

Τ.Ε.Ι. ΜΕΣΟΛΟΓΓΙΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ-ΑΛΙΕΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**"*Asteromonas gracilis* και άλλα είδη μικροφυκών.
Επίδραση θερμοκρασίας, φωτός και φυγοκέντρισης
στην αύξησή τους και στη διατροφή
του τροχοζώου *Brachionus plicatilis*"**

Εισηγητής:

Δρ. Γεώργιος Χώτος

Καθηγητής

Σπουδαστές:

Παναγιώτης Αναστόπουλος

Δήμητρα Πέτσα

ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2001

Εξεπρίσταται

ΥΠ

Δρ. Γ. Χιώτος
Καθηγητής

Μεσοβόρσι 5-6-2001

Φόντο εξοφύλλου:
Brachionus plicatilis
από φωτογραφικό αρχείο Δρ. Γ. Χιώτου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Abstract	1
Αντί Προλόγου	2
ΜΕΡΟΣ Α. Πείραμα Θερμοκρασίας	4
Εισαγωγή	4
Γενικά Στοιχεία του είδους <i>Asteromonas gracilis</i>	6
Συστηματική Κατάταξη	7
Μορφολογία	8
Εσωτερική Δομή	8
Κύστεις	10
Γενικά Στοιχεία του είδους <i>Tetraselmis sp.</i>	11
Συστηματική Κατάταξη	11
Υλικά & Μέθοδοι	12
Αποτελέσματα - Συζήτηση	15
ΜΕΡΟΣ Β. Πείραμα Διατροφής Τροχοζώων	26
Εισαγωγή	26
Γενικά Στοιχεία του είδους <i>Brachionus plicatilis</i>	26
Συστηματική Κατάταξη	28
Κλείδα προσδιορισμού των ειδών	29
Μορφολογία	31
Βιολογία & Κύκλος Ζωής	35
Πολυμορφισμός	38
Οικολογία	39
Υλικά & Μέθοδοι	41
Αποτελέσματα - Συζήτηση	43

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α.

Προσδιορισμός πυκνότητας φυτοπλαγκτού με
χρήση απλού φασματοφωτομέτρου 55

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β.

Τυπική πορεία ανάπτυξης ενός
φυτοπλαγκτονικού πληθυσμού με το χρόνο 59

Βιβλιογραφία 61

ABSTRACT

This dissertation thesis deals with the big (12-22 μm), wall-less, halotolerant microalgae *Asteromonas gracilis* Artari. The impact of temperature, light and centrifugation on the growth rate of *Asteromonas gracilis*, in comparison with other microalgal species (i.e. *Tetraselmis* sp., *Dunaliella* sp.) and on the nutrition of the rotifer *Brachionus plicatilis* was examined. The experimental studies revealed that the optimum temperature for the mass culture of *Asteromonas gracilis* is 20°C and that above 25°C the culture deteriorates. Relatively high reproductive rates of the rotifer *B. plicatilis* were found in the dark (compared to the light), when they were fed with centrifuged cells (compared to cells in levitation) of *Dunaliella* sp. (compared to *Asteromonas gracilis*, *Tetraselmis* sp.). When *Asteromonas gracilis* was used as food for the *B. plicatilis*, the optimum reproductive rates were obtained in the dark with centrifuged cells. These findings point towards the beneficial effect of the centrifuged cells in the feeding of rotifers.

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Η ραγδαία ανάπτυξη του κλάδου των υδατοκαλλιεργειών τα τελευταία χρόνια καθιστά επιτακτική την ανάγκη εξεύρεσης νέων, πιο αποδοτικών ειδών και μεθόδων καλλιέργειας.

Στα πλαίσια μιας σειράς εργασιών, που πραγματοποιούνται τα τελευταία χρόνια στο Εργαστήριο «Υδατοκαλλιεργειών Ιχθύων Θαλάσσης και Υφαλμύρων Υδάτων - Τμήμα Παραγωγής Φυτο-ζωοπλαγκτού» του Τ.Ε.Ι. Μεσολογγίου, με σκοπό την καθιέρωση της μαζικής καλλιέργειας του φυτοπλαγκτονικού είδους *Asteromonas gracilis* Artari, συμπεριλαμβάνεται και η παρούσα.

Πρόκειται για ένα ευμεγέθες (12-22μm), αλοανθεκτικό, μονοκύτταρο φύκος, χωρίς κυτταρικό τοίχωμα, που όπως έχει παρατηρηθεί σε πειραματικές καλλιέργειες παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα: α) απομονώνεται εύκολα από μίγμα ειδών (χρήση υπεραλατότητας), β) δεν απαιτεί έντονο φωτισμό και αερισμό, γ) δεν απαιτεί βιταμίνες, δ) δεν «καταρρέει» ούτε απότομα ούτε εύκολα, ε) δεν παρουσιάζει μακρά αρχική φάση καθυστέρησης (lag phase) (Χώτος κ.α. 1997).

Με αφορμή τα αποτελέσματα των εργασιών, που πραγματοποιήθηκαν στο παρελθόν στο ίδιο εργαστήριο και αποδεικνύουν ότι τα κύτταρα της *Asteromonas gracilis* προτιμούνται από το τροχοζώο *Brachionus plicatilis* (Χώτος κ.α. 1997), προσδίδοντας του ενεργειακό πλεονέκτημα, μιας και με λιγότερη προσπάθεια καταπίνουν μεγαλύτερη φυκική βιομάζα (Χώτος & Αβραμίδου, 1994), δόθηκε το ερέθισμα για να γίνει η παρούσα μελέτη.

Αντικείμενό της είναι η επίδραση της θερμοκρασίας, του φωτός και της φυγοκέντρισης στην αύξησή του παραπάνω μικροφύκους και στη διατροφή του τροχοζώου *Brachionus plicatilis*.

Στο **Μέρος Α** μελετήθηκε ο ρυθμός αύξησης της *Asteromonas gracilis* σε σύγκριση με ένα από τα πλέον χρησιμοποιηθέντα φυτοπλαγκτονικά είδη το *Tetraselmis sp.* σε θερμοκρασίες 20°C, 25°C, 30°C και 35°C.

Στο **Μέρος Β** συγκρίθηκαν οι ρυθμοί αύξησης του τροχοζώου *Brachionus plicatilis* σε δύο καταστάσεις περιβαλλοντικού φωτισμού (φως και σχεδόν σκοτάδι) και φυτοπλαγκτονικών κυττάρων (σε αιώρηση και

φυγοκεντριμένα}, που εφαρμόστηκαν σε τρία διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα *Asteromonas gracilis*, *Tetraselmis sp.* και *Dunaliella sp.*

Επιπλέον στο **Παράρτημα** μελετήθηκε το κατά πόσο ο υπολογισμός της πυκνότητας των φυτοπλαγκτονικών κυττάρων, με τη χρήση φασματοφωτομέτρου δίνει αποτελέσματα ικανοποιητικής ακρίβειας συγκριτικά με αυτά του αιμοκυπτομέτρου.

Ευχαριστούμε θερμά, τον εισηγητή μας Καθηγητή Δρ. Γ. Χώτο για τη βοήθεια και το ενδιαφέρον του, καθώς επίσης και όλους εκείνους που με κάθε τρόπο στάθηκαν δίπλα μας και μας βοήθησαν να ολοκληρώσουμε αυτή την μελέτη.

ΜΕΡΟΣ Α.

ΠΕΙΡΑΜΑ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στις σύγχρονες υδατοκαλλιέργειες το φυτοπλαγκτόν καλλιεργείται εντατικά με ποικίλες μεθόδους, καθώς αποτελεί τη βάση της τροφικής αλυσίδας:

Φυτοπλαγκτόν → Ζωοπλαγκτόν → Νύμφες Ψαριών ή Μαλακίων

Περισσότερα από σαράντα διαφορετικά φυτοπλαγκτονικά είδη έχουν χρησιμοποιηθεί σαν ζωντανή τροφή υδρόβιων ασπόνδυλων και σπονδυλωτών (Ukeles, 1976; Walne, in COST, 1978; Imai, 1977; Persoone & Claus, 1980; De Pauw, 1981; αναφέρονται από De Pauw et al., 1984).

Η θρεπτική αξία των ειδών αυτών έχει διαπιστωθεί κυρίως μέσω δοκιμών σε είδη με σπουδαία εμπορική αξία, όπως τα στρείδια, οι χλαμύδες, οι γαρίδες, τα ψάρια και το ζωοπλαγκτόν (De Pauw & Pruder, 1984; αναφέρεται από De Pauw et al., 1984).

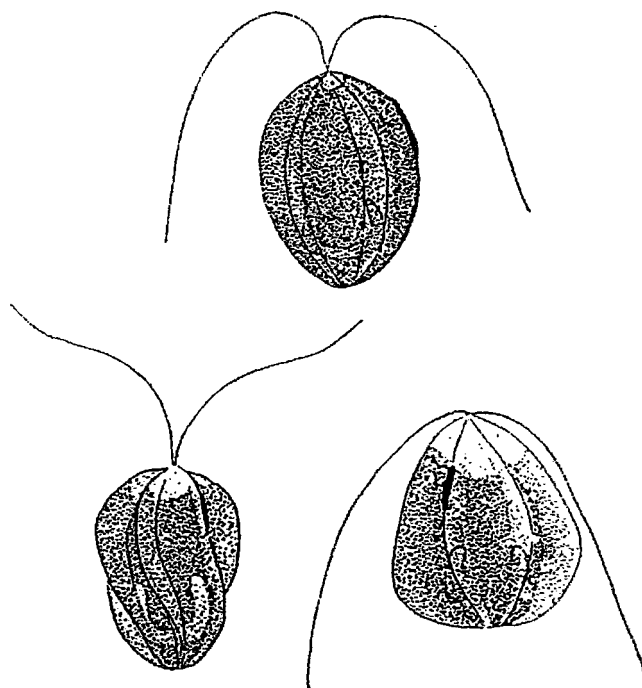
Μέχρι σήμερα ο ακριβής λόγος, για τον οποίο ένα φυτοπλαγκτονικό είδος θεωρείται καλή τροφή και κάποιο άλλο λιγότερο ή καθόλου, δεν έχει εξακριβωθεί και πολλές αντικρουόμενες απόψεις πάνω σε αυτό το θέμα συναντώνται στη διεθνή βιβλιογραφία.

Υπάρχουν κάποια βασικά και απαραίτητα κριτήρια, που θα πρέπει να πληρεί ένα είδος φυτοπλαγκτού, για να μπορεί να χορηγηθεί σαν τροφή στους καλλιεργούμενους οργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα θα πρέπει α) να μην είναι τοξικό, β) να έχει μέγεθος κατάλληλο, γ) να διαθέτει λεπτό κυτταρικό τοίχωμα ώστε να είναι εύπεπτο και δ) να έχει την απαιτούμενη βιοχημική σύσταση. Τα δίθυρα μαλάκια για παράδειγμα δε μπορούν να πέψουν κύτταρα με χοντρό κυτταρικό τοίχωμα, ενώ τα τροχοζώα μπορούν με τη βοήθεια του φαρυγγικού τους οργάνου-mastax. Για αυτό ακριβώς το λόγο το γένος *Chlorella* είναι κατάλληλο στην καλλιέργεια των τροχοζώων, αλλά όχι στην καλλιέργεια στρειδιών. Ωστόσο, με θραύση του κυτταρικού τοιχώματος (π.χ. με θερμικό σοκ) τα χλωροφύκη μπορούν να γίνουν εύπεπτα.

Επιπλέον μερικά είδη συχνά και απρόβλεπτα γίνονται τοξικά για τις λάρβες των ψαριών και των στρειδιών (Loosanoff & Davis, 1963; Walne, 1974; αναφέρεται από De Pauw et al., 1984). Οι λόγοι εμφάνισης αυτού του φαινομένου δεν έχουν ακόμα εξακριβωθεί, παρ' όλα αυτά η ηλικία της καλλιέργειας των φυτοπλαγκτονικών ειδών, όταν αυτά χορηγούνται σαν τροφή, ίσως να έχει κάποια σημασία.

Στην περίπτωση που κάποιο είδος πληρεί τις παραπάνω προϋποθέσεις, τότε για να μπορεί να καλλιεργηθεί μαζικά, θα πρέπει να ερευνηθούν οι βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας του, όπως π.χ. η θερμοκρασία, η αλατότητα, ο φωτισμός, το pH, το οξυγόνο, το CO₂, κλπ.

Με βάση τα παραπάνω κρίθηκε σκόπιμο να πραγματοποιηθεί ένα πείραμα, ώστε να αναζητηθεί η βέλτιστη και η μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του φυτοπλαγκτονικού είδους *Asteromonas gracilis*, συγκρίνοντάς το με ένα από τα πλέον χρησιμοποιηθέντα είδη, το *Tetraselmis* sp. Η *Asteromonas gracilis* είναι ένα καινούριο είδος για χρήση στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς και παρουσιάζει πολύ καλά χαρακτηριστικά ανάπτυξης. (Γ. Χώτος κ.α., 1995)

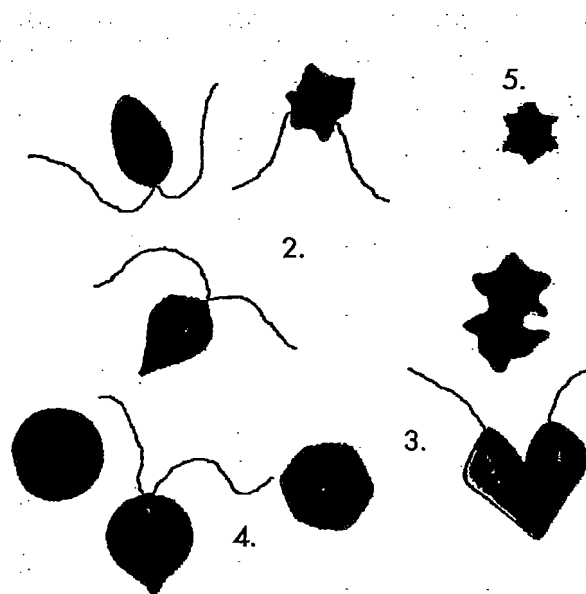


Εικόνα 1. *Asteromonas gracilis* Artari

ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Asteromonas gracilis*

Το είδος *Asteromonas gracilis* Artari αναφέρθηκε για πρώτη φορά (Artari 1913,1916) σε αλατορυχεία και μικρές υδατοσυλλογές αλμυρού νερού στην Κριμαία. Επιπλέον έχει συναντηθεί σε παρόμοια περιβάλλοντα και σε πολλά άλλα μέρη του κόσμου, όπως το Βέλγιο, η Γαλλία, η Πορτογαλία, η Αλγερία, η Τυνησία, η Αυστραλία, η Βραζιλία και οι Ειρηνικές ακτές της Βόρειας Αμερικής (Pierce, 1914; Feldmann, 1931a, 1931b, 1937, 1938; Smith, 1933; Ruinen, 1938; Congrad & Kufferath, 1954; Hollande, Enjument & Lafaurie, 1954; Chadefaud, 1960, Peterfi & Manton, 1968). Είναι είδος ευρύθερμο, πολύ αλοανθεκτικό και κοσμοπολίτικο.

Ο Artari (1913,1916) περιέγραψε συνοπτικά τη μορφολογία των κυττάρων της *Asteromonas* και στη συνέχεια τα σχεδίασε (Εικόνες 2-5), δίνοντας με τον τρόπο αυτό πιο παραστατικά και με μεγαλύτερη λεπτομέρεια τα εξωτερικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα των κυττάρων αυτών.



Εικόνες 2-5. *Asteromonas gracilis* Artari. 1913. Αντίγραφο των έγχρωμων σχημάτων που δημοσιεύθηκαν για να περιγράψουν το καινούριο αυτό γένος και είδος (Artari. 1913, Pl. VI, group III). Εικόνα 2. Τρία κύτταρα x 750. Εικόνα 3. Στάδια διαίρεσης x c.1000. Εικόνα 4. Διογκωμένα κύτταρα εξαιτίας της χαμηλής αλατότητας του περιβάλλοντος νερού. Εικόνα 5. Εγκάρσια τομή.

Λίγα χρόνια πριν ο Dangeard (1910,1912) είχε περιγράψει κύτταρα παρόμοια αλλά όχι πανομοιότυπα, για ένα είδος που το ονόμαζε *Stephanoptera fabreae*. Η βασικότερη διαφορά στις περιγραφές αφορούσε τα μεγέθη των

κυττάρων και πιο συγκεκριμένα αυτά που περιέγραψε ο Dangeard ήταν πολύ μεγαλύτερα από αυτά που περιέγραψε ο Artari.

Το 1924 ο Wislouch και το 1933 ο Smith επιχειρήσαν να συγκρίνουν τα σχέδια των Artari και Dangeard. Περιορίστηκαν όμως στις ασήμαντες διαφορές, με αποτέλεσμα να παραβλέψουν τα ουσιώδη χαρακτηριστικά (όπως το σχήμα του κυττάρου), στα οποία θα μπορούσε να στηριχθεί η ταξινόμηση των κυττάρων.

Πάρα τις παραπάνω προσπάθειες μέχρι σήμερα δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα αν τα κύτταρα, που περιέγραψε ο Dangeard (1910,1912) ανήκουν ή όχι στο γένος *Asteromonas*.

Σύμφωνα με τους Peterfi L.S. και Manton I. (1968) αν υπάρχει κάποια σχέση μεταξύ της *Asteromonas* και του *Stephanoptera* δεν μπορεί να εξακριβωθεί, παρά μόνο στην περίπτωση που βρεθούν και μελετηθούν ξανά οι τύποι του είδους *Stephanoptera fabreae*.

ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ

Σύμφωνα με τον Άτλαντα Ταξινόμησης των Θαλάσσιων Φυτοπλαγκτονικών ειδών "Atlas du Phytoplankton Marin" (Chretiennot-Cinet, M.J.-1990), η συστηματική κατάταξη του είδους *Asteromonas gracilis* δίνεται παρακάτω:

Συνομοταξία-Φύλο: Rhycophyta (Φύκη)

Ομοταξία-Κλάση: Chlorophyceae Silva, 1982

Τάξη: Dunaliellales Ettl, 1983

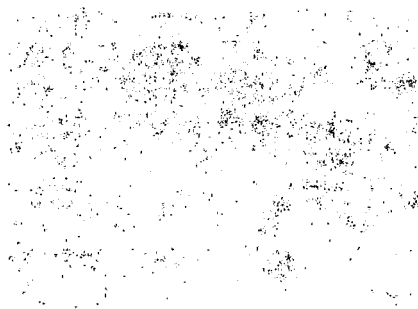
Οικογένεια: Asteromonadaceae Peterfi & Ionescu, 1979

Γένος: *Asteromonas* Artari, 1913

Είδος: *Asteromonas gracilis* Artari, 1913



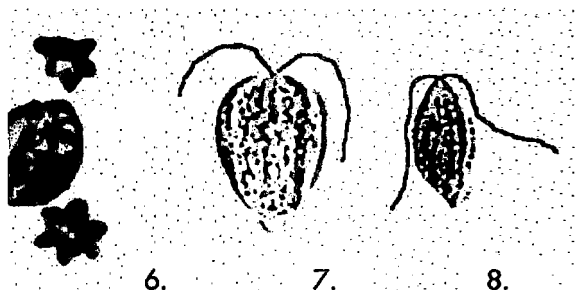
Φωτογραφία 1. Κύτταρο *Asteromonas gracilis* (από φωτογραφικό αρχείο Δρ. Γ. Χώτου)



ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Τα πιο σημαντικά μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυσιολογικών, ώριμων κυττάρων του είδους *Asteromonas gracilis*, που διακρίνονται τόσο με οπτικό όσο και με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι:

- ατρακτοειδές σχήμα, που είναι άλλοτε στενό και άλλοτε όχι,
- 2 μαστίγια προσαρτημένα στο ανώτερο τμήμα τους, γέρνουν πλευρικά κάνοντας τη «θηλή», που βρίσκεται και αυτή στο ανώτερο τμήμα τους, άλλοτε περισσότερο και άλλοτε λιγότερο εμφανή,
- απουσία κυτταρικού τοιχώματος,
- 3 έως 6 (το πιο χαρακτηριστικό 6) «εγκοπές» (σαν καρίνα), που διατρέχουν κατά μήκος πλευρικά όλο το κύτταρο,
- μήκος 12-22μm και πλάτος 8-16μm,
- μήκος μαστιγίων ίσο με 1½ έως 2 φορές το μήκος του σώματος,
- εξωτερική επιφάνεια χωρίς φολίδα, παρ' όλα αυτά στην επιφάνεια του σώματος και των μαστιγίων συχνά διακρίνονται λεπτές ινώδεις αποθέσεις (χαρακτηριστικά ορατά με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο).



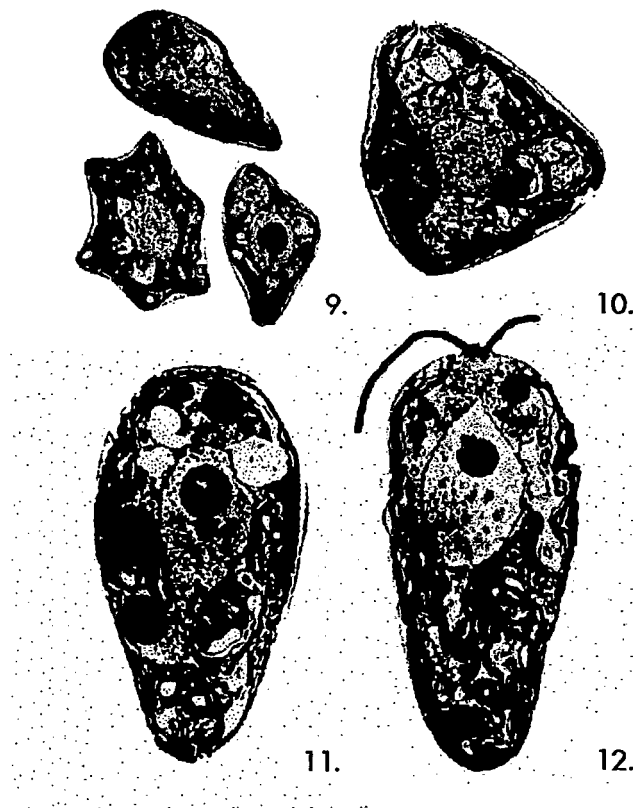
Εικόνες 6-8. *Asteromonas gracilis*, ζωντανά κύτταρα x 1000.

ΕΣΩΤΕΡΙΚΗ ΔΟΜΗ

Σε ένα ζωντανό κύτταρο του είδους *Asteromonas gracilis* διακρίνεται ένα σύνολο κυτταρικών οργανιδίων και σχηματισμών στο εσωτερικό του κυτταροπλάσματος. Ένα από τα βασικότερα είναι ο **χλωροπλάστης** με σχεδόν λεκανοειδή μορφή. Είναι λεπτός και ωχρός (χωρίς έντονο πράσινο χρώμα) στην μεγαλύτερή του επιφάνεια. Εκτείνεται μέχρι το πάνω τμήμα του κυττάρου, σχεδόν μέχρι τη βάση των μαστιγίων. Διαθέτει ένα ασύμμετρο **πυρηνοειδές** (ή **pyrenoid**, πρωτεϊνικό σώμα στο εσωτερικό του χλωροπλάστη, που είναι το

κέντρο σχηματισμού του αμύλου), που συνδέεται άμεσα με το οπίσθιο τμήμα του μεγάλου πυρήνα. Στο ανώτερο τμήμα του σώματος και μέσα στον χλωροπλάστη διακρίνεται ένα πορτοκαλί στίγμα, η **οφθαλμική κλίδα** (ή **stigma**). Ο **πυρήνας** είναι μεγάλος και περιέχει έναν ευδιάκριτο **πυρηνίσκο**. Είναι τοποθετημένος σχεδόν στο κέντρο του κυτάρου και το μπροστινό του τμήμα εκτείνεται σχεδόν μέχρι τη βάση των μαστιγίων (Εικόνες 9-12).

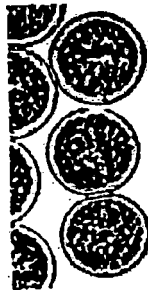
Επιπλέον στην εσωτερική πλευρά του κυτάρου, στην επιφάνεια του κυτταροπλάσματος, διακρίνονται πολλά μικρά **μιτοχόνδρια**. Στο μπροστινό τμήμα του κυτάρου είναι κατανεμημένα περισσότερο ή λιγότερο συμμετρικά γύρω από τον πυρήνα αρκετά **δικτυοσώματα** 4-6 στον αριθμό, που όλα μαζί αποτελούν το **σύστημα Golgi**. Ο μεγάλος αριθμός **μικρο-κυστιδίων**, που διακρίνονται στο μπροστινό τμήμα του κυτάρου, μεταξύ των δικτυοσωμάτων, πιθανόν εξέρχονται από αυτά.



Εικόνα 9-12. *Asteromonas gracilis*. Εικόνα 9. Εγκάρσια τομή x 3000. Εικόνα 10. Εγκάρσια τομή ενός κυτάρου, που μόλις έχει διαιρεθεί x 6000. Εικόνες 11 & 12. Δύο επιμήκεις τομές, που διέρχονται από το κέντρο του κυτάρου x 6000.

ΚΥΣΤΕΙΣ

Πολλές κύστεις (Εικόνα 13) με λεπτό τοίχωμα συχνά συσσωρεύονται στον πυθμένα μιας παλιάς καλλιέργειας. Δεν έχει βρεθεί κάποιο στοιχείο, που να συνδέει το σχηματισμό των κύστεων με την αναπαραγωγική διαδικασία. Τα κύτταρα που πρόκειται να σχηματίσουν κύστεις μεγεθύνονται σημαντικά, διατηρώντας σχετικά μικρό το πυρηνοειδές. Το τοίχωμα της κύστης (Εικόνα 14) μοιάζει αρχικά να επικάθεται, σαν ένα ασυνεχές στρώμα περιφερειακά του κυτταροπλάσματος, που στη συνέχεια λεπταίνει, ξεκινώντας από το εσωτερικό. Οι απόλυτα ώριμες κύστεις έχουν διάμετρο, που κυμαίνεται από 13 έως 18 μm και με πάχος τοιχώματος από 2 έως 3 μm .



Εικόνα 13. Κύστεις *Asteromonas gracilis*.



Εικόνα 14. *Asteromonas gracilis*. Τρία στάδια του σχηματισμού του τοιχώματος των κύστεων x 20.000

ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Tetraselmis sp.*

Τα κύτταρα αυτού του είδους είναι πράσινα, κινητά, σχήματος ωοειδούς. Το μέγεθος τους κυμαίνεται από 8 έως 12 μm. Διαθέτουν τέσσερα **μαστίγια** ιδίου μήκους, που εκφύονται από μία κοιλότητα στο μπροστινό τμήμα του κυττάρου. Η επιφάνειά τους καλύπεται με φολίδα. Ο **χλωροπλάστης** βρίσκεται και αυτός στο μπροστινό τμήμα, ενώ στη βάση του συναντάται το **πυρηνοειδές**, που περιβάλλεται με άμυλο. Στο κέντρο του κυττάρου βρίσκεται ο **πυρήνας** και η **οφθαλμική κηλίδα**. Τα κύτταρα συχνά συναθροίζονται (έως τέσσερα) και σχηματίζουν **κύστεις**. **Ψευδο-κύστεις** με πολλά διαδοχικά, λεία τοιχώματα, σχηματίζονται συχνά σε γερασμένες καλλιέργειες, όταν τα κύτταρα βρίσκονται στο μη κινητό στάδιο. Είναι κοσμοπολίτικοι οργανισμοί και ζουν σε παράκτια περιβάλλοντα.

Η καλλιέργειά της γίνεται σε θαλασσινό νερό, η συνήθης θερμοκρασία καλλιέργειας είναι οι $27 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ και θεωρείται ώριμη σε συγκέντρωση 1×10^3 κύτταρα/ml (Παπανδρουλάκης, Ν. κ.α., 1998).

ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ

Σύμφωνα με τον Άτλαντα Ταξινόμησης των Θαλάσσιων Φυτοπλαγκτονικών ειδών "**Atlas du Phytoplankton Marin**" (Chretiennot-Cinet, M.J.-1990), η συστηματική κατάταξη του είδους *Tetraselmis sp.* δίνεται παρακάτω:

Συνομοταξία-Φύλο: Phycophyta (Φύκη)

Ομοταξία-Κλάση: Prasinophyceae Christensen, sensu Moestrup & Thronksen, 1988

Τάξη: Chlorodendrales Fritsch, emend. Moestrup & Thronksen, 1988

Οικογένεια: Chlorodendraceae Oltmanns emend. Moestrup & Thronksen, 1988

Γένος: *Tetraselmis* Stein, 1878

Είδος: *Tetraselmis cordiformis* (Carter) Stein, 1878

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τα φυτοπλαγκτονικά είδη *Asteromonas gracilis* και *Tetraselmis sp.*, τα οποία προέρχονταν από τις αποθεματικές, μονοειδικές καλλιέργειες του εργαστηρίου.

Το νερό των καλλιεργειών ήταν τεχνητά παρασκευασμένο θαλασσινό νερό αλατότητας 35ppt, που προερχόταν από ανάμιξη φιλτραρισμένου νερού βρύσης με κατάλληλη ποσότητα άλατος INSTANT OCEAN® και περιείχε όλα τα απαιτούμενα στοιχεία και ιχνοστοιχεία του τυπικού θαλασσινού νερού. Η λίπανσή του πραγματοποιήθηκε με τη χρήση έτοιμων συμπλόκων αλάτων του τύπου F Media Algal Salt type II M&M USA. Φτιαχνόταν σε δοχεία τύπου carboys (Nalgene) των 25 lt, τα οποία στη συνέχεια αποστειρώνονταν στο αυτόκαυστο (120°C, 2 bar, SANYO Labo Autoclave).

Με βάση το σχεδιασμό του πειράματος, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Οκτώ κωνικές φιάλες (Erlenmeyer flasks) των 500 ml αποστειρώθηκαν στο αυτόκαυστο (120°C, 2 bar) και σε αυτές προστέθηκαν 250 ml θαλασσινό νερό. Στη συνέχεια οι τέσσερις εμβολιάστηκαν με 20 ml *Asteromonas gracilis* και οι υπόλοιπες τέσσερις με 20 ml *Tetraselmis sp.* Αφού οι φιάλες πωματίστηκαν με αποστειρωμένο βαμβάκι, για να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις, τοποθετήθηκαν σε αυτές αυτοκόλλητες ετικέτες, στις οποίες αναγράφονταν το φυτοπλαγκτονικό είδος, η ημερομηνία και ο αριθμός του δείγματος.

Οι οκτώ φιάλες μεταφέρθηκαν σε ειδικό θερμοθάλαμο (P SELECTA-Hotcold-GI), ο οποίος αρχικά ρυθμίστηκε να διατηρεί σταθερή τη θερμοκρασία των 20°C. Ο αερισμός διοχετευόταν στις καλλιέργειες σταθερά με τη βοήθεια αεραντλίας, η οποία ήταν τοποθετημένη στο εσωτερικό του. Ο φωτισμός γινόταν με λάμπες φθορισμού και η έντασή του στην επιφάνεια των δοχείων ήταν της τάξεως των 10.000 lux. Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν με τρόπο τέτοιο ώστε να δέχονται όλες την ίδια ένταση φωτός.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των φυτοπλαγκτονικών κυτάρων, με τη χρήση ειδικής πλάκας αιμοκυτομέτρου τύπου Fuchs-Rosenthal. Μικρή ποσότητα δείγματος από κάθε κωνική φιάλη τοποθετούνταν στο αιμοκυτόμετρο και καλυπτόταν με καλυπρίδα για προστασία. Σε περίπτωση που

η πυκνότητα των κυττάρων ήταν μεγάλη, το δείγμα αραιωνόταν για καλύτερη και γρηγορότερη καταμέτρηση.

Η αρραίωση γινόταν σε ειδικούς πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες, στους οποίους τοποθετούνταν ένα μέρος δείγματος και από ένα έως δεκατρία μέρη θαλασσινού νερού. Η ακινητοποίηση των κινούμενων φυτοπλαγκτονικών κυττάρων επιτυγχανόταν με την προσθήκη μικρής σταγόνας φορμόλης σε κάθε δείγμα.

Η πλάκα μεταφερόταν στο μικροσκόπιο για παρατήρηση και καταμέτρηση των κυττάρων με τη βοήθεια μετρητή χειρός. Η καταμέτρηση πραγματοποιούνταν και στα δύο πλαίσια του αιμοκυττόμετρου (πάνω και κάτω). Ο προσδιορισμός της πυκνότητας των κυττάρων γινόταν με τη χρησιμοποίηση της σχέσης:

$$\text{Αριθμός κυττάρων/ml} = (n_1 + n_2) / 2 \times 10^3 \times d$$

όπου:

n_1 = αριθμός κυττάρων που καταμετρήθηκαν στο πάνω πλαίσιο,

n_2 = αριθμός κυττάρων που καταμετρήθηκαν στο κάτω πλαίσιο,

d = συντελεστής αρραίωσης του δείγματος.

Η καταμέτρηση της πυκνότητας των φυτοπλαγκτονικών κυττάρων επαναλαμβανόταν κάθε δύο ημέρες για χρονικό διάστημα εννέα ημερών. Συνολικά δηλαδή οι μετρήσεις που παίρνονταν ήταν πέντε για κάθε δείγμα (την ημέρα Νο1, 3, 5, 7, 9).

Η πειραματική αυτή διαδικασία πραγματοποιήθηκε άλλες τρεις φορές με τον ίδιο ακριβώς τρόπο και με τη διαφορά ότι η θερμοκρασία στο θερμοθάλαμο αυξανόταν κάθε φορά κατά 5°C (δηλαδή 20°C, 25°C, 30°C και 35°C).

Για να μελετηθεί η ανάπτυξη της εκάστοτε καλλιέργειας υπολογίστηκε ο ειδικός ρυθμός αύξησης (μ) καθώς και ο χρόνος γενεάς (t_g), των οποίων οι τύποι δίνονται παρακάτω:

$$\mu = (\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1)$$

$$t_g = 0,6931 / \mu$$

όπου:

x_1 = μετρηθείσες πυκνότητες φυτοπλαγκτού σε χρόνο t_1

x_2 = μετρηθείσες πυκνότητες φυτοπλαγκτού σε χρόνο t_2

t = χρόνος σε ημέρες

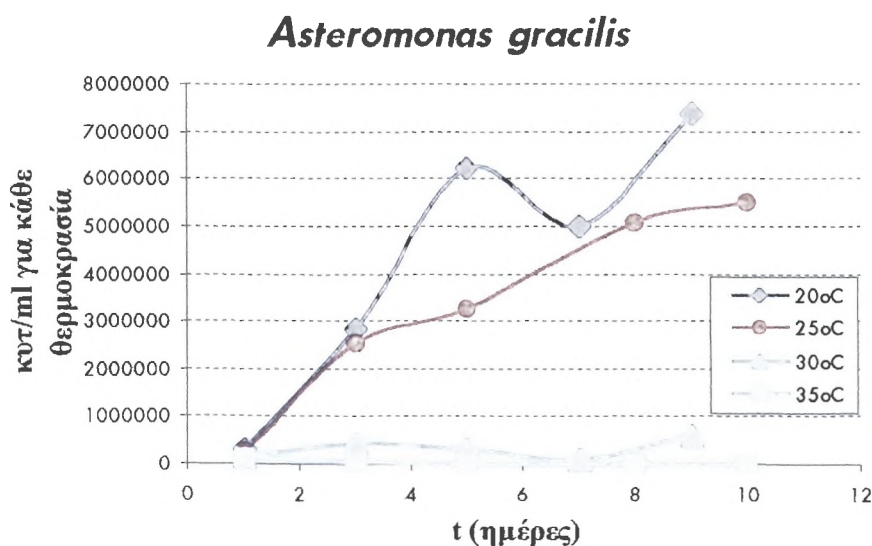
Χρόνος γενεάς (t_g) είναι ο χρόνος που απαιτήθηκε για τα κύτταρα να διαιρεθούν (σε ημέρες).

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών Ιχθύων Θαλάσσης και Υφαλμύρων Υδάτων στο τμήμα Παραγωγής Φυτοζωοπλαγκτού του ΤΕΙ Μεσολογγίου κατά το χρονικό διάστημα από 25.03.2000 έως 17.05.2000.

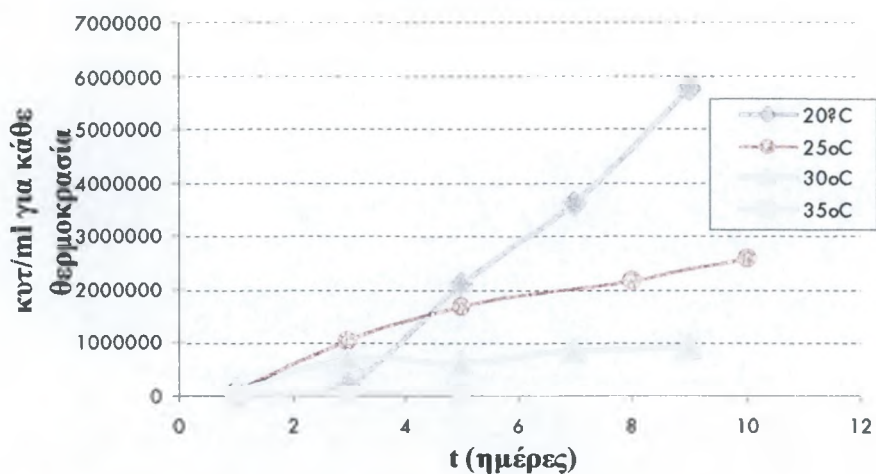
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αφού πραγματοποιήθηκε η καταμέτρηση των φυτοπλαγκτονικών κυττάρων και για τα πέντε δείγματα κάθε είδους, σε θερμοκρασία καλλιέργειας 20°C, 25°C, 30°C και 35°C, υπολογίστηκε η πυκνότητά τους (κύτταρα/ml), μελετήθηκε ο ειδικός ρυθμός αύξησης (μ) και ο χρόνος γενεάς (t_g), που αποτελούν βασικά χαρακτηριστικά της εκάστοτε καλλιέργειας.

Στα παρακάτω γραφήματα δίνεται η πυκνότητα των κυττάρων κάθε είδους σε σχέση με το χρόνο στις εξεταζόμενες θερμοκρασίες καλλιέργειας.



Σχήμα 1. Μεταβολή της πυκνότητας (κυτ/ml) του είδους *Asteromonas gracilis* σε σχέση με το χρόνο. Η ημέρα 1 θεωρείται η ημέρα εισαγωγής των φυτοπλαγκτονικών κυττάρων στο μέσο καλλιέργειας. Ανά δύο ημέρες πραγματοποιήθηκαν 5 μετρήσεις.

Tetraselmis sp.

Σχήμα 2. Μεταβολή της πυκνότητας (κυτ/ml) του είδους *Tetraselmis sp.* σε σχέση με το χρόνο. Η ημέρα 1 θεωρείται η ημέρα εισαγωγής των φυτοπλακτονικών κυττάρων στο μέσο καλλιέργειας. Ανά δύο ημέρες πραγματοποιήθηκαν 5 μετρήσεις.

Με τη βοήθεια των γραφημάτων μπορεί να γίνει μια πρώτη σύγκριση της ανάπτυξης κάθε φύκους στις διάφορες θερμοκρασίες (20°C, 25°C, 30°C και 35°C).

Το συμπέρασμα που προκύπτει με μια πρώτη παρατήρηση, είναι ότι η ανάπτυξη των φυτοπλακτονικών κυττάρων σαφώς και επηρεάζεται από τη θερμοκρασία. Ανάλογα με την τιμή της θερμοκρασίας, η πυκνότητα των κυττάρων μεταβάλλεται ποικιλοτρόπως.

Συγκεκριμένα το είδος *Asteromonas gracilis* παρουσιάζει το μέγιστο ρυθμό αύξησης της πυκνότητας των κυττάρων του στους 20°C. Από την ημέρα 1 έως την ημέρα 5 η κλίση της καμπύλης είναι πολύ μεγάλη, γεγονός που σημαίνει ότι σε αυτό το χρονικό διάστημα, παρατηρείται πολύ έντονη ανάπτυξη. Πράγματι από 283.500 κυτ/ml που υπήρχαν την ημέρα 1 (ημέρα εισαγωγής των φυτοπλακτονικών κυττάρων στο μέσο καλλιέργειας), την ημέρα 5 η πυκνότητα του φύκους υπολογίστηκε ότι ήταν 6.225.000 κυτ/ml. Είχε δηλαδή μια αύξηση της τάξεως του 2.100% (2.096%). Στη συνέχεια, όμως παρουσίασε μια μικρή σχετικά πτώση (5.002.500 κυτ/ml) για να φτάσει τελικά την τελευταία ημέρα (9^η ημέρα) σε πυκνότητα 7.345.000 κυτ/ml. Αυτή (**7.345.000 κυτ/ml**) ήταν και η μέγιστη πυκνότητα, που παρατηρήθηκε στο φύκος *Asteromonas gracilis* σε όλες τις θερμοκρασίες.

Σημαντικό όμως ρυθμό αύξησης της πυκνότητας των κυττάρων παρουσίασε και στους 25°C. Στη θερμοκρασία αυτή αν και η πυκνότητα αυξανόταν σταθερά μέρα με τη μέρα, δεν παρατηρήθηκαν τόσο μεγάλες τιμές όπως στους 20°C. Η μέγιστη τιμή σε αυτή τη θερμοκρασία ήταν 5.496.000 κυτ/ml. Συγκρίνοντας την καμπύλη των 25°C με αυτή των 20°C, διαπιστώνουμε πως από την ημέρα 1 έως την ημέρα 3 έχουν την ίδια σχεδόν κλίση. Δηλαδή τη χρονική αυτή περίοδο τα φυτοπλαγκτονικά κύτταρα παρουσιάζουν την ίδια περίπου ανάπτυξη.

Στους 30°C η αύξηση της πυκνότητας των κυττάρων ήταν πολύ μικρή σχετικά με αυτή που παρουσιάστηκε στους 20°C και στους 25°C. Από 126.000 κυτ/ml που υπήρχαν την ημέρα 1, την ημέρα 9 η πυκνότητα του φύκους υπολογίστηκε ότι ήταν 578.400 κυτ/ml. Δηλαδή σε χρονικό διάστημα 8 ημερών πραγματοποιήθηκε αύξηση της πυκνότητας των κυττάρων κατά 360%.

Τέλος όσον αφορά τους 35°C η πυκνότητα των κυττάρων (118.000 κυτ/ml) την ημέρα 1 διαρκώς ελαττωνόταν, με εξαίρεση μια μηδαμινή αύξηση κατά την τελευταία μέτρηση (από 400 σε 500 κυτ/ml). Διαπιστώνουμε δηλαδή πως μια καλλιέργεια του φύκους *Asteromonas gracilis* στους 35°C, θα ήταν εντελώς ανώφελη για μια παραγωγική μονάδα.

Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά της *Asteromonas gracilis* παρουσίασε και η *Tetraselmis sp.* Στους 20°C παρουσιάζει το μέγιστο ρυθμό αύξησης της πυκνότητας των κυττάρων του. Την ημέρα 1 η πυκνότητα ήταν 8.250 κυτ/ml και με το πέρας 8 ημερών (9^η ημέρα) έφτασε τα 5.745.000 κυτ/ml. Αυτή (5.745.000 κυτ/ml) ήταν και η μέγιστη πυκνότητα, που παρατηρήθηκε στο φύκος *Tetraselmis sp.* σε όλες τις θερμοκρασίες. Μια καλλιέργεια του είδους *Tetraselmis sp.* θεωρείται ώριμη, όταν η πυκνότητα των κυττάρων είναι της τάξεως των 1×10^6 κύτταρα/ml (Παπανδρουλάκης κ.α., 1998).

Στους 25°C η κλίση της καμπύλης δεν είναι τόσο μεγάλη, όσο αυτή των 20°C, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στη συγκεκριμένη θερμοκρασία η ανάπτυξη των φυτοπλαγκτονικών κυττάρων δεν είναι τόσο έντονη, συγκρινόμενη με αυτή στους 20°C. Παρόλα αυτά η πυκνότητα αυξανόταν σταθερά μέρα με τη μέρα, για να φτάσει τελικά στη μέγιστη τιμή για αυτή τη θερμοκρασία την ημέρα 9 στα 2.602.500 κυτ/ml.

Στους 30°C η ανάπτυξη του φύκους ήταν ανομοιόμορφη και αυτό γιατί ενώ από την ημέρα 1 έως την ημέρα 3 παρουσιάζε αυξητική τάση, στη συνέχεια από την ημέρα 3 έως την ημέρα 5 η πυκνότητα των φυτοπλαγκτονικών κυττάρων μειώθηκε (από 711.250 σε 647.500). Κατά το χρονικό διάστημα από την ημέρα 5 έως την ημέρα 7 η πυκνότητα αυξήθηκε, για να φτάσει τελικά την ημέρα 9 στη μέγιστη τιμή για αυτή τη θερμοκρασία στα 945.000 κυτ/ml.

Στους 35°C η αρχική πυκνότητα (37.000 κυτ/ml) συνεχώς μειωνόταν έως την ημέρα 5. Την ημέρα αυτή παρατηρήθηκε μία ασυνήθιστη αλλαγή στο χρώμα των κυττάρων, που από έντονα πράσινα έγιναν ανοικτόχρωμα πράσινα, σχεδόν διαφανή με πολύ ελάχιστες εξαιρέσεις. Επιπλέον τα κύτταρα παρουσίαζαν ασυνήθιστα μεγάλο μέγεθος.

Την ημέρα 8 τα κύτταρα έγιναν έντονα πράσινα στο χρώμα και πολύ μικρά σε μέγεθος, συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά κύτταρα, φαινόμενο που συνεχίστηκε έως και την ημέρα 10. Κάτι ανάλογο έχει ξανααναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία (Kessler, 1985). Σύμφωνα με τον Kessler παρουσιάστηκαν σε στελέχη της *Chlorella zofingiensis* και της *Chlorella protothecoides* ασυνήθιστες αλλαγές στην απόχρωση των κυττάρων σε ακραίες θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα τα στελέχη της *Chlorella zofingiensis* στην ανώτατη θερμοκρασία ανάπτυξής τους (28 °C) είχαν πορτοκαλί απόχρωση, ενώ το φυσιολογικό τους χρώμα είναι το πράσινο. Όμοια τα στελέχη της *Chlorella protothecoides*, τα οποία ήταν πράσινα, χρωματίστηκαν άσπρα στους 28 °C.

Τέλος συγκρίνοντας το γράφημα της μεταβολής της πυκνότητας (κυτ/ml) σε σχέση με το χρόνο του είδους *Tetraselmis sp.* με αυτό του είδους *Asteromonas gracilis* καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

- Στους 35°C οι συνθήκες καλλιέργειας δεν είναι ευνοϊκές ούτε για το φύκος *Tetraselmis sp.* ούτε για το *Asteromonas gracilis*.
- Στους 20°C η επί τοις εκατό αύξηση της πυκνότητας των κυττάρων για το φύκος *Asteromonas gracilis* ήταν 2.490%, ενώ για το *Tetraselmis sp.* 69.535%. Αντίστοιχα στους 30°C 360% και 476% και στους 25°C 1.955% και 1.965%.

Στους πίνακες που ακολουθούν, δίνονται οι μέσοι όροι των ειδικών ρυθμών αύξησης (μ) και των χρόνων γενεάς (t_g) των φυτοπλαγκτονικών κυττάρων του φύκου *Asteromonas gracilis* και του *Tetraselmis sp.* σε θερμοκρασία καλλιέργειας 20°C, 25°C, 30°C και 35°C.

		<i>Asteromonas gracilis</i>			
		Ειδικός ρυθμός αύξησης (μ)			
Χρονικό διάστημα		20°C	25°C	30°C	35°C
1 ^η -3 ^η ημέρα		1,15	1,13	0,59	-0,71
3 ^η -5 ^η ημέρα		0,39	0,13	-0,18	-1,22
5 ^η -7 ^η ημέρα		-0,1	0,15	-0,61	-0,61
7 ^η -9 ^η ημέρα		0,19	0,04	0,96	0,11

Πίνακας 1. Μέσοι όροι των ειδικών ρυθμών αύξησης (μ) των φυτοπλαγκτονικών κυττάρων του φύκου *Asteromonas gracilis* σε θερμοκρασία καλλιέργειας 20°C, 25°C, 30°C και 35°C.

		<i>Asteromonas gracilis</i>			
		Χρόνος γενεάς (t_g)			
Χρονικό διάστημα		20°C	25°C	30°C	35°C
1 ^η -3 ^η ημέρα		0,6	0,62	1,17	-0,98
3 ^η -5 ^η ημέρα		1,76	5,48	-3,88	-0,57
5 ^η -7 ^η ημέρα		-6,36	4,72	-1,14	-1,13
7 ^η -9 ^η ημέρα		3,62	18	0,73	6,16

Πίνακας 2. Μέσοι όροι των χρόνων γενεάς (t_g) των φυτοπλαγκτονικών κυττάρων του φύκου *Asteromonas gracilis* σε θερμοκρασία καλλιέργειας 20°C, 25°C, 30°C και 35°C.

		<i>Tetraselmis sp.</i>			
		Ειδικός ρυθμός αύξησης (μ)			
Χρονικό διάστημα		20°C	25°C	30°C	35°C
1 ^η -3 ^η ημέρα		1,63	1,06	0,73	-0,02
3 ^η -5 ^η ημέρα		1,14	0,24	-0,05	-0,16
5 ^η -7 ^η ημέρα		0,27	0,08	0,15	
7 ^η -9 ^η ημέρα		0,23	0,09	0,04	

Πίνακας 3. Μέσοι όροι των ειδικών ρυθμών αύξησης (μ) των φυτοπλαγκτονικών κυττάρων του φύκου *Tetraselmis sp.* σε θερμοκρασία καλλιέργειας 20°C, 25°C, 30°C και 35°C.

<i>Tetraselmis sp.</i>				
Χρόνος γενεάς (t_g)				
Χρονικό διάστημα	20°C	25°C	30°C	35°C
1 ^η -3 ^η ημέρα	0,43	0,65	0,94	-46,2
3 ^η -5 ^η ημέρα	0,61	2,88	-14,75	-4,43
5 ^η -7 ^η ημέρα	2,53	8,77	4,52	
7 ^η -9 ^η ημέρα	3,01	7,62	19,52	

Πίνακας 4. Μέσοι όροι των χρόνων γενεάς (t_g) των φυτοπλαγκτονικών κυττάρων του φύκους *Tetraselmis sp.* σε θερμοκρασία καλλιέργειας 20°C, 25°C, 30°C και 35°C.

Παρατηρώντας τους πίνακες 1,2,3,4 καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

- Στους 25°C τόσο στο φύκος *Asteromonas gracilis* όσο και στο *Tetraselmis sp.* οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης (μ) παρουσιάζουν θετικές τιμές σε όλες τις ημέρες. Στη θερμοκρασία αυτή παρατηρείται μια πιο ομοιόμορφη συμπεριφορά των κυττάρων σε σχέση με τις υπόλοιπες θερμοκρασίες.

- Ο μέγιστος ρυθμός αύξησης (**1,63**) παρατηρήθηκε στο φύκος *Tetraselmis sp.*, σε θερμοκρασία 20°C, το χρονικό διάστημα από την 1^η έως την 3^η ημέρα. Ακολουθούν οι τιμές **1,15**, **1,14**, **1,13**, οι οποίες παρουσιάστηκαν αντίστοιχα στο φύκος *Asteromonas gracilis*, σε θερμοκρασία 20°C, το χρονικό διάστημα από την 1^η έως την 3^η ημέρα, στο φύκος *Tetraselmis sp.*, σε θερμοκρασία 20°C, το χρονικό διάστημα από την 3^η έως την 5^η ημέρα, στο φύκος *Asteromonas gracilis*, σε θερμοκρασία 25°C, το χρονικό διάστημα από την 1^η έως την 3^η ημέρα.

- Συγκρίνοντας όλες τις θερμοκρασίες, βλέπουμε πως οι βέλτιστες τιμές του ειδικού ρυθμού αύξησης και του χρόνου γενεάς, τόσο στο φύκος *Asteromonas gracilis* όσο και στο *Tetraselmis sp.* παρουσιάζονται στους 20°C.

- Τέλος, όπως είδαμε και από τα γραφήματα, οι 35°C δεν είναι κατάλληλοι για την καλλιέργεια των φυκών, αφού ο ειδικός ρυθμός αύξησης παρουσίαζε αρνητικές τιμές (η αρνητική τιμή υποδηλώνει πως δεν υπήρχε αύξηση, αλλά μείωση).

Στη συνέχεια και με σκοπό να διαπιστώσουμε αν οι διαφορές, που παρουσιάζονται στους ειδικούς ρυθμούς αύξησης στις διάφορες θερμοκρασίες στα δύο φύκη είναι στατιστικά σημαντικές, πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του προγράμματος STATGRAPHICS PLUS®.

Πρωταρχικά μελετήθηκαν οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων για κάθε θερμοκρασία, τόσο στο φύκος *Asteromonas gracilis*, όσο και στο *Tetraselmis sp.*, για να διαπιστώσουμε αν οι τιμές από δείγμα σε δείγμα έχουν στατιστικές διαφορές. Πραγματοποιήθηκαν «Πολλαπλές Συγκρίσεις-Multiple Comparisons» των δειγμάτων για κάθε θερμοκρασία και φύκος. Οι συγκρίσεις που έγιναν είναι οι εξής:

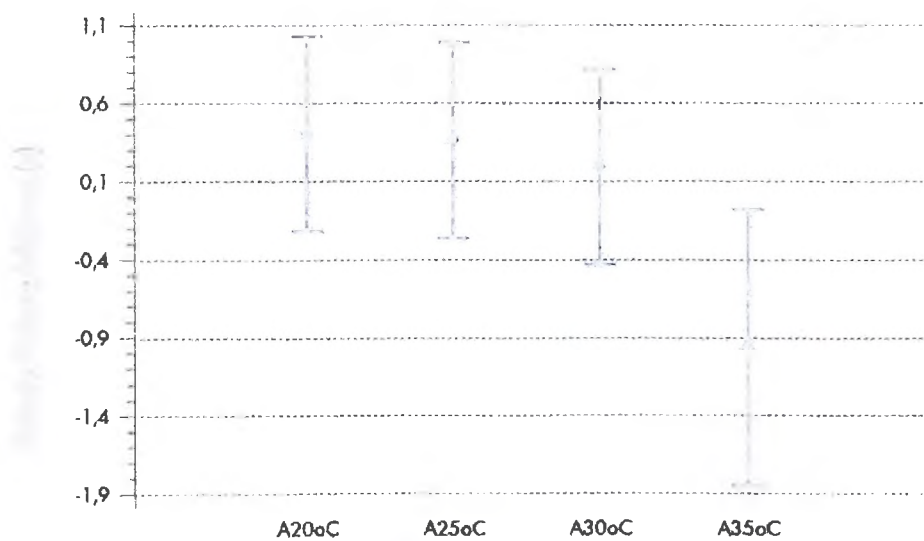
- Μεταξύ των 4 δειγμάτων του φύκους *Asteromonas gracilis* στους 20°C.
- Μεταξύ των 5 δειγμάτων του φύκους *Asteromonas gracilis* στους 25°C.
- Μεταξύ των 5 δειγμάτων του φύκους *Asteromonas gracilis* στους 30°C.
- Μεταξύ των 5 δειγμάτων του φύκους *Asteromonas gracilis* στους 35°C.
- Μεταξύ των 3 δειγμάτων του φύκους *Tetraselmis sp.* στους 20°C.
- Μεταξύ των 4 δειγμάτων του φύκους *Tetraselmis sp.* στους 25°C.
- Μεταξύ των 3 δειγμάτων του φύκους *Tetraselmis sp.* στους 30°C.
- Μεταξύ των 5 δειγμάτων του φύκους *Tetraselmis sp.* στους 35°C.

Η διαδικασία των πολλαπλών συγκρίσεων που εφαρμόστηκε, έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ οποιονδήποτε δειγμάτων σε όριο εμπιστοσύνης 95%. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τη σύγκριση των δειγμάτων είναι η **Tukey's Honestly Significant Difference (HSD)**. Οι τυπικές αποκλίσεις των δειγμάτων δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όριο εμπιστοσύνης 95%.

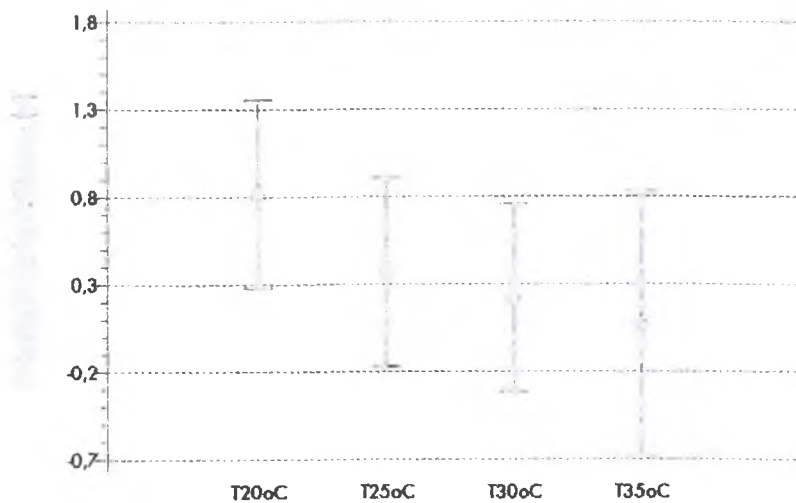
Επειδή τα δείγματα σε κάθε περίπτωση δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, πραγματοποιήθηκαν «Πολλαπλές Συγκρίσεις-Multiple Comparisons» για κάθε φύκος ξεχωριστά, σε όλες τις θερμοκρασίες. Δηλαδή συγκρίθηκαν για κάθε φύκος οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης στις εξεταζόμενες θερμοκρασίες (20°C, 25°C, 30°C και 35°C).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι τιμές του ειδικού ρυθμού αύξησης δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές και για τα δύο φύκη σε όριο εμπιστοσύνης 95%. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τη σύγκριση των καταστάσεων είναι η **Tukey's Honestly Significant Difference (HSD)**. Οι τυπικές

αποκλίσεις των δειγμάτων δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όριο εμπιστοσύνης 95%. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ανάπτυξη κάθε φύκους δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά στις θερμοκρασίες 20°C, 25°C, 30°C και 35°C. Τα παραπάνω τεκμηριώνονται και από το παρακάτω σχήμα, τη γραφική αποτύπωση των μέσων των δειγμάτων (Means and 95.0 Percent Tukey HSD Interval). Οι bars των δειγμάτων επικαλύπτονται, γεγονός που μας υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους.



Σχήμα 3. Γραφική αποτύπωση των μέσων των δειγμάτων του φύκους *Asteromonas gracilis* σε όριο εμπιστοσύνης 95%.

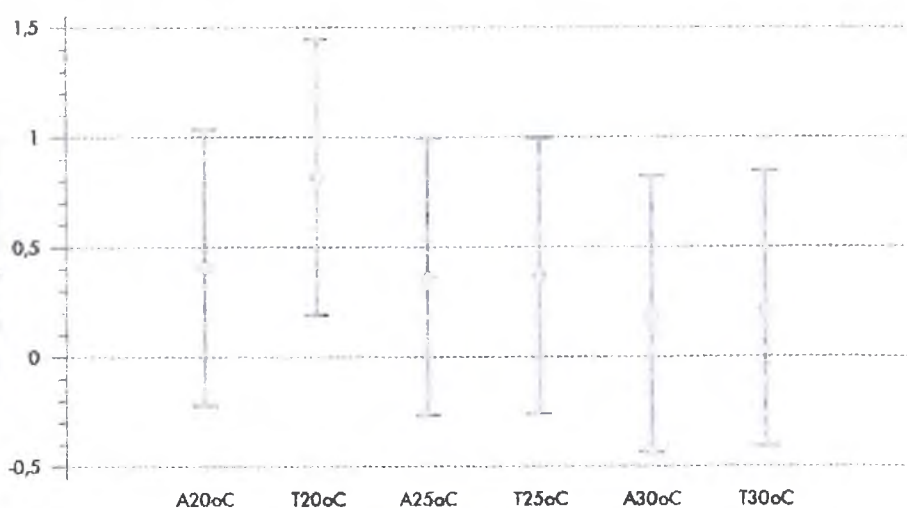


Σχήμα 4. Γραφική αποτύπωση των μέσων των δειγμάτων του φύκους *Tetraselmis sp.* σε όριο εμπιστοσύνης 95%.

Συνεπώς αφού καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι σε διαφορετικές θερμοκρασίες καλλιέργειας τα φύκη δεν παρουσιάζουν, στατιστικά σημαντική, διαφορετική ανάπτυξη, εξετάσαμε και τους ειδικούς ρυθμούς αύξησης μεταξύ των δύο φυκών σε όλες τις θερμοκρασίες. Πραγματοποιήθηκαν «Πολλαπλές Συγκρίσεις-Multiple Comparisons» των ειδικών ρυθμών αύξησης των φυκών σε κάθε θερμοκρασία.

Μεταξύ οποιασδήποτε από τις εξεταζόμενες θερμοκρασίες καλλιέργειας 20°C, 25°C, 30°C δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο φυκών. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τη σύγκριση των καταστάσεων είναι η **Tukey's Honestly Significant Difference (HSD)**. Οι τυπικές αποκλίσεις των δειγμάτων δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όριο εμπιστοσύνης 95%. Από τα παραπάνω καταλήγουμε στο ότι τα δύο φύκη δεν παρουσιάζουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντική διαφορά στους ειδικούς ρυθμούς αύξησής τους, στις εξεταζόμενες θερμοκρασίες καλλιέργειας.

Παρακάτω δίνεται η γραφική αποτύπωση των μέσων των ειδικών ρυθμών αύξησης (Means and 95.0 Percent Tukey HSD Interval) στις θερμοκρασίες 20°C, 25°C, 30°C. Οι bars των δειγμάτων επικαλύπτονται, γεγονός που μας υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει σπουδαία στατιστική διαφορά μεταξύ τους.

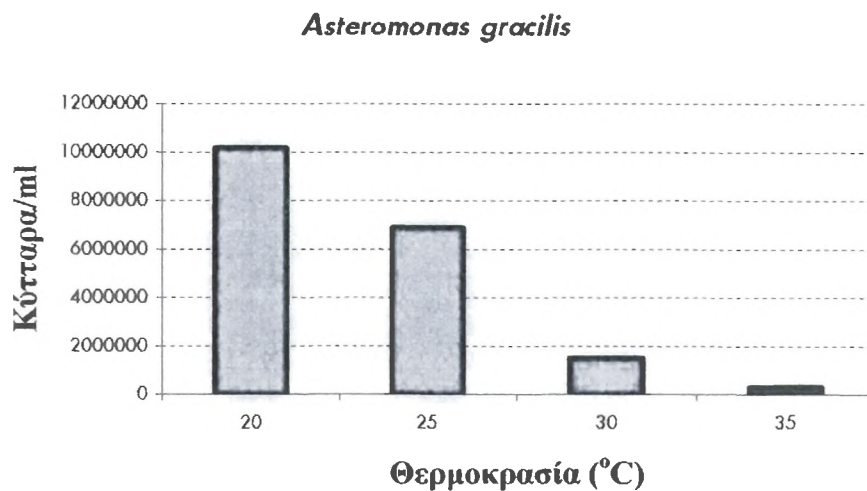


Σχήμα 5. Γραφική αποτύπωση των μέσων των δειγμάτων των φυκών *Asteromonas gracilis* και *Tetraselmis sp.* σε όριο εμπιστοσύνης 95%.

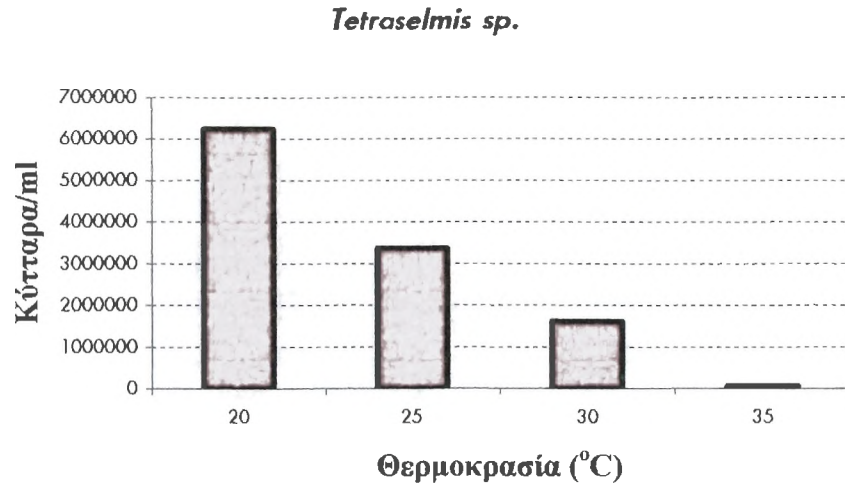
Συγκρίνοντας τη γραφική αποτύπωση των μέσων των ειδικών ρυθμών αύξησης των δύο φυκών στις θερμοκρασίες 20°C, 25°C, 30°C με αυτή του φύκου *Asteromonas gracilis* σε όλες τις θερμοκρασίες καλλιέργειας (20°C, 25°C, 30°C, 35°C), διαπιστώνουμε πως η βαρ της *Asteromonas gracilis* στους 35°C δεν επικαλύπτεται με αυτή της *Tetraselmis sp.* στους 20°C. Έτσι οδηγούμαστε στο συμπέρασμα, ότι υπάρχει σπουδαία στατιστική διαφορά μεταξύ των δύο περιπτώσεων. Οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης σαφώς και παρουσιάζουν καλύτερες τιμές στους 20°C για το φύκος *Tetraselmis sp.*, σε σύγκριση με το φύκος *Asteromonas gracilis* στους 35°C.

Συμπερασματικά καταλήγουμε, πως τόσο η θερμοκρασία καλλιέργειας όσο και το είδος των φυτοπλακτονικών κυττάρων παίζουν σπουδαίο ρόλο στην επιτυχή καλλιέργεια φυκών.

Τέλος στα ακόλουθα σχήματα παριστάνονται γραφικά οι μέγιστες πυκνότητες, που εμφανίστηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος στα διάφορα δείγματα κάθε φύκου, σε κάθε θερμοκρασία.



Σχήμα 6. Μέγιστες πυκνότητες (κύτταρα/ml) του φύκου *Asteromonas gracilis* στις θερμοκρασίες 20°C, 25°C, 30°C, 35°C.



Σχήμα 7. Μέγιστες πυκνότητες (κύτταρα/ml) του φύκους *Tetraselmis sp.* στις θερμοκρασίες 20°C, 25°C, 30°C, 35°C.

Ολοκληρώνοντας, μπορούμε ανεπιφύλακτα να θεωρήσουμε τη θερμοκρασία των 25°C ως όριο για την επιτυχή μαζική παραγωγή αυτών των μικροφυκών. Επιπρόσθετα μπορούμε να συστήσουμε τη χρησιμοποίηση της θερμοκρασίας των 20°C ως θερμοκρασία καλλιέργειας, που αφενός επιτρέπει τη μέγιστη απόδοση σε κύτταρα στον ελάχιστο δυνατό χρόνο και -ως είναι φυσικό- με τη λιγότερη δυνατή κατανάλωση ενέργειας για θέρμανση του νερού.

ΜΕΡΟΣ Β.

ΠΕΙΡΑΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΡΟΧΟΖΩΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Brachionus plicatilis*

Τα τροχοζώα πρωτοανακαλύφθηκαν πριν από περίπου 200 χρόνια από τον Leeuwenhoek, ο οποίος σπριζόμενος στην αντοχή τους στην ξηρασία, εξύμνησε τους θαυμάσιους μηχανισμούς της φύσης για την επιβίωση των ειδών.

Αρκετά χρόνια αργότερα και με την εμφάνιση των υδατοκαλλιεργειών, δημιουργήθηκε η ανάγκη εύρεσης ενός ζωοπλακτονικού οργανισμού για την κάλυψη των ειδικών διατροφικών αναγκών των νυμφών των ψαριών, κατά τη φάση που ακολουθεί την απορρόφηση του λεκιθικού τους σάκου. Τα τροχοζώα κρίθηκαν ως τα καταλληλότερα, καθώς χαρακτηρίζονται από τα παρακάτω βασικά γνωρίσματα:

- Μέγεθος μικρότερο από 400μ., το οποίο ανταποκρίνεται στο μέγεθος του στόματος των νυμφών κατά τις 15 περίπου πρώτες ημέρες της ζωής τους.
- Ικανοποιητική πλευστότητα, ώστε να είναι δυνατή η σύλληψη και καταβρόχθιση από τις νύμφες.
- Ευκολία συγκομιδής ή καλλιέργειας σε θαλασσινό περιβάλλον, ώστε να είναι διαθέσιμα την κατάλληλη στιγμή και σε ικανοποιητικές ποσότητες.

Από τη συνομοταξία των τροχοζώων το είδος που καθιερώθηκε στις υδατοκαλλιέργειες είναι το *Brachionus plicatilis* (Φωτογραφία 1), το οποίο παρά το γεγονός ότι αρχικά χαρακτηρίστηκε ως οργανισμός επιβλαβής στην καλλιέργεια των χελιών σε τεχνητές υδατοσυλλογές στην δεκαετία του '50 και '60, σύντομα Ιάπωνες επιστήμονες ανακάλυψαν τη ότι το είδος αυτό καλύπτει πλήρως τις ανάγκες διατροφής των νυμφών εξαιτίας:

- α) Της θρεπτικής του αξίας.
- β) Του μικρού του μεγέθους (100-350μ.).



Φωτογραφία 2. Άτομα του είδους *Brachionus plicatilis*

- γ) Της αργής, κανονικής και ευθύγραμμης κίνησής του, η οποία δίνει στις νύμφες των ψαριών τη δυνατότητα να το συλλάβουν εύκολα.
- δ) Της γρήγορης ανάπτυξής του σε συνθήκες καλλιέργειας.
- ε) Της προσαρμοστικότητάς του σε ποικίλα θρεπτικά υποστρώματα.
- στ) Της αντοχής που παρουσιάζει σε μεγάλο εύρος διακυμάνσεων των περιβαλλοντικών συνθηκών
- ζ) Του υψηλού ρυθμού αναπαραγωγής του (0,7-1,4 απόγονοι . θηλυκό⁻¹ . ημέρα⁻¹)
- η) Της δυνατότητας εμπλουτισμού του με κατάλληλα σκευάσματα, που περιέχουν ουσίες, όπως: αντιβιοτικά, βιταμίνες, απαραίτητα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (HUFAs) των σειρών 20:5ω3 (EPA) ή 22:6ω3 (DHA)

Η επιτυχημένη χρήση των τροχοζώων ως ζωντανή τροφή για την παραγωγή αρχικά της κόκκινης τσιπούρας (*Pagrus major*), ενθάρρυνε την έρευνα για την ανάπτυξη διαφόρων τεχνικών μαζικής καλλιέργειας τους. Εικοσιπέντε χρόνια μετά την πρώτη χρησιμοποίηση των τροχοζώων ως τροφή στις νυμφικές καλλιέργειες, πολλές και διαφορετικές τεχνικές εντατικής παραγωγής τους εφαρμόζονται σε όλο τον κόσμο.



Φωτογραφία Β.
Brachionus plicatilis

Έτσι σήμερα το τροχοζώο *Brachionus plicatilis* θεωρείται ως η σπουδαιότερη πρώτη ζωντανή τροφή για τις μικρές λάρβες όλων των θαλάσσιων ειδών ψαριών στην υδατοκαλλιέργεια (Lubzens, 1987; Berghahm et al., 1990, αναφέρεται από Bengoa-Ruigomez et al., 1995), καθώς χαρακτηρίζεται ως ελκυστική και θρεπτική, μικρή, λεία (Yufera, 1982; Lubzens, 1989, αναφέρεται από Bengoa-Ruigomez et al., 1995), εύκολη στην αναπαραγωγή (Hirata & Funamoto, 1983, αναφέρεται από Bengoa-Ruigomez et al., 1995) και τον εμπλουτισμό με κατάλληλες θρεπτικές ουσίες (Watanabe et al., 1983, αναφέρεται από Bengoa-Ruigomez et al., 1995).

Η διαθεσιμότητα μεγάλων ποσοτήτων της πηγής αυτής ζωντανής τροφής έχει συμβάλλει στην επιτυχημένη παραγωγή, περισσότερων από 60 ειδών θαλάσσιων ιχθύων και 18 ειδών οστρακόδερμων μέχρι σήμερα.

ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ

Συνομοταξία: Rotifera (Rotatoria)

Ομοταξία: Monogononta

Τάξη: Ploima

Οικογένεια: Brachionidae

Γένος: *Brachionus*

Είδος: *Brachionus plicatilis*

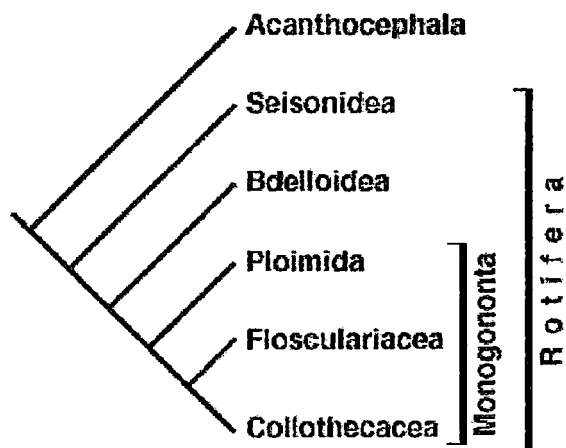
Στη φύση συναντώνται πάνω από 2000 είδη τροχοζώων, τα οποία κατατάσσονται σε τρεις κύριες ομοταξίες (Σχήμα 18):

α. Seisonidea

β. Bdelloidea

γ. Monogononta

Στην ομοταξία Seisonidea συμπεριλαμβάνονται δύο θαλάσσια είδη. Στην ομοταξία Bdelloidea ανήκουν περισσότερα από 360 είδη. Τα είδη αυτής της ομοταξίας υφίστανται μια διαδικασία που ονομάζεται **ανυδροβίωση**, που είναι η ικανότητα να ανέχονται την ξηρασία στο περιβάλλον τους και στη συνέχεια να επανέρχονται. Η ομοταξία Monogononta περιλαμβάνει πάνω από 1600 είδη, βενθικά ή ελεύθερα κολυμβητικά.



Σχήμα 18. Ομοταξίες τροχοζώων.

ΚΛΕΙΔΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ

Σύμφωνα με την Agnes Ruttner - Kolisko, η οικογένεια των Brachionidae περιλαμβάνει συνολικά τέσσερα γένη. Αυτά είναι:

1. *Rhinoglena* (EHRENBERG, 1853)
2. *Eriphanes* (EHRENBERG, 1832)
3. *Brachionus* (PALLAS, 1776)
4. *Platyas* (HARRING, 1913)

Στο γένος *Brachionus*, ο προσδιορισμός των ειδών βασίζεται σε δεκατρία (13) χαρακτηριστικά γνωρίσματα, που αναφέρονται παρακάτω:

1. Πάντα 6 κοντές, κωνικές βελόνες στο μπροστινό μέρος της Ιογίκα· οι μεσαίες βελόνες μακρύτερες ή όλες ίδιου μεγέθους.
2. 6 (σπανιότερα 4) λίγο μακριές, μυτερές βελόνες στο ραχιαίο μπροστινό μέρος· οι μεσαίες (σπανιότερα πλευρικές) βελόνες μακρύτερες.
3. Απαντώνται πάντα 2 μικρές, μυτερές, μεσαίες βελόνες· οι πλευρικές ή οι κάτω μεσαίες βελόνες έχουν μήκος που ποικίλλει ή απουσιάζουν τελείως.
4. Πάντα 4 ραχιαίες βελόνες, ποικίλου μήκους και σχήματος στο μπροστινό τμήμα.
5. Προεξέχον αγωγός στη βάση του πόδα, με ή χωρίς βελόνες.
6. Πόδας χωρίς προεξοχές, αλλά με 2 συχνά πολύ μακριές βελόνες.
7. Ομαλή βάση του πόδα, κάποιες φορές με μικρές βελόνες ή δύο μαλακές προεξοχές.
8. Σώμα περισσότερο ή λιγότερο ορθογώνιο, οι οπίσθιες γωνίες έχουν επιμηκυνθεί σε βελόνες.
9. Σώμα οβάλ, ελαφρώς πεπιεσμένο ραχαιοκοιλιακά.
10. Σώμα ασκοειδές.
11. Πόδας που φέρει κωνικούς δάκτυλους.
12. Πόδας ελαφρώς τμηματοποιημένος, δάκτυλοι με σχήμα λόγχης.
13. Το μπροστινό κάτω μέρος της Ιογίκα με σκληρές βελόνες ή δόντια.

1, 7, 9, 11 _____ ομάδα-γκρουπ *urceolaris*.

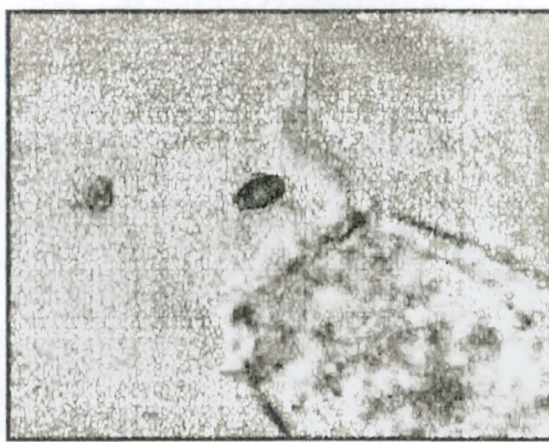
Οι μορφές που ανήκουν σε αυτή την ομάδα, διαφέρουν μεταξύ τους κυρίως στο σχήμα του μπροστινού, κοιλιακού τμήματος της *logica*, στο σχήμα της βάσης του πόδα και στην σκληρότητα, την κατασκευή και το σχήμα της *logica*. Στη φύση τα χαρακτηριστικά αυτά είναι σταθερά στα άτομα του ίδιου πληθυσμού, και εξαρτώνται από συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Πειράματα διατροφής έχουν δείξει ότι διαφορές στο σχήμα του μπροστινού τμήματος της *logica*, έχουν την τάση να περιορίζονται όταν οι συνθήκες καλλιέργειας είναι σταθερές και ότι οι διαφορετικές μορφές (π.χ. *B. urceolaris* x *B. rubens*) διασταυρώνονται χωρίς δυσκολία (Kolisko, A.R., 1974). Συμπερασματικά, οι μορφές αυτής της ομάδας θα πρέπει μάλλον να θεωρούνται οικοτύποι παρά είδη.

_____ *B.plicatilis* (MULLER, 1786)

Μαλακή *logica* το ραχιαίο από το κοιλιακό της τμήμα δεν διακρίνονται εύκολα. Μέγεθος 150-300μm³ αυγά διάπαυσης με κοκκιώματα σε υφάλμυρα και αλμυρά εσωτερικά νερά, συχνά σε τεράστιες ποσότητες σε νερά με υψηλές συγκεντρώσεις ανθρακικού νατρίου τρέφεται με μονοκύτταρα άλγη (Cyanophyta, *Dunaliella*).

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Τα τροχοζώα (Rotifera) ανήκουν στα μικρότερα μετάζωα, εκ των οποίων έχουν περιγραφεί περισσότερα από 1000 είδη, 90% των οποίων κατοικούν στα γλυκά νερά. Βάση του τύπου διατροφής τους χαρακτηρίζονται ως πημοφάγοι οργανισμοί, διηθούν δηλαδή μικροσωματίδια τροφής (μικροσκοπικά μονοκύτταρα φύκη κατάλληλου μεγέθους, πλευστικότητα και σύνθεσης) από το νερό (Φωτογραφία 3). Είναι διαφανή, στερούνται χρωματοφόρων και η εμφάνισή τους είναι απόχρωσης του κίτρινου ή του λευκού.



Φωτογραφία 4. Άτομο του είδους *Brachionus plicatilis* έτοιμο να συλλάβει κύτταρο του είδους *Asteromonas gracilis* (από φωτογραφικό αρχείο Δρ. Γ. Χώτου) **Φωτογραφία 5.** Άτομο του είδους *Brachionus plicatilis*, λίγο μετά την κατάποση κυττάρου *Asteromonas gracilis* (από φωτογραφικό αρχείο Δρ. Γ. Χώτου)

Το μήκος του σώματος τους αν και ενίοτε φτάνει μέχρι και τα 2mm, παρόλα αυτά σπάνια ξεπερνά τα 0.5mm. Συγκεκριμένα το *Brachionus plicatilis* έχει μήκος 150-300μ. Τα αρσενικά άτομα παρουσιάζουν γενικά μικρότερα μεγέθη και είναι λιγότερο ανεπτυγμένα από τα θηλυκά (κάποια αρσενικά εμφανίζουν μήκος μόλις 60μ.).

Το σώμα όλων των ειδών παρουσιάζει αμφίπλευρη συμμετρία. Η δομή του χαρακτηρίζεται ως ευτελική και συνκυτιακή, δηλαδή αποτελείται από ένα σταθερό αριθμό κυττάρων. Συγκεκριμένα στα είδη του γένους *Brachionus* τα κύτταρα είναι περίπου 1000 και μάλιστα θα λέγαμε ότι αυτά δεν αποτελούν το καθένα μια ξεχωριστή οντότητα, αλλά μάλλον σχηματίζουν όλα μαζί μια πλασματική περιοχή. Στην πραγματικότητα τα κύτταρα αυτά είναι πολλοί πυρήνες μέσα σε ένα μεγάλο κοινό πρωτόπλασμα.

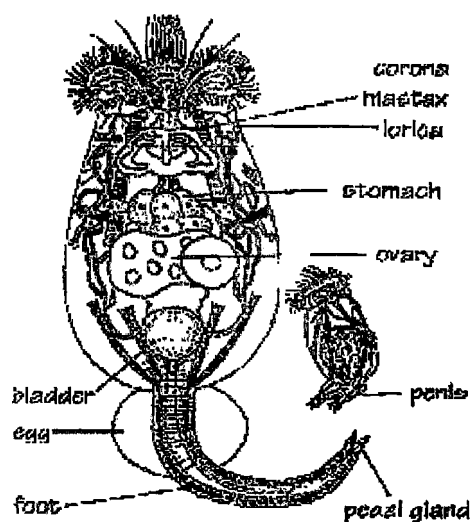


Το σώμα των τροχοζώων διαιρείται σε τρία ευδιάκριτα μέρη, που είναι:

α. η κεφαλική περιοχή

β. ο κορμός

γ. ο πόδας.



Σχήμα 19. *Brachionus plicatilis* αρσενικό και θηλυκό (κατά Koste, 1980)

Η κεφαλική περιοχή φέρει στο ανώτερο τμήμα της μία βλεφαριδοφόρο στεφάνη, που ονομάζεται *cogona*, της οποίας η εμφάνιση με τη γρήγορη κίνηση των βλεφαρίδων θυμίζει «τροχό σε κίνηση». Από το χαρακτηριστικό αυτό προέρχεται η λατινική ονομασία των *Rotifera* (*rota*=τροχός, *ferre*=φέρω). Η ύπαρξη της *cogona* διασφαλίζει τη μετακίνηση και την περιστροφική κίνηση στο νερό, που διευκολύνει τη πρόσληψη μικρών θρεπτικών αιωρούμενων στο νερό μικροσωματιδίων (κυρίως άλγη).

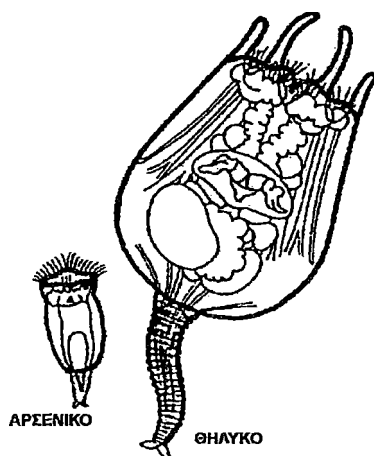
Τα είδη που ανήκουν στην οικογένεια *Brachionidae* διαθέτουν ένα εξωτερικό, διαφανές στρώμα (επιδερμίδα) από σκληροπρωτεΐνες, το οποίο καλύπτει σαν θήκη τον κορμό τους και ονομάζεται *lorica*.

Ο κορμός περιλαμβάνει τον πεπτικό σωλήνα, τα όργανα αναπαραγωγής και το απεκκριτικό σύστημα. Ο πεπτικός σωλήνας ξεκινάει από το μικροσκοπικό στόμα, στη συνέχεια πλαταίνει δημιουργώντας ένα δυνατό φαρυγγικό όργανο και καταλήγει στον στομάχο. Το φαρυγγικό όργανο ονομάζεται *mastax* και είναι μία ασβεστοποιημένη κατασκευή, που συμβάλλει αποτελεσματικά στο άλεσμα των σωματιδίων της τροφής. Περιλαμβάνει ένα ζεύγος σκληρών

σιαγόνων, που ονομάζεται *trophi*. Απαντάται σε όλα σχεδόν τα τροχοζώα και είναι χαρακτηριστικό όργανο της συνομοταξίας *Rotifera*.

Ακριβώς κάτω από τον στόμαχο διακρίνεται η ωοθήκη (στα θηλυκά άτομα), που καλύπτεται από βιτελλογόνο. Πρόκειται για ένα μεγάλο εμφανή σχηματισμό, που στο εσωτερικό του διακρίνονται ώριμα ή ανώριμα ωά. Τα ώριμα ωά διακρίνονται συχνά προσκολλημένα στο εξωτερικό του σώματος του θηλυκού ατόμου στη βάση του πόδα.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω τα αρσενικά άτομα παρουσιάζονται κατά κανόνα πολύ μικρότερα από τα θηλυκά και φέρουν ατροφικά όργανα, με εξαίρεση τους υπερμεγέθεις όρχεις και το πέος, που βρίσκεται δίπλα στον πόδα. Το φαινόμενο αυτό που καλείται «νανισμός», θεωρείται φυλετικός διμορφισμός και είναι εντονότερος στα πελαγικά είδη (όπως το *Brachionus plicatilis*). Εξαιτίας αυτού του χαρακτηριστικού τους τα αρσενικά άτομα έχουν παρομοιαστεί με «κολυμβητικά δοχεία σπέρματος» (Kolisko, 1974, αναφέρεται από Χώτος & Ρογδάκης, 1992).



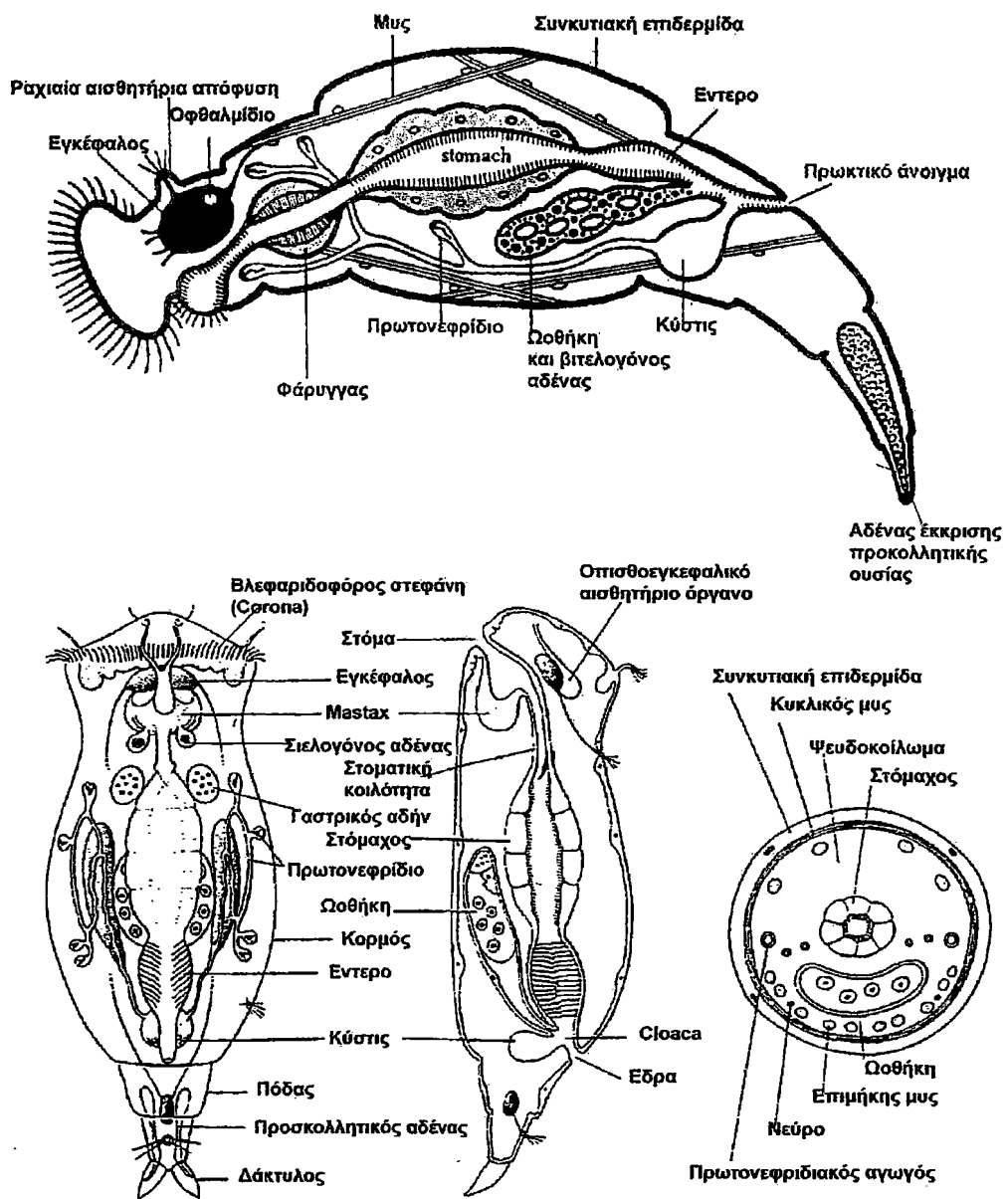
Σχήμα 20. Αρσενικό και θηλυκό άτομο του είδους *Brachionus plicatilis*

Το απεκκριτικό σύστημα περιλαμβάνει την **στρογγυλή κύστη (bladder)**, που αποτελεί απεκκριτικό συλλεκτικό όργανο.

Τα τροχοζώα διαθέτουν μυϊκό σύστημα, που αποτελείται από γραμμωτούς και λείους μύες, οι οποίοι εξυπηρετούν πολλούς σκοπούς (π.χ. λειτουργία του στόμαχου και του φαρυγγικού οργάνου *mastax*). Το αναπνευστικό και το κυκλοφορικό σύστημα απουσιάζουν.

Ο πόδας είναι ένας επιμήκης, συσταλτός, εύκαμπτος σχηματισμός, που καταλήγει σε δύο συνήθως μικροσκοπικούς δακτύλους, που χρησιμεύουν στη μόνιμη ή περιστασιακή προσκόλληση σε σταθερό υπόστρωμα ή στην αποφυγή των θηρευτών. Στη βάση του πόδα διακρίνεται αδένας (Foot gland), ο οποίος εκκρίνει κολλώδη ουσία με την οποία επιτυγχάνεται η προσκόλληση.

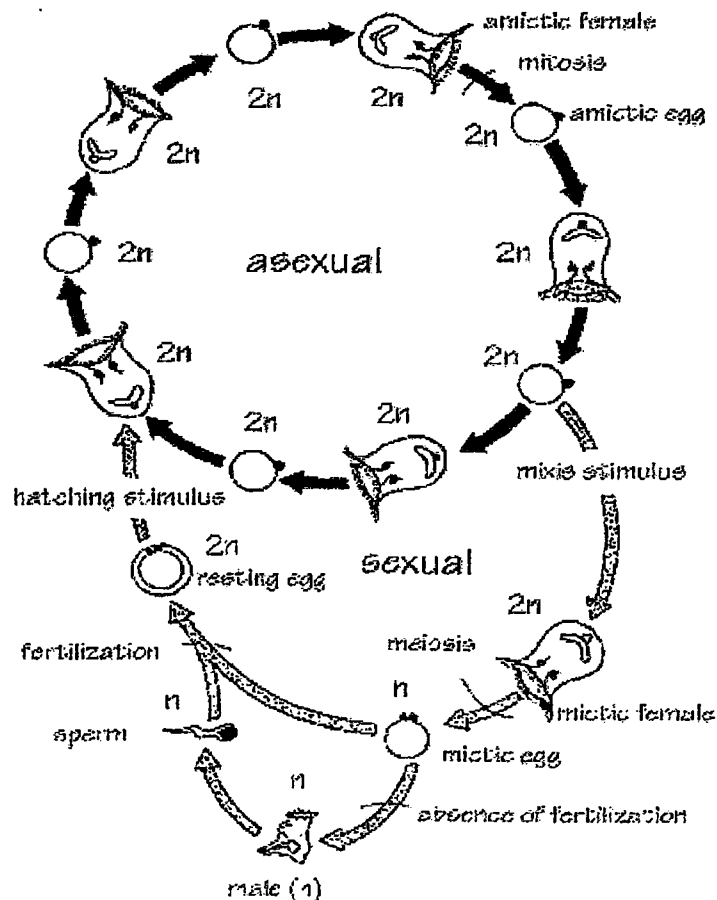
Τα τροχοζώα σταματούν την περιστροφική τους κίνηση και προσκολλώνται σε σταθερό υπόστρωμα, όταν στο περιβάλλον τους υπάρχει αφθονία τροφής.



Σχήμα 21. Μορφολογία του τροχοζώου *Brachionus plicatilis*

ΒΙΟΛΟΓΙΑ & ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ

Στους 25°C η διάρκεια ζωής των τροχοζώων έχει εκτιμηθεί ότι κυμαίνεται από 3,4 έως 4,4 ημέρες. Γενικά ισχύει ότι η λάρβα μετατρέπεται σε ενήλικο άτομο μετά από 0,5 έως 1,5 ημέρες. Από τη στιγμή αυτή και μετά τα θηλυκά αρχίζουν να γεννούν τα αυγά τους περίπου κάθε 4 ώρες. Πιστεύεται ότι τα θηλυκά μπορούν και παράγουν δέκα γενιές απογόνων πριν τελικά πεθάνουν. Η αναπαραγωγική δραστηριότητα των ατόμων του γένους *Brachionus* εξαρτάται από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, την αφθονία και την ποιότητα της τροφής.



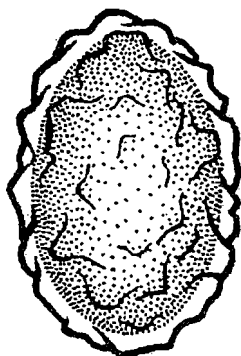
Σχήμα 22. Παρθενογεννητική (αμικτική) και αμφιγονική (μικτική) αναπαραγωγή του *Brachionus plicatilis* (κατά Hoff και Snell, 1987).

Ο κύκλος ζωής του *Brachionus plicatilis* περιορίζεται σε δύο μορφές-τύπους αναπαραγωγής. Κατά την παρθενογένεση τα αμικτικά θηλυκά άτομα παράγουν αμικτικά αυγά (διπλοειδή, 2n χρωμοσώματα). Τα άτομα αυτά δεν γονιμοποιούνται και η παρθενογεννητική παραγωγή αμικτικών αυγών τελικώς παράγει αμικτικά θηλυκά άτομα, δηλαδή ακριβή γενετικά αντίγραφα του εαυτού τους (κλώνοι).

Κάτω από συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες τα θηλυκά εμφανίζουν μία άλλη πολύπλοκη αναπαραγωγική συμπεριφορά, η οποία οδηγεί στη δημιουργία αμικτικών και μικτικών θηλυκών ατόμων.

Παρά το ότι αυτά είναι μορφολογικά δυσδιάκριτα, τα μικτικά θηλυκά παράγουν απλοειδή (η χρωμοσώματα) αυγά. Οι λάρβες που εκκολάπτονται από αυτά τα στείρα μικτικά αυγά αναπτύσσονται σε απλοειδή αρσενικά άτομα. Τα αρσενικά αυτά έχουν μέγεθος ίσο περίπου με το ένα τέταρτο του μεγέθους του θηλυκού ατόμου. Δεν φέρουν πεπτικό σωλήνα και ουροδόχο κύστη, αλλά έχουν έναν αναλογικά μεγάλο μονό όρχη, ο οποίος είναι γεμάτος με σπέρμα.

Τα μικτικά στείρα αυγά, που παράγονται με **παρθενογένεση** και εκκολάπτονται σε αρσενικά απλοειδή (η χρωμοσώματα) άτομα, είναι σημαντικά μικρότερα σε μέγεθος. Αντίθετα τα μικτικά γόνιμα αυγά, που παράγονται με **αμφιγονία**, δηλαδή γονιμοποίηση των μικτικών θηλυκών ατόμων με τα αρσενικά απλοειδή άτομα, είναι διπλοειδή ($2n$ χρωμοσώματα), μεγαλύτερα και έχουν ένα λεπτό, εξωτερικό κοκκοειδές κέλυφος. Αυτά είναι τα **αυγά διάπαυσης** (resting eggs), τα οποία θα αναπτυχθούν και θα εκκολαφθούν αποκλειστικά και μόνο σε αμικτικά θηλυκά άτομα, ύστερα από την έκθεσή τους σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, με αποτέλεσμα ο κύκλος να επαναλαμβάνεται.

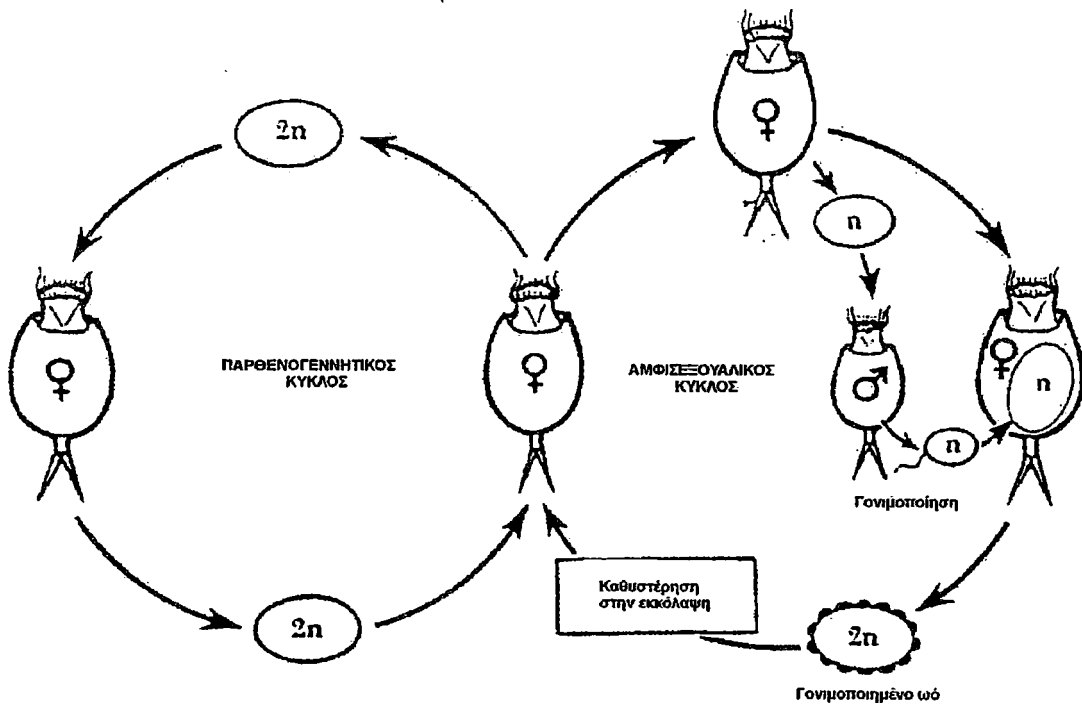


Σχήμα 23. Αυγό διάπαυσης (resting egg)

Η αμφιγονική αναπαραγωγή των τροχοζώων επηρεάζεται τόσο από ενδογενείς (π.χ. ηλικία) όσο και από εξωγενείς (π.χ. θερμοκρασία, τροφή, πυκνότητα πληθυσμού) παράγοντες (Hagiwara et al., 1991, αναφέρεται από Fengqi, 1996). Παρ' όλο που ο μηχανισμός δεν είναι απόλυτα κατανοητός, είναι γενικά αποδεκτό ότι η παραγωγή αυγών διάπαυσης είναι ο δρόμος για την επιβίωση του πληθυσμού υπό δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η ξηρασία ή το κρύο (Fukusho, 1989, αναφέρεται από Fengqi, 1996). Κάτω από

άσχημες περιβαλλοντικές συνθήκες τα τροχοζώα υφίστανται αμφιγονική αναπαραγωγή και άρα η εμφάνιση αρσενικών τροχοζώων υποδηλώνει ότι το μέσο καλλιέργειας πρέπει να αλλάξει (Fengqi, 1996).

Εξαιτίας του ότι τα αυγά διάπαυσης παρουσιάζουν υψηλή συγκέντρωση αποθεματικών θρεπτικών ουσιών, η γονιμότητα του μικτικού γονιμοποιημένου ατόμου (3-7 αυγά) είναι πολύ κατώτερη από αυτή του μη γονιμοποιημένου (20 αυγά). Είναι φανερό άρα ότι στις υδατοκαλλιέργειες η αμφιγονική αναπαραγωγή θα πρέπει να αποφεύγεται, καθώς είναι αργή και έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία αυγών διάπαυσης, που χρειάζεται να εκκολαφθούν, ενώ τα μικτικά θηλυκά κατά κανόνα πεθαίνουν, επιφέροντας μία ξαφνική κατάρρευση της καλλιέργειας.



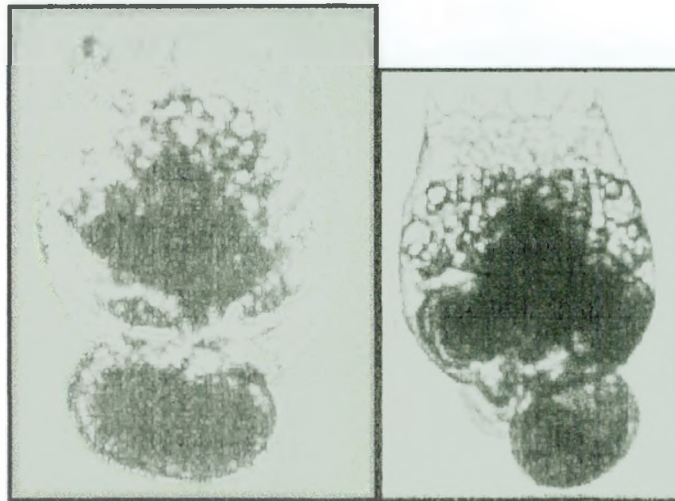
Σχήμα 24. Αναπαραγωγικός κύκλος του *Brachionus plicatilis*

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ

Το είδος *Brachionus plicatilis* χαρακτηρίζεται από μια ποικιλία μεγεθών των ενήλικων ατόμων, που κυμαίνεται από 130μ. έως 420μ.

Σήμερα στις υδατοκαλλιέργειες χρησιμοποιούνται δύο στελέχη τροχοζώων του είδους *Brachionus plicatilis*, που η διάκρισή τους βασίζεται σε δύο διαφορετικούς μορφολογικούς τύπους, των οποίων οι διαφορές σύμφωνα με Ιάπωνες ερευνητές (Fukusho, Iwamoto, Okouchi, Yufera 1980-1983) χαρακτηρίζουν πληθυσμούς γενετικά απομονωμένους, οι οποίοι παρουσιάζουν και οικοφυσιολογικές διαφορές. Οι τύποι αυτοί είναι:

- α) *B. plicatilis rotundiformis* ή Μικρό rotifer (S-τύπος)
- β) *B. plicatilis hepatomus* ή Μεγάλο rotifer (L-τύπος)

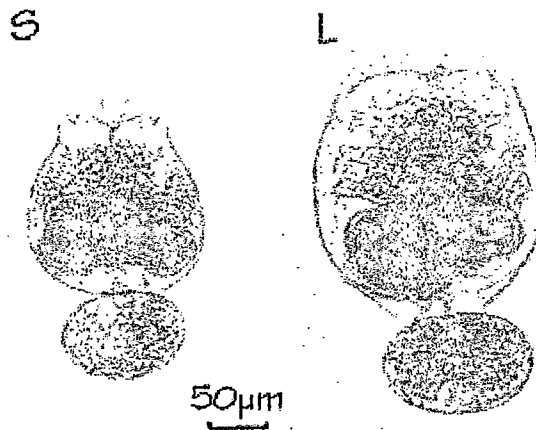


Φωτογραφία 6. Οι δύο τύποι του *Brachionus plicatilis*. L-τύπος (αριστερά), S-τύπος (δεξιά). Από τους Fu et al., 1991.

Οι διαφορές ανάμεσα στους δύο τύπους διακρίνονται εύκολα στα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά και δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

	S-τύπος	L-τύπος
Μήκος σώματος	150μ	250μ
Μήκος λογica	100-210μ (κατά μέσο όρο 160μ)	130-340μ (κατά μέσο όρο 239μ)
Σχήμα λογica	στρογγυλή με μυτερές βελόνες	πιο επιμήκης με πιο οξείες γωνίες μεταξύ των βελόνων
Βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης	θερμόφιλος (28-35°C)	πιο ανεκτικός σε χαμηλές θερμοκρασίες (22-28°C)





Σχήμα 25. S-L τύπος του είδους *Brachionus plicatilis*. Από τους Fu et al., 1991.

Επειδή συχνά στις καλλιέργειες εμφανίζονται και οι δύο τύποι, η αύξηση ή μείωση της θερμοκρασίας της καλλιέργειας, οδηγεί στη λήψη καθαρών καλλιεργειών.

Στις υδατοκαλλιέργειες προτιμούνται τα τροχοζωα S-τύπου, καθώς θεωρούνται καταλληλότερα για τη θρέψη των νυμφών, εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους. Σύμφωνα όμως με τον Rougriot (1990), η παραγωγή αυτού του τύπου τροχοζώων δημιουργεί ορισμένες δυσκολίες, λόγω του μικρού μεγέθους των σωματιδίων τροφής, που απαιτείται να τους δοθούν (Χώτος, 1997).

ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ

Πρόκειται για κοσμοπολίτικους οργανισμούς με μεγάλη ποικιλία στα σχήματα και τις μορφές του σώματός των.

Τα τροχοζωα είναι ευρέως διαδεδομένα και εκτός από λίγα μόνο γένη που ζουν σε ανοικτό περιβάλλον (εκβολές ποταμών ή παράκτιες θαλάσσιες περιοχές), τα υπόλοιπα συναντώνται σε κλειστό περιβάλλον - μόνιμα ή εποχιακά - (λιμνοθάλασσες και πειρωτικοί υγρότοποι, όπως στάσιμα θαλάσσια νερά αλικών, αλμυρές λίμνες κλπ.). Το *Brachionus plicatilis* θα μπορούσε να αναζητηθεί και συλλεχθεί σε αυτά τα υφάλμυρα, αλμυρά ή υπεράλμυρα νερά. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι άγριοι πληθυσμοί των τροχοζώων αυτών εντοπίζονται σε μια περιοχή της Κίνας και πιο συγκεκριμένα στο αλατωρυχείο του κόλπου Βοπαι, όπου το *Brachionus plicatilis* χρησιμοποιείται ως ζωντανή τροφή στα εκκολαπτήρια της γαρίδας *Penaeus chinensis* της περιοχής.

Πολλά είδη τροχοζώων είναι κολυμβητικά, μόνιμα ή παροδικά μέλη του πλαγκτού, ενώ άλλα είναι παροδικώς και άλλα μονίμως προσκολλημένα σε στερεό υπόστρωμα.

Είναι ευαίσθητα στη θερμοκρασία και το οξυγόνο. Τα περισσότερα τροχοζώα απαιτούν η συγκέντρωση του οξυγόνου να βρίσκεται πάνω από 1,0mg/l. Ωστόσο κάποια άλλα μπορούν να ανεχτούν αναερόβιες συνθήκες για μικρό όμως χρονικό διάστημα.

Τα τροχοζώα παρουσιάζουν μεγάλο αριθμό φαινοτυπικών μεταβολών, οι οποίες είναι σημαντικές για την προσαρμογή τους. Προκαλούνται από φυσικές, χημικές και βιολογικές μεταβολές. Για παράδειγμα η βιταμίνη Ε επηρεάζει το σχήμα του σώματος στα τροχοζώα, κάνοντάς τα μεγαλύτερα ώστε να προστατεύονται από τους θηρευτές.

Τα τροχοζώα έχουν τρεις πολύ σημαντικούς ρόλους στο περιβάλλον τους.

α) **Τρέφονται με άλγη.** Παρουσιάζουν έντονους ρυθμούς φιλτραρίσματος της τροφής, που σε κάποια είδη φτάνει τις 100 φορές τον όγκο του σώματός τους σε χρονικό διάστημα μιας ώρας. Επιπλέον έχουν την ιδιότητα να τρέφονται με ποικίλα είδη αλγών, με αποτέλεσμα να μεταβάλλουν το κυρίαρχο είδος άλγους σε ένα οικοσύστημα.

β) **Είναι σημαντικές πηγές τροφής.** Αναπαράγονται ταχύτατα και συχνά αποτελούν το 50% του ζωοπλαγκτονικού πληθυσμού της περιοχής που κατοικούν. Αποτελούν την τροφή άλλων τροχοζώων, μικρών οστρακόδερμων, εντόμων και ψαριών.

γ) **Αποτελούν δείκτη της ποιότητας του νερού,** καθώς παρουσιάζουν ευαισθησία σε ορισμένες μορφές τοξικότητας (τοξικά άλγη, ακατέργαστα έλαια, αμμωνία, φώσφορο, εντομοκτόνα). Η σύντομη διάρκεια ζωής αυτού του οργανισμού σημαίνει ότι μπορούν να παρατηρηθούν άμεσες αντιδράσεις σε περιβαλλοντικές τοξίνες. Για παράδειγμα έχουν πραγματοποιηθεί οικοτοξικολογικές μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν πληθυσμοί του γένους *Brachionus* για να ερευνηθεί η επίδραση διαφόρων βαρέων μετάλλων (κάδμιο, χαλκός, νικέλιο, ψευδάργυρος, κτλ.) και μικροβιοκτόνων σε οργανισμούς γλυκού νερού.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Χρησιμοποιήθηκαν τα φυτοπλαγκτονικά είδη *Asteromonas gracilis*, *Tetraselmis sp.* και *Dunaliella sp.*, τα οποία προέρχονταν από αποθεματικές, μονοειδικές καλλιέργειες του εργαστηρίου. Τα τροχοζώα που χρησιμοποιήθηκαν, ανήκαν στο είδος *Brachionus plicatilis* και προέρχονταν επίσης από καθαρές, αποθεματικές καλλιέργειες.

Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τριβλία ειδικού τύπου (πλάκες Sterilin), με 25 διαμερίσματα διαστάσεων 2Χ2cm το καθένα. Στις δύο πλευρές κάθε τριβλίου, τοποθετήθηκαν ετικέτες όπου αναγράφονταν γράμματα (από Α έως Ε) και αριθμοί (από 1 έως 5), ώστε κάθε διαμέρισμα να έχει την ονομασία του.

Για κάθε φυτοπλαγκτονικό είδος χρειάστηκαν 4 τριβλία, σε κάθε ένα από τα οποία χρησιμοποιήθηκε διαφορετική κατάσταση περιβαλλοντικού φωτισμού (φως και σχεδόν σκοτάδι) και φυτοπλαγκτονικών κυττάρων (σε αιώρηση και φυγοκεντρίμενα).

Σε δύο από τα τέσσερα τριβλία τοποθετήθηκαν με τη βοήθεια γυάλινης πιπέτας 3 ml καλλιέργειας *Dunaliella* αλατότητας 25ppt σε κάθε διαμέρισμα. Από την ίδια καλλιέργεια φυγοκεντρίθηκε ορισμένη ποσότητα σε φυγόκεντρο τύπου Sigma Laborzentrifugen 3K10. Η κυτταρική μάζα (πράσινο ίζημα) διαλύθηκε και με τη βοήθεια γυάλινης πιπέτας τοποθετήθηκαν 3ml σε κάθε διαμέρισμα των άλλων δύο τριβλίων.

Σε κάθε διαμέρισμα και των τεσσάρων τριβλίων τοποθετήθηκε ένα τροχοζώο, το οποίο συλλαμβανόταν με τη βοήθεια ενός μικροαναρροφητήρα, που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στην επιλογή των τροχοζώων, ώστε αυτά να έχουν το ίδιο μέγεθος και να μην φέρουν αυγά.

Τέλος τα τριβλία καλύφθηκαν με σελοφάν προκειμένου να αποφευχθεί η εξάτμιση και σκεπάστηκαν με το πλαστικό τους καπάκι. Ένα με αιωρημένο φυτοπλαγκτόν και ένα με φυγοκεντρίμενο τοποθετήθηκαν σε θερμοθάλαμο θερμοκρασίας 28°C και συνεχή φωτισμό λιγότερο των 100 lux (σχεδόν σκοτάδι) και τα άλλα δύο σε θερμοκρασία 25°C και συνεχή φωτισμό 2000 lux.

Στη συνέχεια και μετά την πάροδο τριών ημερών πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των ατόμων των τροχοζώων σε κάθε διαμέρισμα και των

τεσσάρων τριβλίων με τη βοήθεια στερεοσκοπίου και μετρητή χειρός. Μία δεύτερη μέτρηση πάρθηκε 4 ημέρες αργότερα.

Με σκοπό τον έλεγχο της αύξησης του πληθυσμού των τροχοζώων στο πείραμα υπολογίστηκαν οι εξής παράμετροι:

α) Ενδογενής ρυθμός αύξησης (r)

$$r = (\ln N_t - \ln N_0) / (t_2 - t_1)$$

όπου,

N_t = πυκνότητα rotifer/ml κατά το χρόνο t_2

N_0 = πυκνότητα rotifer/ml κατά το χρόνο t_1

t_2, t_1 = χρόνος σε ημέρες, ισχύει $t_2 > t_1$

β) Χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού (t_D)

$$t_D = 0,6931 / r$$

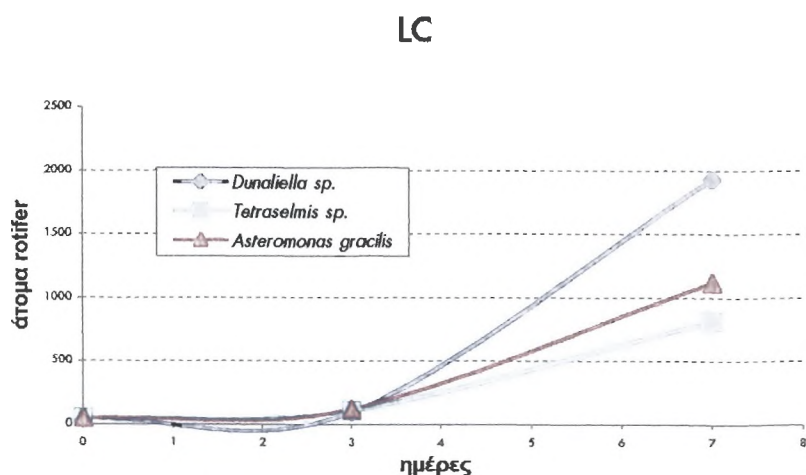
Η πειραματική αυτή διαδικασία εφαρμόστηκε πανομοιότυπα δύο φορές και για τα τρία φυτοπλαγκτονικά είδη, δηλαδή *Dunaliella sp.*, *Asteromonas gracilis* και *Tetraselmis sp.*

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών Ιχθύων Θαλάσσης και Υφαλμύρων Υδάτων στο τμήμα Παραγωγής Φυτοζωοπλαγκτού του ΤΕΙ Μεσολογίου κατά το χρονικό διάστημα από 03.07.2000 έως 01.08.2000.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

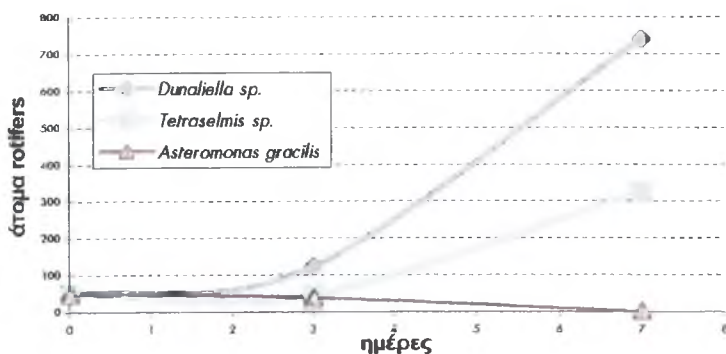
Με βάση το σχεδιασμό του πειράματος, μετά το πέρας τριών (3) και επτά (7) ημερών από την έναρξή του (εισαγωγή των τροχοζώων στα τριβλία), μετρήθηκαν στο στερεοσκόπιο τα άτομα των τροχοζώων, με σκοπό να μελετηθεί η αναπαραγωγική τους δραστηριότητα, να υπολογιστούν οι ενδογενείς ρυθμοί αύξησής τους και ο χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού.

Η σύγκριση σε κάθε περιβαλλοντική κατάσταση, της αύξησης των τροχοζώων στα τρία διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα, γίνεται με τη βοήθεια των παρακάτω γραφημάτων. Σε αυτά φαίνεται η μεταβολή του πλήθους των ατόμων των τροχοζώων κατά τη χρονική διάρκεια των επτά ημερών.



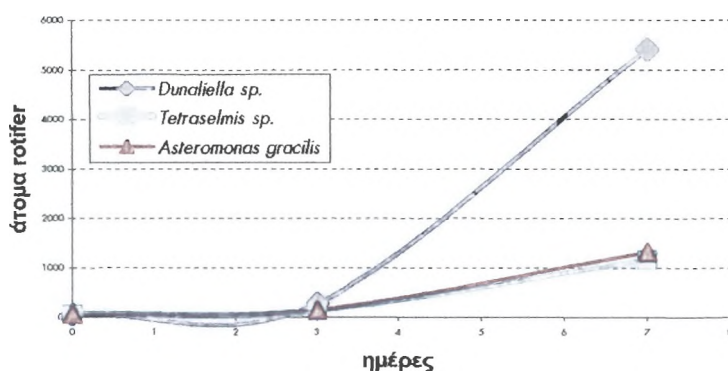
Σχήμα 26. Μεταβολή του αριθμού των ατόμων του τροχοζώου *Brachionus plicatilis* σε σχέση με το χρόνο (ημέρες) στην περιβαλλοντική κατάσταση Φως - Φυγοκεντρίμενα κύτταρα (LC) και για τα τρία θρεπτικά υποστρώματα.

LL



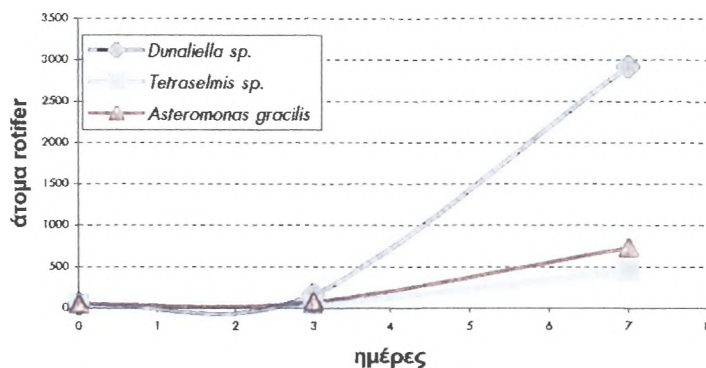
Σχήμα 17. Μεταβολή του αριθμού των ατόμων του τροχοζώου *Brachionus plicatilis* σε σχέση με το χρόνο (ημέρες) στην περιβαλλοντική κατάσταση Φως - Αιωρημένα κύτταρα (LL) και για τα τρία θρεπτικά υποστρώματα.

DC



Σχήμα 28. Μεταβολή του αριθμού των ατόμων του τροχοζώου *Brachionus plicatilis* σε σχέση με το χρόνο (ημέρες) στην περιβαλλοντική κατάσταση Σκοτάδι - Φυγοκεντρίμενα κύτταρα (DC) και για τα τρία θρεπτικά υποστρώματα.

DL



Σχήμα 29. Μεταβολή του αριθμού των στόμων του τροχοζώου *Brachionus plicatilis* σε σχέση με το χρόνο (ημέρες) στην περιβαλλοντική κατάσταση Σκοτάδι - Αιωρημένα κύτταρα (DL) και για τα τρία θρεπτικά υποστρώματα

Μελετώντας τα παραπάνω σχήματα και θέλοντας να συγκρίνουμε τις διάφορες καταστάσεις μεταξύ τους, βλέπουμε ότι γενικά τα τροχοζώα παρουσιάζουν μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης σε σκοτάδι σε σχέση με το φως και σε περιβάλλον με φυγοκεντρίμενα παρά με αιωρημένα κύτταρα. Επιπλέον αν επιχειρήσουμε να συγκρίνουμε μεταξύ τους τα θρεπτικά υποστρώματα, καταλήγουμε στο ότι η *Dunaliella sp.* είναι το πιο αποδοτικό.

Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι και στις τέσσερις καταστάσεις και για τα τρία υποστρώματα, η κλίση της καμπύλης στο διάστημα από την ημέρα 0 έως την ημέρα 3 είναι μικρή, που σημαίνει ότι ο ρυθμός αύξησης των τροχοζώων στο χρονικό αυτό διάστημα είναι περιορισμένος. Αντίθετα από την ημέρα 3 έως και την ημέρα 7 δεν παρατηρείται κοινή συμπεριφορά των τροχοζώων στα τρία θρεπτικά υποστρώματα.

Συγκεκριμένα τα τροχοζώα στο θρεπτικό υπόστρωμα *Dunaliella sp.* και στις τέσσερις καταστάσεις παρουσιάζουν έντονους ρυθμούς αύξησης, γεγονός που αποτυπώνεται στη μεγάλη κλίση που αποκτά η καμπύλη στα σχήματα 1 έως 4 στο χρονικό αυτό διάστημα.

Στο θρεπτικό υπόστρωμα *Tetraselmis sp.* τα τροχοζώα στο ίδιο διάστημα δείχνουν καλύτερους ρυθμούς αύξησης από ότι τις ημέρες 0 έως 3, που όμως δεν φτάνουν στα επίπεδα που προσεγγίζονται με το υπόστρωμα *Dunaliella sp.* Παρόμοια συμπεριφορά παρουσιάζουν τα τροχοζώα και στο θρεπτικό υπόστρωμα *Asteromonas gracilis*. Με εξαίρεση την κατάσταση Φώς - Αιώρηση,

όπου την ημέρα 7 το πλήθος των τροχοζώων είναι μηδενικό, στο υπόστρωμα αυτό τα τροχόζωα παρουσιάζουν ελαφρώς καλύτερη αναπαραγωγική δραστηριότητα, σε σχέση με το υπόστρωμα *Tetraselmis sp.*

Στους πίνακες που ακολουθούν, δίνονται οι μέσοι όροι των ενδογενών ρυθμών αύξησης (r) και ο χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού (t_D) του τροχοζώου *B. plicatilis* στις δύο καταστάσεις περιβαλλοντικού φωτισμού (φως και σχεδόν σκοτάδι) και φυτοπλαγκτονικών κυττάρων (σε αιώρηση και φυγοκεντρίμενα), που εφαρμόστηκαν στα τρία θρεπτικά υποστρώματα.

	<i>Dunaliella sp.</i>		<i>Tetraselmis sp.</i>		<i>Asteromonas gracilis</i>	
	Ενδογενής ρυθμός αύξησης (r)					
Κατάσταση περιβάλλοντος	r_D	r_D'	r_T	r_T'	r_A	r_A'
Φως- Φυγοκέντρωση	0.15	0.81	0.20	0.45	0.51	0.54
Φως-Αιώρηση	0.23	0.48	0.20	0.45	0.14	
Σκοτάδι-Φυγοκέντρωση	0.46	0.86	0.28	0.61	0.27	0.62
Σκοτάδι-Αιώρηση	0.34	0.79	0.23	0.50	0.37	0.53

Πίνακας 5. Συγκεντρωτικά στοιχεία παραγωγής απογόνων του τροχόζωου *Brachionus plicatilis* σε θρεπτικά υποστρώματα με τα φύκη *Dunaliella sp.*, *Tetraselmis sp.* και *Asteromonas gracilis*, με τη μορφή των ενδογενών ρυθμών αύξησης (r) στις τέσσερις διαφορετικές περιβαλλοντικές καταστάσεις, που εφαρμόστηκαν. (Συμβολισμός: r_D , r_T , r_A οι ενδογενείς ρυθμοί αύξησης από την ημέρα 0 έως 3 και r_D' , r_T' , r_A' από την ημέρα 3 έως 7. Ημέρα 0 ορίζεται η ημέρα έναρξης του πειράματος.)

	<i>Dunaliella sp.</i>		<i>Tetraselmis sp.</i>		<i>Asteromonas gracilis</i>	
	Χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού (t_D)					
Κατάσταση περιβάλλοντος	$t_{D 0-3}$	$t_{D 3-7}$	$t_{D 0-3}$	$t_{D 3-7}$	$t_{D 0-3}$	$t_{D 3-7}$
Φως- Φυγοκέντρωση	4.62	0.86	3.47	1.54	1.36	1.28
Φως-Αιώρηση	3.01	1.44	3.47	1.54	4.95	
Σκοτάδι-Φυγοκέντρωση	1.51	0.81	2.48	1.14	2.57	1.12
Σκοτάδι-Αιώρηση	2.04	0.88	3.01	1.39	1.87	1.31

Πίνακας 6. Συγκεντρωτικά στοιχεία παραγωγής απογόνων του τροχόζωου *Brachionus plicatilis* σε θρεπτικά υποστρώματα με τα φύκη *Dunaliella sp.*, *Tetraselmis sp.* και *Asteromonas gracilis*, με τη μορφή των χρόνων διπλασιασμού του πληθυσμού (t_D) στις τέσσερις διαφορετικές περιβαλλοντικές καταστάσεις, που εφαρμόστηκαν. (Συμβολισμός: $t_{D 0-3}$ χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού από την ημέρα 0 έως 3 και $t_{D 3-7}$ από την ημέρα 3 έως 7. Ημέρα 0 ορίζεται η ημέρα έναρξης του πειράματος.)

Όπως φαίνεται στους πίνακες 1&2 σε θρεπτικό υπόστρωμα *Tetraselmis sp.* και *Asteromonas gracilis* παρατηρήθηκαν χαμηλές σχετικά τιμές (<0,6) του ενδογενή ρυθμού αύξησης, τόσο από την ημέρα 0 έως την 3 όσο και από την ημέρα 3 έως και την 7, παρόλο που σε μια περίπτωση (Σκοτάδι – Φυγοκέντριση για το χρονικό διάστημα από την ημέρα 3 έως και την ημέρα 7) καταγράφηκε ρυθμός 0,61 και 0,62 αντίστοιχα. Αντίθετα σε θρεπτικό υπόστρωμα *Dunaliella sp.* οι τιμές που παρατηρήθηκαν ήταν σχετικά υψηλές (>0,6) για το χρονικό διάστημα από την ημέρα 3 έως και την ημέρα 7, εκτός από μια περίπτωση Φως-Αιώρηση (0,48). Όμως από την ημέρα 0 έως την 3 και σε αυτό το θρεπτικό υπόστρωμα οι ρυθμοί αύξησης των τροχοζώων ήταν σχετικά χαμηλοί (<0,46).

Συμπερασματικά σε όλες τις συνθήκες οι ρυθμοί αύξησης κατά το χρονικό διάστημα από την ημέρα 3 έως και την ημέρα 7 σε θρεπτικό υπόστρωμα *Dunaliella sp.* ήταν χαρακτηριστικά υψηλότερες από αυτές που παρατηρήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα *Tetraselmis sp.* και *Asteromonas gracilis*.

Το γεγονός αυτό ενδεχομένως οφείλεται στην ικανότητα του φύκου (*Dunaliella sp.*) να μην καθιζάνει σε συνθήκες καλλιέργειας. Ως γνωστόν το τροχοζώο *Brachionus plicatilis* τρέφεται φιλτράροντας στη στήλη του νερού και όχι λαμβάνοντας τροφή από τον πυθμένα.

Ο υψηλότερος ρυθμός αύξησης (**0,86**) παρουσιάστηκε στα τροχοζώα που διατηρήθηκαν στο σκοτάδι, διήθησαν **φυγοκεντριμένα** κύτταρα του είδους *Dunaliella sp.* και ακολουθούν οι τιμές 0,81 και 0,79 σε θρεπτικό υπόστρωμα *Dunaliella sp.* και καταστάσεις Φως- Φυγοκέντριση και Σκοτάδι-Αιώρηση αντίστοιχα. Κατά το χρονικό διάστημα από την ημέρα 0 έως και την ημέρα 3 ο βέλτιστος ρυθμός ανάπτυξης (**0,51**) παρουσιάστηκε στα τροχοζώα που διατηρήθηκαν στο **φως**, διήθησαν **φυγοκεντριμένα** κύτταρα του είδους *Asteromonas gracilis*. Στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα τα τροχοζώα παρουσίασαν μέγιστο ρυθμό αύξησης (0,62) στην κατάσταση σκοτάδι-φυγοκέντριση από την ημέρα 3 έως και την ημέρα 7.

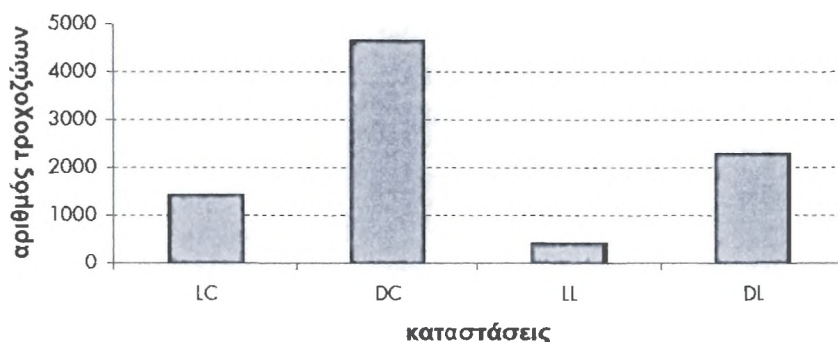
Ο ρυθμός αύξησης των τροχοζώων παρουσίασε ένα εύρος τιμών αρκετά ευρύ από 0,14 έως 0,86. Από την ημέρα 0 έως την 3 οι τιμές σε όλες τις συνθήκες και ανεξαρτήτου θρεπτικού υποστρώματος ήταν κάτω του 0,5.

Δηλαδή σε αυτό το χρονικό διάστημα οι τιμές είναι ενδεικτικές μιας όχι και τόσο ικανοποιητικής αναπαραγωγικής δραστηριότητας των τροχοζώων. Όμως από την ημέρα 3 έως και την ημέρα 7 οι τιμές του ρυθμού αύξησης κυμαίνονται από 0,45-0,86 ενδεικτικές μιας αρκετά ικανοποιητικής αναπαραγωγικής δραστηριότητας των τροχοζώων.

Δεδομένου του ότι η αλατότητα στο πείραμα ήταν 25‰, μπορούμε να συγκρίνουμε τους ρυθμούς αύξησης των τροχοζώων με αυτούς άλλων ερευνητών για παρόμοιες σχετικά αλατότητες. Πιο συγκεκριμένα σύμφωνα με τη Ruttner-Kolisko (1972) (αναφέρεται από Χώτος Γ. κ.α., 1997) στους 20°C και σε αλατότητα 17ppt παρουσιάστηκε βέλτιστος ρυθμός αύξησης 0,4, ενώ σε αλατότητα 35ppt 0,2. Τα δικά μας ευρήματα αντίθετα δείχνουν έναν πολύ καλύτερο ρυθμό αύξησης. Για το χρονικό διάστημα από την ημέρα 3 έως και την ημέρα 7 σε θρεπτικό υπόστρωμα *Dunaliella sp.* η βέλτιστη τιμή ήταν 0,86, σε *Tetraselmis sp.* 0,61 και σε *Asteromonas gracilis* 0,62. Αντίστοιχα για το χρονικό διάστημα από την ημέρα 0 έως και την ημέρα 3 οι βέλτιστες τιμές ήταν 0,46, 0,28, 0,51. Αντίθετα ο Ito (1960) (αναφέρεται από Χώτος Γ. κ.α., 1997) παρατήρησε βέλτιστο ρυθμό αύξησης 0,9 στους 25-28°C (δηλ. σε ίδια θερμοκρασία με αυτή του πειράματος) σε αλατότητα 10-18ppt, ενώ σε αλατότητα 35ppt ο αντίστοιχος ρυθμός αύξησης ήταν 0,3-0,45. Σύμφωνα όμως και με νεότερες μελέτες (Χώτος Γ. κ.α., 1997) όπου οι ρυθμοί αύξησης παρουσίαζαν βέλτιστη τιμή 0,81 σε 30ppt και 0,79 σε 35ppt σε θρεπτικό υπόστρωμα *Asteromonas gracilis*, συμπεραίνουμε ότι η βέλτιστη τιμή του ρυθμού αύξησης που παρουσιάστηκε στο πείραμα (0,86) κρίνεται ως απολύτως ικανοποιητική.

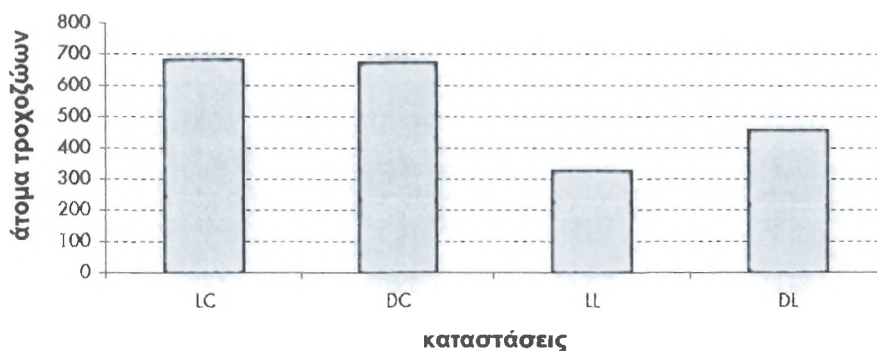
Τέλος παρακάτω δίνονται γραφικά το μέγιστο πλήθος ατόμων rotifer στις δύο καταστάσεις περιβαλλοντικού φωτισμού (φως και σχεδόν σκοτάδι) και φυτοπλαγκτονικών κυττάρων (σε αιώρηση και φυγοκεντρίμενα) που εφαρμόστηκαν για κάθε θρεπτικό υπόστρωμα.

Dunaliella sp.



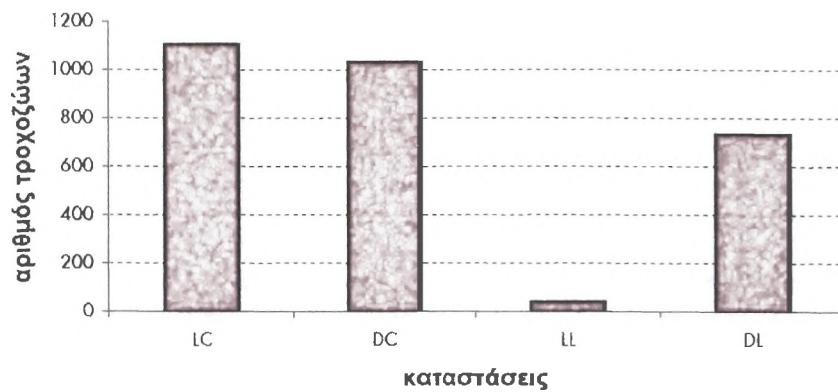
Σχήμα 30. Μέγιστο πλήθος ατόμων rotifer στο πείραμα με θρεπτικό υπόστρωμα το φύκος *Dunaliella sp.*, σε δύο διαφορετικές καταστάσεις περιβαλλοντικού φωτισμού (φως-L και σκοτάδι-D) και σε δύο διαφορετικές καταστάσεις φυτοπλαγκτονικών κυττάρων (φυγοκεντρίμενα-C και αιωρημένα-L).

Tetraselmis sp.



Σχήμα 31. Μέγιστο πλήθος ατόμων rotifer στο πείραμα με θρεπτικό υπόστρωμα το φύκος *Tetraselmis sp.*, σε δύο διαφορετικές καταστάσεις περιβαλλοντικού φωτισμού (φως-L και σκοτάδι-D) και σε δύο διαφορετικές καταστάσεις φυτοπλαγκτονικών κυττάρων (φυγοκεντρίμενα-C και αιωρημένα-L).

Asteromonas gracilis



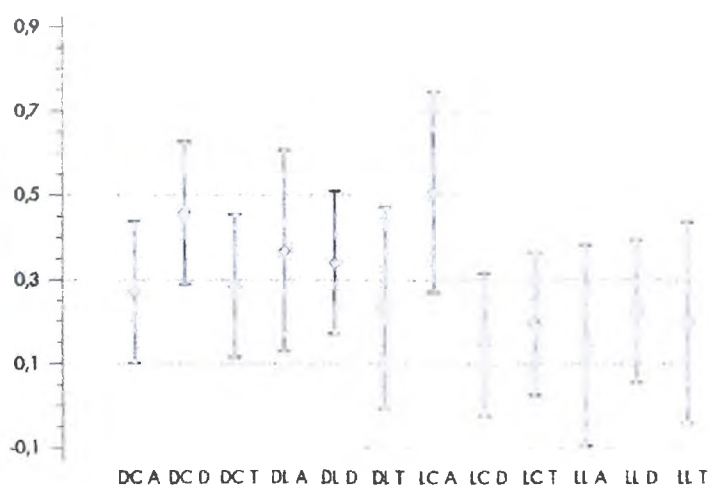
Σχήμα 32. Μέγιστο πλήθος ατόμων rotifer στο πείραμα με θρεπτικό υπόστρωμα το φύκος *Asteromonas gracilis*, σε δύο διαφορετικές καταστάσεις περιβαλλοντικού φωτισμού (φως-L και σκοτάδι-D) και σε δύο διαφορετικές καταστάσεις φυτοπλακτονικών κυτάρων (φυγοκεντρίμενα-C και αιωρημένα-L).

Στη συνέχεια και με σκοπό να διαπιστώσουμε αν οι διαφορές στις τιμές των ρυθμών αύξησης για τις διάφορες καταστάσεις είναι στατιστικά σημαντικές, πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του προγράμματος STATGRAPHICS PLUS®.

Μελετήθηκαν οι ρυθμοί αύξησης των τροχοζώων σε όλες τις καταστάσεις και για τα τρία υποστρώματα ξεχωριστά από την ημέρα 0 έως την ημέρα 3 και από την ημέρα 3 έως την ημέρα 7. Τόσο για την πρώτη όσο και για τη δεύτερη περίπτωση πραγματοποιήθηκαν «Πολλαπλές Συγκρίσεις-Multiple Comparisons» των 12 δειγμάτων (4 καταστάσεις για κάθε υπόστρωμα), τα αποτελέσματα των οποίων αναλύονται παρακάτω.

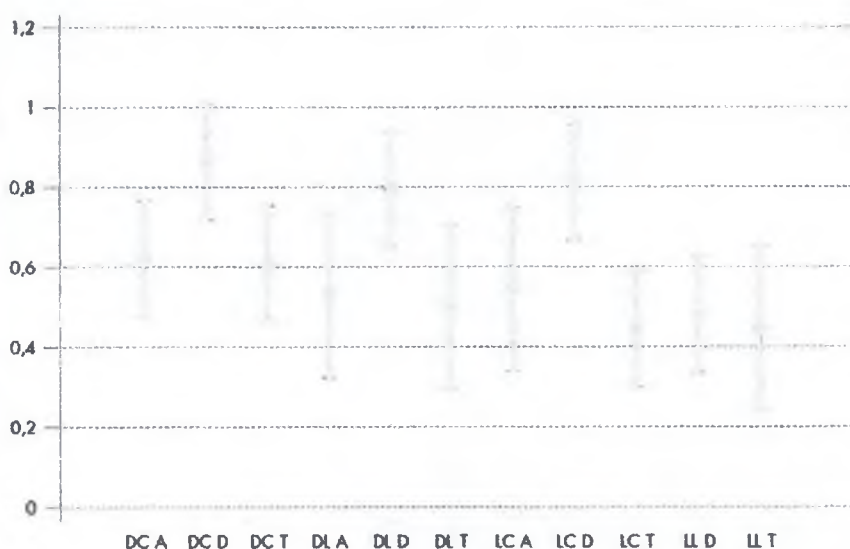
Κατά το χρονικό διάστημα από την ημέρα 0 έως την ημέρα 3 η διαδικασία των πολλαπλών συγκρίσεων που εφαρμόστηκε, έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ οποιουδήποτε ζεύγους των δειγμάτων σε όριο εμπιστοσύνης 95%. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τη σύγκριση των δειγμάτων είναι η **Tukey's Honestly Significant Difference (HSD)**. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι και οι τυπικές αποκλίσεις των 12 δειγμάτων δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όριο εμπιστοσύνης 95%.

Τα παραπάνω συμπεράσματα τεκμηριώνονται και με το παρακάτω σχήμα, τη γραφική αποτύπωση των μέσων των δειγμάτων (**Means and 95.0 Percent Tukey HSD Interval**). Οι bars των δειγμάτων επικαλύπτονται, γεγονός που μας υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει σπουδαία στατιστική διαφορά μεταξύ τους.



Σχήμα 33. Γραφική αποτύπωση των μέσων των δειγμάτων σε όριο εμπιστοσύνης 95% για το χρονικό διάστημα από την ημέρα 0 έως 3.

Οι Πολλαπλές Συγκρίσεις των 12 δειγμάτων, που εφαρμόστηκαν για το χρονικό διάστημα από την ημέρα 3 έως την ημέρα 7 έδειξαν, ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ορισμένων ζευγών των δειγμάτων σε όριο εμπιστοσύνης 95%. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τη σύγκριση των δειγμάτων είναι η **Tukey's Honestly Significant Difference (HSD)**. Οι τυπικές αποκλίσεις των 12 δειγμάτων δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όριο εμπιστοσύνης 95%.



Σχήμα 34. Γραφική αποτύπωση των μέσων των δειγμάτων σε όριο εμπιστοσύνης 95% για το χρονικό διάστημα από την ημέρα 3 έως 7.

Αφού προέκυψαν διαφορές μεταξύ των δειγμάτων (όπως φαίνεται και από την παραπάνω γραφική αποτύπωση των μέσων, αφού κάποιες bars των μέσων δεν επικαλύπτονται μεταξύ τους) πραγματοποιήθηκε εκτενής μελέτη, με σκοπό να μελετηθεί ποιοι παράγοντες (φως ή σκοτάδι και φυγοκεντριμένα ή αιωρούμενα κύτταρα) είναι ευνοϊκότεροι για την ανάπτυξη των τροχοζών.

Συγκεκριμένα για κάθε φύκος συγκρίθηκαν οι καταστάσεις Φως-Αιώρηση με Φως-Φυγοκέντριση, Σκοτάδι-Αιώρηση με Σκοτάδι-Φυγοκέντριση για τη μελέτη του ενός παράγοντα (φυγοκεντριμένα ή αιωρούμενα κύτταρα) και οι καταστάσεις Φως-Αιώρηση με Σκοτάδι-Αιώρηση, Φως-Φυγοκέντριση με Σκοτάδι-Φυγοκέντριση για τη μελέτη του δεύτερου παράγοντα (φως ή σκοτάδι). Οι συγκρίσεις των καταστάσεων πραγματοποιήθηκαν με **t-test**.

Από τις συγκρίσεις των παραπάνω δειγμάτων προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στους ενδογενείς ρυθμούς αύξησης των τροχοζώων στα εξής δείγματα:

- Σκοτάδι-Αιώρηση της *Dunaliella sp.* με Φως-Αιώρηση της *Dunaliella sp.*
- Φως-Αιώρηση της *Dunaliella sp.* με Φως-Φυγοκέντριση της *Dunaliella sp.*

Στην πρώτη περίπτωση ο ρυθμός αύξησης των τροχοζώων σε Σκοτάδι-Αιώρηση με θρεπτικό υπόστρωμα *Dunaliella sp.* είναι κατά πολύ μεγαλύτερος ($0,79 \gg 0,48$) από ότι σε Φως-Αιώρηση με θρεπτικό υπόστρωμα *Dunaliella sp.* Το στοιχείο αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα, ότι το σκοτάδι σε σχέση με το φως είναι σαφώς ευνοϊκότερος παράγοντας για την ανάπτυξη των τροχοζώων.

Αντίθετα όσον αφορά τους αναπαραγωγικούς ρυθμούς των φυτοπλακτονικών οργανισμών, βρέθηκε ότι η επίδραση του φωτός έχει μόνο θετική επιρροή (Brand L.E. et al., 1981). Γι' αυτό άλλωστε οι καλλιεργούμενοι φυτοπλακτονικοί οργανισμοί διατηρούνται καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας σε κατάσταση φωτός είτε με εξωτερικές είτε με εσωτερικές λάμπες στο μέσο καλλιέργειας (Sanmartin M. et al., 1995).

Στη δεύτερη περίπτωση ο ρυθμός αύξησης των τροχοζώων σε Φως-Αιώρηση με θρεπτικό υπόστρωμα *Dunaliella sp.* είναι κατά πολύ μικρότερος ($0,48 \ll 0,81$) από ότι σε Φως-Φυγοκέντριση με θρεπτικό υπόστρωμα *Dunaliella sp.* Από το γεγονός αυτό καταλήγουμε, στο ότι τα φυγοκεντρίμενα σε σχέση με τα αιωρούμενα κύτταρα ευνοούν περισσότερο την ανάπτυξη των τροχοζώων.

Σε ανάλογο συμπέρασμα οδηγήθηκε και ο Barnabe G. (1990). Ύστερα από μελέτες κατέληξε στο ότι μεταξύ άλλων τεχνικών συλλογής και συντήρησης μικροφυκών, η φυγοκέντριση έχει δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα. (Παπανδρουλάκης Ν. κ.α., 1998)

Με βάση τη βιβλιογραφία η χρήση συμπυκνωμένων κυττάρων φυτοπλακτού, που παράγονται ξεχωριστά και είναι συνεχώς διαθέσιμα, θα μπορούσε να απλοποιήσει τη διαδικασία παραγωγής και να μειώσει τους κινδύνους κατάρρευσης της παραγωγής τροχοζώων, που διατρέχουν τα εντατικά εκκολαπτήρια παραγωγής γόνου θαλασσινών ψαριών. (Παπανδρουλάκης Ν. κ.α., 1998)

Εξάλλου σύμφωνα με άλλες μελέτες (Lubzens E. et al., 1995), προκειμένου να επιτευχθούν καλλιέργειες τροχοζώων υψηλής πυκνότητας (να υπερβαίνουν τα 1000 άτομα ανά ml) πρέπει να τους παρέχονται συμπυκνωμένα φύκη. Τέτοιες μεγάλες πυκνότητες δεν επιτυγχάνονται με φύκη, που δίνονται άμεσα στα τροχόζωα, εξαιτίας των χαμηλότερων πυκνοτήτων τους.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα του πειράματος και τη διεθνή βιβλιογραφία, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι παρά το γεγονός ότι ενδεχομένως κατά τη φυγοκέντριση τα φυτοπλαγκτονικά κύτταρα υφίστανται ισχυρή μηχανική καταπόνηση, οι ρυθμοί αύξησης των τροχοζώων που τρέφονται με φυγοκεντριμένα κύτταρα είναι πολύ ικανοποιητικοί. Ο τρόπος με τον οποίο η φυγοκέντριση επιδρά στη μορφολογία και τη φυσιολογία των φυτοπλαγκτονικών κυττάρων δεν έχει έως σήμερα διερευνηθεί σε βάθος και ίσως αυτό να αποτελεί το αντικείμενο ενός μελλοντικού πειράματος.

Πρέπει να αναλογιστούμε πως καθημερινά μια παραγωγική μονάδα χρειάζεται εκατομμύρια άτομα τροχοζώων για τη διατροφή των λαρβών. Έτσι λοιπόν γίνεται εύκολα κατανοητή η σημασία της χρήσης συμπυκνωμένων κυττάρων φυτοπλαγκτού ως τροφή για τα τροχόζωα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΦΥΤΟΠΛΑΓΚΤΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΠΛΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟΥ

Η μέθοδος που σήμερα θεωρείται ως η πιο κατάλληλη και με τα πιο πιστά αποτελέσματα για την καταμέτρηση της φυτοπλαγκτονικής πυκνότητας είναι αυτή του αιματοκυτταρομέτρου. Παρόλο που η παραπάνω μέθοδος είναι αυτή που έχει επικρατήσει και χρησιμοποιείται σχεδόν σε όλους τους ιχθυογεννητικούς σταθμούς της χώρας μας, αυτό που τη χαρακτηρίζει είναι η απαίτηση μεγάλου χρονικού διαστήματος για την πραγματοποίησή της. Αν καθημερινά απαιτείται η εξέταση μεγάλου αριθμού δειγμάτων και λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι για κάθε δείγμα θα πρέπει να πραγματοποιήσουμε έναν ικανοποιητικό αριθμό επαναλήψεων ώστε να αποφύγουμε το στατιστικό λάθος, τότε γίνεται εύκολα αντιληπτό πόσο χρονοβόρα μέθοδος είναι. Η ανάγκη για την εξεύρεση μιας άλλης μεθόδου, η οποία θα είναι πιο γρήγορη στην εφαρμογή της και θα μας δίνει μετρήσεις όσο το δυνατόν πιο κοντά στις πραγματικές μας οδήγησε στη μελέτη του φασματοφωτομετρικού υπολογισμού της πυκνότητας των φυκών.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο υπολογισμός της φυτοπλαγκτονικής πυκνότητας με τη μέθοδο του ελέγχου της απορρόφησης ή διαπερατότητας του εκάστοτε δείγματος στο φασματοφωτόμετρο σε ορισμένο μήκος κύματος (π.χ. για τα πράσινα φύκη το μήκος κύματος πρέπει να ρυθμίζεται στα 535nm), καθώς και η σύγκριση της μεθόδου με αυτή του αιματοκυτταρομέτρου. Η αρχή του φασματοφωτομετρικού υπολογισμού της πυκνότητας των φυκών συνίσταται στο ότι η μετρούμενη απορρόφηση ή διαπερατότητα του δείγματος στο φασματοφωτόμετρο είναι ευθέως ανάλογη της πυκνότητας του δείγματος. Για παράδειγμα πυκνότερα δείγματα μειώνουν τη διαπερατότητα ή αυξάνουν την απορρόφηση.

Προκειμένου να υπολογίζεται η φυτοπλαγκτονική πυκνότητα με την παραπάνω μέθοδο θα πρέπει να δημιουργήσουμε μια μαθηματική εξίσωση γραμμικής σχέσης μεταξύ των δύο μεγεθών (πυκνότητας κυττάρων και απορρόφησης ή διαπερατότητας). Για να βρούμε τη σχέση που συνδέει τα δύο

μεγέθη μετρήθηκε ικανοποιητικός αριθμός δειγμάτων σε ένα ορισμένο μήκος κύματος.

Για να είναι τα αποτελέσματα έγκυρα και ακριβή ακολουθήθηκαν ορισμένοι κανόνες. Αυτοί είναι οι παρακάτω:

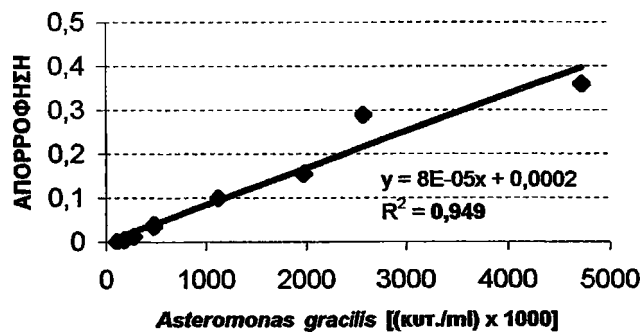
- Επειδή ανάλογα με το χρώμα της φυτοπλαγκτονικής καλλιέργειας η απόκριση του οργάνου είναι ισχυρότερη σε διαφορετικά μήκη κύματος, επιλέχθηκε για μια σειρά δειγμάτων ένα σταθερό μήκος κύματος βέλτιστο για το εκάστοτε είδος του φυτοπλαγκτού (535nm).
- Προτού το δείγμα τοποθετηθεί στην κυψελίδα για μέτρηση αναδεύτηκε πριν πολύ καλά έτσι ώστε η κατανομή των κυττάρων να είναι όσο το δυνατόν πιο ομοιόμορφη σε όλο τον όγκο του δείγματος.
- Πριν ληφθεί η ποσότητα του δείγματος από το δοχείο καλλιέργειας ο αερισμός διακοπτόταν, έτσι ώστε το δείγμα να μην περιλαμβάνει αιωρούμενη ύλη σε μεγάλο ποσοστό και αυτό γιατί διαφορετικά θα παρέμβαινε στην απορρόφηση του φωτός και θα είχαμε λανθασμένες μετρήσεις.
- Το φασματοφωτόμετρο ρυθμίστηκε με τη χρήση «τυφλού» (control) διαλύματος το οποίο περιείχε νερό προτού παρθούν οι μετρήσεις έτσι ώστε να ρυθμιστεί σε ένδειξη είτε 0 για την απορρόφηση είτε 100% για τη διαπερατότητα.
- Το φασματοφωτόμετρο ήταν σωστά ρυθμισμένο σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Τα δείγματα που λαμβάνονταν για το φασματοφωτομετρικό υπολογισμό της πυκνότητας προέρχονταν από καλλιέργειες φυτοπλαγκτού των ειδών *Asteromonas gracilis* και *Tetraselmis sp.* σε θαλασσινό νερό αλατότητας 35ppt. Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε ήταν τύπου HACH.

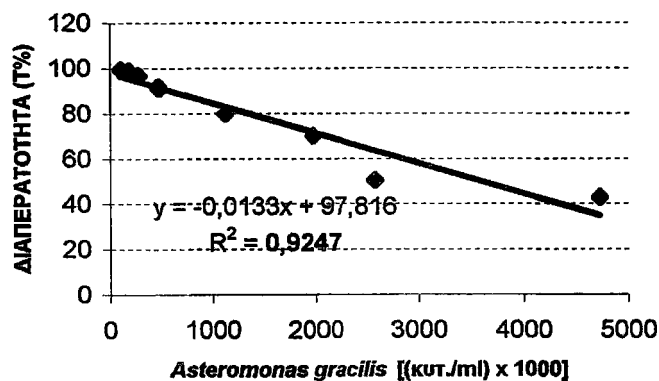
Παρακάτω δίνονται ο πίνακας τιμών, τα διαγράμματα, οι εξισώσεις και ο συντελεστής παλινδρόμησης μεταξύ διαπερατότητας ή απορρόφησης και φυτοπλακτονικής πυκνότητας.

α.α	<i>Asteromonas gracilis</i>			<i>Tetraselmis sp.</i>		
	Πυκνότητα κυτ./mlx1000	Απορρόφηση	Διαπερατότητα (%)	Πυκνότητα κυτ./mlx1000	Απορρόφηση	Διαπερατότητα (%)
1	100	0,001	99,5	11	0,005	99,0
2	180	0,005	99,0	13	0,008	98,0
3	272	0,012	97,0	17,5	0,005	99,0
4	470	0,035	92,0	169,5	0,028	94,0
5	474	0,040	91,0	210	0,020	95,0
6	1120	0,100	80,0	531	0,050	89,0
7	1970	0,155	70,0	1010	0,105	78,5
8	2580	0,290	50,5	1665	0,250	56,0
9	4720	0,360	43,0	1860	0,220	60,5

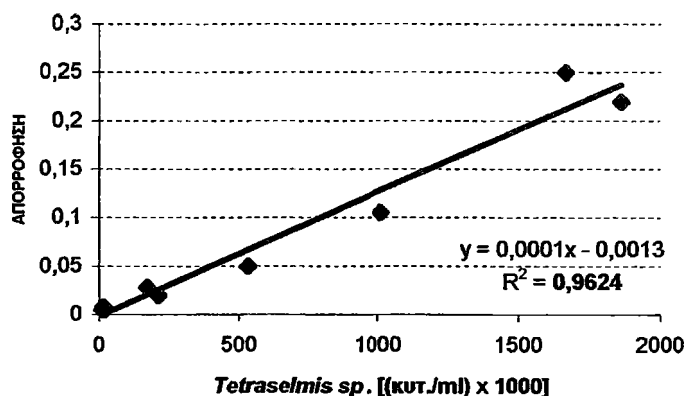
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ-ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ



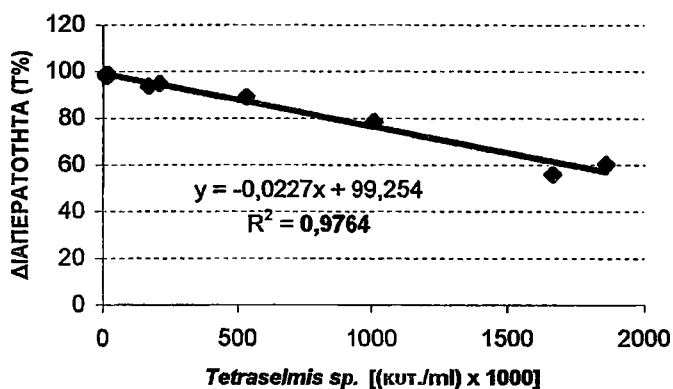
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ-ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ-ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ-ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ



Ο συντελεστής R^2 δηλώνει την ποιότητα προσαρμογής της ευθείας της γραμμικής παλινδρόμησης ή με άλλα λόγια την αναλογία (ή ποσοστό) της συνολικής διακύμανσης των παρατηρούμενων τιμών της Y και ουσιαστικά μετρά την ισχύ της γραμμικής σχέσης των δύο μεταβλητών. Ο συντελεστής παίρνει τιμές από 0 έως 1 και όσο πιο κοντά στο 1 πλησιάζει τόσο μεγαλύτερο ποσοστό της διακύμανσης της Y εξηγεί, δηλαδή τόσο πιο καλή (άριστη) είναι η εξίσωση της παλινδρόμησης (Πετρίδης Δ., 1997).

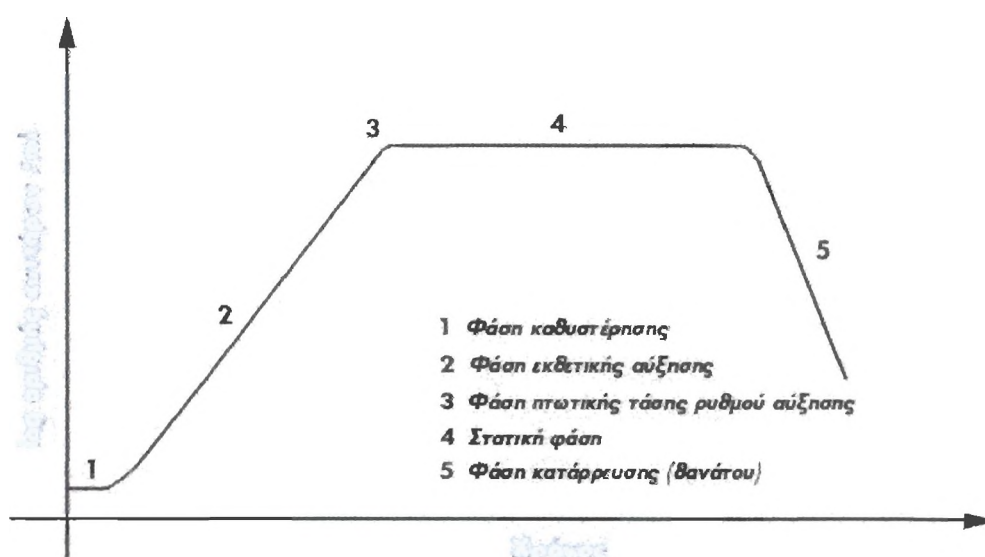
Μελετώντας τα παραπάνω γραφήματα και λαμβάνοντας υπόψη την τιμή του R^2 , η οποία σε όλες τις περιπτώσεις ήταν μεγαλύτερη του 0,92, συμπεραίνουμε πως η μέτρηση με το φασματοφωτόμετρο προσφέρει μια μέθοδο ικανοποιητικής ακρίβειας για την εκτίμηση της πυκνότητας των φυτοπλαγκτονικών καλλιεργειών, αρκεί βέβαια σε κάθε περίπτωση να τηρούνται οι κανόνες που προαναφέρθηκαν.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β.

ΤΥΠΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΕΝΟΣ ΦΥΤΟΠΛΑΓΚΤΟΝΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΜΕ ΤΟ ΧΡΟΝΟ

Σε συνθήκες καλλιέργειας η μορφή αύξησης των μικροφυκών ακολουθεί μια τυπική καμπύλη αύξησης σαν αυτή που δίνεται παρακάτω, στην οποία διακρίνονται πέντε τουλάχιστον διαφορετικές φάσεις. Αυτές είναι:

- **1^η φάση ή φάση καθυστέρησης (lag phase):** Στη φάση αυτή τα κύτταρα δεν διαιρούνται εξαιτίας:
 1. αδρανοποίησης ενζύμων
 2. μειωμένου μεταβολισμού
 3. αύξησης κυττάρων με απουσία κυτταρικών διαιρέσεων
 4. απουσία ή ανεπάρκεια παραγόντων απαραίτητων για τη φωτοσύνθεση.
- **2^η φάση ή εκθετική φάση:** Χαρακτηρίζεται από σταθερό και ταχύ ρυθμό κυτταρικών διαιρέσεων.



Σχήμα 35. Τυπική καμπύλη ανάπτυξης φυτοπλαγκτονικής καλλιέργειας σε συνθήκες εργαστηρίου.

- **3^η φάση ή φάση πτωτικής τάσης ρυθμού αύξησης:** Στη φάση αυτή παρατηρείται σημαντική μείωση του ρυθμού αύξησης που πιθανόν οφείλεται:
 1. στην εξάντληση κάποιου θρεπτικού συστατικού

2. σε μειωμένη συγκέντρωση CO₂
 3. σε αλλαγή του pH
 4. σε περιορισμό του φωτός στο εσωτερικό του δοχείου λόγω μεγάλης πυκνότητας (νόμος του Beer)
 5. σε αυτοαναστολή της αύξησης λόγω παραγωγής κάποιας τοξικής ουσίας.
- **4^η φάση ή στατική φάση:** Ουσιαστικά αποτελεί κατάσταση ισορροπίας μεταξύ του ρυθμού αύξησης και των περιοριστικών παραμέτρων που συσσωρεύτηκαν.
 - **5^η φάση ή φάση κατάρρευσης:** Είναι η φάση θανάτου της καλλιέργειας και επέρχεται με πολύ γρήγορο ρυθμό. Δημιουργείται εξαιτίας μείωσης των θρεπτικών ουσιών μεγάλης συσσώρευσης τοξικών μεταβολικών ουσιών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bengoa-Ruigomez, M.V., Sanmartin, M., Hatziathanasiou, A. N., Divanach, P. & Kentouri, M.-1995**, On the use of bloom strategy in large volume phytoplankton culture for initiation of rapid mass production of *Brachionus plicatilis* (Muller) Actas del Vo Congreso Nacional de Acuicultura.
- Borowitzka, L.J., Borowitzka, M.A. & Moulton, T.P.-1984**, The mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemicals: From laboratory to pilot plant. Hydrobiologia 116/117, 115-120.
- Brand, L.E. & Guillard R.R.L.-1981**, The effects of continuous light and light intensity on the reproduction rates of twenty-two species of marine phytoplankton. J. exp. mar. Biol. Ecol. Vol. 50, pp. 119-132.
- Campbell, C.E.-1997**, *Brachionus plicatilis*, *Brachionus calyciflorus* Rotifers (wheel animals) in class Monogononta. Scientific Assessment of a biological indicator. <http://www.swgc.mun.ca/biology/BIOROT.HTM>.
- Chretiennot-Cinet, M. J.-1990**, Atlas du Phytoplancton Marin. Volume III. Editions du centre national de la recherche scientifique, Paris.
- Dhert, P., De Vlaeminck, D., Ooghe, B., De Vriese, S., Sloover, D., Van Stappen, G. & Kaya, S.-1999**, The *Brachionus plicatilis* in a recirculation system. Theoretical background. Universiteit of Gent. <http://allserv.rug.ac.be/~skaya/Temp/intro/chptr1.htm>.
- Fengqui, L.-1996**, Production and Application of Rotifers in Aquaculture Magazine 22(3):16-22.
- Goodwin, M.-2000**, Introduction to the Rotifera. University of California, Berkeley. Museum of Paleontology. <http://www.ucmp.Berkeley.edu/phyla/rotifera/rotifera.html>
- Kentouri, M., Divanach, P., Hatziathanasiou, A. N. & Petrakis, N.-1993**, One day predictive equation of *Brachionus plicatilis* population growth in mass cultures using egg counts. World Aquaculture 93, 24-28 May, Torremolinos, Spain.
- Kentouri, M., Divanach, P., Hatziathanasiou, A. N. & Bengoa-Ruigomez, M.V.-1993**, Improved technology for reliable, rapid and high density production of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. 4ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Ωκεανογραφίας και Αλιείας, Ρόδος 26-29 Απριλίου.
- Kolisko, A.R.-1974**, Plankton Rotifers. Biology and Taxonomy. E. Schweizerbartsche Verlagsbuch-handlung Stuttgart. Die Binnengewasser Volume XXVI/1 Supplement.

- Kessler, E.-1980**, Mass culture of *Chlorella* strains under conditions of high salinity, acidity, and temperature. Arch. Hydrobiol./Suppl.60:80-86, Stuttgart.
- Kessler, E.-1985**, Upper limits of temperature for growth in *Chlorella* (Chlorophyceae). Plant Systematics and Evolution 151:67-71.
- Kleinow, W.-1999**, Stereopictures of internal structures and trophi of rotifers. Hydrobiol. in press
- Lawrence, E.-1989**, Henderson's Dictionary of Biological Terms. 10th Edition. Longman Group UK Limited.
- Lubzens, E., Gibson, O., Zmora, O. & Sukenik, A.-1995**, Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. Aquaculture 133:295-309.
- Montoya, H.T. & Olivera A.G.- 1993**, *Dunaliella salina* from saline environments of the central coast of Peru. Hydrobiologia 267:155-161.
- Νικολαΐδης Γ.Κ.-1987**, Σημειώσεις Φυκολογίας. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Έκδοση: Υπηρεσία Δημοσιευμάτων Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη.
- Rauw, N., Morales, J. & Persoone, G.-1984**, Mass culture of microalgae in aquaculture systems: Progress and constrains. Hydrobiologia 116/117:121-134.
- Peterfi, L.S. & Manton, I.-1968**, Observations with the electron microscope on *Asteromonas gracilis* Artari emend. (*Stephanoptera gracilis* (Artari) Wisl.), with some comparative observations on *Dunaliella* sp. Br. phycol. Bull. 3 (3):423-440.
- Παπανδρουλάκης, Ν., Divanach, P., Χατζπαθανασίου, Α., Bengoa-Ruigomez, M.V. & Κεντούρη, Μ.- 1998**, Χρήση παγωμένων και κατεψυγμένων κυττάρων *Tetraselmis suecica* για γρήγορη αποκατάσταση εντατικών καλλιεργειών *Brachionus plicatilis* (Muller). Εργασία στα πλαίσια του προγράμματος AIR (No AIR 1-CT92-0286), Κρήτη.
- Παπανδρουλάκης, Ν., Κεντούρη, Μ., Στεφανάκης, Σ. & Divanach, P.-1998**, Συγκριτική αξία ζωντανής και κατεψυγμένης *Chlorella minutissima* για την εκτροφή ιχθυονυμφών τσιπούρας *Sparus aurata* με την τεχνολογία του ψευδοπράσινου νερού. Εργασία στα πλαίσια του προγράμματος AIR (No AIR 1-CT92-0286), Κρήτη.
- Πετρίδης, Δ.-1997**, Εφαρμοσμένη στατιστική στην τεχνολογία τροφίμων. Εκδοτική «ΟΜΗΡΟΣ», Θεσσαλονίκη.
- Ruinen, J.-1938**, Notizen uber Salzflagellaten. II. Uber die Verbeitung der Salzflagellaten. Nachdruck verboten. Übersetzungsrecht vorbehalten. Botanisches Institut, Leiden.

Sanmartin, M., Bengoa-Ruigomez, M.V., Hatzithanasiou, A. N., Divanach, P. & Kentouri, M.-1995, On the use of submarine light tubes in large volume intensive *Chlorella sp.* (Beyenick) culture. Definition of the optimum number of lamps per unit of volume. Actas del Vo Congreso Nacional de Acuicultura, 10-13 Mayo.

Walsh, E.-2000, Rotifer systematic database. Department of biological sciences. University of Texas at El Paso.
<http://dmc.utep.edu/rotifer/>

Winsby, R.-1990, Rotifers and how to find them. Manchester Microscopical Society's Newsletter No. 18.

Χώτος, Γ. & Ρογδάκης, Ι.- 1992, Υδατοκαλλιέργειες ευρύαλων ψαριών - Λαβράκι & Τσιπούρα -Τεχνικές της αναπαραγωγής και πάχυνσης. Εκδόσεις «ΙΩΝ», Αθήνα.

Χώτος, Γ., Αβραμίδου, Δ., Αθανασόπουλος, Η. & Αρβανιτάκης, Γ.-1997, Μελέτη της βιολογίας του τροχοζώου *Brachionus plicatilis* σε θρεπτικά υποστρώματα, με βάση το αλοανθεκτικό φύκος *Asteromonas gracilis*. Τελική έκθεση ερευνητικού προγράμματος, Μεσολόγγι.

Χώτος, Γ. & Αβραμίδου, Δ.- 1995. Μελέτη της αύξησης του μονοκύτταρου αλόφιλου φύκου *Asteromonas gracilis* (Chlorophyta) σε συνθήκες μαζικής καλλιέργειας με τη χρήση διαφορετικών αλατοτήτων, φωτοπεριόδου και έλλειψης πρόσθετων βιταμινών. Γεωτεχνικά Επιστημονικά Θέματα. Τομ. 6, τεύχ.2:37-45.