά τα πρώτα δύο πολυακόρεστα κυριαρχούν σε όλα τα φωσφογλυκερίδια εκτός της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης, όπου κυριαρχεί το 20:4ω-6. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στον οργανισμό αφού διατηρούν τη ρευστότητα και τη διαπερατότητα των κυτταρικών τους μεμβρανών και παρέχουν τις κατάλληλες

ενδοκυτταρικές συνθήκες για τις διάφορες περιβαλλοντικές μεταβολές της θερμοκρασίας και της αλατότητας.

Τα απαραίτητα λιπαρά οξέα χρειάζονται στον οργανισμό των ψαριών για τη φυσιολογική ανάπτυξη και την αναπαραγωγή τους. Μια δίαιτα με μειωμένα λιπαρά οξέα προκαλεί διάφορες παθολογικές καταστάσεις και πολλές φορές συντελεί στο θάνατο των ψαριών. Οι Castell *et al.* (1972) αναφέρουν ότι η διαιτητική έλλειψη των λιπαρών οξέων οδηγούν σε πτωχή ανάπτυξη αλλά και σε χαμηλό συντελεστή αφομοίωσης της τροφής επίσης, η έλλειψή τους οδήγησε στον εκφυλισμό και στη σήψη των πτερυγίων της ιριδίζουσας πέστροφας και του καλκανιού και σε εκφυλισμό του χρωματισμού τους.

Γενικότερα, η έλλειψη των λιπαρών οξέων από τη διατροφή των ψαριών οδηγεί σε μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας των ψαριών, σε μειωμένο αριθμό παραγόμενων αυγών, καθώς και σε μειωμένη εκκόλαψη και αύξηση των δυσμορφιών στις νεο-εκκολαπτόμενες νύμφες (Bae *et al.* 2010).

Είναι γεγονός ότι οι βιομηχανικές τροφές δεν μπορούν να καλύψουν επαρκώς τις διατροφικές ανάγκες των περισσότερων ψαριών, ιδιαίτερα των θαλάσσιων ειδών, είτε διότι οι ανάγκες αυτές δεν είναι επαρκώς γνωστές (τα τεχνητά σιτηρέσια είναι ελλιπή σε κάποια θρεπτικά στοιχεία), είτε διότι είναι τεχνολογικά δύσκολο έως αδύνατο να ενσωματωθούν όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά σε τόσο μικρούς κόκκους.

Αντίθετα, οι ζωντανοί τροφικοί οργανισμοί ικανοποιούν πλήρως τις διατροφικές ανάγκες των ιχθυονυμφών και είναι δυνατόν να εμπλουτισθούν περαιτέρω με διάφορα θρεπτικά συστατικά που κρίνονται απαραίτητα για τη σωστή ανάπτυξη των ψαριών. Κάποια είδη χρειάζονται ζωντανούς πλαγκτικούς οργανισμούς στην αρχή της διατροφής τους, μέχρι την ωρίμανση του πεπτικού τους συστήματος. Τα τελευταία τριάντα χρόνια τα εκκολαπτήρια, μαζί με τις νύμφες των ψαριών ή άλλων εκτρεφόμενων οργανισμών, παράγουν μαζικά τρεις διακριτούς τύπους πλαγκτικών οργανισμών τους οποίους χρησιμοποιούν για τη διατροφή τους:

Μικροφύκη (2-20μm) για την εκτροφή ψαριών, δεκαπόδων, τροχοζώων, διθύρων

Τροχόζωα (50-200μm) για την εκτροφή καρκινοειδών και θαλάσσιων ψαριών

Artemia (400-800µm) για την εκτροφή καρκινοειδών και ψαριών (Τσιόνκη 2013).

Παρά το γεγονός ότι έχει βελτιωθεί η τεχνολογία των καλλιεργειών των μικροφυκών, το κόστος της εντατικής καλλιέργειας μικροφυκών παραμένει υψηλό και αντιπροσωπεύει το 30-40% του συνολικού κόστους ενός εκκολαπτηρίου (Robert & Gérard 1999).

Η ξηρή βιομάζα καθώς και οι διάφορες πάστες συμπυκνωμένων μικροφυκών, παρουσιάζονται ως υποσχόμενη τροφή, τουλάχιστον για τα νεαρά άτομα (Robert & Trintignac 1997). Συμπυκνώματα μικροφυκών που προέκυψαν με φυγοκέντριση και στη συνέχεια συντηρήθηκαν με ψύξη στους 2-4 °C, χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία ως μέρος ή ως αποκλειστική τροφή νυμφών και νεαρών ατόμων οστρακοειδών (Nell & O'Connor 1991, McCausland et al. 1999; Heasman et al. 2000).

### **1.6 Καλλιέργεια μικροφυκών**

Η εμπορική καλλιέργεια μικροφυκών μεγάλης κλίμακας, ξεκίνησε στις αρχές του 1960 στην Ιαπωνία με την καλλιέργεια του μικροφύκου *Chlorella* (Tsukada et al. 1977). Έπειτα στις αρχές του 1970 ξεκίνησε η καλλιέργεια του κυανοβακτηρίου *Spirulina* στη λίμνη Texcoco, στο Μεξικό από την εταιρεία Sosa Texcoco S.A. (Durand-Chastel 1980). Το 1977 η εταιρεία Dai Nippon Ink and Chemicals Inc. στην Ταϊλάνδη προχώρησε στην παραγωγή του μικροφύκου *Spirulina* και μέχρι το 1980 περισσότερα από 46 εργοστάσια στην Ασία παρήγαγαν > 1000kg/μήνα μικροφύκη (κυρίως *Chlorella*) (Kawaguchi 1980). Το 1996 στην Ιαπωνία παρήχθησαν περίπου 2000t του μικροφύκου *Chlorella* (Lee 1997). Το 1986 η παραγωγή του μικροφύκου *Dunaliella salina* ως πηγή β-καρωτινίου, έγινε η 3<sup>η</sup> κύρια βιομηχανική παραγωγή μικροφυκών, όταν ιδρύθηκε στη Αυστραλία η εταιρεία Western Biotechnology Ltd and Betatene Ltd. Σύντομα ακολούθησαν και άλλες χώρες όπως το Ισραήλ και οι ΗΠΑ. Παράλληλα ξεκίνησε και η παραγωγή μεγάλης κλίμακας κυανοβακτηρίων στην Ινδία (Venkatamaran 1986).

Η επιτυχία της μεγάλης-κλίμακας παραγωγής μικροφυκών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων είναι η ανάπτυξη αποδοτικών συστημάτων καλλιέργειας των μικροφυκών (Borowitzka 1999).

#### 1.6.1 Συστήματα καλλιέργειας

Η καλλιέργεια των μικροφυκών μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους: σε ανοικτούς ή κλειστούς τύπους καλλιεργειών (Εικόνα 1.2). Στις ανοικτού-τύπου καλλιέργειες, τα μικροφύκη καλλιεργούνται σε τεχνητούς ή φυσικούς επωαστικούς χώρους, όπως είναι οι δεξαμενές, νερόλακκοι, λίμνες κλπ. Στις κλειστού-τύπου καλλιέργειες η ανάπτυξη φυκών γίνεται εντός διαφόρων σχημάτων κλειστών επωαστικών χώρων που ονομάζονται φωτοβιοαντιδραστήρες (photobioreactors). Οι φωτοβιοαντιδραστήρες δεν επιτρέπουν την άμεση επαφή της καλλιέργειας με τις εξωτερικές συνθήκες και έτσι την προστατεύουν από τους διάφορους περιβαλλοντικούς κινδύνους (Pulz 2001, Richmond 1992).

##### 1.6.1.1 Ανοικτού / κλειστού τύπου καλλιέργειες

Τα **ανοιχτά συστήματα** (ανοιχτές λίμνες – open ponds) αποτελούν τα παλαιότερα και απλούστερα συστήματα για μαζική καλλιέργεια μικροφυκών. Στα συστήματα αυτά οι συνθήκες ανάπτυξης ταυτίζονται με τις φυσικές συνθήκες στις οποίες αυτά αναπτύσσονται (Wiley et al. 2011). Το κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας των ανοικτών συστημάτων είναι χαμηλότερο σε σύγκριση με αυτό των κλειστών συστημάτων και συνήθως προσφέρουν καλές προοπτικές μαζικής καλλιέργειας μικροφυκών (Jorquera et al. 2010).

Ορισμένα από τα μειονεκτήματα των ανοικτών συστημάτων είναι τα εξής:

- 1) Επειδή είναι ανοικτά στον αέρα, συχνά υπάρχει απώλεια νερού λόγω εξάτμισης και η παραγωγή βιομάζας είναι περιορισμένη
- 2) Η μικρή αποτελεσματικότητα και αξιοποίηση του CO<sub>2</sub>
- 3) Η δυσκολία που υπάρχει στο να διατηρηθούν οι ιδανικές συνθήκες καλλιέργειας καθώς και η δυσκολία ανάκτησης της βιομάζας που αυξάνει σημαντικά το κόστος (Ryan 2009).



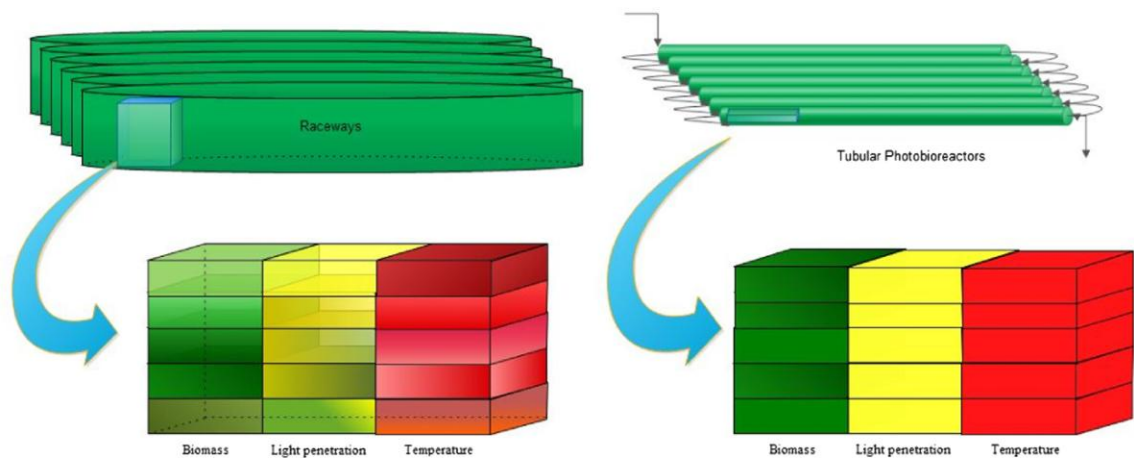
Ο κυριότερος τύπος ανοιχτών τεχνητών δεξαμενών είναι η επιμήκης λεκάνη (raceway) και η κυκλική λεκάνη. Ως βέλτιστο βάθος της δεξαμενής θεωρείται αυτό μεταξύ των 20 – 30 cm (Borowitzka 1999).

Στις **καλλιέργειες κλειστού τύπου**, οι συνθήκες είναι περισσότερο ή λιγότερο ελεγχόμενες, αναλόγως αν πρόκειται για καλλιέργειες στεγασμένες ή υπαίθριες. Τα κλειστά συστήματα έχουν σχεδιαστεί για να ξεπερνούν τα προβλήματα μόλυνσης και εξάτμισης που εμφανίζονται στα ανοιχτά συστήματα. Οι κλειστού τύπου καλλιέργειες πραγματοποιούνται σε κλειστούς επωαστικούς χώρους, τους φωτοβιοαντιδραστήρες (photobioreactors).

Τα υλικά κατασκευής και τα σχήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων ποικίλλουν κατά πολύ. Αυτό εξαρτάται από τις διαφορετικές απαιτήσεις των κυττάρων ως προς τις συνθήκες καλλιέργειας και την αξία των παραγόμενων προϊόντων. Υπάρχουν φωτοβιοαντιδραστήρες επίπεδοι σαν ηλιακοί συλλέκτες κατακόρυφοι ή κεκλιμένοι, κυλινδρικοί με επιμήκεις αγωγούς κατασκευασμένοι από διάφορα διάφανα υλικά (γυαλί ή πλαστικό), ή ελικοειδούς μορφής. Επίσης απλής κατασκευής φωτοβιοαντιδραστήρες θεωρούνται αυτοί του τύπου σάκων πολυαιθυλενίου (Brennan & Owende 2010, Chisti 2007).

Το μειονέκτημα αυτού του τύπου των καλλιεργειών είναι το αυξημένο κόστος κατασκευής και λειτουργίας, όπως και η περιορισμένη δυνατότητα να κατασκευαστούν σε μεγάλης κλίμακας εγκαταστάσεις (scaled-up). Ένας από τους κυριότερους λόγους για την περιορισμένη δυνατότητα κατασκευής σε μεγάλης-κλίμακας εγκαταστάσεις είναι η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου στο υγρό υπόστρωμα ανάπτυξης. Το διαλυμένο οξυγόνο θα πρέπει να απομακρύνεται με κάποιον τρόπο επειδή οι μεγάλες συγκεντρώσεις διαλυμένου οξυγόνου είναι ανασταλτικές της ανάπτυξης οπότε μερικές φορές σε συνδυασμό με υψηλές εντάσεις φωτός προκαλείται φωτοοξειδωση (Molina et al. 2001).

Μερικά από τα πλεονεκτήματα αυτού του τύπου καλλιέργειας είναι: η ελαχιστοποίηση των μολύνσεων, η αποφυγή της εξάτμισης, οι υψηλές συγκεντρώσεις των κυττάρων κτλ.



**Εικόνα 1.2.** Γραφική αναπαράσταση η οποία απεικονίζει τις διαβαθμίσεις: στη συγκέντρωση της βιομάζας, στη διείσδυση του φωτός και στη θερμοκρασία στις ανοικτού τύπου δεξαμενές σε σύγκριση με τους φωτοβιοαντιδραστήρες. Οι φωτοβιοαντιδραστήρες υπερέχουν των ανοικτών δεξαμενών, παρέχοντας ισοδύναμες συγκεντρώσεις βιομάζας καθώς και ισοδύναμη κατανομή του φωτός και της θερμοκρασίας (Πηγή: Bharathiraja et al. 2015).

## 1.7 Φυσικοχημικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών

Η ανάπτυξη οποιωνδήποτε φυτών, καθώς και του φυτοπλαγκτού, απαιτεί φως, διοξείδιο του άνθρακα και νερό για τη φωτοσύνθεση, καθώς και διαλυμένα θρεπτικά συστατικά και κατάλληλη θερμοκρασία περιβάλλοντος για τη μεταβολική τους δραστηριότητα.

### 1.7.1 Φως

Η διαθεσιμότητα του ηλιακού φωτός, ως πηγή ακτινοβολούμενης ενέργειας, είναι ένα χαρακτηριστικό της πρωτογενούς παραγωγής.

Στις καλλιέργειες μικροφυκών η διάρκεια, ένταση και ποιότητα του φωτισμού είναι καθοριστικοί παράγοντες για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Η ποιότητα του φάσματος του φωτός και η ένταση αυτού πρέπει να επιλέγονται με τέτοιον τρόπο ώστε να επιτρέπεται η μέγιστη ανάπτυξη των μικροφυκών. Το φάσμα του αξιοποιούμενου φωτός από τα μικροφύκη είναι μεταξύ 400-700 nm (ενεργή φωτοσυνθετική ακτινοβολία). Ο φωτισμός είναι σε γενικές γραμμές ο καθοριστικότερος παράγοντας για την ανάπτυξη των μικροφυκών και ειδικά στις ανοικτού τύπου καλλιέργειες συνήθως είναι και ο περιοριστικός παράγοντας (Janssen 2002, Suh & Lee 2003).

Ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροφυκών αυξάνεται με την αύξηση της έντασης της ακτινοβολίας μέχρι ενός ορίου. Τα περισσότερα μικροφύκη κορέννουνται σε ένταση φωτισμού μεταξύ 200 και 400  $\mu\text{E m}^{-1} \text{s}^{-1}$ , αλλά αυτό εξαρτάται από την πυκνότητα της καλλιέργειας. Μετά το όριο αυτό ο ρυθμός ανάπτυξης παραμένει σταθερός και από ένα σημείο και έπειτα μειώνεται λόγω της βλάβης που υφίστανται τα κύτταρα λόγω φωτοοξειδωσης (Carvalho et al. 2011, Fernandes et al. 2010, Molina Grima et al. 1999).

### 1.7.2 Θερμοκρασία

Οι μεταβολές της θερμοκρασίας επιδρούν στη φυσικοχημική συμπεριφορά του φυτοπλαγκτού, στον χρόνο παραμονής του στην καλλιέργεια, στη σταθερότητά του και στην ταχύτητα με την οποία προσλαμβάνεται από τους θαλάσσιους οργανισμούς. Οι θερμοκρασίες που γενικά θεωρούνται ως πρότυπες σε πειράματα είναι οι 7, 12, 17, 22 και 27°C (Καρύδης 2001). Πολλά μικροφύκη έχουν την ικανότητα να αντέξουν θερμοκρασίες μέχρι και 15°C χαμηλότερα από τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους, αλλά υπάρχει πιθανότητα με μια μεταβολή της τάξης των 2-4°C επάνω από το βέλτιστο σημείο να υπάρξει πλήρης απώλεια της καλλιέργειας (Richmond 1999).

Η εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας για ένα είδος ή στέλεχος είναι πολύ σημαντική καθώς μόνο σε αυτήν υπάρχει και βέλτιστη αύξηση.

### 1.7.3 Αλατότητα

Υπάρχουν διαφοροποιήσεις στη συνολική περιεκτικότητα του άλατος στο νερό, όπως διακυμάνσεις από το υφάλμυρο νερό των εκβολών στις υψηλές αλατότητες της ανοικτής θάλασσας. Ως συνέπεια αυτού παρουσιάζονται και διαφορετικές χωρικές κατανομές των φυτοπλαγκτικών οργανισμών. Μερικοί φυτοπλαγκτικοί οργανισμοί δύνανται να επιζήσουν και να αυξηθούν σε βιότοπους με διαφορετικές αλατότητες, όπως είναι οι εκβολές (Boney 1995).

Η αλατότητα σε ανοιχτά και κλειστά συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη και τη σύνθεση των κυττάρων των μικροφυκών. Κάθε είδος μικροφύκους έχει διαφορετικό επιθυμητό εύρος αλατότητας. Η περιεκτικότητα αλάτων στις καλλιέργειες μπορεί να αυξηθεί κατά την περίοδο των θερινών μηνών

λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας και κατ' επέκταση της εξάτμισης. Η αλατότητα επηρεάζει τα φύκη με τρεις τρόπους. 1) προκαλώντας ωσμωτική καταπόνηση (ωσμωτικό στρες) λόγω υψηλής συγκέντρωσης αλάτων, 2) προκαλώντας ιοντική καταπόνηση λόγω υψηλής ιοντικής ισχύος, 3) μεταβάλλοντας την εκλεκτική διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης ιόντων. Η πιο εύκολη λύση για τον έλεγχο της αλατότητας είναι η προσθήκη γλυκού νερού ή άλατος όταν απαιτείται (Mata et al. 2010).

#### 1.7.4 pH

Το pH είναι άλλος ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τον ρυθμό ανάπτυξης των μικροφυκών σε καλλιέργειες. Τα περισσότερα μικροφύκη αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με pH που κυμαίνεται μεταξύ 7 – 9 (Νικολάου 2016). Απότομη μεταβολή στο pH μπορεί να έχει καταστροφικές επιπτώσεις στην καλλιέργεια. Στην περίπτωση της υψηλής πυκνότητας της καλλιέργειας των μικροφυκών, η προσθήκη του διοξειδίου του άνθρακα επιτρέπει την αύξηση του pH, το οποίο μπορεί να φθάσει στις οριακές τιμές του 9, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυκών. Το pH ρυθμίζεται με ρυθμιστικά διαλύματα (NaOH, HCl, Tris, HEPES) (Τσιόνκη 2013).

#### 1.7.5 CO<sub>2</sub>

Το CO<sub>2</sub> αποτελεί την κύρια πηγή άνθρακα, ο οποίος μαζί με το άζωτο, τον φώσφορο και το κάλιο χρησιμοποιούνται ως θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη των φυκών. Τα μικροφύκη ως φωτοσυνθέτοντες μικροοργανισμοί μετατρέπουν την ηλιακή ενέργεια και τον ανόργανο άνθρακα (CO<sub>2</sub>) μέσω πολύπλοκων βιοχημικών διεργασιών σε οργανικό άνθρακα (γλυκόζη). Το CO<sub>2</sub> όταν είναι διαλυμένο στο νερό για τις τιμές του pH όπου αναπτύσσονται τα περισσότερα μικροφύκη, υφίσταται είτε σε μορφή διτανθρακικής ρίζας (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) είτε σε μορφή ανθρακικής ρίζας (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> σε μεγαλύτερες τιμές pH). Τα φύκη (με εξαίρεση ορισμένες κατηγορίες όπως για παράδειγμα τα ροδοφύκη) έχουν έναν μηχανισμό (carbon concentrating mechanism) κατά τον οποίο το διαλυμένο CO<sub>2</sub> συγκεντρώνεται γύρω από το κύτταρο και είτε ο άνθρακας απορροφάται ως διτανθρακική ρίζα είτε με τη βοήθεια ενζύμων (carbonic anhydrase) απορροφάται σε μορφή CO<sub>2</sub> (Badger& Price 2003, Giordano et al. 2005).

Στα ανοιχτά συστήματα χρησιμοποιείται το CO<sub>2</sub> της ατμόσφαιρας. Όταν το ατμοσφαιρικό CO<sub>2</sub> δεν επαρκεί, ακολουθεί τεχνητή εισαγωγή. Στα κλειστά συστήματα η αξιοποίηση του ατμοσφαιρικού CO<sub>2</sub> δεν είναι δυνατή και έτσι προστίθεται με τεχνητά μέσα, ως διάλυμα ανόργανου άνθρακα, για την εξασφαλισμένη ανάπτυξη των φυκών (Lundquist et al. 2010).

#### 1.7.6 Θρεπτικά στοιχεία

Για να επιτευχθεί αύξηση, τα φύκη (και τα ανώτερα φυτά) απαιτούν ένα μεγάλο εύρος μεταλλικών θρεπτικών (mineral nutrients), εκτός του φωτός, του νερού και του άνθρακα. Τέτοια μεταλλικά θρεπτικά συνήθως προσλαμβάνονται μέσω πρωτεϊνικών μεταφορέων εντοπισμένων στην πλασματική μεμβράνη, μολονότι μερικά φύκη προσλαμβάνουν επίσης μεταλλικά στοιχεία «καταναλώνοντας» σωματίδια όπως βακτηριακά κύτταρα.

Τα κυριότερα θρεπτικά στοιχεία (**μακροστοιχεία**) εκτός από τον άνθρακα, που είναι αναγκαία για τα φύκη, είναι το άζωτο (N), ο φώσφορος (P), το κάλιο (K) και σε ορισμένες περιπτώσεις (π.χ. διάτομα) το πυρίτιο (Si). Αναγκαία αλλά σε μικρότερες ποσότητες, είναι και τα **μικροστοιχεία** όπως το θείο (S), ο σίδηρος (Fe), το μαγνήσιο (Mg), το ασβέστιο (Ca), καθώς και διάφορα άλλα μέταλλα (π.χ. μολυβδαίνιο, νικέλιο, βανάδιο, κ.λπ.) (Richmond 2004).

Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζονται συνοπτικά τα θρεπτικά στοιχεία τα οποία είναι συνήθως απαιτούμενα από τα φύκη.

Ύψιστης σημασίας για την ανάπτυξη των φυκών είναι τα επίπεδα και οι αναλογίες των ανόργανων θρεπτικών (N:P:S) και κυρίως οι συγκεντρώσεις του αζώτου. Για τα διάτομα σημαντική είναι η πηγή πυριτίου. Τα θρεπτικά πρέπει να είναι ευκόλως διαλυτά, να προσλαμβάνονται άμεσα από τα φύκη και να υφίστανται σε μη περιοριστικές συγκεντρώσεις (Τσιόνκη 2013). Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυκών αποτελούν και κάποιες μικρές ποσότητες οργανικών ενώσεων, όπως οι βιταμίνες B12, B6, B1 (θειαμίνη), βιοτίνη.

**Πίνακας 1.2.** Ανόργανα στοιχεία συνήθως απαιτούμενα για την ανάπτυξη των περισσότερων φυκών.

	<b>Στοιχείο</b>	<b>Παραδείγματα λειτουργίας/εντοπισμού σε κύτταρα φυκών</b>
<b>μακροθρεπτικά</b>	<b>N</b>	αμινοξέα, νουκλεοτίδια, χλωροφύλλη, φυκοβιλίνες
	<b>Si</b>	θήκες διατόμων, σκελετοί πυριτιομαστιγωτών, φολίδες φυκών τύπου-Synura και τοιχώματα στοματοκύστεων, τοιχώματα <i>Cladophora</i> τύπου-Ulva
	<b>P</b>	ATP, DNA, φωσφολιπίδια
	<b>K</b>	άγαρ και καρραγενάνη, οσμωτική ρύθμιση (ιοντική μορφή), συμπαράγοντας πολλών ενζύμων
<b>μικροθρεπτικά</b>	<b>Cl</b>	παραγωγή οξυγόνου στη φωτοσύνθεση, τριχλωροαιθυλένιο, υπερχλωροαιθυλένιο
	<b>S</b>	ορισμένα αμινοξέα, νιτρογενάση, λιπίδια θυλακοειδών, CoA, καρραγενάνη, άγαρ, DSMP, βιοτίνη
	<b>Na</b>	νιτρική αναγωγή
	<b>Ca</b>	αλγινικά, ανθρακικό ασβέστιο, καλμοδουλίνη
	<b>Mg</b>	χλωροφύλλη
	<b>Fe</b>	φερρεδοξίνη, κυτοχρώματα, νιτρογενάση, αναγωγή νιτρωδών και νιτρικών, καταλάση, γλουταμική συνθετάση, συμπαράγοντας της υπεροξειδικής δισμουτάσης
<b>ιχνοστοιχεία</b>	<b>Mo</b>	νιτρική αναγωγή, νιτρογενάση
	<b>Mn</b>	σύμπλοκο του φωτοσυστήματος II με διάχυση οξυγόνου, χιτωνίσκος υπό μορφή θήκης (lorica) ορισμένων ευγληνοειδών και του χλωροφύτου <i>Dysmorphococcus</i> , υπεροξειδική δισμουτάση
	<b>Zn</b>	καρβονική ανυδράση, αλκοολική αφυδρογονάση, γλουταμική αφυδρογονάση
	<b>Cu</b>	πλαστοκυανίνη, κυτοχρωμική οξειδάση
	<b>Co</b>	βιταμίνη B12
	<b>V</b>	βρωμο-υπεροξειδάση, μερικές νιτρογενάσες
	<b>Br, I</b>	αλογονωμένες ενώσεις με αντιμικροβιακές, αντιφυτοβόρες, ή αλληλοπαθητικές λειτουργίες.

(Πηγή: Graham et al., 2008 - τροποποιημένο)

## 1.8 Φάσεις της Κυτταρικής Ανάπτυξης

Η γνώση της διαδικασίας της κυτταρικής ανάπτυξης των μικροφυκών είναι απαραίτητη για την κατανόηση της λειτουργίας των μικροοργανισμών αυτών κατά τη διάρκεια της καλλιέργειάς τους. Η κυτταρική ανάπτυξη των μικροφυκών περιλαμβάνει τις εξής πέντε φάσεις: (1) η λανθάνουσα φάση ή φάση επώασης, (2) η εκθετική φάση, (3) η φάση του φθίνοντος ρυθμού ανάπτυξης, (4) η στατική φάση και (5) η φάση θανάτου (FAO 2013).

1. Λανθάνουσα φάση: Τα κύτταρα προσαρμόζονται στις συνθήκες περιβάλλοντος, χωρίς να πολλαπλασιάζονται. Στη φάση αυτή αυξάνονται τα ένζυμα και οι μεταβολίτες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των κυττάρων και τη δέσμευση άνθρακα. Καλλιέργειες οι οποίες εμβολιάζονται με εκθετικώς αναπτυσσόμενα μικροφύκη έχουν μικρές λανθάνουσες φάσεις, γεγονός που οδηγεί σε σημαντική μείωση του απαιτούμενου χρόνου για τη μετάβαση στη βιομηχανική κλίμακα (upscaling).

2. Εκθετική φάση: Η πυκνότητα των κυττάρων αυξάνεται εκθετικά συναρτήσει του χρόνου βάσει της εξίσωσης:  $C_t = C_0 * e^{mt}$ , όπου  $C_t$  και  $C_0$  είναι οι συγκεντρώσεις των κυττάρων τις χρονικές στιγμές  $t$  και  $0$  αντιστοίχως, ενώ  $e^{mt}$  είναι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, ο οποίος εξαρτάται από διάφορες συνθήκες όπως το είδος των μικροφυκών, την ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας και τη θερμοκρασία.

3. Φάση φθίνοντος ρυθμού ανάπτυξης: η ανάπτυξη των κυττάρων αναστέλλεται, λόγω εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών.

4. Στατική φάση: Οι παράγοντες ανάπτυξης εξαντλούνται και τοξικά μεταβολικά προϊόντα συσσωρεύονται. Στη φάση αυτή αναπτύσσεται ισορροπία μεταξύ του ρυθμού ανάπτυξης και του ρυθμού θανάτου με αποτέλεσμα η πυκνότητα των κυττάρων να παραμένει σταθερή.

5. Φάση θανάτου: Η ποιότητα του νερού υποβαθμίζεται, τα θρεπτικά συστατικά εξαντλούνται κι έτσι η πυκνότητα των κυττάρων μειώνεται. Άλλες παράμετροι που οδηγούν στο ίδιο αποτέλεσμα είναι η έλλειψη οξυγόνου, οι θερμοκρασιακές μεταβολές και οι μεταβολές στο pH (FAO 2013).

Στόχος μιας καλλιέργειας μικροφυκών είναι η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη παραμονή των κυττάρων στην εκθετική φάση. Στη φάση αυτή η θρεπτική αξία καθώς και η ανθεκτικότητα των παραγομένων μικροφυκών είναι αυξημένες (Lavens & Sorgeloos 1996).

### **1.9 Μικτές καλλιέργειες μικροφυκών**

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι ανάπτυξης μικροφυκών για υδατοκαλλιέργειες (Borowitzka 1997, De Pauw 1984):

Ένας τρόπος είναι η ανάπτυξη μονοκαλλιέργειας, για παράδειγμα όταν απαιτείται τροφή υψηλής διατροφικής αξίας ή όταν απαιτούνται καλλιέργειες φυκών χωρίς βακτήρια με μειωμένο κίνδυνο εισαγωγής ανεπιθύμητων παθογόνων σε ζωικές καλλιέργειες. Η κύρια δυσκολία, ειδικά με τις μεγάλης-κλίμακας μονοκαλλιέργειες, είναι ότι τα μικροφύκη είναι ευαίσθητα σε ιούς, βακτήρια, μύκητες και εκτίθενται σε θηρευτές όπως τα πρωτόζωα, τα τροχόζωα κ.λ.π. (Mata et al. 2010).

Ένας άλλος τρόπος είναι η ανάπτυξη φυσικών μικτών πληθυσμών φυτοπλαγκτού, οι οποίοι συλλέγονται απ'ευθείας από το φυσικό περιβάλλον και εμπλουτίζονται με τις κατάλληλες θρεπτικές ουσίες. Μικτές καλλιέργειες είναι δυνατόν να αναπτυχθούν και με την επιλεκτική μίξη κάποιων στελεχών μικροφυκών. Τα κύρια μειονεκτήματα της χρήσης φυσικού φυτοπλαγκτού είναι η έλλειψη ελέγχου της παραγωγής, η κατανάλωση από ανεπιθύμητους θηρευτές (π.χ. πρωτόζωα) και οι μολύνσεις από άλλα είδη τα οποία είναι καλύτερα προσαρμοσμένα στις υπάρχουσες περιβαλλοντικές συνθήκες και στα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά. Μια ελεγχόμενη προσέγγιση των φυτοπλαγκτικών εξάρσεων (algae blooms) είναι ο διαχωρισμός τους από τους καταναλωτές τους, δηλ. η πρόκληση αρχικά των φυτοπλαγκτικών εξάρσεων με την προσθήκη των απαραίτητων θρεπτικών ουσιών και στη συνέχεια η εισαγωγή των καταναλωτών τους (De Pauw 1984). Επίσης, τα καλλιεργημένα μικροφύκη είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν άμεσα ως ζωντανή τροφή ή έμμεσα ως πρόσθετα σε συμπυκνωμένη μορφή μετά τη συγκομιδή (pellet) (Mata et al. 2010).

Το ενδιαφέρον για τη μαζική καλλιέργεια μικροφυκών ως πηγή πρωτεΐνης ξεκίνησε τη δεκαετία του '50. Επειδή δεν έχουν όλα τα είδη των φυκών την ίδια διατροφική



αξία για τα εκτρεφόμενα ζώα, τα είδη που κυριαρχούν στις ανοικτές καλλιέργειες είναι τόσο σημαντικά όσο και η παραγωγικότητα της βιομάζας των μικροφυκών. Η ανάγκη για καλλιέργεια συγκεκριμένων ειδών θαλάσσιων μικροφυκών στις υδατοκαλλιέργειες έχει οδηγήσει σε μελέτες ως προς τους παράγοντες που επηρεάζουν τον ανταγωνισμό των ειδών σε μια μικτή καλλιέργεια. Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την εμπορική καλλιέργεια συγκεκριμένων ειδών μικροφυκών απαιτεί τη μεγιστοποίηση της παραγωγικότητας της βιομάζας αλλά επιπλέον απαιτεί να παραμένουν κυρίαρχα τα επιθυμητά είδη στις καλλιέργειες. Ο μόνος πρακτικός και οικονομικός τρόπος για τον έλεγχο των κυρίαρχων ειδών στις ανοικτές καλλιέργειες είναι να δημιουργηθούν οι συνθήκες που δίνουν το πλεονέκτημα σε συγκεκριμένα είδη να κυριαρχούν. Μερικοί από τους παράγοντες που αναμένεται να επηρεάσουν την κυριαρχία των ειδών είναι: ο θρεπτικός περιορισμός, η μέση θερμοκρασία, η αλατότητα και η μέση ένταση του φωτός. Τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες για την πρόβλεψη των αποτελεσμάτων του ανταγωνισμού μεταξύ των ειδών για τις διαφορετικές απαιτήσεις των ανταγωνιστικών ειδών στους περιοριστικούς παράγοντες. Η απαίτηση ενός είδους στους πόρους ορίζεται ως το ποσό που ένα είδος χρειάζεται προκειμένου να έχει έναν ρυθμό ανάπτυξης ίσο με το ποσοστό απώλειάς του σε μια συνεχή καλλιέργεια. Όταν πολλά είδη ανταγωνίζονται για τον ίδιο περιοριστικό παράγοντα μειώνεται το επίπεδο αυτού στο περιβάλλον μέχρι να επιζήσουν μόνο τα είδη με τις χαμηλότερες απαιτήσεις στον παράγοντα αυτό. Τα κυρίαρχα είδη σε μια καλλιέργεια μπορεί να είναι 1-3 και κυριαρχούν σε σταθερή κατάσταση ανεξάρτητα από τις αρχικές συνθήκες. Ο πιο καθοριστικός παράγοντας για τη κυριαρχία των ειδών είναι η θερμοκρασία (Τσιόνκη 2013).

### **1.10 Οικονομικότητα και αειφορία**

Τα συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών είναι πολύπλοκα και το κόστος παραγωγής βιομάζας είναι μεγάλο. Τα κυριότερα υποσυστήματα που συμβάλλουν ιδιαίτερα στο αυξημένο κόστος παραγωγής είναι τα εξής: α) σύστημα φωτισμού, β) θέρμανση / ψύξη, γ) ανάδευση, δ) συγκομιδή, στ) χρήση θρεπτικών στοιχείων. Οι ανοικτές δεξαμενές, οι οποίες είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες για καλλιέργειες μικροφυκών σε μεγάλη κλίμακα, είναι και αυτές που έχουν το μικρότερο κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας (Norsker et al. 2011).

Πολλά από τα προαναφερθέντα υποσυστήματα, όπως για παράδειγμα η εγκατάσταση συστήματος θέρμανσης/ψύξης στις δεξαμενές ανάπτυξης των μικροφυκών, αυξάνουν κατά πολύ το κόστος παραγωγής της μονοκαλλιέργειας. Επομένως, μια οικονομικότερη επιλογή θα ήταν η ανάπτυξη μικτής καλλιέργειας διαφόρων στελεχών μικροφυκών. Τα στελέχη μικροφυκών στις μικτές καλλιέργειες παρουσιάζουν διάφορες βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης.

Οι περισσότερες καλλιέργειες μικροφυκών σήμερα, είναι μονοκαλλιέργειες. Υπάρχουν πολλοί λόγοι που συμβαίνει αυτό, αλλά ο κυριότερος λόγος είναι ότι κάποια συγκεκριμένα στελέχη μικροφυκών καλλιεργούνται για την παραγωγή προϊόντων μεγάλης διατροφικής αξίας όπως για παράδειγμα τα μικροφύκη *Arthrospira (Spirulina)*, *Chlorella*, *Dunaliella* κ.λ.π. Όταν πρόκειται όμως για την παραγωγή προϊόντων, όπως τα λιπίδια, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός διαφόρων στελεχών μικροφυκών τα οποία παράγουν λιπίδια σε μεγάλα ποσοστά και αυτά τα στελέχη τείνουν να έχουν βέλτιστους ρυθμούς ανάπτυξης σε ποικίλες συνθήκες. Έτσι οι μικτές καλλιέργειες μικροφυκών έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών (Johnson & Admassu 2013).

### **1.11 Μέτρηση της βιομάζας του φυτοπλαγκτού**

Ιστορικά, η αφθονία του φυτοπλαγκτού είχε μετρηθεί και εκφραστεί ως κυτταρικοί αριθμοί. Έτσι οι μετρήσεις έχουν καθιερώσει τέσσερα βασικά χαρακτηριστικά της δυναμικής του φυτοπλαγκτού όπου η αφθονία του ποικίλλει συνήθως:

- ♦ με το βάθος,
- ♦ την εποχικότητα,
- ♦ την περιοχή και
- ♦ τη διαδοχή των απαντώμενων ειδών.

Η βιομάζα μπορεί να μετρηθεί άμεσα από διάφορες αναλύσεις (χλωροφύλλες, ATP, άνθρακα, άζωτο, κ.λ.π.) ή έμμεσα από την απαρίθμηση του πληθυσμού. Οι μετρήσεις της βιομάζας παρέχουν μετρήσεις μερικών κοινών συνιστωσών από ολόκληρο τον πληθυσμό ο οποίος αντανακλά αριθμητικά την αφθονία (Sournia 1978).

## 1.12 Ταξινόμηση των μικροφυκών

Τα μικροφύκη συνιστούν μια πολυφυλετική και πολυποίκιλη ομάδα προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών. Η ταξινόμηση των μικροφυκών βασίζεται σε έναν μεγάλο αριθμό κριτηρίων που αφορά στις ιδιότητες και στα χαρακτηριστικά τους. Η ταξινόμηση σε διαιρέσεις βασίζεται σε διάφορες ιδιότητες όπως η υπερδομή, η φύση των κυτταρικών αποθηκευτικών προϊόντων, η σύνθεση των χρωστικών, η οργάνωση των φωτοσυνθετικών μεμβρανών και άλλα μορφολογικά χαρακτηριστικά (Carlsson et al. 2007).

Η ταξινόμηση των μικροφυκών είναι πολύπλοκη και κάπως αμφιλεγόμενη. Μέχρι το πρόσφατο παρελθόν, τα πλείστα των νέων ειδών των φυκών είχαν εντοπισθεί, και καθιερωθεί με περιγραφές, σύμφωνα με τη μορφολογική έννοια του είδους (Graham et al. 2008, Proschold & Leliart 2007 ).

Τα φύκη δεν είναι δυνατόν να ταξινομηθούν σε μια ενιαία ομάδα προερχόμενη από έναν κοινό πρόγονο. Ταξινομούνται σε 12 φύλα (divisions, phyla). Οι κύριες ομάδες των μικροφυκών με τα άτυπα ονόματά τους είναι: κυανοβακτήρια, γλαυκόφυτα, χλωραραχινόφυτα, ευγληνοειδή, κρυπτομονάδες, απτόφυτα, δινομαστιγωτά, φωτοσυνθετικά σταχυομαστιγωτά, ροδοφύκη, καθώς και χλωροφύκη. Συγκεκριμένες φωτοσυνθετικές χρωστικές, αποταμιευτικές ουσίες και ο τύπος του κυτταρικού περιβλήματος χαρακτηρίζουν κάθε φύλλο (Graham 2011).

Κατά την εξελικτική ιστορία, οι φωτοσυνθετικοί ευκαρυώτες διαχωρίστηκαν σε δύο μεγάλες γενεαλογίες: τη γενεαλογία των «πράσινων» φυκών – green algae (σημ. επικράτησε στην ελληνική τα green algae να καλούνται χλωροφύκη) και τη γενεαλογία των ροδοφυκών - red algae (η οποία αρχικά περιελάμβανε τα διάτομα και τα δινομαστιγωτά) (Falkowski et al. 2004). Αυτές οι δύο γενεαλογίες έχουν διαφοροποιηθεί πριν από  $\approx 1.100$  εκατομμύρια χρόνια, σύμφωνα με τις εκτιμήσεις του μοριακού ρολογιού (Yoon et al. 2004), σηματοδοτώντας την αρχή της διαφοροποίησης των φυκών στον ωκεανό. Υπάρχει μια σειρά από θεμελιώδεις διαφορές μεταξύ αυτών των γενεαλογιών (Falkowski et al. 2004), ιδιαίτερα σε σχέση με την περιεκτικότητά τους σε χρωστικές ουσίες, τη σύνθεση των κυτταρικών ιχνοστοιχείων και τη σύνθεση των γονιδίων των πλαστιδίων. Τα “πράσινα” φύκη

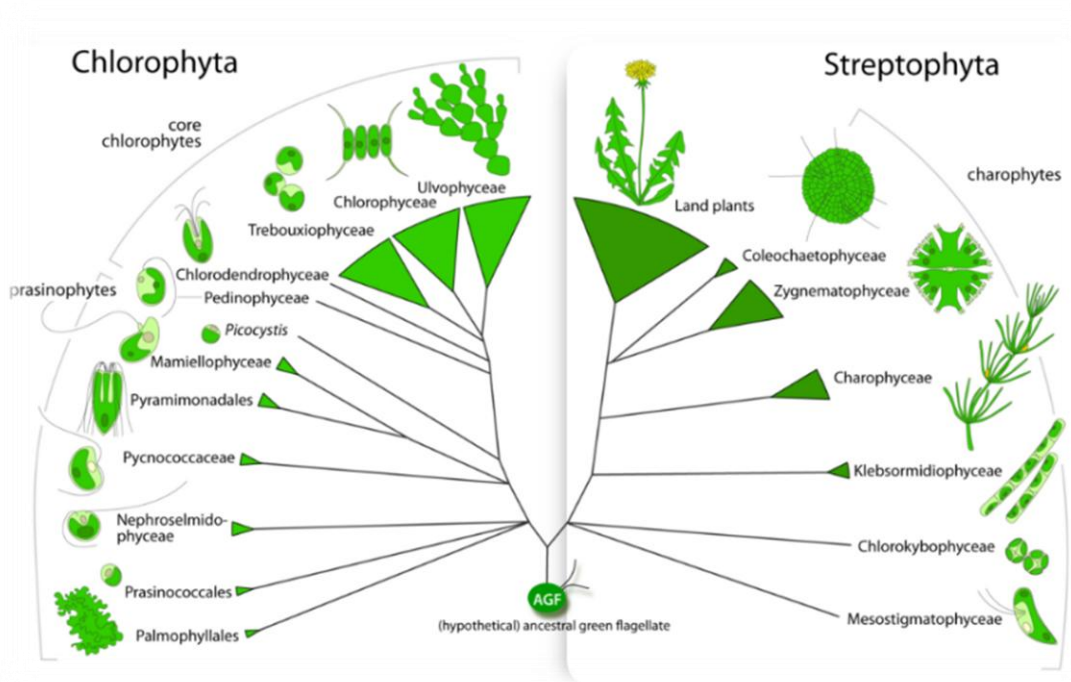
διαθέτουν χλωροφύλλη b ως βοηθητική χλωροφύλλη, ενώ τα φύκη από την κόκκινη γενεαλογία φέρουν κυρίως χλωροφύλλη c (δηλ. ο χλωροπλάστης τους εξελίχθηκε από τα Ροδόφυτα μετά από δευτερογενή ενδοσυμβίωση), επηρεάζοντας τις αντίστοιχες ιδιότητες απορρόφησης φωτός και τελικά τη διανομή τους στα υδάτινα περιβάλλοντα. Τα φύκη από την κόκκινη γενεαλογία προέρχονται συχνά από δευτερογενή ή τριτογενή ενδοσυμβίωση και ο χλωροπλάστης τους περιβάλλεται από τρεις ή τέσσερις μεμβράνες, ενώ τα φύκη από την πράσινη γενεαλογία προέρχονται κυρίως από πρωτογενή ενδοσυμβίωση και ο χλωροπλάστης τους περιβάλλεται από δύο μόνο μεμβράνες (Tragin 2016). Φύκη που ζουν μέσα στα κύτταρα άλλων οργανισμών σε μια σταθερή σύμπραξη (‘ένωση’, association) αντιπροσωπεύουν περιπτώσεις ενδοσυμβίωσης (endosymbiosis), ένα φαινόμενο που έχει επηρεάσει έντονα την εξέλιξη των φυκών. Ενδοσυμβιωτικές ‘ενώσεις’ πραγματοποιούνται όταν φύκη διαβιούν μέσα σε κύτταρα ή ιστούς άλλων οργανισμών, ή όταν τα κύτταρα άλλων οργανισμών διαβιούν μέσα σε κύτταρα φυκών. Κατά την ενδοσυμβίωση, οργανισμοί διακριτού τύπου, γνωστοί ως ενδοσυμβιώτες (endosymbionts), ενσωματώνονται στα κύτταρα ενός διαφορετικού είδους, γνωστού ως ξενιστής (host). Μετά από μια χρονική περίοδο, τα ενδοσυμβιωτικά κύτταρα, τα οργανίδια, ή οι γονιδιωματικές συνιστώσες συγχωνεύονται εντός του ξενιστή, διαμορφώνοντας μια γενετική χίμαιρα (chimera) (Graham et al. 2011).

Η εξελικτική ιστορία αυτών των γενεαλογιών πιθανόν είναι περισσότερο πολύπλοκη από ό,τι είχε αρχικά θεωρηθεί. Απολιθώματα δείχνουν ότι κατά τη διάρκεια της Παλαιοζωικής Εποχής, τα «πράσινα» φύκη κυριαρχούσαν και έτσι επέτρεψαν τον εποικισμό των χερσαία οικοσυστήματα οδηγώντας στην εμφάνιση των φυτών της ξηράς (Harholt et al. 2015). Ωστόσο, από την Τριαδική εποχή, οι κύριες ομάδες του ευκαρυωτικού φυτοπλαγκτού ανήκαν στην κόκκινη γενεαλογία (Falkowski et al. 2004).

Φυλογενετικές αναλύσεις της υπομονάδος SSU του rDNA, υποστηρίζουν ότι υπάρχουν δύο κύριες καταγωγές στα πράσινα φυτά (Friedl 1997). Η πρώτη γενεαλογία περιλαμβάνει τα Στρεπτόφυτα (Streptophyta) και η άλλη τα Χλωρόφυτα (Chlorophytes) (Εικόνα 1.3) (Picket-Heaps & Marchant 1972, Bremer 1985, Lemieux et al. 2007). Τα χλωρόφυτα γνωστά και ως χλωροφύκη (green algae), διαθέτουν ποικίλους τύπους θαλλού, εγγενείς αναπαραγωγικούς κύκλους, εμφανίζονται δε σε

ποικίλα ενδιαιτήματα. Τα χλωροφύκη μοιράζονται πολλά μοριακά, βιοχημικά, κυτταρικά και αναπαραγωγικά γνωρίσματα με τα φυτά της ξηράς, ενώ ο όρος Viridiplantae χρησιμοποιείται ευρέως για να ονομάσει μια εξελικτική σειρά αποτελούμενη από χλωροφύκη και φυτά της ξηράς (Graham et al. 2011). Τα Viridiplantae έχουν κατά το μάλλον ή ήττον στενή συγγένεια με τα ροδοφύκη, από κοινού μάλιστα έχουν συνδεθεί με μία ή περισσότερες πρόσθετες εξελικτικές σειρές φυκών προς σχηματισμό μιας ευκαρυωτικής υπερομάδος ποικίλης ονομασίας: Plantae (Cavalier-Smith 1993), Archaeplastida (Adl et al. 2005), ή Plastidophila (Kim & Graham 2008).

Τα Στρεπτόφυτα τα οποία μετονομάστηκαν σε χαρόφυτα (Charophytes) (Graham et al. 2011) περιλαμβάνουν ένα σύνολο παραφυλετικών φυκών του γλυκού νερού από τα οποία εξελίχθησαν τα φυτά της ξηράς. Τα χαρόφυτα κυμαίνονται σε μορφολογία από μονοκύτταρους έως σύνθετους πολυκύτταρους οργανισμούς, απαντώνται κυρίως σε γλυκά νερά και σε μικρότερο βαθμό σε χερσαίους οικοτόπους (Leliart et al. 2012).



**Εικόνα 1.3.** Σχηματική απεικόνιση της γενεαλογίας των Χλωρόφυτων και των Στρεπτόφυτων. (Πηγή: Leliart et al. 2012 - τροποποιημένο στις 25/10/2013 από Leliart: <https://frederikleliaert.files.wordpress.com>).

Τα «πράσινα» μικροφύκη αποτελούν τη βάση των 'ευρύτερων χλωροφυκών' (green lineage) (Nakayama et al. 1998), οδηγώντας στην υπόθεση ότι ο κοινός πρόγονος των «πράσινων» φυκών και των φυτών της ξηράς θα μπορούσε να είναι ένα προγονικό

πράσινο μαστιγοφόρο (ancestral green flagellate - AGF) το οποίο σχετίζεται στενά με τα Χλωρόφυτα (Chlorophyta) (Leliart et al. 2012). Μια λεπτομερής γνώση της ποικιλίας των «πράσινων μικροφυκών» είναι απαραίτητη για την ανοικοδόμηση των φυλογενετικών σχέσεων των ‘ευρύτερων χλωροφυκών’ (Tragin et al. 2016).

Τα πρασινόφυτα (prasinophytes) τα οποία συνιστούν μια πολυφυλετική ομάδα, αποκλίνουν από τα υπόλοιπα χλωρόφυτα, αλλά οι σχέσεις μεταξύ τους παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άλυτες, κυρίως επειδή τα δεδομένα πολλών γονιδίων είναι διαθέσιμα μόνο για περιορισμένο αριθμό ειδών (Leliart et al. 2012).

Τα χλωρόφυτα αποτελούνται από δύο βασικές ομάδες: τα πρασινόφυτα (prasinophytes) και τα “κεντρικά” χλωρόφυτα (“core” chlorophytes) (Leliart et al. 2012, Fucikova et al. 2014).

Τα πρασινόφυτα αποτελούνται από εννέα μεγάλες γενεαλογίες μικροφυκών, που αντιστοιχούν σε διαφορετικές ταξινομικές ιδιότητες και πιθανόν να αυξηθούν σε επίπεδο τάξης στο μέλλον (Leliart et al. 2012). Αυτές οι γενεαλογίες έχουν κάποια κοινά προγονικά χαρακτηριστικά όπως τα μαστίγια. Πριν περίπου 10 χρόνια, στα πρασινόφυτα εισήχθη ο κλάδος VII (Guillou et al. 2004). Τέσσερα χρόνια αργότερα, αναφέρθηκαν οι κλάδοι VIII και IX (Virey et al. 2008). Τα πρασινόφυτα είναι δυνατόν να διακριθούν σε τρεις ανεπίσημες ομάδες (Marin & Melkonian 2010): μια ομάδα «βασικών» γενεαλογιών (“basal” lineages) (Prasinococcales, Pyramimonadales, Mamiellophyceae), μια ομάδα «ενδιάμεσων» γενεαλογιών (“intermediate” lineages) (Pseudoscourfieldiales, clade VII, Nephroselmidophyceae) και μια ομάδα «ύστερων» αποκλινόντων γενεαλογιών (“late” lineage) (Pedinophyceae και Chlorodendrophyceae). Προσφάτως, αυτές οι δύο “ύστερες” αποκλινούσες γενεαλογίες έχουν συγχωνευθεί με τα Ulvophyceae-Trebouxiophyceae-Chlorophyceae (UTC) στα “κεντρικά” χλωρόφυτα (Fučíková et al. 2014).

Στο θαλάσσιο περιβάλλον, υπάρχουν ελάχιστα δεδομένα για την ποικιλότητα, την οικολογία και την κατανομή του «πράσινου» φυτοπλαγκτού, δεδομένου ότι οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε ομάδες όπως τα διάτομα ή τα δινομαστιγωτά. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια τα χλωροφύκη έχουν παρουσιάσει σημαντικό οικονομικό ενδιαφέρον και χρησιμοποιούνται σε διάφορους

βιομηχανικούς τομείς, όπως οι υδατοκαλλιέργειες, τα βιοκαύσιμα και η φαρμακευτική (Gómez P.I. και González M.A. 2004).

Μια ακριβής φυλογενετική ανακατασκευή μιας προγονικής ομάδας όπως τα «πράσινα» φυτά, θα απαιτήσει μια πλούσια δειγματοληψία, τόσο από υποδειγματικά taxa όσο και από μοριακούς δείκτες, σε συνδυασμό με την εξέλιξη των φυλογενετικών τεχνικών. Η ταχεία αύξηση του ποσού των γονιδιωματικών δεδομένων για ένα ευρύ φάσμα χλωροφυκών, έχει μεγάλες δυνατότητες στην επίλυση των σχέσεών τους. Επιπλέον αυτά τα δεδομένα αποτελούν τη βάση για τις έρευνες της μοριακής εξέλιξης των γονιδίων και των γονιδιωμάτων, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες για την εξελικτική ιστορία των χλωροφυκών (Leliart et al. 2012).

#### 1.12.1 Μέθοδοι ταξινόμησης των μικροφυκών

##### 1.12.1.1 Κλασική ταξινομική

Με τον όρο **κλασική ταξινόμηση**, αναφερόμαστε στο σύνολο εκείνο των μεθοδολογιών που χρησιμοποιούν μορφολογικά και φυσιολογικά κριτήρια για την κατάταξη των οργανισμών σε ταξινομικές ομάδες. Οι βασικές μέθοδοι ταξινόμησης που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των μικροφυκών είναι αυτές της παρατήρησης στο φωτονικό και στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Μέχρι πρόσφατα, η ταξινόμηση των μικροφυκών είχε βασιστεί αποκλειστικά και μόνο με βάση μορφολογικά κριτήρια.

Από τις παρατηρήσεις αυτές προέκυψαν αρκετές κλειδές, οι οποίες χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα στην αναγνώριση του γένους. Ωστόσο, η φωτονική μικροσκοπία δίνει ανεπαρκή στοιχεία για την ασφαλή διάκριση τόσο σε επίπεδο γένους όσο και σε επίπεδο είδους, κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο με βάση το μικρό μέγεθος των κυττάρων. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίστηκε με την Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (ΗΜΔ), μέσω της οποίας κατέστη δυνατή η παρατήρηση της λεπτής εσωτερικής δομής των κυττάρων (Melkonian 1979). Με τον τρόπο αυτό ήταν δυνατή η αναγνώριση χαρακτήρων οι οποίοι δεν είναι ορατοί στο οπτικό μικροσκόπιο, όπως η δομή του πυρηνοειδούς των κυττάρων, η αρχιτεκτονική και δομή της μαστιγιακής συσκευής κ.λ.π. Οι χαρακτήρες αυτοί επέτρεψαν την θέσπιση σαφέστερων και

ασφαλέστερων κριτηρίων για τη διάκριση των στελεχών του γένους σε επίπεδο είδους (Χαντζηστρούντσιου 2014).

#### 1.12.1.2 Φυλογενετική ανάλυση των μικροφυκών – μοριακές τεχνικές

Η έννοια της φυλογενετικής ανάλυσης εισάγεται για πρώτη φορά από τους Zuckerkandl & Pauling (1965) τον 20ο αιώνα με στόχο την εξέταση της εξέλιξης μέσω αλληλουχιών μακρομοριακών υποομάδων (κυρίως πρωτεϊνών και DNA) (Staley 2006). Βασική αρχή της φυλογενετικής ανάλυσης αποτελεί η παραδοχή της ακολουθίας του ολικού DNA ως προτύπου αναφοράς η οποία καθορίζει την ταξινόμηση (Wayne et al. 1987). Μακρομόρια, νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες, αποτελούν αντίγραφα ή μεταφράσεις της γενετικής πληροφορίας και ως εκ τούτου αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για την ανάλυση φυλογενετικών σχέσεων (Murray et al., 1990).

Στα μέσα της δεκαετίας του '80, η εφαρμογή της φυλογενετικής ανάλυσης και των μοριακών δεικτών εισήχθη επίσης στη συστηματική και ταξινομική των μικροφυκών. Οι πρώτες φυλογενετικές αναλύσεις έγιναν με το γονίδιο 5.8S του πυρηνικού ριβοσωμικού nrDNA, σύντομα ακολούθησαν και οι αναλύσεις αλληλουχιών των γονιδίων 18S και 28S του nrDNA (Gunderson et al. 1987, Perasso et al. 1989, Buchheim et al. 1990, Zechman et al. 1990, Chapman et al. 1991, Mishler et al. 1992, Chapman et al. 1998). Οι ριβοσωμικές αλληλουχίες επιλέχθηκαν την εποχή εκείνη διότι ήταν δυνατή η απόκτηση αρκετού ριβοσωμικού RNA για άμεση αλληλούχιση και (αργότερα) επειδή οι περιοχές του γονιδίου ήταν δυνατόν να διατηρηθούν ώστε να δημιουργηθούν καθολικοί εκκινητές (universal primers).

Από το 1990 και μετά, η ραγδαία εξέλιξη των τεχνικών της μοριακής βιολογίας (π.χ. η χρήση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης – PCR) και της βιοπληροφορικής έκαναν δυνατή την παραγωγή και ανάλυση μεγαλύτερου όγκου δεδομένων. Οι αλληλουχίες του κωδικοποιημένου πυρηνικού γονιδίου 18S ήταν μέχρι πρόσφατα, η κύρια πηγή δεδομένων για την εξαγωγή των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των «πράσινων» φυκών (Proschold & Leliaert 2007), στη συνέχεια ακολούθησαν και οι αλληλουχίες του 28S rDNA (Buchheim et al. 2001), της ακτίνης (An et al. 1999) και των χλωροπλαστικών γονιδίων rbcL, tufA και atpB (Daugbjerg et al. 1994, Nozaki et al. 2003). Ωστόσο, οι αναλύσεις μεμονωμένων γονιδίων έχουν



μόνο μερικώς επιλύσει τις σχέσεις μεταξύ των κυριότερων γενεαλογιών των «πράσινων» φυκών. Είναι πλέον σαφές ότι ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων από πολλά είδη πρέπει να αναλυθεί για να καταλήξουμε σε μια αξιόπιστη φυλογενετική ανάλυση για μια αρχαία ομάδα, όπως είναι τα «πράσινα» φύκη (Philippe & Telford 2006).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσης μελέτης είναι η παραγωγή βιομάζας θαλάσσιων μικροφυκών με τις κατάλληλες τεχνικές ανάπτυξης μικτής καλλιέργειας φυσικού φυτοπλαγκτού (natural algal bloom, NAB) για παραγωγή βιομάζας με χρήση στις υδατοκαλλιέργειες.

Οι **βασικοί στόχοι** για τη διεξαγωγή του πειράματος είναι:

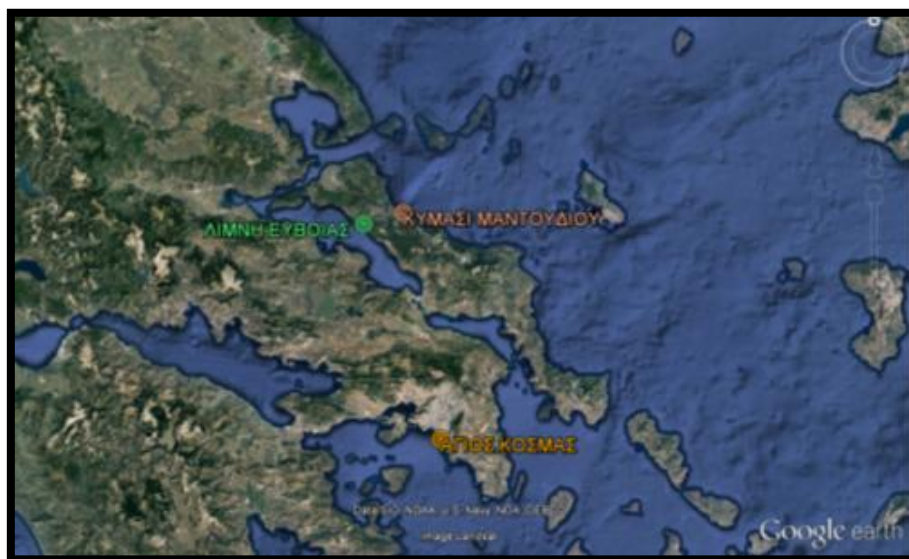
- ❖ Η επιτυχής ανάπτυξη μικτών θαλάσσιων καλλιεργειών (NAB) από τις εξής περιοχές:
  - ♦ Άγιος Κοσμάς, Σαρωνικός Κόλπος (Οκτώβριος, 2015)
  - ♦ Λίμνη Ευβοίας, Ευβοϊκός Κόλπος (Δεκέμβριος, 2015)
  - ♦ Κυμάσι Ευβοίας, Αιγαίο Πέλαγος (Μάρτιος, 2016)
- ❖ Η επίδραση της ποσότητας θρεπτικών στην ανάπτυξη των μικτών καλλιεργειών
- ❖ Η απομόνωση και ταυτοποίηση των κυρίαρχων ειδών
- ❖ Ο χαρακτηρισμός των κυρίαρχων ειδών των μικροφυκών ως προς:
  - ♦ το μέγεθός τους,
  - ♦ το ξηρό τους βάρος
  - ♦ τη χημική ανάλυση και το προφίλ των λιπαρών οξέων
- ❖ Ο συσχετισμός της παραγωγικής ικανότητας και των λιπαρών (gr/lt λιπαρών που παράγονται από την κάθε μικτή καλλιέργεια).

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- Συλλογή υλικού στο πεδίο (Λιμάνι Αγίου Κοσμά, Λίμνη Ευβοίας – Ευβοϊκός Κόλπος, Λιμάνι Μαντουδίου Ευβοίας – Αιγαίο Πέλαγος)
- Ανάπτυξη μικτών καλλιεργειών στο εργαστήριο, απομόνωση κυρίαρχων ειδών και χαρακτηρισμός τους
- Αναβάθμιση (scale-up) σε φιάλες του 1,5lt με εντατικές συνθήκες για παραγωγή βιομάζας μικτών πληθυσμών
- Προσδιορισμός των χαρακτηριστικών της βιομάζας:
  - Ξηρού βάρους
  - Χρωστικών
  - Προφίλ λιπαρών

#### 3.1 Περιοχές συλλογής θαλασσινού νερού

Οι παράκτιες περιοχές συλλογής του θαλασσινού νερού για την ανάπτυξη των μικτών καλλιεργειών μικροφυκών της συγκεκριμένης εργασίας αναγράφονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.1 και παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.1.



**Εικόνα 3.1:** Χάρτης απεικόνισης των περιοχών δειγματοληψίας (Πηγή: Google Earth, Ημερομηνία εικόνων 14/12/2015).

**Πίνακας 3.1:** Περιοχές συλλογής θαλασσινού νερού

Συλλογή θαλασσινού νερού	Περιοχή Δειγματοληψίας	Συνθήκες θαλασσινού νερού	Συντεταγμένες περιοχής σε προβολικό σύστημα WGS84
<b>1<sup>η</sup> (20/10/2015)</b>	Αγ. Κοσμάς, Αττικής (Σαρωνικός κόλπος)	Αλατότητα: 40‰ Θερμοκρασία: 23,2 °C pH: 8,11	ΓΠ: 37°53'28.48"B ΓΜ: 23°43'2.78"A
<b>2<sup>η</sup> (13/12/2015)</b>	Λίμνη (Ν. Ευβοίας, Ευβοϊκός Κόλπος)	Αλατότητα: 41‰ Θερμοκρασία: 16,5 °C pH: 7,83	ΓΠ: 38°45'49.97"B ΓΜ: 23°19'3.71"A
	Κυμάσι Μαντουδίου, <u>Διμάνι</u> (Ν. Ευβοίας, Αιγαίο πέλαγος).	Αλατότητα: 40‰ Θερμοκρασία: 19 °C pH: 7,50	ΓΠ: 38°48'35.94"B ΓΜ: 23°31'26.20"A
<b>3<sup>η</sup> (28/02/2016)</b>	Κυμάσι Μαντουδίου, <u>Εκβολή ποταμού Κυμασιώτη</u> (Ν. Ευβοίας, Αιγαίο πέλαγος).	Αλατότητα: 38‰ Θερμοκρασία: 17 °C pH: 7,30	ΓΠ: 38°48'42.29"B ΓΜ: 23°31'1.04"A

Κατά τη συλλογή θαλασσινού νερού στην εκάστοτε περιοχή, πραγματοποιήθηκε διήθηση στα 100μm, ώστε να απομακρυνθεί το μεσο/μακρο φυτο/ζωο-πλαγκτόν. Στο δείγμα παραμένει ναοπλαγκτόν (< 20μm) και μικροπλαγκτόν (<100μm).

### 3.2 Εργαστηριακή μέθοδος καλλιέργειας φυκών

Έπειτα από τη συλλογή του θαλασσινού νερού, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο η ανάπτυξη/καλλιέργεια και η άνθιση των μικτών καλλιεργειών και η παρακολούθηση αυτών σε διαφορετικές συνθήκες (αλατότητα, θρεπτικά).

Ο εμπλουτισμός έγινε με το θρεπτικό μέσο Conway (Walne 1970), και την προσθήκη βιταμινών και πυριτικών αλάτων.

Αρχικά η ανάπτυξη των καλλιεργειών έγινε σε πλαστικές φιάλες του 1,5 lt. Σε κάθε φιάλη προστέθηκε αντλία συνεχόμενης ροής παροχής αέρος, η οποία εξυπηρετεί την ανάδευση του υγρού καλλιέργειας και τη μετατόπιση των φυκών ώστε να δέχεται ηλιακή ενέργεια όλη η βιομάζα. Έπειτα τα στόμια των φιαλών καλύφθηκαν με πώμα (βαμβάκι) και οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο με φυσικές συνθήκες φωτισμού και θερμοκρασίας.

Η παρακολούθηση των καλλιεργειών ήταν καθημερινή με ποιοτικό (μικροσκοπία) και ποσοτικό έλεγχο (αιμοκυτταρόμετρο).

Για να αποκτηθούν καλλιέργειες μεγαλύτερου όγκου γίνεται διαδοχική αναβάθμιση των μικρότερων όγκων. Ο τελικός όγκος των καλλιεργειών φτάνει το 1 1/2 λίτρο και χρησιμοποιούνται πλαστικές φιάλες των δύο λίτρων.

Στη συνέχεια από τις καλλιέργειες με τους βέλτιστους ρυθμούς ανάπτυξης έγινε επανάληψη του πειράματος σε τρεις φιάλες, όπου χρησιμοποιήθηκαν οι προηγούμενες καλλιέργειες ως μητρικές και έγινε η ανανέωση με την προσθήκη 300 ml μητρικής καλλιέργειας σε 1200 ml νερού αντίστοιχης αλατότητας καθώς και ο εμπλουτισμός με το θρεπτικό μέσο Conway (Walne), πυριτικών αλάτων και βιταμινών στις κατάλληλες αναλογίες. Οι ανανεωμένες καλλιέργειες εμπλουτίζονται με τις αντίστοιχες αναλογίες θρεπτικών και βιταμινών. Σε όλα τα στάδια απαιτούνται ημι - ασηπτικές συνθήκες.

Καθημερινά την ίδια ώρα, πραγματοποιείται δειγματοληψία και ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος του δείγματος.

Με το πέρας της πειραματικής διαδικασίας, γίνεται εκ νέου επανάληψη του πειράματος με την ίδια διαδικασία που προαναφέρθηκε. Όταν οι καλλιέργειες είναι

στη μετα-εκθετική φάση, 3 δείγματα από κάθε καλλιέργεια διηθούνται υπό κενό με σκοπό να γίνει η μέτρηση του ξηρού τους βάρους. Η διήθηση γίνεται με φίλτρα GF/C, τα οποία προηγουμένως έχουν ζυγιστεί σε αναλυτικό ζυγό 5 δεκαδικών ψηφίων (Mettler Toledo XS105, Germany). Έπειτα τα φίλτρα που συλλέγουν το δείγμα τοποθετούνται σε φούρνο ξηρής θερμότητας στους 60 °C για όλη τη νύχτα. Αφού έρθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με ξηραντήρα κενού, ζυγίζονται ξανά στον αναλυτικό ζυγό. Επίσης με τον ίδιο τρόπο διηθούνται 3 επιπλέον δείγματα από κάθε καλλιέργεια και τοποθετούνται στην κατάψυξη στους -20 °C, με σκοπό να προσδιοριστεί το προφίλ των λιπαρών οξέων των μικτών καλλιεργειών. Η ανάλυση για τον προσδιορισμό του προφίλ των λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της άμεσης εστεροποίησης (Lepage & Roy 1986). Στη συνέχεια ακολούθησε Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδος (Thin Layer Chromatography - TLC) με χρήση πλακιδίων silica gel για τον καθαρισμό των δειγμάτων από χρωστικές. Τα δείγματα εφαρμόστηκαν σε αέριο χρωματογράφο (GLC Varian 3300, Sugar Land, TX, USA) σύμφωνα τους (Fountoulaki et al., 2009). Η ταυτοποίηση των λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκε με την σύγκριση του χρόνου συγκράτησης του κάθε λιπαρού οξέως με τον αντίστοιχο χρόνο μείγματος πρωτύπου (Supelco 37 Component FAME Mix standard USA), ενώ η ποσοτικοποίηση με την χρήση εσωτερικού πρωτύπου 19:0 (methyl nonadecanoate) γνωστής συγκέντρωσης (0.1mg/μl).

Στη συνέχεια παρουσιάζεται η αναλυτική πειραματική διάταξη των μικτών καλλιεργειών για την κάθε περιοχή συλλογής θαλασσινού νερού, πριν τη διαδοχική αναβάθμιση του τελικού όγκου των καλλιεργειών (1 1/2 λίτρο).

### 3.2.1 1<sup>η</sup> Συλλογή θαλασσινού νερού - Αγ. Κοσμάς, Αττικής (Σαρωνικός κόλπος)

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος των καλλιεργειών σε τρεις διαφορετικές αλατότητες (25 ‰, 40 ‰, 60 ‰) και σε 2 διαφορετικά επίπεδα θρεπτικών αζώτου – φωσφόρου (0.145 – 0.29mMol PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> και 1,18 – 2,36 mMol NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), τα οποία εφεξής θα ονομάζουμε 1W και 2W αντιστοίχως. Η διανομή του θαλασσινού νερού έγινε σε 18 πλαστικές φιάλες των 2lt, όπου η κάθε φιάλη περιείχε 1,5 lt για την πραγματοποίηση του πειράματος. Η πειραματική διάταξη των καλλιεργειών φαίνεται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2. Αναλυτική πειραματική διάταξη καλλιιεργειών από την 1<sup>η</sup> συλλογή θαλασσινού νερού (Περιοχή Αγ. Κοσμά – Σαρωνικός κόλπος).

ΜΙΚΤΕΣ				
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ (%)	WALNE (ml)	ΠΥΡΙΤΙΚΑ (ml)	ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ (ml)
NAB 1	25	1,5	0,3	0,1
NAB 2	25	1,5	0,3	0,1
NAB 3	25	1,5	0,3	0,1
NAB 4	25	3	0,6	0,1
NAB 5	25	3	0,6	0,1
NAB 6	25	3	0,6	0,1
NAB 7	40	1,5	0,3	0,1
NAB 8	40	1,5	0,3	0,1
NAB 9	40	1,5	0,3	0,1
NAB 10	40	3	0,6	0,1
NAB 11	40	3	0,6	0,1
NAB 12	40	3	0,6	0,1
NAB 13	60	1,5	0,3	0,1
NAB 14	60	1,5	0,3	0,1
NAB 15	60	1,5	0,3	0,1
NAB 16	60	3	0,6	0,1
NAB 17	60	3	0,6	0,1
NAB 18	60	3	0,6	0,1

Οι καλλιέργειες αφέθηκαν σε συνθήκες χαμηλού διάχυτου φυσικού φωτισμού για διάστημα έως τριών μηνών και έπειτα μεταφέρθηκαν οι βέλτιστες σε θάλαμο με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού.

*Οι συνθήκες που επικρατούν στον θάλαμο καλλιιεργειών είναι οι εξής:*

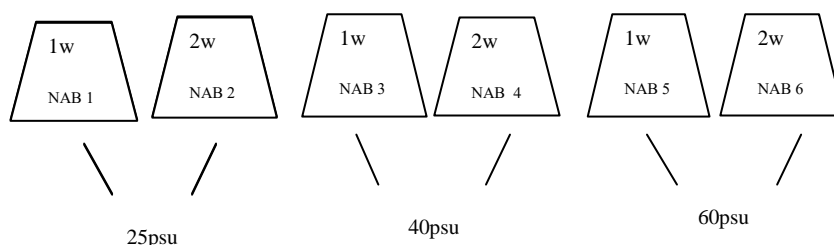
- Θερμοκρασία:  $20 \pm 1$  °C (η θερμοκρασία ελέγχεται με θερμόμετρα μεγίστου-ελαχίστου)

- Σχετική υγρασία αέρος: ~35%
- Ένταση φωτισμού: 65  $\mu\text{moles photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (ο φωτισμός στον θάλαμο είναι συνεχής και παρέχεται από σύστημα λαμπτήρων φθορισμού Gro-Lux L36W/77 της Osram)

Οι παράμετροι ‘θερμοκρασία’, ‘σχετική υγρασία αέρος’ και ‘ένταση συνεχούς φωτισμού’ μετρήθηκαν με τη χρήση μηχανήματος LI-COR LI-1400.

Σε χρονικό διάστημα δύο μηνών από τη συλλογή του θαλασσινού νερού, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (3000 RPM για 10min) στις καλλιέργειες.

Δύο πλαστικές φιάλες από κάθε συνθήκη φυγοκεντρήθηκαν και ενώθηκαν σε 1 κωνική των 250ml, με αποτέλεσμα να έχουμε **6** κωνικές των **250ml**.



Η νέα διάταξη των καλλιεργειών παρουσιάζεται στον ακόλουθο Πίνακα 3.3:

**Πίνακας 3.3.** Νέα πειραματική διάταξη καλλιεργειών από την 1<sup>η</sup> συλλογή θαλασσινού νερού (Περιοχή Αγ. Κοσμά – Σαρωνικός κόλπος) μετά τη φυγοκέντρηση.

ΜΙΚΤΕΣ				
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ (‰)	WALNE (ml)	ΠΥΡΙΤΙΚΑ (ml)	ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ (ml)
NAB 1	25	0,25	0,05	0,025
NAB 2	25	0,50	0,1	0,025
NAB 3	40	0,25	0,05	0,025
NAB 4	40	0,50	0,1	0,025
NAB 5	60	0,25	0,05	0,025
NAB 6	60	0,50	0,1	0,025

Μετά από τον καθημερινό ποιοτικό έλεγχο των καλλιεργειών ως βέλτιστη καλλιέργεια παρουσιάζεται η **NAB 4** με αλατότητα **40ppt (2 W)**. Η καλλιέργεια αυτή διαχωρίστηκε εκ νέου σε δύο καλλιέργειες: **NAB 4(A)** και **NAB 4(B)**.

### 3.2.2 2<sup>η</sup> συλλογή θαλασσινού νερού - Λίμνη (N. Ευβοίας, Ευβοϊκός Κόλπος)



Η διανομή του θαλασσινού νερού έγινε σε 8 πλαστικές φιάλες του 1,5 lt, όπου η κάθε φιάλη περιείχε 0,750 lt για την πραγματοποίηση του πειράματος. Η πειραματική διάταξη των καλλιεργειών φαίνεται στον Πίνακα 3.4.

Πίνακας 3.4. Αναλυτική διάταξη καλλιεργειών από τη 2<sup>η</sup> συλλογή θαλασσινού νερού (Περιοχή Λίμνη Ευβοίας – Ευβοϊκός κόλπος).

ΜΙΚΤΕΣ				
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ (%)	WALNE (ml)	ΠΥΡΙΤΙΚΑ (ml)	ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ (ml)
NAB 1	41	0,75	0,15	0,1
NAB 2	41	0,75	0,15	0,1
NAB 3	41	0,75	0,15	0,1
NAB 4	41	0,75	0,15	0,1
NAB 5	41	1,5	0,3	0,1
NAB 6	41	1,5	0,3	0,1
NAB 7	41	1,5	0,3	0,1
NAB 8	41	1,5	0,3	0,1

Ο έλεγχος των καλλιεργειών πραγματοποιήθηκε σε φυσική αλατότητα 40‰ και σε 2 διαφορετικά επίπεδα θρεπτικών αζώτου – φωσφόρου (1,18 – 2,36 mMol NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 0.145 – 0.29mMol PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>). Οι καλλιέργειες αφέθηκαν σε φυσικές συνθήκες φωτισμού για ένα μήνα και έπειτα, αφού έγινε διήθηση με δίχτυ 50 μm για την απομάκρυνση του ανεπιθύμητου υλικού και στις 8 καλλιέργειες, μεταφέρθηκαν οι βέλτιστες σε θάλαμο με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού (όπως αναφέρθηκε προηγουμένως).

Μετά από τον καθημερινό ποσοτικό και ποιοτικό έλεγχο των καλλιεργειών ως βέλτιστες καλλιέργειες παρουσιάζονται οι **NAB 3 και NAB 7**.

### 3.2.3 3<sup>η</sup> συλλογή θαλασσινού νερού –Κυμάσι (N. Ευβοίας – Αιγαίο πέλαγος)

Η διανομή του θαλασσινού νερού έγινε σε 12 πλαστικές φιάλες του 1,5 lt, όπου η κάθε φιάλη περιείχε 0,5 lt για την πραγματοποίηση του πειράματος. Η πειραματική διάταξη των καλλιεργειών φαίνεται στον Πίνακα 3.5.

Πίνακας 3.5. Αναλυτική διάταξη καλλιεργειών από την 3<sup>η</sup> συλλογή θαλασσινού νερού (Περιοχή Κυμάσι Μαντουδίου – Αιγαίο πέλαγος).

ΜΙΚΤΕΣ				
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ (%)	WALNE (ml)	ΠΥΡΙΤΙΚΑ (ml)	ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ (ml)
NAB 1	40	0,5	0,1	0,1
NAB 2	40	0,5	0,1	0,1
NAB 3	40	0,5	0,1	0,1
NAB 4	40	0,5	0,1	0,1
NAB 5	40	1	0,2	0,1
NAB 6	40	1	0,2	0,1
NAB 7	40	1	0,2	0,1
NAB 8	40	1	02	0,1
NAB 9 (ΕΚΒΟΛΗ)	38	0,5	0,1	0,1
NAB 10(ΕΚΒΟΛΗ)	38	0,5	0,1	0,1
NAB 11(ΕΚΒΟΛΗ)	38	1	0,2	0,1
NAB 12(ΕΚΒΟΛΗ)	38	1	0,2	0,1

Ο έλεγχος των καλλιεργειών πραγματοποιήθηκε σε φυσική αλατότητα 40‰ σε 2 διαφορετικά επίπεδα θρεπτικών αζώτου – φωσφόρου (1,18 – 2,36 mMol NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 0.145 – 0.29mMol PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>). Οι καλλιέργειες αφήθηκαν σε φυσικές συνθήκες φωτισμού καθ' όλη τη διεξαγωγή του πειράματος.

Μετά από τον καθημερινό ποσοτικό και ποιοτικό έλεγχο των καλλιεργειών ως βέλτιστες καλλιέργειες παρουσιάζονται οι: **NAB 6, NAB 8, NAB 9** και **NAB 12**.

### 3.3 Εργαστηριακή μέθοδος παρακολούθησης φυτοπλαγκτού

#### 3.3.1 Ποιοτική μελέτη φυτοπλαγκτού

Κατά τη διάρκεια της διαδοχικής ανάπτυξης των NABs επιλέγονται διαδοχικά δείγματα για ποιοτική παρακολούθηση στο οπτικό μικροσκόπιο, ώστε να καταγραφεί μια σταδιακή διαδοχή των ειδών και της αφθονίας τους με το πέρασ του χρόνου. Για την ποιοτική παρακολούθηση τα κύτταρα φωτογραφήθηκαν ζωντανά, απ' ευθείας από τις καλλιέργειες καθώς και μετά από προσθήκη διαλύματος Lugol (I<sub>2</sub>KI σε CH<sub>3</sub>COOH) το οποίο θανατώνει τα κύτταρα και χρωματίζει τις περιοχές που περιέχουν άμυλο με έντονο σκοτεινό χρωματισμό (εντοπισμός κοκκίων αμύλου και πυρηνοειδούς), ενώ το οξικό οξύ διατηρεί τα μαστίγια και τις βλεφαρίδες.

### 3.3.1.1 Κλασική ταξινόμική

Η ταξινόμηση των φυτοπλαγκτικών οργανισμών πραγματοποιείται με:

- Απλό και με ανάστροφο μικροσκόπιο (Zeiss IDO 3) σε ζωντανό και σε συντηρημένο υλικό, με καταδυτικό φακό (x100) Planapo της Zeiss. Η φωτογράφιση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με σύστημα ψηφιακής κάμερας Altra 20 της Olympus και σύστημα βιντεοκάμερας Sony (Τομέας Οικολογίας και Ταξινόμικής).
- Μικροσκόπιο AxioPlan της Zeiss, με πηγή UV, φίλτρα επιφθορισμού και οπτικό σύστημα Nomarski (differential interference contrast). Η φωτογράφιση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με σύστημα ψηφιακής κάμερας Zeiss AxioCam MRc 5 (Τομέας Βοτανικής).

Το μικροσκόπιο φθορισμού ομοιάζει με το οπτικό μικροσκόπιο, με τη διαφορά ότι το φως που χρησιμοποιείται για την απεικόνιση προέρχεται από το φθορισμό του δείγματος. Ο φθορισμός αυτός μπορεί να οφείλεται είτε σε φθορίζουσα ουσία που έχει προστεθεί στο δείγμα είτε στον αυτοφθορισμό. Το οπτικό μικροσκόπιο χρησιμοποιεί φως στο φάσμα του ορατού (400 – 700 nm), ενώ το μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιεί μια πηγή φωτός μεγαλύτερης έντασης που διεγείρει το δείγμα, το οποίο εκπέμπει φως χαμηλότερης ενέργειας και μεγαλύτερου μήκους κύματος. Η μικροσκοπία φθορισμού χρησιμοποιείται συχνά για να απεικονίσει κάποια χαρακτηριστικά μικρών δειγμάτων είτε για να ενισχύσει οπτικά τρισδιάστατα χαρακτηριστικά σε μικρές κλίμακες. Όταν το ανακλώμενο φως και ο φθορισμός του υποβάθρου φιλτράρονται, είναι δυνατόν να απεικονιστούν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά ενός δείγματος.

Τα φθορίζοντα μόρια απορροφούν σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, και ως εκ τούτου ένα μικροσκόπιο φθορισμού πρέπει να διαθέτει μια πηγή φωτός ικανή να παράγει μήκη κύματος που θα διεγείρουν το δείγμα. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση μιας λυχνίας ξένου (xenon) ή μιας λυχνίας ατμών υδραργύρου, οι οποίες εκπέμπουν σε όλα τα μήκη κύματος του ορατού φάσματος. Για την απομόνωση ενός μήκους κύματος, χρησιμοποιείται ένα οπτικό φίλτρο που ονομάζεται φίλτρο διέγερσης και ρυθμίζεται έτσι ώστε να αφήνει στην έξοδό του μόνο το μήκος κύματος που χρησιμοποιείται για να διεγείρει τα φθορίζοντα μόρια. Μετά το φίλτρο αυτό

ακολουθεί ο διχρωικός καθρέπτης, που ανακλά ορισμένα μήκη κύματος ενώ αφήνει τα υπόλοιπα να τον διαπεράσουν. Όταν το μονοχρωματικό φως εξέρχεται από αυτή τη διάταξη, φτάνει στο δείγμα και διεγείρει τα φθορίζοντα μόρια. Έτσι, τα μόρια αυτά απορροφούν φωτόνια και εκπέμπουν φωτόνια χαμηλότερης ενέργειας, δηλαδή μεγαλύτερου μήκους κύματος. Τα εκπεμπόμενα φωτόνια με μικρότερο μήκος κύματος διαπερνούν τον διχρωικό καθρέπτη και φτάνουν στον ανιχνευτή του μικροσκοπίου (Συγγελάκη 2014)

Για την ταυτοποίηση των ειδών του φυτοπλαγκτού χρησιμοποιούνται κυρίως μορφομετρικά χαρακτηριστικά από μικροσκοπικές παρατηρήσεις με τη βοήθεια κλειδών.

Οι κλειδές που χρησιμοποιήθηκαν για την αναγνώριση των ταξινομικών χαρακτήρων ήταν εκείνες των Lee (1989) και Tomas (1997).

### 3.3.2 Ποσοτική μελέτη φυτοπλαγκτού

#### 3.3.2.1 Ποσοτικοποίηση βιομάζας φυκών

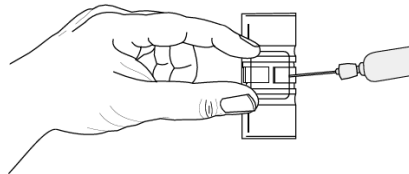
Όταν το NAB επιτύχει τα επιθυμητά αποτελέσματα βιομάζας γίνονται οι ποσοτικές μετρήσεις της αφθονίας των φυτοπλαγκτικών οργανισμών. Η ποσότητα της βιομάζας των φυκών μιας καλλιέργειας αξιολογείται, είτε μετρώντας τον αριθμό των κυττάρων, είτε με τον καθορισμό του βιοόγκου, της οπτικής πυκνότητας και του ξηρού βάρους. Τα κύτταρα είναι δυνατόν να μετρηθούν είτε με ηλεκτρονικό καταμετρητή μεριδίων (electronic particle counter) ή άμεσα με μικροσκόπιο, χρησιμοποιώντας ένα αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Η μέτρηση με το μικροσκόπιο έχει το πλεονέκτημα ότι επιτρέπει τον ταυτόχρονο ποιοτικό έλεγχο της καλλιέργειας. Η μεγαλύτερη δυσκολία στη μικροσκοπική μέτρηση είναι η επαναληψιμότητα, η οποία είναι συνάρτηση της δειγματοληψίας, της αραίωσης, και του εύρους της συγκέντρωσης των κυττάρων. Με τη χρήση φασματομέτρου μπορεί να καθοριστεί η σχέση μεταξύ οπτικής πυκνότητας και κυτταρικής συγκέντρωσης. Ωστόσο, μπορεί να υπάρχουν διακυμάνσεις λόγω του ότι η συγκέντρωση της χλωροφύλλης στα κύτταρα των φυκών διαφέρουν ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας. Με τον τρόπο αυτό, μια καλλιέργεια σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού θα είναι συγκριτικά πιο έγχρωμη και θα οδηγεί τελικά σε μετρήσεις μεγαλύτερης οπτικής πυκνότητας.

### 3.3.2.2 Συνοπτικά οι μέθοδοι της ποσοτικής μελέτης του φυτοπλαγκτού

Ο έλεγχος της αύξησης γίνεται είτε με την παρακολούθηση της κυτταρικής συγκέντρωσης είτε με την παρακολούθηση της αύξησης της βιομάζας.

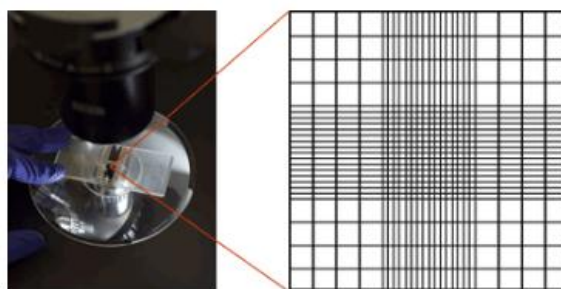
➤ Κυτταρική συγκέντρωση με αιμοκυτταρόμετρο (neubauer)

Αρχικά η καλλιέργεια πρέπει να είναι ομοιογενής. Σε περίπτωση που δεν αερίζεται, γίνεται ανάδευση χειροκίνητα ή με vortex. Γίνεται δειγματοληψία σε δοκιμαστικό σωλήνα και τα κύτταρα αφήνονται να κατακαθίσουν. Χρησιμοποιούνται καθαρές καλυπτρίδες και αιμοκυτταρόμετρα. Το αιμοκυτταρόμετρο έχει δύο θαλάμους μέτρησης για καλύτερα στατιστικά αποτελέσματα. Η ικανότητα μέτρησης είναι έως  $10^4$ - $10^5$  cells/ml, διαφορετικά απαιτείται αραιώση. Σε αραιό δείγμα, πρέπει να μετρηθούν και τα εννιά τετράγωνα (Εικόνα 3.3). Σε πυκνό δείγμα, θα μετρηθούν τρία τετράγωνα, συμπεριλαμβανομένου του κεντρικού. Η καλυπτρίδα προσαρμόζεται με πίεση στο αιμοκυτταρόμετρο και στη συνέχεια με πιπέτα Pasteur μεταφέρεται το δείγμα από τον δοκιμαστικό σωλήνα, αποφεύγοντας τις φυσαλίδες (Εικόνα 3.2).



**Εικόνα 3.2.** Εισαγωγή δείγματος σε αιμοκυτταρόμετρο neubauer (Πηγή: <http://laboratoryinfo.com>).

Μετά από ένα λεπτό, από την καθίζηση των κυττάρων, γίνεται η μέτρηση των κυττάρων. Αν η διαφορά στις μετρήσεις των δύο θαλάμων είναι  $> 10\%$ , τότε το δείγμα απορρίπτεται. Οι μετρήσεις καταγράφονται και γίνεται η αναγωγή στην αρχική συγκέντρωση της καλλιέργειας. Με τις μετρήσεις κατασκευάζονται οι γραφικές παραστάσεις της αύξησης της καλλιέργειας σε σχέση με τον χρόνο και υπολογίζεται ο ειδικός ρυθμός αύξησης  $\mu$ .



Εικόνα 3.3. Αιμακυτταρόμετρο neubauer (Πηγή: <http://www.nexcelom.com>).

➤ Ξηρό βάρος συγκεκριμένου όγκου καλλιέργειας.

Αρχικά γίνεται με ακρίβεια η μέτρηση της κυτταρικής συγκέντρωσης. Στη συνέχεια πραγματοποιείται λήψη αντιπροσωπευτικών δειγμάτων και διήθηση. Η διήθηση (τριών τουλάχιστον δειγμάτων για κάθε καλλιέργεια) γίνεται επάνω σε φίλτρα γνωστού βάρους GF/C. Τα φίλτρα τοποθετούνται σε ειδική συσκευή διήθησης υπό συνθήκες κενού. Τα κύτταρα πλένονται επάνω στο φίλτρο με ισοτονικό φορμικό αμμώνιο για την απομάκρυνση των αλάτων. Τα φίλτρα τοποθετούνται σε πλαστικά δοχεία ζύγισης ή σε σκεπασμένα τρυβλία Petri. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε κλίβανο στους 60° C περίπου για 24hr. Αφού έλθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό 4 ή 5 δεκαδικών στοιχείων. Τα φίλτρα τοποθετούνται πάντα με καθαρές λαβίδες για την αποφυγή οποιασδήποτε φθοράς και αύξησης βάρους από το λίπος των δακτύλων. Οι αναλυτικοί ζυγοί απαιτούν περαιτέρω προσοχή στη χρήση τους επειδή επηρεάζονται από ρεύματα αέρος, ηλεκτρονικό θόρυβο και θερμοκρασία.

*Άλλες μέθοδοι ποσοτικής μελέτης:*

- Μετρητής σωματιδίων Coulter Counter. Μηχάνημα μέτρησης κυτταρικού όγκου και ανάλυσης μεγεθών. Απαιτεί εξειδίκευση και βαθμονόμηση για κάθε είδος.
- Οπτική πυκνότητα σε φασματοφωτόμετρο (OD). Μέθοδος βασισμένη στη φωτομετρική εκτίμηση των αιωρούμενων σωματιδίων. Το κύριο πρόβλημα είναι ότι οι χρωστικές είναι σταθερές μόνο στην εκθετική φάση που υπάρχει ισορροπημένη αύξηση.
- Κυτταρική συγκέντρωση με κυτταρόμετρο ροής (flow cytometer).

- Μέθοδος καθίζησης.
- Μέθοδος σωληνοειδών θαλαμίσκων με ανάστροφο μικροσκόπιο. Κατάλληλη μέθοδος για μελέτη νανο-πλαγκτού και υπερ-πλαγκτού. Απαιτούνται επίπεδοι θαλαμίσκοι ακριβείας (0.5, 1, 2 ml).
- Μέθοδος φυγοκέντρισης με ηλεκτρική φυγόκεντρο. Είναι δυνατή η μελέτη ολόκληρου του πλαγκτού σε ζωντανή κατάσταση.
- Μέθοδος μεμβρανωδών ηθμών. Συλλέγεται όλο το πλαγκτό αλλά αποδομούνται οι λεπτοφυείς οργανισμοί.
- Προσδιορισμός φωτοσύνθεσης. Επίπονη μέθοδος, κατάλληλη μόνο για προσδιορισμό πρωτογενούς παραγωγής.
- Προσδιορισμός χλωροφύλλης. Συλλέγεται όλο το πλαγκτόν. Είναι κατάλληλη μέθοδος για μελέτη παραγωγικότητας. Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές απομονώνονται σε 80% ακετόνης. Η απορρόφηση μετράται στα 649nm και 665nm όπου παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση χλωροφύλλης με τη χρήση κυψελίδων quartz και φωτοφασματογράφου Hitachi 1100.

### **3.4 Μέθοδοι απομόνωσης των κυρίαρχων στελεχών μικροφυκών στις καλλιέργειες**

Κάθε μία από αυτές τις μεθόδους επιτυγχάνει να απομονώσει κύτταρα και να παράγει μια αξενική καλλιέργεια καθώς και να διαχωρίσει απλά και εύκολα τα κύτταρα που είναι προς απομόνωση.

#### **3.4.1 Μέθοδος επίστρωσης σε τρυβλίο**

Ο σκοπός της μεθόδου απομόνωσης μικροφυκών από το πεδίο σε τρυβλία είναι τριπλός :

α) η ακινητοποίηση των κυττάρων ώστε να μην αναμιγνύονται μεταξύ τους. β) Ο διαχωρισμός από άλλους οργανισμούς που μπορεί να διαφέρουν στην οργάνωσή τους. γ) η παροχή θρεπτικών ουσιών και άλλων ευνοϊκών για την αναπαραγωγή τους σε ομοιογενείς πληθυσμούς. Τέτοιες αποικίες, όπως καλούνται αυτές οι καλλιέργειες, αποτελούνται από ένα είδος μόνο και με τη μεταφορά τους σε αποστειρωμένο

θρεπτικό μέσο, έχουμε το σημείο εκκίνησης για καθαρές καλλιέργειες. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί, αν τα κύτταρα είναι με αποτελεσματικό τρόπο απομονωμένα το ένα από το άλλο.

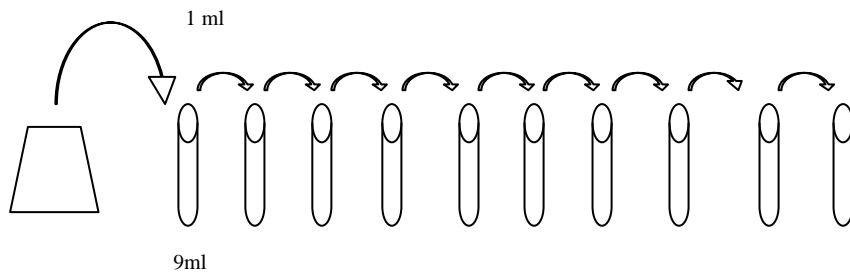
- Προετοιμάζονται τρυβλία Petri (γυάλινα ή πλαστικά) με στερεό θρεπτικό μέσο (Walne's Medium, 40%, πυριτικά άλατα) και περιεκτικότητα σε άγαρ 1,2%. Το άγαρ θα πρέπει να καλύπτει το 1/2 με 2/3 του βάρους του τρυβλίου.
- Μετά τη στερεοποίηση του άγαρ στα τρυβλία, τοποθετείται 1 σταγόνα βιταμινών και απλώνεται με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου.
- Έπειτα τοποθετείται 0,5ml καλλιέργειας και απλώνεται σε όλη τη επιφάνεια του θρεπτικού υποστρώματος. Το τρυβλίο σφραγίζεται με τη βοήθεια παραφίλμ και αφήνεται κάτω από κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας.
- Αφού αναπτυχθούν οι αποικίες, με τη βοήθεια αποστειρωμένου βρόγχου ενοφθαλμισμού (κρίκος) λαμβάνεται δείγμα από μια αποικία και τοποθετείται σε μια σταγόνα από θαλασσινό νερό. Η παρατήρηση στο μικροσκόπιο θα δείξει ότι το δείγμα περιέχει μόνο ένα είδος.
- Έπειτα, μεταφέρεται σε κατάλληλο στερεοποιημένο υπόστρωμα μια αποικία μικροφυκών, τόσο προσεκτικά ώστε να μη χαραχθεί η επιφάνεια του υποστρώματος και σε ασηπτικές συνθήκες, χρησιμοποιώντας τον κρίκο εμβολιασμού. Σχηματίζοντας παράλληλες ή ελικοειδείς γραμμές επάνω στο υπόστρωμα με τον κρίκο εμβολιασμού (ο οποίος σύρεται στην επιφάνεια), επιτυγχάνεται μέσω της προοδευτικής απομάκρυνσης των κυττάρων μεταξύ τους, η απόθεση απομονωμένων κύτταρων στην επιφάνεια του θρεπτικού υποστρώματος και η δημιουργία αποικιών.
- Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία από τα ήδη απομονωμένα κύτταρα και οι αποικίες αφήνονται να αναπτυχθούν ξανά.
- Τέλος, η αποικία μεταφέρεται σε υγρό θρεπτικό μέσο ή σε άγαρ.

#### 3.4.2 Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων

Κατά τις διαδοχικές αραιώσεις, το αρχικό εμβόλιο (με τη χρήση αποστειρωμένης πιπέτας) αραιώνεται σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων/δοχείων. Μετά από κάθε αραιώση ο δοκιμαστικός σωλήνας θα περιέχει το 1/10 κυττάρων, σε σχέση με τον ακριβώς προηγούμενο.



- Η διαδοχική αραίωση έγινε σε 3 σειρές (10 δοκιμαστικοί / σειρά) και ο εμπλουτισμός έγινε με θρεπτικό μέσο Walne, πυριτικά άλατα και βιταμίνες.



Όλοι οι χειρισμοί έγιναν υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής.

### 3.5 Συντήρηση των απομονωμένων στελεχών

Τα απομονωθέντα στελέχη ανήκουν πλέον στην Τράπεζα Καλλιεργειών Μικροφυκών του Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τα απομονωμένα στελέχη, ανανεώνονται με τη μέθοδο του εμβολιασμού υπό ασηπτικές συνθήκες κάθε μήνα, σε θάλαμο νηματικής ροής και συντηρούνται σε θάλαμο σταθερών συνθηκών (οι συνθήκες του οποίου αναφέρθηκαν).

Ο εμβολιασμός των στελεχών στην παρούσα εργασία, έγινε σε κωνικές των 100ml, όπου το μέσο της καλλιέργειας αποτελείται από φιλτραρισμένο και αποστειρωμένο θαλασσινό νερό (40ml) και θρεπτικό Walne (καθώς και πυριτικά άλατα για τα στελέχη των διατόμων) όπως επίσης και βιταμίνες στις κατάλληλες αναλογίες.

*Το φιλτραρισμένο θαλασσινό νερό προέρχεται από την περιοχή του Αγίου Κοσμά, παραχωρήθηκε από το Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.).*

### 3.6 Παρασκευή θρεπτικών διαλυμάτων

#### 3.6.1 Παρασκευή θρεπτικού μέσου Walne

##### Διάλυμα 1<sup>ο</sup>

Σε 1L απεσταγμένου νερού προστίθενται:

- Na<sub>2</sub> EDTA - 45g

- $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 33.6g
- $\text{NaNO}_3$  ή  $\text{KNO}_3$  - 100g ή 116g
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - 20g
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  - 0.36g
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - 1.3g.

### Διάλυμα 2

Σε 100L απεσταγμένου νερού προστίθενται:

- $\text{ZnCl}_2$  - 2.1g
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - 2g
- $(\text{NH}_4)_6\text{Mg}_7\text{O}_{24}\text{H}_2\text{O}$  - 0.9g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 2g
- $\text{HCl}$  (συμπυκνωμένο) - 10ml

### Διάλυμα 3

Σε 100L απεσταγμένου νερού προστίθενται:

$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 4g

Σε όλα τα διαλύματα γίνεται θέρμανση και ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα έως την τελική διάλυση. Στο 1<sup>ο</sup> διάλυμα προστίθενται: 1ml από το 2<sup>ο</sup> διάλυμα και 2ml από 3<sup>ο</sup> διάλυμα.

#### 3.6.2 Παρασκευή διαλύματος βιταμινών

Σε 1L απιονισμένου νερού προστίθεται:

- Θειαμίνη ·  $\text{HCl}$  (vit. B1) - 20 mg
- Κυανοκοβαλαμίνη (vit. B12) – 10mg
- Βιοτίνη (vit. H) – 5mg

Ακόμα, προστίθενται λίγες σταγόνες  $\text{HCl}$  ώστε να μη δημιουργηθεί ίζημα.

Τα διαλύματα αποστειρώνονται στο αυτόκαυστο (θερμοκρασία 121°C, πίεση 1atm) για 1h και στη συνέχεια αποθηκεύονται στους 4°C.

## Τελικό θρεπτικό μέσο Walne 40%

Σε 1L διηθημένου θαλασσινού νερού προστίθεται 1ml θρεπτικού διαλύματος κατά Walne και ακολουθεί έντονη ανάδευση.

Τέλος, η αλατότητα του διαλύματος μετράται με διαθλασίμετρο (Atago S/Mill-E), και το θρεπτικό μέσο αποστειρώνεται.

### **3.7 Φυλογενετική Ανάλυση**

#### 3.7.1 Μοριακές αναλύσεις των κυρίαρχων απομονωθέντων ειδών

Στα **κυρίαρχα είδη** των καλλιεργειών που απομονώθηκαν, εφαρμόστηκαν μοριακές αναλύσεις με σκοπό την περαιτέρω ταυτοποίησή τους.

Οι μοριακές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο «εργαστήριο» Μοριακής Οικολογίας (University of Athens Molecular Ecology Laboratory – UAMEco Lab) του Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ.

##### 3.7.1.1 Μοριακοί δείκτες

Ένα από τα βασικά στάδια, πριν από τη φυλογενετική ανάλυση, είναι η ορθή επιλογή των μοριακών δεικτών. Οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν οι εξής:

- Τμήμα (1161bp) του γονιδίου *rbcl*, το οποίο κωδικοποιεί για τη μεγάλη υπομονάδα του φωτοσυνθετικού ενζύμου RuBisCO.
- Τμήμα (1594bp) του γονιδίου *18s*

##### 3.7.1.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης γονιδιωματικού DNA

Η εξαγωγή του γενετικού υλικού από τα κύτταρα έγινε με τη χρήση του πακέτου Genomic DNA from Plant”, της εταιρίας Macherey-Nagel, η οποία βασίζεται στη μέθοδο CTAB (Cetyltrimethyl Ammonium Bromide) DNA Miniprep (Clark 2009).

Παρακάτω παρατίθενται τα βασικά στάδια του τροποποιημένου πρωτοκόλλου:

*Ομογενοποίηση δείγματος:*

1. Ένας όγκος 1 ml υγρής καλλιέργειας, για κάθε στέλεχος, φυγοκεντρείται στις 6000 στροφές (rpm).
2. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και από το ίζημα (pellet) ένας όγκος περίπου 250 µl τοποθετείται σε σωλήνα Eppendorf του 1,5 ml και ομογενοποιείται μηχανικά με τη χρήση ειδικής πλαστικής ράβδου («γουδοχέρι»).

*Λύση των κυττάρων με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος PL1:*

3. Στο ομογενοποιημένο δείγμα προστίθενται 400µl ρυθμιστικού διαλύματος PL1 (του οποίου η αποτελεσματικότητα έχει ελεγχθεί για τα κύτταρα των «πράσινων» φυκών).
4. Μετά από καλή ανάδευση (Vortex) προστίθενται 10µl διαλύματος RNAase A.
5. Το δείγμα αναδεύεται ξανά και επωάζεται στους 65°C για 30'.

*Διήθηση του αδρού εκχυλίσματος:*

6. Τοποθετείται το εκχύλισμα στην ειδική στήλη Nucleospin® Filter (µωβ δακτύλιος) και φυγονεντρείται για 2' στις 11.000rpm.
7. Το διαυγές διήθημα (flow-through) μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωλήνα Eppendorf του 1,5 µl.

*Ρύθμιση των συνθηκών δέσμευσης του DNA:*

8. Μετά την προσθήκη 450 µl ρυθμιστικού διαλύματος PC το δείγμα αναδεύεται επαρκώς με τη βοήθεια vortex.

*Δέσμευση του DNA:*

9. Μεταφέρονται 700 ml από το διάλυμα που προέκυψε στη στήλη NucleoSpin® Plant II Column (πράσινος δακτύλιος) και φυγοκεντρούνται για 1' στις 11.000rpm.
10. Το διήθημα απορρίπτεται.

*Πλύση και ξήρανση της μεμβράνης πυριτίου:*

- I. 1η πλύση → Προσθήκη 400µl ρυθμιστικού διαλύματος PW1 στη στήλη, φυγοκέντρηση για 1' στις 11.000rpm και απόρριψη του διηθήματος.
- II. 2η πλύση → Προσθήκη 700µl ρυθμιστικού διαλύματος PW2 στη στήλη, φυγοκέντρηση για 1' στις 11.000rpm και απόρριψη του διηθήματος.
- III. 3η πλύση → Προσθήκη 200µl ρυθμιστικού διαλύματος PW2 στη στήλη και φυγοκέντρηση για 1' στις 11.000rpm ώστε να καθαριστεί και να στεγνώσει πλήρως η μεμβράνη πυριτίου.

*Έκλυση του DNA:*

11. Η στήλη τοποθετείται σε νέο αποστειρωμένο σωλήνα Eppendorf και μετά την προσθήκη 50μl ρυθμιστικού διαλύματος PE (το οποίο είχε τοποθετηθεί στους 65°C) σε αυτή, ο σωλήνας επωάζεται για 20' στους 65°C.
12. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1' στις 11.000rpm ώστε να επιτευχτεί η έκλυση του DNA.
13. Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται για μια ακόμη φορά με το ίδιο το διήθημα αντί για νέα ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος.

Το δείγμα αποθηκεύεται στους -20°C.

### 3.7.1.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain reaction, PCR)

Η περιοχή των γονιδίων που επιλέχθηκαν για την ταυτοποίηση των στελεχών, ενισχύθηκαν με τη διαδικασία της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης. Η Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια *in vitro* μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό προεπιλογής αλληλουχίας DNA σε πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο. Εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τους Saiki et al. (1985) και βελτιώθηκε αργότερα από τους Mullis & Faloona. Η τεχνική αυτή αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ενίσχυσης αλληλουχιών DNA και RNA, *in vitro* και *in situ*.

Η PCR είναι μια σχετικά απλή και ταχεία μέθοδος πολλαπλασιασμού μιας μικρής αλληλουχίας DNA και επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση και ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές (primers) σε συνδυασμό και με άλλα αντιδραστήρια τα οποία είναι απαραίτητα για την αντίδραση.

### 3.7.1.4 Τα συστατικά της PCR

Τα βασικά συστατικά για τη διενέργεια της αντίδρασης PCR είναι:

- a) Το **Γενετικό υλικό – αλληλουχία στόχος**, για τη βέλτιστη απόδοση της PCR το DNA πρέπει να είναι μακρομοριακό και υψηλής καθαρότητας, απαλλαγμένο από υπολείμματα αιθανόλης ή αλάτων που ενδέχεται να αναστείλουν την αντίδραση.

- b) Οι **Εκκινητές (primers)** είναι ολιγονουκλεοτίδια και έχουν έκαστος συνήθως μήκος 15-20 νουκλεοτιδίων. Χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές (primers), ο καθένας συμπληρωματικός προς μια συγκεκριμένη αλληλουχία μιας εκ των δύο αλυσίδων του DNA. Αφορούν στις περιοχές από όπου αρχίζει το ένζυμο DNA πολυμεράσης τη σύνθεση της διπλής αλυσίδας του επιθυμητού DNA προϊόντος και έχουν περίπου την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature,  $T_m^*$ ).

*\* $T_m$ , είναι η θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων DNA παραμένει σε μονόκλωνη μορφή. Εξαρτάται από το μέγεθος της αλληλουχίας και τη σύσταση των βάσεων της αλληλουχίας. Οι δύο εκκινητές δεν πρέπει να έχουν πολύ διαφορετικές  $T_m$  μεταξύ τους, με μια διαφορά  $<3-5^\circ C$  να θεωρείται αποδεκτή.*

- c) Η **DNA πολυμεράση (Taq polymerase)** είναι ένζυμο που χρησιμοποιεί ως μήτρα το μονόκλωνο DNA για τη σύνθεση μιας καινούργιας νέας συμπληρωματικής αλυσίδας με κατεύθυνση  $5' \rightarrow 3'$ , ξεκινώντας από το τμήμα του μορίου που είναι δίκλωνο. Για τη σύνθεση αυτή απαραίτητη είναι η παρουσία μίγματος νουκλεοτιδίων και ιόντων  $Mg^{2+}$ . Για την ενίσχυση τμημάτων DNA στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η KAPA-Taq DNA Polymerase της εταιρίας KAPABIOSYSTEMS.
- d) Τα **dNTP's** τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates) (dATP, dTTP, dCTP και dGTP), τα οποία είναι ουσιώδη δομικά στοιχεία για τη σύνθεση των νέων αλυσίδων.
- e) Το **ρυθμιστικό διάλυμα** της αντίδρασης (buffer) για τη διατήρηση του pH στις τιμές 7.5 – 8.0.
- f) Τα ιόντα μαγνησίου ( **$Mg^{++}$** ) που απαιτούνται για την ενζυμική δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης. Τα ιόντα  $Mg^{2+}$  σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, το DNA εκμαγείο και τους εκκινητές. Περίσσεια  $Mg^{2+}$  οδηγεί σε μη-ειδική σύνδεση των εκκινητών με το DNA, αυξάνοντας τα μη-ειδικά προϊόντα στην αντίδραση. Επίσης μειώνει την πιστότητα αντιγραφής της Taq πολυμεράσης. Χαμηλές συγκεντρώσεις  $Mg^{2+}$  οδηγούν σε μείωση της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος. Η βέλτιστη συγκέντρωση  $Mg^{2+}$  για κάθε αντίδραση PCR πρέπει να προσδιορίζεται εμπειρικά με δοκιμή διαδοχικών συγκεντρώσεων.

Η διαδικασία πραγματοποιείται σε κατάλληλη συσκευή ειδικού θερμικού κυκλοποιητή. Συγκεκριμένα, η μέθοδος της PCR στηρίζεται στη συνεχή επανάληψη ενός κύκλου που αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια. Σε κάθε στάδιο γίνεται επώαση του δείγματος σε διαφορετική κάθε φορά θερμοκρασία. Ο κυκλοποιητής έχει τη δυνατότητα να θερμαίνει και να ψύχει τα δείγματα σε σύντομο χρονικό διάστημα.

**Τα στάδια που αποτελούν τον επαναλαμβανόμενο κύκλο είναι τα εξής:**

- 1) Αρχική αποδιάταξη δείγματος (initialization): Η θερμοκρασία ανεβαίνει στους 95°C. Σε αυτό το στάδιο διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου, οι οποίοι συνδέουν τις 2 πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Έτσι προκύπτουν 2 μονόκλωνες αλυσίδες που θα χρησιμεύσουν ως μήτρα για τη σύνθεση νέων συμπληρωματικών αλυσίδων.
- 2) Αποδιάταξη προϊόντων (denaturation): Σε θερμοκρασία 94°C τα μικρά τμήματα DNA που δημιουργήθηκαν στο στάδιο της αντιγραφής απομακρύνονται και περνούν στη μονόκλωνη μορφή τους.
- 3) Υβριδοποίηση εκκινητών (primer annealing) στις αλληλουχίες του DNA στόχου: Η θερμοκρασία μειώνεται στους 51°C. Σε αυτό το στάδιο επιτυγχάνεται ειδική ένωση των αφετηριών (primers) με τις συμπληρωματικές προς αυτές μονόκλωνες DNA αλυσίδες – μήτρα, που προέκυψε στο πρώτο στάδιο. Οι αφετηρίες εντοπίζουν το προς αντιγραφή τμήμα του DNA και προσανατολίζονται με τρόπο ώστε το 5' άκρο της κάθε μίας να ενώνεται με το 3' άκρο της συμπληρωματικής αλυσίδας – μήτρα. Η ακριβής θερμοκρασία και ο χρόνος αυτού του σταδίου εξαρτώνται από το ζεύγος των εκκινητών που έχουν επιλεγεί.
- 4) Επιμήκυνση εκκινητών (primer extension) στο 3' άκρο με την πρόσθεση νουκλεοτιδίων (dNTP's): Σε αυτό το στάδιο η θερμοκρασία ανέρχεται στους 72°C, όπου και επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Ο χρόνος εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος της αλληλουχίας DNA που θα ενισχυθεί.
- 5) Τελική επιμήκυνση (final elongation): Το βήμα αυτό χρησιμοποιείται, ώστε να διασφαλιστεί ότι θα ολοκληρωθούν όσα μονόκλιωνα τμήματα ενδέχεται να έχουν απομείνει στο μείγμα με το πέρας των κύκλων. Ο χρόνος επιμήκυνσης εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος DNA που ενισχύεται με βάση τις συγκεκριμένες προδιαγραφές της θερμοανθεκτικής πολυμεράσης.

- 6) Διατήρηση (pause): Ο θερμοκυκλοποιητής παραμένει αυτόματα σε θερμοκρασία 16°C μετά το πέρας όλων των προηγούμενων σταδίων, για την προσωρινή αποθήκευση των δειγμάτων μέχρι αυτά να απομακρυνθούν από το μηχάνημα.

Τα στάδια 2 έως 4 αντιπροσωπεύουν έναν κύκλο PCR. Ο συνολικός αριθμός των κύκλων αντιγραφής εξαρτάται από τη συγκέντρωση των μορίων του DNA προτύπου στο προς εξέταση υλικό. Στην παρούσα εργασία η αντίδραση επαναλαμβάνεται για 40 κύκλους.

Η διαδικασία της PCR διακρίνεται σε τρεις φάσεις:

- **Εκθετική (exponential) φάση:** Είναι η φάση κατά την οποία έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Σε αυτή τη φάση η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική και σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται η προεπιλεγμένη αλληλουχία DNA
- **Γραμμική (linear) φάση:** Η φάση στην οποία παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας DNA εξ αιτίας της μείωσης της ενεργότητας των αντιδραστηρίων
- **Φάση Plateau:** Στη φάση αυτή έχει σταματήσει η αντίδραση PCR καθώς και η παραγωγή νέων αντιγράφων εξ αιτίας της εξάντλησης των αντιδραστηρίων (VanGuilder et al. 2008).

### 3.7.1.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης και απεικόνιση των μορίων DNA

#### ➤ Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

Στη συνέχεια ακολουθεί ανίχνευση των προϊόντων της PCR, με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, συγχρόνως με μάρτυρα DNA (υπολογίζουμε δηλαδή σε ποιο μοριακό βάρος εντοπίζεται η ανιχνεύσιμη ζώνη σύμφωνα με τα μοριακά βάρη των ζωνών του μάρτυρα DNA). Κάθε τμήμα DNA είναι εφικτό να αναλυθεί με τη βοήθεια αυτής της τεχνικής. Ένα πήκτωμα αγαρόζης είναι ένας πολυσακχαρίτης που προέρχεται από φύκη (red algae). Τα πηκτώματα αγαρόζης φέρουν ευμεγέθεις πόρους και είναι κατάλληλα για τον διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA. Τα διακριτά τμήματα των νουκλεϊνικών οξέων δύναται να εντοπιστούν με υπεριώδη ακτινοβολία,



έπειτα από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (μια χρωστική που έχει την ικανότητα να εκπέμπει φθορισμό λόγω σχηματισμού συμπλόκων παρεμβολής (intercalation) με το δίκλωνο DNA όταν διεγερθεί από υπεριώδη ακτινοβολία (UV)), ως φθορίζουσες ζώνες.

Αναλυτικά τα στάδια της διαδικασίας:

1. Ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης 2% και προστίθεται σε φιάλη με 100ml ρυθμιστικό διάλυμα (TBE 0,5X).
2. Το διάλυμα θερμαίνεται ( $\approx 3 - 5$  λεπτά) μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και να δημιουργηθεί ένα διαυγές διάλυμα.
3. Προστίθεται στο διάλυμα βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0.005% v/v.
4. Αφού κρυώσει το διάλυμα τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο και προστίθενται εξαρτήματα που ομοιάζουν με χτένες και δημιουργούν τα μικρά βοθρία («πηγαδάκια») υποδοχής του δείγματος.
5. Το διάλυμα αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 30min. Όταν κρυώσει η αγαρόζη δημιουργεί ένα πήκτωμα, καθώς δεσμοί υδρογόνου συνδέουν τα μόρια της αγαρόζης.
6. Μετά την πήξη απομακρύνεται προσεκτικά η «χτένα» και η κατασκευή (καλούπι) με το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
7. Το πήκτωμα εμβαπτίζεται στο λουτρό ηλεκτροφόρησης σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (Tris Borate Acid/EDTA - TBE).
8. Σε 1.5μl δείγματος προστίθενται 6.5μl dH<sub>2</sub>O και κιτρινέρυθρης χρωστικής (orange loading dye) και με τη βοήθεια πιπέτας τα τοποθετούμε στις ειδικές θέσεις της πηκτής.
9. Τοποθέτηση των δειγμάτων. Τα δείγματα τοποθετούνται στις θέσεις υποδοχής με τη βοήθεια πιπέτας ρυθμιζόμενου όγκου.
10. Τοποθέτηση 1,6μl «μάρτυρα» με κομμάτια DNA γνωστού μοριακού βάρους.
11. Τέλος, με τη βοήθεια τροφοδοτικού εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται οδηγεί τα αρνητικώς φορτισμένα μόρια του DNA (λόγω του αρνητικού φορτίου των φωσφορικών ομάδων) να κινηθούν προς την κάθοδο. Η ηλεκτρική τάση ασκείται για τον βέλτιστο χρόνο που απαιτείται για τον διαχωρισμό των μορίων του DNA.

12. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, όταν τα μόρια του DNA έχουν διαχωριστεί ικανοποιητικά, το πήκτωμα τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας και φωτογραφίζεται.

#### 3.7.1.6 Διαλύματα ανάλυσης δεσοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA)

##### Πηκτή αγαρόζης 2%

- 2g αγαρόζης
- 100ml 1xTBE
- 5μl βρωμιούχου αιθιδίου

Τελικός όγκος 100ml

##### Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης

- 100ml 10xTAE
- 900ml ddH<sub>2</sub>O

Τελικός όγκος 1000ml

##### Βρωμιούχο αιθίδιο

- 5mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O

#### 3.7.1.7 Δείκτης («μάρτυρας») μοριακών βαρών

Για την επιβεβαίωση ή μη της ενίσχυσης των γονιδιακών περιοχών-στόχων που έγινε μέσω ηλεκτροφόρησης των παραγομένων προϊόντων PCR, χρησιμοποιείται ο DNA Ladder HT3 RTU της εταιρίας NIPPON Genetics.

#### 3.7.1.8 Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

Για να προσδιοριστεί η αλληλουχία των ενισχυμένων DNA, πρέπει τα δείγματα να μην περιέχουν υποπροϊόντα. Ο καθαρισμός των επιλεγμένων προς αλληλούχιση προϊόντων PCR έγινε με τη χρήση του **NucleoSpin ExtractII: PCR clean up, Gel**

**extraction» της εταιρείας Macherey - Nagel**, εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο της εταιρείας:

1. Αρχικά πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση στα 60volt, με όλο το προϊόν της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης (2%) εμποτισμένο με βρωμιούχο αιθίδιο και κιτρινέρυθρη χρωστική (orange loading dye).
2. Αφαιρείται με καθαρό νυστέρι, το τμήμα που περιέχει το ενισχυμένο τμήμα ενδιαφέροντος, από το πήκτωμα αγαρόζης και τοποθετείται σε ένα σωλήνα Eppendorf του 1,5ml. Εάν δεν υπάρχουν περισσότερες από μία ταινίες (μπάντες) εξ αρχής, τότε το δείγμα της PCR μεταφέρεται απ'ευθείας σε σωλήνα Eppendorf.
3. Στη συνέχεια προστίθενται 200μl από το Buffer NT και το δείγμα επωάζεται στους 50°C μέχρι να διαλυθούν εντελώς όλα τα τμήματα από το πήκτωμα αγαρόζης ( $\approx 40'$ ). Παράλληλα γίνεται ανάδευση με vortex κάθε 2-3 min μέχρι το τέλος της επώασης.
4. Δέσμευση DNA: Προστίθενται 700μl δείγματος στην ειδική στήλη NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 11.000rpm για 30'' και το διήθημα απορρίπτεται.
5. Πλύση της μεμβράνης πυριτίου: Προστίθενται 700μl ρυθμιστικού διαλύματος NT3 στη στήλη, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 11.000rpm για 30'' και το διήθημα απορρίπτεται.
6. Ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντρηση στις 11.000rpm για 1' ώστε να απομακρυνθούν τα κατάλοιπα του NT3 (και κυρίως της αιθανόλης που περιέχεται σε αυτό). Επιπλέον η στήλη αφήνεται για  $\approx 1'$  μέχρι να επέλθει ξήρανση της μεμβράνης πυριτίου.
7. Έκλυση DNA: Προστίθενται 30μl ρυθμιστικού διαλύματος NE στη στήλη και το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1min και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 11.000g για 1min.

Μετά τον καθαρισμό ακολούθησε ξανά ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%, για να επιβεβαιωθεί ο καθαρισμός τους.

Τα διηθήματα των δειγμάτων αποθηκεύονται στους -20°C.

### 3.7.1.9 Αλληλούχιση προϊόντων PCR

Ακολουθούσε προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA από την εταιρία CeMIA SA, όπου απεστάλησαν 50ng/μl DNA.

### 3.7.1.10 Επεξεργασία αλληλουχιών

Τα χρωματογραφήματα των αλληλουχιών ελέγχθηκαν μέσω του λογισμικού **CodonCodeAlligner v.2.0.6** ως προς την ύπαρξη απροσδιόριστων νουκλεοτιδίων, τα οποία αφού εντοπίστηκαν, διορθώθηκαν έτσι ώστε να ανταποκρίνονται σε ένα από τα τέσσερα σύμβολα των νουκλεοτιδίων (A,C,G,T).

### 3.7.1.11 Στοιχίση αλληλουχιών

Η στοιχίση των ακολουθιών αφορά στην περαιτέρω ανάλυση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των εξεταζόμενων στελεχών. Αποσκοπεί στον προσδιορισμό των ομόλογων θέσεων, βήμα το οποίο είναι απαραίτητο για τις φυλογενετικές αναλύσεις. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα **CodonCodeAlligner v.2.0.6**.

### 3.7.1.12 Εύρεση ομόλογων αλληλουχιών

Επόμενο βήμα της φυλογενετικής ανάλυσης αποτελεί η εύρεση ομόλογων αλληλουχιών από τη βάση δεδομένων της GenBank του NCBI. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται με τη χρήση του εργαλείου αναζήτησης βασικής τοπικής ευθυγράμμισης BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Μέσω του BLAST είναι δυνατή η ανίχνευση «αδύναμων αλλά βιολογικά σημαντικής ομοιότητας ακολουθιών» σε σύντομο χρονικό διάστημα (Altschul et al. 1990)

Εκτός από τον έλεγχο της ακολουθίας, το BLAST χρησιμοποιήθηκε και για την επιλογή κατατεθειμένων στη GenBank ακολουθιών ομόλογων των ειδών που ταυτοποιήθηκαν, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στις φυλογενετικές αναλύσεις. Η επιλογή τους έγινε με διάφορα κριτήρια, όπως παράδειγμα το είδος, το γένος και η κλάση. Χρησιμοποιήθηκαν κατατεθειμένες ακολουθίες από διάφορα είδη των γενών αυτής της μελέτης καθώς και ειδών με τα ίδια μορφολογικά χαρακτηριστικά. Ουσιαστικά επιλέχθηκαν αντιπροσωπευτικές ακολουθίες με βάση και βιβλιογραφικά δεδομένα.

### 3.8 Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων

#### 3.8.1 Μέθοδος Σύνδεσης Γειτόνων NJ (Neighbour Joining)

Μετά την αλληλούχιση και τη στοίχιση των αλληλουχιών, έγινε εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων, με το μοντέλο Kimura 2 - parameter (Kimura 1980). Το μοντέλο λαμβάνει υπόψη τους ρυθμούς των μεταστροφών και των μετατοπίσεων, θεωρώντας ότι οι συχνότητες των τεσσάρων νουκλεοτιδίων είναι οι ίδιες και ότι οι ρυθμοί των υποκαταστάσεων δεν ποικίλλουν ανάμεσα στις διάφορες θέσεις της αλληλουχίας.

Τα αρχικά δέντρα κατασκευάστηκαν αυτόματα με τη Μέθοδο Σύνδεσης Γειτόνων NJ (Neighbour Joining), οι θέσεις που περιείχαν κενά εξαλείφθηκαν πλήρως και η ισχύς των δημιουργηθεισών τοπολογιών ελέγχθηκε με την εφαρμογή της δοκιμής bootstrap 1000 επαναλήψεων. Η NJ μετατρέπει τα δεδομένα σε πίνακα αποστάσεων με χρήση των ανά ζεύγος διαφορών των ταξινομικών μονάδων μέσω του αλγορίθμου των Saitou & Nei (1987) για τη δημιουργία του βραχύτερου εξελικτικά δέντρου.

Η NJ ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα MEGA v.7.

#### 3.8.2 Ανάλυση κατά Bayes

Η ανάλυση κατά Bayes (Bayesian inference, BI) αναζητά εκείνο το δένδρο που μεγιστοποιεί την πιθανότητα τα δεδομένα και το εξελικτικό μοντέλο να ερμηνεύουν το δένδρο (Hall 2004). Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιεί τον αλγόριθμο MCMC (Markov Chain Monte Carlo). Εξετάζεται μία αλυσίδα Markov που ενεργεί για τον υπολογισμό της ύστερης πιθανότητας του κάθε παραγόμενου δένδρου.

Η BI ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα MrBayes v.3.2.6 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). Ο έλεγχος της καταλληλότητας του μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε για την κάθε ανάλυση, έγινε με βάση το σύνολο των εξεταζόμενων ακολουθιών και πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα PartitionFinder v.2.1.1 (Lanfear et al. 2012), υπό το κριτήριο BIC (Schwarz 1978).

### Συνοπτικός κατάλογος των χρησιμοποιηθέντων προγραμμάτων

- CodonCode Aligner v.2.0.6 – Επεξεργασία και στοίχιση αλληλουχιών
- FigTree v.1.4.3 – Απεικόνιση φυλογενετικών δέντρων
- MEGA v.7 – Φυλογενετική ανάλυση NJ
- MrBayes v.3.2.6 – Φυλογενετική ανάλυση BI
- Partition Finder v.2.1.1 – Επιλογή εξελικτικών μοντέλων νουκλεοτιδικής υποκατάστασης

### **3.9 Βιοχημικές αναλύσεις**

Οι υπό μελέτη μικτές καλλιέργειες υποβλήθηκαν επιπλέον σε βιοχημικές αναλύσεις λιπαρών οξέων και χρωστικών.

#### 3.9.1 Εργαστηριακή μέθοδος για την άμεση εστεροποίηση των λιπαρών οξέων

Η περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα προσδιορίζεται με τη μέθοδο της άμεσης εστεροποίησης (Lepage & Roy 1986).

Όπως προαναφέρθηκε, με το πέρας της πειραματικής διαδικασίας των μικτών καλλιεργειών έγινε εκ νέου επανάληψη του πειράματος και όταν οι καλλιέργειες ήταν στη μετα-εκθετική φάση, 3 δείγματα από κάθε καλλιέργεια διηθήθηκαν υπό κενό σε φίλτρα GF/C με σκοπό να γίνει η μέτρηση των λιπαρών οξέων.

#### Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια

- a. Μεθανόλη/τολουόλιο (3:2 v/v)
- b. ακετυλογλωρίδιο/μεθανόλη (1/20 v/v)
- c. εξάνιο AR
- d. θειικό νάτριο (άνυδρο sodiumsulphate)
- e. ισοοκτάνιο
- f. Internal standard 19:0 (συγκέντρωση 1mg/ml stock solution)

### Εργαστηριακή διαδικασία

1. Τα φίλτρα τοποθετούνται σε γυάλινους σωλήνες των 35ml με τεφλόν βιδωτό καπάκι (SIGMA). Γίνεται η προσθήκη 5ml αντιδραστηρίου μεθανόλης – εξανίου (3:2 v/v) και 5ml αντιδραστηρίου ακετυλοχλωριδίου/μεθανόλης (1/20 v/v, που παρασκευάζεται αυθημερόν) ως παράγοντας εστεροποίησης, καθώς και 100μl εσωτερικού πρότυπου διαλύματος του λιπαρού οξέος 19:0 (internal standard) από συμπυκνωμένο διάλυμα καλλιεργητικού μέσου.
2. Σε κάθε σωλήνα διοχετεύεται άζωτο και κλείνεται ερμητικά (αντίδραση σε ατμόσφαιρα αζώτου προς αποφυγή οξείδωσης των λιπαρών οξέων).
3. Γίνεται προσεκτική ανάδευση έτσι ώστε να μην κολλήσουν τα δείγματα ψηλά στους σωλήνες.
4. Οι σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο των 100 °C για 1 ώρα και αναδεύονται προσεκτικά κάθε 10 λεπτά.
5. Με το πέρας της 1 ώρας προστίθεται στα δείγματα 5ml HPLC νερό και 5ml εξάνιο και γίνεται καλή ανάδευση.
6. Τα δείγματα μεταφέρονται σε σωλήνες φυγοκέντρου των 35-50ml και πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στις 3000 rpm για 5 λεπτά.
7. Η ανώτερη φάση του εξανίου μεταφέρεται πολύ προσεκτικά σε απλούς σωλήνες των 35ml. Το στάδιο του καθαρισμού επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές (στους σωλήνες φυγοκέντρωσης γίνεται προσθήκη νερού με 3ml HPLC και με 3ml εξάνιο).
8. Αφαιρείται η υγρασία της φάσης του εξανίου φιλτράροντας τα δείγματα στην ειδική συσκευή διήθησης, έχοντας προσθέσει 1-2gr θειικό νάτριο (άνυδρο sodiumsulphate). Τα δείγματα συλλέγονται σε φιάλες εξάτμισης.
9. Γίνεται εξάτμιση σε περιστροφικό εξάτμιστή υπό κενό και στη συνέχεια διοχετεύεται άζωτο μέχρι πλήρους εξάτμισης.
10. Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων συλλέγονται σε φιαλίδια αέριας χρωματογραφίας, με 1ml αντιδραστηρίου e και φυλάσσονται στους -20°C.

### 3.9.2 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (Thin Layer Chromatography - TLC) με χρήση πλακιδίων silica gel

Η χρωματογραφία είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει μεμονωμένα συστατικά μέσα σε ένα δείγμα, με βάση τις διαφορές τους σε ορισμένα

φυσικά χαρακτηριστικά τους όπως π.χ. το μέγεθος του μορίου, το σχήμα, το φορτίο, την πτητικότητα, τη διαλυτότητα κ.λ.π. Σε γενικές γραμμές όλα τα χρωματογραφικά συστήματα αποτελούνται από μία στατική φάση η οποία μπορεί να είναι στερεή, πηκτή (gel), υγρή ή ένα μείγμα στερεού-υγρού, και μια κινητή φάση η οποία μπορεί να είναι υγρή ή αέρια και η οποία ρέει επάνω ή διαμέσου της στατικής φάσης. Η επιλογή των δύο φάσεων γίνεται έτσι ώστε οι προς διαχωρισμό ενώσεις να έχουν διαφορετικούς συντελεστές κατανομής.

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος, με την ιδιαίτερα υψηλή διαχωριστική της ικανότητα, χρησιμοποιείται κυρίως για την ποιοτική ανάλυση μη πτητικών ενώσεων και ειδικότερα: για την παρακολούθηση της διαδικασίας καθαρισμού ενός δείγματος, τον έλεγχο της πορείας μιας αντίδρασης και τον προσδιορισμό του αριθμού των προϊόντων της.

Στην παρούσα εργασία, η στατική φάση είναι μια γυάλινη πλάκα (Nano-SIL-20 [0.20mm (10 x 10cm)] της εταιρίας Macherey-Nagel), επιστρωμένη με διοξείδιο του πυριτίου (Hexane / Diethylether 1/1). Ως κινητή φάση (διαλύτης ανάπτυξης) χρησιμοποιείται το μίγμα διαλυτών (Hexane + Diethylether + Acetic acid glacial (αναλογία 80:20:2). Η κινητή υγρή φάση διέρχεται κατά μήκος την πλάκα της λεπτής στοιβάδος που κρατείται κατακόρυφα, ωθούμενη (η υγρή φάση) από τριχοειδή φαινόμενα.

#### Εργαστηριακή διαδικασία

*1<sup>ο</sup> Στάδιο: Ενεργοποίηση των πλακιδίων:*

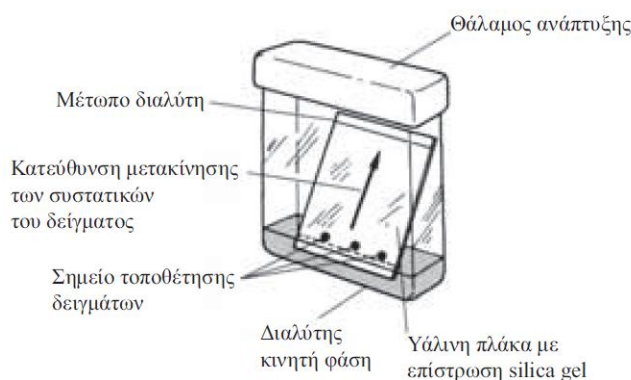
1. Στο γυάλινο θάλαμο ανάπτυξης τοποθετούνται περίπου 55ml διαλύματος εξανίου/ διεθυλαιθέρα (Hexane / Diethylether - αναλογία 1:1).
2. Έπειτα τοποθετούνται κατακόρυφα 2 πλακίδια και αφήνονται περίπου 30 λεπτά μέχρι το δ/μα να διατρέξει όλη την επιφάνειά τους.
3. Κατόπιν τα πλακίδια εισέρχονται σε κλίβανο ξηρής θερμότητας στους 110°C (για 1 ώρα) με την ενεργοποιημένη επιφάνεια προς τα επάνω.
4. Στη συνέχεια τα πλακίδια αφήνονται να κρυώσουν σε ξηραντήρα.

*2<sup>ο</sup> Στάδιο: Εφαρμογή του δείγματος*

5. Αρχικά τα δείγματα συμπυκνώνονται με αέριο άζωτο μέχρι να φτάσουν περίπου το 0,5ml.



6. Επάνω στα πλακίδια, με τη βοήθεια ενός μολυβιού και ενός χάρακα, γίνεται σχεδιασμός μιας γραμμής, μετρώντας 1cm από τη βάση του πλακιδίου.
7. Έπειτα με τη βοήθεια μιας πιπέτας Pasteur (στην αιχμή της οποίας έχει τοποθετηθεί βαμβάκι), γίνεται εφαρμογή του δείγματος, επάνω στη γραμμή σχεδίασης.
8. Τα πλακίδια τοποθετούνται στο θάλαμο ανάπτυξης (Εικόνα 3.4), με 50ml εξανίου / διεθυλαιθέρα /οξικού οξέος (n-Hexane/ Diethylether/ Acetic acid glacial -αναλογία 80:20:2), και αφήνονται να διαχωριστούν, μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να απέχει περίπου 2cm από την κορυφή των πλακιδίων.



Εικόνα 3.4. Διάταξη ενός συστήματος TLC.

9. Μετά την αφαίρεση των πλακιδίων από τον θάλαμο ανάπτυξης με τη βοήθεια ενός μολυβιού σημειώνεται η επιθυμητή ζώνη, εκατέρωθεν του ύψους ανάπτυξης του δείγματος.
10. Αφού στεγνώσουν τα πλακίδια, με τη βοήθεια ενός νυστεριού, απομακρύνεται η επιφάνεια της ζώνης που έχει προηγουμένως σχεδιαστεί. Τα δείγματα συλλέγονται σε σωλήνες φυγοκέντρου.
11. Στους σωλήνες γίνεται προσθήκη 1,5ml εξανίου/BHT (n-Hexane HPLC/ BHT – αναλογία 0,05w/v)
12. Με τη βοήθεια σύριγγας (στην οποία έχει τοποθετηθεί ειδικό φίλτρο Spartan HPLC Certified), γίνεται συλλογή του υπερκείμενου διαλύματος από τους σωλήνες. Τα δείγματα επανατοποθετούνται στα αρχικά τους φιαλίδια αέριας χρωματογραφίας.
13. Τα δείγματα φυλάσσονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι να διέλθουν στον αέριο χρωματογράφο (GLC Varian 3300, Sugar Land, TX, USA).

Η ανάλυση του προφίλ των λιπαρών οξέων, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Διατροφής και Παθολογίας Υδρόβιων Οργανισμών, του Ινστιτούτου Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.ΘΕ (Ελληνικό Κέντρο Θαλασσιών Ερευνών).

### 3.9.3 Διαδικασία προσδιορισμού χλωροφύλλης α (Chl-a)

Η μέθοδος στηρίζεται στην εκχύλιση των χρωστικών με πρόσφατα παρασκευασθέν διάλυμα ακετόνης 90% και στον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της chl-a σε επιλεγμένα μήκη κύματος.

Για τον σκοπό αυτό, έγινε διήθηση κατάλληλου όγκου από τις καλλιέργειες NAB3, NAB6, NAB 7.

#### *Πειραματική διαδικασία*

- ❖ 2ml πυκνών καλλιεργειών, ηλικίας περίπου ενός μηνός, διηθήθηκαν με τη χρήση συσκευής διήθησης υπό κενό, σε φίλτρα γυάλινων μικροϊνών (GFC) Whatman. Για στατιστικούς λόγους, ελήφθησαν 3 δείγματα από την κάθε καλλιέργεια.
- ❖ Στη συνέχεια, τα φίλτρα αυτά τοποθετήθηκαν σε γυάλινους σωλήνες φυγοκέντρου που περιείχαν 5ml διαλύματος ακετόνης 90% και επώαστηκαν στους -18 °C για 24 ώρες.
- ❖ Τα φίλτρα ομογενοποιήθηκαν, εντός των σωλήνων φυγοκέντρωσης, με τη χρήση γυάλινης ράβδου, και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 3000 rpm.
- ❖ Το υπερκείμενο υλικό φωτομετρήθηκε σε πλαστικές κυψελίδες των 5ml, σε αναλογικό φωτόμετρο Shimadzu UV-120-02. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε καθαρό διάλυμα ακετόνης 90%. Τα μήκη κύματος στα οποία μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων είναι τα εξής:
  - 750 nm: έλεγχος, κανονικά έχουμε μηδενική απορρόφηση χλωροφυλλών
  - 664, 647, 630 nm: μήκη κύματος που απορροφούν οι χλωροφύλλες

#### Υπολογισμοί

Από τις αρχικές απορροφήσεις που μετρήθηκαν στα διάφορα μήκη κύματος πλην των 750 nm, αφαιρέθηκαν οι απορροφήσεις κάθε δείγματος για το μήκος κύματος 750 nm και προέκυψαν οι τελικές απορροφήσεις (A) των δειγμάτων.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης χρωστικών στον μετρούμενο όγκο καλλιέργειας έγινε με τη χρήση των παρακάτω εξισώσεων (από Parsons et al. 1984):

$$Ca = 11,85 \cdot (OD'664) - 1,54 \cdot (OD'647) - 0,08 \cdot (OD'630)$$

$$Cb = 21,03 \cdot (OD'647) - 5,43 \cdot (OD'664) - 2,66 \cdot (OD'630)$$

$$Cc = 24,52 \cdot (OD'630) - 1,67 \cdot (OD'664) - 7,60 \cdot (OD'647)$$

Στη συνέχεια, έγινε αναγωγή των παραπάνω συγκεντρώσεων σε mg χρωστικής ανά ml καλλιέργειας:

$$\text{mg/ml} = (Ci \times u) / (V \times 10)$$

Όπου:

*Ci* : αντίστοιχη συγκέντρωση χρωστικής

*u* = 5 ml (όγκος διαλύματος ακετόνης)

*V* = 2 ml (όγκος καλλιέργειας που διηθήθηκε)

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

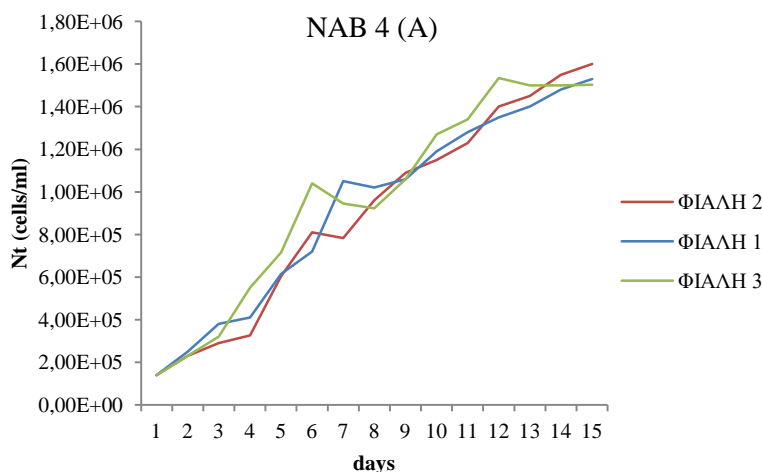
### 4.1 Πειράματα μικτών καλλιέργειών

Όλες οι καλλιέργειες, αναπτύσσονται όπως αναφέρθηκε, σε φυσική αλατότητα  $\approx 40\%$ . Ο συνολικός όγκος για την κάθε φιάλη της κάθε καλλιέργειας είναι 1,5lt και το αρχικό εμβόλιο είναι 300ml. Στη συνέχεια ακολουθούν αναλυτικά τα πειράματα των μικτών καλλιέργειών, για τις 3 περιοχές δειγματοληψίας.

#### 4.1.1 Πείραμα καλλιέργειας – Λιμάνι Αγίου Κοσμά (Σαρωνικός κόλπος)

##### NAB 4 (A)

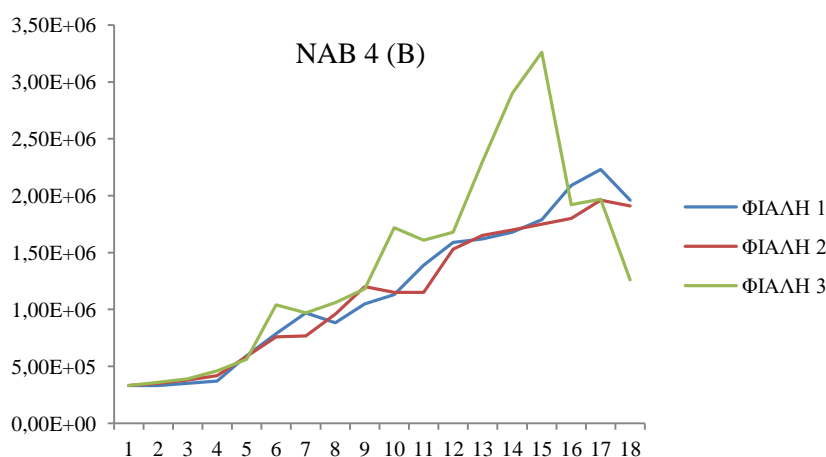
Στην καλλιέργεια **NAB 4 (A)** που είναι εμπλουτισμένη με θρεπτικό αναλογίας 2 x Walne, εμφανίζεται ένα κυρίαρχο είδος, το οποίο ανήκει στο γένος *Tetraselmis*. Ο αριθμός των κυττάρων / ml της καλλιέργειας που έγινε για τον έλεγχο της ανάπτυξης των μικροφυκών, παρουσιάζεται αναλυτικά στο Παράρτημα I στον **Πίνακα 1**. Στο Διάγραμμα 4.1 παρουσιάζεται η κινητική ανάπτυξης της καλλιέργειας στις 3 φιάλες ανάπτυξης. Στο Παράρτημα II παρουσιάζονται και τα διαγράμματα του ρυθμού αύξησης [Διάγραμμα 1 (LN cells / ml) και Διάγραμμα 2]. Η αρχική πυκνότητα των κυττάρων / ml της καλλιέργειας NAB 4(A) ήταν  $1,40 \times 10^5$  cells/ml και στις 3 φιάλες.



**Διάγραμμα 4.1.** Cells/ml καλλιέργειας NAB (A), Αγ. Κοσμάς.

## NAB 4 (B)

Στην καλλιέργεια **NAB 4 (B)** που είναι εμπλουτισμένη με θρεπτικό αναλογίας 2 x Walne, εμφανίζεται επίσης ένα κυρίαρχο είδος, το οποίο ανήκει στο γένος *Tetraselmis*. Ο αριθμός των κυττάρων / ml της καλλιέργειας παρουσιάζεται αναλυτικά στο Παράρτημα I στον **Πίνακα 2**. Στο Διάγραμμα 4.2 παρουσιάζεται η κινητική ανάπτυξης της καλλιέργειας στις 3 φιάλες ανάπτυξης. Στο Παράρτημα II παρουσιάζονται και τα διαγράμματα του ρυθμού αύξησης [Διάγραμμα 3 (LN cells / ml) και Διάγραμμα 4]. Η αρχική πυκνότητα των κυττάρων / ml της καλλιέργειας NAB 4(B) ήταν  $3,32 \times 10^5$  cells/ml και στις 3 φιάλες.



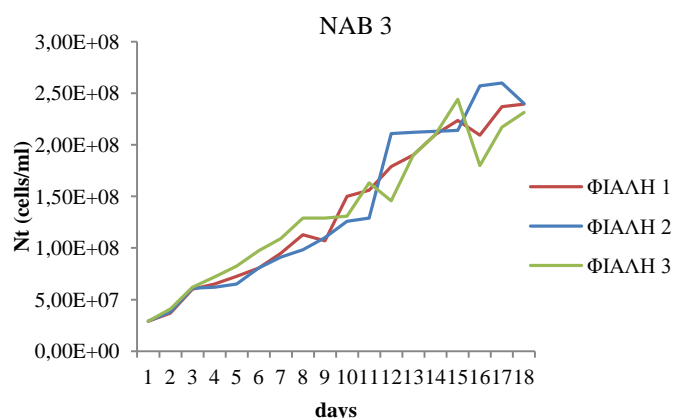
Διάγραμμα 4.2. Cells/ml καλλιέργειας NAB (B), Αγ. Κοσμάς.

### 4.1.2 Πείραμα καλλιέργειας – Λίμνη Ευβοίας (Ευβοϊκός κόλπος)

## NAB 3

Η Καλλιέργεια **NAB 3** αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο Walne. Εμφανίζεται ένα κυρίαρχο είδος, το οποίο ανήκει στην κλάση των Trebouxiophyceae. Ο αριθμός των κυττάρων / ml της καλλιέργειας που έγινε για τον έλεγχο της ανάπτυξης των μικροφυκών, παρουσιάζεται αναλυτικά στο Παράρτημα I στον **Πίνακα 3**. Στο Παράρτημα II παρουσιάζονται και τα διαγράμματα του ρυθμού αύξησης [Διάγραμμα 5 (LN cells / ml) και Διάγραμμα 6]. Η αρχική πυκνότητα των κυττάρων / ml της καλλιέργειας NAB 3 ήταν  $2,90 \times 10^7$  cells/ml και στις 3 φιάλες.

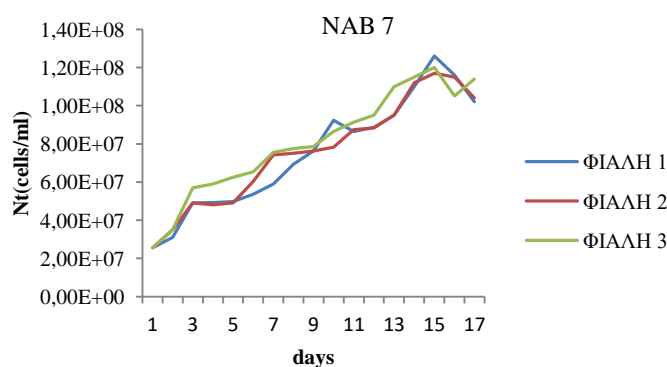
Στο Διάγραμμα 4.3 που ακολουθεί παρουσιάζεται η κινητική ανάπτυξης της καλλιέργειας στις 3 φιάλες ανάπτυξης.



Διάγραμμα 4.3. Cells/ml καλλιέργειας NAB 3, Λίμνη Ευβοίας.

### NAB 7

Η Καλλιέργεια **NAB 7** αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο 2 x Walne. Εμφανίζεται ένα κυρίαρχο είδος, το οποίο ανήκει στο γένος *Nannochloropsis*. Ο αριθμός των κυττάρων / ml της καλλιέργειας που έγινε για τον έλεγχο της ανάπτυξης των μικροφυκών, παρουσιάζεται αναλυτικά στο Παράρτημα I στον Πίνακα 4. Στο Παράρτημα II παρουσιάζονται και τα διαγράμματα του ρυθμού αύξησης [Διάγραμμα 7 (LN cells / ml) και Διάγραμμα 8]. Η αρχική πυκνότητα των κυττάρων / ml της καλλιέργειας NAB 7 ήταν  $2,56 \times 10^7$  cells/ml και στις 3 φιάλες. Στο Διάγραμμα 4.4 που ακολουθεί παρουσιάζεται η κινητική ανάπτυξης της καλλιέργειας στις 3 φιάλες ανάπτυξης.

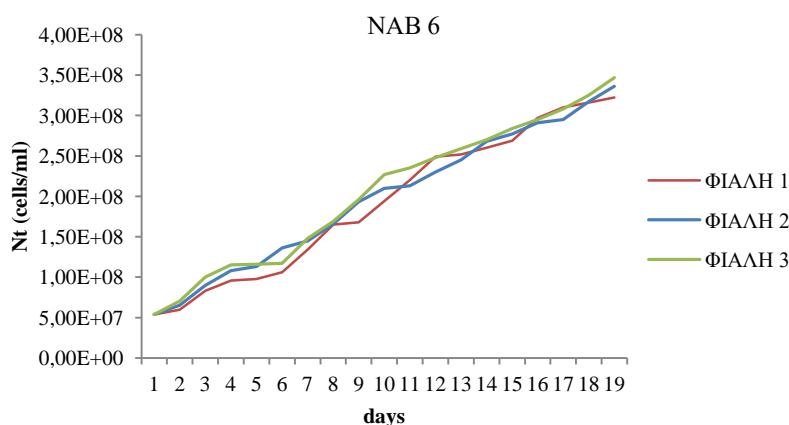


Διάγραμμα 4.4 Cells/ml καλλιέργειας NAB 7, Λίμνη Ευβοίας.

### 4.1.3 Πείραμα καλλιέργειας – Κυμάσι – Μαντουδίου (Αιγαίο πέλαγος)

#### NAB 6

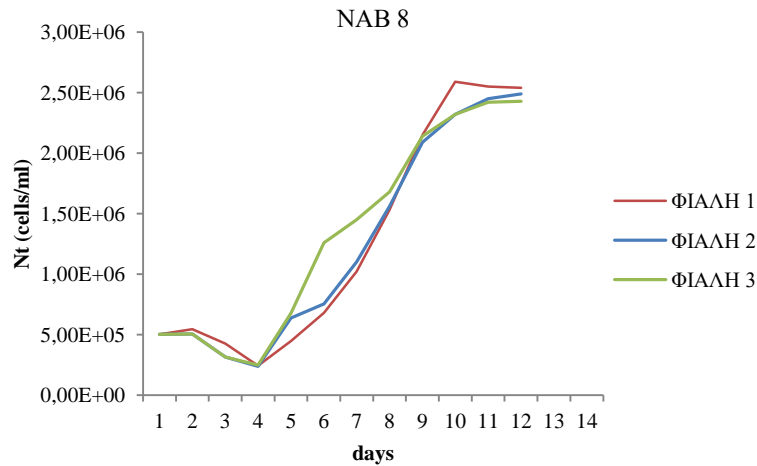
Η Καλλιέργεια **NAB 6** αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο 2 x Walne. Εμφανίζεται ένα κυρίαρχο είδος, το οποίο ανήκει στην κλάση Trebouxiophyceae. Ο αριθμός των κυττάρων / ml της καλλιέργειας που έγινε για τον έλεγχο της ανάπτυξης των μικροφυκών, παρουσιάζεται αναλυτικά στο Παράρτημα I στον **Πίνακα 5**. Στο Παράρτημα II παρουσιάζονται και τα διαγράμματα του ρυθμού αύξησης [Διάγραμμα 9 (LN cells / ml) και Διάγραμμα 10]. Η αρχική πυκνότητα των κυττάρων / ml της καλλιέργειας NAB 6 ήταν  $5,36 \times 10^7$  cells/ml και στις 3 φιάλες. Στο Διάγραμμα 4.5 που ακολουθεί παρουσιάζεται η κινητική ανάπτυξης της καλλιέργειας στις 3 φιάλες ανάπτυξης.



**Διάγραμμα 4.5.** Cells/ml καλλιέργειας NAB 6, Κυμάσι – Μαντουδίου.

#### NAB 8

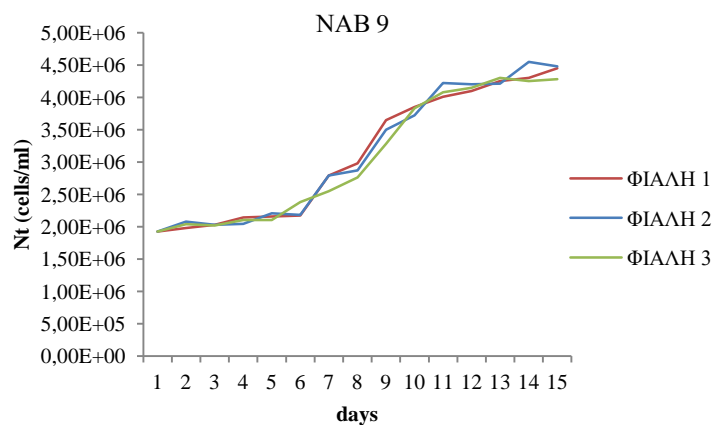
Η Καλλιέργεια **NAB 8** αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο 2 x Walne. Εμφανίζεται ένα κυρίαρχο είδος, το οποίο πιθανώς ανήκει στο γένος *Pavlova*. Ο αριθμός των κυττάρων / ml της καλλιέργειας που έγινε για τον έλεγχο της ανάπτυξης των μικροφυκών, παρουσιάζεται αναλυτικά στο Παράρτημα I στον **Πίνακα 6**. Στο Παράρτημα II παρουσιάζονται και τα διαγράμματα του ρυθμού αύξησης [Διάγραμμα 11 (LN cells / ml) και Διάγραμμα 12]. Η αρχική πυκνότητα των κυττάρων / ml της καλλιέργειας NAB 8 ήταν  $5,04 \times 10^5$  cells/ml και στις 3 φιάλες. Στο Διάγραμμα 4.6 που ακολουθεί παρουσιάζεται η κινητική ανάπτυξης της καλλιέργειας στις 3 φιάλες ανάπτυξης.



**Διάγραμμα 4.6.** Cells/ml καλλιέργειας NAB 8, Κυμάσι – Μαντουδίου.

### NAB 9

Η Καλλιέργεια **NAB 9** αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο Walne. Ο συνολικός όγκος της συγκεκριμένης καλλιέργειας, της κάθε φιάλης ανάπτυξης, είναι 1lt και το αρχικό εμβόλιο είναι 500ml. Εμφανίζεται ένα κυρίαρχο είδος, το οποίο ανήκει πιθανώς στο γένος *Pyramimonas*. Ο αριθμός των κυττάρων / ml της καλλιέργειας που έγινε για τον έλεγχο της ανάπτυξης των μικροφυκών, παρουσιάζεται αναλυτικά στο Παράρτημα στον **Πίνακα 7**. Στο παράρτημα II παρουσιάζονται και τα διαγράμματα του ρυθμού αύξησης [Διάγραμμα 13 (LN cells / ml) και Διάγραμμα 14]. Η αρχική πυκνότητα των κυττάρων / ml της καλλιέργειας NAB 9 ήταν  $1,93 \times 10^6$  cells/ml και στις 3 φιάλες. Στο Διάγραμμα 4.7 που ακολουθεί παρουσιάζεται η κινητική ανάπτυξης της καλλιέργειας στις 3 φιάλες ανάπτυξης.

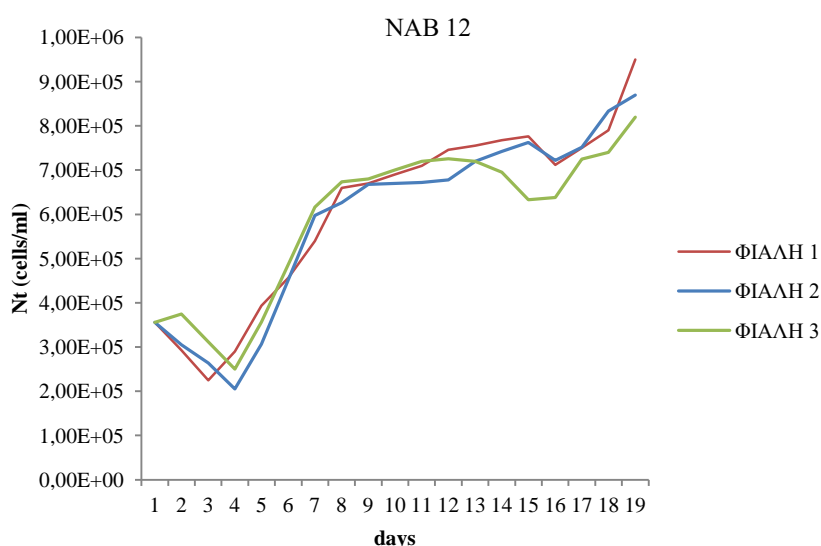


**Διάγραμμα 4.7.** Cells/ml καλλιέργειας NAB 9, Κυμάσι – Μαντουδίου.



## NAB 12

Η Καλλιέργεια **NAB 12** αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο 2 x Walne. Εμφανίζεται ένα κυρίαρχο είδος, το οποίο ανήκει πιθανώς στην κλάση Coccolithophyceae. Ο αριθμός των κυττάρων / ml της καλλιέργειας που έγινε για τον έλεγχο της ανάπτυξης των μικροφυκών, παρουσιάζεται αναλυτικά στο παράρτημα στον **Πίνακα 8**. Στο Παράρτημα II παρουσιάζονται και τα διαγράμματα του ρυθμού αύξησης [Διάγραμμα 15 (LN cells / ml) και Διάγραμμα 16]. Η αρχική πυκνότητα των κυττάρων / ml της καλλιέργειας NAB 12 ήταν  $3,56 \times 10^5$  cells/ml και στις 3 φιάλες. Στο Διάγραμμα 4.8 που ακολουθεί παρουσιάζεται η κινητική ανάπτυξης της καλλιέργειας στις 3 φιάλες ανάπτυξης.



**Διάγραμμα 4.8.** Cells/ml καλλιέργειας NAB 12, Κυμάσι – Μαντουδίου.

Στον Πίνακα 4.1 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι μέσες τιμές του ειδικού ρυθμού αύξησης ( $\mu_{max}$ ,  $d^{-1}$ ), η μέγιστη αφθονία ( $N_{tmax}$ , κύτταρα  $ml^{-1}$ ), η μέγιστη βιομάζα ( $X_{max}$ ,  $mg\ ml^{-1}$ ), η ογκομετρική παραγωγικότητα των κυττάρων ( $P_{cells}$ , κύτταρα  $ml^{-1}d^{-1}$ ) και η ογκομετρική παραγωγικότητα της βιομάζας ( $P_x$ ,  $mg\ ml^{-1}d^{-1}$ ) των μικτών καλλιεργειών όπως αυτές αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο.

Η κωδικοποίηση των μικτών καλλιεργειών με τα κυρίαρχα είδη μικροφυκών, παραμένει η ίδια όπως έχει εφαρμοστεί και προηγουμένως:

NAB 4 (A) και NAB (B) (*Tetraselmis* spp., Chlorodendrophyceae) από τον Σαρωνικό Κόλπο, NAB 3 (green coccoid, Trebouxiophyceae) και NAB 7 (*Nannochloropsis oceanica*, Eustigmatophyceae) από τον Ευβοϊκό Κόλπο, NAB 6 (green coccoid, Trebouxiophyceae), NAB 8 (*Pavlova* sp., Pavlovophyceae) NAB 9 (*Pyramimonas* sp., Pyramimonadophyceae) & NAB 12 (coccolithophorid) από το Αιγαίο Πέλαγος – ΒΑ της Εύβοιας (Κυμάσι – Μαντουδίου).

**Πίνακας 4.1.** Μέσες τιμές του ειδικού ρυθμού αύξησης ( $\mu_{max}$ ,  $d^{-1}$ ), η μέγιστη αφθονία ( $N_{tmax}$ , κύτταρα  $ml^{-1}$ ), η ογκομετρική παραγωγικότητα των κυττάρων ( $P_{cells}$ , κύτταρα  $ml^{-1}d^{-1}$ ), η μέγιστη βιομάζα ( $X_{max}$ ,  $mg\ ml^{-1}$ ) και η ογκομετρική παραγωγικότητα της βιομάζας ( $P_x$ ,  $mg\ ml^{-1}d^{-1}$ ) των μικτών καλλιεργειών.

AVERAGE	NAB 4 (A)	NAB 4 (B)	NAB 3	NAB 7	NAB 6	NAB 8	NAB 9	NAB 12
$\mu_{max}$ ( $d^{-1}$ )	0,36	0,25	0,20	0,17	0,23	0,51	0,15	0,31
std	0,038	0,063	0,016	0,021	0,031	0,064	0,028	0,040
$N_{tmax}$ (cells/ml)	1,55E+06	2,48E+06	2,44E+08	1,23E+08	3,35E+08	2,50E+06	4,43E+06	8,80E+05
std	3,93E+04	1,91E+05	1,47E+07	5,11E+06	1,24E+07	8,08E+04	1,26E+05	6,56E+04
$P_{cells}$ (cells/ml/day)	1,11E+05	1,46E+05	1,43E+07	7,21E+06	1,86E+07	2,28E+05	3,17E+05	4,89E+04
std	2,81E+03	1,12E+04	8,65E+05	3,00E+05	6,90E+05	7,35E+03	8,99E+03	3,64E+03
$X_{max}$ ( $\mu m^3/ml$ )	8,26E+08	1,26E+09	1,85E+09	4,44E+09	2,62E+09	2,36E+08	2,32E+08	8,42E+08
std	2,99E+07	1,06E+08	2,70E+07	1,98E+07	1,80E+08	1,06E+07	7,65E+06	1,05E+08
$P_x$ ( $\mu m^3/ml/day$ )	5,90E+07	7,42E+07	1,09E+08	2,61E+08	1,46E+08	2,15E+07	1,66E+07	4,68E+07
std	2,13E+06	6,23E+06	1,59E+06	1,16E+06	9,98E+06	9,65E+05	5,46E+05	5,84E+06

#### 4.2 Επανάληψη του πειράματος με σκοπό τη μέτρηση των λιπαρών και του ξηρού βάρους των καλλιεργειών

Τα πειράματα των καλλιεργειών επαναλήφθηκαν με τις ίδιες συνθήκες, μέχρι τη **μετα-εκθετική φάση**, όπου έγινε λήψη δείγματος, με σκοπό τη μέτρηση του ξηρού βάρους και τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων των καλλιεργειών.

Οι αριθμοί κυττάρων / ml των καλλιεργειών που έγιναν για τον έλεγχο της ανάπτυξης των μικροφυκών, παρουσιάζονται αναλυτικά στους πίνακες τους Παραρτήματος Ι. Στο Παράρτημα ΙΙ παρουσιάζονται αναλυτικά και τα διαγράμματα για την κινητική ανάπτυξης των καλλιεργειών και του ρυθμού αύξησης.

Στον Πίνακα 4.2 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές του ειδικού ρυθμού αύξησης ( $\mu_{max}$ ,  $d^{-1}$ ), η μέγιστη αφθονία ( $N_{tmax}$ , κύτταρα  $ml^{-1}$ ), η ογκομετρική παραγωγικότητα των κυττάρων ( $P_{cells}$ , κύτταρα  $ml^{-1}d^{-1}$ ) και η ογκομετρική παραγωγικότητα της βιομάζας ( $P_x$ ,  $mg\ ml^{-1}d^{-1}$ ) των μικτών καλλιεργειών όπως αυτές αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο, για την επανάληψη του πειράματος.

Στην 2<sup>η</sup> επανάληψη του πειράματος στην μικτή καλλιέργεια **NAB 4(A)**, τα κυρίαρχα είδη ήταν 2. Το sp.1 είναι το *Tetraselmis* sp. και το sp.2 ανήκει πιθανώς στην κλάση των Trebouxiophyceae.

Πίνακας 4.2. Μέσες τιμές του ειδικού ρυθμού αύξησης ( $\mu_{max}$ ,  $d^{-1}$ ), η μέγιστη αφθονία ( $N_{tmax}$ , κύτταρα  $ml^{-1}$ ), η ογκομετρική παραγωγικότητα των κυττάρων ( $P_{cells}$ , κύτταρα  $ml^{-1}d^{-1}$ ), η μέγιστη βιομάζα ( $X_{max}$ ,  $mg\ ml^{-1}$ ) και η ογκομετρική παραγωγικότητα της βιομάζας ( $P_x$ ,  $mg\ ml^{-1}d^{-1}$ ) των μικτών καλλιεργειών για την επανάληψη του πειράματος.

AVERAGE	NAB 4 (A) SP1	NAB 4 (A) SP2	NAB 4 (B)	NAB 3	NAB 7	NAB 6	NAB 8	NAB 9	NAB 12
$\mu_{max}$ ( $d^{-1}$ )	0,18	0,18	0,25	0,22	0,17	0,14	0,32	0,17	0,16
std	0,008	0,023	0,060	0,015	0,049	0,006	0,054	0,034	0,011
$N_{tmax}$ (cells/ml)	9,63E+05	1,97E+06	1,04E+06	1,48E+08	6,48E+07	1,66E+08	1,40E+06	4,37E+06	3,94E+05
std	3,93E+05	6,15E+05	8,47E+04	4,42E+06	8,14E+06	1,17E+07	5,69E+04	2,65E+05	1,43E+04
$P_{cells}$ (cells/ml/day)	7,78E+04	1,57E+05	1,18E+05	1,34E+07	5,89E+06	1,66E+07	1,08E+05	4,37E+05	3,94E+04
std	4,34E+04	6,85E+04	1,55E+04	4,02E+05	7,40E+05	1,17E+06	4,37E+03	2,65E+04	1,43E+03
$X_{max}$ ( $\mu m^3/ml$ )	5,13E+08	1,97E+07	5,28E+08	1,13E+09	2,36E+09	1,30E+09	1,33E+08	2,29E+08	3,76E+08
std	2,15E+08	6,64E+06	4,83E+07	1,04E+08	3,47E+08	1,51E+08	1,33E+07	1,46E+07	2,19E+07
$P_x$ ( $\mu m^3/ml/day$ )	4,15E+07	1,58E+06	5,96E+07	1,02E+08	2,14E+08	1,30E+08	1,02E+07	2,12E+07	3,76E+07
std	2,36E+07	7,43E+05	8,58E+06	9,42E+06	3,16E+07	1,51E+07	1,02E+06	3,97E+06	2,19E+06

### 4.3 Ξηρό βάρος καλλιεργείων

Στον Πίνακα 4.3 που ακολουθεί παρουσιάζεται ο μέσος όρος του ξηρού βάρους, για τις 3 φιάλες ανάπτυξης και για τις 8 μικτές καλλιέργειες.

**Πίνακας 4.3.** Μέσος όρος ξηρού βάρους των 8 μικτών καλλιεργείων.

<b>ΞΗΡΟ ΒΑΡΟΣ</b>	<b>NAB 4(A)</b>	<b>NAB 4(B)</b>	<b>NAB 3</b>	<b>NAB 7</b>	<b>NAB 6</b>	<b>NAB 8</b>	<b>NAB 9</b>	<b>NAB 12</b>
<b>average (mg/lit)</b>	191,83	364,57	203,02	338,40	239,40	157,16	198,23	473,22
<b>stdev</b>	51,43	49,04	21,26	22,80	22,75	10,07	18,44	30,48

### 4.4 Βιοχημικές αναλύσεις

#### 4.4.1 Χλωροφύλλες

Στον Πίνακα 4.4 που ακολουθεί παρουσιάζεται ο μέσος όρος της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλες, των μικτών καλλιεργείων NAB 3, NAB 6 και NAB 7. Ο προσδιορισμός των χλωροφυλλών εφαρμόστηκε μόνο για τις μικτές καλλιέργειες, στις οποίες τα κυρίαρχα στελέχη ήταν κοκκοειδή φύκη (coccoïd algae), συμπληρωματικά για τον ταξινομικό προσδιορισμό των συγκεκριμένων φυκών.

Πίνακας 4.4. Χλωροφύλλες των μικτών καλλιεργείων NAB 3, NAB 6 και NAB 7 σε mg/ml καλλιέργειας.

	<b>Chla(av)</b>	<b>STDEV</b>	<b>Chlb(av)</b>	<b>STDEV</b>	<b>Chlc(av)</b>	<b>STDEV</b>	<b>Ratio a:b</b>
<b>NAB 3</b>	2,890	0,017	1,121	0,010	-0,076	0,034	2,58
<b>NAB 6</b>	1,181	0,032	0,649	0,058	-0,370	0,020	1,82
<b>NAB 7</b>	10,634	0,084	2,384	0,038	0,952	0,020	<b>4,46</b>

#### 4.1.1 Χημική Ανάλυση του Προφίλ Λιπαρών Οξέων FAME (Fatty Acids Methylsters)

Το ποσοστό καθώς και τα mg/g των λιπαρών οξέων των μικτών καλλιιεργειών, όπως προέκυψαν από τον μέσο όρο των μετρήσεων, παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 4.5 και 4.6 που ακολουθούν.

Για την καλλιέργεια NAB 4(A), ο μέσος όρος των λιπαρών οξέων προκύπτει από τις μετρήσεις των 3 δειγμάτων που ελήφθησαν, για την κάθε φιάλη της μικτής καλλιέργειας (σύνολο 3 φιάλες / μικτή καλλιέργεια). Στις υπόλοιπες καλλιέργειες, ο προσδιορισμός των λιπαρών οξέων έγινε για ένα δείγμα από κάθε φιάλη (σύνολο 3 φιάλες / μικτή καλλιέργεια) και ο μέσος όρος προκύπτει από το σύνολο των 3 φιαλών για την κάθε μικτή καλλιέργεια.

Σε γενικές γραμμές, το προφίλ των μικροφυκών των μικτών καλλιιεργειών κυριαρχείται από τα λιπαρά οξέα 16:00 (παλμιτικό οξύ), 18:2ω6 (λινελαϊκό οξύ), 18:3ω3 (α-λινολενικό οξύ). Υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ποσοστών των διαφόρων λιπαρών οξέων των μικτών καλλιιεργειών, οι οποίες φαίνεται να κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με το εκάστοτε κυρίαρχο είδος της καλλιέργειας.

**Πίνακας 4.5.** Μέσος όρος (%) των λιπαρών οξέων των μικτών καλλιέργειών NAB 4(A) και NAB (B), δείγματα των οποίων ελήφθησαν κατά τη μετα – εκθετική φάση, καθώς και το ποσοστό των λιπαρών οξέων της μητρικής καλλιέργειας NAB 4(B), η οποία είναι καλλιέργεια  $\approx$  1 μηνός. (Σαρωνικός Κόλπος).

FAME	NAB 4(A) Φ.1		NAB 4(A) Φ.2		NAB 4(A) Φ.3		NAB 4 (B)		ΜΗΤΡΙΚΗ NAB 4(B)
	MEAN	STD	MEAN	STD	MEAN	STD	MEAN	STD	
14:0	10,79	0,67	5,79	0,70	10,19	0,66	8,94	0,77	9,14
14:1	0,56	0,11	0,34	0,15	0,45	0,10	0,46	0,17	-
15:1	0,59	0,11	0,21	0,19	0,33	0,33	0,64	0,28	3,84
16:0	23,18	3,57	18,56	10,26	23,99	0,81	18,27	5,06	21,64
16:1n-7	1,20	0,21	3,48	2,50	2,07	0,18	1,62	0,93	4,29
16:1n-9	1,48	0,47	0,91	0,74	1,38	0,16	1,56	0,52	0,62
?	2,69	0,39	2,85	0,07	2,83	0,27	2,70	0,97	1,71
?	1,12	0,11	1,01	0,55	1,31	0,15	0,81	0,29	0,59
16:2n-4 (?)	1,91	0,22	2,98	1,59	2,96	0,29	1,62	0,18	1,68
?	-	-	1,65	0,85	-	-	-	-	-
16:3	1,22	0,78	2,39	2,67	-	-	2,36	1,77	-
17:1n-9	-	-	-	-	-	-	-	-	4,70
?	1,65	0,12	1,63	0,72	1,40	0,18	1,21	0,66	-
16:4n-3	4,41	0,60	2,15	1,94	3,87	1,65	2,46	1,35	2,29
18:0	0,52	0,18	0,18	0,14	0,28	0,05	0,26	0,11	0,26
18:1n-9	15,06	2,03	13,40	8,25	18,46	0,81	14,56	3,63	19,88
18:1n-7	3,34	0,55	2,49	1,57	3,64	0,11	3,41	0,66	3,68
18:2n-9	1,59	1,12	3,29	3,86	1,06	0,46	3,10	2,44	-
18:2n-6	5,44	1,04	3,89	3,23	5,77	0,42	3,72	1,37	7,28
18:3n-6	0,40	0,10	0,84	0,35	0,66	0,16	0,81	0,13	0,68
18:3n-3	7,45	0,96	3,97	3,50	6,47	1,03	4,66	2,56	2,61
18:4n-3	1,77	0,21	1,18	0,15	1,35	0,45	1,18	0,40	0,74
?	2,06	1,51	4,31	5,22	1,16	0,54	3,41	3,20	-
20:0	0,35	0,24	-	-	-	-	-	-	-
20:1n-9	2,24	0,31	1,45	1,09	2,18	0,20	1,78	0,22	1,83
20:2n-9	-	-	0,38	0,24	0,19	0,06	0,61	0,12	0,52
20:3n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20:4n-6 (ARA)	0,17	0,03	5,10	6,07	0,24	0,09	-	-	0,60
20:3n-3	2,24	1,90	-	-	1,45	0,71	4,27	3,57	2,62
20:4n-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20:5n-3 (EPA)	1,70	0,43	1,33	0,03	1,76	0,14	2,07	0,41	1,29
22:1n-9	2,52	2,14	5,37	6,41	1,56	0,73	4,42	3,76	-
22:2n-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22:3n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	4,26
22:5n-6	-	-	0,59	0,40	-	-	0,74	0,09	-
22:5n-3	2,34	1,99	5,41	6,55	1,54	0,69	4,24	3,76	-
24:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22:6n-3 (DHA)	-	-	0,23	0,20	0,23	0,13	0,54	0,20	3,10
24:1n-9	-	-	3,59	2,07	3,63	-	3,75	3,02	0,15
TFA mg/g	62,81	2,85	60,74	22,21	58,87	4,86	71,24	20,73	49,23
SAFA %	33,21	3,94	24,53	10,55	34,46	0,58	27,47	5,73	31,03
MUFA %	26,53	1,74	31,24	5,53	31,29	1,89	32,19	4,95	38,99
PUFA %	32,33	4,60	33,73	13,17	27,56	1,55	32,20	8,55	27,68

Πίνακας 4.6 Μέσος όρος (%) των λιπαρών οξέων των μικτών καλλιέργειών NAB 3, NAB 7 (Ευβοϊκός Κόλπος) και NAB 6, NAB 8, NAB 12, NAB 9 (Κυμάσι – Αιγ. Πέλαγος), δείγματα των οποίων ελήφθησαν κατά τη μετα – εκθετική φάση.

FAME	NAB 3		NAB 7		NAB 6		NAB 8		NAB 12		NAB 9	
	MEAN	STD	MEAN	STD	MEAN	STD	MEAN	STD	MEAN	STD	MEAN	STD
14:0	7,06	2,10	12,60	0,85	10,15	2,13	4,52	1,47	1,27	0,52	3,84	0,46
14:1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,72	0,11
15:1	0,79	0,18	0,71	0,26	0,86	0,64	9,41	3,52	13,47	2,52	12,32	1,01
16:0	21,52	3,21	19,35	3,08	17,82	3,97	14,04	1,84	14,41	3,44	8,07	0,82
16:1n-7	1,04	0,36	1,01	0,11	1,04	0,56	8,58	3,03	10,86	2,13	9,46	0,69
16:1n-9	1,01	0,24	16,45	3,52	0,90	0,14	1,84	1,08	3,09	1,06	4,95	0,56
?	5,98	1,47	0,43	0,15	4,29	0,47	-	-	-	-	0,60	0,32
?	1,90	0,33	-	-	1,69	0,43	-	-	-	-	-	-
16:2n-4 (?)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
?	-	-	0,66	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-
16:3	2,54	0,69	1,92	0,90	2,07	2,08	-	-	-	-	2,27	0,32
17:1n-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
?	4,17	0,86	-	-	4,17	1,23	12,97	1,34	16,46	1,33	11,45	0,28
16:4n-3	0,40	0,11	0,40	0,07	0,22	0,07	2,47	0,53	-	-	1,69	0,83
18:0	0,67	0,12	0,43	0,04	0,47	0,17	0,29	0,05	0,70	0,05	0,58	0,06
18:1n-9	3,38	0,85	2,81	0,29	2,21	1,19	1,44	1,07	2,05	0,46	2,19	0,22
18:1n-7	3,71	0,92	1,06	0,10	2,07	0,70	0,69	0,21	0,73	0,34	1,83	0,22
18:2n-9	2,97	1,35	3,48	1,54	3,06	2,50	4,93	1,98	-	-	3,36	0,44
18:2n-6	6,91	1,02	1,51	0,30	8,00	3,13	-	-	4,05	1,49	0,73	0,11
18:3n-6	0,81	0,54	0,73	0,30	0,61	0,35	-	-	-	-	0,81	0,42
18:3n-3	12,84	2,98	-	-	11,98	2,20	-	-	-	-	1,90	0,74
18:4n-3	0,40	0,19	0,35	0,25	0,51	0,12	1,06	0,50	0,37	0,24	2,50	1,57
?	3,18	1,61	3,94	1,71	3,48	3,06	-	-	1,92	1,67	4,33	0,45
20:0	-	-	-	-	-	-	6,37	2,62	4,31	3,37	1,83	0,14
20:1n-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20:2n-9	0,72	0,21	0,53	0,13	0,53	0,32	1,48	0,99	-	-	0,61	0,09
20:3n-6	-	-	1,38	0,58	-	-	-	-	-	-	-	-
20:4n-6 (ARA)	4,18	1,97	4,52	1,94	6,08	2,65	-	-	5,68	1,97	5,47	0,60
20:3n-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20:4n-3	-	-	-	-	-	-	6,79	3,18	-	-	-	-
20:5n-3 (EPA)	1,88	0,47	9,28	3,53	1,83	0,31	2,46	1,07	2,55	0,74	1,34	0,07
22:1n-9	4,70	2,25	5,16	2,18	6,67	2,70	-	-	-	-	6,20	0,76
22:2n-9	-	-	-	-	-	-	9,01	2,58	10,78	0,75	-	-
22:3n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22:5n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22:5n-3	4,87	2,58	4,87	2,04	6,41	2,15	-	-	-	-	6,53	0,49
24:0	0,61	0,11	0,39	0,15	3,65	3,75	-	-	5,12	2,89	-	-
22:6n-3 (DHA)	0,52	0,32	0,30	0,17	-	-	7,46	3,36	2,44	2,12	0,75	0,10
24:1n-9	1,89	2,02	5,73	6,02	1,18	1,01	4,11	5,80	-	-	3,68	0,86
TFA mg/g	70,58	16,29	85,83	8,14	73,09	17,84	142,39	32,36	150,28	110,89	98,36	24,49
SAFA %	29,86	5,02	32,78	2,43	32,09	8,82	25,22	2,63	25,80	1,89	14,32	0,28
MUFA %	15,89	3,07	32,93	5,42	12,31	5,83	26,07	11,30	33,55	11,33	41,34	2,17
PUFA %	39,03	3,56	29,26	3,00	41,97	1,67	35,65	10,82	22,27	10,11	27,96	2,53

SAFA(saturated fatty acids): Κορεσμένα λιπαρά οξέα, MUFA(monounsaturated fatty acids): Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, PUFA(polyunsaturated fatty acids): Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.

## 4.2 Κυρίαρχα είδη των μικτών καλλιεργείων

Στον Πίνακα 4.7 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα μικροφύκη που κυριάρχησαν στις μικτές καλλιέργειες (Natural Algae Blooms - NABs).

Πίνακας 4.7 Κυρίαρχα μικροφύκη των μικτών καλλιεργείων

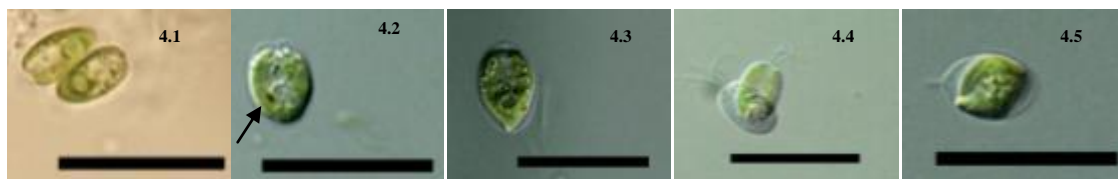
ΠΕΡΙΟΧΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ NAB	ΚΥΡΙΑΡΧΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ
Αγ. Κοσμάς (Σαρωνικός κόλπος)	NAB 4 (A)	<i>Tetraselmis</i> sp.
	NAB 4 (B)	<i>Tetraselmis</i> sp.
Λίμνη - Ευβοίας (Ευβοϊκός κόλπος)	NAB 3	Κλάση Trebouxiophyceae
	NAB 7	<i>Nannochloropsis oceanica</i>
Κυμάσι – Μαντουδίου (Αιγαίο Πέλαγος)	NAB 6	Κλάση Trebouxiophyceae
	NAB 8	<i>Pavlova</i> sp.
	NAB 9	<i>Pyramimonas</i> sp.
	NAB 12	Κλάση Coccolithophyceae

## 4.3 Μορφολογική περιγραφή των κυρίαρχων στελεχών των μικτών καλλιεργείων

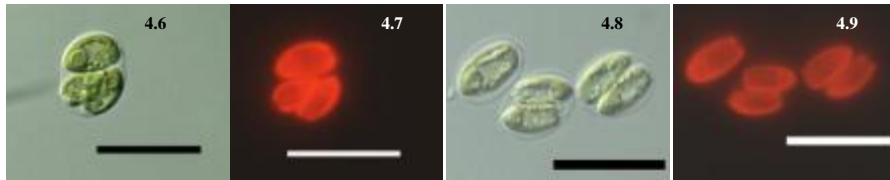
Στη συνέχεια, παρατίθενται τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των μελετηθέντων στελεχών, όπως αυτά παρατηρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο και στο σύστημα Nomarski και επιφθορισμού (όπου υπήρχαν φωτογραφίες).

### 4.3.1 Περιοχή Δειγματοληψίας Άγιος Κοσμάς – Σαρωνικό Κόλπος

#### NAB 4 (A)



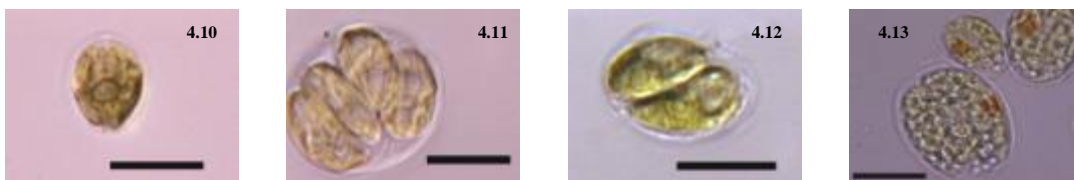




**Εικ. 4.1-4.9.** NAB 4 (A). Οι εικόνες 4.1-4.9 απεικονίζουν το κυρίαρχο είδος της μικτής καλλιέργειας NAB 4 (A). Η Εικ. 1, οπτικό μικροσκόπιο (x100), κλίμακα 10μm. Εικ. 4.2-4.6, 4.8, οπτικό σύστημα Nomarski (x100). Εικ. 4.7, 4.9, απεικόνιση των κυττάρων με πηγή UV και φίλτρα επιφθορισμού (x100). Κλίμακα 20μm.

- **Σχήμα:** ελλειψοειδές, ελαφρώς καρδιόσχημο
- **Μέγεθος:** ύψος 11-14 μm, πλάτος 7.2-10.50 μm
- **Βιοόγκος κυττάρου** στη μετα-εκθετική φάση:  $\approx 498 - 516\mu\text{m}^3/\text{cell}$
- **Χλωροπλάστης:** κυπελοειδής, συμπαγής στον οπίσθιο άκρο, λεπτότερος στο πρόσθιο άκρο
- **Πυρηνοειδές:** ευμέγεθες, σε βασική-μετακεντρική θέση
- **Οφθαλμική κηλίδα:** όχι πάντα ευδιάκριτη, εντοπισμένη κοντά στο πυρηνοειδές
- **Παλμελλοειδή κύτταρα:** πολύ κοινά στην καλλιέργεια, ελλειπτικά, μεγαλύτερου μεγέθους από τα κινητά κύτταρα, συνήθως εγκλεισμένα εντός βλενωδους υλικού πιθανότατα προερχόμενου από αποβληθέντα κυτταρικά τοιχώματα
- **Μαστίγια:** 4
- **Συγγένεια:** *Tetraselmis* sp.

### NAB 4 (B)



**Εικ.4.10-4.13.** NAB 4(B). Οι εικόνες 4.10-4.13 απεικονίζουν το κυρίαρχο είδος της μικτής καλλιέργειας NAB 4 (B). Οπτικό μικροσκόπιο (x100). Κλίμακα 10μm.

- **Σχήμα:** ελλειψοειδές
- **Μέγεθος:** μήκος 11.50-14.50 μm, πλάτος 7.5-10.50 μm
- **Βιοόγκος κυττάρου** στη μετα-εκθετική φάση:  $\approx 525 - 538\mu\text{m}^3/\text{cell}$
- **Χλωροπλάστης:** κυπελοειδής, συμπαγής στο οπίσθιο άκρο, λεπτότερος στο πρόσθιο άκρο
- **Πυρηνοειδές:** ευμέγεθες, σε βασική-μετακεντρική θέση

- **Οφθαλμική κηλίδα:** όχι πάντα ευδιάκριτη, εντοπισμένη κοντά στο πυρηνοειδές
- Παλμελλοειδή κύτταρα:** πολύ κοινά στην καλλιέργεια, ελλειπτικά, μεγαλύτερου μεγέθους από τα κινητά κύτταρα
- **Μαστίγια:** 4
- **Συγγένεια:** *Tetraselmis* sp.

Περιγραφή του γένους *Tetraselmis*

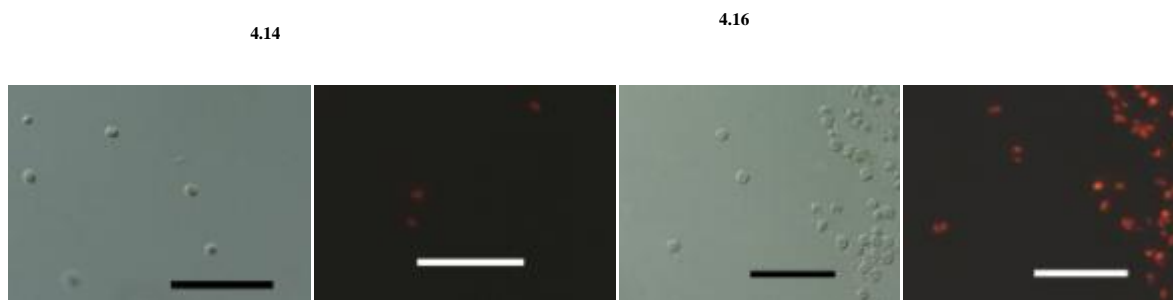
<b>Επικράτεια</b>	Eukaryota
<b>Βασίλειο</b>	Plantae
<b>Φύλλο</b>	Chlorophyta
<b>Κλάση</b>	Chlorodendrophyceae
<b>Τάξη</b>	Chlorodendrales
<b>Οικογένεια</b>	Chlorodendraceae
<b>Γένος</b>	<i>Tetraselmis</i>

Πηγή: <http://www.algaebase.org>

Ενδέχεται να απαντάται ως μαστιγωτό, ή ως ένα μη-κινητό κύτταρο εδραζόμενο με έναν βλεννώδη μίσχο. Τα μαστιγιοφόρα κύτταρα έχουν τέσσερα μαστίγια αναδυόμενα από ένα βοθρίο, σε δύο ζεύγη. Ένα ευκρινές τοίχωμα (θήκη), συντιθέμενο από μικρά φολιδοειδή μερίδια σε κρυσταλλική διάταξη, καλύπτει τα κύτταρα. Τα κινητά κύτταρα συχνά δεν επιδίδονται σε κολύμβηση για μεγάλες χρονικές περιόδους, ενώ τα μαστίγια ενίοτε χάνονται. Παρά το γεγονός ότι συνήθως είναι πράσινα, μερικά αποκτούν ερυθρά απόχρωση με τη συσσώρευση καρωτινοειδών. Έχουν αναφερθεί περίπου 26 είδη από θαλάσσια και γλυκέων-υδάτων ενδιαιτήματα (Sym & Pienaar 1993, Graham et al. 2011).

#### 4.3.2 Περιοχή Δειγματοληψίας Λίμνη Ευβοίας – Ευβοϊκός Κόλπος

### NAB 3



**Εικ.4.14-4.17.** NAB 3. Οι Εικόνες 4.14-4.17 απεικονίζουν το κυρίαρχο είδος της μικτής καλλιέργειας NAB 3. Εικ. 14,16, οπτικό σύστημα Nomarski (x100). Εικ. 4.15,4.17, απεικόνιση των κυττάρων με πηγή UV και φίλτρα επιφθορισμού (x100). Κλίμακα 20μm.

- **Σχήμα:** σφαιρικό
- **Μέγεθος:** διάμετρος 1.80-2.90μm
- **Βιοόγκος κυττάρου** στη μετα-εκθετική φάση:  $\approx 7 - 8\mu\text{m}^3/\text{cell}$
- **Χλωροπλάστης:** ελλειψοειδής
- **Πυρηνοειδές:** απουσιάζει
- **Μαστίγια:** απουσιάζουν
- **Συγγένεια:** *Nannochloris* sp. ή *Picochlorum* sp., Κλάση Trebouxiophyceae.

#### Περιγραφή των γενών *Nannochloris* και *Picochlorum*

<b>Επικράτεια</b>	Eukaryota	Eukaryota
<b>Βασίλειο</b>	Plantae	Plantae
<b>Φύλλο</b>	Chlorophyta	Chlorophyta
<b>Κλάση</b>	Trebouxiophyceae	Trebouxiophyceae
<b>Τάξη</b>	Chlorellales	Chlorellales
<b>Οικογένεια</b>	Chlorellaceae	<u>Chlorellales incertae sedis</u>
<b>Γένος</b>	<i>Nannochloris</i>	<i>Picochlorum</i>

Πηγή: <http://www.algaebase.org>

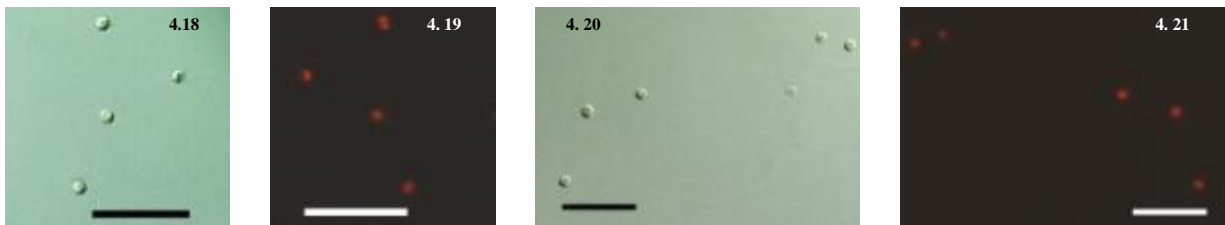
❖ Γένος *Nannochloris*

Το γένος *Nannochloris* περιλαμβάνει μερικούς από τους μικρότερους και δομικά απλούστερους φωτοτροφικούς ευκαρυώτες (Henley et al. 2004). Αποτελείται από μη μαστιγωτά πράσινα κύτταρα που ανήκουν στην κλάση των Trebouxiophyceae. Η αγενής αναπαραγωγή πραγματοποιείται μέσω αυτοσπορίων, με αυτόν τον τρόπο το μητρικό κυτταρικό τοίχωμα αποβάλλεται, μετά το διαχωρισμό του πρωτοπλάστη σε κάθε επανάληψη της κυτταρικής διαίρεσης (Yamamoto et al. 2007).

❖ Γένος *Picochlorum*

Τα κύτταρα του γένους είναι πράσινα, σφαιρικά ή ωσειδή, με διάμετρο 1,5-3 μm και αναπτύσσονται σε εδάφη με υγρασία, σε γλυκά ύδατα αλλά και στη θάλασσα. Περιλαμβάνουν ένα πυρήνα, ένα μιτοχόνδριο, ένα πλευρικό χλωροπλάστη, ενώ το πυρηνοειδές απουσιάζει. Το γένος δεν φέρει μαστίγια. Οι χρωστικές του χλωροπλάστη περιλαμβάνουν τη χλωροφύλλη α και β (<http://www.algaebase.org>).

**NAB 7**



**Εικ.4.18-4.21.** NAB 7. Οι εικόνες 4.18-4.21 απεικονίζουν το κυρίαρχο είδος της μικτής καλλιέργειας NAB 7. Εικ. 4.18,4.20, οπτικό σύστημα Nomarski (x100). Εικ. 4.19,4.21, απεικόνιση των κυττάρων με πηγή UV και φίλτρα επιφθορισμού (x100). Κλίμακα 20μm.

- **Σχήμα:** σφαιρικό
- **Μέγεθος:** διάμετρος 3- 4.9μm
- **Βιοόγκος κυττάρου** στη μετα-εκθετική φάση:  $\approx 35.30 - 38.20\mu\text{m}^3/\text{cell}$
- **Χλωροπλάστης:** ελλειψοειδής
- **Πυρηνοειδές:** απουσιάζει
- **Οφθαλμική κηλίδα:** όχι ευδιάκριτη
- **Μαστίγια:** απουσιάζουν

- **Επιπλέον στοιχεία:** κιτρινο – καστανός χρωματισμός της καλλιέργειας μετά το πέρας μερικών εβδομάδων
- **Συγγένεια:** *Nannochloropsis oceanica*

Περιγραφή του γένους *Nannochloropsis*

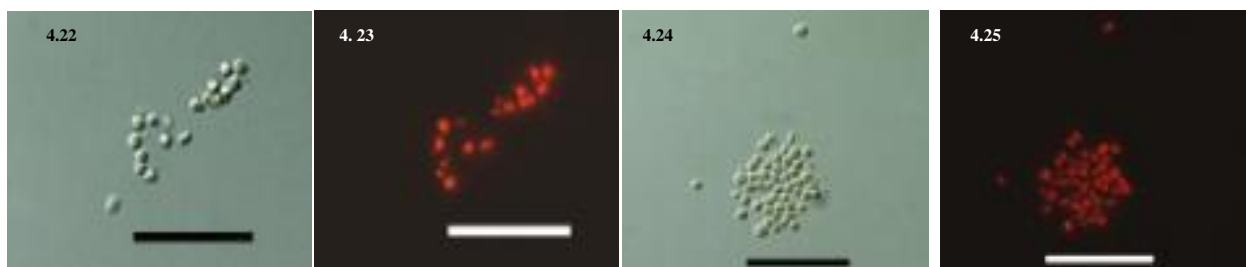
<b>Επικράτεια</b>	Eukaryota
<b>Βασίλειο</b>	Chromista
<b>Φύλλο</b>	Ochrophyta
<b>Κλάση</b>	Eustigmatophyceae
<b>Τάξη</b>	Eustigmatales
<b>Οικογένεια</b>	Monodopsidaceae
<b>Γένος</b>	<i>Nannochloropsis</i>

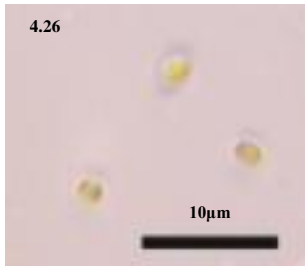
Πηγή: <http://www.algaebase.org>

Γένος μονοκύτταρων και μη-κινητών θαλάσσιων μικροφυκών. Αποτελείται από έξι γνωστά είδη: *Nannochloropsis gaditana*, *Nannochloropsis granulata*, *Nannochloropsis limnetica*, *Nannochloropsis oceanica*, *Nannochloropsis oculata* και *Nannochloropsis salina*. Αναπαράγεται με κυτταρική διαίρεση. Το κύτταρο είναι απλό σε μορφολογία και η διάμετρος κυμαίνεται από 2 έως 8 μm. Τα πλαστίδια είναι παρόμοια με αυτά των κυττάρων των φυτών. Ο χλωροπλάστης με σαφώς ορατές στοιβές θυλακοειδών είναι σε άμεση γειτνίαση με τον πυρήνα. Τα σταγονίδια των λιπιδίων (LD) λειτουργούν ως ενεργειακή αποθήκη, η οποία μπορεί να αυξηθεί σε μέγεθος υπό επιβαρυντικές συνθήκες (XiaoNian et al. 2016).

4.3.3 Περιοχή Δειγματοληψίας Κυμάσι Μαντουδίου - Αιγαίο Πέλαγος

**NAB 6**

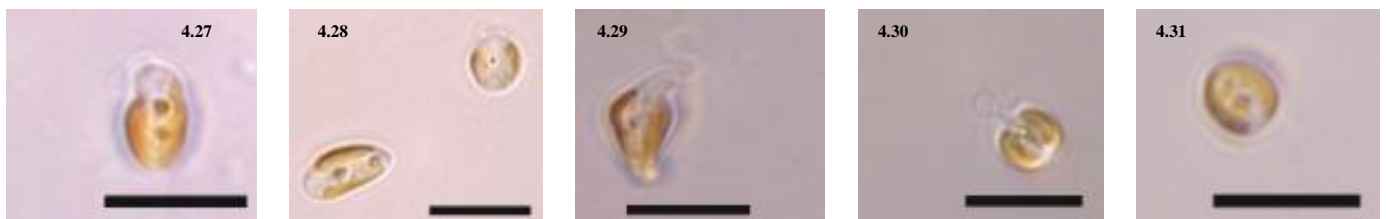




**Εικ. 4.22-4.26.** NAB 6. Οι εικόνες 4.22-4.26, απεικονίζουν το κυρίαρχο είδος της μικτής καλλιέργειας NAB 6. Εικ. 4.22,4.24, οπτικό σύστημα Nomarski (x100). Εικ. 4.23,4.25, απεικόνιση των κυττάρων με πηγή UV και φίλτρα επιφθορισμού (x100). Εικ. 4.26 απλό οπτικό μικροσκόπιο. Κλίμακα 20μm.

- **Σχήμα:** σφαιρικό
- **Μέγεθος:** διάμετρος 2-2.80μm
- **Βιοόγκος κυττάρου** στη μετα-εκθετική φάση:  $\approx 7.60 - 8.40\mu\text{m}^3/\text{cell}$
- **Χλωροπλάστης:** ελλειψοειδής
- **Πυρηνοειδές:** απουσιάζει
- **Μαστίγια:** απουσιάζουν
- **Συγγένεια:** *Nannochloris* sp. ή *Picochlorum* sp., Κλάση Trebouxiophyceae  
Η περιγραφή των γενών έχει αναφερθεί προηγουμένως (δες NAB 3).

## NAB 8



**Εικ.4.27-4.31.** NAB 8. Οι εικόνες 4.27-4.31 απεικονίζουν το κυρίαρχο είδος της μικτής καλλιέργειας NAB 8. Οπτικό μικροσκόπιο (x100). Κλίμακα 10μm.

- **Σχήμα:** ωοειδές
- **Μέγεθος:** ύψος 5.50-10.50 μm, πλάτος 3.5 - 6μm
- **Βιοόγκος κυττάρου** στη μετα-εκθετική φάση:  $90.70 - 101.60 \mu\text{m}^3/\text{cell}$
- **Χλωροπλάστης:** κυπελοειδής
- **Πυρηνοειδές:** δε διακρίνεται
- **Οφθαλμική κηλίδα:** όχι πάντα ευδιάκριτη
- **Μαστίγια:** 2 άνισα
- **Επιπλέον στοιχεία:** κιτρινέρυθρος - ερυθρός χρωματισμός της καλλιέργειας
- **Συγγένεια:** *Pavlova* sp.

## Περιγραφή του γένους *Pavlova*

---

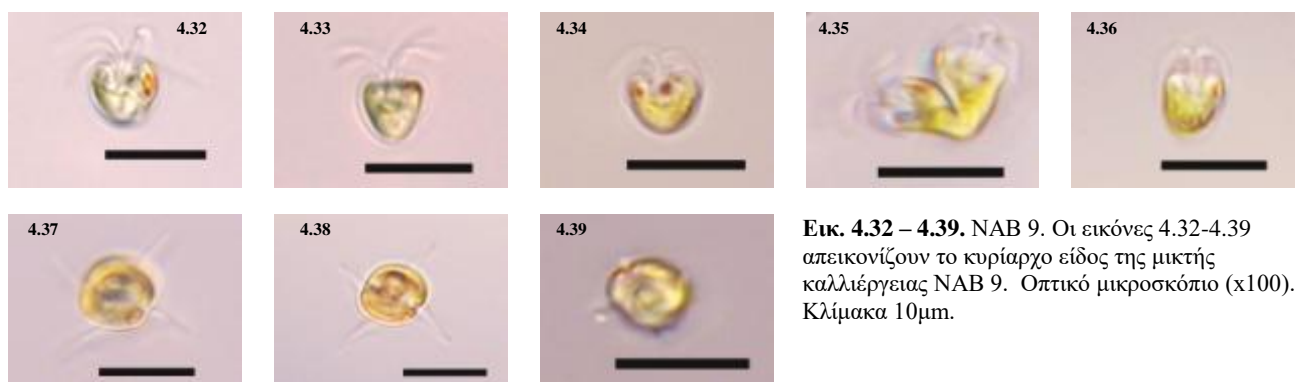
<b>Επικράτεια</b>	Eukaryota
<b>Βασίλειο</b>	Chromista
<b>Φύλλο</b>	Haptophyta
<b>Κλάση</b>	Pavlovophyceae
<b>Τάξη</b>	Pavloales
<b>Οικογένεια</b>	Pavlovaceae
<b>Γένος</b>	<i>Pavlova</i>

---

Πηγή: <http://www.algaebase.org>

Το γένος *Pavlova* περιλαμβάνει μονοκύτταρα είδη, τα οποία διαθέτουν χαρακτηριστικές στερόλες και χρωστικές (Van Lenning et al. 2003). Εμφανίζεται πρωτίστως ως μονοκύτταρο μαστιγωτό αλλά επίσης και ως στάδιο χωρίς κολυμβητική ικανότητα. Μπορεί να εντοπισθεί σε γλυκέων-υδάτων λίμνες αλλά είναι κυρίως θαλάσσιο γένος, εμφανιζόμενο συνήθως σε υφάλμυρα ύδατα. Το γένος αυτό και άλλα μέλη της κλάσης Pavlovophyceae διαθέτουν ένα βραχύ απτόνημα και ευκρινώς κατέχουν δύο άνισα μαστίγια, η επιφάνεια δε του μακρού μαστιγίου είναι διακοσμημένη με σωματίδια ή λεπτές τρίχες. Υπάρχει μια περιοχή παρόμοια με οισοφάγο κοντά στα μαστίγια. Οργανικές φολίδες, οζώδεις ή μορφής-μανιταριού, ενδέχεται να εμφανίζονται στην επιφάνεια του σώματος. Επίσης ενδέχεται να υπάρχει μια οφθαλμική κηλίδα, γεγονός ασύνηθες για τα απτόφυτα. Τα δύο πλαστίδια έχουν μια μάλλον κίτρινη απόχρωση (λεμονί) παρά καστανή, όπως έχουν πολλά απτόφυτα (Graham et al. 2011).

## NAB 9



- **Σχήμα:** πυραμιδοειδές, με στρογγυλεμένο το οπίσθιο μέρος
- **Μέγεθος:** διάμετρος 4.50-6.50 μm, ύψος 5.5 – 8.5μm
- **Βιοόγκος κυττάρου** στη μετα-εκθετική φάση: 52 – 52.50 μm<sup>3</sup>/cell
- **Χλωροπλάστης:** με 4 κοντούς λοβούς
- **Πυρηνοειδές:** κυπελλοειδούς μορφής
- **Οφθαλμική κηλίδα:** 1 ή 2 ευδιάκριτες
- **Μαστίγια:** 4, ίσα με το μήκος του κυττάρου
- **Συγγένεια:** *Pyramimonas* sp.

### Περιγραφή του γένους *Pyramimonas*

<b>Επικράτεια</b>	Eukaryota
<b>Βασίλειο</b>	Plantae
<b>Φύλλο</b>	Chlorophyta
<b>Κλάση</b>	Pyramimonadophyceae
<b>Τάξη</b>	Pyramimonadales
<b>Οικογένεια</b>	Pyramimonadaceae
<b>Γένος</b>	<i>Pyramimonas</i>

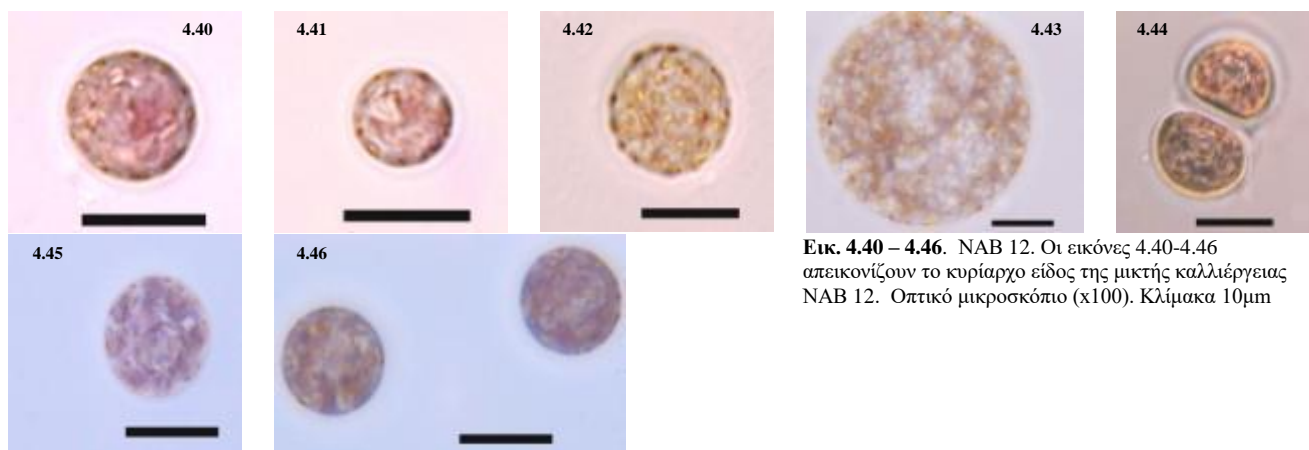
Πηγή: <http://www.algaebase.org>

Το γένος περιλαμβάνει μονοκύτταρα μαστιγοφόρα είδη. Απαντάται σε θαλάσσια, υφάλμυρα και γλυκών-υδάτων ενδιαιτήματα. Αναλόγως Ανάλογα με το είδος, τα διαθέσιμα μαστίγια μπορεί να είναι από 4-16, με μήκος έως και πέντε φορές



μεγαλύτερο του μήκους του κυττάρου, αναδύονται από ένα βαθύ και στενό βοθρίο. Το πρόσθιο μέρος έχει τέσσερις λοβούς, όπως και ο συνήθης μονήρης, κυπελλοειδής χλωροπλάστης. Αυτοί οι λοβοί του κυττάρου και του χλωροπλάστη περιβάλλουν το βοθρίο. Συνήθως εντοπίζεται ένα πυρηνοειδές, καθώς και μία ή περισσότερες κηλίδες στο πλαστίδιο (Graham et al. 2011)

## **NAB 12**



**Εικ. 4.40 – 4.46.** NAB 12. Οι εικόνες 4.40-4.46 απεικονίζουν το κυρίαρχο είδος της μικτής καλλιέργειας NAB 12. Οπτικό μικροσκόπιο (x100). Κλίμακα 10μm

- **Σχήμα:** σφαιρικό
- **Μέγεθος:** διάμετρος 6-18μm
- **Βιοόγκος κυττάρου** στη μετα-εκθετική φάση:  $\approx 913 - 1000\mu\text{m}^3/\text{cell}$
- **Πυρηνοειδές:** μη ευδιάκριτο
- **Οφθαλμική κηλίδα:** απουσιάζει
- **Μαστίγια:** απουσιάζουν
- **Επιπλέον στοιχεία:** τα κύτταρα πιθανώς περιβάλλονται από κοκκόλιθους, σκοτεινο-καστανός χρωματισμός της καλλιέργειας
- **Συγγένεια:** Κλάση Coccolithophyceae

### Περιγραφή κλάσης Coccolithophyceae

<b>Επικράτεια</b>	Eukaryota
<b>Βασίλειο</b>	Chromista
<b>Φύλλο</b>	Haptophyta
<b>Κλάση</b>	Coccolithophyceae

Πηγή: <http://www.algaebase.org>

Το κυρίαρχο είδος του NAB 12, δεν κατέστη δυνατόν να αναγνωρισθεί σε επίπεδο γένους. Πιθανώς ανήκει στην κλάση των Coccolithophyceae. Το όνομα της κλάσης αντικατοπτρίζει την παρουσία εξόχως διακοσμημένων και εμποτισμένων με ανόργανα άλατα φολίδων, γνωστών με την ονομασία **κοκκόλιθοι** (coccoliths), στην εξωτερική κυτταρική επιφάνεια πολλών (αν και όχι όλων) από τα περιλαμβανόμενα είδη. Οι κοκκόλιθοι συντίθενται συνήθως από κρυστάλλους ανθρακικού ασβεστίου υπό μορφή ασβεστίτη και δεν αποδομούνται εύκολα στις φυσιολογικές τιμές pH των ωκεανών. Τα Coccolithophyceae περιλαμβάνουν αρκετές τάξεις κοκκολιθο-παραγωγών γενών, περιλαμβάνουν επίσης σχετικώς πρώιμης-απόκλισης μέλη, τα οποία γενικώς στερούνται ενασβεστωμένων φολίδων αλλά συχνά διαθέτουν στις κυτταρικές τους επιφάνειες δαντελωτές οργανικές φολίδες κατασκευασμένες από κυτταρίνη (Graham et al. 2011).

#### **4.4 Μοριακές αναλύσεις**

Τα είδη που απομονώθηκαν και στα οποία εφαρμόστηκαν μοριακές αναλύσεις, είναι τα κυρίαρχα είδη των μικτών καλλιιεργειών NAB (A), NAB 3, NAB 7 και NAB 6. Τα είδη αυτά στις αναλύσεις που ακολουθούν κωδικοποιούνται ως εξής:

NAB 4 (A) – Σαρωνικός Κόλπος (Άγιος Κοσμάς) → AK\_1\_1

NAB 3 – Ευβοϊκός Κόλπος (Λίμνη, Ευβοίας) → EG\_3\_1\_1

NAB 7 - Ευβοϊκός Κόλπος (Λίμνη, Ευβοίας) → EG\_7\_1

NAB 6 – Αιγαίο Πέλαγος (Κυμάσι, Μαντουδίου) → Kym\_6\_1

##### 4.4.1 Πολλαπλασιασμός των γονιδίων-στόχων μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση του γονιδιώματος των απομονωμένων στελεχών. Τα γονίδια rbcL και 18S ενισχύθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τους κατάλληλους εκκινητές.

#### 4.4.1.1 Επιλεγμένοι εκκινητές (primers)

Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για το κάθε γονίδιο στην παρούσα εργασία, δίνονται στον Πίνακα 4.8.

Πίνακας 4.8. Πληροφορίες για τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των περιοχών **rbcL** και **18s** του DNA των απομονωθέντων στελεχών.

Ενισχυόμενη περιοχή	Εκκινητής	Αλληλουχία (5' – 3')	Μέγεθος (bp)	Βιβλιογραφική αναφορά
<b>rbcL</b>	RH-1S	ATG TCA CCA CAA ACA GAA ACT	1161	Daugbjerg <i>et al.</i> 1994
	Ce1161R	CAT GTG CAA TAC GTG AAT ACC		
<b>18s</b>	Euk328f	ACC TGG TTG ATC CTG CCA G	1594	Romari & Daniel Vaultot, 2004
	Euk329r	TGA TCC TTC YGC AGG TTC AC		

#### 4.4.2 Ενίσχυση rbcL από το συνολικό γονιδίωμα των απομονωμένων μικροφυκών - Συνθήκες PCR

Για τα στελέχη των μικροφυκών με κωδική ονομασία **EG\_3\_1** και **Kym\_6\_1**, οι συνθήκες της PCR, για την ενίσχυση του γονιδίου rbcL, παρουσιάζονται αναλυτικά στον ακόλουθο Πίνακα 4.9:

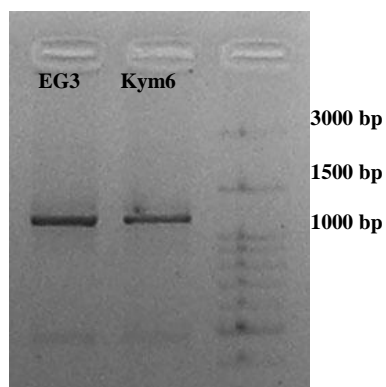
Πίνακας 4.9. Συγκενρωτικός πίνακας των διαφόρων αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του PCR MIX και οι συνθήκες της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου rbcL.

PCR mix	Συγκέντρωση αντίδρασης (μl)	Συνθήκες PCR		
		Stage	°C	Time
Taq buffer	2,5	Pro-incubation	95	3'
MgCl <sub>2</sub>	5	Denaturation	94	15"
dNTP's	0,5	Annealing	51	1'
Primer A	1	Extension	72	1,5'
Primer B	1	Another Step	72	10'
Taq polymerase	0,1	Number of cycles	40	
BSA	2,5	Standby temp.	16	
ddH <sub>2</sub> O	11,4			

Όγκος αντίδρασης → 25 μl, DNA template → 3μl

Για τα στελέχη των μικροφυκών με κωδική ονομασία **AK\_1\_1** και **EG\_7\_1**, για την ενίσχυση του γονιδίου *rbcL*, ακολουθείται το ίδιο πρωτόκολλο της PCR, με τη διαφορά ότι ο όγκος του DNA των στελεχών μικροφυκών που προστίθεται είναι 5μl.

Στην συνέχεια παρουσιάζονται οι Εικόνες 4.47 και 4.48 του ηλεκτροφορήματος από το οποίο έγινε η λήψη του DNA.



Εικόνα 4.47. Απεικόνιση ηλεκτροφόρησης έπειτα από PCR του χλωροπλαστικού γονιδίου *rbcL* για τα στελέχη EG3 και Kym6.



Εικόνα 4.48. Απεικόνιση ηλεκτροφόρησης έπειτα από PCR του χλωροπλαστικού γονιδίου *rbcL* για τα στελέχη AK και EG7.

Για το στέλεχος EG7 για την ενίσχυση του γονιδίου *rbcL*, η PCR δεν μας έδωσε κάποιο αποτέλεσμα, και ενδεχομένως να χρειαστεί σε κάποια μελλοντική ανάλυση η χρήση διαφορετικών εκκινητών.

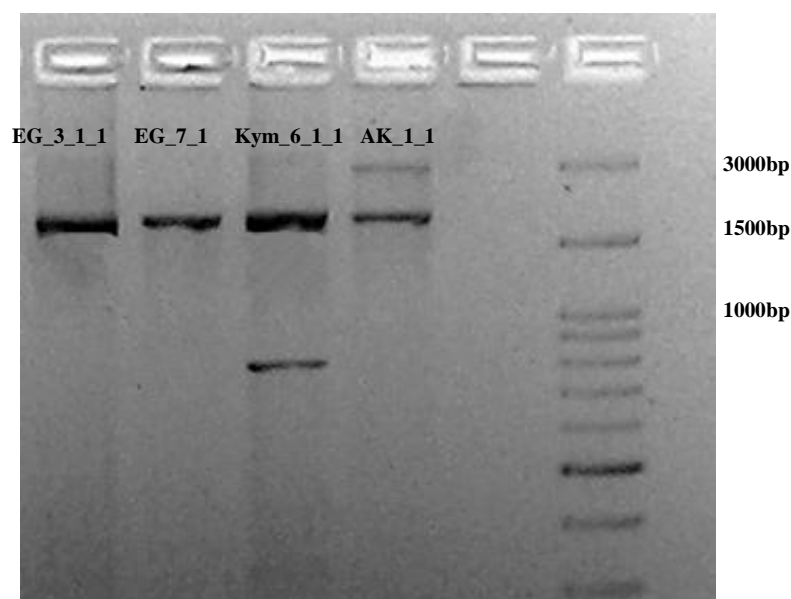
#### 4.4.3 Ενίσχυση 18S από το συνολικό γονιδίωμα των απομονωμένων μικροφυκών – Συνθήκες PCR

Για τα στελέχη των μικροφυκών με κωδική ονομασία **EG\_3\_1**, **EG\_7\_1**, **Kym\_6\_1\_1** και **AK\_1\_1** για την ενίσχυση του γονιδίου 18S, οι συνθήκες της PCR παρουσιάζονται αναλυτικά στον ακόλουθο Πίνακα 4.10:

Πίνακας 4.10. Συγκεντρωτικός πίνακας των διαφόρων αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του PCR MIX και οι συνθήκες της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου 18S.

PCR mix	Συγκέντρωση αντίδρασης ( $\mu$ l)	Συνθήκες PCR		
		Stage	$^{\circ}$ C	Time
Taq buffer	2,5	Pro-incubation	95	15'
MgCl <sub>2</sub>	1,5	Denaturation	95	1'
dNTP's	0,5	Annealing	57	1,5'
Primer A	1,5	Extension	72	1,5'
Primer B	1,5	Another Step	72	10'
Taq polymerase	0,1	Number of cycles	34	
BSA	2,5	Standby temp.	16	
ddH <sub>2</sub> O	11,4			

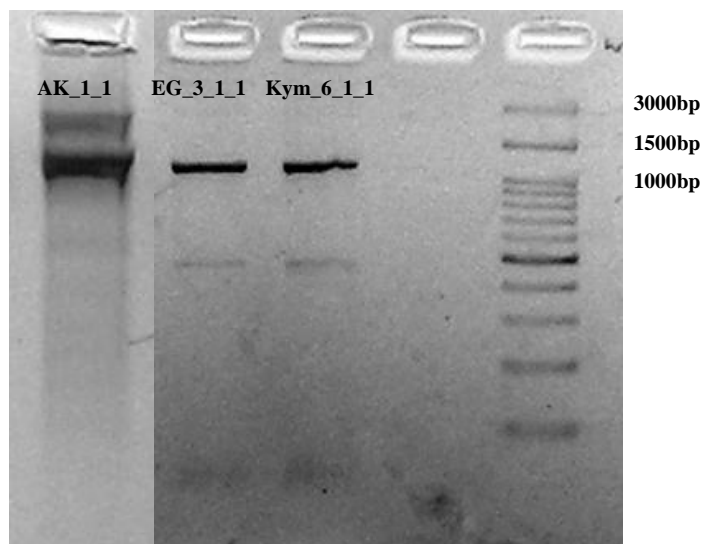
Όγκος αντίδρασης  $\rightarrow$  25  $\mu$ l, DNA template  $\rightarrow$  4  $\mu$ l



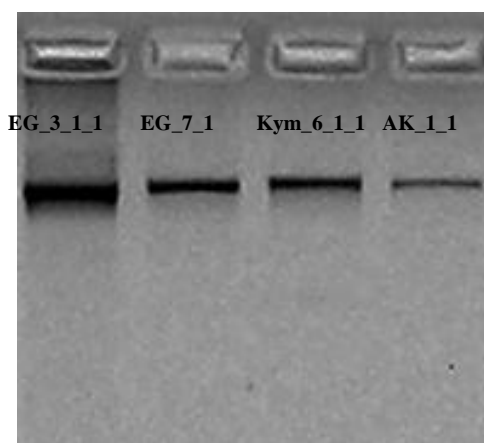
Εικόνα 4.49. Απεικόνιση ηλεκτροφόρησης έπειτα από PCR του πυρηνικού γονιδίου 18S για όλα τα απομονωθέντα στελέχη.

#### 4.4.4 Καθαρισμός προϊόντος της PCR

Η περαιτέρω χρησιμοποίηση του προϊόντος της PCR, με σκοπό τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, απαιτεί την απομάκρυνση υπολειμμάτων των εκκινητών, των νουκλεοτιδίων και της πολυμεράσης.



Εικόνα 4.50. Απεικόνιση του ηλεκτροφορήματος από το οποίο έγινε η λήψη του DNA για τα στελέχη AK\_1\_1, EG\_3\_1\_1 και Kym\_6\_1\_1 για το γονίδιο rbcL.



Εικόνα 4.51. Απεικόνιση του ηλεκτροφορήματος από το οποίο έγινε η λήψη του DNA για τα στελέχη EG\_3\_1\_1, EG\_7\_1, και Kym\_6\_1\_1 και AK\_1\_1 για το γονίδιο 18S.

Στις Εικόνες 4.50 κ 4.51 παρουσιάζεται η μορφή των ηλεκτροφορημάτων με όλο το προϊόν της PCR, πριν την αφαίρεση με καθαρό νυστέρι των κομματιών που περιείχαν το ενισχυμένο τμήμα ενδιαφέροντος.

#### 4.4.5 Φυλογενετικά δέντρα

Λόγω των διαφορετικών κλάσεων, στις οποίες ανήκουν τα απομονωθέντα στελέχη της μελέτης, αποφασίστηκε να γίνουν διαφορετικά φυλογενετικά δέντρα για την κάθε κλάση και για το κάθε γονίδιο. Συνολικά παρουσιάζονται 5 φυλογενετικά δέντρα για την κάθε ανάλυση (Neighbor - Joining (NJ) και ανάλυση κατά Bayes).

Οι ομόλογες ακολουθίες που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων παρουσιάζονται και με την κωδική τους ονομασία, όπως αυτή έχει κατατεθεί στην GenBank (Παράρτημα III).

Για το στέλεχος με την κωδική ονομασία Kym\_6\_1\_1 και για το γονίδιο 18S δεν παρουσιάζεται φυλογενετικό δέντρο, εξ αιτίας μόλυνσης του δείγματος.

##### 4.4.5.1 Ανάλυση κατά Bayes (Bayes Inference, BI)

Στη BI ανάλυση, για την εξαγωγή των δέντρων (τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικά στις Εικόνες 4.52 – 4.56), τα μοντέλα νουκλεοτιδικής υποκατάστασης, για κάθε θέση εντός κωδικονίου (partition), που εφαρμόστηκαν σύμφωνα με την ανάλυση του προγράμματος PartitionFinder v.2.1.1, υπό το κριτήριο BIC, παρουσιάζονται αναλυτικά στη συνέχεια:

#### **Για το γονίδιο 18S**

**AK\_1\_1** → Εφαρμόστηκαν τα μοντέλα K80+I+G, TRNEF+I+G, K80+I+G για την 1<sup>η</sup>, 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> θέση εντός κωδικονίου (partition) αντιστοίχως.

**EG\_3\_1\_1** → Εφαρμόστηκε το μοντέλο TRNEF+I+G για την 1<sup>η</sup>, 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> θέση εντός κωδικονίου (partition) αντιστοίχως.

**EG\_7\_1** → Εφαρμόστηκε το μοντέλο TRNEF+I+G για την 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> και το μοντέλο K80+I+G για τη 3<sup>η</sup> θέση εντός κωδικονίου (partition) αντιστοίχως.

#### **Για το γονίδιο rbcL**

**AK\_1\_1** → Εφαρμόστηκαν τα μοντέλα TRN+I, JC+I, TVM+I για την 1<sup>η</sup>, 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> θέση εντός κωδικονίου (partition) αντιστοίχως.

**EG\_3\_1 και EG\_7\_1** → Εφαρμόστηκαν τα μοντέλα TIM+G, JC+I+G, GTR+I+G για την 1<sup>η</sup>, 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> θέση εντός κωδικονίου (partition) αντιστοίχως.

Σε όλες τις αναλύσεις, πραγματοποιήθηκαν 2 ανεξάρτητα τρεξίματα (runs) με 4 αλυσίδες για 2000000 γενεές (επαναλήψεις), με εξαίρεση την ανάλυση για το στέλεχος AK (για το γονίδιο 18S), όπου η ανάλυση έγινε για 10000000. Το 25% των φυλογενετικών δέντρων απορρίφθηκε ως «burn-in».

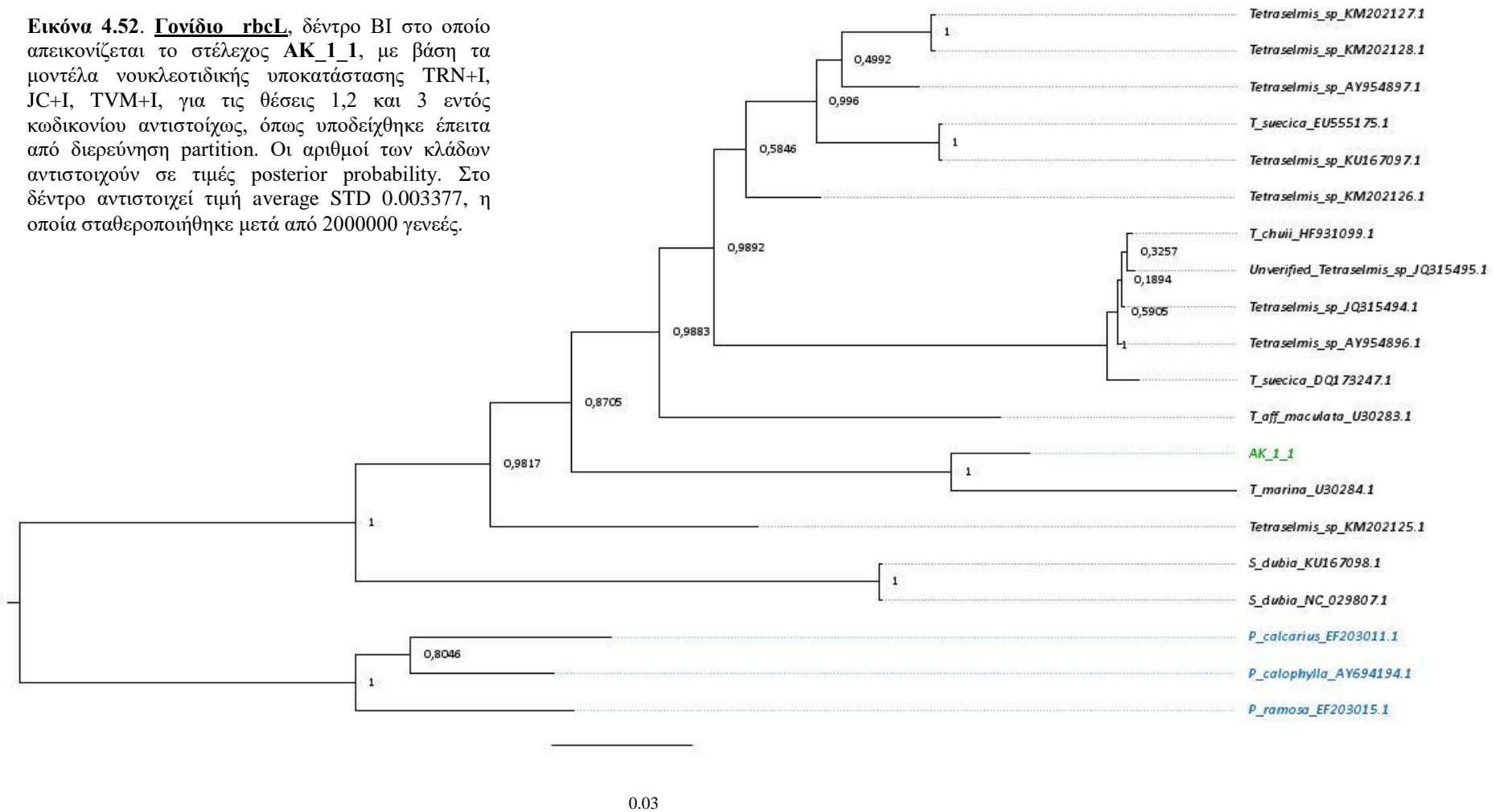
Σε κάθε κλάδο αναγράφεται η τιμή posterior probability, η οποία δείχνει τη στατιστική στήριξης του εκάστοτε κλάδου. Επιλέγεται να θεωρηθούν στατιστικά σημαντικές τιμές αυτές που υπερβαίνουν την τιμή 0.95.

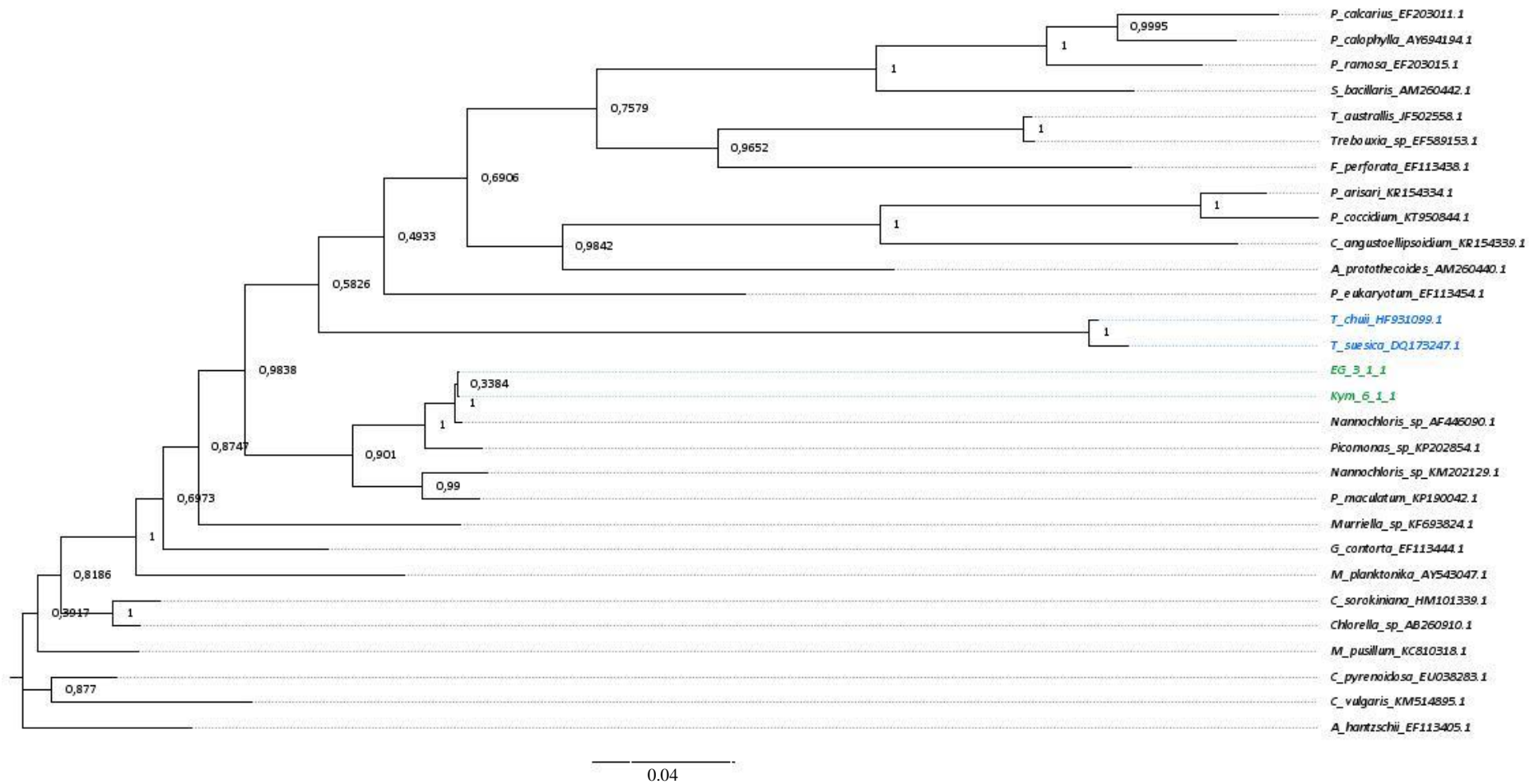
Παρατηρώντας το δέντρο της Εικόνας 4.52 όπου απεικονίζεται το στέλεχος AK\_1\_1, (γονίδιο rbcL) φαίνεται αυτό να συμφωνεί με τη συστηματική του γένους, βάσει και των μορφολογικών χαρακτήρων. Η εξωομάδα που χρησιμοποιήθηκε, η οποία αποτελείται από τα στελέχη *Prasiolopsis ramosa*, *Prasiococcus calcarius* και *Prasiola calophylla* (οικογένεια: Prasiolales, Κλάση: Trebouxiophyceae) ομαδοποιείται ξεχωριστά από τα υπόλοιπα στελέχη τα οποία ανήκουν στην κλάση των Chlorodendrophyceae. Ο κλάδος με τιμές p.prob = 1, στον οποίο απεικονίζεται το στέλεχος AK\_1\_1, το παρουσιάζει ως πιο συγγενικό με το είδος *Tetraselmis marina*. Στο δέντρο της Εικόνας 4.54 (γονίδιο 18S) ο κλάδος που απεικονίζεται το στέλεχος, το ομαδοποιεί επίσης ως πιο συγγενικό με το *Tetraselmis marina*. Η εξωομάδα (Κλάση: Trebouxiophyceae) που χρησιμοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση επίσης ομαδοποιείται ξεχωριστά [(*Chlorella vulgaris*, Οικογένεια: Chlorellaceae), (*Parietochloris alveolaris*, *Pseustichococcus monallantoides* και *Xylochloris irregularis* Οικογένεια: Trebouxiophyceae incertae sedis), (*Trebouxia impressa*, Οικογένεια: Microthamniales), (*Loposphaera tirolensis*, Οικογένεια: Chlorellaceae)].



Στο δέντρο της Εικόνας 4.53 παρουσιάζονται τα στελέχη EG\_3\_1\_1 και Kym\_6\_1\_1 (γονίδιο rbcL). Η εξωομάδα που χρησιμοποιήθηκε, η οποία αποτελείται από τα στελέχη: *Tetraselmis chuii* και *Tetraselmis suesica*, (Οικογένεια: Chlorodendraceae, Κλάση: Chlorodendrophyceae) ομαδοποιείται ξεχωριστά από τα υπόλοιπα στελέχη τα οποία ανήκουν στην κλάση των Trebouxiophyceae. Τα στελέχη απεικονίζονται στο δέντρο στον ίδιο κλάδο και φαίνεται να έχουν συγγένεια με το *Nannochloris* sp., *Picomonas* sp. ή *Picochlorum maculatum*, τα οποία παρουσιάζονται στον ίδιο κλάδο. Στην Εικόνα 4.55, στην οποία παρουσιάζεται το στέλεχος EG\_3\_1\_1 (γονίδιο 18S), παρουσιάζεται επίσης ως πιο συγγενικό το στέλεχος, με τα είδη που προαναφέρθηκαν (εκτός του *Picomonas* sp.).

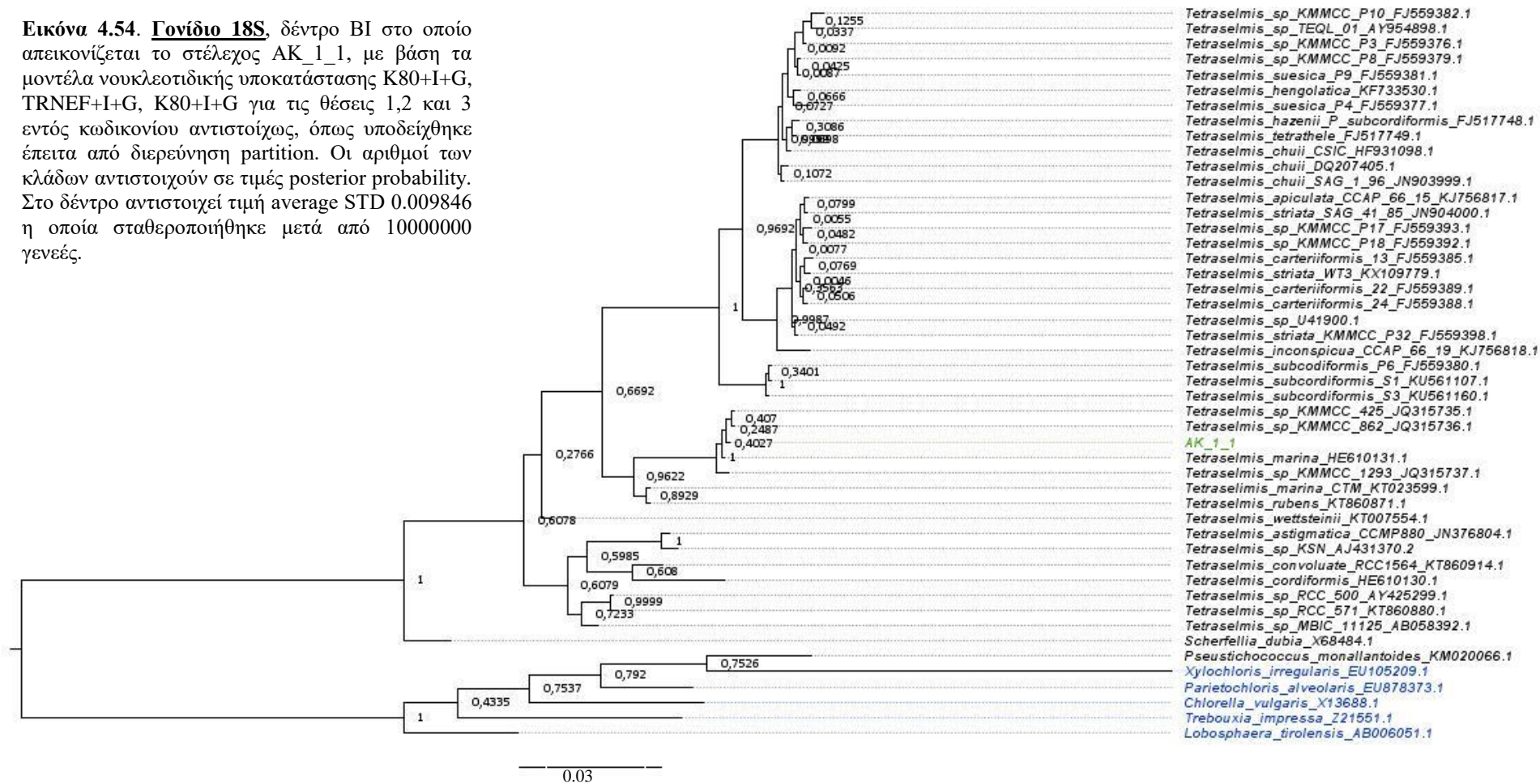
**Εικόνα 4.52. Γονίδιο *rbcL***, δέντρο BI στο οποίο απεικονίζεται το στέλεχος **AK\_1\_1**, με βάση τα μοντέλα νουκλεοτιδικής υποκατάστασης TRN+I, JC+I, TVM+I, για τις θέσεις 1,2 και 3 εντός κωδικονίου αντιστοίχως, όπως υποδείχθηκε έπειτα από διερεύνηση partition. Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν σε τιμές posterior probability. Στο δέντρο αντιστοιχεί τιμή average STD 0.003377, η οποία σταθεροποιήθηκε μετά από 2000000 γενεές.

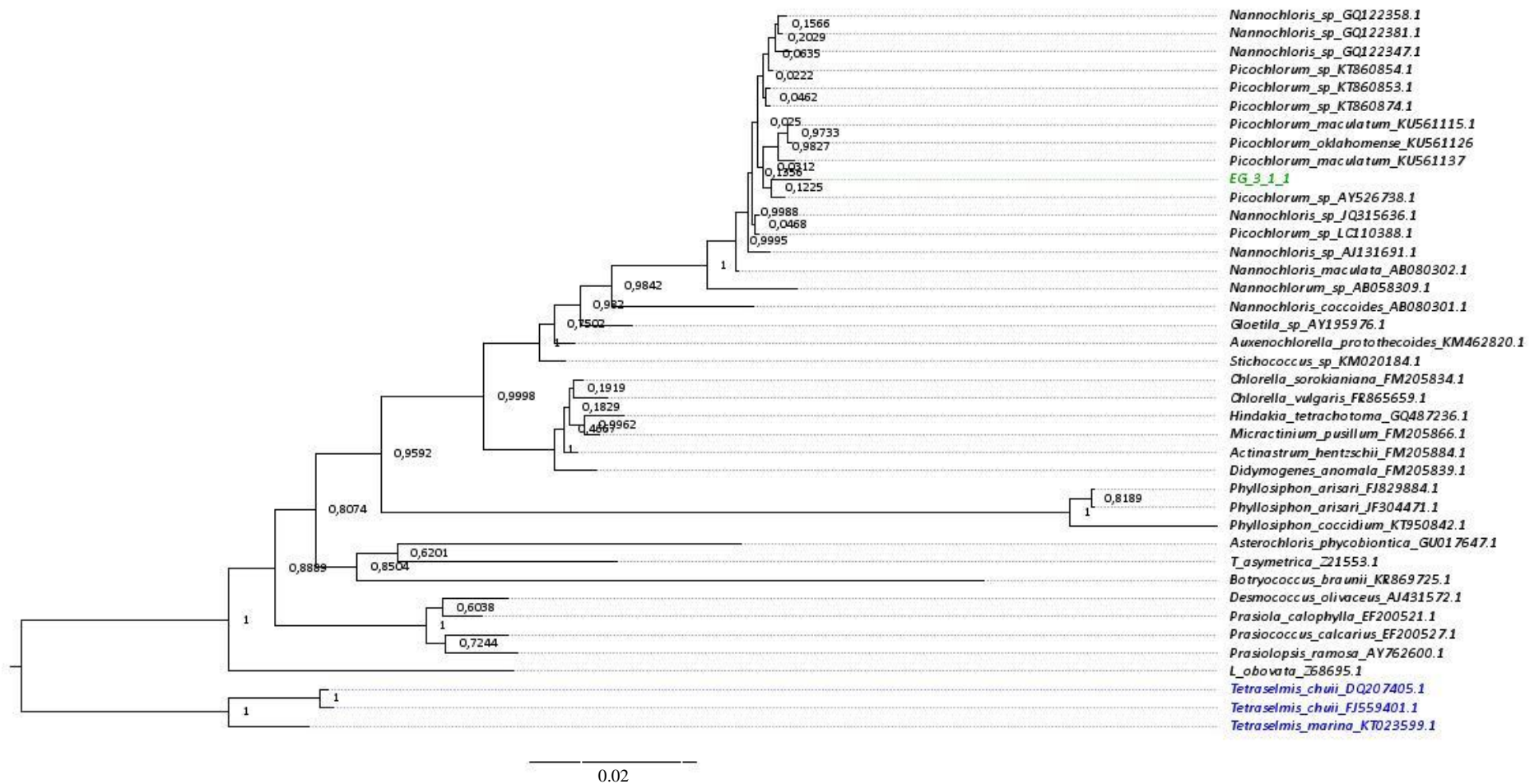




**Εικόνα 4.53. Γονίδιο *rbcL***, δέντρο BI στο οποίο απεικονίζονται τα στελέχη EG\_3\_1\_1 και Kym\_6\_1\_1, με βάση τα μοντέλα νουκλεοτιδικής υποκατάστασης TIM+G, JC+I+G, GTR+I+G, για τις θέσεις 1,2 και 3 εντός κωδικονίου αντιστοίχως, όπως υποδείχθηκε έπειτα από διερεύνηση partition. Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν σε τιμές posterior probability. Στο δέντρο αντιστοιχεί τιμή average STD 0.005171, η οποία σταθεροποιήθηκε μετά από 2000000 γενεές

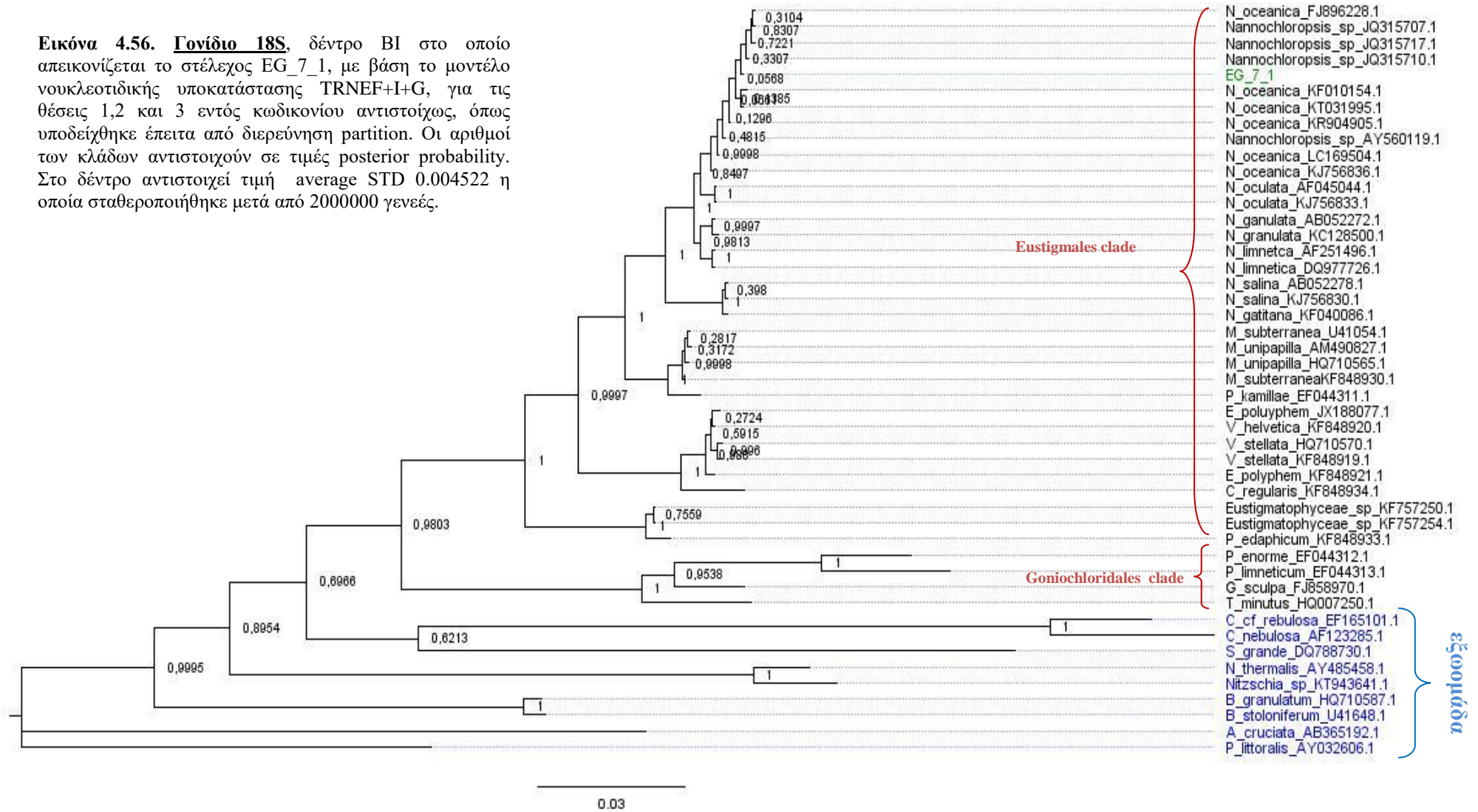
**Εικόνα 4.54. Γονίδιο 18S**, δέντρο ΒΙ στο οποίο απεικονίζεται το στέλεχος AK\_1\_1, με βάση τα μοντέλα νουκλεοτιδικής υποκατάστασης K80+I+G, TRNEF+I+G, K80+I+G για τις θέσεις 1,2 και 3 εντός κωδικονίου αντιστοίχως, όπως υποδείχθηκε έπειτα από διερεύνηση partition. Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν σε τιμές posterior probability. Στο δέντρο αντιστοιχεί τιμή average STD 0.009846 η οποία σταθεροποιήθηκε μετά από 1000000 γενεές.





**Εικόνα 4.55. Γονίδιο 18S**, δέντρο BI στο οποίο απεικονίζεται το στέλεχος EG\_3\_1\_1, με βάση το μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης TRNEF+I+G για τις θέσεις 1,2 και 3 εντός κωδικονίου αντιστοίχως, όπως υποδείχθηκε έπειτα από διερεύνηση partition. Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν σε τιμές posterior probability. Στο δέντρο αντιστοιχεί τιμή average STD 0.003921 η οποία σταθεροποιήθηκε μετά από 2000000 γενεές.

**Εικόνα 4.56. Γονίδιο 18S**, δέντρο BI στο οποίο απεικονίζεται το στέλεχος EG\_7\_1, με βάση το μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης TRNEF+I+G, για τις θέσεις 1,2 και 3 εντός κωδικονίου αντιστοίχως, όπως υποδείχθηκε έπειτα από διερεύνηση partition. Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν σε τιμές posterior probability. Στο δέντρο αντιστοιχεί τιμή average STD 0.004522 η οποία σταθεροποιήθηκε μετά από 2000000 γενεές.



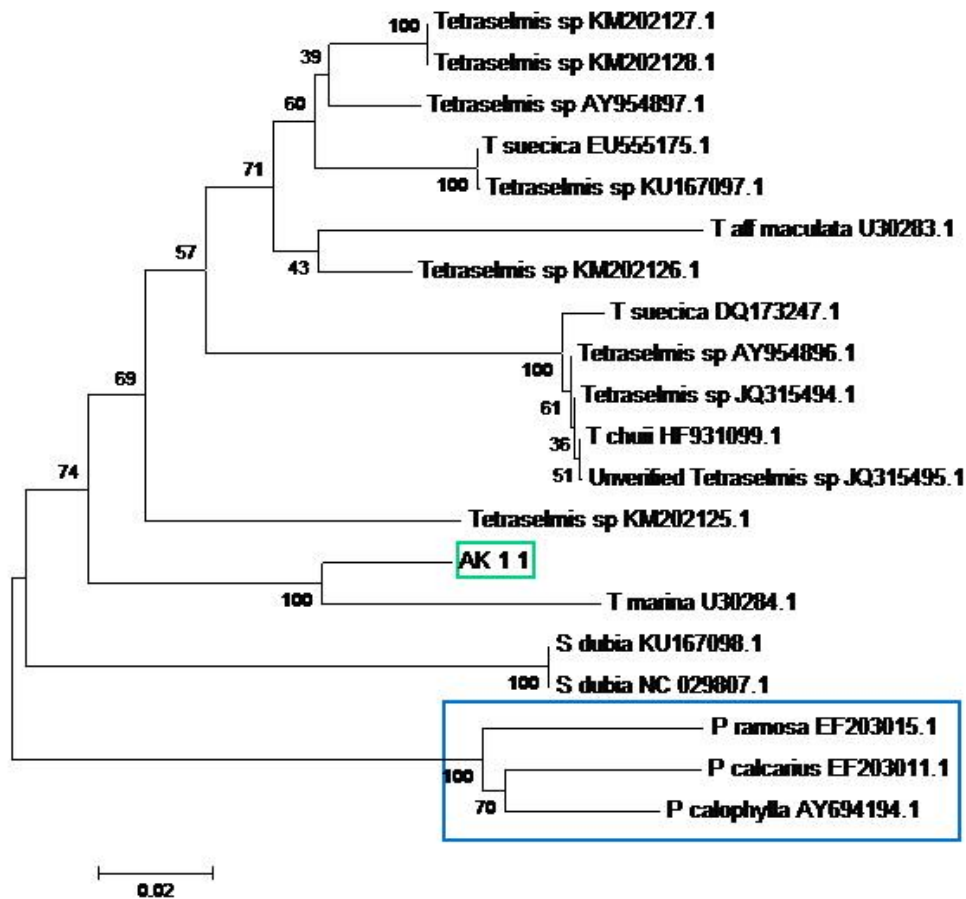
Στην Εικόνα 4.56 (γονίδιο 18S), όπου απεικονίζεται το στέλεχος EG\_7\_1, ο κλάδος στο οποίο απεικονίζεται, το ομαδοποιεί ως πιο συγγενικό με το *Nannochloropsis oceanica*.

Η εξωομάδα που χρησιμοποιήθηκε, η οποία αποτελείται από τα στελέχη: *S. grande* (Οικογένεια: Synchronoma, Κλάση: Synchronomorphyceae), *C. cf. nebulosa* και *C. nebulosa* (Οικογένεια: Chromulinaceae, Κλάση: Chrysophyceae), *N. thermalis* και *Nitzschia* sp. (Οικογένεια: Bacillariaceae, Κλάση: Bacillariophyceae), *A. cruciata* (Οικογένεια: Aurearenaceae, Κλάση: Phaeothamniophyceae), *P. littoralis* (Οικογένεια: Acinetosporaceae Κλάση: Phaeophyceae), *B. grarnulatum* και *B. stoloniferum* (Οικογένεια: Botrydiaceae, Κλάση: Xanthophyceae) ομαδοποιείται ξεχωριστά από τα υπόλοιπα στελέχη τα οποία ανήκουν στην κλάση των Eustigmatophyceae.

#### 4.1.1.1 Ανάλυση Neighbor - Joining (NJ)

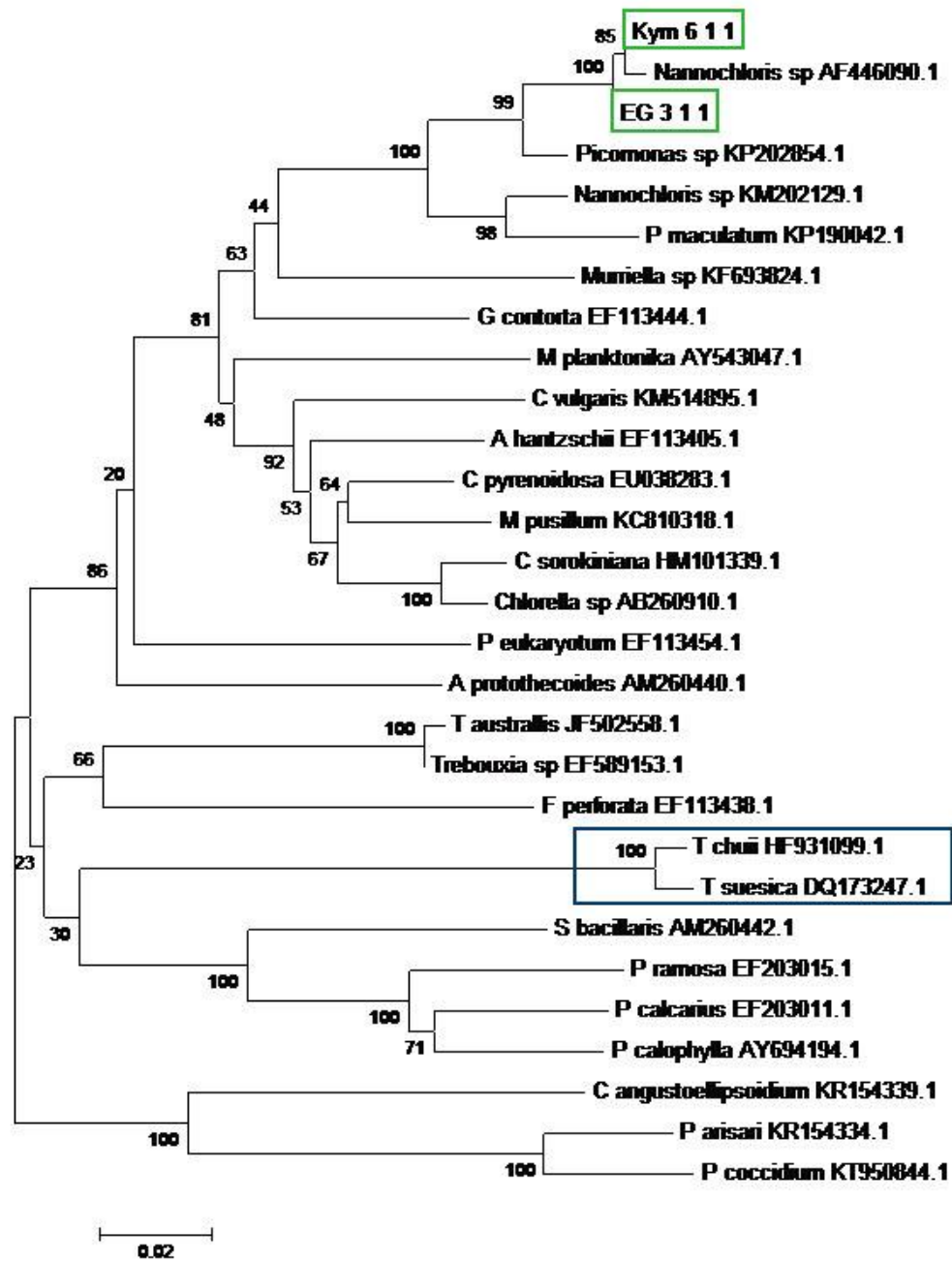
Η ανάλυση με τη μέθοδο Neighbor - Joining (NJ) παρατίθεται απλά και μόνο ως συμπληρωματική της Μπεϋσιανής Ανάλυσης.

Τα φυλογενετικά δέντρα που προέκυψαν από την ανάλυση των αλληλουχιών του γονιδίου *rbcL* για το κάθε στέλεχος της μελέτης, φαίνονται στις Εικόνες 4.57 – 4.61 όπως προέκυψαν από την ανάλυση Neighbor Joining. Οι τιμές στους κόμβους των διακλαδώσεων του δέντρου απεικονίζουν τις τιμές του ελέγχου bootstrap (ως % ποσοστά των επαναλήψεων στις οποίες ελήφθη η εκάστοτε σχέση).

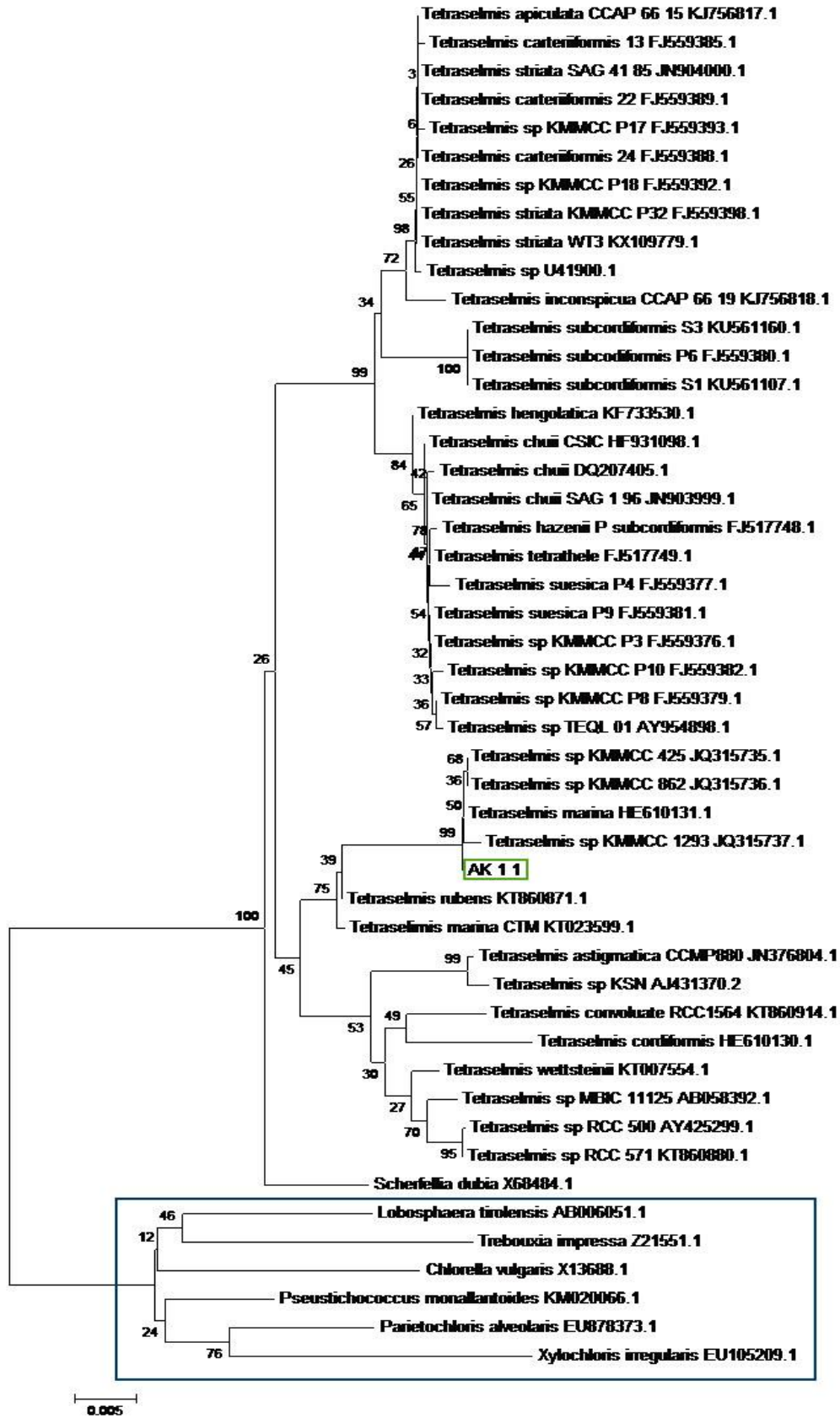


**Εικόνα 4.57.** Φυλογενετικό δένδρο Neighbor Joining από την ανάλυση των αλληλουχιών του γονιδίου *rbcL* στο οποίο απεικονίζεται στο στέλεχος AK\_1\_1, με βάση το διαπραγματικό μοντέλο του Kimura (1980). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (1000 επαναλήψεις).

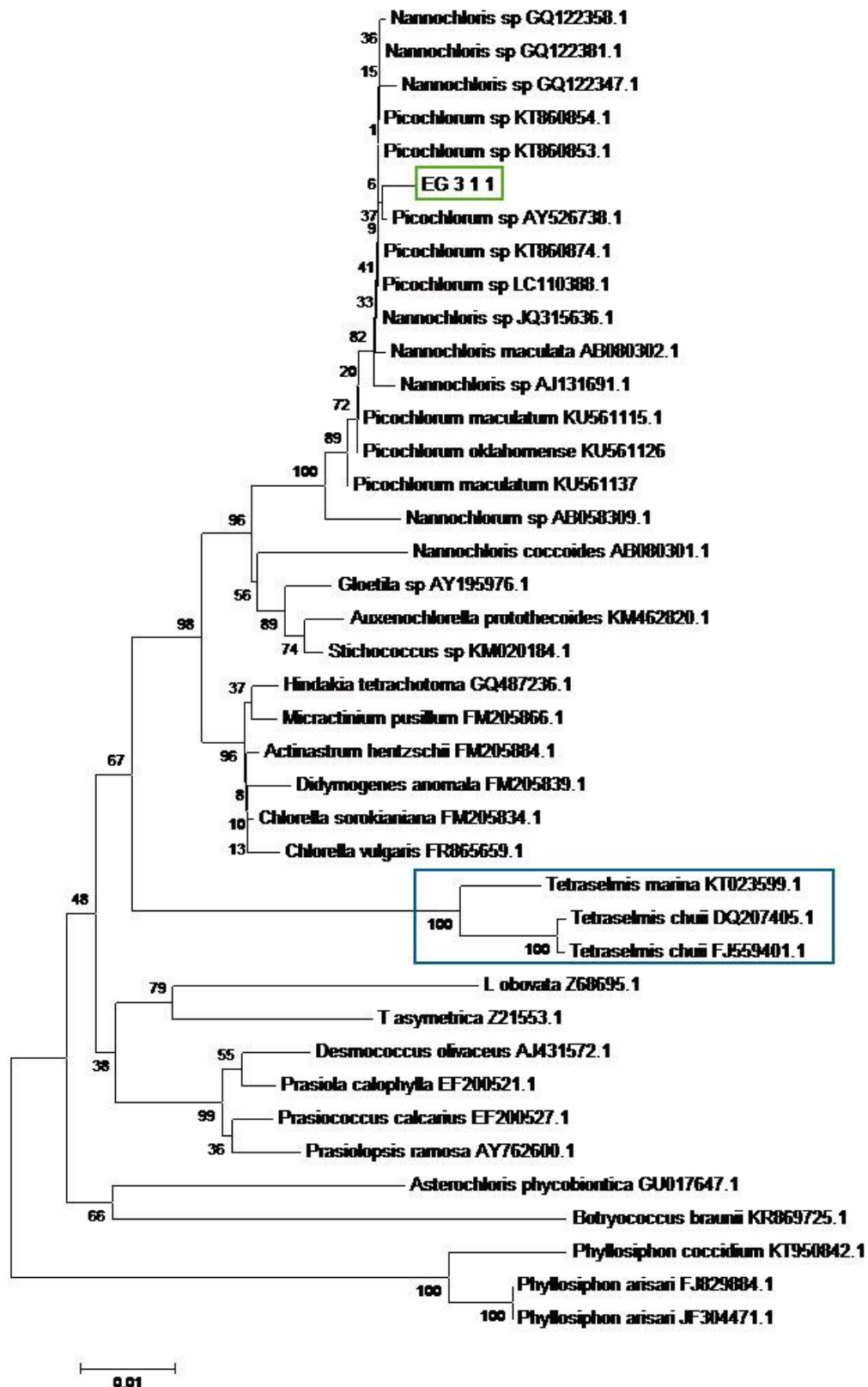




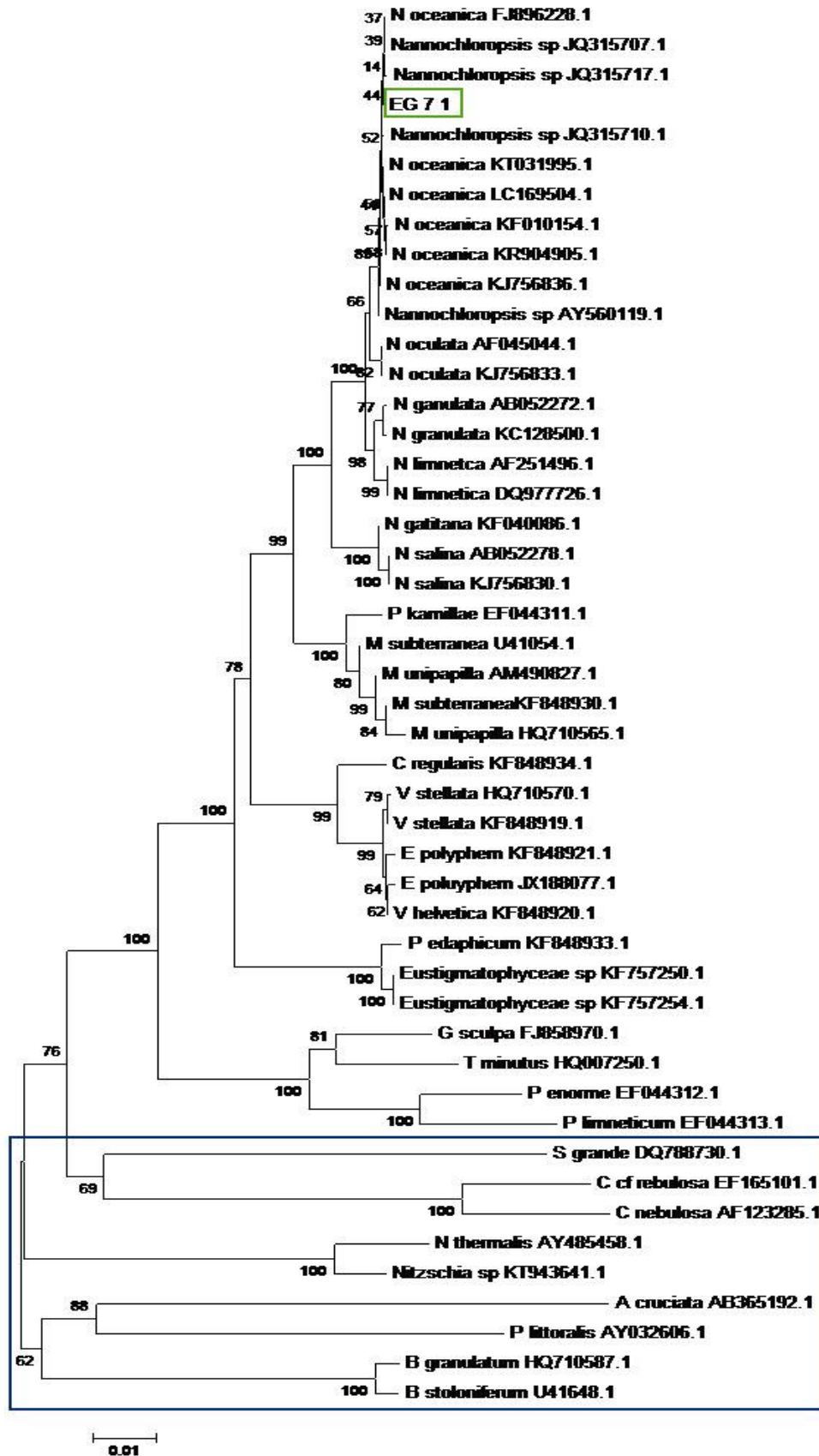
**Εικόνα 4.58** Φυλογενετικό δένδρο Neighbor Joining από την ανάλυση των αλληλουχιών του γονιδίου rbcL στο οποίο απεικονίζονται τα στελέχη EG\_3\_1\_1 και Kym\_6\_1\_1, με βάση το διαπραματικό μοντέλο του Kimura (1980). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (1000 επαναλήψεις).



Εικόνα 1.59 Φυλογενετικό δένδρο Neighbor Joining από την ανάλυση των αλληλουχιών του γονιδίου 18S στο οποίο απεικονίζεται το στέλεχος AK\_1\_1, με βάση το παραμετρικό μοντέλο του Kimura (1980). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (1000 επαναλήψεις).



Εικόνα 4.60. Φυλογενετικό δένδρο Neighbor Joining από την ανάλυση των αλληλουχιών του γονιδίου 18S στο οποίο απεικονίζεται το στέλεχος EG3\_1\_1, με βάση το διαparamατρικό μοντέλο του Kimura (1980). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (1000 επαναλήψεις).



Εικόνα 4. 21. Φυλογενετικό δένδρο Neighbor Joining από την ανάλυση των αλληλουχιών του γονιδίου 18S στο οποίο απεικονίζεται το στέλεχος EG7\_1\_1, με βάση το διπαραματρικό μοντέλο του Kimura (1980). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (1000 επαναλήψεις).

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 5.1 Σύνθεση της βιοκοινωνίας των καλλιεργειών και εναλλαγή των ειδών

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η φυσική άνθιση του φυτοπλαγκτού και στη συνέχεια διατηρήθηκε σε σταθερά επίπεδα. Επί μία έως δύο ημέρες, οι καλλιέργειες παρέμεναν σε λανθάνουσα φάση. Είναι γνωστόν από τη βιβλιογραφία ότι ο εμβολιασμός της καλλιέργειας ακολουθείται από μια φάση φαινομενικής αδράνειας, γνωστή ως λανθάνουσα φάση (lag phase). Στελέχη που «μετακομίζουν» από ένα περιβάλλον σε ένα άλλο χρειάζονται ένα χρόνο διάστημα προσαρμογής (Παπαπετροπούλου & Μαυρίδου 1995).

Στη συνέχεια άρχισε να αυξάνεται η πυκνότητα των κυττάρων καθώς εισήλθαν στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Συνήθως, μετά από δέκα ημέρες, η πυκνότητα των κυττάρων στις καλλιέργειες έφτανε σε ένα μέγιστο επίπεδο ανάπτυξης. Η βιομάζα των καλλιεργειών αυξήθηκε και ταυτόχρονα σημειώθηκε αλλαγή της σύνθεσης της βιοκοινωνίας με την εναλλαγή των ειδών. Η σύνθεση των ειδών των καλλιεργειών παρουσίαζε εναλλαγή ανάλογα με τις διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας μέχρι να επιτευχθεί η κυριαρχία ενός είδους σε κάθε καλλιέργεια.

Οι μικτές καλλιέργειες, οι οποίες αναπτύχθηκαν από διαφορετικές περιοχές συλλογής θαλασσινού νερού και σε διαφορετικές εποχές, παρουσίασαν διαφορετικά κυρίαρχα είδη.

Κατά την πρώτη συλλογή θαλασσινού νερού το Φθινόπωρο, από περιοχή του Σαρωνικού κόλπου (Λιμανάκι Αγίου Κοσμά), οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν αρχικά σε διαφορετικές αλατότητες. Οι επιτυχημένες καλλιέργειες ήταν αυτές που εφαρμόστηκαν σε φυσική αλατότητα ( $\approx 40$ ppt), όπου το κυρίαρχο είδος ανήκει στο γένος *Tetraselmis*.

Αποφασίστηκε οι επόμενες καλλιέργειες να διεξαχθούν σε φυσική αλατότητα. Τα κυρίαρχα είδη ήταν διαφορετικά για την κάθε μικτή καλλιέργεια. Στις μικτές καλλιέργειες NAB 3 (Ευβοϊκός κόλπος) και NAB 6 (Αιγ. Πέλαγος – Κυμάσι) το κυρίαρχο είδος ανήκει στο ίδιο γένος.

Η μεγαλύτερη ποικιλότητα από άποψη κυρίαρχων ειδών παρουσιάστηκε στις μικτές καλλιέργειες NAB 6, NAB 8, NAB 9 και NAB 12, όπου η συλλογή θαλασσινού νερού, πραγματοποιήθηκε την Άνοιξη.

Στην επανάληψη του πειράματος που έγινε με σκοπό τη λήψη δειγμάτων για τη μέτρηση του ξηρού βάρους και τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων, τα κυρίαρχα είδη που επικράτησαν στο πρώτο πείραμα, παρέμειναν τα ίδια, με εξαίρεση την καλλιέργεια NAB 4(B), όπου εκτός του *Tetraselmis* sp. παρουσιάστηκε ακόμη ένα είδος ως κυρίαρχο (κοκκοειδές «πράσινο» φύκος – green coccoid algae).

Στην επακόλουθη διερεύνηση των διαφορετικών επιπέδων θρεπτικών, παρατηρήθηκε ότι αυτά επηρεάζουν τη σύνθεση των βιοκοινωνιών στις καλλιέργειες και καθορίζουν τον ανταγωνισμό και την τελική κυριαρχία των ειδών.

## 5.2 Ταξινόμηση των κυρίαρχων στελεχών

Με βάση τις μορφολογικές και μοριακές παρατηρήσεις, έγινε προσπάθεια ένταξης των υπό μελέτη κυρίαρχων στελεχών που απομονώθηκαν, σε επίπεδο γένους, αλλά και είδους όπου ήταν εφικτό.

Από τις γονιδιωματικές αναλύσεις επιλύονται ζητήματα που αφορούν την ταξινόμηση διαφόρων οργανισμών, τα οποία με βάση μόνο μορφολογικά χαρακτηριστικά δεν ήταν δυνατόν να επιλυθούν παρέχοντας έτσι μια σωστότερη προσέγγιση στην εξελικτική τους ιστορία και τις μεταξύ τους σχέσεις (Graham et al. 2011).

Από τις μικτές καλλιέργειες, επετεύχθη απομόνωση και εφαρμόστηκαν μοριακές αναλύσεις σε τέσσερα κυρίαρχα στελέχη, με σκοπό την περαιτέρω ταυτοποίησή τους.

Τα φυλογενετικά δέντρα που προέκυψαν με τις δύο διαφορετικές μεθόδους (NJ, BI) έχουν παρόμοιες τοπολογίες (ανά γενετικό τόπο).

Το κυρίαρχο στέλεχος της μικτής καλλιέργειας NAB 4(A), το οποίο και απομονώθηκε, ταξινομήθηκε στο γένος *Tetraselmis*. Με βάση τα πιο πρόσφατα μοριακά δεδομένα που αφορούν στα Χλωρόφυτα και στην εξελικτική τους πορεία η ταξινόμηση κατατάσσει το γένος στη διακριτή κλάση των Chlorodendrophyceae, όπου εντάσσεται μόνο ένα ακόμη γένος, το *Scherffelia* (Leliaert et al. 2012). Η κλάση αυτή

εντάσσεται στα ευρύτερα χλωροφύκη μαζί με τα Chlorophyceae, Trebouxiophyceae και Ulvophyceae (UTC).

Τα κυρίαρχα στελέχη των μικτών καλλιεργειών NAB 3 και NAB 6 φαίνεται να ανήκουν στην κλάση των Trebouxiophyceae, αλλά και στο ίδιο γένος (*Nannochloris* ή *Picochlorum*), καθώς ομαδοποιούνται ως συγγενικά είδη στον ίδιο κλάδο. Το είδος *Picomonas* sp. το οποίο ομαδοποιείται μαζί με τα στελέχη Kym\_6\_1\_1 και EG\_3\_1\_1 (γονίδιο *rbcL*, Εικόνες 4.53 και 4.58) ανήκει στο φύλο των ετερότροφων Picozoa, Κλάση Picomonadea, οικογένεια Picomonadidae και φέρει δύο άνισα μαστίγια. Μορφολογικά δεν συνάδει με τα στελέχη της παρούσης μελέτης. Το μόνο αναγνωρισμένο είδος μέχρι σήμερα είναι το *Picomonas judraskeda*, το οποίο τρέφεται με σωματίδια <150nm και σε μικροσκόπιο επιφθορισμού δεν εμφανίζει αυτοφθορισμό χλωροφύλλης (Seenivasan et al. 2013). Επίσης, το γονίδιο *rbcL* κωδικοποιεί για τη μεγάλη υπομονάδα του φωτοσυνθετικού ενζύμου RuBisCO και το γένος *Picomonas* ανήκει στους ετερότροφους μικροοργανισμούς. Οπότε σύμφωνα με τα προηγούμενα, αποκλείουμε με σχετική ασφάλεια, το ενδεχόμενο τα στελέχη της παρούσης μελέτης να έχουν συγγένεια με το συγκεκριμένο γένος. Βέβαια, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ένας αριθμός ειδών που ανήκουν στην κλάση Trebouxiophyceae, έχει χάσει τη φωτοσυνθετική του ικανότητα και έχει αναπτύξει ετερότροφο ή πολύ προσαρμοσμένο παρασιτικό τρόπο ζωής (π.χ., *Prototheca* και *Helicosporidium*) (de Koning & Keeling 2006, Pombert & Keeling 2010).

Η ταξινόμηση των μικρών κοκκοειδών χλωροφύτων είναι αρκετά προβληματική εξ αιτίας του περιορισμένου αριθμού των μορφολογικών και αναπαραγωγικών χαρακτηριστικών (Henley et al. 2014). Οι βιοχημικοί χαρακτήρες καθώς και η μοριακή φυλογένεση, δείχνουν ότι το γένος *Chlorella vulgaris* Beyerinck, για παράδειγμα, είναι πολυφυλετικό (Friedl 1995), οδηγώντας σε μια σημαντική αναθεώρηση και διάσπαση των κλάσεων Chlorophyceae και Trebouxiophyceae (Huss et al. 1999). Οι Hepperle & Krienitz (2001) αναφέρουν ότι τα ονομαζόμενα ως “*Chlorella*” και “*Nannochloris*” φύκη, είναι δύσκολο να προσδιοριστούν και περιλαμβάνουν αμφίβολης διάκρισης ταξινομικές μονάδες. Αλληλουχίες του γονιδίου 18S που είχαν προσωρινά υποβληθεί στη GenBank ως “*Nannochloris*” μετέβαλαν την ταξινομική τους θέση στη συνέχεια.

Τέλος, το κυρίαρχο στέλεχος της καλλιέργειας NAB 7, είναι το μοναδικό το οποίο παρέχει αρκετή ασφάλεια στη διάκρισή του σε επίπεδο είδους. Βάσει του κλάδου στον οποίο απεικονίζεται, φαίνεται ως συγγενικό με το *Nannochloropsis oceanica*.

Τα είδη του γένους *Nannochloropsis* έχουν χαρακτηριστεί από το πυρηνικό ριβοσωμικό 18S γονίδιο (18S rDNA) και το πλαστιδιακό *rbcL*. Παρά το γεγονός ότι υπάρχει κάποια μορφολογική παραλλαγή, δεν υπάρχουν συνεκτικά μορφολογικά χαρακτηριστικά που να υποστηρίζουν την υπάρχουσα ταξινόμηση σε επίπεδο ειδών (Andersen et al. 1998, Fawley & Fawley 2007). Το αυξημένο ενδιαφέρον για το *Nannochloropsis* έχει οδηγήσει σε ανάπτυξη πληθώρας στελεχών του γένους, τα οποία είναι διαθέσιμα από πολλές συλλογές καλλιεργειών φυκών. Αυτά τα στελέχη συχνά έχουν χαρακτηριστεί μόνο από τις αλληλουχίες του 18S rDNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να είναι κατατεθειμένες περισσότερες από 150 18S rDNA αλληλουχίες στη GenBank (Fawley et al. 2015).

Τα πλαγκτικά ετερόκοντα (Heterokonts) μικροφύκη του γένους *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae, Hibberd D. J. 1981), που εκπροσωπούνται από διάφορα μέλη (Suda et al. 2002) ανήκουν στο φύλο των Σταχυομαστιγωτών (Stramenopiles), μαζί με άλλα είδη μη-φωτοσυνθετικών πρωτίστων και μικροφυκών, όπως τα διάτομα και τα φαιοφύκη (<http://tolweb.org/Eukaryotes/3>). Αυτά τα φύκη θεωρείται ότι έχουν μια κοινή εξελικτική προέλευση από δευτερογενή ενδοσυμβίωση των ροδοφυκών (Keeling 2009). Λόγω αυτών των εξελικτικών γεγονότων, τα πλαστίδια των Σταχυομαστιγωτών περιβάλλονται από τέσσερις μεμβράνες (Fawley et al. 2015).

Ο προσδιορισμός των χλωροφυλλών της παρούσης εργασίας, έδειξε ότι ανάμεσα στα κοκκοειδή μικροφύκη των μικτών καλλιεργειών, ο λόγος χλωροφύλλης α:β είναι 4,46 ( $Chla = 10,63\text{mg/ml}$ ), στην καλλιέργεια NAB 7, ενώ στην πλειοψηφία των χλωροφυκών ο λόγος α:β είναι έως 2 (Wood 1979). Σε αναλύσεις των χρωστικών σε είδη του γένους, η χλωροφύλλη α, είναι από τις κυρίαρχες χρωστικές μαζί με τις βιολοξανθίνη και αυξεριοξανθίνη (violaxanthin and aucherioxanthin-ester).

Σύμφωνα με μελέτη των Fawley et al. (2014) στα Eustigmatophyceae δύο μεγάλες γενεαλογίες υποστηρίζονται σε επίπεδο Τάξης: η ήδη αναγνωρισμένη τάξη Eustigmatales και η νέα τάξη Goniochloridales (Εικόνες 4.56 και 4.61). Ωστόσο, τα αποτελέσματα των αναλύσεων τους θεωρούνται ανεπαρκή. Συνολικά, τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν ότι τα Eustigmatophyceae είναι μια εξαιρετικά



πολυποίκιλη τάξη, με πολλά νέα είδη, γένη και οικογένειες που αναμένουν ταξινομική διευθέτηση.

Ωστόσο, το 18S rDNA είναι ένας εξαιρετικά διατηρημένος γενετικός τύπος που γενικώς δεν θεωρείται κατάλληλος για ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους (Leliaert et al. 2014).

Τα κυρίαρχα στελέχη των μικτών καλλιεργειών **NAB 4(B)**, **NAB 8**, **NAB 9** και **NAB 12** ταξινομήθηκαν με σχετική επιφύλαξη, με βάση την παρατήρηση στο φωτονικό μικροσκόπιο και τη χρήση κλειδών αναγνώρισης, καθώς δεν επετεύχθη η απομόνωσή τους, ώστε να γίνει επιβεβαίωση και με μοριακές μεθόδους.

### 5.3 Σύγκριση της παραγωγικότητας των καλλιεργειών

Ο μικρότερος αριθμός κυττάρων / ml καλλιέργειας ήταν της τάξης των  $10^5$  στις μικτές καλλιέργειες του NAB 12, όπου το κυρίαρχο στέλεχος ήταν κοκκολιθοφόρο. Η μέγιστη βιομάζα όμως της συγκεκριμένης καλλιέργειας ήταν της τάξης του  $10^8$  ( $8,42 \times 10^8 \mu\text{m}^3/\text{ml}$ ), καθώς τα κύτταρα της συγκεκριμένης καλλιέργειας ήταν τα κύτταρα με τον μεγαλύτερο βιοόγκο / κύτταρο ( $1006,07 \mu\text{m}^3/\text{cell}$ ). Η NAB 12 ήταν η καλλιέργεια η οποία παρουσίασε και το μεγαλύτερο ξηρό βάρος ( $473,22 \text{ mg/l}$ ).

Ο μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων / ml ήταν της τάξης των  $10^8$  στις καλλιέργειες NAB 3 και NAB 6 (κυρίαρχο είδος, κλάση Trebouxiophyceae), και NAB 7 (κυρίαρχο είδος *Nannochloropsis oceanica*). Σε όλες τις υπόλοιπες καλλιέργειες ο μέγιστος αριθμός κυττάρων ήταν της τάξης των  $10^6$ .

Οι μικτές καλλιέργειες NAB 4(A) και NAB 4(B), όπου το κυρίαρχο είδος ανήκει στο γένος *Tetraselmis*, ο μέγιστος αριθμός κυττάρων έφτασε τα  $1,55 \times 10^6$  και  $2,48 \times 10^6$  cells/ml αντιστοίχως.

Οι καλλιέργειες NAB 6, NAB 8, NAB 9 και NAB 12 αναπτύχθηκαν σε φυσικές συνθήκες φωτισμού με πολύ καλή αποδοτικότητα στην παραγωγή βιομάζας. Η αποδοτική εκμετάλλευση της ηλιακής ενέργειας μπορεί να μας λύσει πολλά προβλήματα στη βιομηχανία των καλλιεργειών μικροφυκών, όπως το υψηλό κόστος λειτουργίας αλλά και την κατανάλωση ηλεκτρικής ενέργειας.

Η μικτή καλλιέργεια NAB 6, της οποίας το κυρίαρχο στέλεχος (*Nannochloris* ή *Picochlorum*) ανήκει στο ίδιο γένος με το κυρίαρχο στέλεχος της μικτής καλλιέργειας NAB 3, αλλά αναπτύχθηκε σε διαφορετικές συνθήκες φωτισμού και θρεπτικών (NAB 6: φυσικός φωτισμός / 1,18 mMol NO<sub>3</sub><sup>-</sup> και 0.29mMol PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, NAB 3: τεχνητός φωτισμός 65 μmoles photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> / 2,36 mMol NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 0.29 mMol PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), παρουσίασε με μικρή διαφορά, μεγαλύτερη παραγωγικότητα σε σύγκριση με τη μικτή καλλιέργεια NAB 3.

#### 5.4 Ανάλυση του προφίλ των λιπαρών οξέων των μικτών καλλιεργειών

Όπως ήδη αναφέρθηκε, το προφίλ των μικροφυκών των μικτών καλλιεργειών κυριαρχείται από τα λιπαρά οξέα 16:0 (παλμιτικό οξύ), 18:2ω6 (λινελαϊκό οξύ), 18:3ω3 (α-λινολενικό οξύ). Υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ποσοστών των διαφόρων λιπαρών οξέων των μικτών καλλιεργειών, οι οποίες φαίνεται να κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με το εκάστοτε κυρίαρχο είδος της καλλιέργειας.

Στις μικτές καλλιέργειες NAB 4(A), NAB 4(B) καθώς και στη Μητρική - NAB 4(B) (Σαρωνικός Κόλπος), όπου το κυρίαρχο είδος ανήκει στο γένος *Tetraselmis*, σημαντικό είναι το ποσοστό των λιπαρών οξέων 14:0 (μυριστικό οξύ) και 18:1ω9, το οποίο φαίνεται να υπάρχει σε σημαντικά ποσοστά και σε στελέχη που έχουν απομονωθεί από λιμνοθάλασσες της Δυτικής Ελλάδας (Tzovenis et. al. 2009, Chantzistrountsiou et al. 2016). Τα ποσοστά των 20:4ω6 (ARA), 20:5ω3 (EPA) και 22:6ω3 (DHA) δεν παρουσιάζονται ως τα κυρίαρχα λιπαρά των στελεχών στη συγκεκριμένη μελέτη, αλλά το ποσοστό του συνόλου των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων κυμαίνεται από 27,56% - 33,73%. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα (SAFA) κυμαίνονται από 24,53% - 34,46%, ενώ τα μονοακόρεστα (MUFA) από 26,53% - 38,99%. Στη μητρική καλλιέργεια [NAB A(B)] του γένους, διάρκειας ενός μηνός περίπου, το ποσοστό των μονοακόρεστων λιπαρών φαίνεται να είναι μεγαλύτερο (κατά 10%) των πολυακόρεστων λιπαρών, ενώ στις καλλιέργειες που έγινε λήψη δείγματος για τον προσδιορισμό των λιπαρών κατά τη μετα-εκθετική φάση των καλλιεργειών, το ποσοστό των MUFA και PUFA είναι περίπου το ίδιο. Οπότε φαίνεται να υπάρχει διαφοροποίηση στην ποσοστιαία σύσταση των λιπαρών οξέων, η οποία εξαρτάται από τη φάση λήψης δείγματος της καλλιέργειας.

Οι μικτές καλλιέργειες NAB 3 (Ευβοϊκός κόλπος) και NAB 6 (Κυμάσι – Αιγαίο Πέλαγος), οι οποίες εμφανίζουν το ίδιο κυρίαρχο είδος (*Nannochloris* sp. ή *Picochlorum* sp.), παρουσιάζουν το ίδιο προφίλ λιπαρών οξέων, κάτι που επιβεβαιώνει και τη μεταξύ τους συγγένεια. Τα λιπαρά οξέα αποτελούν σημαντική ταξινομική ένδειξη λόγω των ενζύμων που συμμετέχουν στη σύνθεσή τους (Tzovenis et al. 2009). Επίσης, παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ποσοστό σε πολυακόρεστα λιπαρά (39,03% και 41,97% αντιστοίχως) αλλά και το μεγαλύτερο ποσοστό σε 18:2ω6 (λινελαϊκό οξύ), 18:3ω3 (α-λινολενικό οξύ) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες μικτές καλλιέργειες, κάτι που φαίνεται να συμφωνεί και με σχετική μελέτη των Mourente et al. (1990), οι οποίοι είχαν καταγράψει αντίστοιχα υψηλά ποσοστά στα λιπαρά οξέα που προαναφέρθηκαν, σε στελέχη που ανήκουν στην κλάση των Trebouxiophyceae (*N. atomus*, *N. maculata*, *N. sp.*).

Η μικτή καλλιέργεια NAB 7, όπου το κυρίαρχο είδος πιθανώς είναι το *Nannochloropsis oceanica*, παρουσιάζει υψηλά ποσοστά σε 20:4ω6 (ARA) και 20:5ω3 (EPA). Το *Nannochloropsis oceanica* αποτελεί σημαντική πηγή λιπαρών οξέων μακράς αλύσου (LC-PUFA, Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids), όπως είναι το εικοσοπεντανοϊκό οξύ (EPA, 20:5ω3) (Kaye et al. 2015). Λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε LC-PUFA, διάφορα είδη του γένους *Nannochloropsis* χρησιμοποιούνται ευρέως στις υδατοκαλλιέργειες ως διατροφή (Renaud & Parry 1994, Renaud et al. 1991, Sukenik et al. 1993). Στελέχη του γένους, σε συνθήκες καλλιέργειας με έλλειψη αζώτου, έχουν τη δυνατότητα να συσσωρεύουν έλαια μέχρι και 60% της ξηρής βιομάζας τους (Rodolfi et al. 2009).

Οι μικτές καλλιέργειες NAB 8, NAB 9 και NAB 12 (Κυμάσι – Αιγαίο Πέλαγος), παρουσιάζουν τα περισσότερα λιπαρά οξέα σε mg/g ξηρού βάρους καλλιέργειας.

Η μικτή καλλιέργεια NAB 8 όπου το κυρίαρχο είδος πιθανώς ανήκει στο γένος *Pavlova* παρουσιάζει υψηλό ποσοστό σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (35,97%). Το ποσοστό σε DHA ανέρχεται στο 7,44 % και αποτελεί το υψηλότερο ποσοστό σε σύγκριση με τις υπόλοιπες μικτές καλλιέργειες. Σε μελέτη των Patil et al. (2007), τα λιπαρά οξέα είδους που ανήκει στο συγκεκριμένο γένος και τα οποία ανευρέθησαν σε μεγαλύτερη αναλογία ήταν τα: C14:0, C16:0, C16:1, C20:5ω3 και C22:6ω3. Στην παρούσα εργασία, το προφίλ των λιπαρών οξέων συμφωνεί με το μεγαλύτερο μέρος της ανάλυσης της συγκεκριμένης μελέτης.

Στη μικτή καλλιέργεια NAB 9, όπου το κυρίαρχο είδος πιθανώς ανήκει στο γένος *Pyramimonas*, το προφίλ των λιπαρών οξέων της μικτής καλλιέργειας δεν φαίνεται να συμφωνεί στο μεγαλύτερο μέρος, με αντίστοιχες έρευνες που έχουν γίνει για τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων για τη μονοκαλλιέργεια του είδους (Tzovenis et al. 2009, Dunstan et al. 1992). Στην παρούσα εργασία, τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα διαπιστώθηκε ότι είναι σε μεγαλύτερο ποσοστό (41,34%) από ό,τι τα πολυακόρεστα λιπαρά (27,96%), τα οποία φαίνεται να είναι κυρίαρχα σε αντίστοιχες μονοκαλλιέργειες του γένους.

Υψηλό ποσοστό σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (33,55%) παρουσιάζεται και στη μικτή καλλιέργεια NAB 12, όπου το κυρίαρχο είδος, φαίνεται να ανήκει στην κλάση *Coccolithophyceae*.

Οι απόλυτες συγκρίσεις των λιπαρών οξέων των μικτών καλλιέργειών, με τα αντίστοιχα στελέχη των μονοκαλλιέργειών, δεν είναι ρεαλιστικές, καθώς αυτές οι τιμές ενδεχομένως επηρεάζονται και από τα λιπαρά των υπολοίπων ειδών τα οποία υπάρχουν σε μικρότερη πυκνότητα στις μικτές καλλιέργειες επίσης, οι τιμές αυτές επηρεάζονται από τις συνθήκες καλλιέργειας και τη φάση καλλιέργειας χωρίς να έχει καθιερωθεί κάποιο σαφές πρότυπο απόκρισης.

## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων συνάγονται τα εξής:

- Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συλλογή θαλασσινού νερού σε διαφορετικές εποχές του χρόνου (Φθινόπωρο, Χειμώνας, Άνοιξη) και τοποθεσίες, έδωσε σταθερές καλλιέργειες φυτοπλαγκτού υψηλής παραγωγικότητας για μήνες (επαναλαμβανόμενες καλλιέργειες) μέσα στα όρια των ήπιων συνθηκών του εργαστηρίου.
- Η υφιστάμενη μεθοδολογία και το πρωτόκολλο εργασίας που χρησιμοποιήθηκε κατέστησαν επιτυχή την ανάπτυξη και τη διαχείριση της μικτής καλλιέργειας του φυτοπλαγκτού.
- Η διερεύνηση των συνθηκών καλλιέργειας έδωσε σαφή αποτελέσματα για τη βέλτιστη ανάπτυξη των καλλιεργειών και την εναλλαγή των ειδών της βιοκοινωνίας.
- Με τη ρύθμιση του θρεπτικού εμπλουτισμού και των επιπέδων αλατότητας πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη καλλιέργειας με υψηλή πυκνότητα κυττάρων της τάξης του  $10^8$ .
- Οι καλλιέργειες έχουν την ικανότητα να διατηρούνται σε σταθερά επίπεδα, ώστε η εφαρμογή τους στην εκτροφή θαλάσσιων ζωντανών οργανισμών να είναι εφικτή.
- Η ανάλυση του προφίλ των λιπαρών οξέων έδωσε αυξημένα ποσοστά πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε ποσότητα εφαρμόσιμη στη βιομηχανία των υδατοκαλλιεργειών.
- Οι μικτές καλλιέργειες φυτοπλαγκτού είναι εφικτές και παραγωγικά εφάμιλλες των μονοκαλλιεργειών.
- Τα στελέχη που κυριαρχούν στις διάφορες μικτές καλλιέργειες, διαπιστώθηκε ότι ανήκουν σε είδη που χρησιμοποιούνται συνήθως στις υδατοκαλλιέργειες, με ευνοϊκά προφίλ λιπαρών οξέων, σε διάφορες αναλογίες ανάλογα με το κυρίαρχο στέλεχος.
- Όσον αφορά στις μοριακές τεχνικές που εφαρμόστηκαν για την ταυτοποίηση των μικροφυκών, η χρήση των γονιδίων *gbcL* και *18S* που χρησιμοποιήθηκαν, είναι σημαντική ένδειξη αλλά δεν επαρκεί για να οδηγηθούμε σε ασφαλή ταξινομικά συμπεράσματα. Είναι απαραίτητη η χρήση περισσότερων γονιδίων

καθώς και η επιλογή των καταλληλότερων, για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων και την αναπαράσταση των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των στελεχών.

## **7. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ**

Η εργασία αυτή μπορεί να αποτελέσει το έναυσμα για μια σειρά μελλοντικών ερευνητικών προοπτικών, οι οποίες είναι δυνατόν να εστιαστούν κυρίως στα παρακάτω:

- Η τεχνική των μικτών καλλιεργειών φυτοπλαγκτού να δοκιμαστεί σε μεγάλης-κλίμακας εξωτερικούς χώρους, διότι φαίνεται ότι αποτελεί λύση για φθηνές μεγάλες ποσότητες βιομάζας φυτοπλαγκτού, οι οποίες απαιτούνται για την εκτροφή σε εκολλαπτήρια δίθυρων μαλακίων, για την εκτροφή ζωοπλαγκτού στις διάφορες υδατοκαλλιέργειες της Μεσογείου, αλλά και σε πολλές άλλες εφαρμογές.
- Υπάρχει ανάγκη για αναζήτηση, σαφέστερη ταξινόμηση και εκτενέστερη μελέτη των εγχώριων καλλιεργήσιμων στελεχών μικροφυκών, προς χρήση στη βιομηχανία.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Καρύδης Μ. (2001). Σημειώσεις μαθήματος, Υδατική Τοξικολογία, Πειράματα Τοξικότητας. Τμήμα Επιστημών της Θάλασσας, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Μυτιλήνη.

Λυκάκης Ι. (1996). Υδροβιολογία. Αθανασόπουλος, Παπαδήμας και ΣΙΑ Ε.Ε., Αθήνα.

Νικολάου Χ., (2016), Αξιοποίηση βιομάζας μικροφυκών από επεξεργασία αποβλήτων για παραγωγή βιοαιθανόλης. Μεταπτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Πατρών.

Παπαπετροπούλου Μ. και Μαυρίδου Α. (1995). «Μικροβιολογία του υδάτινου περιβάλλοντος, βασικές αρχές», Εκδοτικός οίκος Τραυλός, Αθήνα.

Συγγελάκη Μ. (2014). Εξέλιξη της Κατανομής Μεγέθους στα Μικροφύκη του Γένους *Dunaliella salina* υπό την Επίδραση Σταθερής Διατμητικής Τάσης. Διπλωματική εργασία, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, Αθήνα.

Τσιόνκη Ι. (2013). Μαζική ανάπτυξη μικροφυκών υπό εργαστηριακές συνθήκες για τη χρήση τους στις υδατοκαλλιέργειες. Μεταπτυχιακή εργασία, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Οικολογίας και Ταξινομικής, ΕΚΠΑ.

Χαντζηστρούντσιου Ξ. (2014). Συστηματική Ανάλυση Στελεχών του Γένους *Tetraselmis* STEIN (Chlorodendrophyceae) από Λιμνοθάλασσες της Δυτικής Ελλάδας με τη χρήση Μικροσκοπικών, Βιοχημικών και Μοριακών Μεθόδων. Μεταπτυχιακή εργασία, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Οικολογίας και Ταξινομικής, ΕΚΠΑ.

### ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., ... & James, T. Y. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(5), 399-451.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.

An, S. S., Mopps, B., Weber, K., and Bhattacharya, D. 1999. The origin and evolution of green algal and plant actins. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 275-285.

- Andersen, R. A., Brett, R. W., Potter, D., & Sexton, J. P. (1998). Phylogeny of the Eustigmatophyceae based upon 18S rDNA, with emphasis on Nannochloropsis. *Protist*, *149*(1), 61-74.
- Archibald, J.M. 2009. The puzzle of plastid evolution. *Curr. Biol.* **19**: R81-R
- Badger, M. R., & Price, G. D. (2003). CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *Journal of experimental botany*, *54*(383), 609-622.
- Bae, J. Y., Kim, D. J., Yoo, K. Y., Kim, S. G., Lee, J. Y., & Bai, S. C. (2010). Effects of dietary arachidonic acid (20: 4n-6) levels on growth performance and fatty acid composition of juvenile eel, *Anguilla japonica*. *Asian-Aust J Anim Sci*, *23*(4), 508-514.
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, *25*(2), 207-210.
- Becker, W. (2004). 18 Microalgae in Human and Animal Nutrition. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, 312.
- Bharathiraja, B., Chakravarthy, M., Kumar, R. R., Yogendran, D., Yuvaraj, D., Jayamuthunagai, J., ... & Palani, S. (2015). Aquatic biomass (algae) as a future feed stock for bio-refineries: A review on cultivation, processing and products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *47*, 634-653.
- Boney A.D. (1975). Phytoplankton, Studies in Biology, *First published by Edward Arnold (Publishers) Limited*, London
- Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of biotechnology*, *70*(1), 313-321.
- Borowitzka, M. A. (1997). Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*, *9*(5), 393-401.
- Borowitzka, M. A. (1988). Fats, oils and hydrocarbons. *Micro-algal biotechnology.*, 257-287.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*(1-2), 248-254.
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and sustainable energy reviews*, *14*(2), 557-577.
- Bremer K. (1985). Summary of green plant phylogeny and classification. *Cladistics*, *1*(4), 369-385.



Brown, M. R. (2002). Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 3, 281-292.

Buchheim, M. A., Michalopoulos, E. A., and Buchheim, J. A. (2001). Phylogeny of the Chlorophyceae with special reference to the Sphaeropleales: A study of 18S and 26S rDNA data. *J. Phycol.* **37**: 819–835.

Buchheim, M. A. and Chapman, R. L. (1991). Phylogeny of the colonial green flagellates: a study of 18S and 26S rRNA sequence data. *Biosystems* **25**: 85–100.

Carlsson, A. S., van Beilen, J. B., Möller, R., Clayton, D., & Bowles, D. (2007). Micro-and macro-algae: utility for industrial applications, outputs from the EPOBIO project, University of York.

Carvalho, A. P., Meireles, L. A., & Malcata, F. X. (2006). Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology progress*, 22(6), 1490-1506.

Castro P. and Huber M.E. (1999). *Θαλάσσια Βιολογία*, University Studio Press, Θεσσαλονίκη

Certik, M., & Shimizu, S. (1999). Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of bioscience and bioengineering*, 87(1), 1-14.

Cavalier-Smith, T. (1993, January). Evolution of the eukaryotic genome. In *SYMPOSIA-SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY* (Vol. 1, No. 50, pp. 333-333). Cambridge University Press.

Chantzistroutsiou, X., Tzovenis, I., Parmakelis, A., & Economou-Amilli, A. (2016). Characterization of *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* (Chlorodendrophyceae) strains from coastal lagoons of Western Greece using a multivariate approach. *Phytotaxa*, 278(3), 225-240.

Chapman, R. L., Buchheim, M. A., Delwiche, C. F., Friedl, T., Huss, V. A. R., Karol, K. G., Lewis, L. A., Manhart, J., McCourt, R. M., Olsen, J. L., and Waters, D. A. (1998). Molecular systematics of the green algae. **In:** *Molecular Systematics of Plants II*, pp. 508–540. Soltis, D. E., Soltis, P. S. and Doyle, J. J. Eds., Kluwer Academic, Boston, MA.

Chapman, R. L., Buchheim, M. A., and Hoshaw, R. W. (1991). Ribosomal RNA gene sequences: Analysis and significance in the phylogeny and taxonomy of green algae. *Crit. Rev. Plant Sci.* **10**: 343–368.

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, *25*(3), 294-306.

Clarke, J. D. (2009). Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) DNA miniprep for plant DNA isolation. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2009*(3), pdb-prot5177.

Daugbjerg, N., Moestrup, Ø., and Arctander, P. (1994). Phylogeny of the genus *Pyramimonas* (Prasinophyceae, Chlorophyta) inferred from the *rbcL* gene. *J. Phycol.* **30**: 991–999.

de Koning, A. P., & Keeling, P. J. (2006). The complete plastid genome sequence of the parasitic green alga *Helicosporidium* sp. is highly reduced and structured. *BMC biology*, *4*(1), 12.

De la Noue, J., & de Pauw, N. (1988). The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotechnology advances*, *6*(4), 725-770.

De Pauw, N., Morales, J., & Persoone, G. (1984). Mass culture of microalgae in aquaculture systems: progress and constraints. In *Eleventh International Seaweed Symposium* (pp. 121-134). Springer Netherlands.

Durand-Chastel, H. (1980). Production and use of *Spirulina* in Mexico. *Algae biomass: production and use*/[sponsored by the National Council for Research and Development, Israel and the Gesellschaft für Strahlen-und Umweltforschung (GSF), Munich, Germany]; editors, Gedaliah Shelef, Carl J. Soeder.

Dunstan, G. A., Volkman, J. K., Jeffrey, S. W., & Barrett, S. M. (1992). Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and

Prasinophyceae. 2. Lipid classes and fatty acids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 161(1), 115-134.

Falkowski, P. G., Schofield, O., Katz, M. E., Van de Schootbrugge, B., & Knoll, A. H. (2004). Why is the land green and the ocean red?. In *Coccolithophores* (pp. 429-453). Springer Berlin Heidelberg.

FAO, 2013. Algal Production (Growth Phases) - Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (Online) Available: - <http://www.fao.org/docrep/003/W3732E/w3732e06.htm>

Fawley, M. W., Jameson, I., & Fawley, K. P. (2015). The phylogeny of the genus *Nannochloropsis* (Monodopsidaceae, Eustigmatophyceae), with descriptions of *N. australis* sp. nov. and *Microchloropsis* gen. nov. *Phycologia*, 54(5), 545-552.

Fawley, K. P., Eliáš, M., & Fawley, M. W. (2014). The diversity and phylogeny of the commercially important algal class Eustigmatophyceae, including the new clade Goniochloridales. *Journal of applied phycology*, 26(4), 1773-1782.

Fawley, K. P., & Fawley, M. W. (2007). Observations on the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), with descriptions of new taxa. *Protist*, 158(3), 325-336.

Fernandes, B. D., Dragone, G. M., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010). Light regime characterization in an airlift photobioreactor for production of microalgae with high starch content. *Applied biochemistry and biotechnology*, 161(1-8), 218-226.

Fountoulaki, E., Alexis, M.N., Nengas. I., Venou. B.. 2003. Effects of dietary arachidonic acid (20:4n-6). on growth. body composition. and tissue fatty acids profile of gilthead bream fingerlings (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 225, 309-323

Friedl, T. (1997). The evolution of the green algae. In *Origins of Algae and their Plastids* (pp. 87-101). Springer Vienna.

Friedl, T. (1995). Inferring taxonomic positions and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae: a phylogenetic analysis of 18S ribosomal RNA sequences from *Dictyochloropsis reticulata* and from members of the genus *Myrmecia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae cl. nov.) 1. *Journal of Phycology*, 31(4), 632-639.

Fučíková, K., Leliaert, F., Cooper, E. D., Škaloud, P., D'hondt, S., De Clerck, O., ... & Delwiche, C. F. (2014). New phylogenetic hypotheses for the core Chlorophyta based on chloroplast sequence data. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2, 63.

- Giordano, M., Beardall, J., & Raven, J. A. (2005). CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.*, *56*, 99-131.
- Gómez, P.I. & González, M.A. (2004): Genetic variation among seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with industrial potential, based on RAPD banding patterns and on nuclear ITS rDNA sequences. – *Aquaculture* 233: 149–162
- Graham JE, Wilcox LW & LE Graham (2011). Φύκη. Οικονόμου-Αμίλλη Α. (επιμ. μτφ), Εκδ. Κωσταράκη, σελ 1-813, Αθήνα
- Grewe, C. B., & Pulz, O. (2012). The biotechnology of cyanobacteria. In *Ecology of Cyanobacteria II* (pp. 707-739). Springer Netherlands.
- Grima, E. M., Fernández, F. A., Camacho, F. G., & Chisti, Y. (1999). Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *Journal of biotechnology*, *70*(1), 231-247.
- Guillou, L., Eikrem, W., Chrétiennot-Dinet, M. J., Le Gall, F., Massana, R., Romari, K., ... & Vaultot, D. (2004). Diversity of picoplanktonic prasinophytes assessed by direct nuclear SSU rDNA sequencing of environmental samples and novel isolates retrieved from oceanic and coastal marine ecosystems. *Protist*, *155*(2), 193-214.
- Gunderson, J. H., Elwood, H., Ingold, A., Kindle, K., & Sogin, M. L. (1987). Phylogenetic relationships between chlorophytes, chrysophytes, and oomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(16), 5823-5827.
- Guschina, I. A., & Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in lipid research*, *45*(2), 160-186.
- Hall, B. G. (2004). *Phylogenetic trees made easy: a how-to manual* (Vol. 547). Sunderland, MA: Sinauer Associates
- Harholt, J., Moestrup, Ø., & Ulvskov, P. (2016). Why plants were terrestrial from the beginning. *Trends in plant science*, *21*(2), 96-101.
- Heasman, M., Diemar, J., O'connor, W., Sushames, T., & Foulkes, L. (2000). Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs—a summary. *Aquaculture Research*, *31*(8-9), 637-659.
- Henley, W. J., Hironaka, J. L., Guillou, L., Buchheim, M. A., Buchheim, J. A., Fawley, M. W., & Fawley, K. P. (2004). Phylogenetic analysis of the ‘Nannochloris-like’ algae and diagnoses of *Picochlorum oklahomensis* gen. et sp. Nov (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phycologia*, *43*(6), 641-652.

- Hepperle, D., & Krienitz, L. (2001). Systematics and ecology of chlorophyte picoplankton in German inland waters along a nutrient gradient. *International Review of Hydrobiology*, 86(3), 269-284.
- Hibberd, D. J. (1981). Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 82(2), 93-119.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The plant journal*, 54(4), 621-639.
- Hunt M., 2006. "Real Time PCR Tutorial". University of South Carolina. Διαθέσιμο online: <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>. Τελευταία πρόσβαση 21/01/2017
- Huss, V. A., Frank, C., Hartmann, E. C., Hirmer, M., Kloboucek, A., Seidel, B. M., ... & Kessler, E. (1999). Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella sensu lato* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 35(3), 587-598.
- Jensen, S., & Knutsen, G. (1993). Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis in *Spirulina platensis*. *Journal of applied phycology*, 5(5), 495-504.
- Johnson, K. R., & Admassu, W. (2013). Mixed algae cultures for low cost environmental compensation in cultures grown for lipid production and wastewater remediation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(6), 992-998.
- Jorquera, O., Kiperstok, A., Sales, E. A., Embirucu, M., & Ghirardi, M. L. (2010). Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource technology*, 101(4), 1406-1413.
- Kawaguchi, K. (1980). Microalgae production systems in Asia. *Algae biomass: production and use/[sponsored by the National Council for Research and Development, Israel and the Gesellschaft fur Strahlen-und Umweltforschung (GSF), Munich, Germany]; editors, Gedaliah Shelef, Carl J. Soeder.*
- Kaye, Y., Grundman, O., Leu, S., Zarka, A., Zorin, B., Didi-Cohen, S., ... & Boussiba, S. (2015). Metabolic engineering toward enhanced LC-PUFA biosynthesis in *Nannochloropsis oceanica*: Overexpression of endogenous  $\Delta 12$  desaturase driven by stress-inducible promoter leads to enhanced deposition of polyunsaturated fatty acids in TAG. *Algal Research*, 11, 387-398.
- Keeling, P. J. (2009). Chromalveolates and the evolution of plastids by secondary endosymbiosis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(1), 1-8.
- Khummongkol, D., Canterford, G. S., & Fryer, C. (1982). Accumulation of heavy metals in unicellular algae. *Biotechnology and Bioengineering*, 24(12), 2643-2660.

- Kim, E., & Graham, L. E. (2008). EEF2 analysis challenges the monophyly of Archaeplastida and Chromalveolata. *PLoS One*, 3(7), e2621.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111-120.
- Kroes, R., Schaefer, E. J., Squire, R. A., & Williams, G. M. (2003). A review of the safety of DHA45-oil. *Food and chemical toxicology*, 41(11), 1433-1446.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y., & Guindon, S. (2012). PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*, 29(6), 1695-1701.
- Lavens, P., & Sorgeloos, P. (1996). *Manual on the production and use of live food for aquaculture* (No. 361). Food and Agriculture Organization (FAO).
- Lee, Y. K. (1997). Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. *Journal of Applied Phycology*, 9(5), 403-411.
- Lee R.E.(1989). *Phycology*. Cambridge University Press.
- Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F., & De Clerck, O. (2012). Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1), 1-46.
- Lemieux, C., Otis, C., & Turmel, M. (2007). A clade uniting the green algae *Mesostigma viride* and *Chlorokybus atmophyticus* represents the deepest branch of the Streptophyta in chloroplast genome-based phylogenies. *BMC biology*, 5(1), 2.
- Lepage, G., & Roy, C. C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of lipid research*, 27(1), 114-120.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(4), 629-636.
- Lundquist, T. J., Woertz, I. C., Quinn, N. W. T., & Benemann, J. R. (2010). A realistic technology and engineering assessment of algae biofuel production. *Energy Biosciences Institute*, 1-178.
- Marin, B., & Melkonian, M. (2010). Molecular phylogeny and classification of the Mamiellophyceae class. nov.(Chlorophyta) based on sequence comparisons of the nuclear-and plastid-encoded rRNA operons. *Protist*, 161(2), 304-336.
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1), 217-232.

- McCausland, M. A., Brown, M. R., Barrett, S. M., Diemar, J. A., & Heasman, M. P. (1999). Evaluation of live microalgae and microalgal pastes as supplementary food for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 174(3), 323-342.
- Melkonian, M. (1979). An ultrastructural study of the flagellate *Tetraselmis cordiformis* Stein (Chlorophyceae) with emphasis on the flagellar apparatus. *Protoplasma*, 98(1-2), 139-151.
- Metting Jr, F. B. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of industrial microbiology*, 17(5-6), 477-489.
- Mishler, B. D., Lewis, L. A., Buchheim, M. A., Renzaglia, K. S., Garbary, D. J., Delwiche, C. F., Zechman, F. W., Kantz, T. S., and Chapman, R. L. (1992). Phylogenetic relationships of the “green algae” and “bryophytes”. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 81: 451–483.
- Molina, E., Fernández, J., Acién, F. G., & Chisti, Y. (2001). Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of biotechnology*, 92(2), 113-131.
- Mourente, G., Lubian, L. M., & Odriozola, J. M. (1990). Total fatty acid composition as a taxonomic index of some marine microalgae used as food in marine aquaculture. *Hydrobiologia*, 203(3), 147-154.
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*, 155, 335-350
- Murray, R. G. E., Brenner, D. J., Colwell, R. R., De Vos, P., Goodfellow, M., Grimont, P. A. D., ... & Zavarzin, G. A. (1990). Report of the ad hoc committee on approaches to taxonomy within the Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 40(2), 213-215.
- Nakayama, T., Marin, B., Kranz, H. D., Surek, B., Huss, V. A., Inouye, I., & Melkonian, M. (1998). The basal position of scaly green flagellates among the green algae (Chlorophyta) is revealed by analyses of nuclear-encoded SSU rRNA sequences. *Protist*, 149(4), 367-380.
- Nascimento, I. A., Marques, S. S. I., Cabanelas, I. T. D., Pereira, S. A., Druzian, J. I., de Souza, C. O., ... & Nascimento, M. A. (2013). Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. *Bioenergy research*, 6(1), 1-13.
- Nell, J. A., & O'Connor, W. A. (1991). The evaluation of fresh algae and stored algal concentrates as a food source for Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley), larvae. *Aquaculture*, 99(3-4), 277-284.
- Norsker, N. H., Barbosa, M. J., Vermuë, M. H., & Wijffels, R. H. (2011). Microalgal production—a close look at the economics. *Biotechnology advances*, 29(1), 24-27.

- Nozaki, H., Misumi, O., and Kuroiwa, T. (2003). Phylogeny of the quadriflagellate Volvocales (Chlorophyceae) based on chloroplast multigene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **29**: 58–66.
- Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., & Gislerød, H. R. (2007). Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International*, *15*(1), 1-9.
- Perasso, R., Baroin, A., Qu, L. H., Bachellerie, J. P., and Adoutte, A. (1989). Origin of the algae. *Nature* **339**: 142–144.
- Philippe, H. and Telford, M. J. (2006). Large-scale sequencing and the new animal phylogeny. *Trends Ecol. Evol.* **21**: 614–620.
- Pickett-Heaps, J. D. (1975). *Green algae: structure, reproduction and evolution in selected genera*. Mass., Sinauer Associates.
- Pombert, J. F., & Keeling, P. J. (2010). The mitochondrial genome of the entomoparasitic green alga *Helicosporidium*. *PLoS One*, *5*(1), e8954.
- Proschold, T., & Leliaert, F. (2007). Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches. *Systematics association special volume*, *75*, 123.
- Pulz, O. (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*, *57*(3), 287-293.
- Raja R., Hemaiswarya S., Kumar N. Ashok, Sridhar S., Rengasamy R. (2008). A Perspective on the Biotechnological Potential of Microalgae, *Critical Reviews in Microbiology* *34*:77-88
- Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, *86*(11), 807-815.
- Raymond E.G. (1980). “Plankton and productivity in the Oceans”, *2<sup>nd</sup> edition, Vol. 1, Phytoplankton Pergamon Press, Oxford*, 489 pp.
- Renaud, S. M., & Parry, D. L. (1994). Microalgae for use in tropical aquaculture II: Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. *Journal of applied Phycology*, *6*(3), 347-356.
- Renaud, S. M., Parry, D. L., Thinh, L. V., Kuo, C., Padovan, A., & Sammy, N. (1991). Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, *3*(1), 43-53.
- Richmond, A. (2004). Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology, *Blackwell Science Ltd., Oxford*, 566 pp.



- Richmond, A. (1999). Physiological principles and modes of cultivation in mass production of photoautotrophic microalgae. *Chemicals from Microalgae*, 353-86
- Richmond, A. (1992). Open systems for the mass production of photoautotrophic microalgae outdoors: physiological principles. *Journal of Applied Phycology*, 4(3), 281-286.
- Robert, R., & Trintignac, P. (1997). Substitutes for live microalgae in mariculture: a review. *Aquatic Living Resources*, 10(5), 315-327.
- Robert, R., & Gérard, A. (1999). Bivalve hatchery technology: the current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquatic Living Resources*, 12(2), 121-130.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 102(1), 100-112.
- Romari, K., & Vaultot, D. (2004). Composition and temporal variability of picoeukaryote communities at a coastal site of the English Channel from 18S rDNA sequences. *Limnology and Oceanography*, 49(3), 784-798.
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572-1574.
- Ruiz-Rodriguez, A., Reglero, G., & Ibañez, E. (2010). Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51(2), 305-326.
- Ryan, C., Green, T. B., Hartley, A., Browning, B., & Garvin, C. (2009). Cultivation Clean Energy: The Promise of Algae Biofuels.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Schwarz, G. (1978). Estimating the dimension of a model. *The annals of statistics*, 6(2), 461-464.

Seenivasan, R., Sausen, N., Medlin, L. K., & Melkonian, M. (2013). *Picomonas judraskeda* gen. et sp. nov.: the first identified member of the Picozoa phylum nov., a widespread group of picoeukaryotes, formerly known as 'picobiliphytes'. *PLoS one*, 8(3), e59565.

Sharma, K. K., Schuhmann, H., & Schenk, P. M. (2012). High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*, 5(5), 1532-1553.

Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., & Roessler, P. (1998). A look back at the US Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae. *National Renewable Energy Laboratory*, 328.

Sournia A. (1978). *Phytoplankton Manual*. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, UNESCO

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), 87-96.

Staley, J. T. (2006). The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 361(1475), 1899-1909.

Suda, S., Atsumi, M., & Miyashita, H. (2002). Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (Eustigmatophyceae). *Phycologia*, 41(3), 273-279.

Suh, I.S., & Lee, C.G. (2003). Photobioreactor engineering: design and performance. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8(6), 313.

Sukenik, A., Zmora, O., & Carmeli, Y. (1993). Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture*, 117(3-4), 313-326.

Sym, S. D., & Pienaar, R. N. (1993). Further observations on *Trichocystis*, a subgenus of *Pyramimonas* (Prasinophyceae, Chlorophyta). *Phycologia*, 32(5), 338-350.

Tapiero, H., Ba, G. N., Couvreur, P., & Tew, K. D. (2002). Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(5), 215-222.

Tomas, C. R. (Ed.). (1997). *Identifying marine phytoplankton*. Academic press.

Tsukada, O., & Kawahara, T. (1977). Mass culture of *Chlorella* in Asian countries. *Biological solar energy conversion*

- Tsukahara, K., & Sawayama, S. (2005). Liquid fuel production using microalgae. *Jpn Pet Inst*, 48(5), 251.
- Tragin, M., Lopes dos Santos, A., Christen, R., & Vaultot, D. (2016). Diversity and ecology of green microalgae in marine systems: an overview based on 18S rRNA gene sequences. *Perspectives in Phycology*, 141-154.
- Tzovenis, I. (2001). Optimisation of the biomass and fatty acid production of the Microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-ISO) for aquacultural and industrial purposes. *Universiteit Geint, Ph.D in Applied Biological Sciences (Agriculture)*
- Tzovenis, I., Fountoulaki, E., Dolapsakis, N., Kotzamanis, I., Nengas, I., Bitis, I., ... & Economou-Amilli, A. (2009). Screening for marine nanoplanktic microalgae from Greek coastal lagoons (Ionian Sea) for use in mariculture. *Journal of applied phycology*, 21(4), 457.
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 44(5), 619.
- Venkataraman, L. V. (1986). Blue-green algae as biofertilizer. *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*, 455-471.
- Van Lenning, K., Latasa, M., Estrada, M., Sáez, A. G., Medlin, L., Probert, I., ... & Young, J. (2003). Pigment signatures and phylogenetic relationships of the Pavlophyceae (Haptophyta) 1. *Journal of Phycology*, 39(2), 379-389.
- Viprey, M., Guillou, L., Ferréol, M., & Vaultot, D. (2008). Wide genetic diversity of picoplanktonic green algae (Chloroplastida) in the Mediterranean Sea uncovered by a phylum-biased PCR approach. *Environmental Microbiology*, 10(7), 1804-1822.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., & Starr, M. P. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(4), 463-464.
- Wiley, P. E., Campbell, J. E., & McKuin, B. (2011). Production of biodiesel and biogas from algae: a review of process train options. *Water Environment Research*, 83(4), 326-338.
- Wood, A. M. (1979). Chlorophyll a: b ratios in marine planktonic algae. *Journal of Phycology*, 15(3), 330-332.
- XiaoNian, M., TianPeng, C., Bo, Y., Jin, L., & Feng, C. (2016). Lipid production from *Nannochloropsis*. *Marine Drugs*, 14(4).
- Yamamoto, M., Nishikawa, T., Kajitani, H., & Kawano, S. (2007). Patterns of asexual reproduction in *Nannochloris bacillaris* and *Marvania geminata* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Planta*, 226(4), 917-927.

Yoon, H. S., Hackett, J. D., Ciniglia, C., Pinto, G., & Bhattacharya, D. (2004). A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Molecular biology and evolution*, 21(5), 809-818.

Zechman, F. W., Theriot, E. C., Zimmer, E. A., and Chapman, R. L. (1990). Phylogeny of the Ulvophyceae (Chlorophyta): cladistic analysis of nuclearencoded rRNA sequence data. *J. Phycol.* **26**: 700–710

Zuckerandl, E., & Pauling, L. (1965). Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of theoretical biology*, 8(2), 357-366.

## ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

- <http://www.algaebase.org>
- <https://frederikleiaert.files.wordpress.com>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <http://tolweb.org/Eukaryotes/3>
- <http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- <http://www.marinespecies.org/>

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ Ι&ΙΙ&ΙΙΙ  
ΠΙΝΑΚΕΣ & ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ**

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι - ΠΙΝΑΚΕΣ

**Πίνακας 1.** Κινητική καλλιέργειας **NAB 4 (A)** - *Tetraselmis* sp., Άγιος Κοσμάς (Σαρωνικός κόλπος).

ΗΜΕΡΕΣ	ΦΙΑΛΗ 1	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 2	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 3	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ
0	1,40E+05	11,85	0,00	1,40E+05	11,85	0,00	1,40E+05	11,85	0,00
1	2,30E+05	12,35	0,50	2,50E+05	12,43	0,58	2,30E+05	12,35	0,50
2	2,90E+05	12,58	0,23	3,80E+05	12,85	0,42	3,20E+05	12,68	0,33
3	3,27E+05	12,70	0,12	4,10E+05	12,92	0,08	5,50E+05	13,22	0,54
4	6,04E+05	13,31	0,61	6,15E+05	13,33	0,41	7,15E+05	13,48	0,26
5	8,10E+05	13,60	0,29	7,20E+05	13,49	0,16	1,04E+06	13,85	0,37
6	7,83E+05	13,57	-0,03	1,05E+06	13,86	0,38	9,46E+05	13,76	-0,09
7	9,60E+05	13,77	0,20	1,02E+06	13,84	-0,03	9,23E+05	13,74	-0,02
8	1,09E+06	13,90	0,13	1,06E+06	13,87	0,04	1,06E+06	13,87	0,14
9	1,15E+06	13,96	0,05	1,19E+06	13,99	0,12	1,27E+06	14,05	0,18
10	1,23E+06	14,02	0,07	1,28E+06	14,06	0,07	1,34E+06	14,11	0,05
11	1,40E+06	14,15	0,13	1,35E+06	14,12	0,05	1,53E+06	14,24	0,14
12	1,45E+06	14,19	0,04	1,40E+06	14,15	0,04	1,50E+06	14,22	-0,02
13	1,55E+06	14,25	0,07	1,48E+06	14,21	0,06	1,50E+06	14,22	0,00
14	1,60E+06	14,29	0,03	1,53E+06	14,24	0,03	1,50E+06	14,22	0,00

**Πίνακας 2.** Κινητική καλλιέργειας **NAB 4 (B)** - *Tetraselmis* sp., Άγιος Κοσμάς (Σαρωνικός κόλπος)

ΗΜΕΡΕΣ	ΦΙΑΛΗ 1	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 2	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 3	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ
0	3,32E+05	12,71	0,00	3,32E+05	12,71	0,00	3,32E+05	12,71	0,00
1	3,30E+05	12,71	-0,01	3,50E+05	12,77	0,05	3,60E+05	12,79	0,08
2	3,50E+05	12,77	0,06	3,80E+05	12,85	0,08	3,90E+05	12,87	0,08
3	3,70E+05	12,82	0,06	4,20E+05	12,95	0,10	4,60E+05	13,04	0,17
4	5,92E+05	13,29	0,47	5,87E+05	13,28	0,33	5,63E+05	13,24	0,20
5	7,86E+05	13,57	0,28	7,60E+05	13,54	0,26	1,04E+06	13,85	0,61
6	9,70E+05	13,79	0,21	7,68E+05	13,55	0,01	9,70E+05	13,79	-0,07
7	8,83E+05	13,69	-0,09	9,60E+05	13,77	0,22	1,06E+06	13,87	0,09
8	1,05E+06	13,86	0,17	1,20E+06	14,00	0,22	1,18E+06	13,98	0,11
9	1,13E+06	13,94	0,07	1,15E+06	13,96	-0,04	1,72E+06	14,36	0,38
10	1,39E+06	14,14	0,21	1,15E+06	13,96	0,00	1,61E+06	14,29	-0,07
11	1,59E+06	14,28	0,13	1,53E+06	14,24	0,29	1,68E+06	14,33	0,04
12	1,62E+06	14,30	0,02	1,65E+06	14,32	0,08	2,30E+06	14,65	0,31
13	1,68E+06	14,33	0,04	1,70E+06	14,35	0,03	2,90E+06	14,88	0,23
14	1,79E+06	14,40	0,06	1,75E+06	14,38	0,03	3,26E+06	15,00	0,12
15	2,09E+06	14,55	0,15	1,80E+06	14,40	0,03	1,92E+06	14,47	-0,53
16	2,23E+06	14,62	0,06	1,96E+06	14,49	0,09	1,97E+06	14,49	0,03
17	1,96E+06	14,49	-0,13	1,91E+06	14,46	-0,03	1,26E+06	14,05	-0,45

**Πίνακας 3.** Κινητική καλλιέργειας **NAB 3** - Trebouxiophyceae, Λίμνη Ευβοίας (Ευβοϊκός κόλπος).

ΗΜΕΡΕΣ	ΦΙΑΛΗ 1	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 2	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 3	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ
0	2,90E+07	17,18	0,00	2,90E+07	17,18	0,00	2,90E+07	17,18	0,00
1	3,70E+07	17,43	0,24	3,80E+07	17,45	0,27	4,10E+07	17,53	0,35
2	6,00E+07	17,91	0,48	6,10E+07	17,93	0,47	6,20E+07	17,94	0,41
3	6,50E+07	17,99	0,08	6,20E+07	17,94	0,02	7,20E+07	18,09	0,15
4	7,26E+07	18,10	0,11	6,50E+07	17,99	0,05	8,25E+07	18,23	0,14
5	8,05E+07	18,20	0,10	8,05E+07	18,20	0,21	9,75E+07	18,40	0,17
6	9,48E+07	18,37	0,16	9,13E+07	18,33	0,13	1,09E+08	18,51	0,11
7	1,13E+08	18,54	0,18	9,83E+07	18,40	0,07	1,29E+08	18,68	0,17
8	1,07E+08	18,49	-0,05	1,10E+08	18,52	0,11	1,29E+08	18,68	0,00
9	1,50E+08	18,83	0,34	1,26E+08	18,65	0,14	1,31E+08	18,69	0,02
10	1,56E+08	18,87	0,04	1,29E+08	18,68	0,02	1,63E+08	18,91	0,22
11	1,79E+08	19,00	0,14	2,11E+08	19,17	0,49	1,46E+08	18,80	-0,11
12	1,90E+08	19,06	0,06	2,12E+08	19,17	0,00	1,90E+08	19,06	0,26
13	2,10E+08	19,16	0,10	2,13E+08	19,18	0,00	2,10E+08	19,16	0,10
14	2,24E+08	19,23	0,06	2,14E+08	19,18	0,00	2,44E+08	19,31	0,15
15	2,09E+08	19,16	-0,07	2,57E+08	19,36	0,18	1,80E+08	19,01	-0,30
16	2,37E+08	19,28	0,12	2,60E+08	19,38	0,01	2,17E+08	19,20	0,19
17	2,40E+08	19,29	0,01	2,40E+08	19,30	-0,08	2,32E+08	19,26	0,06



**Πίνακας 4.** Κινητική καλλιέργειας **NAB 7** - *Nannochloropsis* sp., Λίμνη Ευβοίας (Ευβοϊκός κόλπος).

ΗΜΕΡΕΣ	ΦΙΑΛΗ 1	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 2	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 3	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ
0	2,56E+07	17,06	0,00	2,56E+07	17,06	0,00	2,56E+07	17,06	0,00
1	3,10E+07	17,25	0,19	3,50E+07	17,37	0,31	3,50E+07	17,37	0,31
2	4,90E+07	17,71	0,46	4,90E+07	17,71	0,34	5,70E+07	17,86	0,49
3	4,93E+07	17,71	0,01	4,80E+07	17,69	-0,02	5,90E+07	17,89	0,03
4	4,97E+07	17,72	0,01	4,90E+07	17,71	0,02	6,25E+07	17,95	0,06
5	5,36E+07	17,80	0,08	6,03E+07	17,91	0,21	6,54E+07	18,00	0,05
6	5,90E+07	17,89	0,10	7,42E+07	18,12	0,21	7,55E+07	18,14	0,14
7	6,94E+07	18,06	0,16	7,50E+07	18,13	0,01	7,75E+07	18,17	0,03
8	7,62E+07	18,15	0,09	7,63E+07	18,15	0,02	7,86E+07	18,18	0,01
9	9,23E+07	18,34	0,19	7,83E+07	18,18	0,03	8,65E+07	18,28	0,10
10	8,65E+07	18,28	-0,06	8,75E+07	18,29	0,11	9,13E+07	18,33	0,05
11	8,87E+07	18,30	0,03	8,83E+07	18,30	0,01	9,50E+07	18,37	0,04
12	9,50E+07	18,37	0,07	9,50E+07	18,37	0,07	1,10E+08	18,52	0,15
13	1,10E+08	18,52	0,15	1,12E+08	18,53	0,16	1,15E+08	18,56	0,04
14	1,26E+08	18,65	0,14	1,17E+08	18,58	0,04	1,20E+08	18,60	0,04
15	1,16E+08	18,57	-0,08	1,15E+08	18,56	-0,02	1,05E+08	18,47	-0,13
16	1,02E+08	18,44	-0,13	1,04E+08	18,46	-0,10	1,14E+08	18,55	0,08
17	1,04E+08	18,46	0,02	1,17E+08	18,58	0,12	1,25E+08	18,64	0,09

**Πίνακας 5.** Κινητική καλλιέργειας **NAB 6** - Trebouxiophyceae, Κυμάσι – Μαντουδίου (Αιγαίο Πέλαγος).

ΗΜΕΡΕΣ	ΦΙΑΛΗ 1	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 2	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 3	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ
0	5,36E+07	17,80	0,00	5,36E+07	17,80	0,00	5,36E+07	17,80	0,00
1	5,97E+07	17,90	0,11	6,54E+07	18,00	0,20	7,05E+07	18,07	0,27
2	8,32E+07	18,24	0,33	9,00E+07	18,32	0,32	1,00E+08	18,42	0,35
3	9,58E+07	18,38	0,14	1,08E+08	18,50	0,18	1,15E+08	18,56	0,14
4	9,78E+07	18,40	0,02	1,13E+08	18,54	0,05	1,16E+08	18,57	0,01
5	1,06E+08	18,48	0,08	1,36E+08	18,73	0,19	1,17E+08	18,58	0,01
6	1,34E+08	18,71	0,23	1,45E+08	18,79	0,06	1,48E+08	18,81	0,24
7	1,65E+08	18,92	0,21	1,66E+08	18,93	0,14	1,69E+08	18,95	0,13
8	1,68E+08	18,94	0,02	1,93E+08	19,08	0,15	1,96E+08	19,09	0,15
9	1,94E+08	19,08	0,14	2,10E+08	19,16	0,08	2,27E+08	19,24	0,15
10	2,20E+08	19,21	0,13	2,13E+08	19,18	0,01	2,35E+08	19,28	0,03
11	2,49E+08	19,33	0,12	2,30E+08	19,25	0,08	2,48E+08	19,33	0,05
12	2,52E+08	19,34	0,01	2,45E+08	19,32	0,06	2,59E+08	19,37	0,04
13	2,60E+08	19,38	0,03	2,68E+08	19,41	0,09	2,70E+08	19,41	0,04
14	2,69E+08	19,41	0,03	2,77E+08	19,44	0,03	2,84E+08	19,46	0,05
15	2,97E+08	19,51	0,10	2,91E+08	19,49	0,05	2,95E+08	19,50	0,04
16	3,10E+08	19,55	0,04	2,95E+08	19,50	0,01	3,08E+08	19,55	0,04
17	3,16E+08	19,57	0,02	3,17E+08	19,57	0,07	3,25E+08	19,60	0,05
18	3,22E+08	19,59	0,02	3,36E+08	19,63	0,06	3,47E+08	19,66	0,07

**Πίνακας 6.** Κινητική καλλιέργειας **NAB 8** – *Pavlova* sp, Κυμάσι – Μαντουδίου, (Αιγαίο Πέλαγος).

ΗΜΕΡΕΣ	ΦΙΑΛΗ 1	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 2	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 3	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ
0	5,04E+05	13,13	0,00	5,04E+05	13,13	0,00	5,04E+05	13,13	0,00
1	5,46E+05	13,21	0,08	5,06E+05	13,13	0,00	5,04E+05	13,13	0,00
2	4,26E+05	12,96	-0,25	3,14E+05	12,66	-0,48	3,16E+05	12,66	-0,47
3	2,43E+05	12,40	-0,56	2,37E+05	12,38	-0,28	2,50E+05	12,43	-0,23
4	4,48E+05	13,01	0,61	6,39E+05	13,37	0,99	6,77E+05	13,42	1,00
5	6,80E+05	13,43	0,42	7,54E+05	13,53	0,17	1,26E+06	14,05	0,62
6	1,02E+06	13,84	0,41	1,10E+06	13,91	0,38	1,45E+06	14,19	0,14
7	1,53E+06	14,24	0,41	1,56E+06	14,26	0,35	1,68E+06	14,33	0,15
8	2,15E+06	14,58	0,34	2,09E+06	14,55	0,29	2,14E+06	14,58	0,24
9	2,59E+06	14,77	0,19	2,32E+06	14,66	0,10	2,32E+06	14,66	0,08
10	2,55E+06	14,75	-0,02	2,45E+06	14,71	0,05	2,42E+06	14,70	0,04
11	2,54E+06	14,75	0,00	2,49E+06	14,73	0,02	2,43E+06	14,70	0,00

**Πίνακας 7.** Κινητική καλλιέργειας **NAB 9** – *Pyramimonas* sp, Κυμάσι – Μαντουδίου (Αιγαίο Πέλαγος).

ΗΜΕΡΕΣ	ΦΙΑΛΗ 1	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 2	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 3	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ
0	1,93E+06	14,47	0,00	1,93E+06	14,47	0,00	1,93E+06	14,47	0,00
1	1,98E+06	14,50	0,03	2,08E+06	14,55	0,08	2,04E+06	14,53	0,06
2	2,03E+06	14,52	0,02	2,03E+06	14,52	-0,02	2,02E+06	14,52	-0,01
3	2,14E+06	14,58	0,05	2,04E+06	14,53	0,01	2,10E+06	14,56	0,04
4	2,16E+06	14,58	0,01	2,21E+06	14,61	0,08	2,11E+06	14,56	0,00
5	2,17E+06	14,59	0,01	2,18E+06	14,59	-0,01	2,38E+06	14,68	0,12
6	2,79E+06	14,84	0,25	2,79E+06	14,84	0,25	2,55E+06	14,75	0,07
7	2,98E+06	14,91	0,07	2,87E+06	14,87	0,03	2,76E+06	14,83	0,08
8	3,65E+06	15,11	0,20	3,50E+06	15,07	0,20	3,28E+06	15,00	0,17
9	3,85E+06	15,16	0,05	3,72E+06	15,13	0,06	3,83E+06	15,16	0,16
10	4,01E+06	15,20	0,04	4,22E+06	15,26	0,13	4,08E+06	15,22	0,06
11	4,10E+06	15,23	0,02	4,20E+06	15,25	0,00	4,15E+06	15,24	0,02
12	4,25E+06	15,26	0,04	4,21E+06	15,25	0,00	4,30E+06	15,27	0,04
13	4,30E+06	15,27	0,01	4,55E+06	15,33	0,08	4,25E+06	15,26	-0,01
14	4,45E+06	15,31	0,03	4,48E+06	15,32	-0,02	4,28E+06	15,27	0,01

**Πίνακας 8.** Κινητική καλλιέργειας **NAB 12** – *Coccolithophyceae*, Κυμάσι – Μαντουδίου (Αιγαίο Πέλαγος).

ΗΜΕΡΕΣ	ΦΙΑΛΗ 1	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 2	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 3	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ
0	3,56E+05	12,78	0,00	3,56E+05	12,78	0,00	3,56E+05	12,78	0,00
1	2,93E+05	12,59	-0,19	3,05E+05	12,63	-0,15	3,75E+05	12,83	0,05
2	2,25E+05	12,32	-0,26	2,64E+05	12,48	-0,14	3,12E+05	12,65	-0,18
3	2,90E+05	12,58	0,25	2,05E+05	12,23	-0,25	2,50E+05	12,43	-0,22
4	3,93E+05	12,88	0,30	3,07E+05	12,63	0,40	3,57E+05	12,78	0,36
5	4,57E+05	13,03	0,15	4,52E+05	13,02	0,39	4,87E+05	13,10	0,31
6	5,40E+05	13,20	0,17	5,98E+05	13,30	0,28	6,17E+05	13,33	0,24
7	6,60E+05	13,40	0,20	6,27E+05	13,35	0,05	6,73E+05	13,42	0,09
8	6,70E+05	13,42	0,02	6,68E+05	13,41	0,06	6,80E+05	13,43	0,01
9	6,90E+05	13,44	0,03	6,70E+05	13,42	0,00	7,00E+05	13,46	0,03
10	7,10E+05	13,47	0,03	6,72E+05	13,42	0,00	7,20E+05	13,49	0,03
11	7,46E+05	13,52	0,05	6,78E+05	13,43	0,01	7,26E+05	13,50	0,01
12	7,55E+05	13,53	0,01	7,20E+05	13,49	0,06	7,20E+05	13,49	-0,01
13	7,68E+05	13,55	0,02	7,42E+05	13,52	0,03	6,95E+05	13,45	-0,04
14	7,77E+05	13,56	0,01	7,62E+05	13,54	0,03	6,33E+05	13,36	-0,09
15	7,12E+05	13,48	-0,09	7,22E+05	13,49	-0,05	6,38E+05	13,37	0,01
16	7,50E+05	13,53	0,05	7,52E+05	13,53	0,04	7,25E+05	13,49	0,13
17	7,90E+05	13,58	0,05	8,33E+05	13,63	0,10	7,40E+05	13,51	0,02
18	9,50E+05	13,76	0,18	8,70E+05	13,68	0,04	8,20E+05	13,62	0,10

**ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗ  
ΜΕΤΡΗΣΗ ΞΗΡΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΚΑΙ ΛΙΠΑΡΩΝ**

**Πίνακας 9.** Κινητική καλλιέργειας **NAB 4(A), sp. 1** (*Tetraselmis* sp.), Άγιος Κοσμάς (Σαρωνικός κόλπος).

ΗΜΕΡΕΣ	ΦΙΑΛΗ 1	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 2	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 3	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ
0	3,20E+05	12,68	0,00	3,06E+05	12,63	0,00	3,01E+05	12,61	0,00
1	3,16E+05	12,66	-0,01	2,71E+05	12,51	-0,12	3,38E+05	12,73	0,12
2	3,78E+05	12,84	0,18	4,70E+05	13,06	0,55	4,85E+05	13,09	0,36
3	4,70E+05	13,06	0,22	4,00E+05	12,90	-0,16	4,64E+05	13,05	-0,04
4	5,75E+05	13,26	0,20	4,17E+05	12,94	0,04	4,24E+05	12,96	-0,09
5	6,50E+05	13,38	0,12	5,10E+05	13,14	0,20	5,14E+05	13,15	0,19
6	7,80E+05	13,57	0,18	6,03E+05	13,31	0,17	5,51E+05	13,22	0,07
7	8,63E+05	13,67	0,10	6,87E+05	13,44	0,25	6,85E+05	13,44	0,24
8	1,05E+06	13,86	0,19	4,97E+05	13,12	-0,32	5,54E+05	13,23	-0,21
9	1,04E+06	13,85	-0,01	6,36E+05	13,36	0,25	4,49E+05	13,01	-0,21
10	1,32E+06	14,09	0,24	6,37E+05	13,36	0,00	5,61E+05	13,24	0,22
11	<b>1,40E+06</b>	14,15	0,06	6,86E+05	13,44	0,07	5,33E+05	13,19	-0,05
12				7,56E+05	13,54	0,10	5,99E+05	13,30	0,12
13				8,12E+05	13,61	0,07	6,41E+05	13,37	0,07
14				<b>8,47E+05</b>	13,65	0,04	<b>6,37E+05</b>	13,36	-0,01
15									

**Πίνακας 10.** Κινητική καλλιέργειας **NAB 4(A), sp. 2** (Trebouxiophyceae), Άγιος Κοσμάς (Σαρωνικός κόλπος).

ΗΜΕΡΕΣ	ΦΙΑΛΗ 1	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 2	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 3	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ
0	4,64E+05	13,05	0,00	4,30E+05	12,97	0,00	3,10E+05	12,64	0,00
1	7,20E+05	13,49	0,44	6,17E+05	13,33	0,36	4,05E+05	12,91	0,27
2	7,83E+05	13,57	0,08	5,43E+05	13,20	-0,13	5,05E+05	13,13	0,22
3	8,68E+05	13,67	0,10	7,53E+05	13,53	0,33	4,41E+05	13,00	-0,14
4	9,17E+05	13,73	0,05	6,54E+05	13,39	-0,14	4,37E+05	12,99	-0,01
5	9,86E+05	13,80	0,07	7,75E+05	13,56	0,17	6,07E+05	13,32	0,33
6	1,12E+06	13,92	0,12	8,33E+05	13,63	0,07	8,54E+05	13,66	0,34
7	1,73E+06	14,36	0,32	1,03E+06	13,85	0,23	9,57E+05	13,77	0,39
8	2,02E+06	14,52	0,16	9,22E+05	13,73	-0,11	8,60E+05	13,66	-0,11
9	1,92E+06	14,47	-0,05	1,21E+06	14,01	0,27	8,60E+05	13,66	0,00
10	2,44E+06	14,71	0,24	1,37E+06	14,13	0,12	9,10E+05	13,72	0,06
11	<b>2,53E+06</b>	14,74	0,04	1,67E+06	14,33	0,20	1,01E+06	13,83	0,11
12				1,97E+06	14,49	0,17	1,18E+06	13,98	0,15
13				2,00E+06	14,51	0,02	1,26E+06	14,04	0,06
14				<b>2,08E+06</b>	14,55	0,04	<b>1,31E+06</b>	14,09	0,04

**Πίνακας 11.** Κινητική καλλιέργειας **NAB 4(B)** – *Tetraselmis* sp., Άγιος Κοσμάς (Σαρωνικός κόλπος).

ΗΜΕΡΕΣ	ΦΙΑΛΗ 1	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 2	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 3	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ
<b>0</b>	2,61E+05	12,47	0,00	2,55E+05	12,45	0,00	2,98E+05	12,60	0,00
<b>1</b>	3,42E+05	12,74	0,27	3,41E+05	12,74	0,29	4,36E+05	12,98	0,38
<b>2</b>	4,23E+05	12,95	0,21	4,28E+05	12,97	0,23	6,03E+05	13,31	0,33
<b>3</b>	4,70E+05	13,06	0,11	5,14E+05	13,15	0,18	7,71E+05	13,56	0,25
<b>4</b>	4,92E+05	13,11	0,12	6,63E+05	13,40	0,22	1,07E+06	13,88	0,30
<b>5</b>	6,24E+05	13,34	0,24	9,03E+05	13,71	0,31	1,04E+06	13,85	-0,03
<b>6</b>	6,43E+05	13,37	0,03	1,02E+06	13,83	0,12	1,17E+06	13,97	0,11
<b>7</b>	7,91E+05	13,58	0,21	9,50E+05	13,76	-0,07	1,06E+06	13,87	-0,10
<b>8</b>	8,48E+05	13,65	0,07	<b>9,50E+05</b>	13,76	0,00	<b>1,06E+06</b>	13,87	0,00
<b>9</b>	9,04E+05	13,72	0,06						
<b>10</b>	1,00E+06	13,82	0,10						
<b>11</b>	<b>1,12E+06</b>	13,93	0,11						

**Πίνακας 12.** Κινητική καλλιέργειας **NAB 3** - *Trebouxiophyceae*, Λίμνη Ευβοίας (Ευβοϊκός κόλπος).

ΗΜΕΡΕΣ	ΦΙΑΛΗ 1	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 2	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 3	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ
0	2,90E+07	17,18	0,00	2,90E+07	17,18	0,00	2,90E+07	17,18	0,00
1	3,70E+07	17,43	0,24	3,80E+07	17,45	0,27	4,10E+07	17,53	0,35
2	6,00E+07	17,91	0,48	6,10E+07	17,93	0,47	6,20E+07	17,94	0,41
3	6,50E+07	17,99	0,08	6,20E+07	17,94	0,02	7,20E+07	18,09	0,15
4	7,26E+07	18,10	0,11	6,50E+07	17,99	0,05	8,25E+07	18,23	0,14
5	8,05E+07	18,20	0,10	8,05E+07	18,20	0,21	9,75E+07	18,40	0,17
6	9,48E+07	18,37	0,16	9,13E+07	18,33	0,13	1,09E+08	18,51	0,11
7	1,13E+08	18,54	0,18	9,83E+07	18,40	0,07	1,29E+08	18,68	0,17
8	1,07E+08	18,49	-0,05	1,10E+08	18,52	0,11	1,29E+08	18,68	0,00
9	1,50E+08	18,83	0,34	1,26E+08	18,65	0,14	1,31E+08	18,69	0,02
10	1,56E+08	18,87	0,04	1,29E+08	18,68	0,02	1,63E+08	18,91	0,22
11	1,79E+08	19,00	0,14	2,11E+08	19,17	0,49	1,46E+08	18,80	-0,11
12	1,90E+08	19,06	0,06	2,12E+08	19,17	0,00	1,90E+08	19,06	0,26
13	2,10E+08	19,16	0,10	2,13E+08	19,18	0,00	2,10E+08	19,16	0,10
14	2,24E+08	19,23	0,06	2,14E+08	19,18	0,00	2,44E+08	19,31	0,15
15	2,09E+08	19,16	-0,07	2,57E+08	19,36	0,18	1,80E+08	19,01	-0,30
16	2,37E+08	19,28	0,12	2,60E+08	19,38	0,01	2,17E+08	19,20	0,19
17	2,40E+08	19,29	0,01	2,40E+08	19,30	-0,08	2,32E+08	19,26	0,06

**Πίνακας 13.** Κινητική καλλιέργειας **NAB 7** – *Nannochloropsis* sp., Λίμνη Ευβοίας (Ευβοϊκός κόλπος).

ΗΜΕΡΕΣ	ΦΙΑΛΗ 1	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 2	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 3	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ
0	2,08E+07	16,85	0,00	2,33E+07	16,97	0,00	2,50E+07	17,03	0,00
1	3,20E+07	17,28	0,43	3,12E+07	17,26	0,29	3,10E+07	17,25	0,21
2	3,70E+07	17,43	0,15	3,41E+07	17,34	0,09	3,15E+07	17,27	0,02
3	3,90E+07	17,48	0,05	3,69E+07	17,42	0,08	3,29E+07	17,31	0,04
4	4,02E+07	17,51	0,08	3,89E+07	17,48	0,07	3,82E+07	17,46	0,07
5	4,20E+07	17,55	0,05	3,70E+07	17,43	-0,05	4,20E+07	17,55	0,09
6	4,72E+07	17,67	0,12	4,57E+07	17,64	0,21	4,50E+07	17,62	0,07
7	5,24E+07	17,77	0,10	4,67E+07	17,66	0,02	5,25E+07	17,78	0,15
8	5,01E+07	17,73	-0,04	5,75E+07	17,87	0,21	5,48E+07	17,82	0,04
9	5,28E+07	17,78	0,05	5,92E+07	17,90	0,03	5,96E+07	17,90	0,08
10	5,43E+07	17,81	0,03	6,38E+07	17,97	0,08	6,89E+07	18,05	0,15
11	<b>5,55E+07</b>	17,83	0,02	<b>6,85E+07</b>	18,04	0,07	<b>7,05E+07</b>	18,07	0,02

**Πίνακας 14.** Κινητική καλλιέργειας **NAB 6** – *Trebouxiophyceae*, Κυμάσι – Μαντουδίου (Αιγαίο Πέλαγος).

ΗΜΕΡΕΣ	ΦΙΑΛΗ 1	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 2	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 3	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ
0	6,44E+07	17,98	0,00	6,72E+07	18,02	0,00	6,94E+07	18,06	0,00
1	6,70E+07	18,02	0,04	6,95E+07	18,06	0,03	7,10E+07	18,08	0,02
2	8,50E+07	18,26	0,24	8,90E+07	18,30	0,25	8,80E+07	18,29	0,21
3	9,20E+07	18,34	0,08	9,48E+07	18,37	0,06	8,92E+07	18,31	0,01
4	1,00E+08	18,42	0,09	1,10E+08	18,52	0,15	1,07E+08	18,49	0,18
5	1,15E+08	18,56	0,14	1,25E+08	18,64	0,13	1,25E+08	18,64	0,16
6	1,25E+08	18,64	0,08	1,35E+08	18,72	0,08	1,38E+08	18,74	0,10
7	1,39E+08	18,75	0,11	1,51E+08	18,83	0,11	1,50E+08	18,83	0,08
8	1,42E+08	18,77	0,02	1,60E+08	18,89	0,06	1,60E+08	18,89	0,06
9	1,48E+08	18,81	0,04	1,65E+08	18,92	0,03	1,65E+08	18,92	0,03
10	1,53E+08	18,85	0,03	1,75E+08	18,98	0,06	1,71E+08	18,96	0,04



**Πίνακας 15.** Κινητική καλλιέργειας **NAB 8** – *Pavlova* sp., Κυμάσι – Μαντουδίου (Αιγαίο Πέλαγος).

ΗΜΕΡΕΣ	ΦΙΑΛΗ 1	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 2	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 3	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ
0	4,98E+05	13,12	0,00	4,98E+05	13,12	0,00	4,98E+05	13,12	0,00
1	3,50E+05	12,77	-0,35	3,80E+05	12,85	-0,27	3,65E+05	12,81	-0,31
2	2,80E+05	12,54	-0,22	2,95E+05	12,59	-0,25	3,00E+05	12,61	-0,20
3	3,00E+05	12,61	0,07	3,60E+05	12,79	0,20	4,05E+05	12,91	0,30
4	3,18E+05	12,67	0,06	4,15E+05	12,94	0,14	4,42E+05	13,00	0,09
5	4,14E+05	12,93	0,26	5,35E+05	13,19	0,25	7,06E+05	13,47	0,47
6	6,80E+05	13,43	0,50	6,10E+05	13,32	0,13	7,11E+05	13,47	0,01
7	6,86E+05	13,44	0,01	6,20E+05	13,34	0,02	1,11E+06	13,92	0,45
8	9,50E+05	13,76	0,33	9,80E+05	13,80	0,46	1,20E+06	14,00	0,08
9	1,00E+06	13,82	0,06	1,10E+06	13,91	0,12	1,28E+06	14,06	0,06
10	1,07E+06	13,88	0,06	1,22E+06	14,01	0,10	1,35E+06	14,12	0,05
11	1,10E+06	13,91	0,03	1,22E+06	14,01	0,00	1,38E+06	14,14	0,02
12	1,20E+06	14,00	0,09	1,35E+06	14,12	0,10	1,40E+06	14,15	0,01
13	1,34E+06	14,11	0,11	1,42E+06	14,17	0,05	1,45E+06	14,19	0,04

**Πίνακας 16.** Κινητική καλλιέργειας **NAB 9** – *Pyramimonas* sp., Κυμάσι – Μαντουδίου (Αιγαίο Πέλαγος).

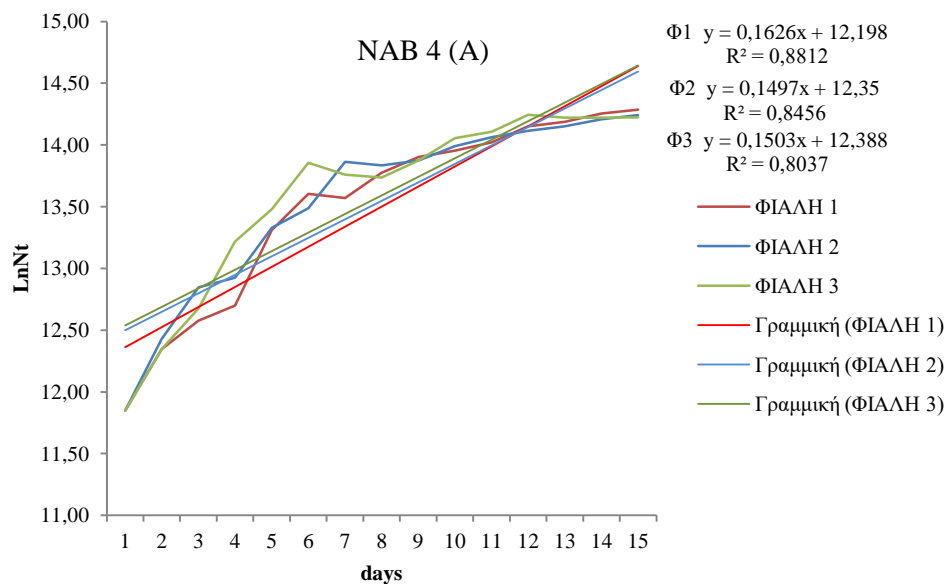
ΗΜΕΡΕΣ	ΦΙΑΛΗ 1	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 2	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 3	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ
0	2,23E+06	14,62	0,00	2,23E+06	14,62	0,00	2,23E+06	14,62	0,00
1	2,20E+06	14,60	-0,01	2,30E+06	14,65	0,03	2,15E+06	14,58	-0,03
2	2,23E+06	14,62	0,01	2,33E+06	14,66	0,01	2,17E+06	14,59	0,01
3	2,34E+06	14,67	0,05	2,34E+06	14,66	0,00	2,18E+06	14,59	0,00
4	2,35E+06	14,67	0,00	2,47E+06	14,72	0,06	2,18E+06	14,59	0,00
5	2,37E+06	14,68	0,01	2,55E+06	14,75	0,03	2,55E+06	14,75	0,16
6	2,49E+06	14,73	0,05	3,23E+06	14,99	0,24	3,77E+06	15,14	0,39
7	3,08E+06	14,94	0,21	3,44E+06	15,05	0,06	4,02E+06	15,21	0,06
8	3,45E+06	15,05	0,11	3,85E+06	15,16	0,11	4,12E+06	15,23	0,02
9	3,80E+06	15,15	0,10	4,29E+06	15,27	0,11	4,20E+06	15,25	0,02
10	4,17E+06	15,24	0,09	4,67E+06	15,36	0,08	4,27E+06	15,27	0,02

**Πίνακας 17.** Κινητική καλλιέργειας **NAB 12** – Coccolithophyceae, Κυμάσι – Μαντουδίου (Αιγαίο Πέλαγος).

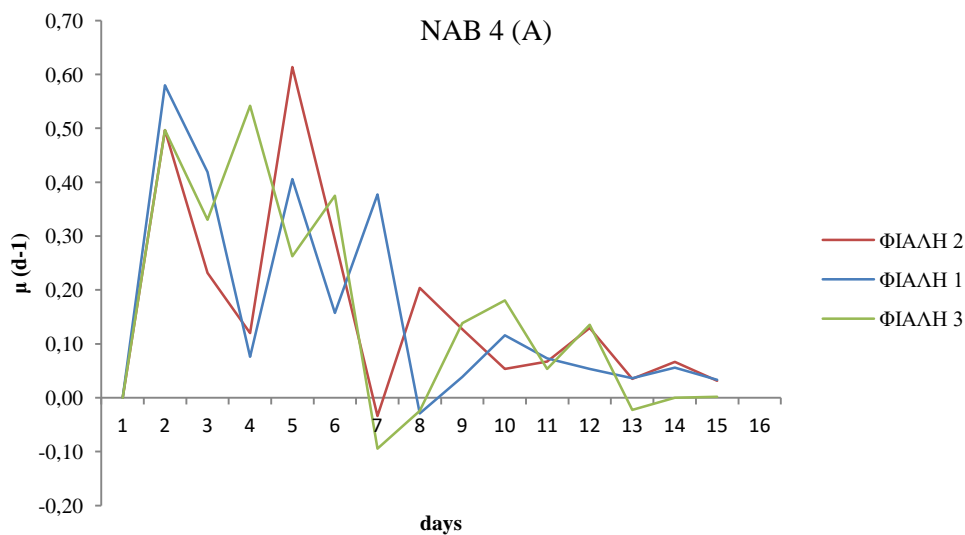
ΗΜΕΡΕΣ	ΦΙΑΛΗ 1	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 2	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ	ΦΙΑΛΗ 3	LN cells/ml	ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ
<b>0</b>	1,90E+05	12,15	0,00	1,74E+05	12,07	0,00	1,64E+05	12,01	0,00
<b>1</b>	2,00E+05	12,21	0,05	2,00E+05	12,21	0,14	1,90E+05	12,15	0,15
<b>2</b>	2,60E+05	12,47	0,26	2,20E+05	12,30	0,10	2,20E+05	12,30	0,15
<b>3</b>	3,18E+05	12,67	0,20	2,82E+05	12,55	0,25	2,27E+05	12,33	0,03
<b>4</b>	3,26E+05	12,69	0,03	2,88E+05	12,57	0,02	2,56E+05	12,45	0,12
<b>5</b>	3,30E+05	12,71	0,01	3,19E+05	12,67	0,10	3,45E+05	12,75	0,30
<b>6</b>	3,30E+05	12,71	0,00	3,63E+05	12,80	0,13	3,76E+05	12,84	0,09
<b>7</b>	3,22E+05	12,68	-0,02	3,78E+05	12,84	0,04	4,06E+05	12,91	0,08
<b>8</b>	3,56E+05	12,78	0,10	3,75E+05	12,83	-0,01	4,00E+05	12,90	-0,01
<b>9</b>	3,85E+05	12,86	0,08	3,70E+05	12,82	-0,01	4,01E+05	12,90	0,00
<b>10</b>	<b>3,97E+05</b>	12,89	0,03	<b>3,68E+05</b>	12,82	-0,01	<b>4,05E+05</b>	12,91	0,01

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ – ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

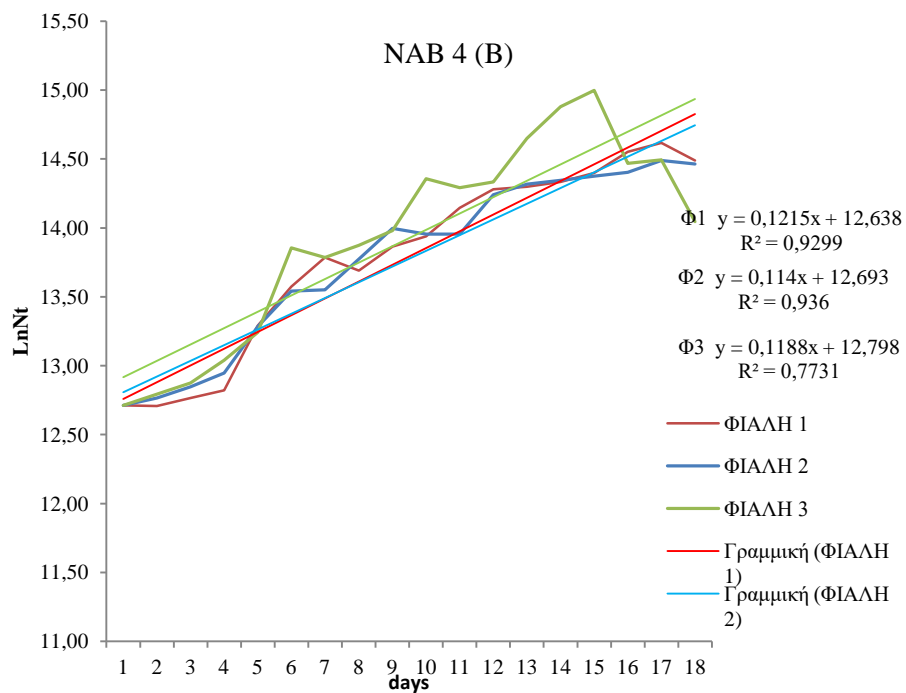
### Πείραμα καλλιέργειας – Λιμάνι Αγίου Κοσμά (Σαρωνικός κόλπος)



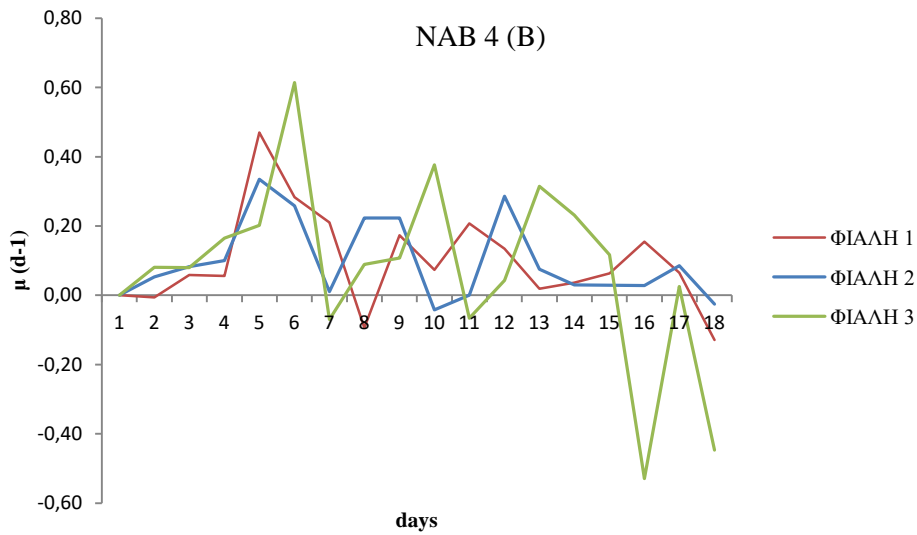
**Διάγραμμα 1.** N (LN cells / ml) της καλλιέργειας NAB 4(A), Αγ. Κοσμάς.



**Διάγραμμα 2.** Ρυθμός αύξησης καλλιέργειας NAB 4(A), Αγ. Κοσμάς.

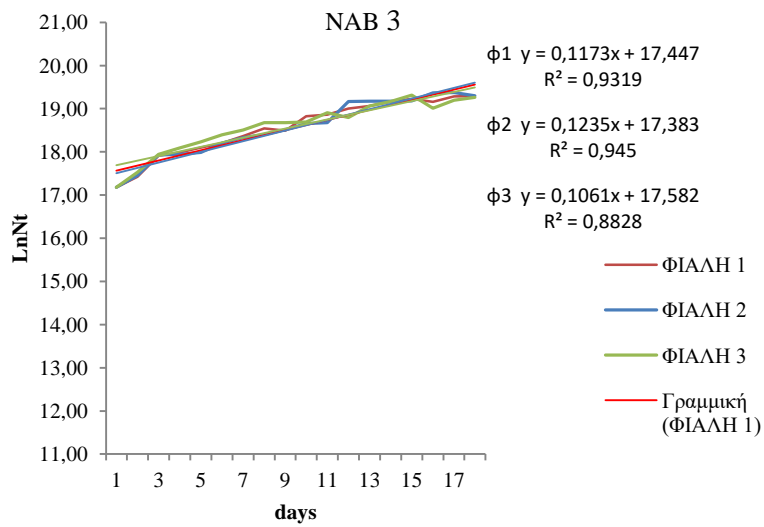


**Διάγραμμα 3.** N (LN cells / ml) της καλλιέργειας NAB (B), Αγ. Κοσμάς.

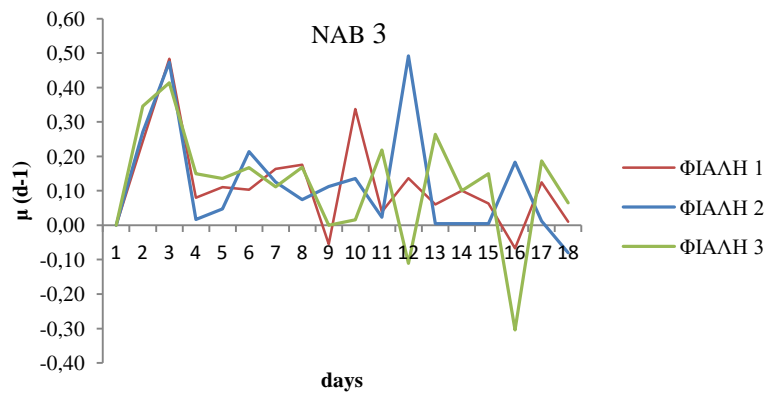


**Διάγραμμα 4.** Ρυθμός αύξησης καλλιέργειας NAB 4 (B), Αγ. Κοσμάς.

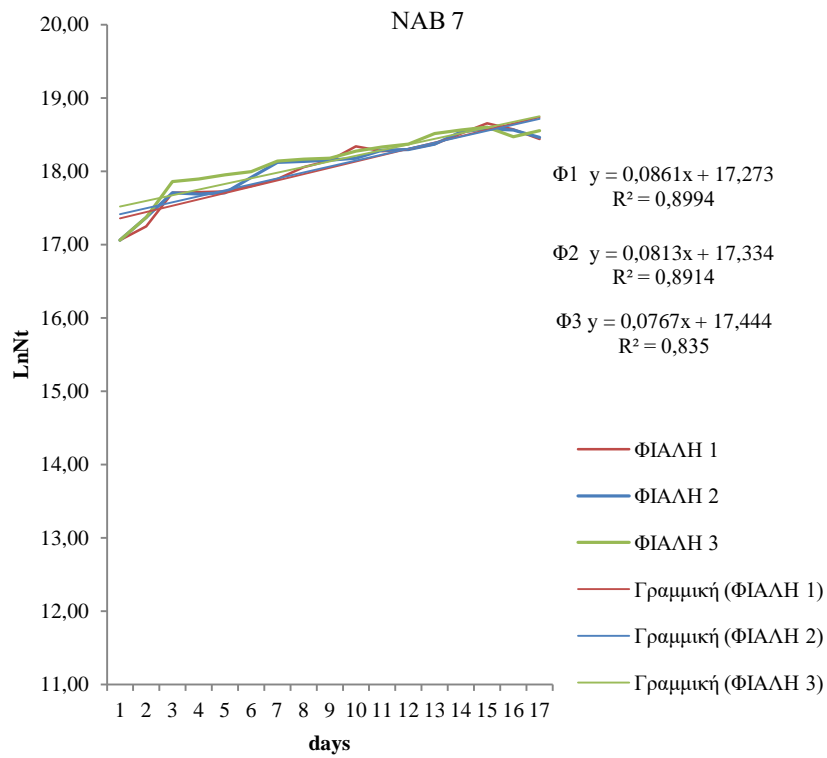
## Πείραμα καλλιέργειας – Λίμνη Ευβοίας (Ευβοϊκός κόλπος)



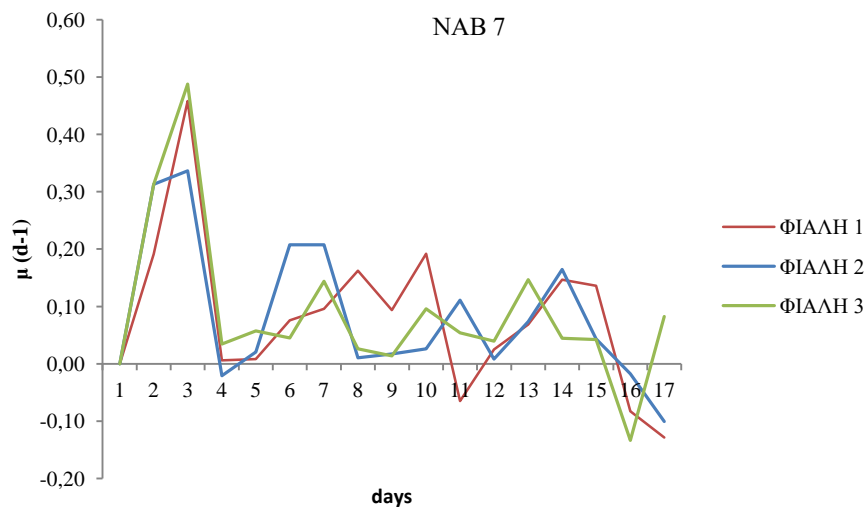
Διάγραμμα 5. N (LN cells / ml) της καλλιέργειας NAB 3, Λίμνη Ευβοίας.



Διάγραμμα 6. Ρυθμός αύξησης καλλιέργειας NAB 3, Λίμνη Ευβοίας.

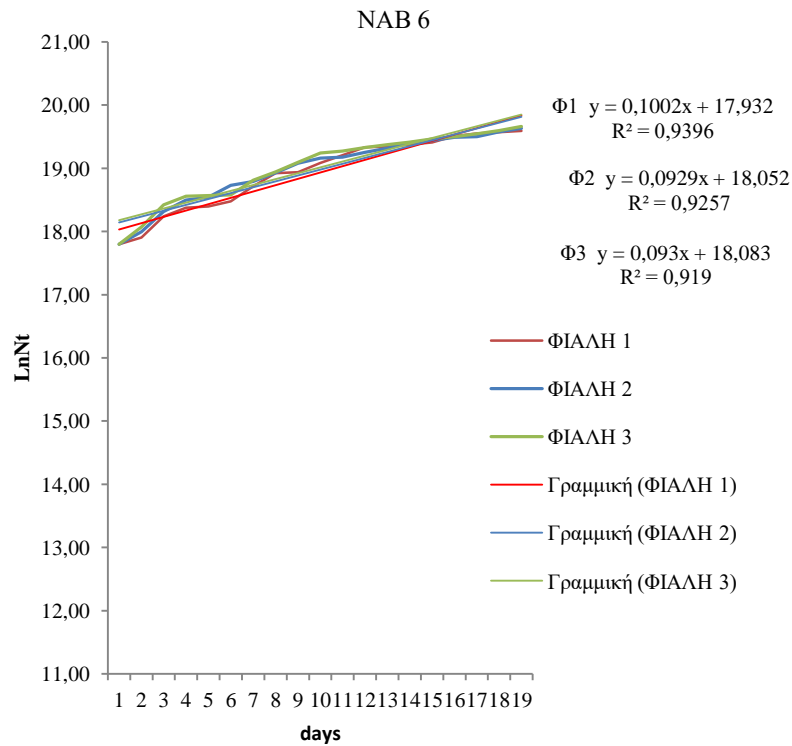


**Διάγραμμα 7.** N (LN cells / ml) της καλλιέργειας NAB 7, Λίμνη Ευβοίας.

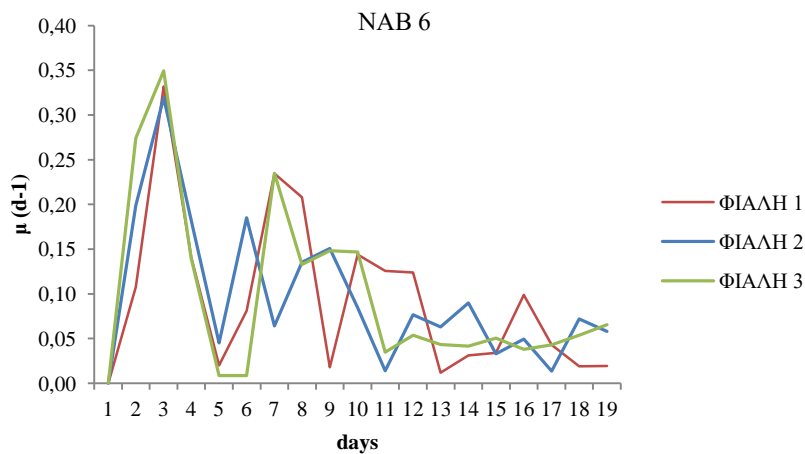


**Διάγραμμα 8.** Ρυθμός αύξησης καλλιέργειας NAB 7, Λίμνη Ευβοίας.

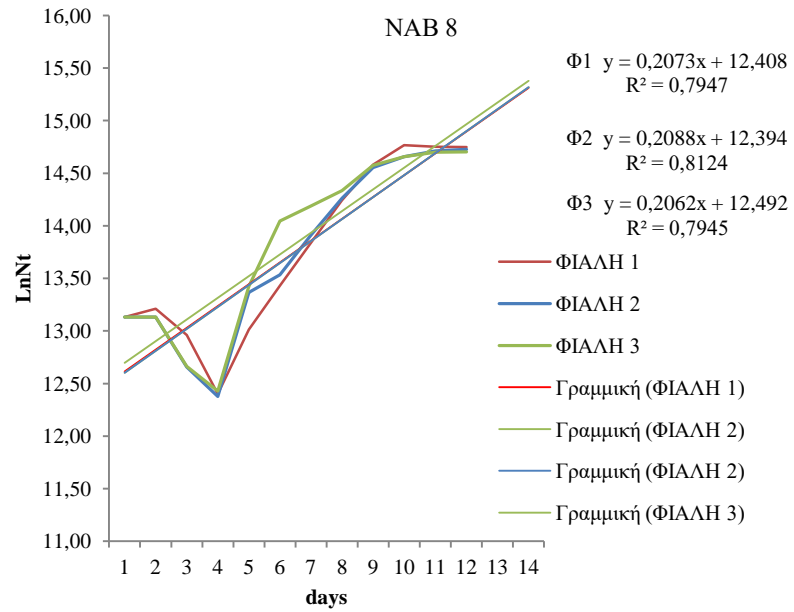
**Πείραμα καλλιέργειας – Κυμάσι – Μαντουδίου (Αιγαίο πέλαγος)**



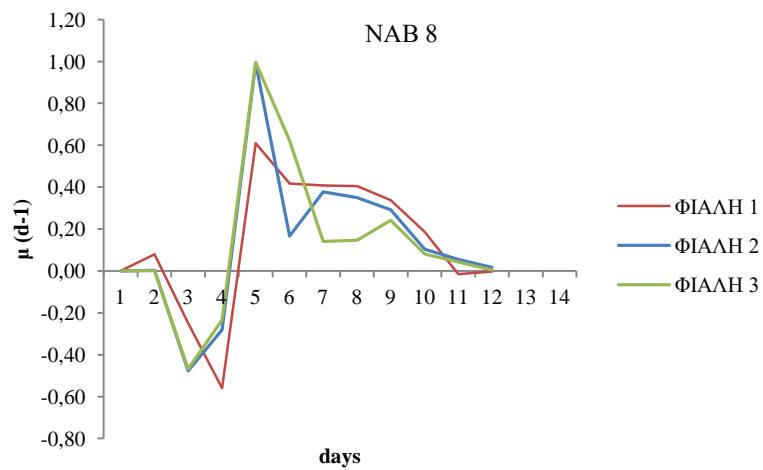
**Διάγραμμα 9.** N (LN cells / ml) της καλλιέργειας NAB 6, Κυμάσι – Μαντουδίου.



**Διάγραμμα 10.** Ρυθμός αύξησης καλλιέργειας NAB 6, Κυμάσι – Μαντουδίου.

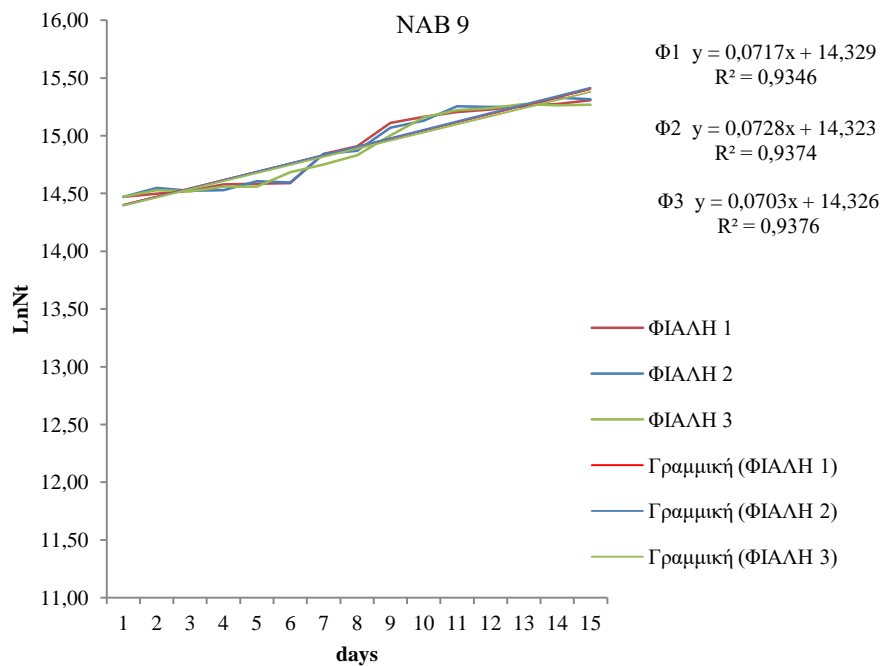


**Διάγραμμα 11.** N (LN cells / ml) της καλλιέργειας NAB 8, Κυμάσι – Μαντουδίου.

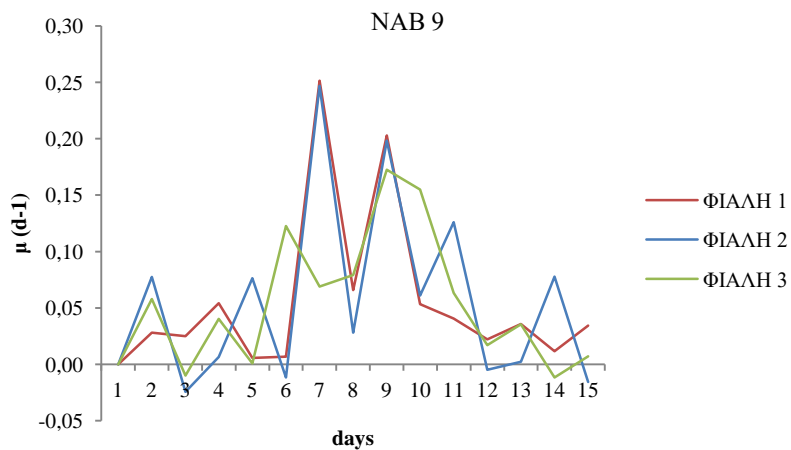


**Διάγραμμα 12.** Ρυθμός αύξησης καλλιέργειας NAB 8, Κυμάσι – Μαντουδίου.

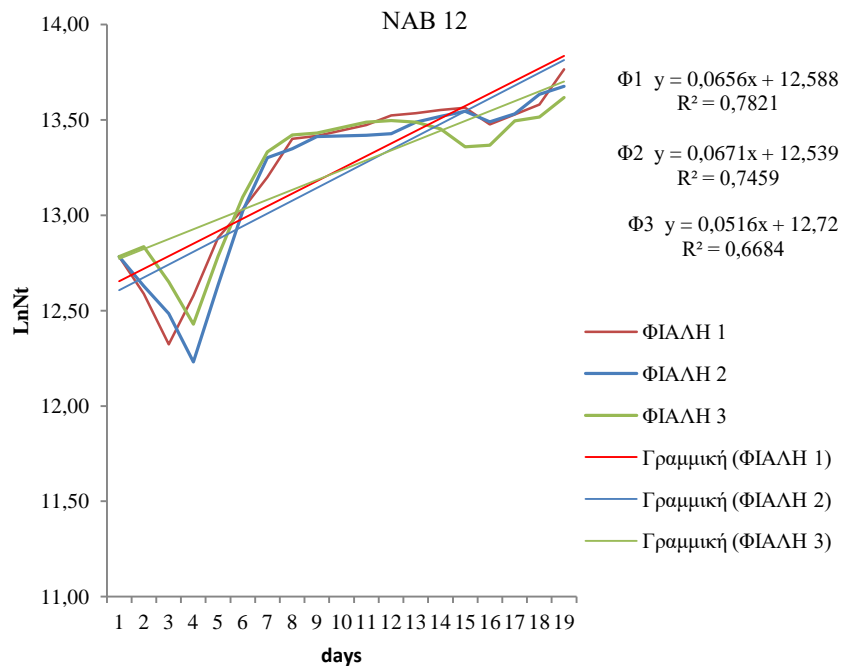




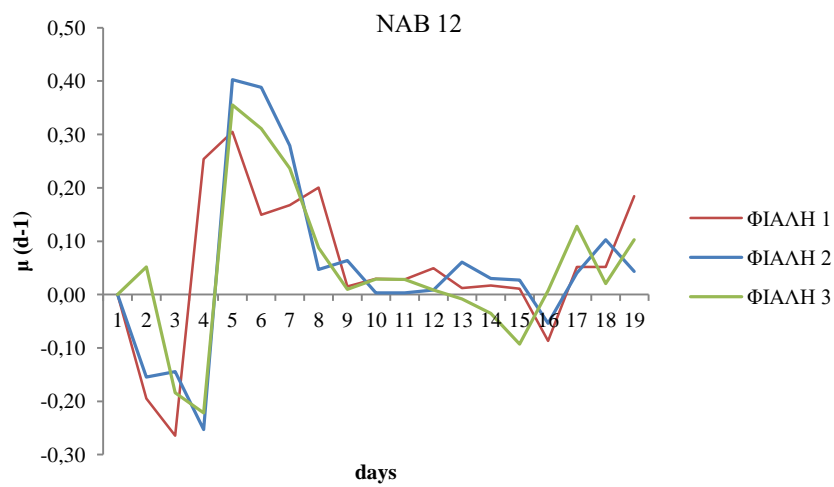
**Διάγραμμα 13.** N (LN cells / ml) της καλλιέργειας NAB 9, Κυμάσι – Μαντουδίου.



**Διάγραμμα 14.** Ρυθμός αύξησης καλλιέργειας NAB 9, Κυμάσι – Μαντουδίου.



**Διάγραμμα 15.** N (LN cells / ml) της καλλιέργειας NAB 12, Κυμάσι – Μαντουδίου.



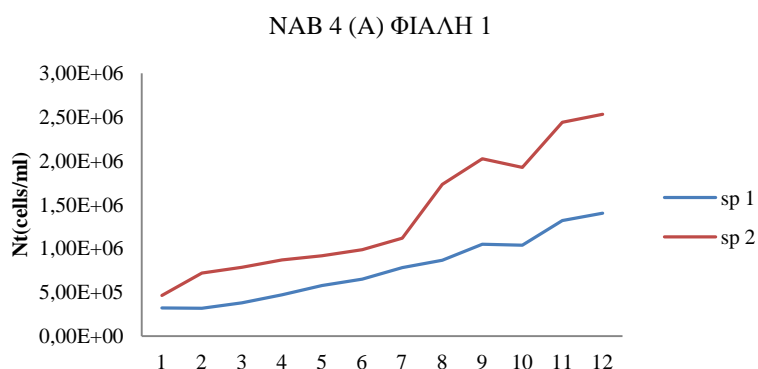
**Διάγραμμα 16.** Ρυθμός αύξησης καλλιέργειας NAB 12, Κυμάσι – Μαντουδίου.

## ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΞΗΡΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΚΑΙ ΛΙΠΑΡΩΝ

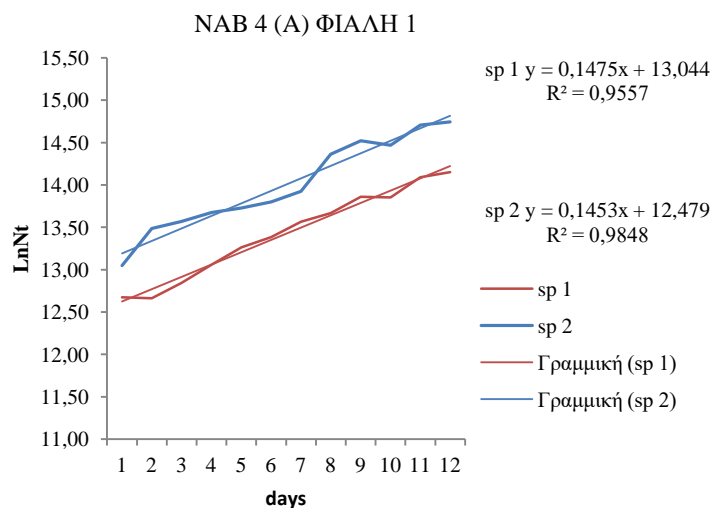
### Πείραμα καλλιέργειας – Λιμάνι Αγίου Κοσμά (Σαρωνικός κόλπος)

#### NAB 4 (A)

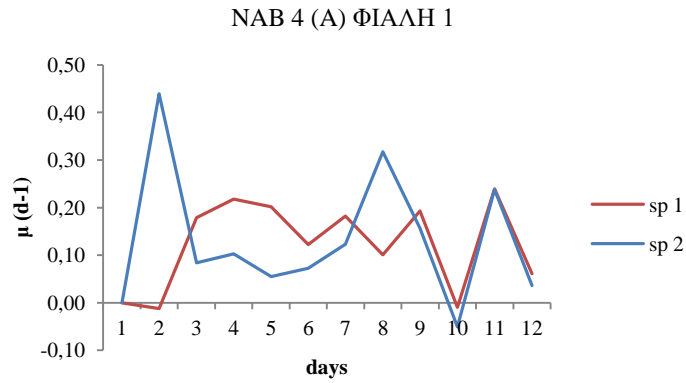
Στη 2<sup>η</sup> επανάληψη του πειράματος στη μικτή καλλιέργεια NAB 4(A), τα κυρίαρχα είδη ήταν 2. Το sp.1 ανήκει όπως και προηγουμένως στο γένος *Tetraselmis* και το sp. 2 ανήκει πιθανώς στην κλάση των *Trebouxiophyceae*.



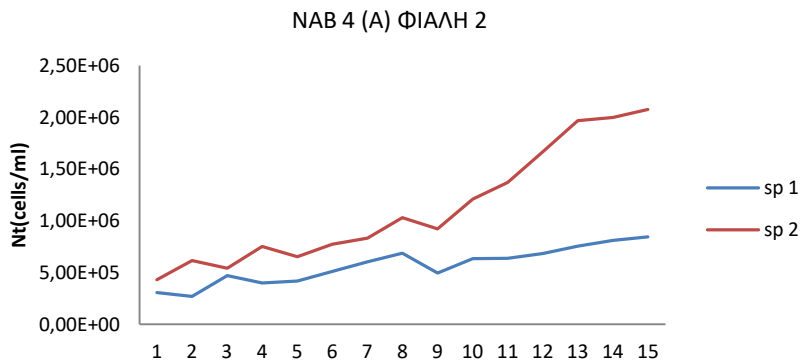
Διάγραμμα 17. Cells/ml καλλιέργειας NAB 4 (A), Φιάλη 1, Αγ. Κοσμάς.



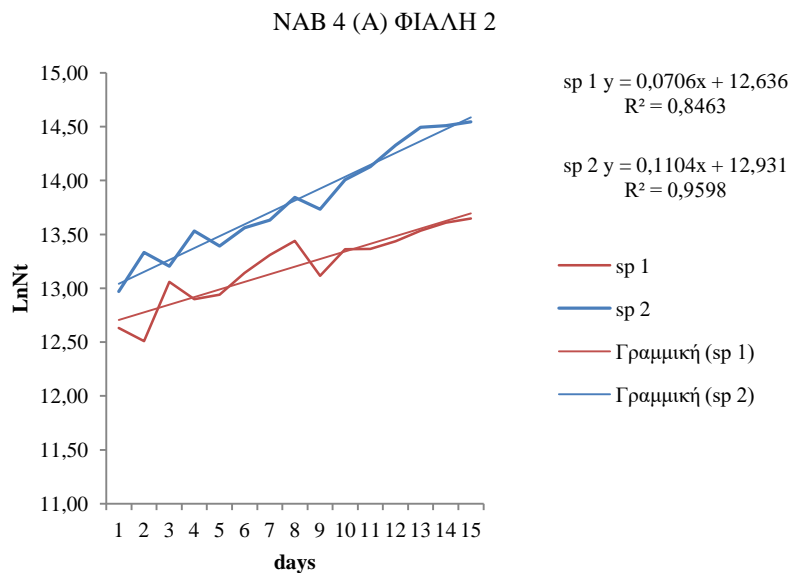
Διάγραμμα 18. N (LN cells / ml) της καλλιέργειας NAB 4 (A) της Φιάλης 1, Αγ. Κοσμάς.



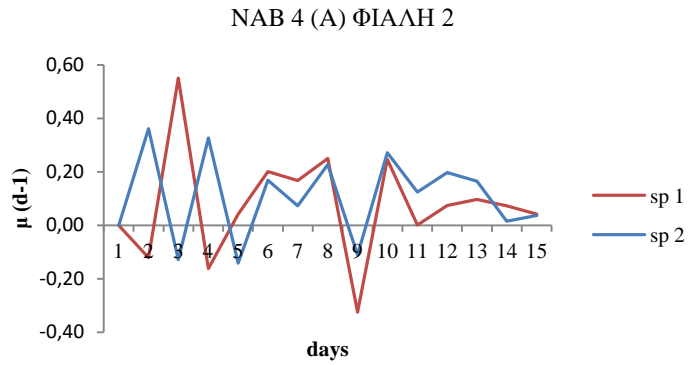
**Διάγραμμα 19.** Ρυθμός αύξησης καλλιέργειας NAB 4 (A), Φιάλη 1, Αγ. Κοσμάς.



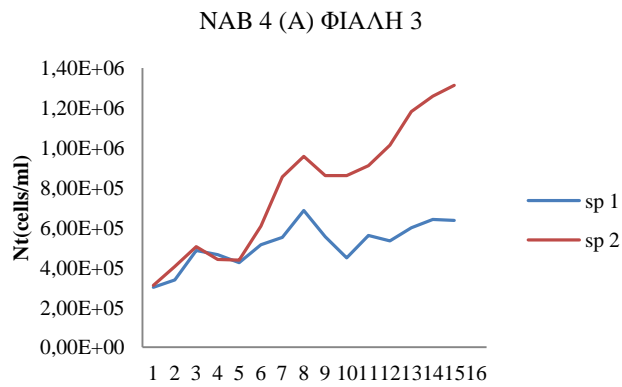
**Διάγραμμα 20.** Cells/ml καλλιέργειας NAB 4 (A), Φιάλη 2, Αγ. Κοσμάς.



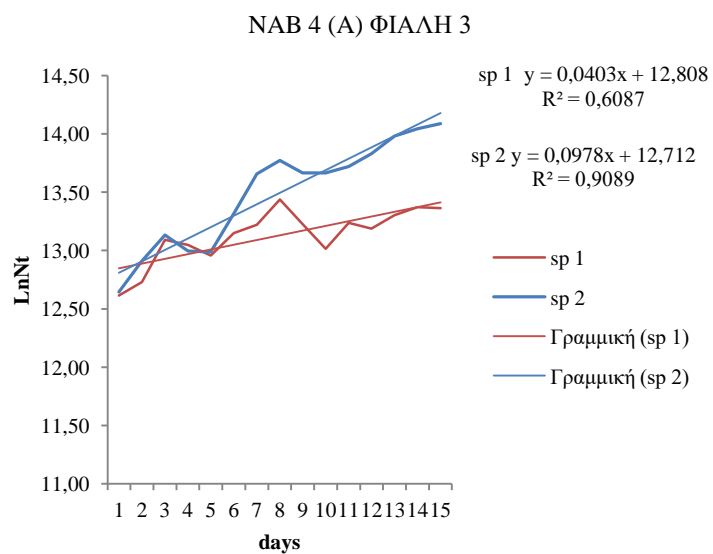
**Διάγραμμα 21.** N (LN cells / ml ) της καλλιέργειας NAB 4 (A) της Φιάλης 2, Αγ. Κοσμάς.



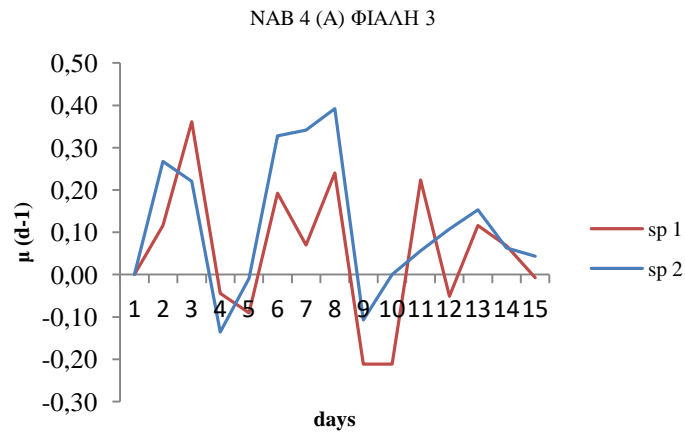
**Διάγραμμα 22.** Ρυθμός αύξησης καλλιέργειας NAB 4 (A), Φιάλη 2, Άγ. Κοσμάς.



**Διάγραμμα 23.** Cells/ml καλλιέργειας NAB 4 (A), Φιάλη 3, Άγ. Κοσμάς.



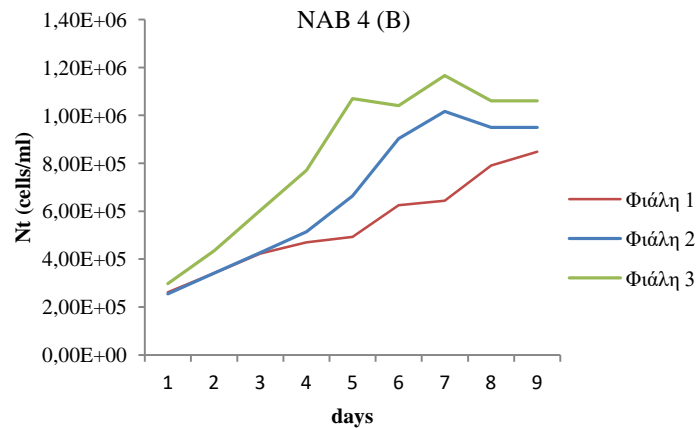
**Διάγραμμα 24.** N (LN cells / ml) της καλλιέργειας NAB 4 (A) της Φιάλης 3, Αγ. Κοσμάς.



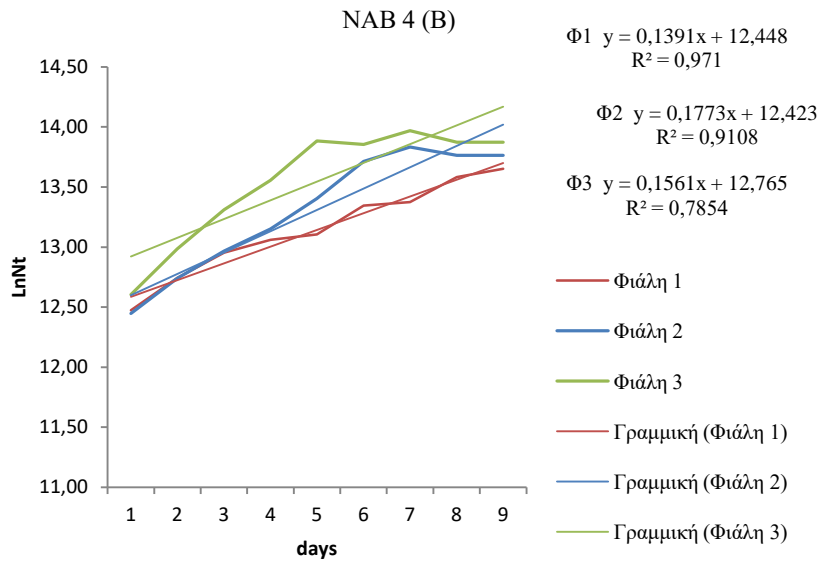
**Διάγραμμα 25.** Ρυθμός αύξησης καλλιέργειας NAB 4 (A), Φιάλη 3, Αγ. Κοσμάς.

### NAB 4 (B)

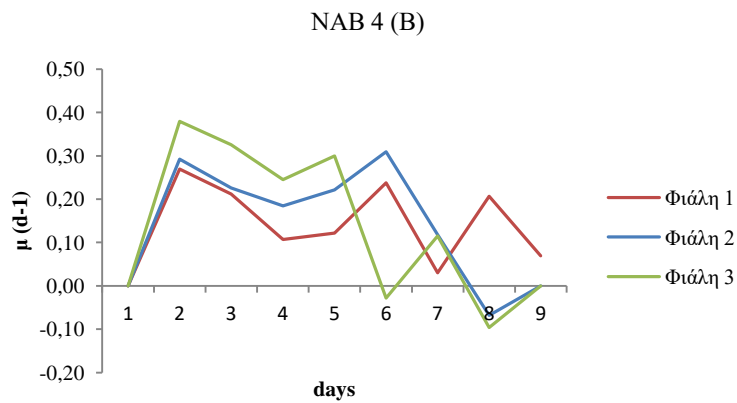
Στη 2<sup>η</sup> επανάληψη του πειράματος στη μικτή καλλιέργεια **NAB 4 (B)**, παραμένει το ίδιο κυρίαρχο είδος, το οποίο ανήκει στο γένος *Tetraselmis*.



**Διάγραμμα 26.** Cells/ml καλλιέργειας NAB 4 (B), Αγ. Κοσμάς.



**Διάγραμμα 27.** N (LN cells / ml) της καλλιέργειας NAB 4 (B), Αγ. Κοσμάς.

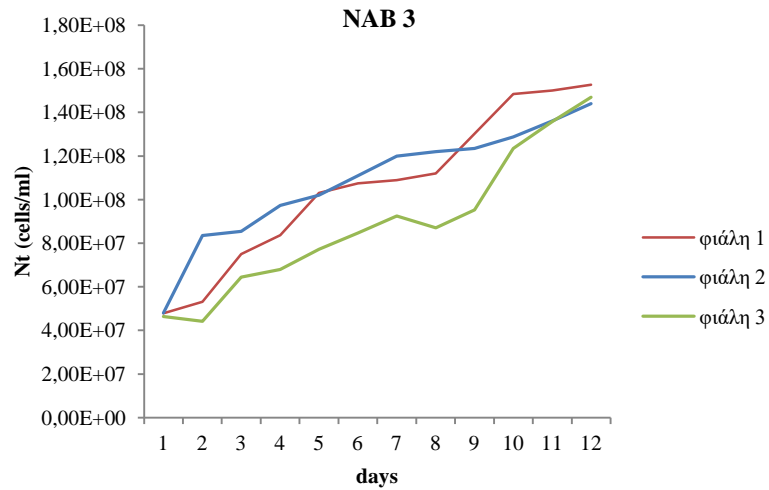


**Διάγραμμα 28.** Ρυθμός αύξησης καλλιέργειας NAB 4 (B), Αγ. Κοσμάς.

## Πείραμα καλλιέργειας – Λίμνη Ευβοίας (Ευβοϊκός κόλπος)

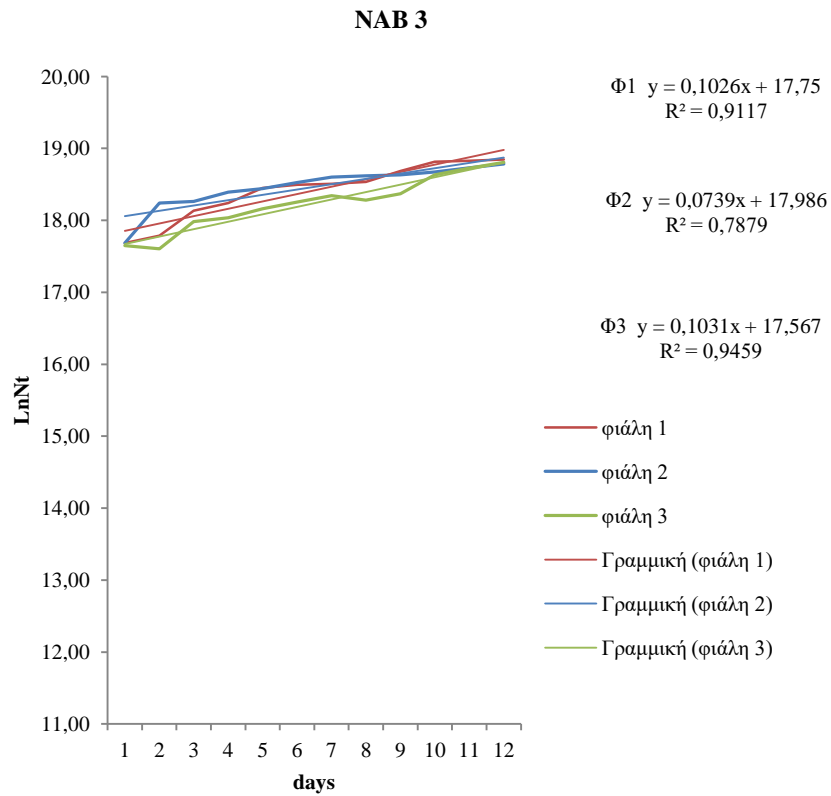
### NAB 3

Στη 2<sup>η</sup> επανάληψη του πειράματος στην καλλιέργεια NAB 3, ως κυρίαρχο είδος παραμένει το ίδιο (κλάση των Trebouxiophyceae).

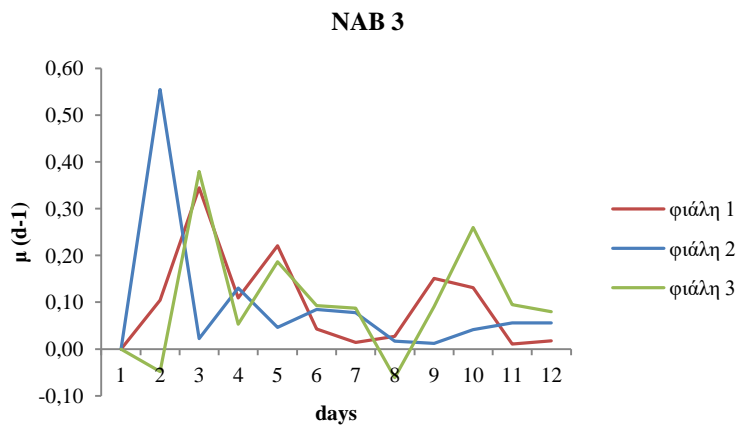


**Διάγραμμα 29.** Cells/ml καλλιέργειας NAB 3, Λίμνη Ευβοίας.





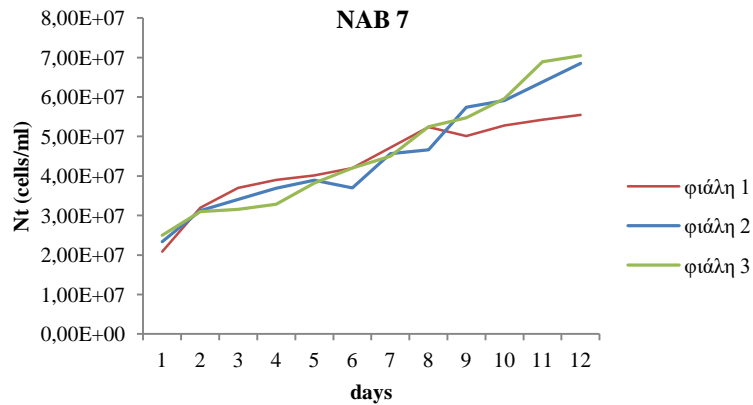
**Διάγραμμα 30.** N (LN cells / ml) της καλλιέργειας NAB 3, Λίμνη Ευβοίας.



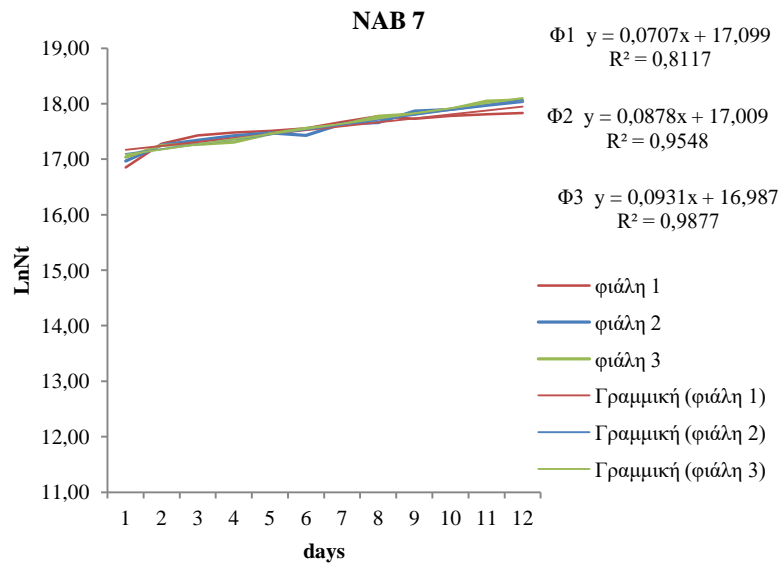
**Διάγραμμα 31.** Ρυθμός αύξησης καλλιέργειας NAB 3, Λίμνη Ευβοίας.

## NAB 7

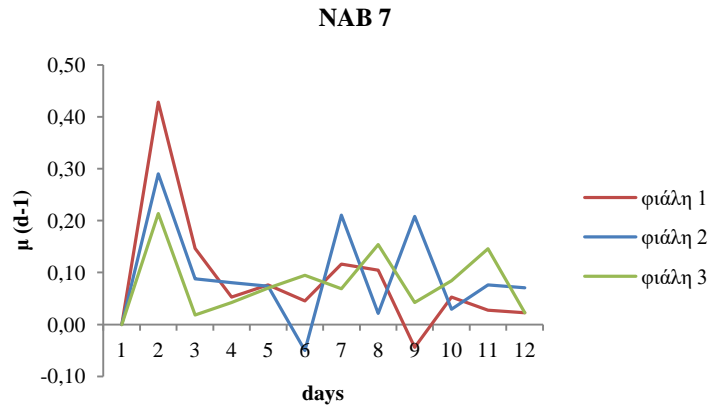
Στη 2<sup>η</sup> επανάληψη του πειράματος στην καλλιέργεια NAB 7, ως κυρίαρχο είδος παραμένει το ίδιο (γένος *Nannochloropsis*).



**Διάγραμμα 32.** Cells/ml καλλιέργειας NAB 7, Λίμνη Ευβοίας.



**Διάγραμμα 33.** (LN cells / ml) της καλλιέργειας NAB 7, Λίμνη Ευβοίας.

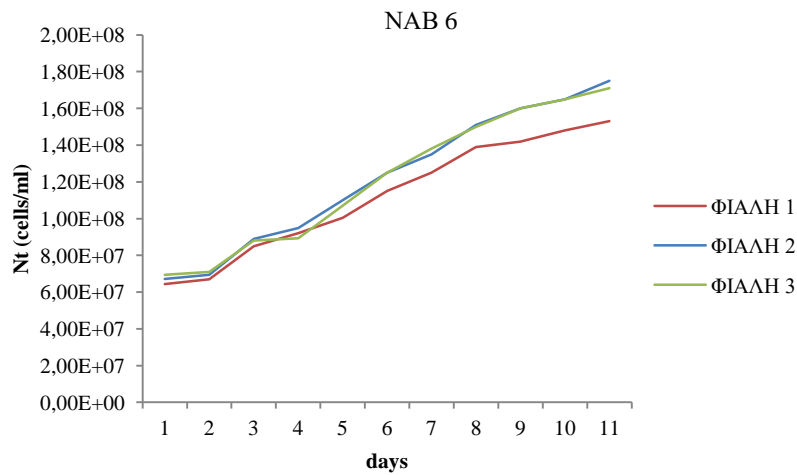


**Διάγραμμα 34.** Ρυθμός αύξησης καλλιέργειας NAB 7, Λίμνη Ευβοίας.

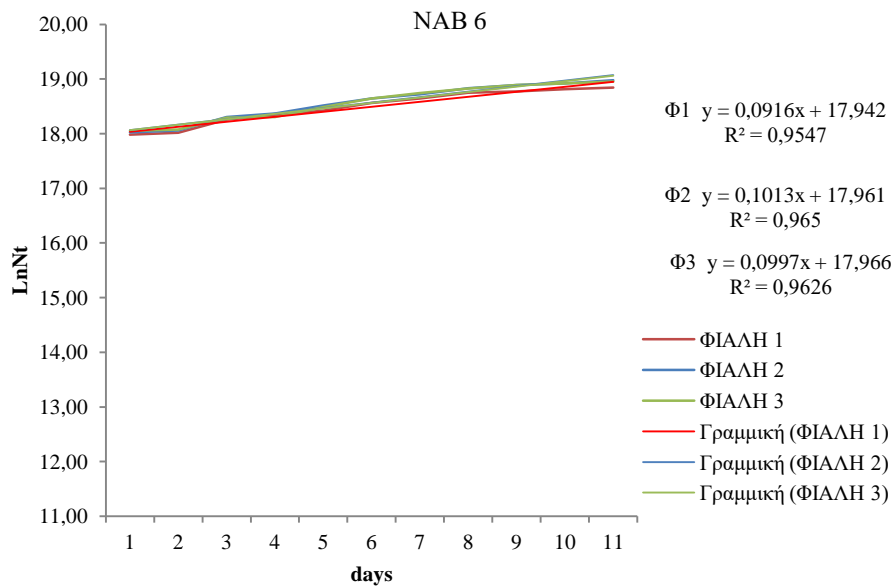
**Πείραμα καλλιέργειας – Κυμάσι – Μαντουδίου (Αιγαίο πέλαγος)**

**NAB 6**

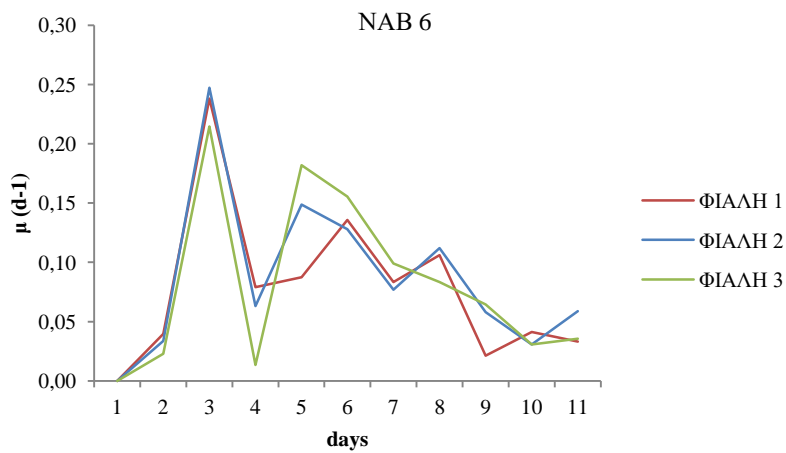
Στη 2<sup>η</sup> επανάληψη του πειράματος στην καλλιέργεια NAB 6, ως κυρίαρχο είδος παραμένει το ίδιο (κλάση Trebouxiophyceae).



**Διάγραμμα 35.** Cells/ml καλλιέργειας NAB 6, Κυμάσι – Μαντουδίου.



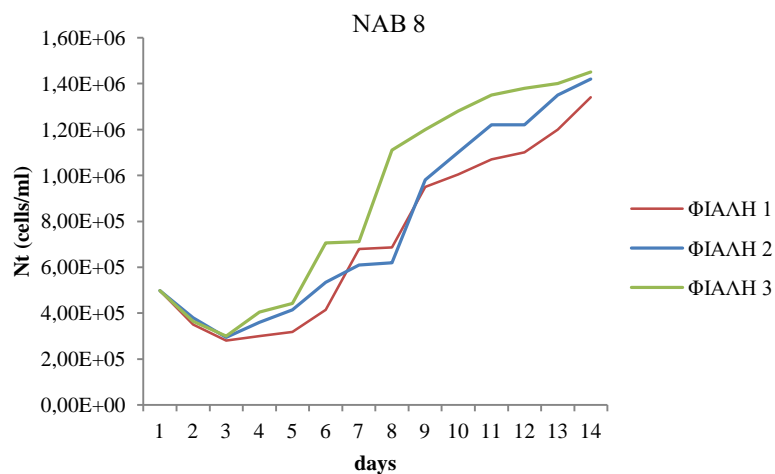
**Διάγραμμα 36.** (LN cells / ml) της καλλιέργειας NAB 6, Κυμάσι – Μαντουδίου.



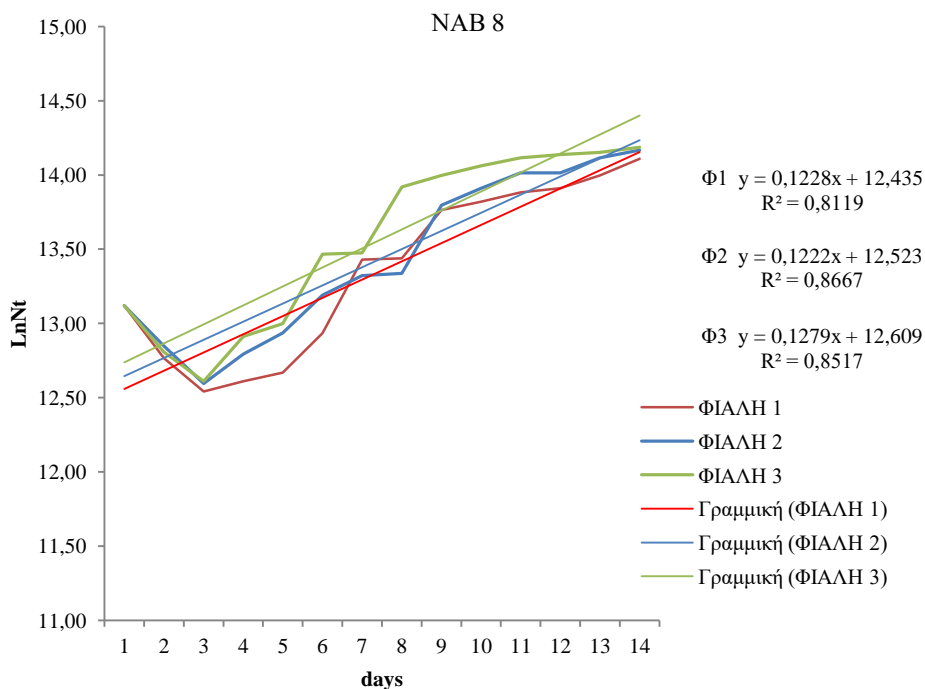
**Διάγραμμα 37.** Ρυθμός αύξησης καλλιέργειας NAB 6, Κυμάσι – Μαντουδίου.

## NAB 8

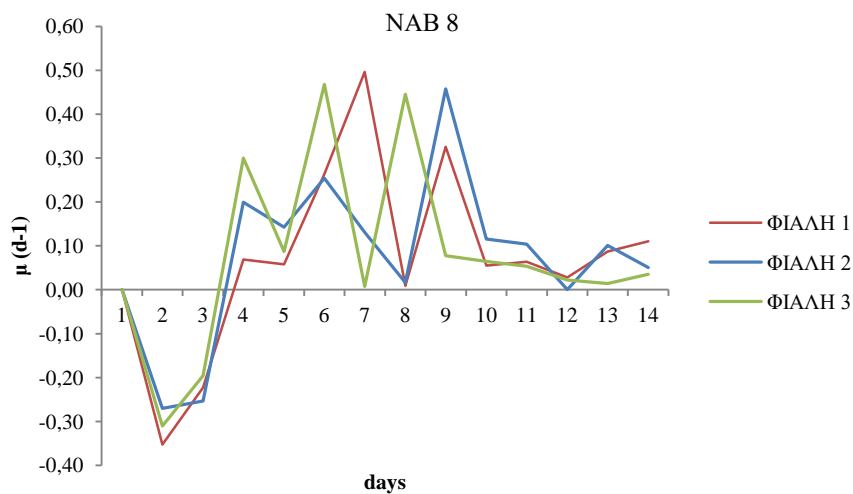
Στη 2<sup>η</sup> επανάληψη του πειράματος στην καλλιέργεια NAB 8, ως κυρίαρχο είδος παραμένει το ίδιο (γένος *Pavlova*).



**Διάγραμμα 38.** Cells/ml της καλλιέργειας NAB 8, Κυμάσι – Μαντουδίου.



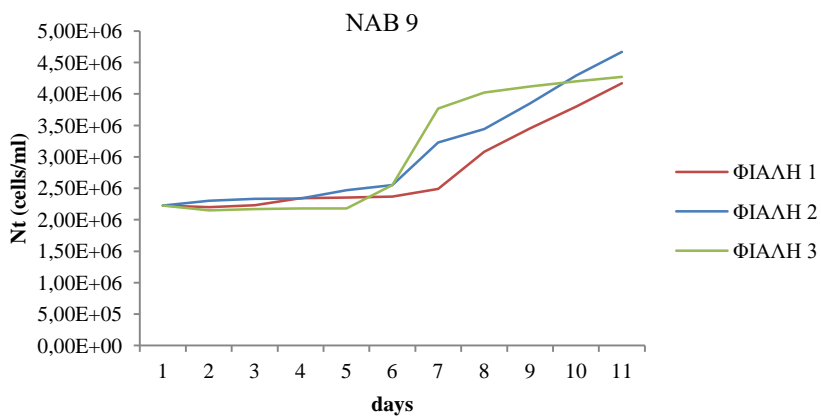
**Διάγραμμα 39.** (LN cells / ml) της καλλιέργειας NAB 8, Κυμάσι – Μαντουδίου.



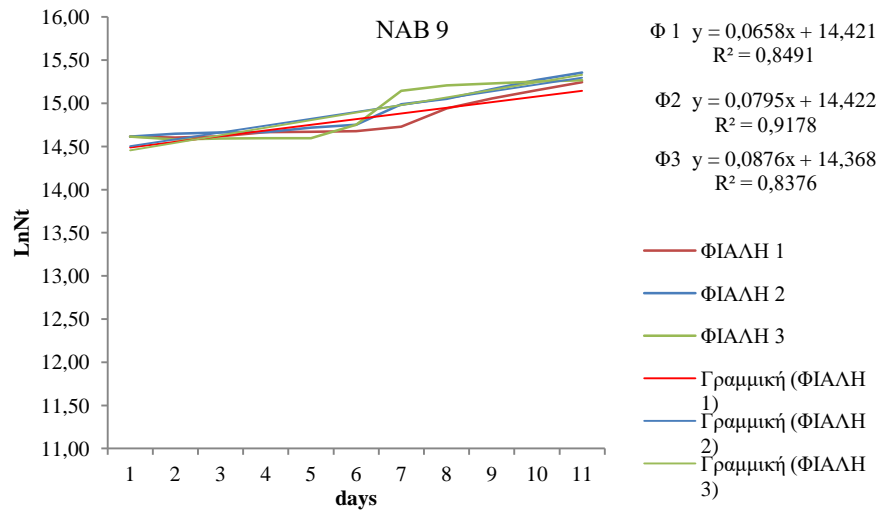
**Διάγραμμα 40.** Ρυθμός αύξησης της καλλιέργειας NAB 8, Κυμάσι – Μαντουδίου.

### NAB 9

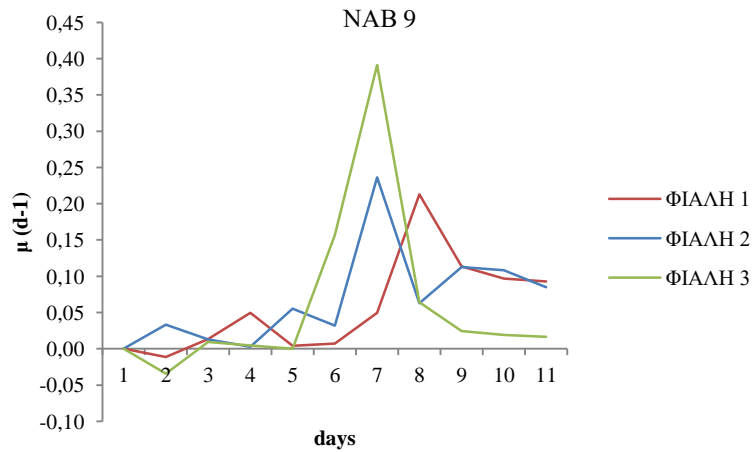
Στη 2<sup>η</sup> επανάληψη του πειράματος στην καλλιέργεια NAB 9, ως κυρίαρχο είδος παραμένει το ίδιο (γένος *Pantonia*).



**Διάγραμμα 41.** Cells/ml καλλιέργειας NAB 9, Κυμάσι – Μαντουδίου.



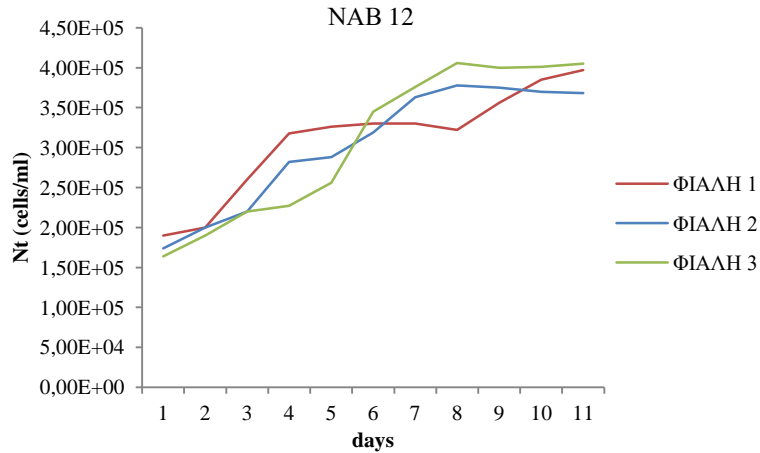
**Διάγραμμα 42.** (LN cells / ml) της καλλιέργειας NAB 9, Κυμάσι – Μαντουδίου.



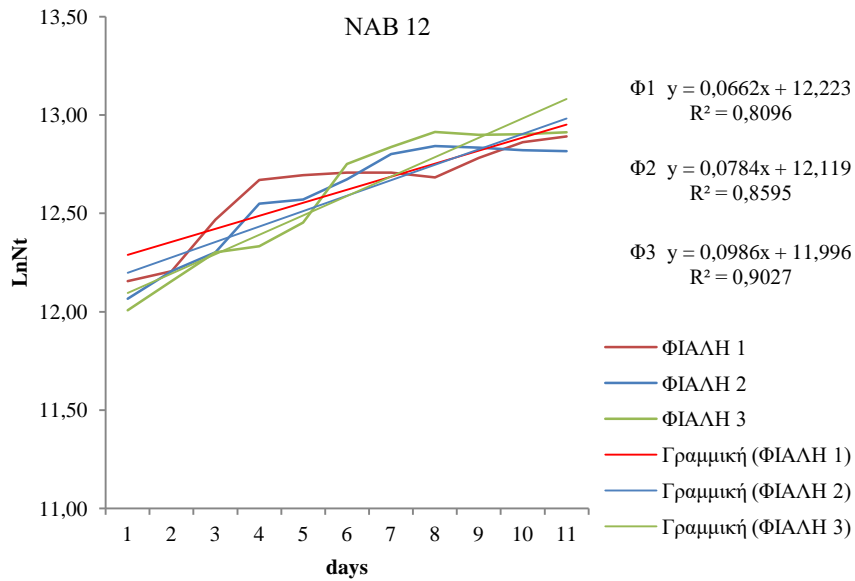
**Διάγραμμα 43.** Ρυθμός αύξησης της καλλιέργειας NAB 9, Κυμάσι Μαντουδίου.

## NAB 12

Στη 2<sup>η</sup> επανάληψη του πειράματος στην καλλιέργεια NAB 12, ως κυρίαρχο είδος παραμένει το ίδιο (κλάση Coccolithophyceae).

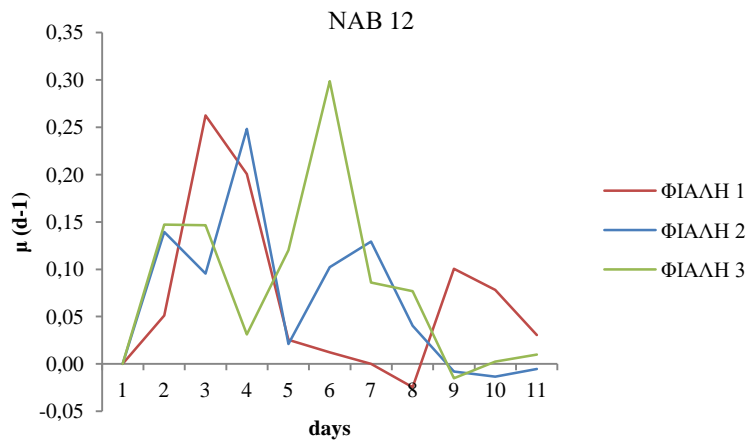


**Διάγραμμα 44.** Cells/ml καλλιέργειας NAB 12, Κυμάσι – Μαντουδίου.



**Διάγραμμα 45.** (LN cells / ml) της καλλιέργειας NAB 12, Κυμάσι – Μαντουδίου.





**Διάγραμμα 46.** Ρυθμός αύξησης της καλλιέργειας NAB 12, Κυμάσι – Μαντουδίου.

### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ – ΠΙΝΑΚΕΣ (ΚΩΔΙΚΟΙ ΟΜΟΛΟΓΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ)

**Πίνακας 1.** Κωδική ονομασία των ομόλογων αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απεικόνιση του φυλογενετικού δέντρου του στελέχους AK\_1\_1 της μελέτης (γονίδιο *rbcL*), όπως έχουν κατατεθεί στην GenBank.

Accession	Class	Genus	Species
EF203011.1		<i>Prasiococcus</i>	<i>P. calcarius</i>
AY694194.1	Trebouxiophyceae	<i>Prasiola</i>	<i>P. calophylla</i>
EF203015.1		<i>Prasiolopsis</i>	<i>P. ramosa</i>
KU167098.1			<i>S. dubia</i>
NC_029807.1		<i>Scherffelia</i>	<i>S. dubia</i>
U30284.1			<i>T. marina</i>
KM202125.1			<i>Tetraselmis</i> sp.
U30283.1			<i>T. aff. maculata</i>
HF931099.1			<i>T. chuii</i>
JQ315495.1			Unverified <i>Tetraselmis</i> sp.
JQ315494.1			<i>Tetraselmis</i> sp.
AY954896.1	Chlorodendrophyceae		<i>Tetraselmis</i> sp.
DQ173247.1		<i>Tetraselmis</i>	<i>T. suecica</i>
EU555175.1			<i>T. suecica</i>
KU167097.1			<i>Tetraselmis</i> sp.
AY954897.1			<i>Tetraselmis</i> sp.
KM202127.1			<i>Tetraselmis</i> sp.
KM202128.1			<i>Tetraselmis</i> sp.
KM202126.1			<i>Tetraselmis</i> sp.

**Πίνακας 2.** Κωδική ονομασία των ομόλογων αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απεικόνιση του φυλογενετικού δέντρου του στελέχους AK\_1\_1 της μελέτης (γονίδιο 18S), όπως έχουν κατατεθεί στην GenBank.

Accession	Class	Genus	Species
X13688.1		<i>Chlorella</i>	<i>C. vulgaris</i>
EU878373.1		<i>Parietochloris</i>	<i>P. alveolaris</i>
KM020066.1	Trebouxiophyceae	<i>Pseustichococcus</i>	<i>P. monallantoides</i>
EU105209.1		<i>Xylochloris</i>	<i>X. irregularis</i>
Z21551.1		<i>Trebouxia</i>	<i>T. impressa</i>
AB006051.1		<i>Lobosphaera</i>	<i>L. tirolensis</i>
X68484.1			<i>Scherffellia</i>
JN376804.1			<i>T. astigmatica</i>
AJ431370.2			<i>Tetraselmis</i> sp.
KT860914.1			<i>T. convolute</i>
HE610130.1			<i>T. cordiformis</i> _
AB058392.1			<i>Tetraselmis</i> sp.
AY425299.1			<i>Tetraselmis</i> sp.
KT860880.1			<i>Tetraselmis</i> sp.
KT007554.1			<i>T. wettsteinii</i>
KJ756817.1			<i>T. apiculata</i>
JN904000.1			<i>T. striata</i>
FJ559393.1			<i>Tetraselmis</i> sp.
FJ559392.1			<i>Tetraselmis</i> sp.
FJ559385.1			<i>T. carteriiformis</i>
KX109779.1			<i>T. striata</i>
FJ559389.1			<i>T. carteriiformis</i>
FJ559388.1			<i>T. carteriiformis</i>
U41900.1	Chlorodendrophyceae	<i>Tetraselmis</i>	<i>Tetraselmis</i> sp.
FJ559398.1			<i>T. striata</i>
KJ756818.1			<i>T. inconspicua</i>
HF931098.1			<i>T. chuii</i>
FJ517748.1			<i>T. hazenii</i> <i>P. subcordiformis</i>
FJ517749.1			<i>T. tetrathele</i>
KF733530.1			<i>T. hengolatica</i>
FJ559377.1			<i>T. suesica</i>
FJ559382.1			<i>T. sp.</i>
AY954898.1			<i>T. sp.</i>
FJ559376.1			<i>T. sp.</i>
FJ559379.1			<i>T. sp.</i>
FJ559381.1			<i>T. suesica</i>
DQ207405.1			<i>T. chuii</i>
JN903999.1			<i>T. chuii</i>
FJ559380.1			<i>T. subcodiformis</i>
KU561107.1			<i>T. subcordiformis</i>

KU561160.1		<i>T. subcordiformis</i>
KT023599.1		<i>T. marina</i>
KT860871.1		<i>T. rubens</i>
JQ315737.1		<i>T. sp.</i>
HE610131.1		<i>T. marina</i>

**Πίνακας 3.** Κωδική ονομασία των ομόλογων αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απεικόνιση του φυλογενετικού δέντρου των στελεχών: EG\_3\_1\_1 και EG\_6\_1\_1 (γονίδιο *rbcL*), όπως έχουν κατατεθεί στην GenBank.

Accession	Class	Genus	Species
HF931099.1	Chlorodendrophyceae	<i>Tetraselmis</i>	<i>T. chuii</i>
DQ173247.1			<i>T. suesica</i>
EF203011.1	Trebouxiophyceae	<i>Prasiococcus</i>	<i>P. calcarius</i>
AY694194.1		<i>Prasiola</i>	<i>P. calophylla</i>
EF203015.1		<i>Prasiolopsis</i>	<i>P. ramosa</i>
AM260442.1		<i>Stichococcus</i>	<i>S. bacillaris</i>
JF502558.1		<i>Trebouxia</i>	<i>T. australlis</i>
EF589153.1		<i>Trebouxia</i>	<i>Trebouxia sp.</i>
EF113438.1		<i>Fusochloris</i>	<i>F. perforata</i>
KR154334.1		<i>Phyllosiphon</i>	<i>P. arisari</i>
KT950844.1		<i>Phyllosiphon</i>	<i>P. coccidium</i>
KR154339.1		<i>Chloroidium</i>	<i>C. angustoellipsoidium</i>
AM260440.1		<i>Auxenochlorella</i>	<i>A. protothecoides</i>
EF113454.1		<i>Picochlorum</i>	<i>P. eukaryotum</i>
AF446090.1		<i>Nannochloris</i>	<i>Nannochloris sp.</i>
KP202854.1		<i>Picomonas</i>	<i>Picomonas sp.</i>
KM202129.1		<i>Nannochloris</i>	<i>Nannochloris sp.</i>
KP190042.1		<i>Picochlorum</i>	<i>P. maculatum</i>
KF693824.1		<i>Murriella</i>	<i>Murriella sp.</i>
EF113444.1		<i>Gloeotila</i>	<i>G. contorta</i>
AY543047.1		<i>Meyerella</i>	<i>M. planktonika</i>
HM101339.1		<i>Chlorella</i>	<i>C. sorokiniana</i>
AB260910.1	<i>Chlorella</i>	<i>Chlorella sp.</i>	
KC810318.1	<i>Micractinium</i>	<i>M. pusillum</i>	
EU038283.1	<i>Chlorella</i>	<i>C. pyrenoidosa</i>	
KM514895.1	<i>Chlorella</i>	<i>C. vulgaris</i>	
EF113405.1	<i>Actinastrum</i>	<i>A. hantzschii</i>	

**Πίνακας 4.** Κωδική ονομασία των ομόλογων αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απεικόνιση του φυλογενετικού δέντρου του στελέχους EG\_3\_1\_1 (γονίδιο 18S), όπως έχουν κατατεθεί στην GenBank.

Accession	Class	Genus	Species
DQ207405.1	Chlorodendrophyceae		<i>T. chuii</i>
FJ559401.1		<i>Tetraselmis</i>	<i>T. chuii</i>
KT023599.1			<i>T. marina</i>
GQ122358.1			<i>Nannochloris</i> sp.
GQ122381.1		<i>Nannochloris</i>	<i>Nannochloris</i> sp.
GQ122347.1			<i>Nannochloris</i> sp.
KT860854.1			<i>Picochlorum</i> sp.
KT860853.1			<i>Picochlorum</i> sp.
KT860874.1			<i>Picochlorum</i> sp.
KU561115.1		<i>Picochlorum</i>	<i>P. maculatum</i>
KU561126			<i>P. oklahomense</i>
KU561137			<i>P. maculatum</i>
AY526738.1			<i>Picochlorum</i> sp.
JQ315636.1		<i>Nannochloris</i>	<i>Nannochloris</i> sp.
LC110388.1		<i>Picochlorum</i>	<i>Picochlorum</i> sp.
AJ131691.1		<i>Nannochloris</i>	<i>Nannochloris</i> sp.
AB080302.1			<i>N. maculata</i>
AB058309.1		<i>Nannochlorum</i>	<i>Nannochlorum</i> sp.
AB080301.1		<i>Nannochloris</i>	<i>N. coccoides</i>
AY195976.1	<i>Gloetila</i>	<i>Gloetila</i> sp.	
KM462820.1	Trebouxiophyceae	<i>Auxenochlorella</i>	<i>A. protothecoides</i>
KM020184.1		<i>Stichococcus</i>	<i>Stichococcus</i> sp.
FM205834.1			<i>C. sorokianiana</i>
FR865659.1		<i>Chlorella</i>	<i>C. vulgaris</i>
GQ487236.1		<i>Hindakia</i>	<i>H. tetrachotoma</i>
FM205866.1		<i>Micractinium</i>	<i>M. pusillum</i>
FM205884.1		<i>Actinastrum</i>	<i>A. hentszschii</i>
FM205839.1		<i>Didymogenes</i>	<i>D. anomala</i>
FJ829884.1			<i>P. arisari</i>
JF304471.1		<i>Phyllosiphon</i>	<i>P. arisari</i>
KT950842.1			<i>P. coccidium</i>
GU017647.1		<i>Asterochloris</i>	<i>A. phycobiontica</i>
Z21553.1		<i>Trebouxia</i>	<i>T. asymetrica</i>
KR869725.1		<i>Botryococcus</i>	<i>B. braunii</i>
AJ431572.1		<i>Desmococcus</i>	<i>D. olivaceus</i>
EF200521.1		<i>Prasiola</i>	<i>P. calophylla</i>
EF200527.1		<i>Prasiococcus</i>	<i>P. calcarius</i>
AY762600.1		<i>Prasiolopsis</i>	<i>P. ramosa</i>
Z68695.1		<i>Leptosira</i>	<i>L. obovata</i>

**Πίνακας 5.** Κωδική ονομασία των ομόλογων αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απεικόνιση του φυλογενετικού δέντρου του στελέχους EG\_7\_1 (γονίδιο 18S), όπως έχουν κατατεθεί στην GenBank.

Accession	Class	Genus	Species	
EF165101.1	Chrysophyceae	Chromulina	<i>C. cf rebulosa</i>	
AF123285.1			<i>C. nebulosa</i>	
DQ788730.1	Synchromophyceae	Synchroma	<i>S. grande</i>	
AY485458.1	Bacillariophyceae	<i>Nitzschia</i>	<i>N. thermalis</i>	
KT943641.1			<i>Nitzschia</i> sp.	
HQ710587.1	Phaeothamniophyceae	<i>Botrydium</i>	<i>B. granulatum</i>	
U41648.1			<i>B. stoloniferum</i>	
AB365192.1	Xanthophyceae	<i>Aurearena</i>	<i>A. cruciata</i>	
AY032606.1		<i>Pylaiella</i>	<i>P. littoralis</i>	
FJ896228.1	Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis</i>	<i>N. oceanica</i>	
JQ315707.1			<i>Nannochloropsis</i> sp.	
JQ315717.1			<i>Nannochloropsis</i> sp.	
JQ315710.1			<i>Nannochloropsis</i> sp.	
KF010154.1			<i>N. oceanica</i>	
KT031995.1			<i>N. oceanica</i>	
KR904905.1			<i>N. oceanica</i>	
AY560119.1			<i>Nannochloropsis</i> sp.	
LC169504.1			<i>N. oceanica</i>	
KJ756836.1			<i>N. oceanica</i>	
AF045044.1			<i>N. oculata</i>	
KJ756833.1			<i>N. oculata</i>	
AB052272.1			<i>N. granulata</i>	
KC128500.1			<i>N. granulata</i>	
AF251496.1			<i>N. limnetca</i>	
DQ977726.1			<i>N. limnetca</i>	
AB052278.1			<i>N. salina</i>	
KJ756830.1			<i>N. salina</i>	
KF040086.1			<i>N. gatitana</i>	
U41054.1			<i>M. subterranea</i>	
AM490827.1			<i>M. unipapilla</i>	
HQ710565.1			<i>M. unipapilla</i>	
KF848930.1			<i>M. subterranea</i>	
EF044311.1			<i>Pseudotetraedriella</i>	<i>P. kamillae</i>
JX188077.1			<i>Eustigmatos</i>	<i>E. polyphem</i>
KF848920.1				<i>V. helvetica</i>
HQ710570.1			<i>Vischeria</i>	<i>V. stellata</i>
KF848919.1				<i>V. stellata</i>
KF848921.1			<i>Eustigmatos</i>	<i>E. polyphem</i>
KF848934.1			<i>Chlorobotrys</i>	<i>C. regularis</i>
KF757250.1			<i>Eustigmatophyceae</i>	<i>Eustigmatophyceae</i> sp.
KF757254.1				<i>Eustigmatophyceae</i> sp.
KF848933.1	<i>Pseudellipsoidion</i>	<i>P. edaphicum</i>		
EF044312.1		<i>P. enorme</i>		
EF044313.1	<i>Pseudostaurastrum</i>	<i>P. limneticum</i>		
FJ858970.1	<i>Goniochloris</i>	<i>G. sculpa</i>		
HQ007250.1	<i>Trachydiscus</i>	<i>T. minutus</i>		