



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΑΛΙΕΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Π.Μ.Σ.)

<<ΒΙΩΣΙΜΗ ΑΛΙΕΙΑ-ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ – SUSTAINABLE FISHERIES-
AQUACULTURE>>

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΦΥΤΟΠΛΑΓΚΤΟΝΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΜΕ
ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ-ΟΡΑΤΟΥ
(UV-Vis)
ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΕΚΠΟΜΠΗΣ

Δέσποινα Αβραμίδου (Ιχθυολόγος Τ.Ε.)

Επίβλεψη
Βλασούλα Μπεκιάρη
Αναπληρώτρια καθηγήτρια

Μεσολόγγι 2021

Περιεχόμενα

Περίληψη - Abstract	1
Ευχαριστίες	2
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
Τα φύκη και η σπουδαιότητά τους	3
Γενικώς περί υπολογισμού της φυκικής πυκνότητας	6
Σκοπός της εργασίας	7
Γενικά στοιχεία φασματοσκοπίας & φασματοφωτομετρίας	9
Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία	9
Φασματοσκοπία υπεριώδους - ορατού	10
Φασματοφωτόμετρο	13
Φθορισμός και φθορισομετρία	14
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	17
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	28
Φάσματα απορρόφησης κάθε φύκους	28
Σχέση μεταξύ πυκνότητας καλλιέργειας και οπτικής πυκνότητας	35
<i>Nephroselmis</i> sp.	36
<i>Amphidinium carterae</i>	38
<i>Phormidium</i> sp	41
<i>Dunaliella</i> sp	44
<i>Tetraselmis</i> sp. (var. red)	46
<i>Anabaena</i> sp	47
Φάσματα απορρόφησης διαφορετικών πυκνοτήτων μικροφυκικού είδους	51
Φάσματα εκπομπής διαφορετικών πυκνοτήτων μικροφυκικού είδους	57
Φάσματα εκπομπής διαφορετικών πυκνοτήτων της <i>Dunaliella</i> sp	57
Φάσματα εκπομπής διαφορετικών πυκνοτήτων της <i>Nephroselmis</i> sp	59
Φάσματα εκπομπής διαφορετικών πυκνοτήτων του <i>Amphidinium carterae</i>	60
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	63
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	64
Βιολογικά χαρακτηριστικά των εξετασθέντων μικροφυκών	64
1. <i>Phormidium</i> sp	66
2. <i>Nephroselmis</i> sp.	68
3. <i>Amphidinium carterae</i>	69
4. <i>Tetraselmis</i> sp. (var. red)	71
5. <i>Anabaena</i> sp	72
6. <i>Dunaliella</i> sp	73
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	75

Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως στόχο τη διερεύνηση της χρήσης της φασματοφωτομετρίας απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) και της φασματοφωτομετρίας εκπομπής (φθορισμομετρία) στον υπολογισμό της πυκνότητας της καλλιέργειας (σε κύτ./mL ή σε ξηρό βάρος g/L) ειδών φυτοπλαγκτού, τα οποία χρησιμοποιούνται για ποικίλους σκοπούς. Το σκεπτικό αυτού του εγχειρήματος συνίσταται στο να κατασκευαστούν πρότυπες καμπύλες βαθμονόμησης, οι εξισώσεις των οποίων να συσχετίζουν τις μετρηθείσες με αιμοκυττόμετρο πυκνότητες των καλλιιεργειών με την οπτική πυκνότητά τους για ένα ορισμένο μήκος κύματος στο φασματοφωτόμετρο απορρόφησης, καθώς και την πυκνότητά τους με την ένταση φθορισμού στο φθορισόμετρο. Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκαν 6 είδη μικροφυκών φυτοπλαγκτονικού τύπου: 3 χλωροφύκη (*Nephroselmis* sp., *Dunaliella* sp., *Tetraselmis* sp. [var. red]), 1 δινομαστιγωτό (*Amphidinium carterae*) και 2 νηματοειδή κυανοβακτήρια (*Phormidium* sp. & *Anabaena* sp.). Έπειτα από εξέταση των φασμάτων απορρόφησης για τα παραπάνω είδη, επιλέχθηκαν τα μήκη κύματος 430, 680 και 750 nm για να χρησιμοποιηθούν στις βαθμονομήσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν πολύ υψηλούς συντελεστές συσχέτισης κατά Pearson ($R^2 > 0,9$) για όλα τα μήκη κύματος, με εξισώσεις που ποίκιλαν κατά είδος και χρησιμοποιούμενου μήκους κύματος για όλο το εύρος των πυκνοτήτων που μπορούν να υπάρξουν για κάθε καλλιέργεια.

Κατά τη φθορισμομετρική εξέταση σε 4 από τα παραπάνω είδη βρέθηκε ότι η πυκνότητα καλλιέργειας και η ένταση φθορισμού μπορούν να δώσουν αξιόπιστες βαθμονομήσεις μόνο για περιορισμένο εύρος πυκνοτήτων, που απαντάται στα αρχικά στάδια καλλιέργειας, αποκλείοντας τις υψηλές πυκνότητες.

Abstract

The aim of the present dissertation is to investigate the use of the UV-Vis absorption and emission spectrophotometry in the calculation of the culture density (in cells / mL or in dry weight g / L) of phytoplankton species which are used for various purposes. The rationale for this project is to construct standard calibration curves with equations that correlate the hemocytometer densities of the algal cultures with their optical density measured at a certain wavelength in a spectrophotometer and their densities against fluorescence intensity in a fluorescence-spectrophotometer. Six species of phytoplankton microalgae were selected; 3 chlorophytes (*Nephroselmis* sp., *Dunaliella* sp., *Tetraselmis* sp. [var. red]), 1 dinophyte (*Amphidinium carterae*) and 2 filamentous cyanobacteria (*Phormidium* sp. & *Anabaena* sp.). After examining the absorption spectra of all, the wavelengths of 430, 680 and 750 nm were selected for use in the calibrations. The results showed that all wavelengths gave very high Pearson correlation coefficients ($R^2 > 0.9$) with equations that varied among species and wavelength used across the range of densities that can exist in each culture.

During the fluorometric examination in 4 of the above species it was found that the culture density and the fluorescence intensity can give reliable calibrations only in a range of densities that is found in the early stages of culture, i.e. high culture densities are excluded.

Ευχαριστίες

Ως συγγραφέας του παρόντος ευχαριστώ την αναπληρώτρια καθηγήτρια κα Βλασούλα Μπεκιάρη για την αμέριστη βοήθειά της στην επιλογή του θέματος και στην καθοδήγηση στις τεχνικές της φασματοφωτομετρίας που αποτέλεσε για εμένα ένα καινούργιο και γοητευτικό επιστημονικώς κόσμο.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζω στον καθηγητή κ. Γ. Χώτο στο εργαστήριο ευθύνης του οποίου (Καλλιέργειας πλαγκτού) και υπό την αμέριστη καθοδήγησή του έγιναν οι καλλιέργειες και οι μετρήσεις των φυτοπλαγκτονικών οργανισμών. Νιώθω ιδιαίτερα τυχερή που επιστημονικώς έχω συνδέσει την εργασιακή μου πορεία με ένα τέτοιο εργαστήριο όπου καθημερινά η μικροσκοπική ζωή εκδηλώνεται σε όλες τις εκφάνσεις της και επί 30 χρόνια τροφοδοτείται από το ασίγηστο πάθος αυτού του ανθρώπου.

Τέλος ευχαριστίες εκφράζω στους κ.κ. Ράμφο Αλέξιο και Δενδρινό Παναγάγγελο (αναπληρωτή και επίκουρο καθηγητή αντίστοιχα) για την συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Μεσολόγγι

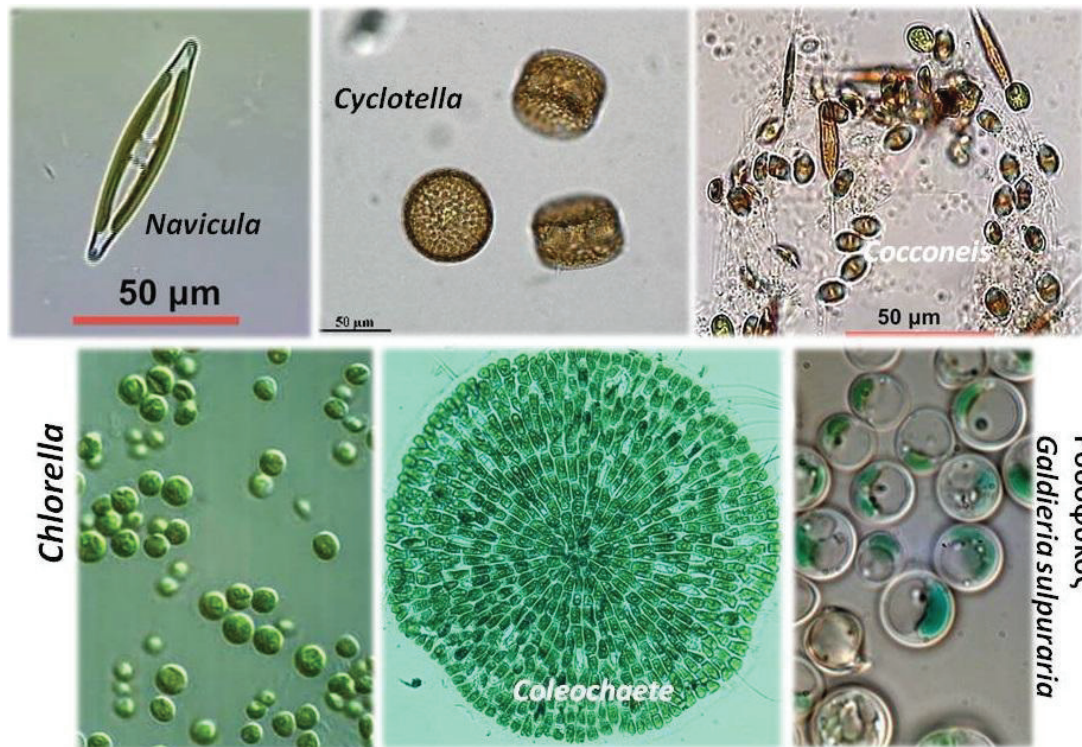
Φεβρουάριος 2021

Δέσποινα Αβραμίδου

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα φύκη και η σπουδαιότητά τους

Τα φύκη, είτε ως μικροφύκη-φυτοπλαγκτόν (Εικόνα 1), είτε ως μακροφύκη, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη διαβίωση, καθώς είναι ιδιαίτερα σημαντικά για την ισορροπία του υδάτινου οικοσυστήματος. Η σημασία των φυκών σταδιακά γίνεται κατανοητή από ολόένα και μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού, αφού οι χρήσεις τους από ιδιαίτερα ειδικές που ήταν μέχρι πριν 2-3 δεκαετίες, άρχισαν να διευρύνονται, αποκτώντας περισσότερες προοπτικές εκμετάλλευσης αλλά και εφαρμογές σε τομείς της βιομηχανίας.



Εικόνα 1. Αντιπροσωπευτικά είδη μικροφυκών.

Στην σύγχρονη εποχή, τα επίπεδα CO_2 της ατμόσφαιρας παρουσιάζουν αυξητικές τάσεις φτάνοντας ήδη τα 450 ppm (Shen, 2014) επιδεινώνουν το φαινόμενο της υπερθέρμανσης του πλανήτη. Όπως δηλώνεται από το IPCC, μια πιθανή θεραπεία προκύπτει μόνο από την δέσμευση όσο το δυνατόν περισσότερου CO_2 από φυσικά μέσα. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης, με τα φύκη να αποτελούν βασικό στοιχείο της διαδικασίας. Σημαντικό ρόλο σε αυτό διαδραματίζουν τα μικροφύκη, καθώς είναι 10-50 φορές πιο αποτελεσματικά στην δέσμευση CO_2 συγκριτικά με τα χερσαία φυτά (Cuellar-Bermudez, 2015).

Επιπλέον, μαζική καλλιέργεια των μικροφυκών (Εικόνα 2) πραγματοποιείται για χρήση αυτών ως βιοκαύσιμα, πρώτες ύλες και προϊόντα προστιθέμενης αξίας, επεξεργασία λυμάτων και αφαίρεση θρεπτικών ουσιών (Ravindran et al., 2016). Ο αριθμός των καλλιεργούμενων μικροφυκών αυξάνεται συνεχώς και συγκεντρώνεται όλο και περισσότερη γνώση σχετικά με τις ανάγκες τους για αποτελεσματικότερη παραγωγή. Οι τεχνικές καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται για τα διάφορα είδη προσαρμόζονται αναλόγως τις

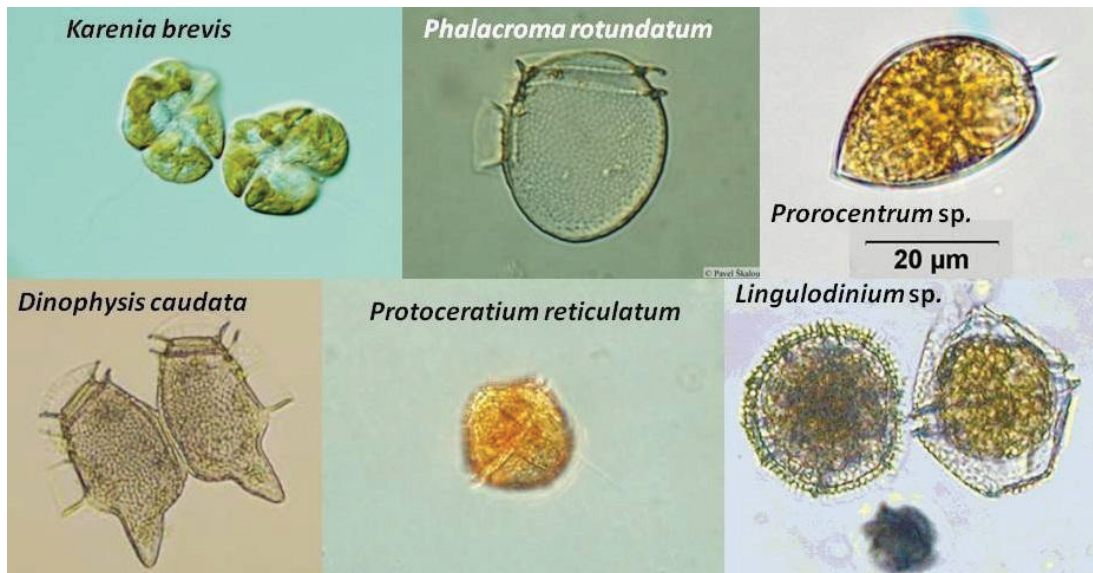
ανάγκες τους σε περιβαλλοντικές συνθήκες (φως, αλατότητα, θερμοκρασία), σε χημικές ουσίες (θρεπτικά συστατικά, pH, τοξικότητα) και σε ειδική διαμόρφωση υποστήριξης (π.χ. αερισμός, προσθήκη CO₂, διαμόρφωση δοχείου). Στόχος είναι είναι η παραγωγή μέγιστης βιομάζας φυκών με χρήση του οικονομικότερου τρόπου σε σχέση με τον χώρο, τον χρόνο και την ενέργεια της διεργασίας. Κοινή πρακτική καλλιέργειας μικροφυκών είναι η συνεχής παρακολούθηση της πυκνότητας των μελετώμενων φυκών σε όρους κυττάρων / mL ή ξηρού βάρους (g / L).



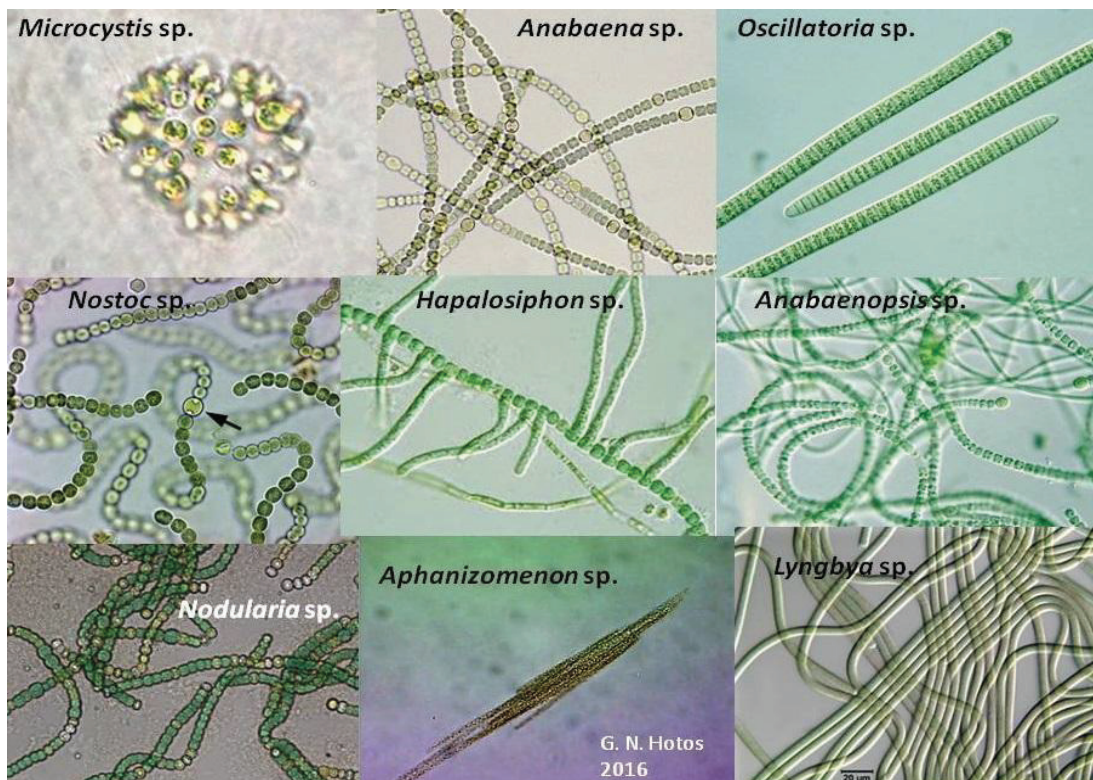
Εικόνα 2. Χαρακτηριστικά φωτιζόμενα δοχεία μαζικής καλλιέργειας μικροφυκών.

Αξίζει να σημειωθεί ωστόσο και η αρνητική επίδραση των φυκών. Τα φύκη πολλές φορές γίνονται τοξικά εξαιτίας της υπερβολικής ανάπτυξής τους (ανθίσεις - blooms) στα φυσικά νερά, λόγω ευτροφισμού, δηλαδή παρουσίας ανθρωπογενών ουσιών (λύματα, λιπάσματα, βιομηχανικά απόβλητα κ.α.) τα οποία προκαλούν αύξηση του πληθυσμού τους. Οι ανθίσεις αυτές των φυκών καταναλώνουν γρήγορα το οξυγόνο του νερού (κυρίως από τα αποσυντιθέμενα φύκη) με συνέπεια μαζικούς θανάτους ψαριών και πρόκληση δυσοσμίας. Επιπροσθέτως, πολλά φύκη (Εικόνες 3 & 4) παράγουν αυτοτελώς τοξίνες ως μηχανισμό άμυνας απέναντι στους θηρευτές τους, οι οποίες επιδρούν αδιακρίτως σε υδρόβιους και χερσαίους πληθυσμούς επιφέροντας πλήθος βλαβών έως και θάνατο.

Ως απόρροια των παραπάνω αρνητικών επιδράσεων των φυκών (και ιδιαιτέρως μικροφυκών και φυτοπλαγκτόν) ο άνθρωπος επεμβαίνει με κατάλληλα μέσα εάν ο πληθυσμός των φυκών τοπικά φθάσει σε υπερβολικό βαθμό συγκέντρωσης. Για την πρόληψη τους μάλιστα, η παρακολούθηση των πληθυσμών είναι αναγκαία πριν ακόμα συμβεί η άνθισή τους.



Εικόνα 3. Είδη μικροφυκών της κατηγορίας των δινομαστιγωτών που παράγουν τοξίνες.



Εικόνα 4. Αντιπροσωπευτικά κυανοβακτηριακά μικροφύκη που παράγουν τοξίνες.

Στην περίπτωση ωστόσο χρήσης των φυκών για παραγωγικούς σκοπούς, η ταχεία και αποτελεσματική - σε βαθμό υπερβολής- αύξηση του πληθυσμού τους (σε ελεγχόμενο περιβάλλον) είναι αναγκαία. Η αύξησή τους επιδιώκεται σε ειδικές μονάδες επεξεργασίας λυμάτων έτσι ώστε να απορροφηθούν τα θρεπτικά στοιχεία των νερών και κατόπιν τα νερά θα χυθούν στους φυσικούς αποδέκτες μεταφέροντας πλέον πολύ λιγότερο ρυπαντικό φορτίο (pollution abatement). Τέλος, η καλλιέργεια μικροφυκών στις υδατοκαλλιέργειες και στην βιομηχανική παραγωγή χρησιμεύει στην παραγωγή βιοκαυσίμων, διατροφικών ουσιών, αντιοξειδωτικών και φαρμάκων.

Συνάγεται λοιπόν το συμπέρασμα πως η αύξηση του πληθυσμού των φυκών, και η παρακολούθησή της θα πρέπει να αποτελεί μέλημα του επιστήμονα. Χωρίς επίβλεψη της πορείας καλλιέργειών των μικροφυκών είναι αδύνατη η διεξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων και χωρίς παρακολούθηση της πυκνότητας των φυκών στα φυσικά νερά είναι αδύνατη η πρόληψη.

Γενικώς περί υπολογισμού της φυκικής πυκνότητας

Οι μέθοδοι υπολογισμού της πυκνότητας των κυττάρων του φυτοπλαγκτού (είτε από τη φύση είτε από καλλιέργειες) ποικίλουν και για την έκφραση της χρησιμοποιείται κυρίως το : κύτταρα mL^{-1} (συντ. $\text{κ}ύτ.\text{mL}^{-1}$). Συχνά όμως απαντάται και ως ξηρό βάρος L^{-1} (συντ. ξ.β. L^{-1} ή d.w. L^{-1}) το οποίο ως έκφραση χρησιμοποιείται κυρίως όταν προσδιορίζεται η τελική απόδοση μιας καλλιέργειας. Μια άλλη έκφραση αποτελεί και ο υπολογισμός της χλωροφύλλης ως $\mu\text{g chl./ml}$ η οποία όμως προϋποθέτει εκτεταμένη προεργασία του δείγματος και είναι αρκετά χρονοβόρα διαδικασία- αν και ιδιαιτέρως χρήσιμη σε άλλου είδους μελέτες. Σε κάθε περίπτωση από τις δυο τελευταίες ωστόσο, οι μετρήσεις δεν είναι πλήρεις, χρήσιμες και διαχειρίσιμες αν δεν αντιπροσωπεύουν και μέτρηση της πυκνότητας των κυττάρων στο δείγμα που εξετάστηκε.

Έτσι, έχοντας ως κεντρική ιδέα την προσέγγιση της διαδικασίας υπολογισμού της πυκνότητας των φυτοπλαγκτονικών κυττάρων χρησιμοποιούνται διάφορα εργαλεία, ένα εκ των οποίων, η καταμέτρηση των κυττάρων ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος με φωτονικό μικροσκόπιο με χρήση κατάλληλης αντικειμενοφόρου πλάκας. Μικρής ποσότητας δείγμα τοποθετείται στην πλάκα (αιμοκυττόμετρο) και αφήνεται να απλωθεί επάνω από ένα κατάλληλα χαραγμένο πλέγμα στην επιφάνεια του αιμοκυττόμετρου. Το πλέγμα έχει γνωστή επιφάνεια, διαιρεμένη καταλλήλως με γραμμές. Ο όγκος νερού που εμπεριέχεται μεταξύ του πλέγματος και της καλυπτρίδας που συμπιέζει το νερό είναι καθορισμένος. Μετρώντας τα κύτταρα με την βοήθεια του μικροσκοπίου (καλύπτοντας όλη την επιφάνεια του πλέγματος) μπορούμε βάσει κατάλληλου τύπου να ανάγουμε τη μέτρηση σε αριθμό (κυττάρων) ανά mL .

Σε κάθε περίπτωση η καταμέτρηση με το αιμοκυττόμετρο καταγράφει τον αριθμό των κυττάρων που διακρίνει ο εξεταστής με το φωτονικό μικροσκόπιο. Η τεχνική αυτή δεν είναι ιδιαίτερα δύσκολη, απαιτεί όμως ακριβείς χειρισμούς και είναι πολύ χρονοβόρα ακόμη και για ένα μόνο δείγμα. Η ώρα εξέτασης πολλών δειγμάτων μπορεί να μειωθεί δραματικά αν η καταμέτρηση δεν γίνει από τον άνθρωπο αλλά από συσκευή που καταγράφει αυτόματα τα κύτταρα που βρίσκονται στο δείγμα που εισάγουμε. Τέτοιες είναι οι συσκευές ηλεκτρονικής καταμέτρησης σωματιδίων (Coulter counter, Flow cytometer, κ.ά.) οι οποίες όμως παρουσιάζουν και μειονεκτήματα, δύο εκ των οποίων είναι:

α) Η συσκευή καταμετρά ως κύτταρα φυτοπλαγκτού του δείγματος και διάφορα θραύσματα υλικών ή τμήματα νεκρού φυτοπλαγκτού. Τέτοιες καταγραφές είναι λανθασμένες και μπορεί να τις αποφύγει ο ερευνητής που κάνει χρήση του αιμοκυττόμετρου αλλά όχι και η συσκευή (παρόλο που μπορεί να δεχτεί ρυθμίσεις σχετικά με το μέγεθος των σωματιδίων που θα καταγράψει ως έγκυρα). Συνεπώς, η χρήση ηλεκτρονικού καταμετρητή απαιτεί δείγμα με νερό απαλλαγμένο στο μέγιστο δυνατό βαθμό από ανόργανα σωματίδια κάτι το οποίο είναι δύσκολο να γίνει στην περίπτωση μιας καλλιέργειας φορτισμένη με πυκνή μάζα φυτοπλαγκτού.

β) Οι τιμές για απόκτηση τέτοιων συσκευών είναι ιδιαίτερα υψηλές, ώστε να αποκτηθούν από μια μέση μονάδα φυκοκαλλιέργειας.

Σκοπός της εργασίας

Η τεχνική της φασματοφωμετρίας είναι μη επεμβατική, δηλαδή δεν καταστρέφει το δείγμα τόσο ως ποσότητα όσο και ως σύσταση. Η εφαρμογή της φασματοφωτομετρίας στις φυκοκαλλιέργειες παρουσιάζει ποικίλα πλεονεκτήματα όπως ταχύτητα, απλότητα, ακρίβεια και απουσία πολυάριθμων αντιδραστηρίων. Το επιθυμητό μήκος κύματος (nm) επιλέγεται στην διάταξη του οργάνου και στην συνέχεια έχοντας εισάγει τυφλό διάλυμα (δηλαδή σκέτο νερό χωρίς το φύκος) μηδενίζεται η αναγραφόμενη ένδειξη. Κατόπιν, εισάγεται η κυψελίδα που περιέχει το δείγμα του φυτοπλαγκτού και καταγράφεται η τιμή της απορρόφησης (Absorbance) ή οπτικής πυκνότητας (O.D. - Optical Density).

Αν χρησιμοποιήσουμε για εξέταση δείγματα φυτοπλαγκτού γνωστής πυκνότητας (σε κύτ./mL) και πραγματοποιήσουμε μετρήσεις για διάφορες πυκνότητες τότε παρατηρείται ότι τα ζεύγη τιμών απορρόφησης-πυκνότητας παρουσιάζουν μια γραμμική παλινδρόμηση και προκύπτει η επιθυμητή σχέση που θα συνδέει τα δυο αυτά μεγέθη.

Η εφαρμογή της παραπάνω διαδικασίας για καλλιέργειες διαφόρων ειδών μικροφυκών προσφέρει στον ερευνητή την δυνατότητα παρακολούθησης της καλλιέργειας μέσω απλής μέτρησης της απορρόφησης, ποσότητας δείγματος στο φασματοφωτόμετρο και στην συνέχεια μετατροπής αυτής σε πυκνότητα κυττάρων, ώστε να επιβλέπεται και η πορεία της αύξησης.

Παρόλη την πρακτικότητα της μεθόδου δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία συστηματοποιημένες και εφαρμόσιμες εργασίες που να αποτελούν οδηγό χρήσης για τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα είδη φυτοπλαγκτού στις υδατοκαλλιέργειες (π.χ. *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Rhodomonas*, *Dunaliella*, κ.ά.). Από τις λίγες εργασίες που υπάρχουν (Gaigalas et al. 2009; Rodrigues et al 2011; Almomaní & Ormeçí, 2018)) δεν προκύπτουν στοιχεία που να μπορούν να εφαρμοστούν στα συνήθη φυτοπλαγκτονικά είδη που χρησιμοποιούνται στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς, ούτε έχει αναλυθεί πλήρως το θέμα του καλύτερου μήκους κύματος με το οποίο θα μετρηθεί η απορρόφηση. Πραγματικά επειδή η μετρούμενη απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο επηρεάζεται από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές των κυττάρων (Χώτος, 2020) και επειδή η κάθε χρωστική παρουσιάζει το δικό της μέγιστο απορρόφησης σε ένα (ή και δεύτερο) χαρακτηριστικό μήκος κύματος, η επιλογή του κατάλληλου μήκους κύματος είναι υψίστης σημασίας ώστε αυτό που θα επιλεγεί να δίνει την καλύτερη συσχέτιση απορρόφησης-πυκνότητας κυττάρων. Εξυπακούεται ότι άπαξ και αποδειχθεί το πιο είναι το καλύτερο μήκος κύματος για το συγκεκριμένο εξεταζόμενο φύκος, αυτό (το μήκος κύματος) πλέον θα πρέπει να χρησιμοποιείται και από άλλους ερευνητές που χρησιμοποιούν την εξίσωση που καθιέρωσε την πρώτη φορά ο επιχειρήσας τον πειραματισμό.

Τα διάφορα είδη των φυκών διαφέρουν ως προς τη σύσταση των φωτοσυνθετικών χρωστικών τους και συνεπώς παρουσιάζεται ποικιλία στις αποκρίσεις της απορρόφησης στα διάφορα μήκη κύματος που επιλέγονται. Συνήθως σε τέτοιες δραστηριότητες εκτίμησης της φυτοπλαγκτονικής καλλιέργειας με φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιούνται διάφορα μήκη κύματος στο εύρος 540-685 nm (Ugwu et al. 2007; Wang et al. 2010; Oh et al. 2010; Rodrigues et al. 2011) αλλά αυτό δεν αποκλείει και τη χρησιμοποίηση και άλλων μηκών κύματος. Στην πραγματικότητα αυτό που επιδιώκουμε είναι να βρούμε ένα χρηστικό και αξιόπιστο μήκος κύματος για το κάθε φύκος. Δεν αποκλείεται βέβαια η αναζήτηση αυτή να μην έχει τόση σημασία όση ες' αρχής μπορεί κάποιος να υποθέσει μια και η απορρόφηση

στην ουσία είναι έκφραση της "θολερότητας" της προκαλούμενης λόγω της πυκνότητας των αιωρούμενων κυττάρων των μικροφυκών και η έντασή της (της απορρόφησης) εξαρτάται από την πυκνότητα αυτή καθαυτή. Όμως αυτό πρέπει να αποδειχθεί και αυτός ακριβώς είναι ο σκοπός της παρούσας εργασίας.

Ανακεφαλαιώνοντας, με την παρούσα εργασία επιδιώκουμε να απαντήσουμε στα παρακάτω:

1. Αν ναι ποιο είναι το βέλτιστο μήκος κύματος για το συγκεκριμένο είδος φυτοπλαγκτού;
2. Μπορεί η φασματοφωτομέτρηση να βρει εφαρμογή σε όλα τα είδη φυτοπλαγκτού;

Για να επιτευχθεί αυτό, η συχνή δειγματοληψία της καλλιεργούμενης βιομάζας είναι απαραίτητη προϋπόθεση και μια μικρή ποσότητα υγρού εξετάζεται μικροσκοπικά για τη μέτρηση των κυττάρων, ή μια ορισμένη ποσότητα υγρού διηθείται και στη συνέχεια ξηραίνεται για ώρες σε κλίβανο και στη συνέχεια ζυγίζεται για να υπολογιστεί το ξηρό βάρος. Και οι δύο είναι χρονοβόρες διαδικασίες ειδικά όταν χρησιμοποιούνται πολλά αγγεία καλλιέργειας. Η παρακολούθηση της πυκνότητας καλλιέργειας μπορεί να απλουστευθεί πολύ καταγράφοντας απλώς την οπτική πυκνότητα (απορρόφηση) των δειγμάτων καλλιέργειας και συμπεραίνοντας την πυκνότητα των φυκών χρησιμοποιώντας μια γραμμή παλινδρόμησης μεταξύ οπτικής πυκνότητας (O.D.) και πυκνότητας των κυττάρων. Αυτό επιτυγχάνεται με μέτρηση μιας φοράς αρκετών δειγμάτων με διαφορετικές πυκνότητες και μετρώντας με αιματοκυτταρόμετρο τον αριθμό των κυττάρων ανά ml. Στη συνέχεια, κάθε πυκνότητα κυττάρων αντιστοιχεί στο σχετικό O.D. σε φασματοφωτόμετρο σε κατάλληλο μήκος κύματος. Στη συνέχεια μόνο η O.D. πρέπει να μετρηθεί και η κυτταρική πυκνότητα υπολογίζεται με την εξίσωση παλινδρόμησης. Υπάρχουν στη βιβλιογραφία (Padovan, 1992; Valer and Glock, 1998; Geis et al., 2000; Mikschofsky et al., 2009; Ribeiro-Rodrigues et al., 2011; Santos-Ballardo et al., 2015) διάφορες εξισώσεις παλινδρόμησης αυτού του τύπου για πολλά είδη μικροφυκών. Ωστόσο, υπάρχουν επίσης πολλά μικροφύκη με δυνατότητα καλλιέργειας για τα οποία δεν έχει επιχειρηθεί ποτέ η εύρεση αυτής της σχέσης.

Στη λογική της φασματοφωτομετρικής μέτρησης των καλλιεργειών και των μηκών κύματος που επιλέγονται για χρησιμοποίηση, εντάσσεται και ένα προκαταρκτικό στάδιο ανάλυσης του φάσματος απορρόφησης του εκάστοτε εξεταζόμενου φύκου. Το φάσμα απορρόφησης είναι χαρακτηριστικό για κάθε είδους φύκος και η μορφή του σε μήκος κύματος εύρους των 300-800 nm επηρεάζεται από τη σύνθεση των χρωστικών που περιέχουν τα κύτταρα. Ως πρώτη ανάλυση λαμβάνεται λοιπόν το φάσμα απορρόφησης πρωτίστως για να επιβεβαιωθεί το κάθε μήκος κύματος όπου παρουσιάζονται οι κορυφές και αφετέρου για να διερευνηθεί αν ποικίλες πυκνότητες καλλιέργειας του ίδιου είδους παρουσιάζουν μεταβολή στο σχήμα του φάσματος και αν υπάρχει κάποιο πρότυπο που να συνδέει την πυκνότητα των κυττάρων με την αλλαγή των φασμάτων. Κάτι τέτοιο αν επιβεβαιωθεί ότι ισχύει για κάθε πιθανή πυκνότητα ή για ένα ορισμένο εύρος πυκνοτήτων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και στην εκτίμηση των πληθυσμιακών δεδομένων του φυτοπλαγκτού στα φυσικά νερά υπό την προϋπόθεση βεβαίως ότι είναι γνωστή σε επαρκή βαθμό η σύνθεση των φυτοπλαγκτονικών πληθυσμών.

Επιπρόσθετα με τα φάσματα απορρόφησης για να εκτιμηθεί το ποιοτικό και ποσοτικό μέρος φυτοπλαγκτονικών καλλιεργειών υπάρχει και η τεχνική της φθορισμομετρίας με την οποία λαμβάνονται τα φάσματα εκπομπής των καλλιεργειών. Δηλαδή ένα δείγμα φυτοπλαγκτονικής καλλιέργειας διεγείρεται φωτίζοντάς το στο φθορισμόμετρο με φως

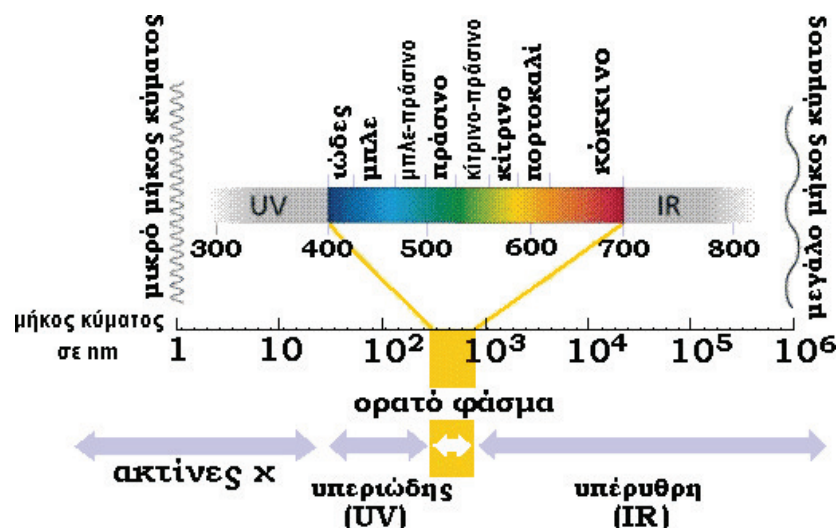
ορισμένου (και κατάλληλου) μήκους κύματος και καταγράφεται η εκπεμπόμενη ακτινοβολία των χρωστικών του (συνήθως η χλωροφύλλη) ως εύρος φάσματος με κορυφές μεγαλύτερου μήκους κύματος από τις αντίστοιχες του φάσματος απορρόφησης. Το φάσμα εκπομπής και η συνήθως μία χαρακτηριστική κορυφή που παρουσιάζει είναι χαρακτηριστικό για το κάθε είδος φυτοπλαγκτού και μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για την ταυτοποίηση του είδους όσο και για την εκτίμηση της πυκνότητας του πληθυσμού του. Όμως εξαιτίας του ότι στο θέμα αυτό δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα στη βιβλιογραφία, στην παρούσα εργασία το επιχειρούμε σε μια γενική διερευνητική προσέγγιση για να διαπιστώσουμε αν μπορεί να δώσει αξιόπιστα δεδομένα για το χαρακτηρισμό ενός είδους φυκών και για να δούμε αν υπάρχει αναλογικότητα του ύψους της κορυφής εκπομπής μεταξύ διαφόρων πυκνοτήτων της εξεταζόμενης καλλιέργειας.

Βάσει των παραπάνω η παρούσα εργασία στοχεύει να παρουσιάσει εξισώσεις παλινδρόμησης αναφοράς για τις πυκνότητες των κυττάρων για επιλεγμένα μικροφύκη που είναι πολλά υποσχόμενα για την παραγωγή προϊόντων αξίας μετά από μαζική καλλιέργεια με εφικτό τρόπο.

Γενικά στοιχεία φασματοσκοπίας & φασματοφωτομετρίας

Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία

Ο ήλιος εξαιτίας πυρηνικών συντήξεων που λαμβάνουν χώρα στο εσωτερικό του, παράγει ενέργεια, την οποία εκπέμπει ως ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (Εικόνα 5). Το ορατό φως, τα ραδιοκύματα, τα μικροκύματα και οι ακτίνες -X αποτελούν συνιστώσες της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, μέρος της οποίας θα διασπαρθεί στο διάστημα ενώ άλλο θα φθάσει στην Γη. Ειδικά το ορατό φως ως μορφή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας αποτελείται από ταλαντούμενα ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία τα οποία ταξιδεύουν στο κενό με ταχύτητα περίπου $3 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$. Η ποιοτική και ποσοτική μελέτη της σύστασης της ύλης μέσω της ανάλυσης του φωτός το οποίο εκπέμπεται ή απορροφάται από αυτή, αποτελεί το αντικείμενο της φασματοσκοπίας (spectroscopy).



Εικόνα 5. Το φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (electromagnetic radiation), που εκπέμπει ο ήλιος, με μεγέθυνση της περιοχής που αποτελεί το φάσμα του ορατού φωτός. Πηγή: www.Cyprusbiology.com.

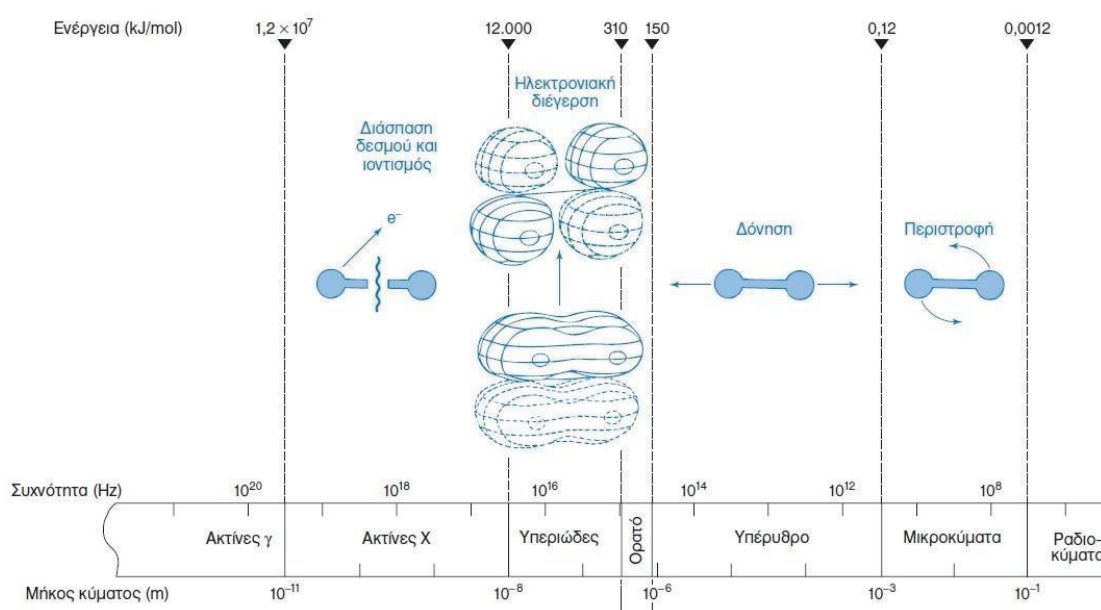
Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 5, η περιοχή εύρους 400-700 nm αντιπροσωπεύει το ορατό τμήμα του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Ταυτόχρονα, η συγκεκριμένη περιοχή του φάσματος είναι και αυτή που αξιοποιείται περισσότερο από τους φωτοσυνθετικούς μηχανισμούς (PAR-Photosynthetic Active Radiation). Το φάσμα του ορατού εκτείνεται από το τέλος της περιοχής του ιώδους (~400 nm) έως την αρχή του ερυθρού (~700 nm). Όσο προχωράμε από τα 400 στα 700 nm η συχνότητα μειώνεται, όπως και αναλογικά και η ενέργεια. Αναλόγως με την ενέργεια που αντιπροσωπεύει κάθε μήκος όπως φαίνεται στην εικόνα 5, παρουσιάζεται και κλιμακωτή αλλαγή του χρώματος (εφόσον η ακτινοβολία είναι συνεχής). Πέραν του ιώδους (<400 nm), σε ακόμα υψηλότερες συχνότητες υπάρχει η υπεριώδης ακτινοβολία που είναι βλαβερή για τα κύτταρα και πέραν του ερυθρού (>700 nm), η υπέρυθη ακτινοβολία η οποία μπορεί να ανιχνευθεί ως θερμότητα με χρήση ειδικών οργάνων.

Φασματοφωτομετρία απορρόφησης υπεριώδους -ορατού (UV-Vis).

Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι χημικής ανάλυσης, όπου ανήκει και η φασματοφωτομετρία UV-Vis, χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την επίλυση χημικών προβλημάτων, που σχετίζονται κυρίως με τη δομή, την κινητική, την ταυτοποίηση και την ποσοτική ανάλυση διαφόρων ενώσεων.

Οι μέθοδοι αυτές πλεονεκτούν στο η απαιτούμενη ποσότητα εξεταζόμενου δείγματος όχι μόνο είναι πολύ μικρή, αλλά παραμένει και αναλλοίωτη έπειτα από το πέρασμα των μετρήσεων. Επιπλέον, χαρακτηρίζονται από μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία και είναι αρκετά γρήγορες.

Οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι βασίζονται στην επίδραση κατάλληλης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας η οποία δεσμεύεται από τα άτομα, ή τα μόρια μιας ουσίας προκαλώντας ηλεκτρονιακές διεγέρσεις, διεγέρσεις πυρήνων, αλλαγές στην περιστροφή και δόνηση των μορίων (Εικόνα 6). Στη συνέχεια τα άτομα και τα μόρια επιστρέφουν συνήθως στην αρχική τους κατάσταση, αποβάλλοντας το ποσό της ενέργειας που απορρόφησαν. Η καταγραφή της απορρόφησης της ακτινοβολίας σε συνάρτηση με το μήκος κύματος αποτελεί το φάσμα απορρόφησης, το οποίο είναι γραμμικό στα άτομα και έχει μορφή ταινιών στα μόρια.



Εικόνα 6. Συνοπτική απεικόνιση των ηλεκτρονιακών διεγέρσεων των φωτοσυνθετικών χρωστικών από τη δράση των φωτονίων. Πηγή: https://student.cc.uoc.gr/uploadFiles/184-%CE%A7%CE%97%CE%9C-301/18Kef_433_458.pdf

Η απορρόφηση ακτινοβολίας στην υπεριώδη περιοχή (ενέργεια ~ 100 Kcal/mole) προκαλεί ηλεκτρονιακές μεταβολές δόνησης και περιστροφής. Όταν οι ταινίες που αντιπροσωπεύουν γειτονικές περιοχές επικαλύπτονται μερικώς, το αποτέλεσμα είναι η λήψη ευρέων κορυφών. Για το υπεριώδες διακρίνουμε δύο περιοχές: α) το εγγύς υπεριώδες (400-190 nm) και β) το άπω υπεριώδες (190-100 nm). Η συνήθης οργανολογία άρα και οι μελέτες μας συνήθως περιορίζεται στο εγγύς υπεριώδες, διότι η απορρόφηση κάτω από τα 190 nm επηρεάζεται α) από το διοξείδιο του πυριτίου (χαλαζία), από το οποίο είναι κατασκευασμένες οι κυψελίδες και β) από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο το οποίο δεν επιτρέπει μετρήσεις στο άπω υπεριώδες.

Προκειμένου να απορροφηθεί ακτινοβολία, τα φωτόνια που προσκρούουν στο δείγμα θα πρέπει να έχει ενέργεια ίση με αυτή που χρειάζεται για να προκληθεί μια κβαντισμένη ενεργειακή μεταβολή.

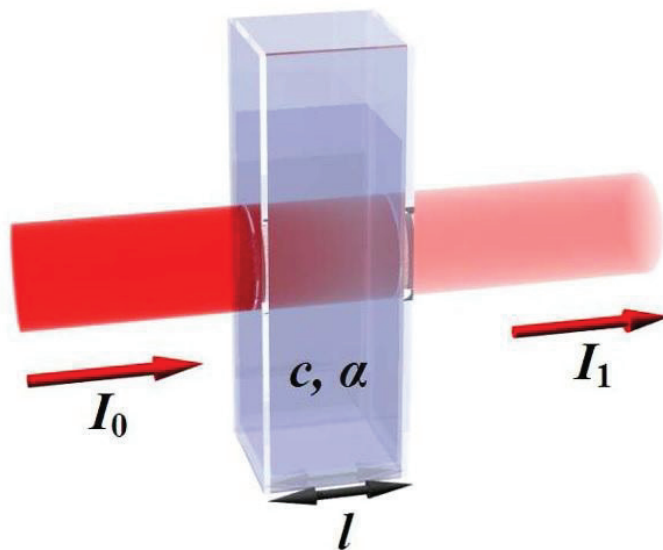
Η ενέργεια των ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων είναι της τάξης μερικών eV και δίδεται από τον τύπο:

$$E = E_1 - E_2 = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (1)$$

όπου E η ενέργεια, h η σταθερά του Planck, ν η συχνότητα της ακτινοβολίας, c η ταχύτητα του φωτός στο κενό (3×10^8 m s⁻¹) και λ το μήκος κύματος.

Οι ποσοτικές μετρήσεις της φασματοφωτομετρίας UV-VIS στηρίζονται στο ότι η απορρόφηση της ακτινοβολίας εξαρτάται από την ποσότητα της ουσίας που απορροφά. Η σχέση εκφράζεται μέσω του νόμου των Beer-Lambert.

Στην εικόνα 7 απεικονίζεται μια κυψελίδα η οποία περιέχει διάλυμα ουσίας, μέσα από την οποία διέρχεται ακτινοβολία αρχικής έντασης I_0 και εξέρχεται ακτινοβολία έντασης I .



Εικόνα 7. Ακτινοβολία διερχόμενη μέσα από κυψελίδα η οποία περιέχει κάποιο διάλυμα χημικής ουσίας.

Σύμφωνα με το νόμο Beer-Lambert ισχύει:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\alpha l c} = I_0 \cdot 10^{-\epsilon l c} \quad (2)$$

Όπου:

I_1 : η ένταση της ακτινοβολίας που εξέρχεται από το διάλυμα

I_0 : ένταση προσπίπτουσας ακτινοβολίας

α : σταθερά αναλογίας, όταν η συγκέντρωση c του διαλύματος εκφράζεται σε g / L, ονομαζόμενη απορροφητικότητα

l : το μήκος της διαδρομής της ακτινοβολίας μέσα στο διάλυμα (δηλαδή το εσωτερικό πάχος της κυψελίδας στην οποία βρίσκεται το διάλυμα), το οποίο στο 99,9 % των περιπτώσεων ισούται με 1 cm

c : συγκέντρωση της απορροφούσας ουσίας

ϵ : σταθερά αναλογίας, όταν η συγκέντρωση c του διαλύματος εκφράζεται σε moles / L ονομαζόμενη μοριακή απορροφητικότητα ($\epsilon = \alpha \text{ MB}$, όπου MB το μοριακό βάρος της ουσίας)

Αν στην εξίσωση (2) πιο πάνω θέσουμε $c = 1 \text{ M}$, και $l = 1 \text{ cm}$, τότε $\epsilon = A$, όπου A η απορρόφηση της ουσίας (absorbance) η οποία είναι ίση με τον λογάριθμο του πηλίκου I_1/I_0 . Οπότε θεωρούμε ότι ο συντελεστής ϵ ισούται με την απορροφητικότητα του διαλύματός μας όταν η ουσία που μας ενδιαφέρει είναι σε συγκέντρωση 1 M. Επειδή οι τιμές του ϵ για τις περισσότερες ουσίες που απορροφούν κυμαίνονται από 1000 έως $10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, και τα φασματοφωτόμετρα δίνουν αξιόπιστες μετρήσεις απορροφητικότητας μέχρι την τιμή του 2,00, αντιλαμβανόμαστε ότι για να μπορέσουμε να έχουμε αξιόπιστες τιμές απορροφητικότητας για ουσίες με τέτοιο εύρος τιμών ϵ , θα πρέπει οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις να κυμαίνονται από χαμηλά mM (10^{-3} M) μέχρι πολύ χαμηλά επίπεδα μM (10^{-6} M). Ο Νόμος των Beer-Lambert ισχύει για αυστηρά μονοχρωματική ακτινοβολία.

Η σχέση (2) μετασχηματίζεται σε λογαριθμική μορφή:

$$\log \frac{I_1}{I_0} = -\epsilon c l \quad (3)$$

Το ϵ είναι ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης (molar absorption coefficient) και συνδέεται με απορροφητικότητα α με τη σχέση:

$$\epsilon = \frac{\alpha}{2.303} \quad (4)$$

Το γινόμενο $\epsilon c l$ ονομάζεται **απορρόφηση A**, (absorbance).

$$A = \epsilon c l \quad (5)$$

Ο λόγος $\frac{I_1}{I_0}$ ονομάζεται **διαπερατότητα T**.

$$T = \frac{I_1}{I_0} \quad (6)$$

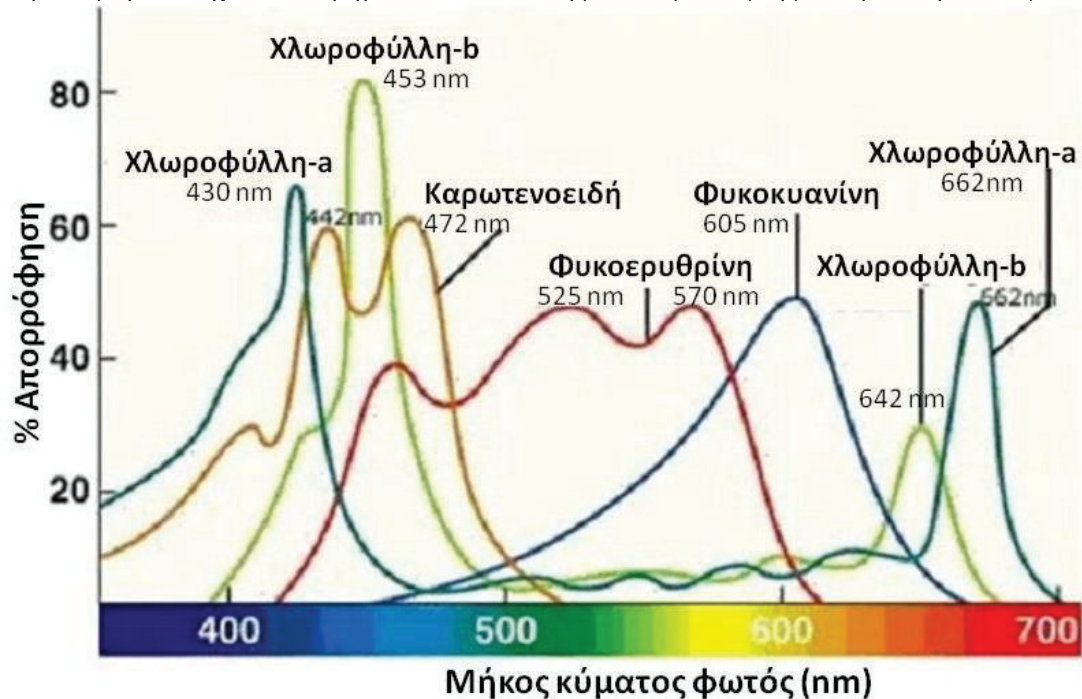
Από τις σχέσεις (3) και (6) ισχύει:

$$A = -\log T \quad (7)$$

Ο νόμος των Beer-Lambert μπορεί να εφαρμοστεί όταν: 1) η προσπίπτουσα ακτινοβολία είναι μονοχρωματική, 2) Οι χημικές ουσίες που απορροφούν δρουν ανεξάρτητα στη διαδικασία απορρόφησης, 3) η απορρόφηση συμβαίνει σε έναν όγκο ομοιόμορφης διατομής, 4) η ενεργειακή υποβάθμιση είναι γρήγορη χωρίς να παρουσιάζεται φθορισμός. Ο νόμος των

Beer-Lambert μπορεί να δίδει αξιόπιστα αποτελέσματα μόνο όταν εφαρμόζεται σε αραιά διαλύματα.

Το φάσμα απορρόφησης μιας διαλυμένης ουσίας (π.χ. φωτοσυνθετικές χρωστικές στο Εικόνα 8) δημιουργείται όταν απεικονισθεί γραφικώς η απορρόφηση σε όλα τα μήκη κύματος (ή τουλάχιστον σε βήματα του 1nm) της ακτινοβολίας της υπό μελέτη ουσίας.



Εικόνα 8. Φάσματα απορρόφησης εκχυλισμένων φωτοσυνθετικών χρωστικών με τα χαρακτηριστικά μέγιστα που παρουσιάζουν στα διάφορα μήκη κύματος.

Το μήκος κύματος στο οποίο παρατηρείται το μεγαλύτερο ποσοστό απορρόφησης, ονομάζεται μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης και συμβολίζεται με λ_{\max} . Η τιμή του λ_{\max} είναι χαρακτηριστική της ουσίας, άρα μας δίνει ποιοτική πληροφορία. Το επικαμπύλιο ολοκλήρωμα κάθε κορυφής που αντιπροσωπεύει μία ουσία σχετίζεται με την ποσότητα αυτής, βοηθώντας μας στον ποσοτικό προσδιορισμό.

Φασματοφωτόμετρο

Τα φασματοφωτόμετρα διακρίνονται σε φασματοφωτόμετρα υπεριώδους ή ορατού ή υπεριώδους-ορατού ή υπερώδου, σε φασματοφωτόμετρα απλής ή διπλής δέσμης και σε φασματοφωτόμετρα αμέσου αναγνώσεως ή μηδενισμού.

Οι βασικές δομικές μονάδες ενός τυπικού φασματοφωτομέτρου είναι :

- σταθερή πηγή ακτινοβολίας (πηγή φωτός)
- επιλογέας μήκους κύματος
- κυψελίδα
- ανιχνευτής ακτινοβολίας
- σύστημα μέτρησης που περιλαμβάνει ενισχυτή και όργανο ανάγνωσης

Σαν πηγές φωτός για το ορατό φάσμα χρησιμοποιούνται λυχνίες βολφραμίου και για το υπεριώδες λυχνίες υδρογόνου.

Στην ποσοτική ανάλυση χρησιμοποιείται κατά κανόνα στενή περιοχή μηκών κύματος για να

ισχύει ο νόμος των Lambert – Beer. Η απομόνωση της επιθυμητής στενής περιοχής επιτυγχάνεται με φίλτρα ή μονοχρωμάτορες (πρίσμα ή φράγμα περίθλασης)

Το υλικό κατασκευής των κυψελίδων εξαρτάται από την περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που μετράμε. Για την ορατή περιοχή χρησιμοποιούνται κυψελίδες από γυαλί, ενώ στο υπεριώδες από χαλαζία γιατί το κοινό γυαλί απορροφά έντονα την υπεριώδη ακτινοβολία. Για την υπέρυθρο περιοχή χρησιμοποιούνται κυψελίδες από αλογονίδια αλκαλίων. Σαν ανιχνευτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν φωτοκύτταρα, φωτολυχνίες, φωτοπολλαπλασιαστές, θερμοζεύγη, βολτόμετρα, κ.ά. Ανεξάρτητα από τον τύπο του φασματοφωτομέτρου η μέτρηση της απορρόφησης είναι πάντοτε σχετική, δηλαδή συγκρίνεται η απορρόφηση του δείγματος με την απορρόφηση προτύπου ή τυφλού διαλύματος.

Το τυφλό διάλυμα περιέχει όλα τα αντιδραστήρια και τον διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του δείγματος εκτός από την ουσία που πρόκειται να προσδιοριστεί. Με το τυφλό ρυθμίζεται το όργανο ώστε να δείχνει διαπερατότητα 100 % (απορρόφηση 0) και έτσι εξουδετερώνονται σφάλματα που προέρχονται από απορρόφηση του διαλύτη και των αντιδραστηρίων, απορρόφηση της κυψελίδας, ανάκλαση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας πάνω στη κυψελίδα, κ.ά.

Στα φασματοφωτόμετρα απλής δέσμης υπάρχει μία μόνο οπτική διαδρομή και αυτά βαθμονομούνται (0 % και 100 %) για κάθε μήκος κύματος. Χρησιμοποιούνται δύο κυψελίδες, μία με το τυφλό διάλυμα και μία με το δείγμα.

- Αρχικά γίνεται η ρύθμιση του 100% της διαπερατότητας (0 % απορρόφηση) με τον διακόπτη ρύθμισης του μηδενός
- Τοποθετείται η κυψελίδα με το τυφλό και ρυθμίζεται το 100% της διαπερατότητας
- Αντικαθίσταται η κυψελίδα με το τυφλό με την κυψελίδα με το δείγμα.
- Μετράται η απορρόφηση ή η διαπερατότητα του δείγματος.
- Κάθε φορά που αλλάζει το μήκος κύματος πρέπει να ρυθμίζεται το 100% της διαπερατότητας με το τυφλό.

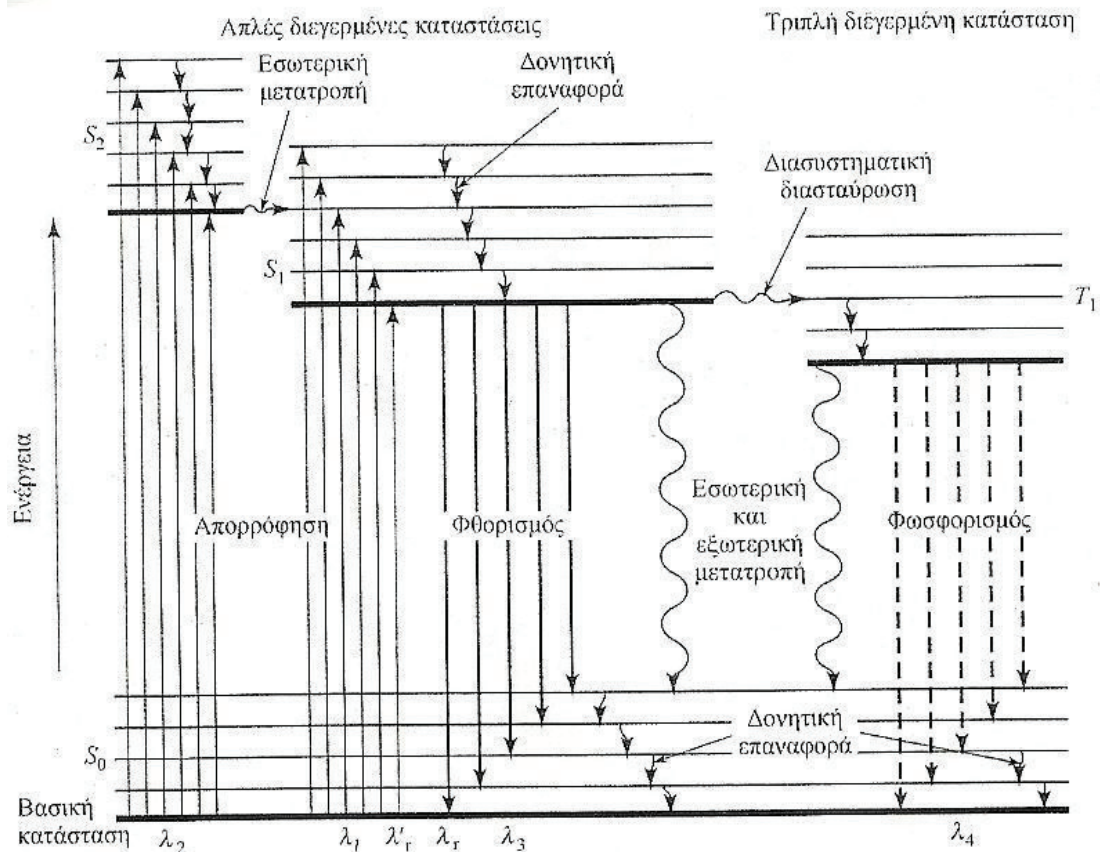
Στα φασματοφωτόμετρα διπλής δέσμης η ακτινοβολία μετά τη δίοδο από τον μονοχρωμάτορα διχάζεται σε δύο δέσμες που περνούν μία από το τυφλό και μία από το δείγμα. Έτσι η βαθμονόμηση του 100% της διαπερατότητας γίνεται αυτόματα από το όργανο.

Φθορισμός και φθορισομετρία

Με το ειδικό όργανο που ονομάζεται φθορισόμετρο μετράται και καταγράφεται ο μοριακός φθορισμός ουσιών που προκαλείται όταν διεγείρονται από απορρόφηση φωτονίων χωρίς μεταβολή του ηλεκτρονιακού τους spin. Ο φθορισμός αποτελεί μια κατηγορία φασματοφωτομετρίας και σε αντίθεση με τη φασματοφωτομετρία απορρόφησης μελετά την εκπομπή του φωτός από την εξεταζόμενη ουσία η οποία έχει προηγουμένως διεγερθεί με φως με μήκος κύματος μικρότερο από αυτό που κατόπιν εκπέμπεται. Η φωταύγεια που παράγεται κατά τον φθορισμό διαρκεί ελάχιστα (περί τα 10^{-5} sec).

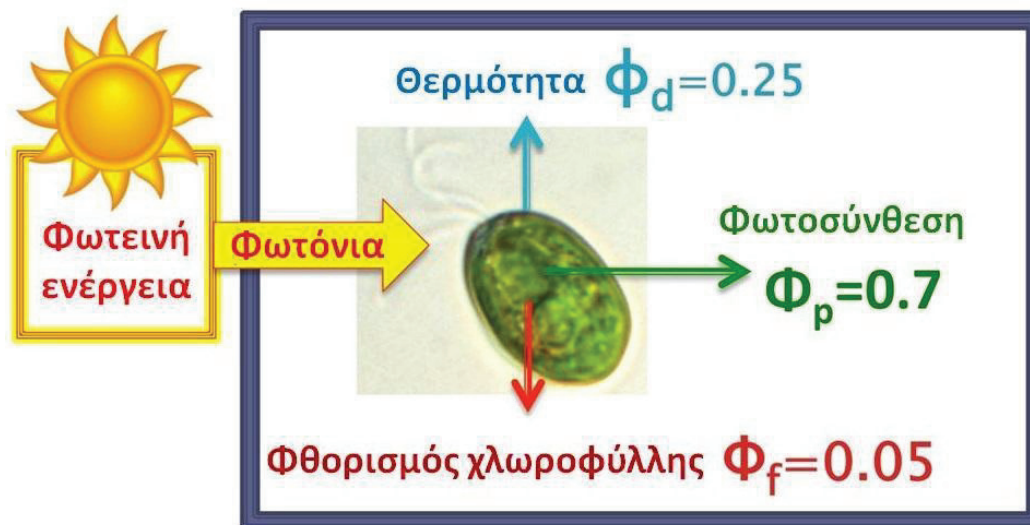
Η θεωρητική βάση εξήγησης του φθορισμού στηρίζεται στο φαινόμενο της φωταύγειας η οποία με τη σειρά της εξηγείται ως εξής (Εικόνα 9): Τα συγκεκριμένα μόρια μιας ουσίας διαλυμένης σε ένα μέσο (π.χ. χλωροφύλλη σε νερό) μπορούν να απορροφούν ακτινοβολία ορισμένου μήκους κύματος, και να διεγείρονται μεταβαίνοντας σε αυξημένο ενεργειακό

επίπεδο. Εκεί παραμένουν για απειροελάχιστο χρονικό διάστημα ($10^{-12} - 10^{-8}$ sec) και επιστρέφουν στη βασική ενεργειακή τους κατάσταση ακτινοβολώντας όμως ένα μέρος της ενέργειας που είχαν προσλάβει όταν διεγέρθηκαν, ενώ τα υπόλοιπα αποβάλλεται μέσω θερμικής αποδιέγερσης. Ως είναι λογικό η εκπεμπόμενη ακτινοβολία έχει λιγότερη ενέργεια από αυτή που αρχικά προσέλαβε το μόριο (και διεγέρθηκε) και μεγαλύτερο μήκος κύματος από τη διεγείρουσα (απορροφηθείσα) ακτινοβολία. Το όλο φαινόμενο ονομάζεται φθορισμός και η εκπεμπόμενη ακτινοβολία ακτινοβολία φθορισμού. Εκτός όμως από την άμεση επαναφορά του διεγερθέντος μορίου στη βασική του κατάσταση μπορεί αυτό να μεταπέσει σε χαμηλότερο μεν ενεργειακό επίπεδο (μετασταθές επίπεδο) από το διεγερμένο αλλά κατά τι μεγαλύτερο από το βασικό. Στο μετασταθές επίπεδο παραμένει για ελάχιστο χρόνο ($< 0,001$ sec) και επιστρέφει στη βασική του κατάσταση εκπέμποντας ακτινοβολία ακόμα μεγαλύτερου μήκους κύματος (και φυσικά μικρότερης ενέργειας). Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται φωσφορισμός. Από τα παραπάνω συνάγεται ότι η φωταύγεια ως ορισμός αντιστοιχεί γενικώς στο φαινόμενο της ακτινοβολίας ενός διεγερμένου μορίου και αποτελείται από τον φθορισμό (άμεση αποδιέγερση του μορίου) και ενίοτε και από τον φωσφορισμό (αποδιέγερση του μορίου κατά 2 συνεχόμενα στάδια) με τον φωσφορισμό να διαρκεί περισσότερο από τον φθορισμό. Δεν παρουσιάζουν όλες οι ουσίες ιδιότητα φωσφορισμού όμως όποιες την κατέχουν παρουσιάζουν φωτεινότητα για αρκετή ώρα μετά τη διέγερσή τους.



Εικόνα 9. Διάγραμμα ενεργειακών μεταπτώσεων σε ένα φωταυγάζον σύστημα (από Ζαφειρόπουλο, Λαλιδάκη, Χατζάκη, 2007).

Στη μελέτη του φυτοπλαγκτού η φθορισμομετρία μπορεί να είναι χρήσιμη επειδή η ένταση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας φθορισμού αναμένεται να είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του φυτοπλαγκτού. Όλα τα φυτοπλαγκτονικά είδη περιέχουν χλωροφύλλη η οποία διεγερόμενη με την κατάλληλου μήκους κύματος ακτινοβολία φθορίζει με τις φασματικές κορυφές της να εμφανίζονται στα 670-690 nm (Yoder et al., 2001). Αν λοιπόν υποθέσουμε ότι ένα δείγμα υγρής καλλιέργειας φυτοπλαγκτού με μια συγκεκριμένη πυκνότητα κυττάρων / ml αντιστοιχεί σε ένα διάλυμα κάποιας φθορίζουσας ουσίας σε νερό, κατά την έννοια του ότι η περιεχόμενη χλωροφύλλη στα κύτταρα είναι αυτή η ουσία, και λαμβανομένου υπόψη της αναλογίας της έντασης φθορισμού με τη συγκέντρωση της ουσίας, αξίζει να μελετηθεί αν μια τέτοια αναλογική σχέση υφίσταται σε δείγματα φυτοπλαγκτονικών καλλιεργειών που φθορίζουν.



Εικόνα 10. Η πορεία της φωτεινής ενέργειας που προσπίπτει στη χλωροφύλλη, (από Bobco, 2014, τροποποιημένο).

Η χρωστική χλωροφύλλη είναι παρούσα σε όλους τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς (ευκαρυωτικούς και κυανοβακτήρια) και είναι υπεύθυνη για την επιτέλεση της φωτεινής αντίδρασης της φωτοσύνθεσης αλλά και για τη συλλογή του φωτός μαζί με τις επικουρικές χρωστικές (καρωτενοειδή και φυκοβιλιπρωτεΐνες) και τη μεταφορά του στο ενεργό κέντρο των φωτοσυστημάτων (ειδικά μόρια χλωροφύλλης) όπου θα επιτελεστεί η διάσπαση του νερού και η διέγερση των ηλεκτρονίων. Η ενέργεια των φωτονίων που απορροφάται από τα μόρια της χλωροφύλλης μπορεί να ακολουθήσει 3 πορείες (Εικόνα 10) με ποικίλο βαθμό έντασης ανάλογα με τις συνθήκες (φυσικές και βιολογικές): 1) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να επιτελεσθεί η φωτεινή φάση της φωτοσύνθεσης, 2) να διαχυθεί ως θερμότητα, 3) να επανεκπεμφθεί ως φθορισμός μεγαλύτερου μήκους κύματος από αυτό που είχαν τα αρχικά φωτόνια (Maxwell & Johnson, 2000). Το ποσοστό της ενέργειας που θα κατανομηθεί στις 3 παραπάνω πορείες ποικίλλει ανάλογα με το λόγο των φωτονίων που ακολουθούν την κάθε πορεία προς το σύνολο των φωτονίων που απορρόφησε η χλωροφύλλη. Οι πορείες αυτές (φωτοσύνθεση, θερμότητα, φθορισμός) είναι ανταγωνιστικές επειδή κάθε αύξηση κάποιας καταλήγει σε αναλογική μείωση των υπολοίπων. Σε κάθε περίπτωση το ενεργειακό ισοζύγιο είναι εξισορροπημένο, η εισερχόμενη ενέργεια ισούται με την εξερχόμενη ενέργεια.

Αν για παράδειγμα η φωτοσύνθεση λειτουργεί ανεμπόδιστα χρησιμοποιεί περί το 70% των εισερχομένων φωτονίων και ο φθορισμός περί το 5% (Σχήμα 11). Αν όμως για διάφορους λόγους (π.χ. υπολειτουργία των φωτοσυστημάτων) επηρεασθεί, τότε ο φθορισμός θα αυξηθεί.

Η κατάσταση γίνεται πιο σύνθετη αν στην εξέταση του φθορισμού εξεταστεί και ο φθορισμός που παράγεται εξαιτίας και των άλλων εκτός της χλωροφύλλης χρωστικών (καρωτενοειδή, φυκοβιλίνες) που υπάρχουν σε διάφορες αναλογίες ανάλογα με το είδος των μικροφυκών στα κύτταρά τους. Αυτό βέβαια ισχύει για την περίπτωση των κυανοβακτηρίων που περιέχουν και φυκοβιλίνες με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους του φθορισμού όταν διεγερθούν με φως μήκους κύματος διαφορετικού από αυτό που χρησιμοποιείται για να διεγερθεί η χλωροφύλλη. Δηλαδή με άλλα λόγια αν χρησιμοποιήσουμε το φθορισμό που παράγεται από τη χλωροφύλλη διεγειρόμενη με ένα κατάλληλο μήκος κύματος μπορούμε μεν θεωρητικώς να υποθέσουμε ότι η ένταση του φθορισμού θα είναι ανάλογη με τη μάζα των κυττάρων που περιέχουν χλωροφύλλη (ευκαρυωτικά φύκη και κυανοβακτήρια) αλλά δεν μπορούμε να διακρίνουμε την αναλογία ευκαρυωτών και κυανοβακτηρίων σε ένα εξεταζόμενο δείγμα φυτοπλαγκτού. Αυτό θα μπορούσε να γίνει μόνο αν κατόπιν διεγείραμε (φωτίζαμε) το δείγμα και με άλλα μήκη κύματος στα οποία απορροφούν οι βιλιπρωτεΐνες (φυκοκυανίνη, φυκοερυθρίνη) και μελετούσαμε τον παραγόμενο φθορισμό ως προερχόμενο αποκλειστικώς από τις φυκοβιλίνες (Grigoryeva, 2020) σε σύγκριση με αυτόν που παρήγαγε η χλωροφύλλη.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα μικροφύκη που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα προέρχονται από είδη που απομονώθηκαν από την λιμνοθάλασσα της περιοχής, έχοντας υποστεί διαδικασίες απομόνωσης μονοειδικής καλλιέργειας από το νερό, καταλήγουν σε δοχεία με θαλασσινό νερό που περιείχουν μόνο το επιθυμητό είδος (Εικόνα 11B). Από αυτά τα δοχεία με διαδοχικές επεκτάσεις προκύπτουν οι μεγαλύτεροι όγκοι των 0,5, 1 και 2 L σύμφωνα με τους οποίους διεξήχθησαν τα πειράματα.

Κάθε φύκος καλλιεργήθηκε σε γυάλινες κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer σε νερό αλατότητας 40 ppt (το οποίο είχε πρώτα αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο στους 121 °C), πίεσης 2bar για 20 min. Κατόπιν το νερό αφήνονταν να κρυώσει για 24 ώρες ώστε να καταστεί έτοιμο για χρήση. Με την αποστείρωση εξασφαλίζεται τόσο η πλήρης απουσία ασπονδύλων, πρωτοζώων, φυκών και μυκήτων αλλά και των βακτηριδίων με τους σπόρους αυτών. Από το δοχείο Nalgene 10 L που περιείχε το αποστειρωμένο και λιπασμένο με θρεπτικά μεταλλικά στοιχεία λαμβάνονταν η απαιτούμενη ποσότητα στην οποία εμβολιάζονταν με δόση 10% κατ' όγκο, η καθαρή ποσότητα του εκάστοτε μικροφύκου και αφήνονταν να αυξηθεί.

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

ΜΕΤΑΛΛΙΚΑ ΑΛΑΤΑ

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

Τοποθετούνται για 30 λεπτά σε αυτόκαυστο (Εικόνα 11Α) στους 120 °C.

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

ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ

Πρόδρομα διαλύματα:

Διάλυμα Α

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

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

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

Διάλυμα Δ $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 50 g Διάλυση σε 1 L αποσταγμένου νερού.

Τοποθετούνται για 30 λεπτά σε αυτόκαυστο στους 120 °C.

Διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Τελικό διάλυμα

Διάλυμα Δ : 100 ml από το πρόδρομο διάλυμα

Διάλυμα Α : 10 ml " " " "

Διάλυμα Β : 10 ml " " " " Διάλυμα

Γ : 10 ml " " " " Προσθήκη 800 ml

αποσταγμένου νερού.

Τοποθετούνται σε αυτόκαυστο για 30 λεπτά στους 120 °C.

Διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

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

ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ

Πρόδρομα διαλύματα:

B_{12} : 100 mg σε 1 L αποσταγμένου νερού

Βιοτίνη : 100 mg σε 1 L αποσταγμένου νερού

Θειαμίνη : 10 mg σε 1 L αποσταγμένου νερού

Τα διαλύματα των βιταμινών δεν τοποθετούνται σε αυτόκαυστο διότι καταστρέφονται.

Επίσης επειδή είναι φωτοευαίσθητα τοποθετούνται σε σκουρόχρωμες φιάλες. Διατηρούνται σε ψυγείο.

Τελικό διάλυμα

B_{12} : 10 ml από το βασικό διάλυμα Βιοτίνη

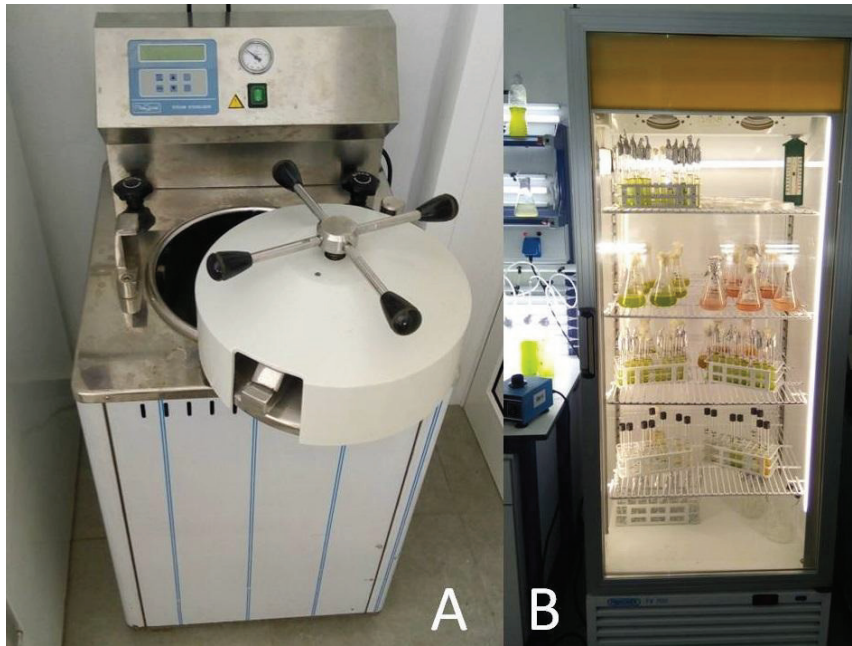
: 10 ml από το βασικό διάλυμα Θειαμίνη: 10

ml από το βασικό διάλυμα Διαλύονται σε 1

L αποσταγμένου νερού

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

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



Εικόνα 11. Κλίβανος αποστείρωσης (A) υπό πίεση (αυτόκαυστο) που χρησιμοποιήθηκε για την αποστείρωση του νερού των καλλιέργειών και των θρεπτικών διαλυμάτων. Θερμοθάλαμος (B) με τις καθαρές αποθεματικές καλλιέργειες των ειδών φυτοπλαγκτού.



Εικόνα 12. Δοχεία καλλιέργειας τύπου Erlenmeyer χωρητικότητας 1 L με τις καλλιέργειες μικροφυκών (στα συγκεκριμένα *Amphidinium carterae*).

Το κάθε δοχείο καλλιέργειας τοποθετήθηκε σε ειδική τράπεζα εργασίας (Εικόνα 12) και φωτίζονταν από επιτοιχίως τοποθετημένες συστοιχίες λαμπτήρων τύπου LED λευκού φωτός και σε θέση τέτοια που στην επιφάνεια του δοχείου να καταγράφεται (Lux meter BIOBLOCK LX-101) φωτισμός έντασης ~6000 lux ο οποίος είναι επαρκής για τη φωτοσύνθεση. Η διάρκεια του φωτισμού ελέγχονταν από χρονοδιακόπτη ρεύματος που είχε ρυθμιστεί να λειτουργεί για να δημιουργεί 16 ώρες φωτός και 8 ώρες σκοτάδι (16L:8D). Οι καλλιέργειες αναδύονταν με παροχή ατμοσφαιρικού αέρα από μία γυάλινη πιπέτα των 2 ml που συνδέονταν μέσω πλαστικού σωληνίσκου εσωτερικής διαμέτρου 4 mm με τη σωλήνωση διαμοιρασμού αέρα, ο οποίος είχε περάσει πρώτα από ειδικό φίλτρο πόρων 0,45 μm προερχόμενος από αεραντλία-blower παροχής 40 m³/min.

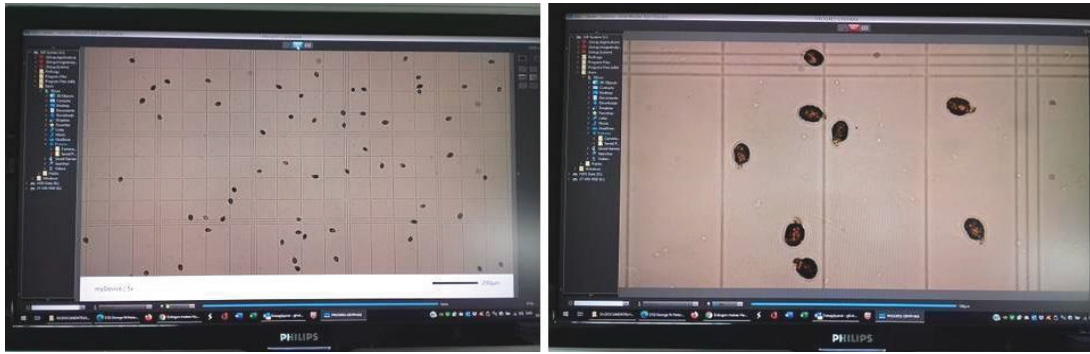
Ο αέρας που παρεχόταν στα δοχεία εξυπηρετούσε δύο λειτουργίες. Αφενός παρείχε το αναγκαίο διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) που χρειάζεται η φωτοσύνθεση και αφετέρου διατηρούσε την καλλιέργεια σε συνεχή ανάδευση. Έτσι τα κύτταρα βρίσκονταν περιοδικά και ομοιόμορφα κοντά στα τοιχώματα του δοχείου ώστε να λαμβάνουν επαρκή ποσότητα φωτονίων (καθώς όταν η καλλιέργεια γίνεται πυκνή το φως δεν μπορεί χωρίς την βοήθεια της ανάδευσης να διεισδύσει μέχρι το κέντρο του δοχείου). Δηλαδή ο αερισμός καταπολεμά το φαινόμενο της αυτοσκίασης που υφίσταται η μάζα των φυκών που βρίσκεται στο κέντρο του δοχείου μιας πυκνής καλλιέργειας.

Καθημερινώς, η πυκνότητα των κυττάρων ελέγχονταν μέσω της καταμέτρησης με αιμοκυττόμετρο. Η διαδικασία αυτή συνίσταται στα εξής. Μικρή ποσότητα από την καλά αναδεδυμένη καλλιέργεια αφαιρούνταν με αποστειρωμένη πιπέτα και με κατάλληλο τρόπο τοποθετούνταν μια σταγόνα της στην αντικειμενοφόρο πλάκα του αιμοκυττόμετρου τύπου Neubauer και σε αιμοκυττόμετρο τύπου Fuchs-Rosenthal (Εικόνα 13). Τα κύτταρα καταμετρούνταν σε μικροσκόπιο (Leica DM 1000) βάσει του πρωτοκόλλου καταμέτρησης για κάθε τύπο αιμοκυττόμετρου. Στην συνέχεια, ο αριθμός των κυττάρων της καταμέτρησης βάσει μαθηματικού τύπου ανάγονταν σε κύτταρα/mL καλλιέργειας. Εφόσον οι χειρισμοί της τοποθέτησης του δείγματος γίνουν σωστά δεν υπάρχει κίνδυνος λανθασμένης καταμέτρησης καθώς η ποσότητα του δείγματος που θα απλωθεί στην αντικειμενοφόρο πλάκα και θα καλυφθεί από την καλυπτρίδα είναι δεδομένη και ο χώρος που θα περιορισθεί το δείγμα είναι οριοθετημένος.

Συνεπώς, αρκεί να απλωθεί η σταγόνα του νερού του δείγματος επάνω στην αντικειμενοφόρο για να μετρηθεί το ποσό των κυττάρων σε αυτό το χώρο και κατόπιν να γίνει η μετατροπή σε κύτταρα/ml. Όμως για να είναι αντιπροσωπευτική η μέτρηση της πραγματικής πυκνότητας των κυττάρων στο δοχείο καλλιέργειας πρέπει να δοθεί προσοχή στη λήψη του δείγματος, τόσο στην ποσότητα (~10 ml) που θα ληφθεί από το δοχείο καλλιέργειας όσο και σε αυτή που θα ληφθεί από το δείγμα αυτό για να τοποθετηθεί στην αντικειμενοφόρο πλάκα του αιμοκυττόμετρου. Η προσοχή συνίσταται στην ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων στο δοχείο και στην αντικειμενοφόρο και αυτό επιτυγχάνεται με ανάδευση του μέσου καλλιέργειας κατά τη λήψη του δείγματος αλλά και ανάδευση του δείγματος πριν τη λήψη της μικροποσότητας προς καταμέτρηση. Όλα τα κύτταρα των φυτοπλαγκτονικών ειδών αν αφεθούν σε ηρεμία (έλλειψη αερισμού) -ακόμα και αυτά των μαστιγοφόρων κινητικών ειδών- θα υποστούν ένα βαθμό καθίζησης και μια ποσότητα από αυτά θα συγκεντρωθεί στον πυθμένα του δοχείου. Συμπεραίνουμε λοιπόν πως αν ληφθεί δείγμα από δοχείο σε ηρεμία η πυκνότητα των κυττάρων δεν θα αντιπροσωπεύει την πραγματική. Ο αερισμός αποτρέπει κάτι τέτοιο αλλά για να διασφαλίσουμε την ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων όταν παίρνουμε δείγμα, συγχρόνως θα αναδεύουμε και χειροκίνητα το δοχείο.



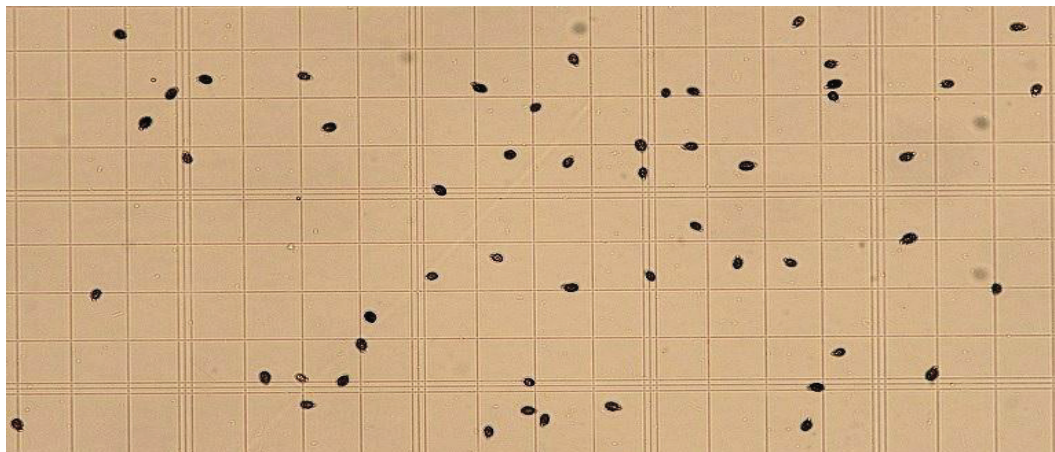
Εικόνα 13. Δύο τύποι αιματοκυττομέτρων, αριστερά Neubauer, δεξιά Fuchs-Rosenthal που χρησιμοποιήθηκαν για τη μικροσκοπική καταμέτρηση των μικροφυκικών κυττάρων



Εικόνα 14. Απεικόνιση σε οθόνη υπολογιστή μέσω βιντεοκάμερας μικροσκοπίου των κυττάρων φυτοπλαγκτού προς καταμέτρηση στην επιφάνεια του "πλέγματος" του αιμοκυττόμετρου, σε διαφορετικές μεγεθύνσεις.

Για τα είδη φυτοπλαγκτού που είναι κινητικά δεν συνιστάται η καταμέτρησή τους σε ζωντανή κατάσταση, καθώς η συνεχής αλλαγή θέσης αποτρέπει την μέτρησή τους επάνω στο κατοπτρευόμενο μικροσκοπικώς γεωμετρικό γραμμωτό ειδικό πλέγμα που είναι χαραγμένο στο αιμοκυττόμετρο (Εικόνες 14 & 15). Έτσι τα κύτταρα ακινητοποιούνται πρώτα με ενστάλαξη μικροποσότητας διαλύματος Lugol (0,05 ml στα ~10 ml δείγματος) και κατόπιν λαμβάνεται η μικροποσότητα που θα τοποθετηθεί στο αιμοκυττόμετρο. Η μέθοδος αυτή όχι μόνο ακινητοποιεί τα κύτταρα αλλά τα βάφει και καφέ-κόκκινα κάτι που διευκολύνει τον εντοπισμό τους, ξεχωρίζοντας τα από τυχόν άλλα ανόργανα μικροσωματίδια και διευκολύνοντας την καταμέτρησή τους.

Κάτι άλλο που διευκολύνει την καταμέτρηση είναι σωστή αραιώση του δείγματος. Αραίωση απαιτείται όταν το δείγμα είναι πολύ πυκνό και βρίθεται κυττάρων. Σε μια τέτοια περίπτωση η τοποθέτηση δείγματος στο αιμοκυττόμετρο θα παρουσιάσει στο οπτικό πεδίο του ερευνητή



Εικόνα 15. Χαρακτηριστικό πεδίο αιμοκυτταρομέτρου τύπου Fuchs-Rosenthal με το χαραγμένο πλαίσιο και τα κύτταρα του φυτοπλαγκτού προς καταμέτρηση.

μια πυκνή μάζα κυττάρων που είναι αδύνατον να καταμετρηθούν επειδή αφενός πολλά κύτταρα επικαλύπτονται και αφετέρου ο χρόνος καταμέτρησης είναι πολύ μεγάλος. Αν λάβουμε υπόψη ότι για την πιστότητα της καταμέτρησης απαιτούνται αρκετές επαναλήψεις,

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

Όλα τα παραπάνω αφορούν τη διαδικασία καταμέτρησης των κυττάρων των μονοκύτταρων φυτοπλαγκτονικών ειδών που εξετάσαμε (*Nephroselmis*, *Amphidinium*, *Tetraselmis* [red], *Dunaliella*) αλλά όχι των νηματοειδών πολυκύτταρων κυανοβακτηριακών ειδών που στην περίπτωση μας ήταν το *Phormidium* sp. και το *Anabaena* sp.. Για τα κυανοβακτήρια αυτά η υπολογιζόμενη πυκνότητα καταγράφηκε όχι ως κύτταρα/mL αλλά ως γραμμάρια ξηρού βάρους μάζας κυττάρων ανά mL ή ανά L (g d.w.mL^{-1} ή g d.w.L^{-1}). Αυτό έγινε επειδή είναι αδύνατον να κατανεμηθούν τα μακριά νηματιά τους επάνω στο αιμοκυττόμετρο για να μπορούν να καταμετρηθούν.

Το ξηρό βάρος υπολογίστηκε ως εξής: ορισμένη ποσότητα καλλιέργειας η οποία ποίκιλε ανάλογα με την αύξηση της φυκικής μάζας (μικρή πυκνότητα στην αρχή, ολοένα και μεγαλύτερη συν τω χρόνω) από 50 έως 300 mL (μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος στην αραιή καλλιέργεια, μικρότερη στην πυκνότερη) διηθούνταν σε αντλία κενού (Heto SUE 3Q) διά μέσου χάρτινου ηθμού Whatman πόρων 11 μm για το *Phormidium* ή φίλτρου GF/C πόρων 0,45 μm για το *Anabaena* και η μάζα των κυανοβακτηριακών νηματίων συγκρατούνταν στην επιφάνεια του (Εικόνα 16). Ο κάθε ηθμός αφού αφυδατώνονταν πρώτα με ξήρανση 3 ωρών στους 105 °C σε κλίβανο (Termaks - Εικόνα 17) είχε προζυγιστεί σε ηλεκτρονική ζυγαριά ακριβείας (KERN-ALJ 220- 4NM) της τάξεως του 0,0001 g (Εικόνα 18). Η υγρή μάζα των φυκών που παρέμενε στον ηθμό μετά τη φίλτραση όλου του δείγματος ξεπλένονταν με 0,5 M φορμικό αμμώνιο ενώ η αντλία κενού λειτουργούσε, προκειμένου να αφαιρεθούν τα υπολείμματα άλατος από τη μάζα. Το φορμικό αμμώνιο έχει το πλεονέκτημα (συγκριτικά με το αποσταγμένο νερό) ότι δεν επιφέρει ωσμωτικό στρες στα κύτταρα (και έτσι δεν τα καταστρέφει με διάρρηξη των τοιχωμάτων τους) αλλά επιδρά μόνο στα άλατα διαλύοντάς τα. Κατόπιν ο υγρός ηθμός με λαβίδα αφαιρούνταν και τοποθετούνταν στον κλίβανο στους 100 °C για 24 ώρες προκειμένου να εξατμιστεί πλήρως όλο το νερό. Στη συνέχεια ο ηθμός με την ξηρή πλέον φυκομάζα (Εικόνα 19) ζυγίζονταν και η διαφορά με το αρχικό βάρος του ηθμού απέδιδε το ξηρό βάρος των φυκών που περιέχονταν στο δείγμα καλλιέργειας που διηθήθηκε.



Εικόνα 16. Αντλία κενού και φίλτρο προκειμένου να συλλεχθεί η υγρή μάζα των νηματοειδών κυανοβακτηριακών μικροφυκών.

Παράδειγμα:

V_1 : δείγμα καλλιέργειας προς διήθηση= 100 mL

W_1 : βάρος σε g αχρησιμοποίητου ηθμού

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

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

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

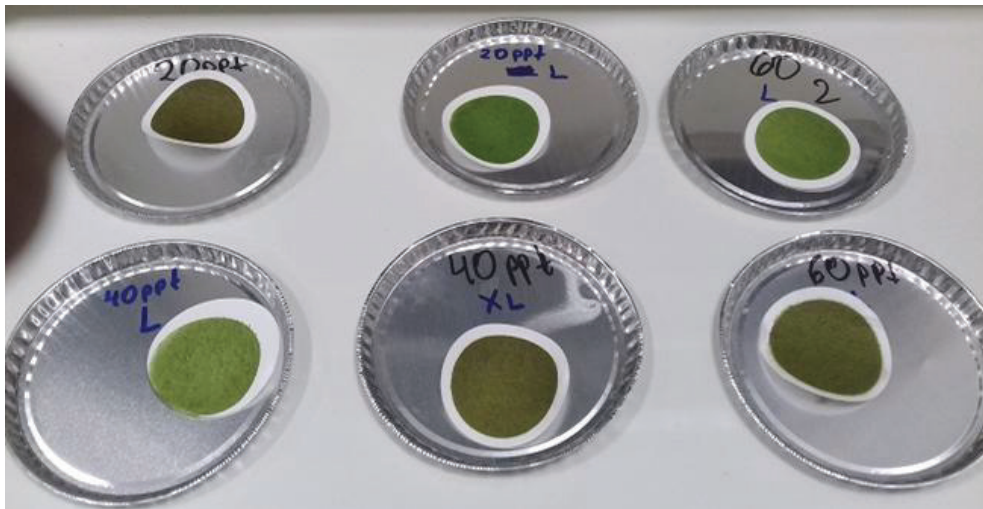
Διαιρώντας την εκάστοτε ευρεθείσα τιμή του $W_{d.w.}$ με τα ml του δείγματος που διηθήσαμε υπολογίζουμε την πυκνότητα του φύκους σε g d.w. mL⁻¹ και με απλή αναγωγή και σε g d.w. L⁻¹.



Εικόνα 17. Κλίβανος για ξήρανση (αφυδάτωση) των ηθμών με τη μικροφυκική μάζα.



Εικόνα 18. Ηλεκτρονικό ζυγός ακριβείας 0,0001 g που χρησιμοποιήθηκε για τη ζύγιση των ηθμών.

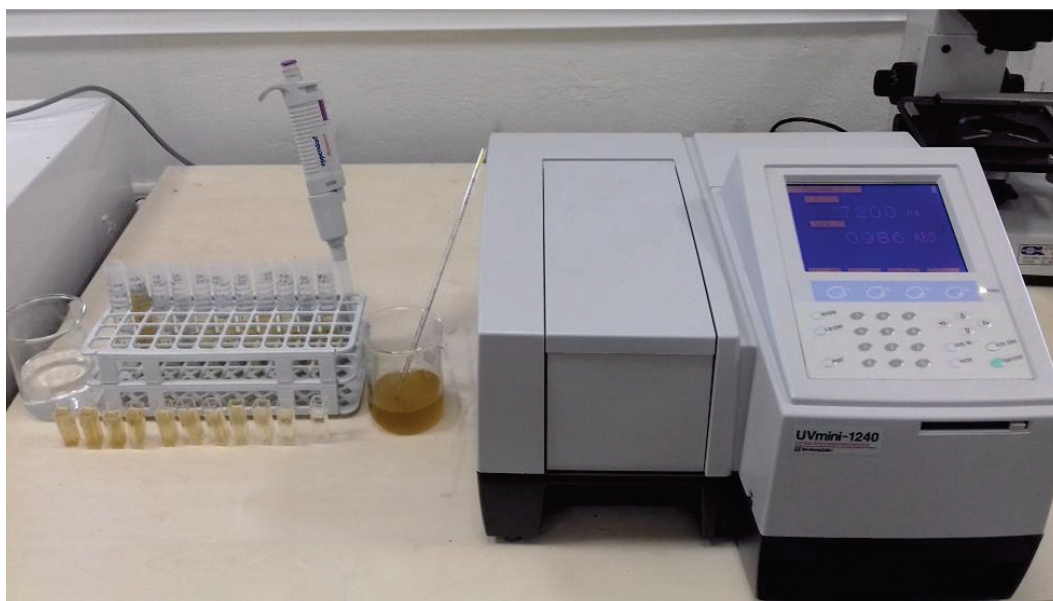


Εικόνα 19. Αποξηραμένα φίλτρα GF/C πόρων 0,45 μm , με την ξηρή μάζα μικροφυκών έτοιμα για ζύγιση.

Προκειμένου η διήθηση να γίνει απρόσκοπτα συνιστάται η χρησιμοποίηση μικρής ποσότητας δείγματος, καθώς μια πυκνή καλλιέργεια θα έφραζε πολύ γρήγορα τους πόρους του ηθμού με αποτέλεσμα στο χωνί διήθησης να λιμνάζει το επιπλέον νερό.

Όλα τα καταμετρηθέντα δείγματα των καλλιεργούμενων φυκών προέρχονταν από αυξητικά στάδια που αντιστοιχούσαν στις διαδοχικές ημέρες που διαρκούσε η καλλιέργεια. Ένα εγγενές χαρακτηριστικό των φυτοπλαγκτονικών καλλιεργειών είναι το πρότυπο ανάπτυξης του πληθυσμού τους στην πορεία του χρόνου. Εφόσον οι συνθήκες (θερμοκρασία, φωτισμός, αερισμός, συγκέντρωση θρεπτικών) παραμένουν σε αποδεκτά και ει δυνατόν ιδανικά όρια για την ανάπτυξή τους, το πρότυπο της αύξησης της βιομάζας των διακρίνεται σε 4 φάσεις. Στην αρχή είναι η φάση καθυστέρησης, όπου τα κύτταρα δεν διαιρούνται (ή διαιρούνται λίγα απ' αυτά) και η καλλιέργεια παρουσιάζει καθόλου ή ελάχιστη αύξηση. Το στάδιο αυτό διαρκεί ποικίλο χρόνο ανάλογα με το είδος και τις συνθήκες. Κατόπιν τα κύτταρα έχοντας πλήρως προσαρμοστεί στις συνθήκες επιταχύνουν το μεταβολισμό τους και διαιρούνται συνεχώς με αποτέλεσμα ο πληθυσμός τους να αυξάνεται με εκθετικά. Είναι η λεγόμενη εκθετική φάση αύξησης και σε αυτή ο πληθυσμός θεωρείται ότι έχει τα βέλτιστα χαρακτηριστικά. Διαρκεί αρκετές ημέρες και αυτή είναι η φάση που θεωρητικά αντιστοιχεί σε δυνατότητα να μελετηθούν σωστά οι διάφορες βιοχημικές παράμετροι των κυττάρων. Η τρίτη φάση που ακολουθεί την εκθετική είναι η φάση στασιμότητας (στατική φάση) όπου τα κύτταρα έχουν εξαντλήσει τη δυναμική του έντονου μεταβολισμού τους, σταματούν να διαιρούνται και απλώς διατηρούνται στη μέγιστη πληθυσμιακή πυκνότητα που επετεύχθη προηγουμένως. Η στατική φάση οφείλεται στην εξάντληση των θρεπτικών ουσιών του μέσου καθώς και σε ουσίες ή βιοχημικά "σήματα" υπερπληθυσμού, παράγοντες που σταματούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η φάση αυτή ανάλογα με το είδος μπορεί να διαρκεί λίγες ημέρες ή και εβδομάδες. Συν τω χρόνω τοξικά παραπροϊόντα συσσωρεύονται στο νερό και τα κύτταρα πεθαίνουν μαζικά σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Πρόκειται για τη φάση κατάρρευσης της καλλιέργειας από την οποία δεν υπάρχει επιστροφή (αδύνατη η ανανέωσή της).

Οι μετρήσεις της παρούσας εργασίας έγιναν στις 3 πρώτες από τις παραπάνω φάσεις (καθυστέρησης, εκθετική, στατική) με μόνο περιορισμό ότι στην στατική φάση ελήφθησαν μετρήσεις μόνο για τα πολύ αρχικά στάδιά της.



Εικόνα 20. Φασματοφωτόμετρο UV-ορατού μονής δέσμης που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις της απορρόφησης των εξεταζόμενων δειγμάτων. Αριστερά φαίνεται μια σειρά με κυψελίδες από δείγματα προς εξέταση, το δοχείο με το δείγμα φυτοπλαγκτού και η αυτόματη πιπέτα που χρησιμοποιήθηκε για να γίνουν οι επιθυμητές αραιώσεις.

Τα δείγματα που λαμβάνονταν για να καταμετρηθεί η πυκνότητα των κυττάρων συνάμα χρησιμοποιούνταν και για να μετρηθεί η απορρόφηση τους (ή οπτική πυκνότητα-optical density-O.D.) στο φασματοφωτόμετρο για επιλεγμένα μήκη κύματος. Στο φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης Shimadzu UVmini-1240 (Εικόνα 20) χρησιμοποιήθηκαν τα μήκη κύματος 430, 680 και 750 nm για όλα τα φύκη (ευκαρυωτικά και κυανοβακτήρια) και επιπλέον 570 nm για το κυανοβακτήριο *Phormidium*.

Πριν από κάθε μέτρηση στο εκάστοτε μήκος κύματος η ένδειξη μηδενίζονταν βάζοντας στον υποδοχέα το λεγόμενο "τυφλό" δείγμα που ήταν καθαρό νερό καλλιέργειας (χωρίς κύτταρα). Το νερό που προήλθε από προηγούμενη φυγοκέντρηση δείγματος καλλιέργειας, έτσι ώστε τα κύτταρα να συγκεντρωθούν ως ίζημα στο σωλήνα και το υπερκείμενο υγρό να ληφθεί για την χρήση του ως τυφλό. Η μέθοδος αυτή επιλέχθηκε επειδή στις καλλιέργειες όσο περνάει ο χρόνος στο νερό απελευθερώνονται και ποικίλες εξωκυτταρικές ουσίες οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την ακριβή μέτρηση της απορρόφησης αν δεν ληφθούν μέτρα για να αντισταθμιστεί ο "θόρυβος" που δημιουργούν οι εξωκυτταρικές ουσίες.

Χαρακτηριστική περίπτωση αποτελεί το εξεταζόμενο είδος *Tetraselmis* sp. (var. red Kotyhi) το οποίο παράγει αγνώστου φύσεως εξωκυτταρικές ουσίες οι οποίες χρωματίζουν το νερό κόκκινο. Αν φυγοκεντρηθεί δείγμα αυτού του μικροφύκου τα μεν κύτταρα του *Tetraselmis* θα σχηματίζουν ίζημα στον πυθμένα του δοχείου φυγοκέντρησης, όμως το υπερκείμενο αντί για διαυγές θα είναι κόκκινο (Εικόνα 21). Συνεπώς ακριβώς αυτό το υπερκείμενο αποτέλεσε το τυφλό για αυτό το φύκος προκειμένου το κόκκινο μέσον καλλιέργειας να μην επηρεάσει την οπτική πυκνότητα του μετρούμενου δείγματος η οποία επιθυμούμε να επηρεάζεται μόνο από την πυκνότητα των αιωρούμενων κυττάρων.

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

Τα μήκη κύματος 430 και 680 nm αντιστοιχούν σε κορυφές (peaks) του φάσματος σε όλα τα φύκη που εξετάστηκαν και αν και με μικροαποκλίσεις ως προς την ακριβή τιμή της κορυφής ανά φύκος, θεωρούνται αντιπροσωπευτικά της διπλής κορυφής μέγιστης απορρόφησης των μορίων της χλωροφύλλης-α που υπάρχει σε όλα τα είδη. Το μήκος κύματος των 570 nm αποτελεί μια ενδιάμεση τιμή της κλίμακας των μηκών κύματος που δεν αντιστοιχεί σε κάποια κορυφή στο κυανοβακτήριο *Phormidium* που να αφορά είτε τις χλωροφύλλες, είτε τα καρωτενοειδή, είτε τις βιλιπρωτεΐνες (φυκοκυανίνη-φυκοερυθρίνη) που μόνο αυτό περιέχει. Τέλος και η τιμή των 750 nm που δεν αντιστοιχεί σε καμιά κορυφή του φάσματος σε κανένα φύκος επιλέχθηκε ως ένα "ουδέτερο" μήκος κύματος επειδή αρκετές φορές απαντάται στη βιβλιογραφία.



Εικόνα 21. Χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα του υπερκείμενου υγρού σε φυγοκεντρημένα δείγματα του μικροφύκου *Tetraselmis* sp. (red var Kotyhi).

Πέραν της οπτικής απορρόφησης που καταγράφηκε για τα δείγματα των καλλιεργειών που λαμβάνονταν καθημερινά και των οποίων η συγκέντρωση των κυττάρων μετριόταν με το αιμοκυττόμετρο, έγιναν και καταγραφές της οπτικής πυκνότητας για δείγματα που προέρχονταν από πυκνές καλλιέργειες (προς το τέλος της εκθετικής φάσης) τα οποία υπέστησαν κατάλληλες αραιώσεις. Για το σκοπό αυτό ένα δείγμα καλλιέργειας μετρούνταν στο αιμοκυττόμετρο και η συγκέντρωση των κυττάρων σε κύτ./mL υπολογίζονταν. Κατόπιν το δείγμα αυτό υφίστατο αραιώσεις με νερό ίδιας αλατότητας έτσι ώστε να δημιουργηθούν 9 αραιότερα δείγματα, δηλαδή 9 μέρη φυτοπλαγκτού (ονομαζόμενο εντεύθεν "Δείγμα", Δ) και 1 μέρος νερό (ονομαζόμενο εντεύθεν "Νερό", N) άρα 10 μέρη αραιωμένου δείγματος με 0,9 φορές τη συγκέντρωση του αρχικού. Τοποθετούνταν σε δοκιμαστικό σωλήνα και ονομάζονταν 9Δ:1N. Κατά τον ίδιο τρόπο 8 μέρη δείγματος και 2 μέρη νερού (8Δ:2N) έδινε αραιώση 0,8 φορές αυτή του αρχικού. Συνεχίζοντας, φτιάχνονταν 9 αραιωμένα δείγματα (μέχρι 1Δ:9N) δηλαδή μια πλήρης ικανή σειρά αραιώσεων του αρχικού πυκνού δείγματος. Τα αραιωμένα κατά τα παραπάνω δείγματα αντιπροσώπευαν, ανάλογες του βαθμού αραιώσης πυκνότητες κυττάρων του αρχικού πυκνού δείγματος (10Δ:0N). Μετρούμενα ως προς την οπτική τους πυκνότητα στα επιλεχθέντα μήκη κύματος (430, 680, 750 nm) απέδιδαν μια πολύ καλή αξιόπιστη σειρά μετρήσεων για ένα μεγάλο εύρος συγκέντρωσης κυττάρων mL⁻¹.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την αξιοπιστία και την ακρίβεια της μεθόδου ήταν η συνεχής ανάδευση του δείγματος έτσι που να μην υπάρχει περίπτωση να ληφθεί ποσότητα δείγματος προς αραιώση από μέσο καλλιέργειας που να έχει παραμείνει στο δοχείο αδιατάρακτο και να περιέχει κύτταρα που έχουν καθιζάνει. Οι κατά περίπτωση ποσότητες καλλιέργειας και νερού για να δημιουργηθούν οι παραπάνω αραιώσεις γίνονταν με χρήση αυτόματης πιπέτας Eppendorf και το δείγμα της καλλιέργειας από το οποίο λαμβάνονταν οι απαιτούμενες ποσότητες βρισκόταν συνεχώς υπό ανάδευση σε δοχείο τοποθετημένο σε πλάκα αναδευτήρα.

Οι μετρήσεις της απορρόφησης για το κάθε φύκος, σε κάθε μήκος κύματος καταγράφονταν σε υπολογιστικά φύλλα Excel και στη συνέχεια γίνονταν η παραγωγή των γραφημάτων που συνδέουν τη μετρούμενη πυκνότητα των κυττάρων (κύτ. mL⁻¹) με την οπτική πυκνότητα (σε αυθαίρετες μονάδες). Χρησιμοποιήθηκε το σύνολο των τιμών της απορρόφησης που προέκυψαν τόσο από τα δείγματα που υπέστησαν αραιώσεις όσο και από δείγματα που παρακολουθήθηκαν με εξέταση της κατάστασης της καλλιέργειας. Από τα διαγράμματα που προέκυψαν έγινε η προσαρμογή της γραμμής τάσης στα σημεία του γραφήματος με την προοπτική να επιλεγεί αυτή που θα έδινε τον υψηλότερο συντελεστή συσχέτισης κατά Pearson (R²).

Για να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα των καμπυλών συσχέτισης οπτικής πυκνότητας (O.D.)-πυκνότητας κυττάρων της εκάστοτε εξίσωσης, εξετάστηκαν οι % αποκλίσεις της μετρούμενης O.D. (O.D._{obs.}) με την αντίστοιχη της υπολογιζόμενη (O.D._{pred.}) που προκύπτει από την εξίσωση, με τη χρήση της σχέσης (Rosas and Riveros, 1990):

$$\% \text{ απόκλιση} = \left(\frac{\text{O.D.}_{\text{obs.}} - \text{O.D.}_{\text{pred.}}}{\text{O.D.}_{\text{obs.}}} \right) \times 100.$$

Με τη χρήση της σχέσης αυτής οι τιμές των εξισώσεων που για ένα φύκος παρουσίαζαν σχεδόν παρόμοιο και ισχυρό συντελεστή συσχέτισης κατά Pearson (R²) καταγράφηκαν σε πίνακα και το μήκος κύματος στο οποίο οι τιμές αυτές παρουσίασαν τη μικρότερη τυπική απόκλιση και τυπικό σφάλμα επιλέχθηκε ως το καταλληλότερο για χρήση.

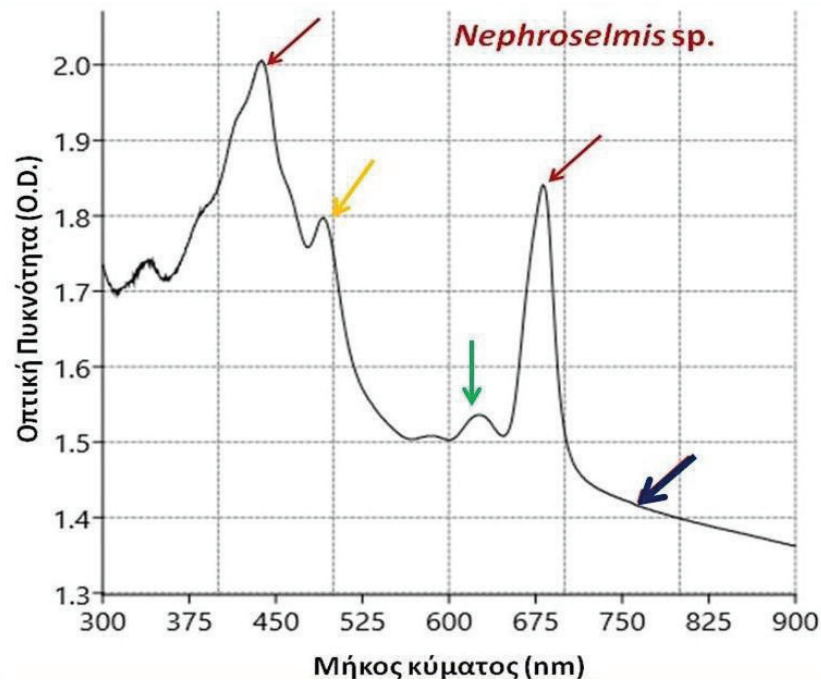
Για τη φθορισμομετρία (φασματοφωτόμετρο εκπομπής CARY Eclipse Varian) επιλεγμένες καλλιέργειες εξετάστηκαν ως προς το φάσμα εκπομπής τους για να διαπιστωθεί η σταθερότητα των εμφανιζόμενων κορυφών εκπομπής προκειμένου αυτό να αποτελέσει ένα σταθερό ποιοτικό χαρακτηριστικό τους. Επιπρόσθετα διερευνήθηκε το κατά πόσο η κορυφή εκπομπής μεταβάλλονταν ανάλογα με την πυκνότητα του δείγματος με σκοπό να διερευνηθεί αν μπορεί να προκύψει μια αναλογική σχέση μεταξύ πυκνότητας και έντασης της κορυφής ώστε να αποτελέσει ένα χρησιμοποιήσιμο ποσοτικό χαρακτηριστικό τους.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Φάσματα απορρόφησης κάθε ξεχωριστού φύκου

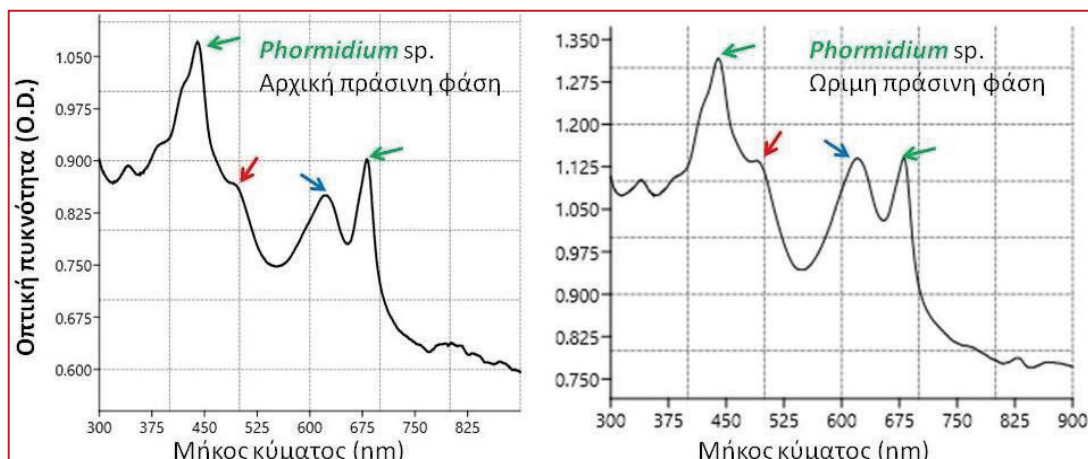
Το φάσμα απορρόφησης για το *Nephroselmis* έδωσε το αποτέλεσμα του Σχήματος 1 στο οποίο εμφανώς υπάρχουν οι δύο κορυφές (κόκκινα βέλη στο σχήμα) που αντιστοιχούν στη χλωροφύλλη-α στα 430 και 680 nm. Επιπρόσθετα παρουσιάζεται και μία κορυφή (πράσινο βέλος) στα ~635 nm που αντιστοιχεί στη χλωροφύλλη-β και μία κορυφή (κίτρινο βέλος) στα 470 nm που αντιστοιχεί στα καρωτενοειδή και ειδικότερα στο β-κρωτένιο. Η περιοχή της απορρόφησης στην κορυφή γύρω από το μήκος κύματος των 430-450 nm παρουσιάζει

τη μεγαλύτερη έκταση λόγω της συνδυασμένης ενίσχυσης στην απορρόφηση των χλωροφυλλών α & β και των καρωτενοειδών που παρουσιάζουν μέγιστα σε αυτή την περιοχή του φάσματος. Στα 750 nm η απορρόφηση ήταν αμελητέα χωρίς κορύφωση.

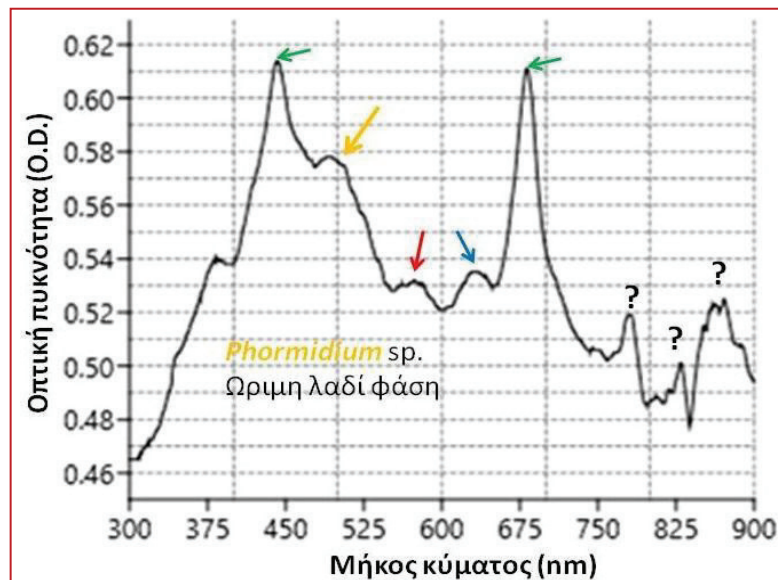


Σχήμα 1. Φάσμα απορρόφησης του χλωροφύκου *Nephroselmis* sp. με τις χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης (οπτική πυκνότητα) σε διάφορα μήκη κύματος. Με κόκκινο βέλος υποδεικνύονται οι κορυφές για τη χλωροφύλλη-α, με πράσινο για τη χλωροφύλλη-β, με κίτρινο για τα καρωτενοειδή και με μαύρο η έλλειψη απορρόφησης στα 750 nm.

Το φάσμα απορρόφησης για το *Phormidium* (Σχήμα 2) στις αρχικές φάσεις της καλλιέργειας παρουσιάζει αξιοσημείωτο ενδιαφέρον. Όπως προαναφέρθηκε το είδος αυτό παρουσιάζει έντονο πράσινο χρώμα κατά τις αρχικές φάσεις της καλλιέργειας (1^η έως περίπου την 5^η ημέρα) και κατόπιν σταδιακά αρχίζει να κιτρινίζει αποκτώντας εντεύθεν κιτρινολαδί χρωματισμό. Έτσι το φάσμα του μετρήθηκε κατά την αρχική του πράσινη φάση και κατά την ώριμη πράσινη φάση εκεί δηλαδή που το πράσινο χρώμα ήταν πλέον έντονο. Και στις δύο πράσινες αυτές φάσεις τα δύο μέγιστα (peaks) της χλωροφύλλης-α (430 & 680 nm) παρέμειναν αναλλοίωτα (πράσινα βέλη στο σχήμα) όπως αναλλοίωτα παρέμειναν και τα ελαφρώς διακρινόμενα μέγιστα των καρωτενοειδών στα ~480 nm (κόκκινα βέλη στο σχήμα). Όμως η κορυφή που αντιστοιχεί στη φυκοκυανίνη (~620 nm-μπλε βέλος στο σχήμα) ήταν μεν ξεκάθαρα εμφανής και στις δύο πράσινες φάσεις αλλά παρουσίασε εντυπωσιακή αύξηση της απορρόφησης στην ώριμη πράσινη φάση, γεγονός που σημαίνει αύξηση της περιεκτικότητας των κυττάρων στη συγκεκριμένη βιλιπρωτεΐνη.



Σχήμα 2. Φάσμα απορρόφησης του κυανοβακτηρίου *Phormidium* sp. με τις χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης (οπτική πυκνότητα) σε διάφορα μήκη κύματος σε δύο διαφορετικές χρονικά περιόδους.

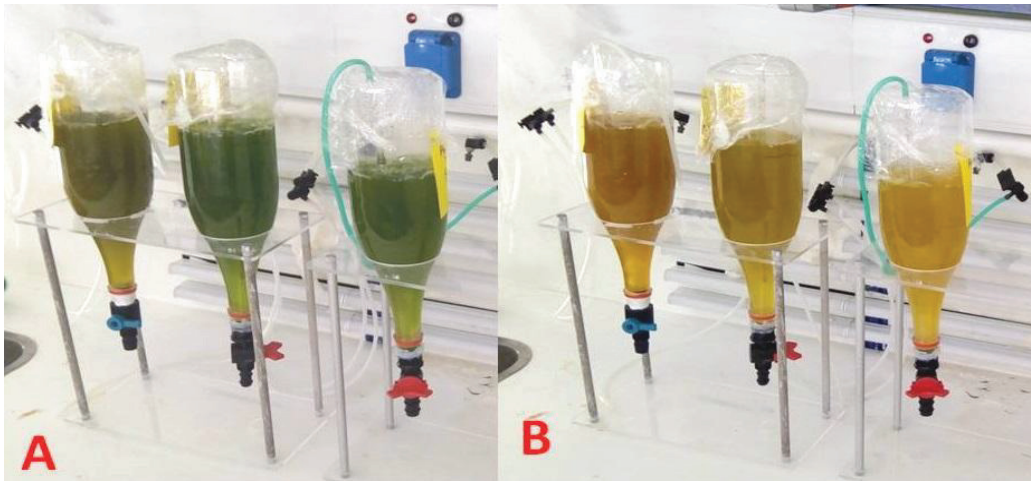


Σχήμα 3. Φάσμα απορρόφησης του κυανοβακτηρίου *Phormidium* sp. της λαδί φάσης του.

Ας σημειωθεί εδώ ότι στην περιοχή απορρόφησης της φυκοκυανίνης (600-650 nm) δεν υπάρχει ενδεχόμενο σύμμειξης των απορροφήσεων με τη χλωροφύλλη-β η οποία παρουσιάζει μέγιστο στα ~642 nm για τον απλούστατο λόγο ότι στα κυανοβακτήρια δεν υφίσταται θέμα ύπαρξης χλωροφύλλης-β. Στα 750 nm η απορρόφηση είναι αμελητέα.

Η κατάσταση διαφέρει πολύ για την ώριμη λαδί φάση (Σχήμα 3). Εδώ ενώ διατηρούνται οι δύο εμφανείς κορυφές για τη χλωροφύλλη-α (430 & 680 nm), η κορυφή των 680 nm έχει φθάσει σε ύψος αυτή των 430 nm. Η εξήγηση για αυτό το φαινόμενο δεν είναι εύκολο να διατυπωθεί, εικάζεται ότι δομικές αλλαγές στο σύμπλοκο πρωτεϊνών-χλωροφυλλών των ενεργών κέντρων της φωτοσύνθεσης προκάλεσαν την αύξηση της κορυφής στα 680 nm. Αντίθετα όμως η κορυφή της φυκοκυανίνης (~620 nm- μπλε βέλος στο σχήμα) έχει υποχωρήσει πολύ συγκριτικά με την αντίστοιχη της πράσινης φάσης ενώ συνάμα εμφανίζεται και μια νέα κορυφή ίσης περίπου έντασης στα ~570 nm που αντιστοιχεί στη φυκοερυθρίνη (κόκκινο βέλος). Συνάμα υψηλότερα από αυτές (~480nm) εμφανίζεται και η κορυφή για τα καρωτενοειδή (κίτρινο βέλος).

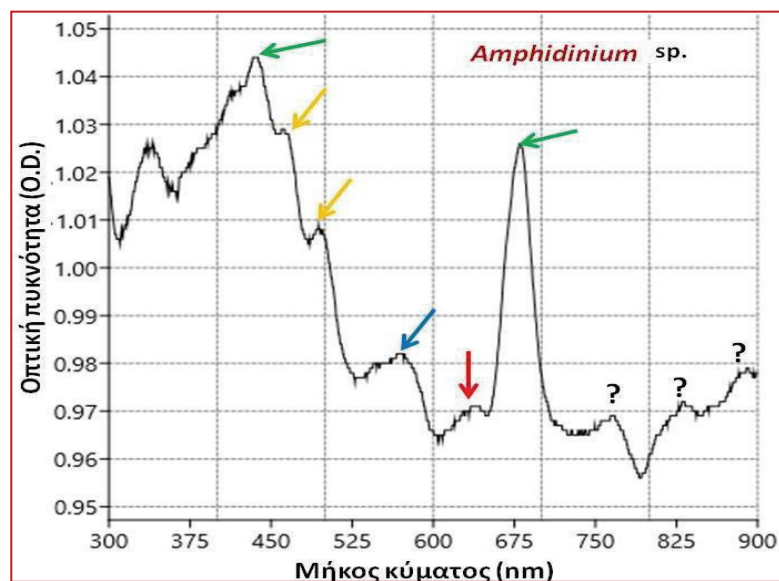
Ο συνδυασμός αυτών των ευρημάτων εξηγεί γιατί στη φάση αυτή η καλλιέργεια εμφανίζει λαδοκίτρινο χρώμα. Είναι προφανώς η υποχώρηση της περιεκτικότητας σε φυκοκυανίνη του κυττάρου με την ταυτόχρονη αύξηση σε φυκοερυθρίνη και καρωτενοειδή που δημιουργεί μια μίξη χρωμάτων που εμφανίζεται ως "λαδί" χρώμα. Έτσι αρχίζοντας από την αρχική πράσινη φάση όπου η φυκοκυανίνη παρουσιάζεται εμφανώς (Σχήμα 2 αριστερά), μεταβαίνουμε στην ώριμη πράσινη φάση (Σχήμα 2 δεξιά & Εικόνα 22A) όπου η φυκοκυανίνη μεγιστοποιείται και τελικώς στην ώριμη λαδί φάση (Σχήμα 3 & Εικόνα 22B) με την υποχώρηση της φυκοκυανίνης και τη μεγάλη αύξηση σε φυκοερυθρίνη και καρωτενοειδή. Σε αυτή την ώριμη λαδί φάση αξιοσημείωτες και συνάμα δυσεξηγήτες είναι και οι 3 κορυφές (σημειώνονται με ?) στην περιοχή πέραν των 750nm. Εικάζεται ότι οφείλονται σε διάφορες ουσίες που έχουν εξάγει τα ώριμα κύτταρα στο μέσο της καλλιέργειας και με την πρόοδο του χρόνου συσσωρεύονται στο νερό.



Εικόνα 22 . Καλλιέργειες του νηματοειδούς κυανοβακτηρίου *Phormidium* παρουσιάζοντας πράσινο χρώμα (A) κατά τις πρώτες ημέρες και λαδοκίτρινο (B) αργότερα (μετά περίπου την 6^η ημέρα).

Στην περίπτωση του *Amphidinium* το φάσμα απορρόφησης (Σχήμα 5) παρουσιάζει αρκετό ενδιαφέρον, καθώς εκτός από τις δύο κορυφές των 430 και 680 nm (πράσινα βέλη) που είναι τυπικές για τη χλωροφύλλη-α παρουσιάζονται και αρκετές άλλες. Οι κορυφές αυτές ~460 και 490 nm (κίτρινο βέλος), ~570 nm (μπλε βέλος) και ~640 nm (κόκκινο βέλος) δεν είναι δυνατόν να ανήκουν παρά μόνο σε ποικίλα καρωτενοειδή (περιδινίνη ή/και φυκοξανθίνη) τυπικά των δινομαστιγωτών καθώς και στη χλωροφύλλη-*c* η οποία επίσης υπάρχει σε αυτή την κατηγορία φυκών αποκλεισμένης της ύπαρξης χλωροφύλλης-*β*.

Η ανάμιξη των επικαλυπτόμενων εντάσεων απορρόφησης αυτών των χρωστικών στο φάσμα απορρόφησης του συγκεκριμένου μικροφύκου δίδει την εικόνα του Σχήματος 5. Ανεξήγητες και εδώ είναι και οι κορυφές που παρουσιάζονται πέραν των 750 nm βαθιά στο ερυθρό μέρος του φάσματος (υποδεικνύονται με ?). Προφανώς και στην περίπτωση αυτή οφείλονται σε ποικίλες εξωκυτταρικές ουσίες τις οποίες εξήγαγαν τα κύτταρα στο νερό. Κάτι τέτοιο υποστηρίζεται και από την παρουσία αφρού στην επιφάνεια του νερού στα δοχεία τους στις εντόνωες αεριζόμενες καλλιέργειες του *Amphidinium*.



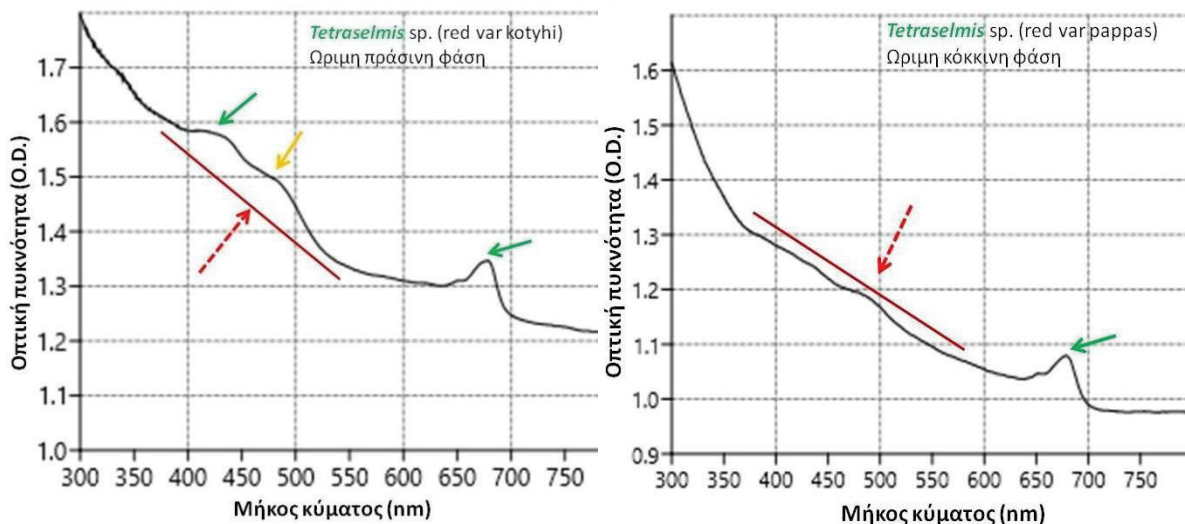
Σχήμα 5. Φάσμα απορρόφησης του δινομαστιγωτού *Amphidinium carterae*.

Τα φάσματα απορρόφησης στο *Tetraselmis* sp. (var. red) παρουσίασαν μια εντελώς διαφορετική και συνάμα ενδιαφέρουσα μορφή συγκριτικά με τα φάσματα των άλλων φυκών (Σχήματα 6A & 6B).

Το πλέον εμφανές γνώρισμα ήταν μια μόνο ξεκάθαρη κορυφή (πράσινο βέλος στα Σχήματα) στα 680 nm που αντιστοιχεί στην απορρόφηση της χλωροφύλλης-α στο ερυθρό. Όμως το ύψος αυτής της κορυφής ήταν πολύ κατώτερο της υπόλοιπης ευρείας περιοχής μεταξύ ~300 και 550 nm (κόκκινη γραμμή στα Σχήματα) η οποία δεν παρουσίασε έντονες κορυφώσεις πλην όμως αποτυπώνει μια έντονη απορρόφηση από υψηλή συγκέντρωση καρωτενοειδών (κυρίως αυτών) και χλωροφύλλης-β στο χλωροπλάστη.

Ιδιαίτερα μάλιστα στην πράσινη φάση αυτού του είδους (Σχήμα 6A) στην περιοχή αυτή ξεχωρίζουν κάπως 2 εξογκώσεις-κορυφές στα ~435 και ~475 nm που αντιστοιχούν στη χλωροφύλλη-α στη χλωροφύλλη-β και στα καρωτενοειδή αντίστοιχα (πράσινο και κίτρινο βέλος αντίστοιχα).

Επιπλέον αυτή η έντονη απορρόφηση που περιλαμβάνεται στο εύρος 300-500 nm εκτός από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές εικάζεται ότι οφείλεται και σε διάφορες ουσίες άγνωστης φύσης (πιθανώς πρωτεΐνες) που εξήχθησαν (για άγνωστη αιτία) από τα κύτταρα στο νερό. Στην Εικόνα 23 απεικονίζονται χαρακτηριστικά δοχεία με καλλιέργειες αυτού του είδους σε διάφορες φάσεις ανάπτυξης με ποικιλία αποχρώσεων κόκκινου χρώματος .



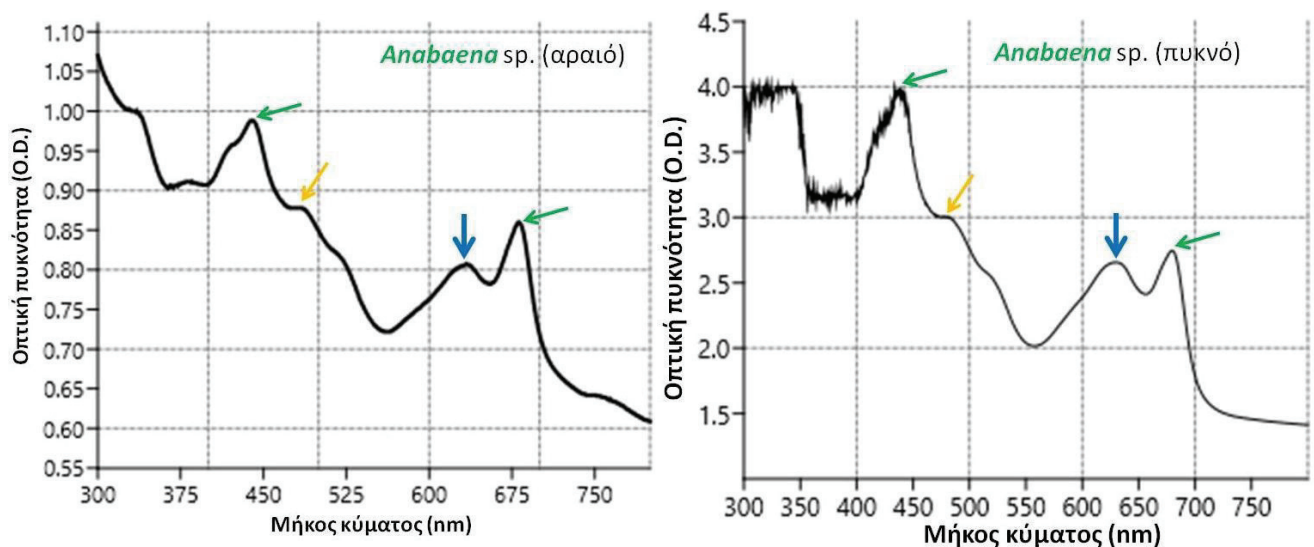
Σχήμα 6. Α) Φάσμα απορρόφησης του χλωροφύκου *Tetraselmis* sp. (var. red) στην ώριμη πράσινη φάση του (αριστερά) Β) Φάσμα απορρόφησης του χλωροφύκου *Tetraselmis* sp. (var. red) στην ώριμη κόκκινη φάση του (δεξιά).



Εικόνα 23. Δοχεία με δείγματα καλλιιεργειών του *Tetraselmis* sp. (var. red) από διάφορες φάσεις ανάπτυξης όπου το χρώμα του νερού καλλιέργειας κυμαίνεται από καφετί έως σκουροκόκκινο.

Για το κυανοβακτηριακό μικροφύκος *Anabaena* το φάσμα απορρόφησης (Σχήματα 7A & 7B) παρουσιάζει παρόμοιο πρότυπο με αυτό του άλλου κυανοβακτηρίου που εξετάστηκε (*Phormidium*, Σχήματα 2 & 3) όμως με χαρακτηριστικές διαφορές στο ύψος των κορυφών του. Έτσι παρουσιάζονται και εδώ (*Anabaena*) οι 2 χαρακτηριστικές κορυφές (~ 440 & 680 nm, πράσινο βέλος) που αντιστοιχούν στη χλωροφύλλη-α, μια κορυφή (~625 nm, μπλε βέλος) που αντιστοιχεί στη φυκοκυανίνη και μία (~475 nm, κίτρινο βέλος) που αντιστοιχεί στα καρωτενοειδή.

Η πιο ώριμη καλλιέργεια της *Anabaena* (Σχήμα 7B) δείχνει μια αυξημένη περιεκτικότητα σε φυκοκυανίνη (αύξηση στην κορυφή της) συγκριτικά με την πρωιμότερή της (και πιο αραιή, Σχήμα 7A) κάτι που διαφοροποιεί αυτό το είδος από το άλλο κυανοβακτήριο (*Phormidium*) στο οποίο η κορυφή της φυκοκυανίνης είναι υψηλότερη στις αρχικές φάσεις της καλλιέργειας (Σχήμα 2) συγκριτικά με την ώριμη φάση του (Σχήμα 3). Επίσης στην *Anabaena* δεν εμφανίζεται κάποια κορυφή που να αντιστοιχεί στην άλλη βιλλιπρωτεΐνη τη φυκοερυθρίνη (~570 nm) κάτι που παρουσιάζει έντονα το *Phormidium* στην ώριμη (λαδί χρώματος) φάση της καλλιέργειάς του (Σχήμα 3) μόνο.

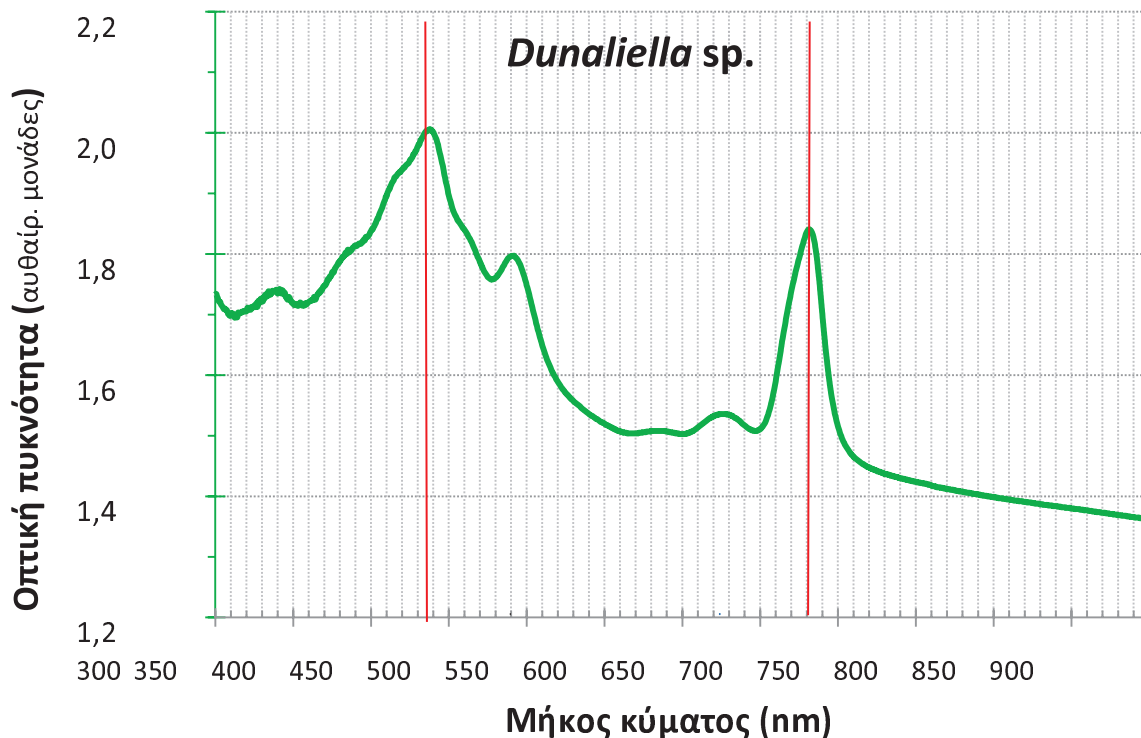


Σχήμα 7. Α) Φάσμα απορρόφησης του κυανοβακτηριακού μικροφύκου *Anabaena* sp. σε χαμηλή πυκνότητα. (αριστερά)

Β) Φάσμα απορρόφησης του κυανοβακτηριακού μικροφύκου *Anabaena* sp. σε υψηλή πυκνότητα. (δεξιά)

Το φάσμα απορρόφησης της *Dunaliella* (Σχήμα 8) παρουσιάζει παρόμοια ακριβώς εικόνα με αυτή (Σχήμα 1) του άλλου χλωροφύκου (*Nephroselmis* sp.) που εξετάζεται στην παρούσα εργασία. Παρουσιάζει δύο έντονες κορυφές στα ~438 και 681 nm (κόκκινες κάθετες γραμμές) που αντιστοιχούν στη χλωροφύλλη-α, μια κορυφή στα ~ 625 (μπλε κάθετη γραμμή) που αντιστοιχεί στη χλωροφύλλη-β και μια κορυφή στα ~ 490 nm (μαύρη κάθετη γραμμή) που αντιστοιχεί στα καρωτενοειδή. Το παρόμοιο πρότυπο του φάσματος στα 2 παραπάνω χλωροφύκη (*Dunaliella* & *Nephroselmis*) σε συνδυασμό με το παρόμοιο σε γενικές γραμμές πρότυπο φάσματος των δύο κυανοβακτηρίων (*Phormidium* & *Anabaena*) και το εντελώς

διαφορετικό από όλα τα παραπάνω του δινομαστιγωτού *Amphidinium* δημιουργεί βάσιμες υποθέσεις ότι οι διάφορες ταξινομικές κατηγορίες των μικροφυκών χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα πρότυπα φασμάτων απορρόφησης και αυτό θα μπορούσε μετά από εξαντλητικές έρευνες να οδηγήσει σε μαθηματικά μοντέλα ταυτοποίησης των πληθυσμών στα φυσικά νερά με στοχευμένες εξετάσεις των φασμάτων απορρόφησης δειγμάτων από αυτά προκειμένου να ανιχνευθούν είτε τοξικά είδη, είτε να παρακολουθείται η σύνθεση των φυτοπλαγκτονικών βιοκοινωνιών. Για τα παραπάνω είδη που εξετάστηκαν στο παρόν δεν βρέθηκαν ανάλογες βιβλιογραφικές αναφορές οπότε το πεδίο είναι σχεδόν παντελώς ανεξερεύνητο.



Σχήμα 8. Φάσμα απορρόφησης του φυτοπλαγκτονικού χλωροφύκου *Dunaliella* sp.

Σε μια περαιτέρω προσπάθεια να σκιαγραφηθεί έστω το τεράστιο πεδίο της μορφής των φασμάτων απορρόφησης ανάλογα με την πυκνότητα της καλλιέργειας του κάθε είδους ξεχωριστά και της μορφής που λαμβάνει το φάσμα όταν αναμιχθούν δύο τουλάχιστον είδη έγιναν κάποιες απόπειρες οι οποίες όμως δεν απέδωσαν κάποιο χρήσιμο πρότυπο.

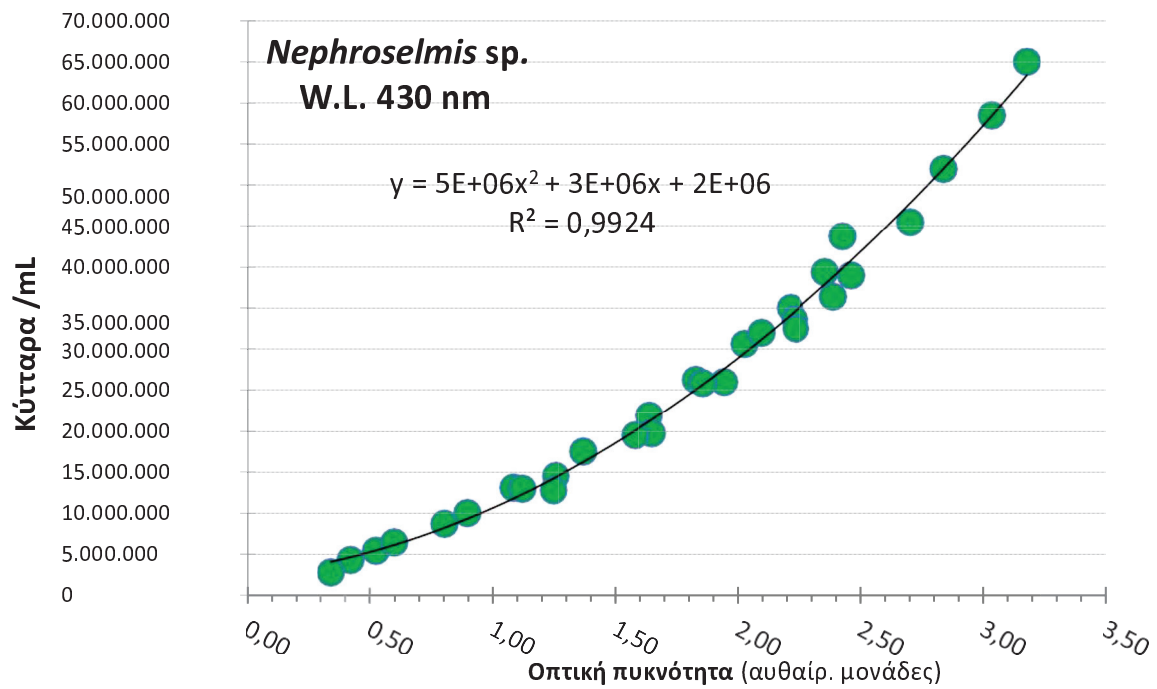
Τα φάσματα απορρόφησης των μικροφυκών που εξετάστηκαν (Σχήματα 1–8), περιλαμβάνονται στην περιοχή εύρους (400-700nm) που αντιστοιχεί στη φωτοσυνθετικώς ενεργή ακτινοβολία (PAR -Photosynthetic Active Radiation) του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Τα φάσματα μετρήθηκαν σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης των φυκών (δηλαδή: επαγωγική, εκθετική και στάσιμη φάση) και έδειξαν σχεδόν ταυτόσημο μοτίβο, έτσι το επιλεγμένο φάσμα κάθε είδους που παρουσιάζεται εδώ είναι αυτό που αντιστοιχεί στο τέλος της εκθετικής φάσης. Και τα 6 είδη παρουσίασαν δύο εμφανείς κορυφές στις περιοχές ~ 430 και ~ 680 nm που αντιστοιχούν στα μέγιστα απορρόφησης της χλωροφύλλης-α. Ελαφρές διαφορές της μέγιστης απορρόφησης για τα μικροφύκη που δοκιμάστηκαν και για άλλα είδη που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία μπορούν να αποδοθούν σε διαφορές στα συγκεκριμένα περιεχόμενα των χλωροφύλλων (a & b για τα χλωροφύτα, a & c για τα δινομαστιγωτά και κυανοβακτήρια) και τα καρωτενοειδή ή τις βιλιπρωτεΐνες φυκοκυανίνη και φυκοερυθρίνη

(μόνο στα κυανοβακτήρια) που υπάρχουν στο τα κύτταρα (Bricaud et al., 1998; Ebenezer and Ki, 2013). Για την ευκολία της ομοιότητας στην παρουσίαση ενός χρήσιμου μήκους κύματος για όλα τα δοκιμασμένα φύκη, εξομαλύνουμε τις μικρές κορυφές μεταξύ τους και επιλέξαμε 430 και 680 nm ως μήκη κύματος εργασίας και για τα 6 φύκη. Πιθανώς στα παραπάνω δύο μήκη κύματος (430 και 680 nm) που αντιπροσωπεύουν τα μήκη κύματος της μέγιστης ευαισθησίας ως προς την υπάρχουσα κυτταρική περιεκτικότητα των κυττάρων τους στη χλωροφύλλη-α, στα μικροφύκη που εξετάστηκαν, η σχέση μεταξύ απορρόφησης (ως οπτική πυκνότητα - Optical Density-O.D.) και πυκνότητας κυττάρων πρέπει να είναι της υψηλότερης ακρίβειας. Ένα τέτοιο συμπέρασμα δεν θα είχε νόημα χωρίς, για λόγους σύγκρισης, να εξεταστούν επιπλέον μήκη κύματος στα οποία η απορρόφηση είναι ελάχιστη. Έτσι, τα επιλεγμένα μήκη κύματος 750 nm για όλα τα είδη και επιπλέον 570 nm για το *Phormidium* (που ανήκε στα κυανοβακτήρια) δοκιμάστηκαν για να δούμε αν μπορούν επίσης να είναι χρήσιμα για την πρόβλεψη της πυκνότητας των κυττάρων στο λογική του ότι σε αυτά τα μήκη κύματος η απορρόφηση δεν θα εκφράζει τίποτα άλλο παρά θολότητα προκαλούμενη από τα αιωρούμενα στο νερό κύτταρα.

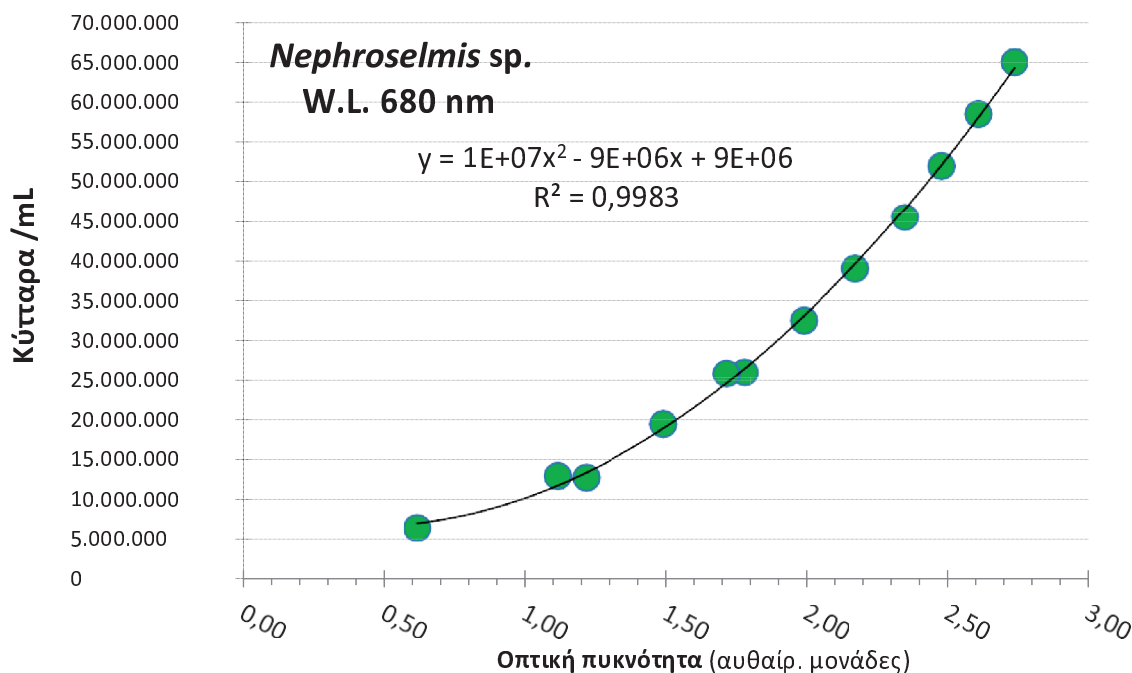
Σχέση μεταξύ πυκνότητας καλλιέργειας και οπτικής πυκνότητας

Τα μήκη κύματος που χρησιμοποιήθηκαν οδήγησαν σε πολύ υψηλούς συνολικούς συντελεστές συσχέτισης Pearson ($R^2 > 0,90$) για όλα τα φύκη, υποδεικνύοντας ότι οι επιλεγμένες συναρτήσεις ήταν ισχυρές που σημαίνει ότι η μετρούμενη κυτταρική πυκνότητα δείχνει υψηλή θετική συσχέτιση με την απορρόφηση εξηγώντας περισσότερο από το 90% της διακύμανσης (Rosas και Riveros, 1990). Αντί για μια απλή γραμμική σχέση της O.D. ως προς την πυκνότητα κυττάρων και όπου αυτό απεδείχθη καταλληλότερο, επιλέχθηκε μια συνάρτηση δύναμης ($Y = aX^b$) ή μια πολυωνυμική ή λογαριθμική συνάρτηση ανάλογα με το υψηλότερο R^2 που προέκυψε.

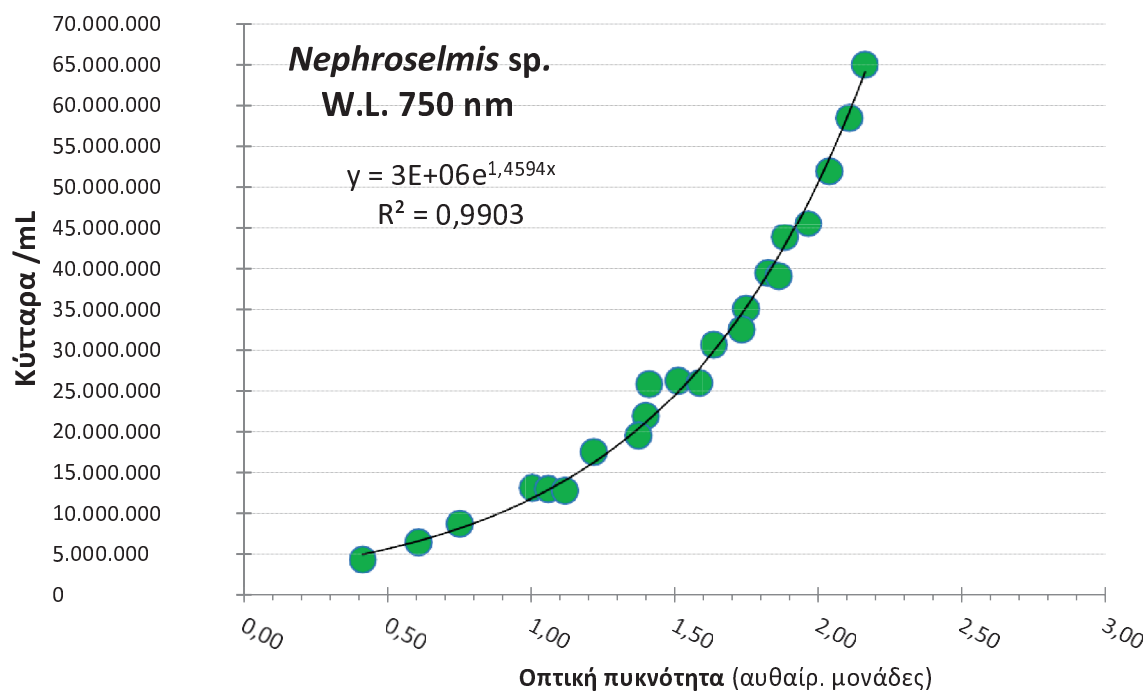
Παραδειγματικά στο *Nephroselmis* όπου η εξίσωση δύναμης στα 750 nm (Σχήμα 11) επιλέχθηκε με βάση τη βέλτιστη τιμή του R^2 , η τιμή του b ήταν υψηλότερη από τη μονάδα, υποδηλώνοντας ότι η απορρόφηση αυξάνεται με την πυκνότητα των κυττάρων λόγω πιθανώς κάποιου είδους επίδρασης, πρόσθεσης στο νερό εξοκυτταρικών ουσιών που παράγουν σε αυξημένο βαθμό τα κύτταρα των ώριμων καλλιεργειών. Στην περίπτωση επίσης του *Phormidium* και στα 570 nm (σχήμα 19) η κατάσταση ήταν παρόμοια με την τιμή του b της εξίσωσης δύναμης υψηλότερη από την μονάδα δείγμα και εδώ παρόμοιας αιτίας με το *Nephroselmis*.

Nephroselmis sp.

Σχήμα 9. Καμπύλη βαθμονόμησης κυττάρων/mL - οπτικής πυκνότητας στα 430 nm του χλωροφύκου *Nephroselmis sp.*



Σχήμα 10. Καμπύλη βαθμονόμησης κυττάρων/mL - οπτικής πυκνότητας στα 680 nm του χλωροφύκου *Nephroselmis sp.*



Σχήμα 11. Καμπύλη βαθμονόμησης κυττάρων/mL - οπτικής πυκνότητας στα 750 nm του χλωροφύκου *Nephroselmis sp.*

Για το *Nephroselmis* (Σχήματα 9, 10 & 11) οι μετρήσεις τόσο στα 430 όσο στα 680 καθώς και στα 750 nm έδωσαν πολύ υψηλούς συντελεστές παλινδρόμησης ($R^2 = 0,9924, 0,9983$ & $0,9903$ αντίστοιχα). Στα μεν 430 και 680 nm η σχέση πυκνότητας κυττάρων - οπτικής πυκνότητας (O.D.) εκφράζεται από πολυωνυμικές εξισώσεις 2^{ου} βαθμού στα δε 750 nm από λογαριθμική εξίσωση. Οι εξισώσεις είναι οι παρακάτω:

Για τα 430 nm:

$$(\text{Πυκνότητα κυττάρων/mL}) = 5 \cdot 10^6 \cdot \text{OD}_{430}^2 + 3 \cdot 10^6 \cdot \text{OD}_{430} + 2 \cdot 10^6 \quad (R^2 = 0,9924)$$

Για τα 680 nm:

$$(\text{Πυκνότητα κυττάρων/mL}) = 10^7 \cdot \text{OD}_{680}^2 - 9 \cdot 10^6 \cdot \text{OD}_{680} + 9 \cdot 10^6 \quad (R^2 = 0,9983)$$

Για τα 750 nm:

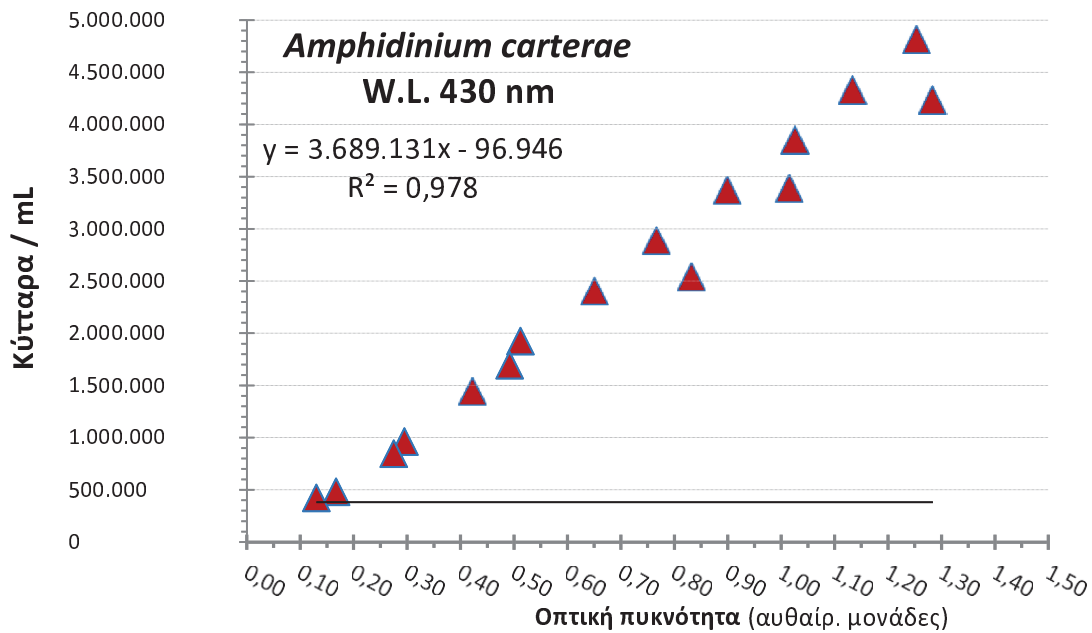
$$(\text{Πυκνότητα κυττάρων/mL}) = 3 \cdot 10^6 \cdot e^{1,4594 \cdot \text{OD}_{750}} \quad (R^2 = 0,9903)$$

Από πρακτική άποψη και οι 3 παραπάνω εξισώσεις κρίνονται ισχυρές και σαφώς αποτυπώνουν μια αξιόπιστη σχέση μεταξύ πυκνότητας κυττάρων και οπτικής πυκνότητας (O.D.). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκάστοτε εκτίμηση της αύξησης της καλλιέργειας αυτού του μικροφύκου, όμως συνιστάται η προτίμηση του μήκους κύματος των 750 nm καθώς όπως αποτυπώνεται στο γράφημα του Σχήματος 11 οι τιμές της οπτικής πυκνότητας δεν ξεπερνούν παρά ελάχιστα την τιμή του 2,00 ένα γενικό όριο για τη μέγιστη ευαισθησία και αξιοπιστία του φασματοφωτομέτρου, ενώ στα άλλα δύο μήκη κύματος (Σχήματα 9 & 10) υπάρχουν πολλές τιμές στην περιοχή 2,00-3,50 κάτι που μπορεί να εισάγει ενίοτε οπτικό θόρυβο στις μετρήσεις λόγω της μεταβολής των επιπέδων της χλωροφύλλης α στα κύτταρα ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας.

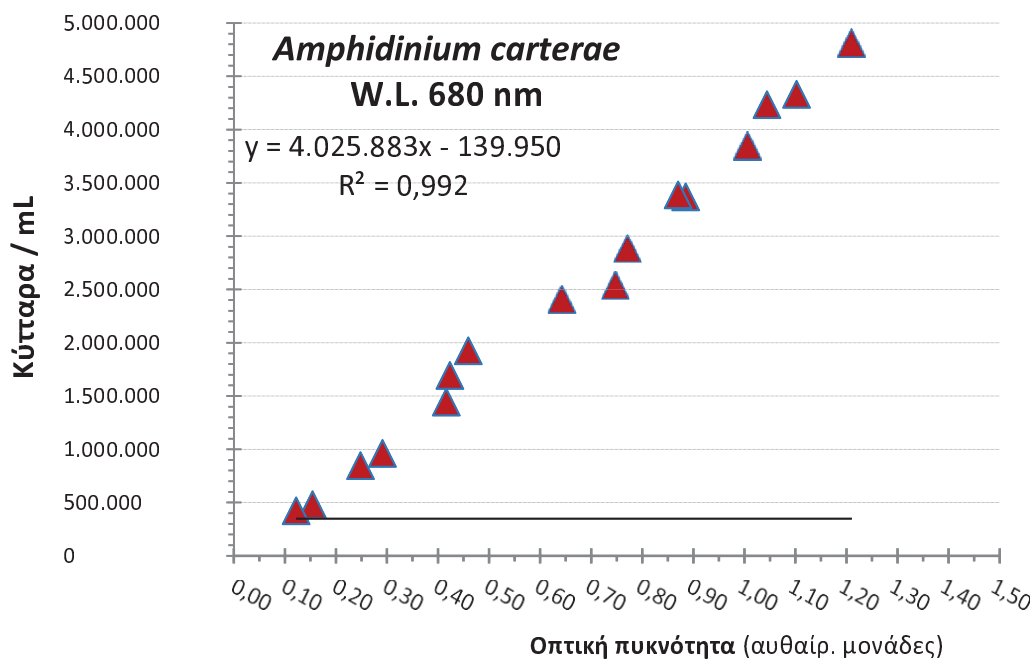
Το μειονέκτημα αυτό εξαλείφεται μετρώντας στα 750 nm καθώς σε αυτό το μήκος κύματος δεν απορροφούν οι χλωροφύλλες. Μία διαφορετική αξιόπιστη προσέγγιση θα μπορούσε να είναι η χρήση των γραμμικών εξισώσεων σε οποιοδήποτε από τα τρία μήκη κύματος και για τιμές απορρόφησης που αντιστοιχούν έως 35.000.000 κύτταρα/mL μετά από κατάλληλη αραίωση των δειγμάτων.

Amphidinium carterae

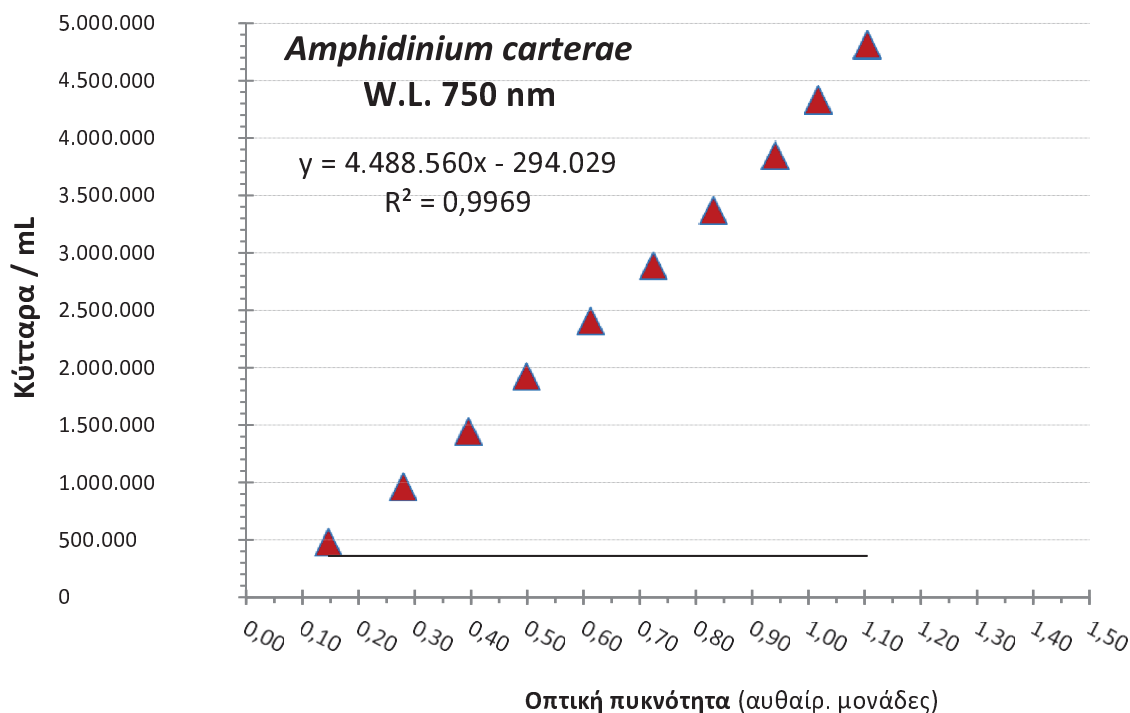
Στο δινομαστιγωτό *Amphidinium carterae* και στα 3 εξετασθέντα μήκη κύματος 430, 680 και στα 750 nm έδωσαν πολύ υψηλούς συντελεστές παλινδρόμησης ($R^2 = 0,9780, 0,9920$ & $0,9969$ αντίστοιχα) με σχέσεις απλής γραμμικής παλινδρόμησης. Όμως στα 430 nm (Σχήμα 12) οι τιμές στις υψηλότερες πυκνότητες κυττάρων παρουσίασαν ελαφρώς μεγαλύτερη απόσταση από την ευθεία παλινδρόμησης συγκριτικά με αυτές στα 680 nm (Σχήμα 13) εξ' ου και ο κατά τι υψηλότερος συντελεστής Pearson R^2 ($0,9920$ έναντι $0,9780$). Στα 750 nm η ταύτιση των σημείων με την ευθεία παλινδρόμησης ήταν απόλυτη (Σχήμα 14).



Σχήμα 12. Καμπύλη βαθμονόμησης κυττάρων/mL - οπτικής πυκνότητας στα 430 nm του δινομαστιγώτου *Amphidinium carterae*.



Σχήμα 13. Καμπύλη βαθμονόμησης κυττάρων/mL - οπτικής πυκνότητας στα 680 nm του δινομαστιγώτου *Amphidinium carterae*.



Σχήμα 14. Καμπύλη βαθμονόμησης κυττάρων/mL - οπτικής πυκνότητας στα 750 nm του δινομαστιγωτού *Amphidinium carterae*.

Οι εξισώσεις είναι οι παρακάτω:

Για τα 430 nm (Σχήμα 12):

$$(\text{Πυκνότητα κυττάρων/mL}) = 3.689.131 \cdot \text{OD}_{430} - 96.946 \quad (R^2 = 0,9780)$$

Για τα 680 nm (Σχήμα 13):

$$(\text{Πυκνότητα κυττάρων/mL}) = 4.025.883 \cdot \text{OD}_{680} - 139.950 \quad (R^2 = 0,9920)$$

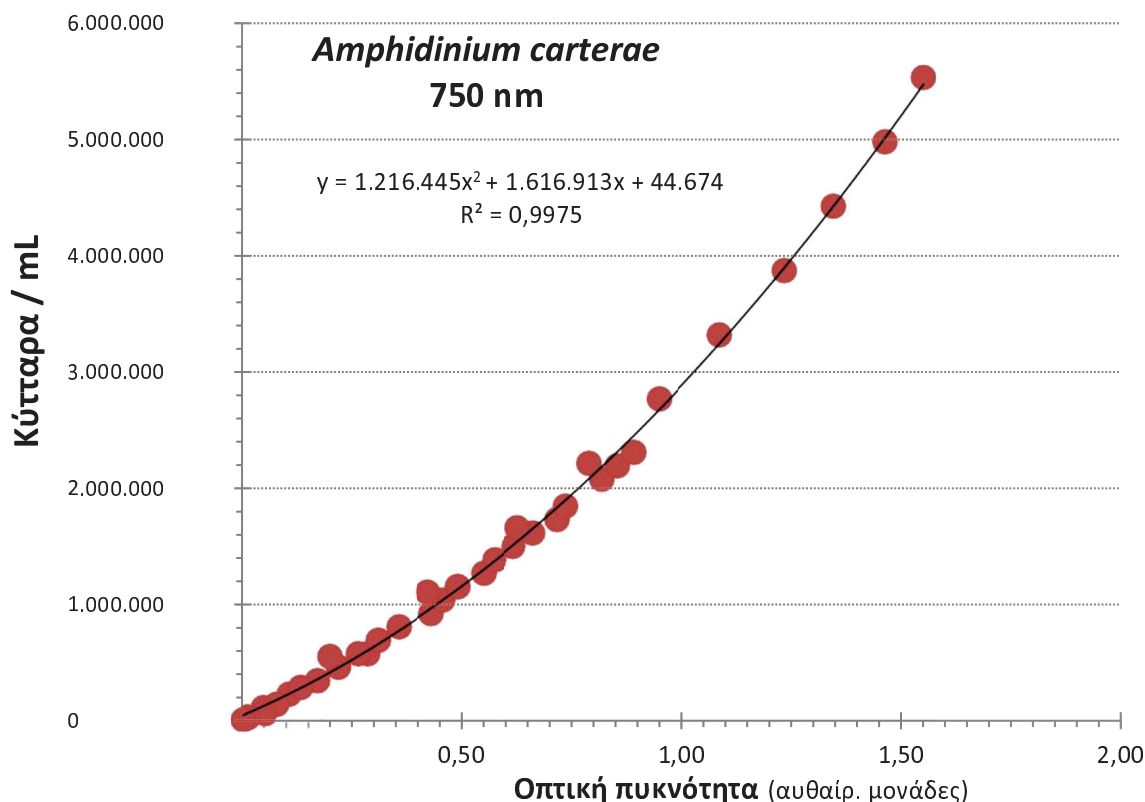
Για τα 750 nm (Σχήμα 14):

$$(\text{Πυκνότητα κυττάρων/mL}) = 4.488.560 \cdot \text{OD}_{750} - 294.029 \quad (R^2 = 0,9969)$$

Επειδή οι παραπάνω μετρήσεις αφορούσαν καλλιέργεια με μέγιστη πυκνότητα περί τα 4.600.000 κύτταρα/mL και διαπιστώνοντας κατόπιν ότι το *Amphidinium* επιτυγχάνει και μέγιστες πυκνότητες στο επίπεδο των 6.000.000 κυττάρων/ml επιχειρήσαμε μια διεξοδικότερη ανάλυση σε καλλιέργεια που είχε φθάσει σε τέτοια πυκνότητα χρησιμοποιώντας αφενός μεγάλο αριθμό μετρήσεων και αφετέρου το μήκος κύματος των 750 nm που είχε δώσει την καλύτερη προσαρμογή στην παλινδρόμηση, επιχειρώντας να καταλήξουμε σε μια ισχυρή σχέση που να καλύπτει όλο το εύρος των πυκνοτήτων των καλλιεργειών. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στο Σχήμα 51 όπου την καλύτερη προσαρμογή έδωσε η πολυωνυμική εξίσωση 2^{ου} βαθμού με πολύ υψηλό συντελεστή Pearson:

$$(\text{Πυκνότητα κυττάρων/ml}) = 1.216.445 \cdot \text{OD}_{750}^2 + 1.616.913 \cdot \text{OD}_{750} + 44.674 \quad (R^2 = 0,9975).$$

Συνεπώς θεωρούμε απόλυτα λειτουργική και αξιόπιστη την παραπάνω σχέση για χρήση σε καλλιέργειες του είδους αυτού. Για καλλιέργειες έως 4.500.000 κύτταρα η πιο αξιόπιστη σχέση είναι γραμμική σε όλα τα μήκη κύματος και μπορεί πάντα να χρησιμοποιούνται οι γραμμικές εξισώσεις με κατάλληλη αραίωση των δειγμάτων.



Σχήμα 15. Καμπύλη βαθμονόμησης κυττάρων/mL - οπτικής πυκνότητας στα 750 nm του δινομαστιγώτου *Amphidinium carterae* χρησιμοποιώντας πολλές μετρήσεις.

Phormidium sp.

Για το *Phormidium* που είναι νηματοειδές κυανοβακτήριο του οποίου ο υπολογισμός της πυκνότητας των κυττάρων είναι κάπως πολύπλοκος λόγω της μεθόδου υπολογισμού που περιλαμβάνει αρκετά στάδια (βάρος χαρτιού διήθησης, διήθηση καλλιέργειας, ξήρανση του συμπυκνώματος, τελική ζύγιση) με εγγενή την εισβολή μικροσφαλμάτων, το γράφημα τιμών O.D. - πυκνότητας κυττάρων παρουσίασε μεγαλύτερη διακύμανση από τα άλλα 5 φύκη. Ωστόσο, οι σχετικές εξισώσεις ήταν ικανοποιητικές με την καλύτερη συσχέτιση να παρουσιάζουν οι πολυωνυμικές 2^{ου} βαθμού για τα μήκη κύματος 430, 680 και 750 nm (Σχήματα 16, 17 & 18 αντίστοιχα) και η λογαριθμική για το μήκος κύματος των 570 nm (Σχήμα 19).

Οι εξισώσεις είναι οι παρακάτω:

Για τα 430 nm:

$$(\text{Ξηρό βάρος g/L}) = 0,1523 \cdot \text{OD}^2 + 0,0224 \cdot \text{OD} + 0,0321 \quad (R^2_{430} = 0,9861)$$

Για τα 680 nm:

$$(\text{Ξηρό βάρος g/L}) = 0,2174 \cdot \text{OD}^2 + 0,0018 \cdot \text{OD} + 0,0462 \quad (R^2_{680} = 0,9788)$$

Για τα 750 nm:

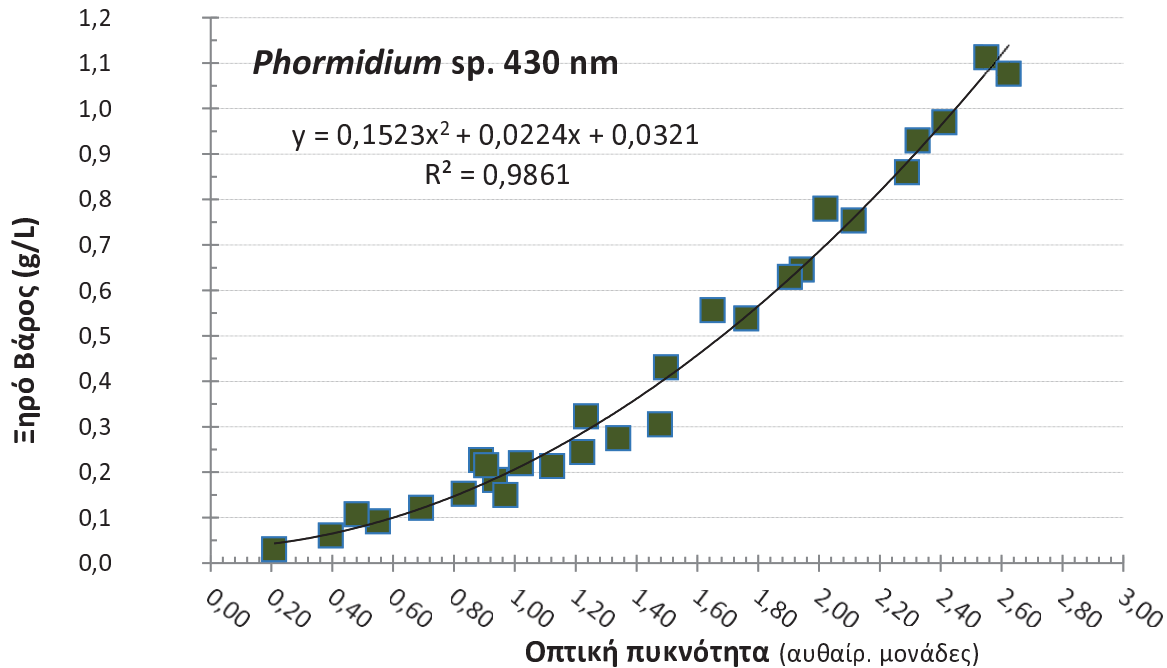
$$(\text{Ξηρό βάρος g/L}) = 0,444 \cdot \text{OD}^2 + 0,1335 \cdot \text{OD} + 0,0847 \quad (R^2_{750} = 0,9822)$$

Για τα 570 nm:

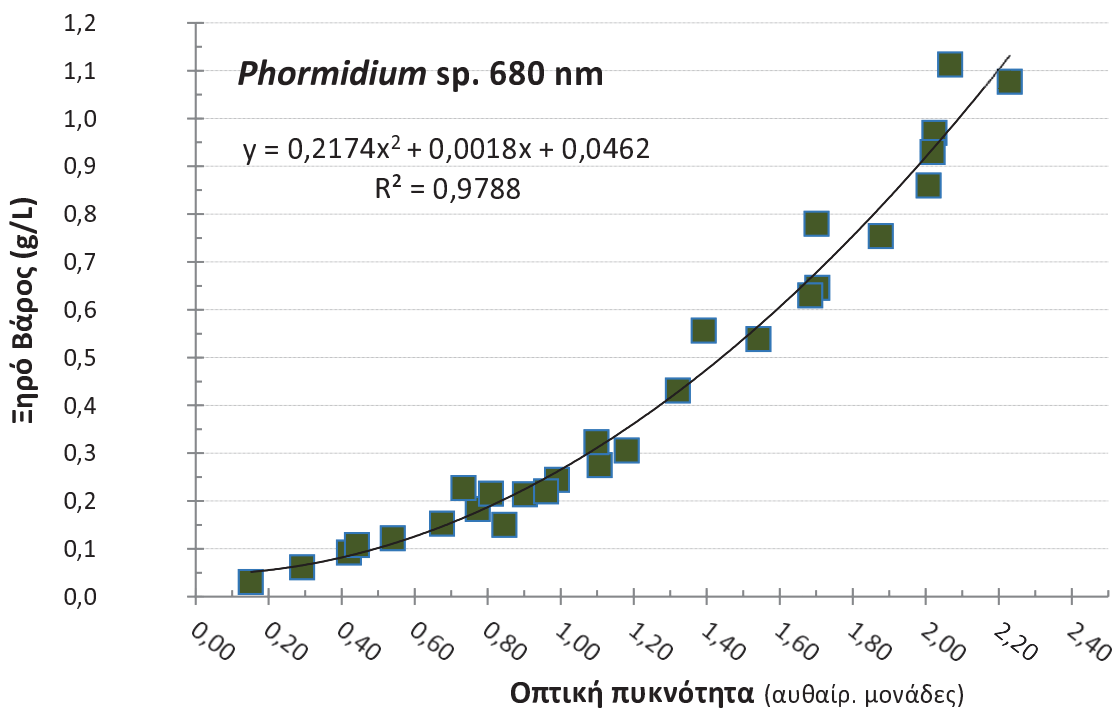
$$(\text{Ξηρό βάρος g/L}) = 0,0561 \cdot e^{1,711 \cdot \text{OD}^{570}} \quad (R^2 = 0,9687)$$

Από την εικόνα που παρουσιάζουν οι καμπύλες της συσχέτισης σε όλα τα εξετασθέντα μήκη κύματος στα Σχήματα 16, 17, 18 & 19 προκύπτει ότι η αύξηση της

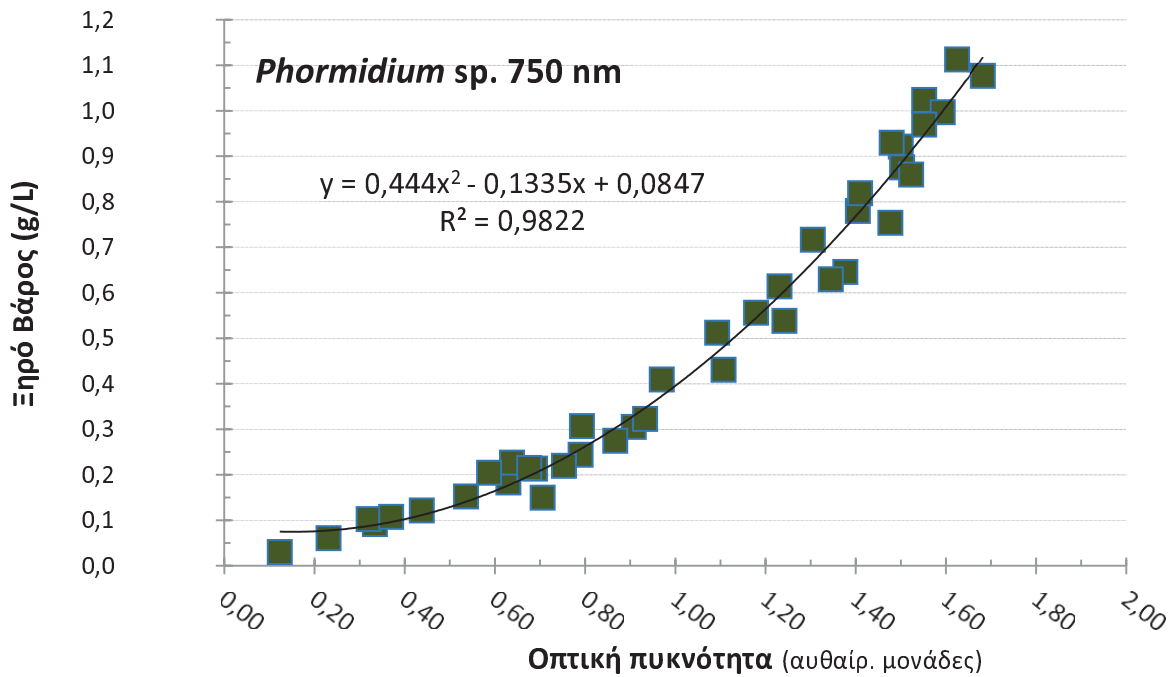
οπτικής πυκνότητας δεν συνδέεται με γραμμική σχέση με την ξηρή μάζα των κυττάρων αλλά με μια καμπύλη με θετικό πρόσημο αύξησης κάτι που επιβεβαιώνεται και από την εφαρμογή μιας απλής γραμμικής παλινδρόμησης σε όλα τα παραπάνω μήκη κύματος και η οποία όταν επιχειρήθηκε έδωσε πολύ χαμηλότερους συντελεστές R^2 (~0,6 - 0,7). Συνεπώς για τις καλλιέργειες αυτού του είδους συνιστούμε την πολυωνυμική στα 430 nm.



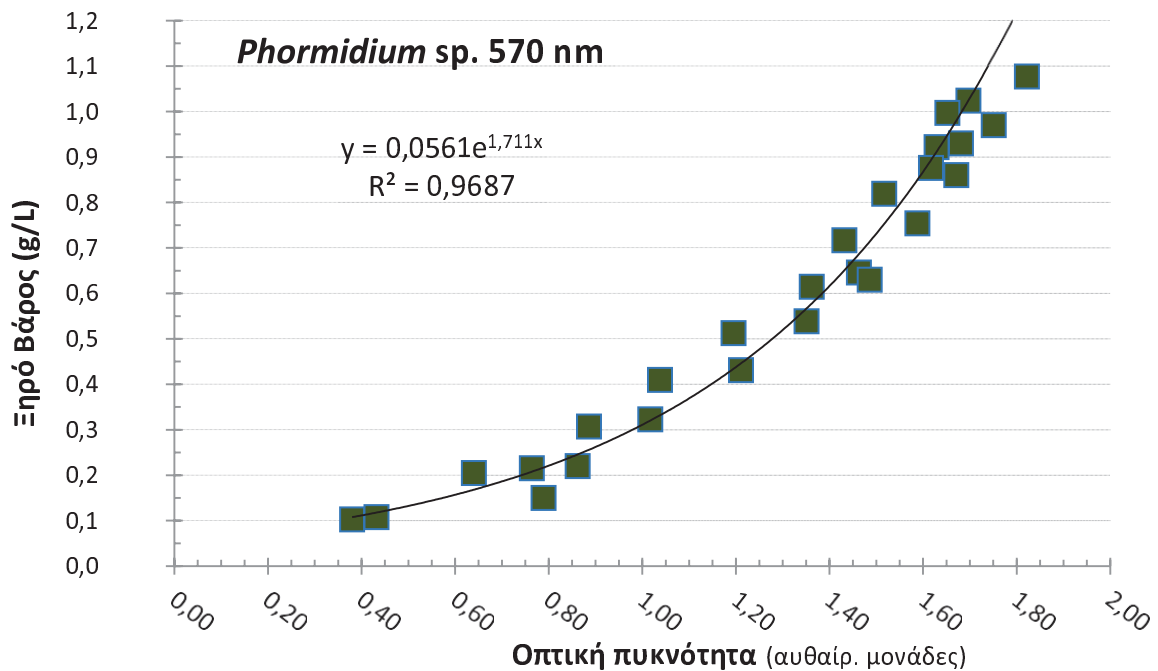
Σχήμα 16. Καμπύλη βαθμονόμησης Ξηρού βάρους g/L - οπτικής πυκνότητας στα 430 nm του νηματοειδούς κυανοβακτηρίου *Phormidium sp.*



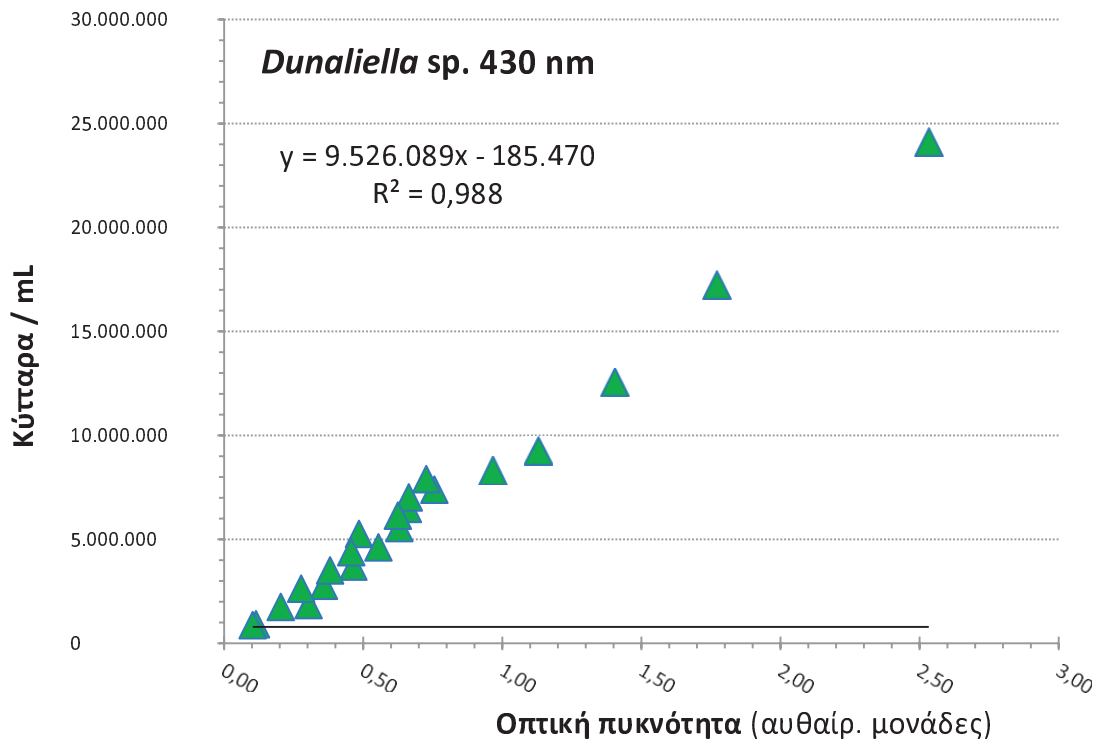
Σχήμα 17. Καμπύλη βαθμονόμησης Ξηρού βάρους g/L - οπτικής πυκνότητας στα 680 nm του νηματοειδούς κυανοβακτηρίου *Phormidium sp.*



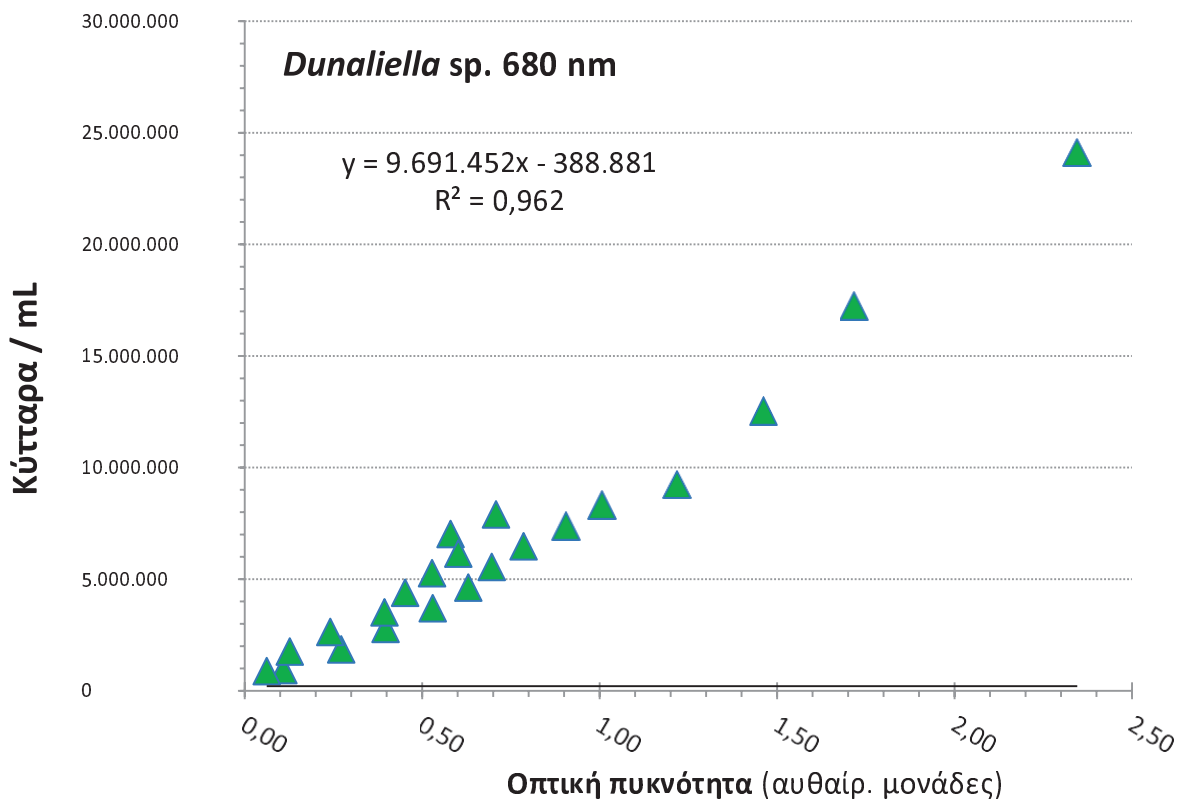
Σχήμα 18. Καμπύλη βαθμονόμησης Ξηρού βάρους g/L - οπτικής πυκνότητας στα 750 nm του νηματοειδούς κυανοβακτηρίου *Phormidium sp.*



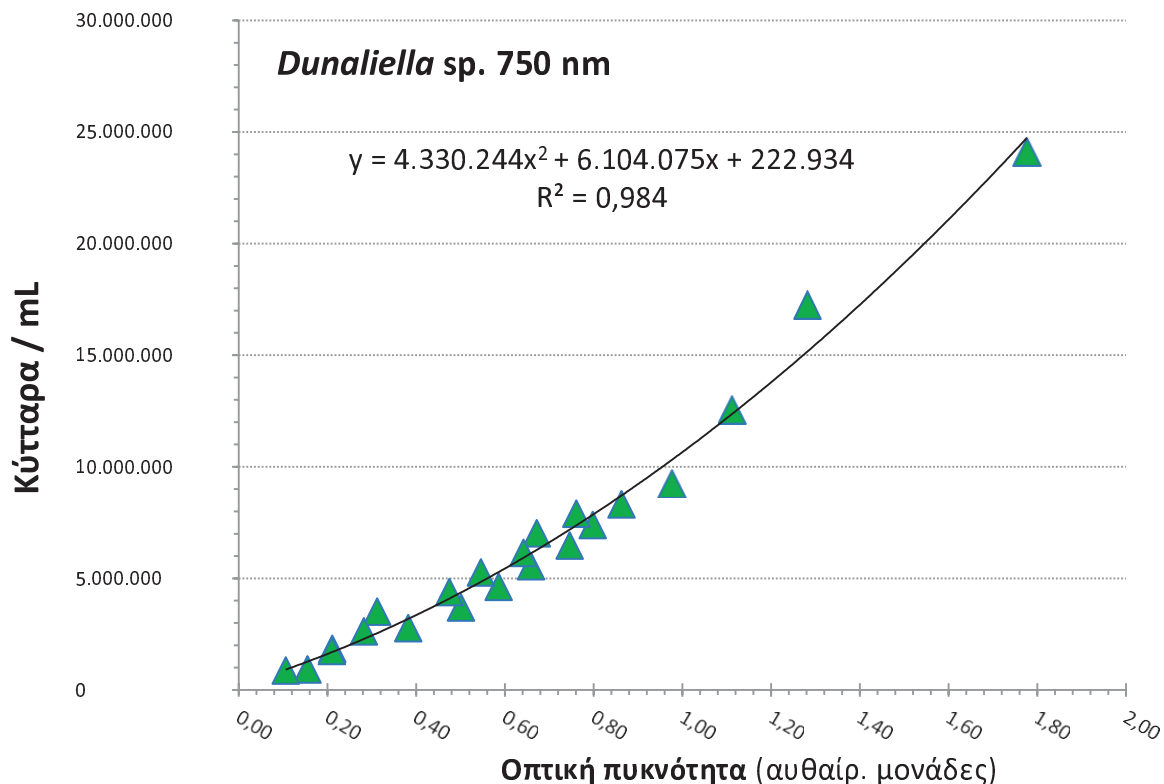
Σχήμα 19. Καμπύλη βαθμονόμησης Ξηρού βάρους g/L - οπτικής πυκνότητας στα 570 nm του νηματοειδούς κυανοβακτηρίου *Phormidium sp.*

Dunaliella sp.

Σχήμα 20. Καμπύλη βαθμονόμησης κυττάρων/mL - οπτικής πυκνότητας στα 430 nm του χλωροφύκου *Dunaliella sp.*



Σχήμα 21. Καμπύλη βαθμονόμησης κυττάρων/mL - οπτικής πυκνότητας στα 680 nm του χλωροφύκου *Dunaliella sp.*



Σχήμα 22. Καμπύλη βαθμονόμησης κυττάρων/mL - οπτικής πυκνότητας στα 750 nm του χλωροφύκου *Dunaliella* sp.

Στη *Dunaliella* η εξέταση στα 430 και 680 nm (Σχήματα 20 & 21 αντίστοιχα) απέδωσε πολύ ισχυρές σχέσεις που εκφράζονται από εξισώσεις απλής γραμμικής παλινδρόμησης με πολύ υψηλούς συντελεστές R^2 (0,9880 και 0,9620 αντίστοιχα) όμως στα 680 nm οι τιμές στις χαμηλότερες πυκνότητες κυττάρων παρουσίασαν μεγαλύτερη απόκλιση από την ευθεία συγκριτικά με τις μεγαλύτερες.

Στα 750 nm (Σχήμα 22) η κατάσταση ήταν εντελώς διαφορετική καθώς την καλύτερη προσαρμογή ($R^2 = 0,9840$) απέδωσε μια πολυωνυμική εξίσωση 2^{ου} βαθμού με ελάχιστη απόκλιση από τη γραμμή τάσης σε όλο το εύρος των πυκνοτήτων.

Οι εξισώσεις είναι οι παρακάτω:

Για τα 430 nm:

$$(\text{Πυκνότητα κυττάρων/mL}) = 9.526.089 \cdot \text{OD}_{430} - 185.470 \quad (R^2 = 0,9880)$$

Για τα 680 nm:

$$(\text{Πυκνότητα κυττάρων/mL}) = 9.691.452 \cdot \text{OD}_{680} - 388.881 \quad (R^2 = 0,9620)$$

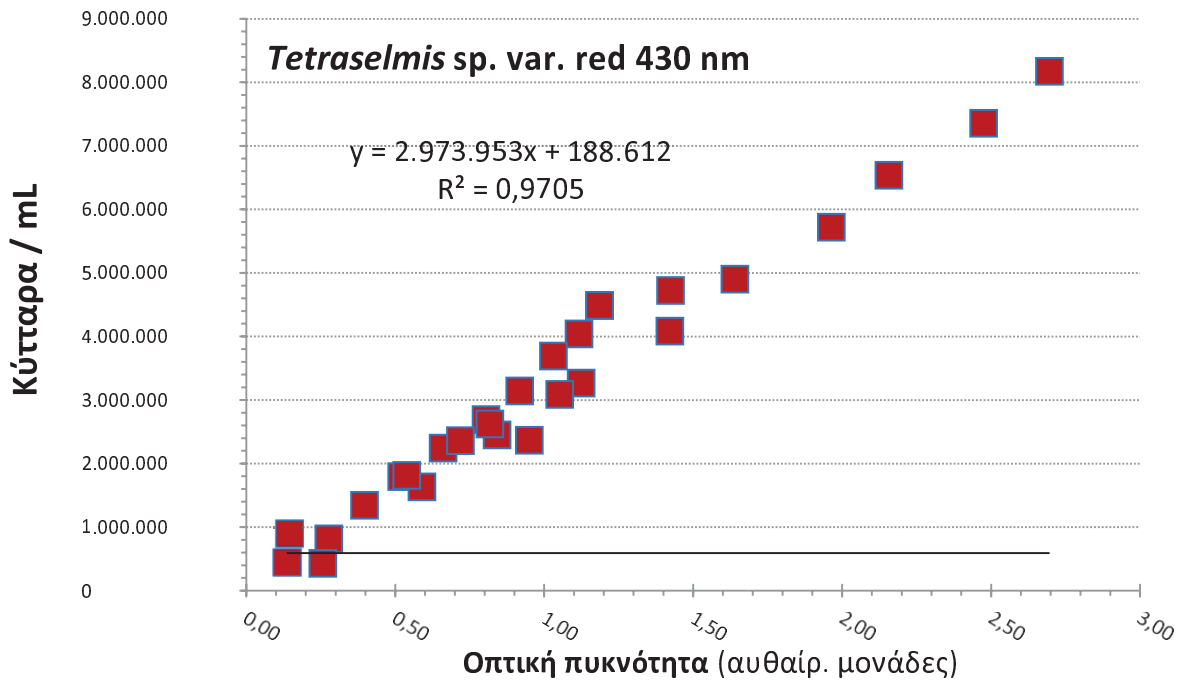
Για τα 750 nm:

$$(\text{Πυκνότητα κυττάρων/mL}) = 4.330.244 \cdot \text{OD}^2 + 6.104.075 \cdot \text{OD} + 222.934 \quad (R^2 = 0,9840)$$

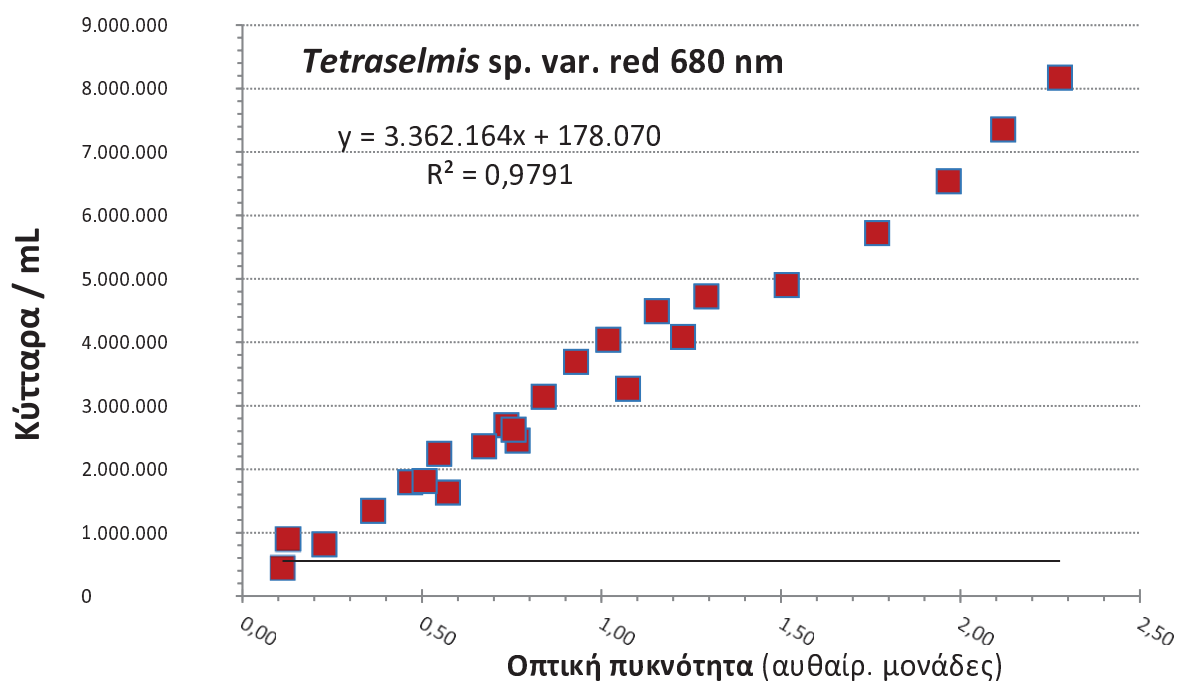
Βάσει των παραπάνω και λαμβάνοντας υπ' όψη το γεγονός ότι για όλο το εύρος των μετρήσεων που αντιστοιχούν σε μέγιστη επιτυγχανόμενη πυκνότητα κυττάρων στην περιοχή των 25.000.000 κυτ./ml για τη *Dunaliella* (από εμπειρία), στα 430 nm οι τιμές της οπτικής πυκνότητας και της συγκέντρωσης έχουν την καλύτερη γραμμική συσχέτιση και

επομένως αυτό το μήκος κύματος συνιστάται να χρησιμοποιείται στις καλλιέργειες του είδους αυτού.

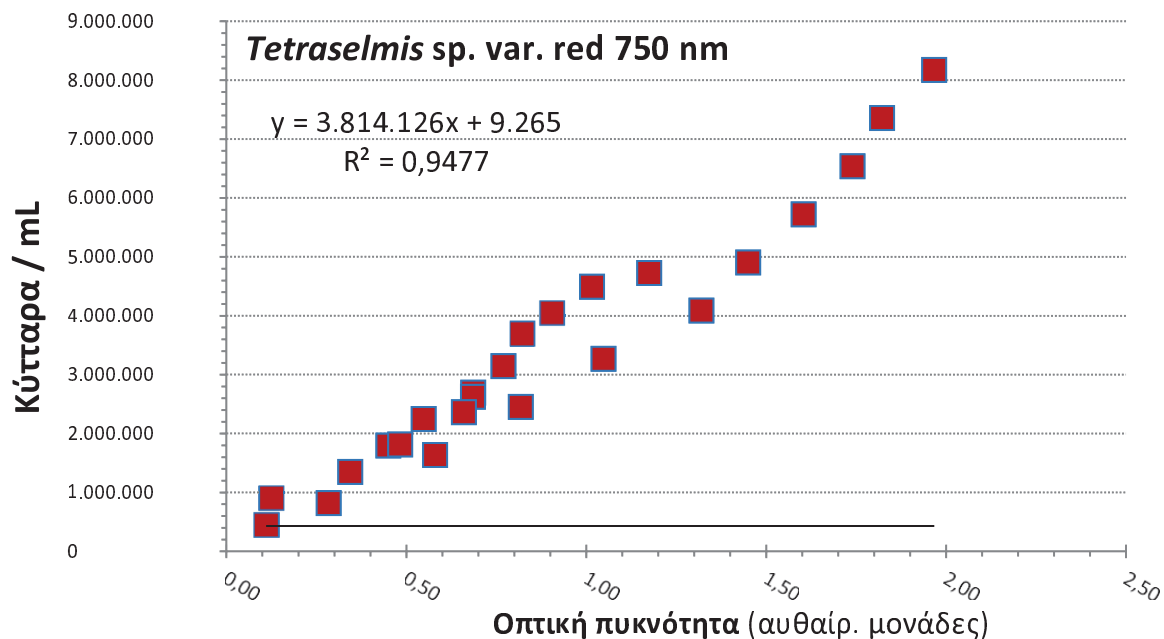
Tetraselmis sp. (var. red)



Σχήμα 23. Καμπύλη βαθμονόμησης κυττάρων/mL - οπτικής πυκνότητας στα 430 nm του χλωροφύκου *Tetraselmis sp. (var. red)*.



Σχήμα 24. Καμπύλη βαθμονόμησης κυττάρων/mL - οπτικής πυκνότητας στα 680 nm του χλωροφύκου *Tetraselmis sp. (var. red)*.



Σχήμα 25. Καμπύλη βαθμονόμησης κυττάρων/mL - οπτικής πυκνότητας στα 750 nm του χλωροφύκου *Tetraselmis sp.* (var. red).

Για το *Tetraselmis sp.* (var. red) (Σχήματα 23, 24 & 25) τα γραφήματα έδωσαν την καλύτερη προσαρμογή υπό τη μορφή απλών εξισώσεων γραμμικής παλινδρόμησης. Οι συντελεστές συσχέτισης (R^2) ήταν και εδώ πολύ υψηλοί με τα 430 και 680 nm να παρουσιάζουν τιμή 0,97 και τα 750 nm λίγο χαμηλότερη αλλά εξίσου πολύ ισχυρή 0,94.

Οι εξισώσεις είναι οι παρακάτω:

Για τα 430 nm (Σχήμα 23):

$$(\text{Πυκνότητα κυττάρων/mL}) = 2.973.953 \cdot \text{OD}_{430} + 188.612 \quad (R^2 = 0,9705)$$

Για τα 680 nm (Σχήμα 24):

$$(\text{Πυκνότητα κυττάρων/mL}) = 3.362.164 \cdot \text{OD}_{680} + 178.070 \quad (R^2 = 0,9761)$$

Για τα 750 nm (Σχήμα 25):

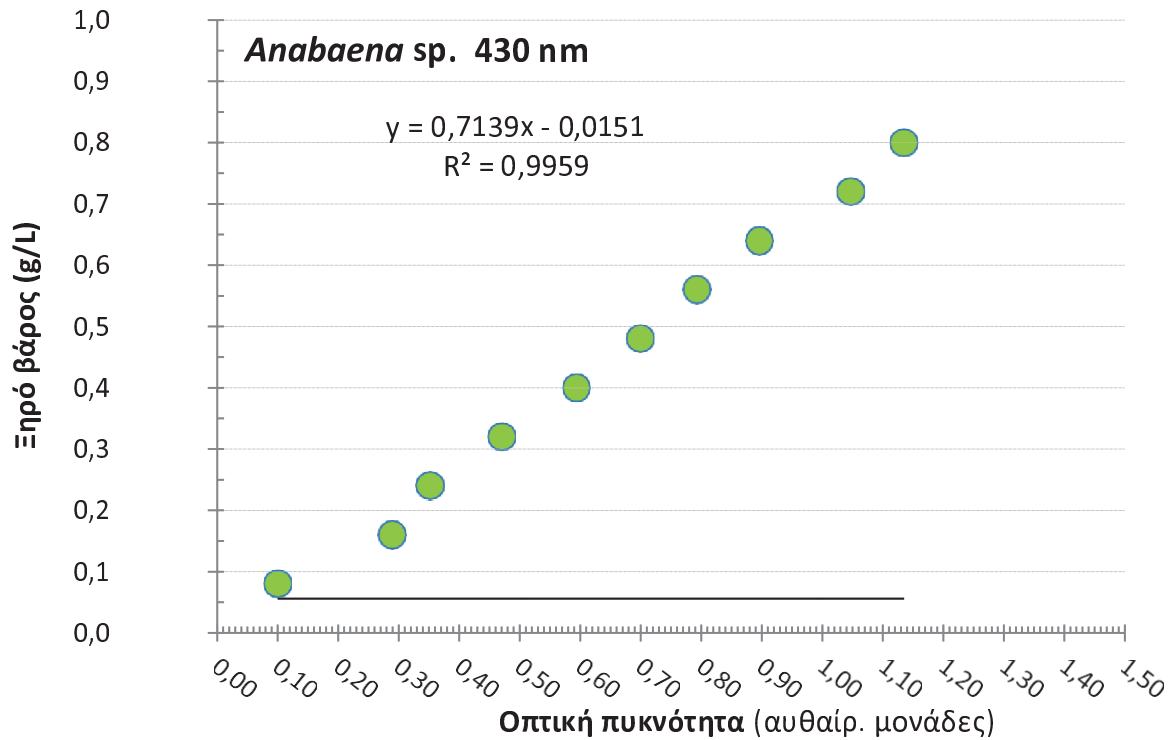
$$(\text{Πυκνότητα κυττάρων/mL}) = 3.814.126 \cdot \text{OD}_{750} + 9265 \quad (R^2 = 0,9477)$$

Όπως έχει ήδη αναφερθεί το συγκεκριμένο είδος *Tetraselmis sp.* (var. red) παρουσιάζει την εξαιρετική ιδιομορφία να εκκρίνει στο νερό απροσδιόριστες κυτταρικές ουσίες οι οποίες προσδίδουν σε αυτό σκούρο κοκκινωπό χρώμα. Εικάζεται ότι αυτό είναι και η αιτία για την εμφανή απόκλιση από την ευθεία της παλινδρόμησης αρκετών μετρήσεων της οπτικής απορρόφησης ιδιαίτερα στα 750 nm. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να επιφέρει ανακρίβεια στις μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας και για το λόγο αυτό ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στη δημιουργία του "τυφλού" διαλύματος πριν από την κάθε φασματοφωτομέτρηση. Το τυφλό αποτελείται από το υπερκείμενο χρωματισμένο κοκκινωπό διάλυμα στο σωλήνα φυγοκέντρησης όπου τοποθετήθηκε το δείγμα της καλλιέργειας και φυγοκεντρήθηκε για 5 min στις 5000 rpm.

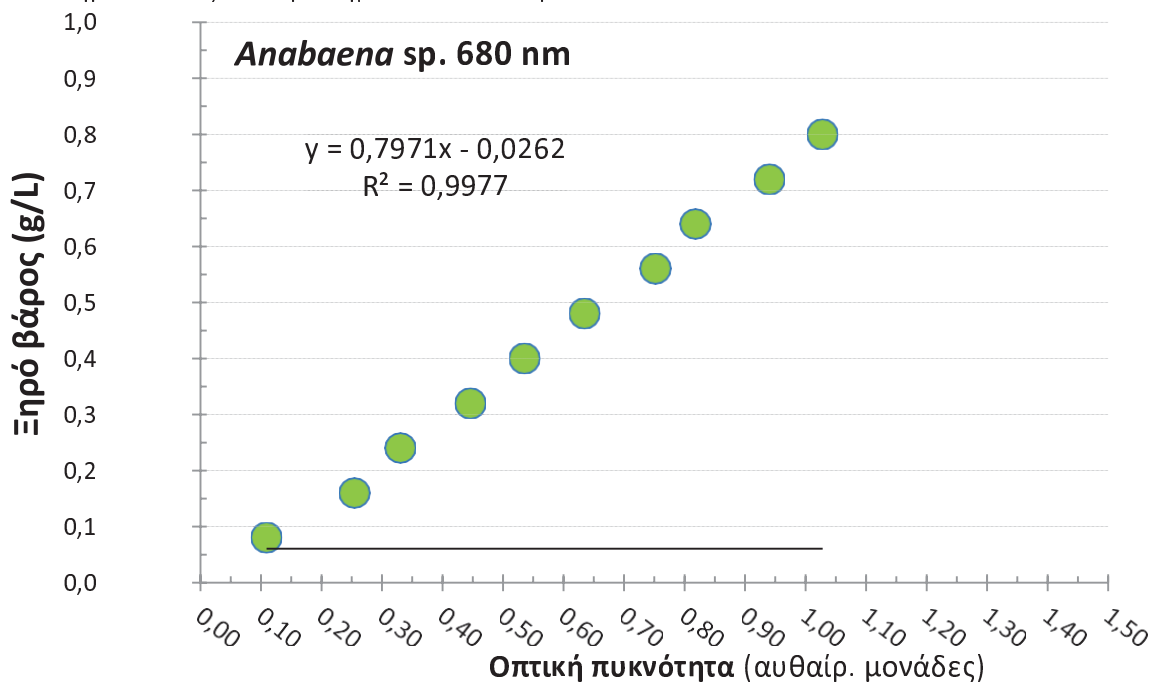
Anabaena sp.

Για το κυανοβακτηριακό και νηματοειδές μικροφύκος *Anabaena sp.* όπως και για το *Phormidium* αντί για πυκνότητα κυττάρων/mL χρησιμοποιήθηκαν μετρήσεις του ξηρού βάρους (σε g/L) έναντι των τιμών της οπτικής απορρόφησης. Σε όλα τα μήκη κύματος οι

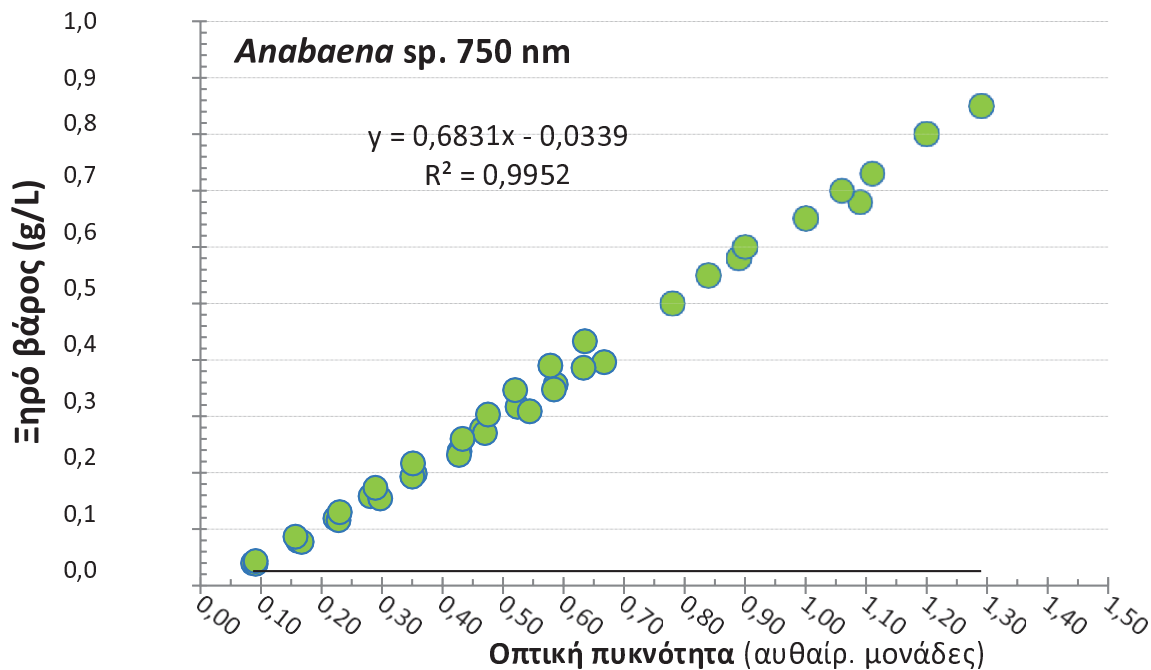
σχέσεις απέδωσαν εξισώσεις απλής γραμμικής παλινδρόμησης με σχεδόν τέλεια εφαρμογή των σημείων στη γραμμή τάσης και φυσικά τιμές R^2 σχεδόν μονάδα (1).



Σχήμα 26. Καμπύλη βαθμονόμησης Ξηρού βάρους g/L - οπτικής πυκνότητας στα 430 nm του νηματοειδούς κυανοβακτηρίου *Anabaena* sp.



Σχήμα 27. Καμπύλη βαθμονόμησης Ξηρού βάρους g/L - οπτικής πυκνότητας στα 680 nm του νηματοειδούς κυανοβακτηρίου *Anabaena* sp



Σχήμα 28. Καμπύλη βαθμονόμησης Ξηρού βάρους g/L - οπτικής πυκνότητας στα 750 nm του νηματοειδούς κυανοβακτηρίου *Anabaena sp*

Οι εξισώσεις είναι οι παρακάτω:

Για τα 430 nm (Σχήμα 26):

$$(\text{Ξηρό βάρος g/L}) = 0,7139 \cdot \text{OD}_{430} - 0,0151 \quad (R^2 = 0,9959)$$

Για τα 680 nm (Σχήμα 27):

$$(\text{Ξηρό βάρος g/L}) = 0,7971 \cdot \text{OD}_{680} - 0,0262 \quad (R^2 = 0,9977)$$

Για τα 750 nm (Σχήμα 28):

$$(\text{Ξηρό βάρος g/L}) = 0,6831 \cdot \text{OD}_{750} - 0,0339 \quad (R^2 = 0,9952)$$

Πολύ λίγες μελέτες παρακολούθησαν την ανάπτυξη καλλιέργειας φυκών χρησιμοποιώντας φασματοφωτομετρία (Santos-Ballardo et al., 2015; Gomez et al., 2016; Dziosa and Makowska, 2016) και σε όλες αυτές με τα χρησιμοποιηθέντα μήκη κύματος, τα 680 nm ήταν βασική τιμή για τις μετρήσεις. Προφανώς, τα 680 nm είναι μια συμβιβαστική τιμή των ελαφρών παραλλαγών των κορυφών απορρόφησης στην περιοχή των 675-686 που παρουσιάζουν τα διάφορα φύκη λόγω των μέγιστων απορροφητικότητας της χλωροφύλλης-α τους σε αυτή την περιοχή.

Σε όλες τις μελέτες, τα 680 nm απέδειξαν ένα καλό προγνωστικό μήκος κύματος για την παρακολούθηση της βιομάζας. Αυτή ήταν και η περίπτωση της παρούσας μελέτης, καθώς και για τα 6 φύκη που μελετήθηκαν η προγνωστική του χρήση είναι ισχυρή. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς τα 6 φύκη ανήκουν σε διαφορετικές ταξινομίες (χλωρόφυτα, δινόφυτα, κυανοβακτήρια) και πιθανώς είναι ένδειξη ότι τα 680 nm μπορούν να είναι ένα καθολικό εργαλείο για χρήση σε οποιαδήποτε ταξινομική ομάδα καλλιέργειας μικροφυκών. Παραδόξως, η άλλη κορυφή της χλωροφύλλης-α στα 430 nm δεν έχει χρησιμοποιηθεί σε σχετικές μελέτες. Στην παρούσα μελέτη τα 430 nm αποδείχθηκαν εξίσου αποτελεσματικά με τα 680 nm στην κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης και στα 6 φύκη. Έτσι, στη λογική της επιλογής των μηκών κύματος με βάση τα φάσματα απορρόφησης και ιδίως

εκείνων των κορυφών της χλωροφύλλης-α, ανεξάρτητα από τις μικρές διαφορές της μέγιστης απορρόφησης μεταξύ των ειδών στις περιοχές ~ 430 και ~ 680 nm, επιλέγοντας οποιοδήποτε από αυτά (430 ή 680) θα είναι σωστή.

Από την άλλη πλευρά, αυτή της επιλογής μηκών κύματος που δεν αντιστοιχούν σε καμία κορυφή απορρόφησης σε ένα φάσμα, τα ευρήματα του παρόντος πειράματος δείχνουν προς τη χρησιμότητα εξίσου με την των 430 και 680 nm των μηκών κύματος του 750 nm (για όλα τα είδη) και του 570 nm για το *Phormidium*. Φαίνεται ότι δεν υπάρχει ανάγκη να χρησιμοποιηθούν αποκλειστικά μήκη κύματος που αντιστοιχούν σε μια κορυφή φάσματος, προκειμένου να ληφθεί μια καμπύλη βαθμονόμησης της σχέσης πυκνότητας κυττάρων - O.D. Πρακτικά οποιοδήποτε μήκος κύματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί καθώς το φασματοφωτόμετρο ανιχνεύει τα επίπεδα απορρόφησης που προκαλούνται από τα αιωρούμενα κύτταρα στο φιαλίδιο. Στην παρούσα μελέτη όπου για πρώτη φορά παρουσιάζουμε κατασκευασμένες εξισώσεις που σχετίζονται με O.D. - πυκνότητας κυττάρων για τα συγκεκριμένα είδη μικροφυκών που εξετάστηκαν, οι μελλοντικοί καλλιεργητές μπορούν να βασίζονται στις εξισώσεις που παρουσιάζονται εδώ και να τις χρησιμοποιούν για να παρακολουθούν τις καλλιέργειες τους υπό την προϋπόθεση ότι χρησιμοποιούν ακριβώς το μήκος κύματος που επιλέγουν και τη σχετική εξίσωση. Ωστόσο, για να αυξήσουμε την ακρίβεια και τη χρησιμότητα των εξισώσεων πρόβλεψης που παρουσιάζονται εδώ και ως τελική επιλογή του καλύτερου μήκους κύματος για κάθε είδος, ελέγξαμε την εκατοστιαία απόκλιση κάθε μήκους κύματος σε ορισμένα από αυτά και επιλέξαμε αυτά με το λιγότερο τυπικό σφάλμα και τυπική απόκλιση (Πίνακας 1). Με βάση τα συνοπτικά στατιστικά στοιχεία των εκατοστημορίων (Πίνακας 1) υποδεικνύουμε 680 nm για τα *Nephroselmis* και *Amphidinium* και 570 nm για το *Phormidium* ως τα πιο αξιόπιστα μήκη κύματος για την εκτίμηση της πυκνότητας των κυττάρων τους.

Πίνακας 1. Σύνοψη στατιστικών στοιχείων της εκατοστιαίας απόκλισης των μετρήσεων της οπτικής πυκνότητας (O.D.) των εξετασθέντων μηκών κύματος για 3 είδη των χρησιμοποιηθέντων μικροφυκών.

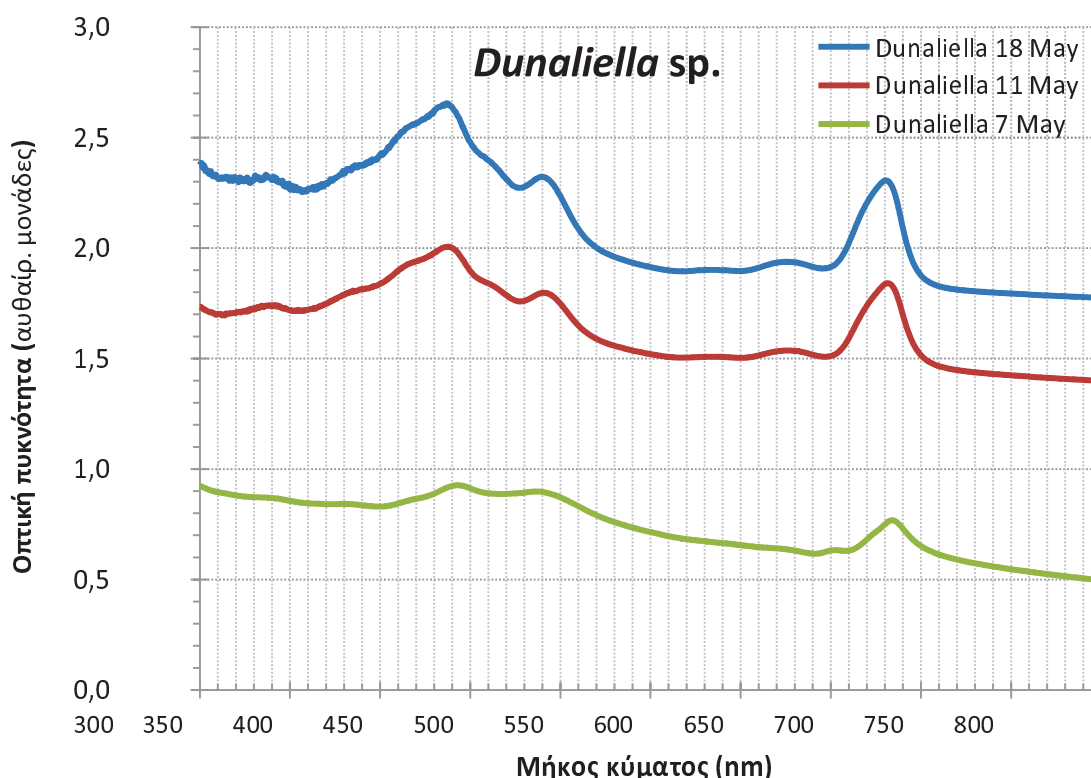
	<i>Nephroselmis</i>			<i>Amphidinium</i>			<i>Phormidium</i>			
	430 nm	680 nm	750 nm	430 nm	680 nm	750 nm	430 nm	680 nm	750 nm	570 nm
N	28	10	20	16	16	10	14	14	29	29
Min	-7,82	-4,99	-16,98	-6,175	-17,75	-12,02	-36,59	-33,33	-39,45	-33,45
Max	15,049	15,439	14,674	15,681	6,639	11,02	19,779	17,324	23,232	22,652
Sum	107,544	5,858	71,413	41,026	-60,38	72,706	-18,46	-16,26	-37,55	-31,56
Mean	3,84085	0,5858	3,57065	2,5641	-3,77	7,2706	-1,318	-1,161	-1,29	-1,088
Std. error	1,10256	1,7969	1,80172	1,598	1,504	2,202	3,1287	2,9123	1,978	1,8134
Variance	34,0383	32,292	64,9243	40,90	36,19	48,50	137,0	118,7	113,5	95,37
Stand.	5,83423	5,6826	8,05756	6,395	6,016	6,964	11,70	10,89	10,65	9,765
25	-1,239	-2,564	-0,682	-2,193	-6,26	6,862	-1,454	-2,189	-4,61	-4,69
75	7,51525	1,4962	9,46075	8,579	-0,19	10,85	1,985	1,507	4,001	3,37
Skewness	-0,3203	2,2584	-0,9951	0,765	-0,83	-2,864	-1,916	-1,803	-1,54	-1,044
Kurtosis	-0,3382	6,1508	0,9221	-0,459	1,094	8,577	7,551	6,572	6,116	4,466
Coeff. variation	151,899	970,05	225,66	249,4	-159,	95,79	-887,7	-937,8	-822,8	-897,1

Φάσματα απορρόφησης διαφορετικών πυκνοτήτων μικροφυκτικού είδους

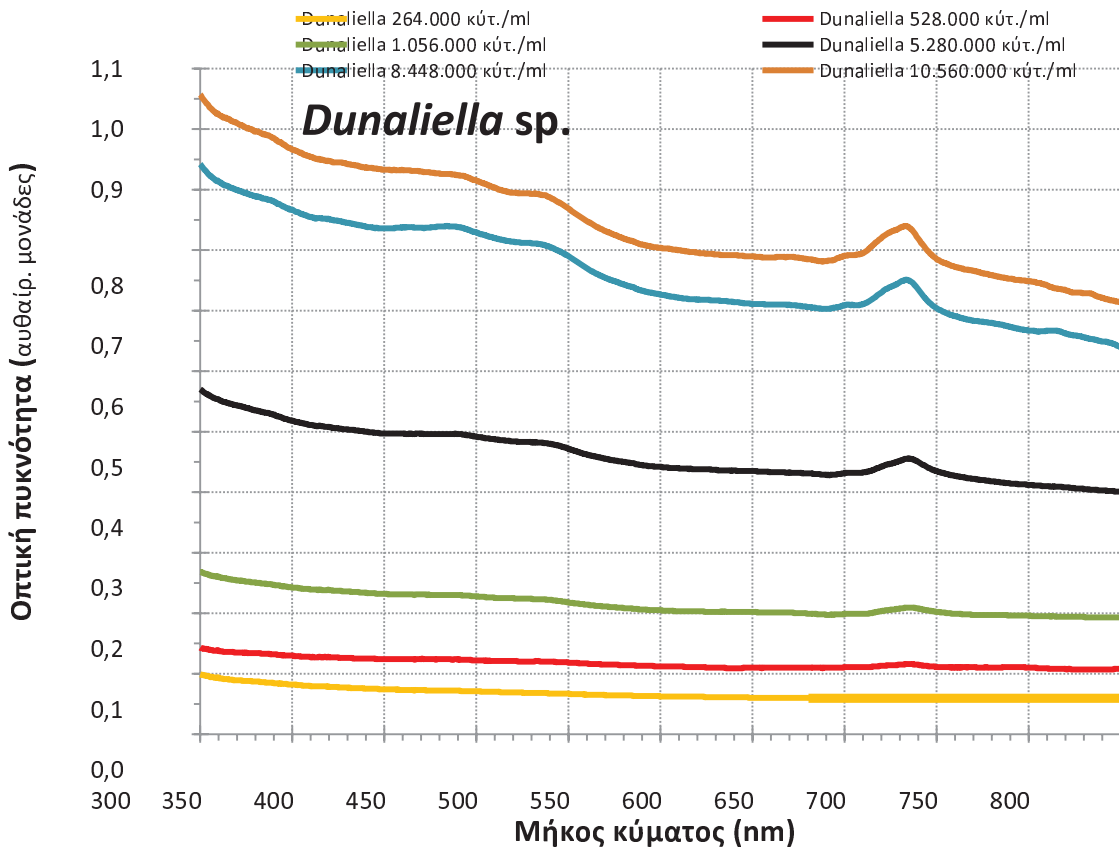
Στην ενότητα αυτή επιχειρήσαμε να διερευνήσουμε το βαθμό κατά τον οποίο η πυκνότητα της καλλιέργειας επηρεάζει τα χαρακτηριστικά του φάσματος απορρόφησης ενός συγκεκριμένου φυτοπλακτονικού μικροφύκου, δηλαδή κατά πόσο αλλάζει το γενικό πρότυπο του φάσματος, το πλήθος των κορυφών του (peaks), η θέση τους και το ύψος τους. ββΓια τον πειραματισμό αυτό επιλέξαμε τα είδη *Dunaliella*, *Amphidinium*, *Tetraselmis*, *Phormidium* και *Nephroselmis*. Για αυτά τα είδη παρακολουθήσαμε την εξέλιξη της καλλιέργειάς τους και ανά τακτά χρονικά διαστήματα καθώς η καλλιέργεια πύκνωνε λαμβάναμε δείγμα τους και καταγράφαμε το φάσμα απορρόφησης τους στο εύρος 300-800 nm (Σχήματα 29, 31, 32 & 33) .

Για τη *Dunaliella* και τη *Nephroselmis* ιδιαίτερα μετρήσαμε και την πυκνότητα των κυττάρων σε καθορισμένα βήματα-αραιώσεις για να επαυξήσουμε την ακρίβεια των παρατηρήσεων (Σχήματα 30 & 34).

Μελετώντας τα προκύπτοντα φάσματα μπορούμε να διαπιστώσουμε εμμέσως κατά πόσον είναι χρηστικές ως προς το βαθμό αξιοπιστίας τους και οι εξισώσεις βαθμονόμησης που επιχειρήσαμε στην προηγούμενη ενότητα, δεδομένου ότι αν αλλάζει δραματικά το φάσμα απορρόφησης ενός είδους κατά την αύξηση της καλλιέργειάς του τότε μικραίνει και ο βαθμός ακρίβειας των μετρήσεων της οπτικής πυκνότητας χρησιμοποιώντας ένα ορισμένο μήκος κύματος κατά τη βαθμονόμηση. Αυτό έγκειται στη λογική ότι τόσο στο φάσμα απορρόφησης όσο και στις μετρήσεις της βαθμονόμησης ο άξονας των Y είναι των ιδίων μονάδων οπτικής πυκνότητας (αυθαίρετες μονάδες).



Σχήμα 29. Φάσματα απορρόφησης σε παράθεση του χλωροφύκου *Dunaliella sp.* σε 3 διαδοχικές στιγμές της χρονικής περιόδου καλλιέργειάς του.



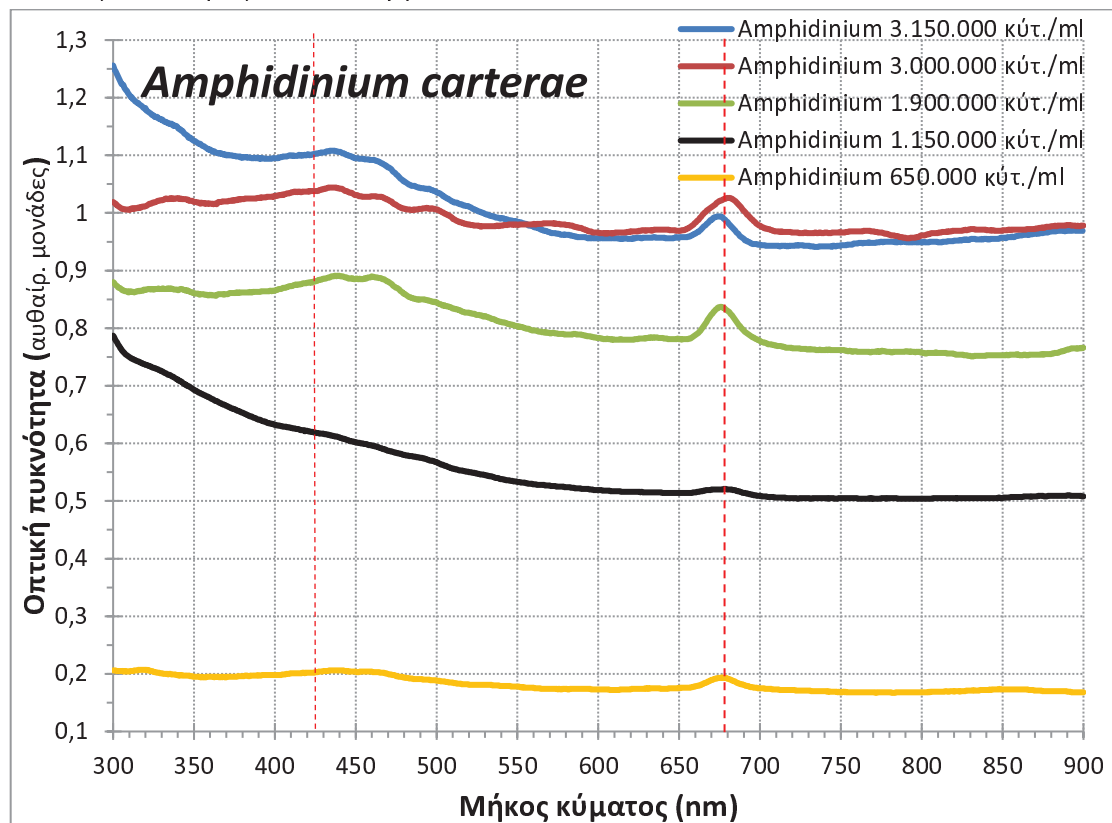
Σχήμα 30. Φάσματα απορρόφησης σε παράθεση του χλωροφύκου *Dunaliella* sp. σε 6 διαφορετικές πυκνότητες (κ.τ./mL) της καλλιέργειάς του.

Από την εξέταση του Σχήματος 29 για τη *Dunaliella* σε καλλιέργειά της με λιπασμένο αποστειρωμένο θαλασσινό νερό αλατότητας 40 ppt (δοχείο Erlenmeyer 2L, ένταση φωτός 5000 lux, θερμοκρασία 23 °C) για μια περίοδο 11 ημερών (7 Μαΐου - 18 Μαΐου) τα φάσματα απορρόφησης παρουσιάζουν σχεδόν απόλυτη ταύτιση τόσο ως προς το γενικό πρότυπο, όσο και ως προς τη θέση και το ύψος των κορυφών τους.

Στο Σχήμα 30 όπου τα φάσματα αντιπροσωπεύουν γνωστές μετρηθείσες και διαμορφωθείσες μέσω κατάλληλων αραιώσεων πυκνότητες κυττάρων, παρατηρούμε τρεις διακριτές περιοχές προτύπων φάσματος. Το πρώτο πρότυπο αντιπροσωπεύει τις χαμηλές πυκνότητες κυττάρων (~264.000 - 1.050.000 κ.τ./mL) όπου το φάσμα παρουσιάζει μια λίγο - πολύ ακυμάτιστη γραμμή και οι κορυφώσεις του μόλις διακρίνονται. Το δεύτερο πρότυπο αντιπροσωπεύει μια αρκετά υψηλότερη πυκνότητα καλλιέργειας της τάξεως των ~5.300.000 κ.τ./ml όπου οι κορυφές (~ 430 & 680 nm) αρχίζουν να ξεχωρίζουν. Στο τρίτο πρότυπο με πυκνότητες κυττάρων στην περιοχή των 8.000.000 - 10.500.000 κ.τ./mL το φάσμα απορρόφησης αποκτά τη χαρακτηριστική του κυματοειδή μορφή με εμφανείς τις κορυφές του στα 440 και 680 nm σε ίδια θέση δηλαδή και με τα φάσματα του Σχήματος 65 όπου οι καλλιέργειες ήταν πολύ πυκνότερες.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η *Dunaliella* αποτελεί ένα είδος το οποίο μπορεί να δώσει αξιόπιστες στο μέγιστο βαθμό εξισώσεις βαθμονόμησης πυκνότητας καλλιέργειας-οπτικής πυκνότητας καθώς οι απορροφήσεις του στις μετρήσεις ακολουθούν μια αναλογικότητα παρόμοια με αυτή των απορροφήσεων του φάσματος απορρόφησης σε

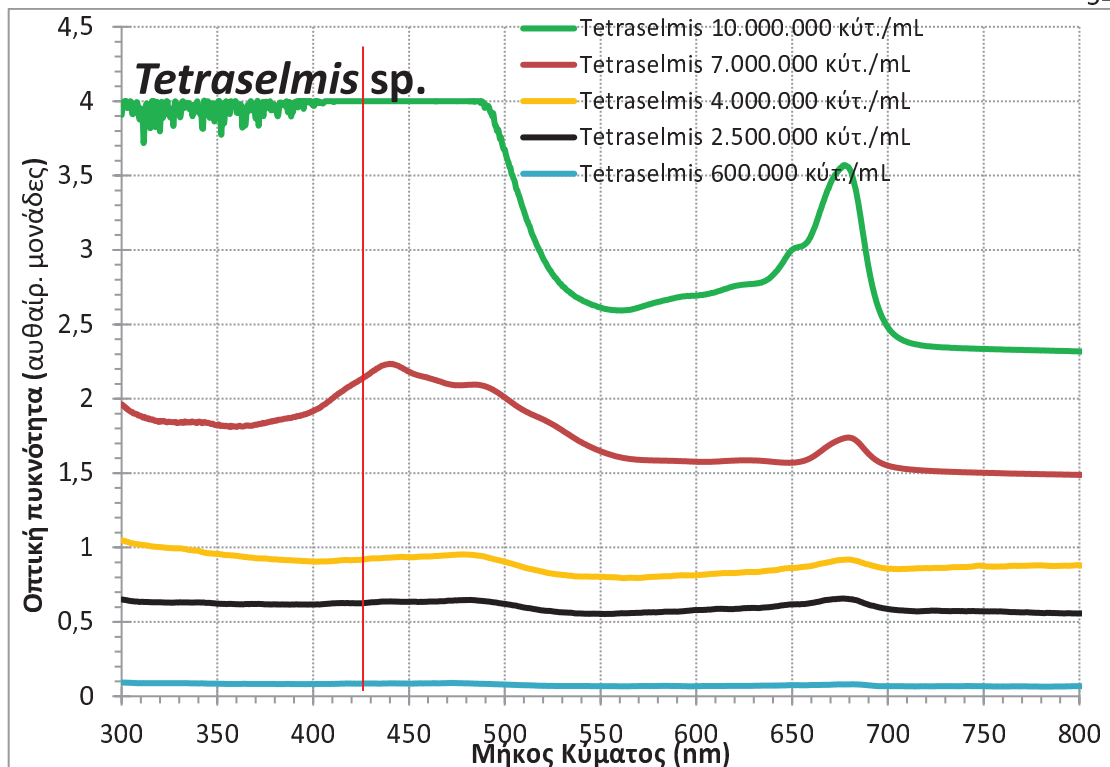
όλη την κλίμακα των μηκών κύματος (των 750 nm συμπεριλαμβανομένου) και σε όλες τις πιθανές πυκνότητες των καλλιιεργειών του.



Σχήμα 31. Φάσματα απορρόφησης σε παράθεση του δινομαστιγώτου *Amphidinium carterae* σε 5 διαδοχικές στιγμές της χρονικής περιόδου καλλιέργειάς του.

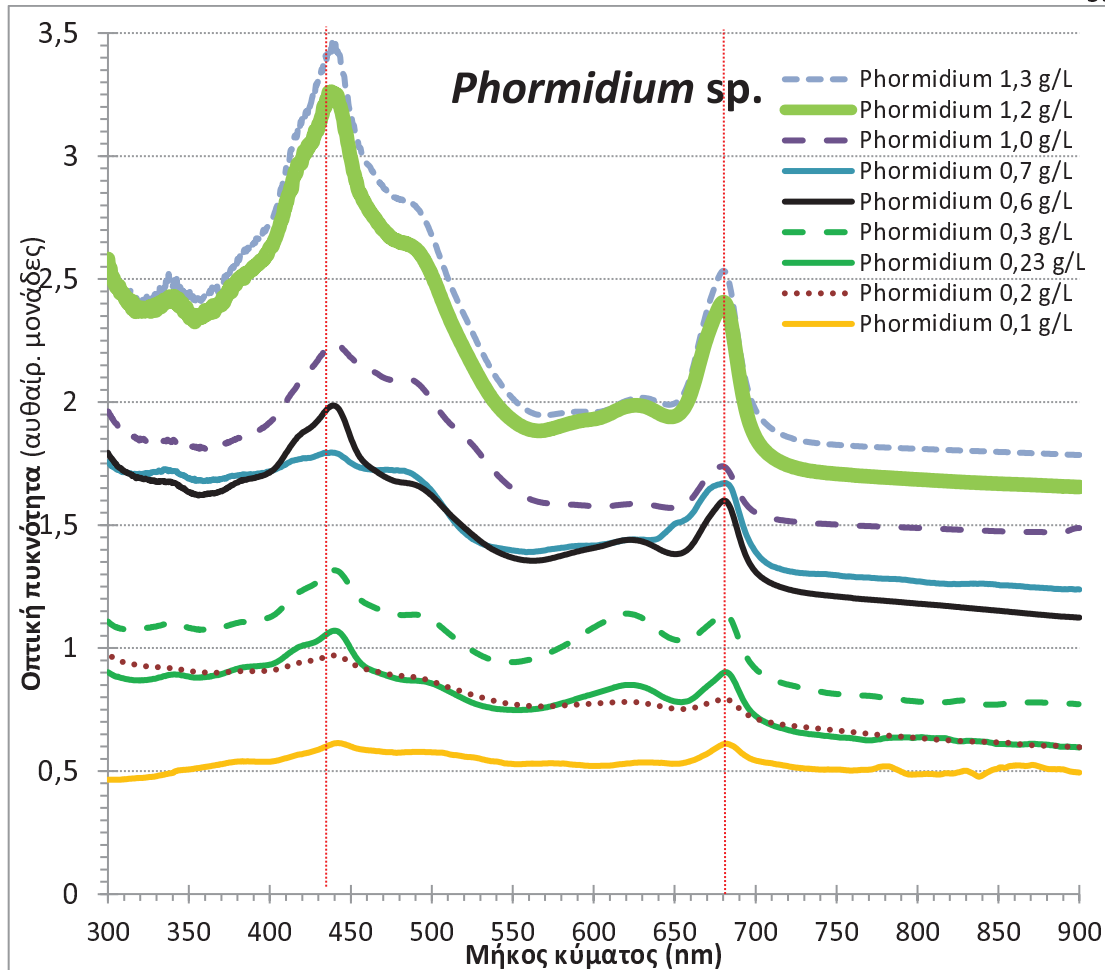
Στην περίπτωση του *Amphidinium* (Σχήμα 31) του οποίου η καλλιέργεια διατηρήθηκε για 15 ημέρες (και για διάφορες πυκνότητες από 650.000 έως 3.200.000 κύτ./mL) με λιπασμένο αποστειρωμένο θαλασσινό νερό αλατότητας 30 ppt (δοχείο Erlenmeyer 2L, ένταση φωτός 5000 lux, θερμοκρασία 23 °C) η εικόνα που παρουσίασε το φάσμα του στις διάφορες πυκνότητες της καλλιέργειας ήταν πολύ διαφορετική από την αντίστοιχη της *Dunaliella*. Εδώ τα φάσματα των διαφορετικών πυκνοτήτων διέφεραν αισθητά μεταξύ τους κυρίως ως προς την ασύμμετρη κυματοειδή μορφή τους αλλά και ως προς τη θέση και το ύψος των κορυφών στα 430 και 680 nm. Αυτή η κατάσταση εμμέσως αποτυπώνεται και στις καμπύλες βαθμονόμησης για το είδος αυτό σε αυτά τα μήκη κύματος με τη χαρακτηριστική απόκλιση πολλών σημείων από τη γραμμική τάση.

Θεωρώντας ότι η καμπύλη του φάσματος που αντιστοιχεί 3.200.000 κύτ./mL στο Σχήμα 67 αντιπροσωπεύει μια καλλιέργεια που ήδη από 2 ημέρες ενωρίτερα ήταν σε φάση στασιμότητας (όχι περαιτέρω αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων) δικαιολογεί την σχεδόν ταυτότητα των καλλιιεργειών ως προς τα φάσματά τους μια και οι όποιες μικροδιαφορές τους οφείλονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εξωκυτταρικών μεταβολιτών στο δοχείο καλλιέργειας. Όμως αυτό δεν αναιρεί τη μεγάλη ανομοιομορφία των προτύπων των φασμάτων για τις αραιότερες καλλιιεργειες (π.χ. 1.150.000 κύτ./mL) συγκριτικά με πυκνότερες (μεταγενέστερες, π.χ. 1.950.000 κύτ./mL) ή τις πολύ πυκνότερες (3-3,2 x 10⁶ κύτ./mL). Όμως εξετάζοντας τα φάσματα ως προς το μήκος κύματος των 750 nm διαπιστώνουμε μια σταθερότητα στις αναλογίες της οπτικής πυκνότητας από τις αραιότερες στις πυκνότερες καλλιιεργειες. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τη βαθμονόμηση που έγινε σε αυτό το μήκος κύματος (Σχήμα 14) όπου παρουσιάστηκε το υψηλότερο R² και η μικρότερη απόκλιση των σημείων από τη γραμμική τάση. Συμπερασματικά για το *Amphidinium* προτείνουμε το μήκος κύματος των 750 nm ως το πλέον αξιόπιστο για βαθμονομήσεις.



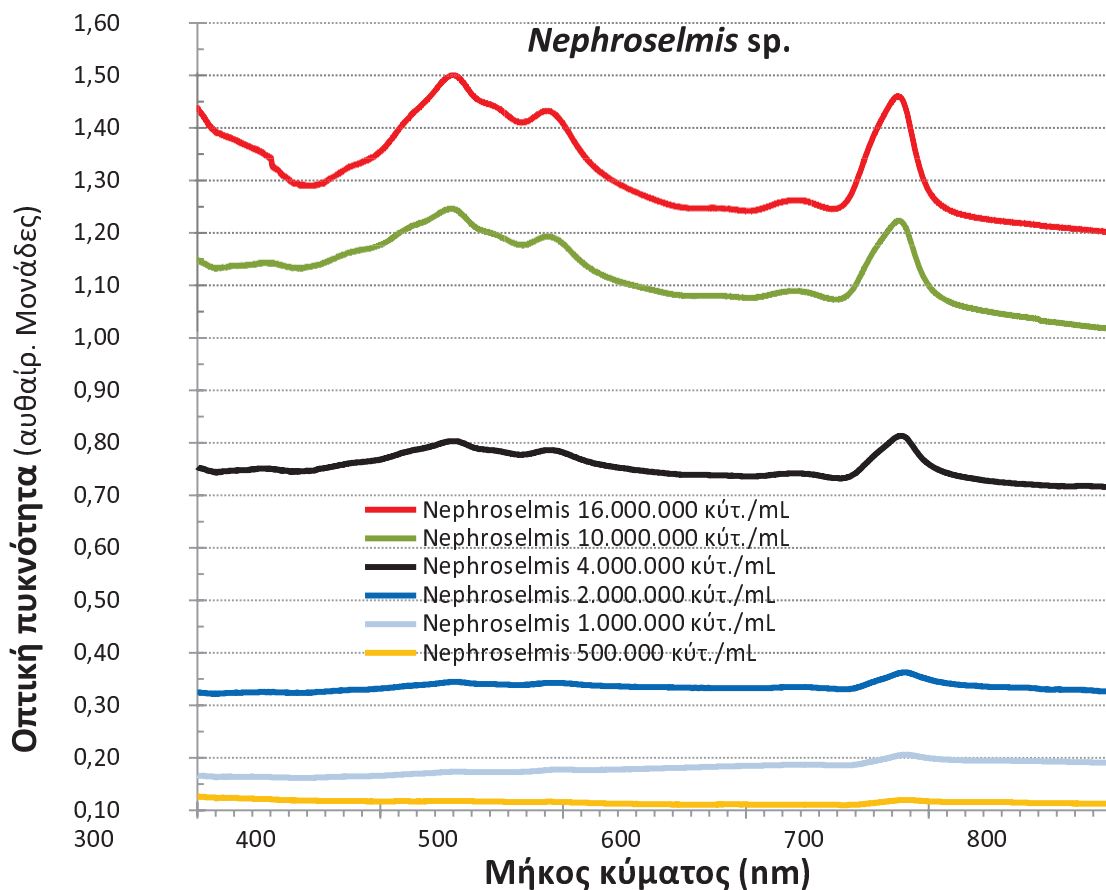
Σχήμα 32. Φάσματα απορρόφησης σε παράθεση του χλωροφύκου Tetraselmis sp. (var. red) σε 5 διαδοχικές στιγμές της χρονικής περιόδου καλλιέργειάς του.

Σε παρόμοιες συνθήκες με τα προηγούμενα είδη (αλατότητα 40 ppt, δοχείο Erlenmeyer 2L, ένταση φωτός 5000 lux, θερμοκρασία 23 °C) και για το ίδιο διάστημα καλλιεργήθηκε και το Tetraselmis sp. (var. red) και επιπλέον από την πολύ ώριμη καλλιέργειά του μετρήθηκε επακριβώς η πυκνότητά του σε κύτταρα/mL πριν παρθεί το φάσμα απορρόφησης. Έχουν ήδη αναφερθεί τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά αυτού του μικροφύκου με την υπερβολική παραγωγή και συσσώρευση στο νερό εξωκυτταρικών ουσιών κοκκινωπού χρώματος οι οποίες ως είναι φυσικό επηρεάζουν το φάσμα απορρόφησης του. Αυτό γίνεται πολύ εμφανές στο Σχήμα 68 όπου για τις διάφορες πυκνότητες των καλλιεργειών τόσο το κυματοειδές πρότυπο των φασμάτων όσο και το ύψος των κορυφών παρουσιάζουν έντονες διαφοροποιήσεις χωρίς να ακολουθούν μια κανονικότητα ως προς την κλιμάκωση των πυκνοτήτων των καλλιεργειών. Μόνο η περιοχή των 750 nm φαίνεται να κλιμακώνεται ομαλά και συνεπώς αυτό το μήκος κύματος συνιστούμε για χρήση στις βαθμονομήσεις.



Σχήμα 33. Φάσματα απορρόφησης σε παράθεση του κυανοβακτηρίου *Phormidium sp.* σε 9 διαδοχικές στιγμές της χρονικής περιόδου καλλιέργειάς του.

Για την καλλιέργεια του κυανοβακτηρίου *Phormidium* που διατηρήθηκε σε παρόμοιες συνθήκες με τα προηγούμενα (αλατότητα 40 ppt, δοχείο Erlenmeyer 2L, ένταση φωτός 5000 lux, θερμοκρασία 23 °C) και για το ίδιο διάστημα η εικόνα (Σχήμα 69) των φασμάτων απορρόφησης στις διάφορες πυκνότητες και καταστάσεις (πράσινη-0,1-0,6 g/L ή "λαδί"-0,7-1,3 g/L φάση κατά πως έχει προαναφερθεί) παρουσιάζει συμμετρία τόσο ως προς το κυματοειδές πρότυπο όσο και ως προς τη θέση και το ύψος των κορυφών ανάλογα με την πυκνότητα της καλλιέργειας. Οι όποιες μικροδιαφορές στις κορυφές των 430 και 680 nm ανάμεσα στις διάφορες πυκνότητες των καλλιεργειών δεν φαίνεται να δημιουργούν σοβαρά προβλήματα ως προς την ακρίβεια των μετρήσεων σε αυτά τα μήκη κύματος κατά τη βαθμονόμηση. Όμως και εδώ στο μήκος κύματος των 750 nm η θέση του στις καμπύλες των φασμάτων δείχνει μια σταθερή αναλογικότητα με την πυκνότητα της καλλιέργειας και συνεπώς αυτό το μήκος κύματος συνιστάται να χρησιμοποιείται στις βαθμονομήσεις.



Σχήμα 34. Φάσματα απορρόφησης σε παράθεση του χλωροφύκου *Nephroselmis* sp. σε 6 διαφορετικές πυκνότητες (κύτ./mL) της καλλιέργειάς του.

Στο *Nephroselmis* (Σχήμα 34) τα φάσματα απορρόφησης αντιπροσωπεύουν διαφορετικές πυκνότητες καλλιεργείων οι οποίες προέκυψαν από διαδοχικές αραιώσεις του ίδιου πυκνού δείγματος που λήφθηκε από μια καλλιέργεια σε εκθετική φάση αύξησης. Η τεχνική αυτή (που εφαρμόστηκε και στη *Dunaliella*) έχει το πλεονέκτημα ότι είναι απαλλαγμένη από τις μεταβολές στο φάσμα που μπορούν να εμφανιστούν λόγω της μεταβολής της περιεκτικότητας σε φωτοσυνθετικές χρωστικές ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες αυξάνεται μια καλλιέργεια και οι οποίες μπορούν να μεταβάλουν τη μορφή του φάσματος όταν συγκρίνονται καλλιέργειες παρόμοιων πυκνοτήτων αλλά διαφορετικών συνθηκών.

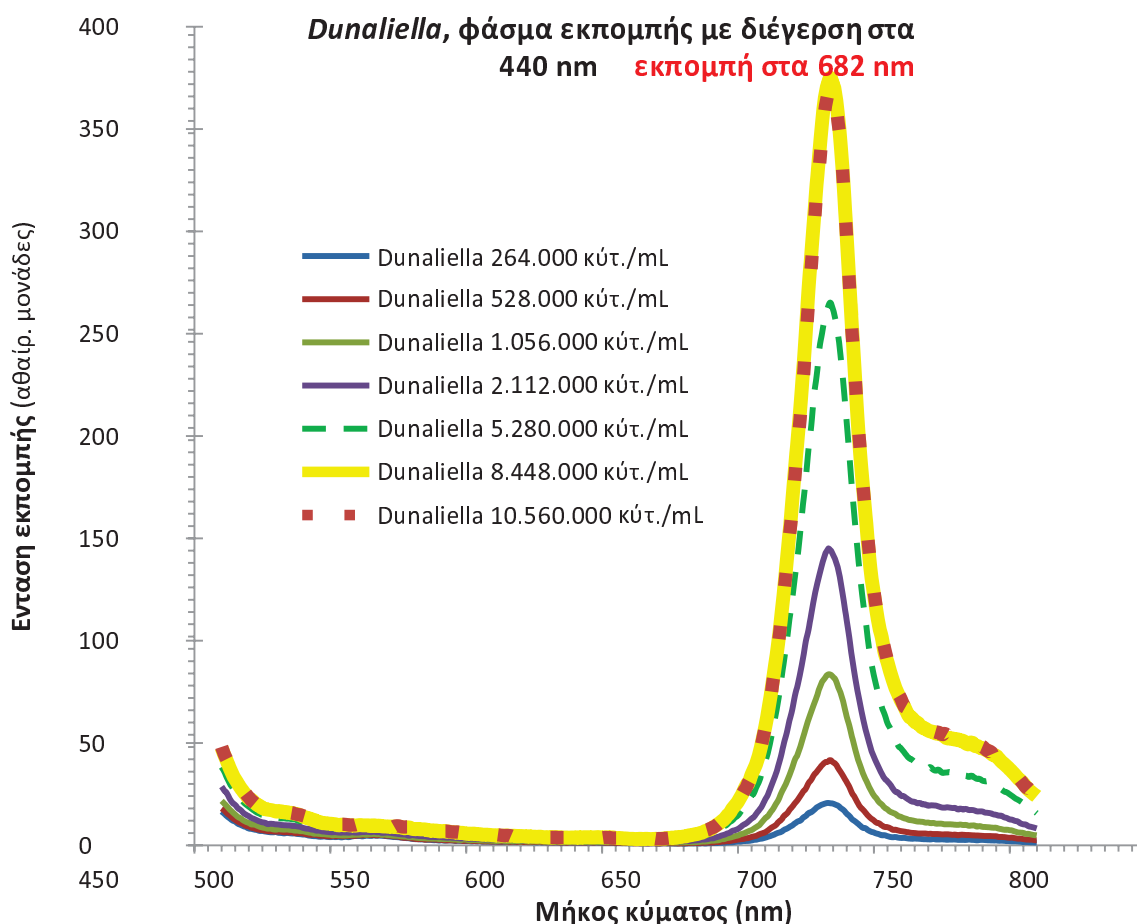
Από την εξέταση του σχήματος προκύπτει μια εικόνα με έντονη κυματοειδή μορφή με δύο έντονες κορυφές για τη χλωροφύλλη-α στα ~440 και 682 nm και μία για τα καρωτενοειδή στα ~482 nm. Οι κορυφές αυτές γίνονται όλο και πιο έντονες για πυκνότητες καλλιέργειας από 4.000.000 κύτ./ml και άνω ενώ σε χαμηλότερες πυκνότητες μόνο η κορυφή των 682 nm αρχίζει μόλις να εμφανίζεται. Σε όλες τις πυκνότητες όμως το πρότυπο της καμπύλης του φάσματος εμφανίζει μια συμμετρική κανονικότητα ακολουθώντας την αύξηση της πυκνότητας.

Συμπερασματικά το *Nephroselmis* φαίνεται ότι μπορεί να δώσει αξιόπιστες μετρήσεις της πυκνότητας της καλλιέργειάς του με φασματοφωτομετρικές βαθμονομήσεις και πρακτικά κάθε μήκος κύματος (π.χ. 430, 440, 680 ή 750 nm) μπορεί με ασφάλεια να χρησιμοποιηθεί για αυτό το σκοπό.

Φάσματα εκπομπής διαφορετικών πυκνοτήτων μικροφυκικού είδους

Σε αυτή τη σειρά των πειραματισμών διερευνήθηκε το κατά πόσο μπορεί να αποβεί χρήσιμο για την εκτίμηση της πυκνότητας μια καλλιέργειας η εξέταση του φάσματος εκπομπής του σε ένα ορισμένο μήκος κύματος (λ_{exc}) φωτός με το οποίο διεγείρουμε το δείγμα έτσι ώστε η χλωροφύλλη των κυττάρων να διεγερθεί και να εκπέμψει φθορίζοντας σε ένα ορισμένο και χαρακτηριστικά καθορισμένο μακρύτερο μήκος κύματος. Αν λοιπόν η ένταση της εκπομπής (κορυφή-peak) διαφοροποιείται με αναλογικό τρόπο ακολουθώντας την εκάστοτε πυκνότητα της καλλιέργειας, αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για τη γρήγορη εκτίμηση της φυτοπλακτονικής πυκνότητας διευκολύνοντας έτσι την παρακολούθηση της καλλιέργειας. Επιπλέον αν ισχύει κάτι τέτοιο θα μπορούσε να αποτελέσει βάση αλγορίθμων και μέθοδο εκτίμησης της φυτοπλακτονικής πυκνότητας σε φυσικά νερά για να ελεγχθεί π.χ. η ανάπτυξη επιβλαβών μικροφυκών όπως ορισμένα κυανοβακτήρια και δινομαστιγωτά.

Φάσματα εκπομπής διαφορετικών πυκνοτήτων της *Dunaliella*

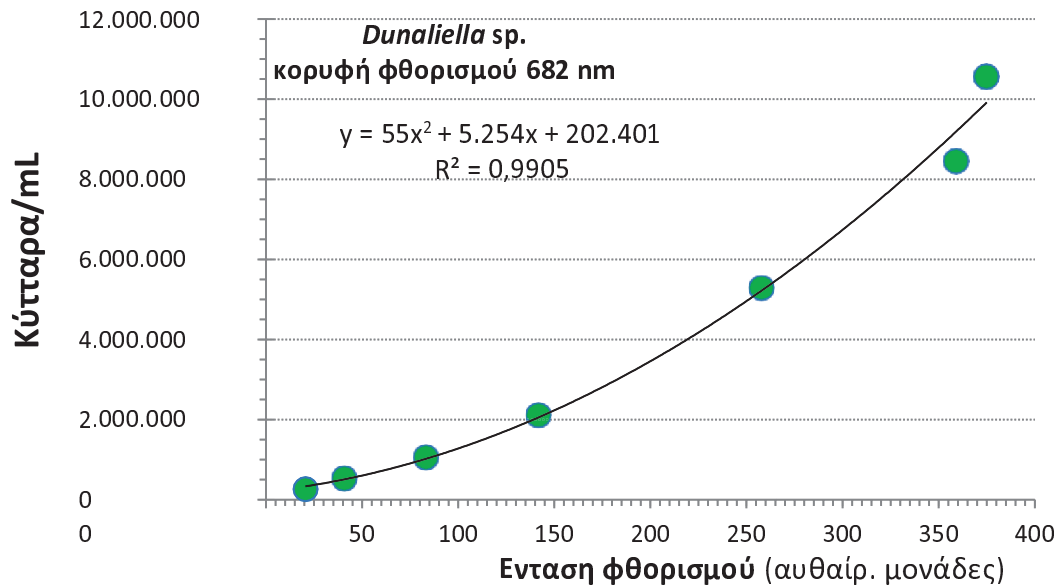


Σχήμα 35. Φάσματα εκπομπής σε παράθεση του χλωροφύκου *Dunaliella* sp. για 7 διαφορετικές πυκνότητες (κύτ./mL) της καλλιέργειάς του.

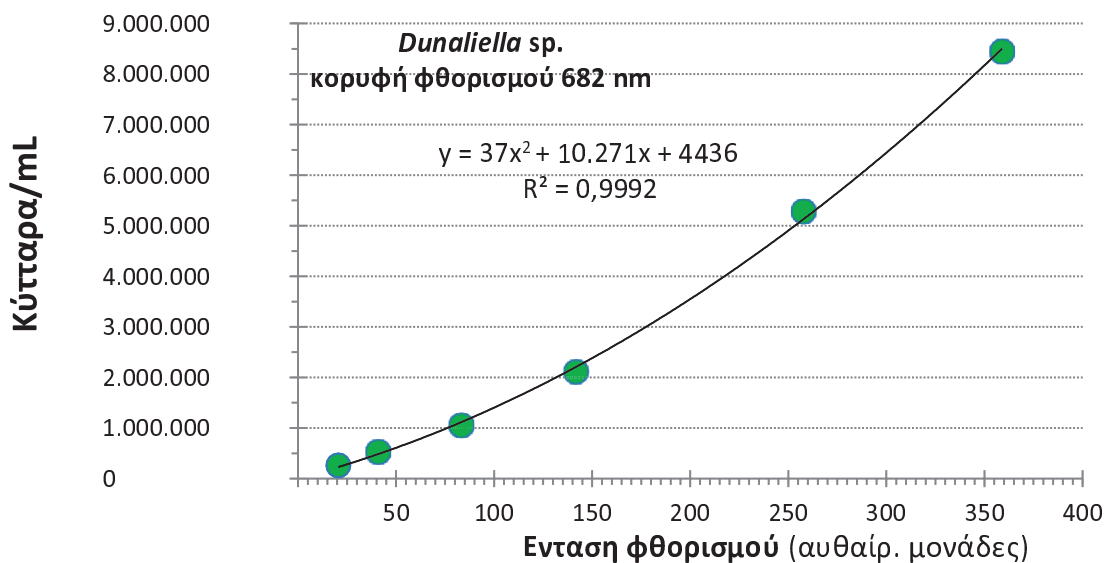
Στο Σχήμα 35 αποτυπώνονται τα διαδοχικά φάσματα εκπομπής της *Dunaliella* sp. για διάφορες επιλεγμένες πυκνότητες καλλιέργειάς της. Όλες οι κορυφές του φάσματος των διαφορετικών πυκνοτήτων τους συνέπιπταν στο μήκος κύματος των 682 nm αλλά διέφεραν ως προς την ένταση. Για να ελεγχθεί το πρότυπο των αλλαγών στην ένταση και να

βρεθεί αν παρουσιάζεται κάποια αναλογικότητα-σχέση μεταξύ πυκνότητας και έντασης φθορισμού εξετάστηκε η μεταξύ τους σχέση χρησιμοποιώντας εξισώσεις παλινδρόμησης.

Στο Σχήμα 35 αποτυπώνεται η σχέση αυτή χρησιμοποιώντας όλες τις τιμές των πυκνοτήτων και βρέθηκε ότι εκφράζεται πολύ ισχυρά ($R^2=0,9905$) από την πολυωνυμική εξίσωση 2^{ου} βαθμού: $\text{Κύτ./mL} = 55(\text{ένταση})^2 + 5254(\text{ένταση}) + 202.401$. Στις υψηλές πυκνότητες αυτού του φύκους (>8.000.000 κύτ./mL) φαίνεται μια τάση για ασάφεια στη σχέση πυκνότητας-έντασης και αυτό γίνεται εμφανές στο γράφημα του Σχήματος 37 όπου παραλείφθηκε η πυκνότητα των 10.560.000 κυτ./mL και η προκύπτουσα πολυωνυμική σχέση ισχυροποιείται ($R^2=0,9992$) εκφραζόμενη από την εξίσωση: $\text{Κύτ./mL} = 37(\text{ένταση})^2 + 10.271(\text{ένταση}) + 4436$. Βάσει των παραπάνω συνιστούμε η εξέταση με φάσμα εκπομπής για το φύκος αυτό να χρησιμοποιείται για απόλυτα αξιόπιστα αποτελέσματα σε πυκνότητες του μέχρι περίπου 8.000.000 κύτ./mL.



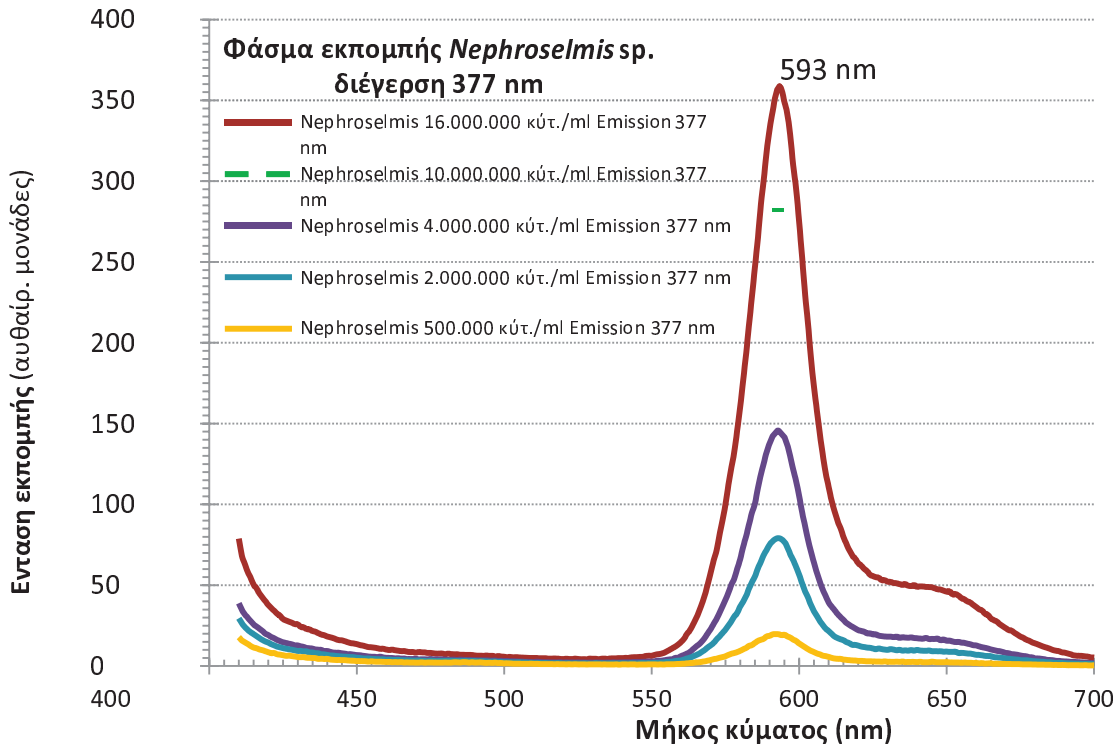
Σχήμα 36. Σχέση πυκνότητας καλλιέργειας και έντασης φθορισμού στη *Dunaliella* με χρησιμοποίηση όλων των πυκνοτήτων του Σχήματος 35.



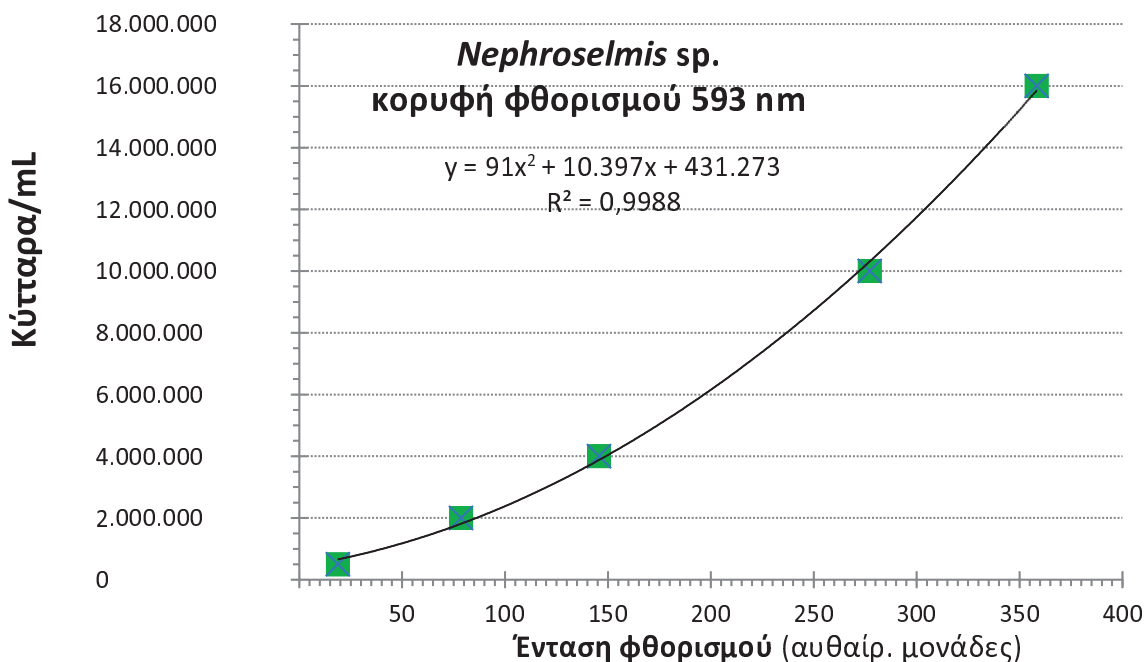
Σχήμα 37. Σχέση πυκνότητας καλλιέργειας και έντασης φθορισμού στη *Dunaliella* με χρησιμοποίηση των πυκνοτήτων του Σχήματος 35 χωρίς αυτή των 10.560.000 κυτ./mL.

Φάσματα εκπομπής διαφορετικών πυκνοτήτων της *Nephroselmis*

Στο Σχήμα 38 αποτυπώνονται τα διαδοχικά φάσματα εκπομπής του *Nephroselmis* sp. για 5 επιλεγμένες πυκνότητες καλλιέργειάς της. Όλες οι κορυφές του φάσματος των διαφορετικών πυκνοτήτων τους συνέπιπταν στο μήκος κύματος των 593 nm αλλά διέφεραν ως προς την ένταση με ένα πρότυπο ομαλής αναλογικότητας το οποίο εξετάστηκε με τη σχέση παλινδρόμησης "πυκνότητας-έντασης φθορισμού" που αποτυπώνεται στο Σχήμα 39.



Σχήμα 38. Φάσματα εκπομπής σε παράθεση του χλωροφύκου *Nephroselmis* sp. για 5 διαφορετικές πυκνότητες (κύτ./ml) της καλλιέργειάς του.

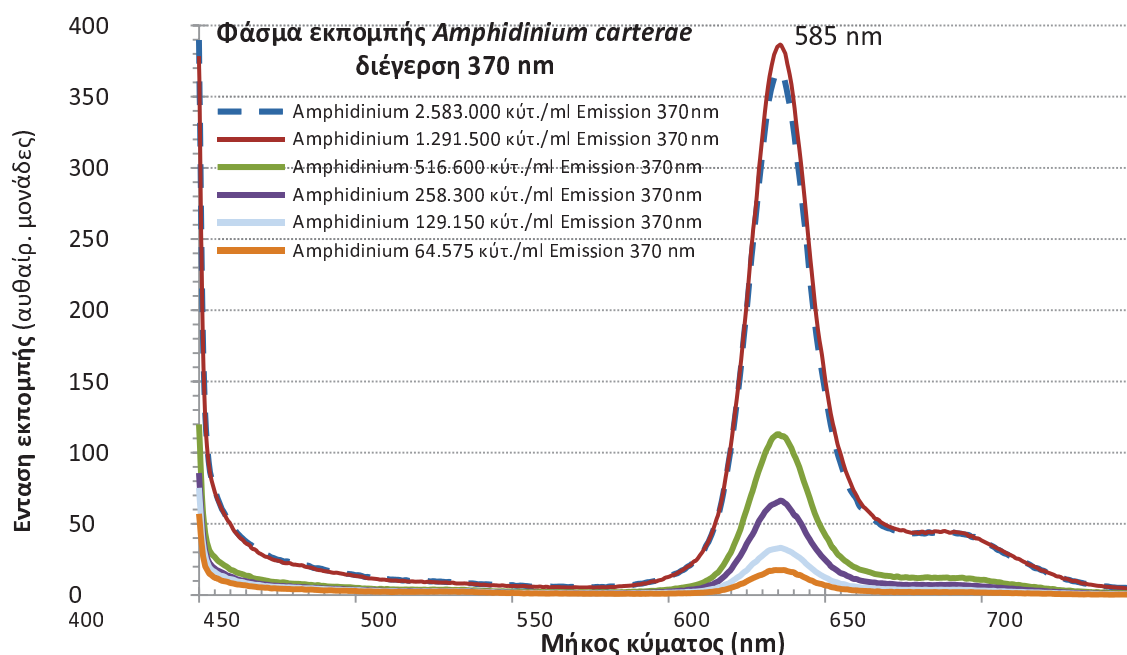


Σχήμα 39. Σχέση πυκνότητας καλλιέργειας και έντασης φθορισμού στη *Nephroselmis* με χρησιμοποίηση όλων των πυκνοτήτων του Σχήματος 38.

Η σχέση πυκνότητας-έντασης εκπομπής χρησιμοποιώντας όλες τις τιμές των πυκνοτήτων και βρέθηκε ότι εκφράζεται πολύ ισχυρά ($R^2=0,9988$) από την πολυωνυμική εξίσωση 2^{ου} βαθμού: $Κύτ./ml = 91(ένταση)^2 + 10.397(ένταση) + 431.273$.

Βάσει των παραπάνω μπορούμε με σιγουριά να δηλώσουμε ότι η εξέταση με φάσμα εκπομπής για το φύκος αυτό μπορεί να χρησιμοποιείται για απόλυτα αξιόπιστα αποτελέσματα σε όλο το εύρος των πυκνοτήτων από ~100.000 - 16.000.000 κύτ./mL.

Φάσματα εκπομπής διαφορετικών πυκνοτήτων του *Amphidinium carterae*

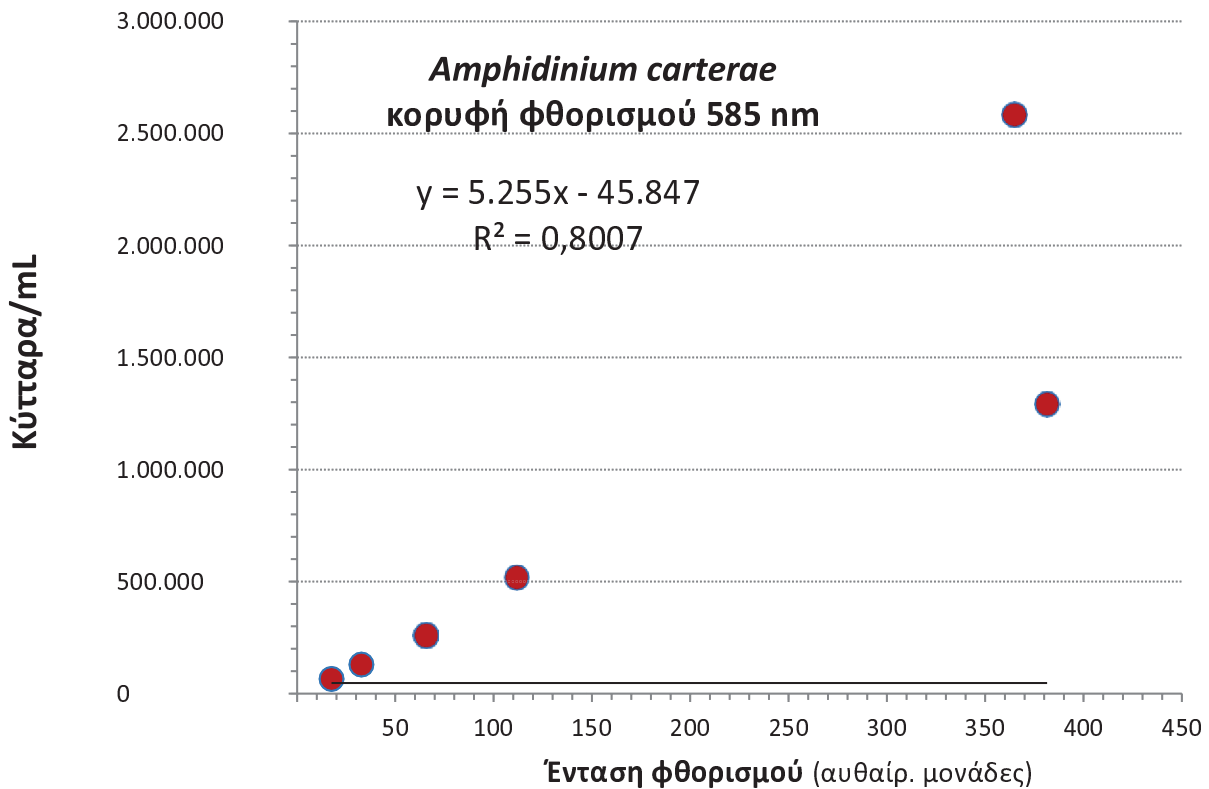


Σχήμα 40. Φάσματα εκπομπής σε παράθεση του δινομαστιγώτου *Amphidinium carterae* για 6 διαφορετικές πυκνότητες (κύτ./ml) της καλλιέργειάς του.

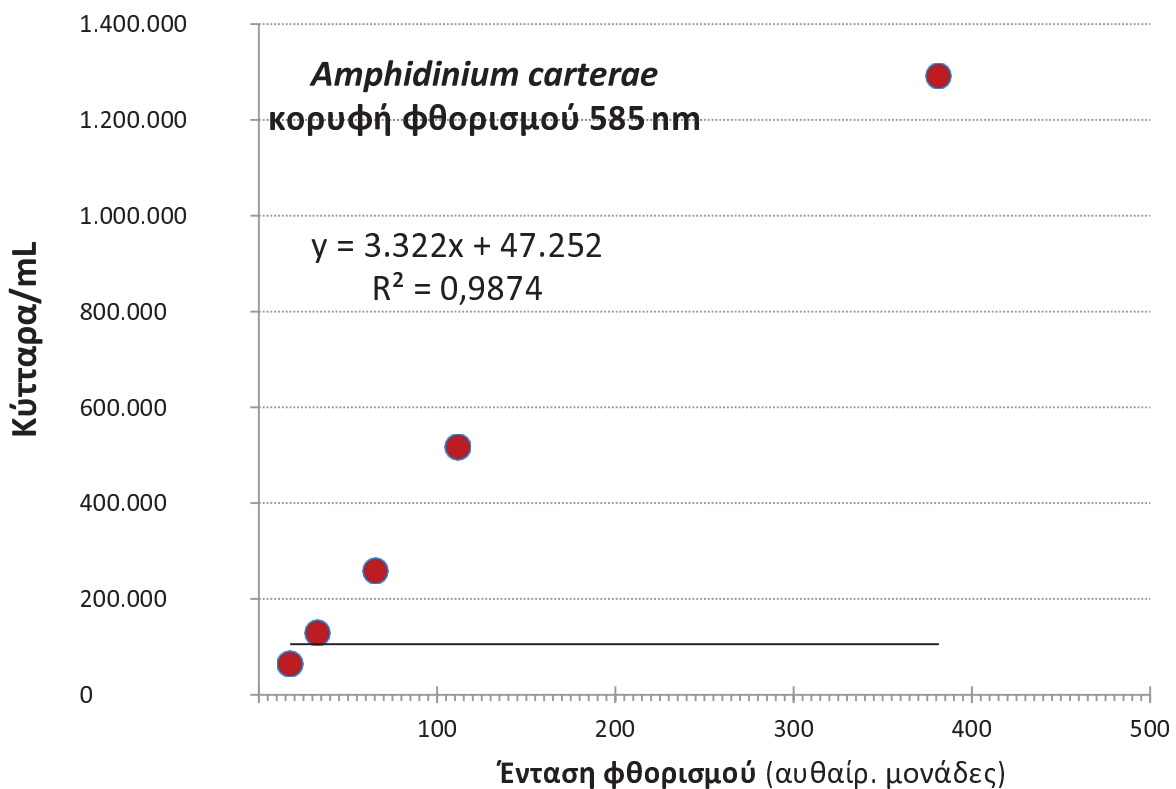
Στο Σχήμα 42 αποτυπώνονται τα διαδοχικά φάσματα εκπομπής του *Amphidinium carterae* για 6 επιλεγμένες πυκνότητες καλλιέργειάς του. Όλες οι κορυφές του φάσματος των διαφορετικών πυκνοτήτων τους συνέπιπταν στο μήκος κύματος των 585 nm αλλά διέφεραν ως προς την ένταση κατά ένα πρότυπο που παρουσίαζε κανονικότητα ως προς την κλιμάκωση των πυκνοτήτων σε χαμηλές τιμές (~60.000 - 500.000 κύτ./ml) αλλά με απουσία προτύπου σε πυκνότητες άνω του 1.000.000 κύτ./ml.

Η κατάσταση αυτή διευκρινίζεται στα γραφήματα των Σχημάτων 41 & 42 όπου στο μεν Σχήμα 41 το γράφημα της απλής γραμμικής παλινδρόμησης όλων των τιμών πυκνοτήτων ($Κύτ./ml = 5255(ένταση) + 45.847$) απέδωσε χαμηλότερο συντελεστή συσχέτισης ($R^2 = 8007$) συγκριτικά με τον αντίστοιχο ($R^2 = 987425$) του γραφήματος του Σχήματος 42 ($Κύτ./ml = 3322(ένταση) + 47.252$) όπου χρησιμοποιήθηκε μόνο η ομάδα τιμών πυκνοτήτων με τις χαμηλές πυκνότητες (~60.000 - 1.300.000 κύτ./ml).

Στην περίπτωση του φύκους αυτού τα δεδομένα αποδεικνύουν ότι η σχέση πυκνότητας καλλιέργειας-έντασης φθορισμού μπορούν να δώσουν αξιόπιστα αποτελέσματα μόνο σε ένα περιορισμένο εύρος πυκνοτήτων μέχρι περίπου την τιμή των 500.000 - 1.500.000 κυτ./ml.



Σχήμα 41. Σχέση πυκνότητας καλλιέργειας και έντασης φθορισμού στο *Amphidinium carterae* με χρησιμοποίηση όλων των πυκνοτήτων του Σχήματος 40.



Σχήμα 42. Σχέση πυκνότητας καλλιέργειας και έντασης φθορισμού στο *Amphidinium* με χρησιμοποίηση των πυκνοτήτων του Σχήματος 76 χωρίς αυτή των 2.583.000 κυτ./ml.

Στη βιβλιογραφία, η τεχνική της φθορισμομετρίας έχει χρησιμοποιηθεί τόσο για την ποιοτική (σύνθεση ειδών) όσο και για την ποσοτική (πυκνότητα βιομάζας) διερεύνηση των φυτοπλαγκτονικών βιοκοινωνιών κυρίως στα φυσικά νερά (Beutler et al., 2002; Richardson et al., 2010, κ.ά.) χωρίς όμως ξεκάθαρα αποτελέσματα που να δημιουργούν ένα οργανωμένο σύστημα αναφοράς στο οποίο κάποιος μπορεί να ανατρέξει. Το πρόβλημα αυτό αναγνωρίζεται και από τους Excoffieri et al., (2015) οι οποίοι για να ξεπεραστούν οι διαφορές που παρουσιάζονται από τη χρήση διαφορετικών οργάνων και τεχνικών προτείνουν περισσότερη έρευνα για τη δημιουργία αξιόπιστων βαθμονομήσεων ποιοτικής και ποσοτικής ταυτοποίησης του φυτοπλαγκτού στα φυσικά νερά.

Στην παρούσα εργασία όμως η χρήση της φθορισμομετρίας περιορίστηκε μόνο σε μικροφύκη μονοειδικών καλλιέργειών με αποκλειστικό στόχο την εκτίμηση της πυκνότητας της καλλιέργειας, δηλαδή μια ποσοτικού τύπου προσέγγιση. Υπ' αυτό το πρίσμα έχοντας χρησιμοποιήσει για το κάθε είδος ένα ορισμένο μήκος κύματος διέγερσης και λαμβάνοντας το φάσμα απορρόφησής του το οποίο παρουσίαζε μια ορισμένη και σταθερή (και συνάμα διαφορετική ανά είδος) κορυφή για όλες τις πυκνότητες που χρησιμοποιήθηκαν, ήμασταν σε θέση να ανιχνεύσουμε για την ύπαρξη λειτουργικής σχέσης "πυκνότητας καλλιέργειας - έντασης φθορισμού". Τα στοιχεία που παρατίθενται στο παρόν δημιουργούν βάσιμη προσδοκία ότι η τεχνική αυτή μπορεί υπό προϋποθέσεις να βρει εφαρμογή στη γρήγορη εκτίμηση της πυκνότητας καλλιέργειας ενός ορισμένου είδους. Οι προϋποθέσεις αυτές είναι η καλλιέργεια να είναι μονοειδική και η πυκνότητά της να μην ξεπερνά κάποιο ανώτερο όριο. Κάτι τέτοιο βέβαια περιορίζει τη χρήση της φθορισμομετρίας στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας, όμως λαμβανομένου υπόψη των ευρημάτων του παρόντος ότι κάθε είδος έχει διαφορετικά μέγιστα ως προς την τελική πυκνότητα της καλλιέργειάς του και διαφορετική απόκριση στο πρότυπο της έντασης φθορισμού για κάθε πυκνότητα, δημιουργεί προοπτική για πιο ακριβείς προσεγγίσεις με περαιτέρω λεπτομερέστερη έρευνα για μεγαλύτερο και πυκνότερο εύρος πυκνοτήτων και για άλλα είδη προκειμένου να συγκροτηθεί μια βάση λειτουργικής αναφοράς για τους καλλιεργητές.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας μπορούμε να οδηγηθούμε στα παρακάτω συμπεράσματα:

1. Τα φάσματα απορρόφησης και εκπομπής των διαφόρων ειδών μικροφυκών αποτελούν χαρακτηριστική «υπογραφή» για το καθένα και μας δώσουν πρώτες ασφαλείς πληροφορίες για τα είδη των χρωστικών που περιέχουν καθώς και για τις μεταβολές που υφίστανται οι χρωστικές ανάλογα με τη φάση της καλλιέργειας.
2. Χρησιμοποιώντας τη φασματοφωτομετρία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) μπορούμε να δημιουργήσουμε εξισώσεις βαθμονόμησης της σχέσης πυκνότητας κυττάρων (σε κύτ. mL⁻¹ ή g/L) και οπτικής πυκνότητας.
3. Για όλα τα είδη που μελετήθηκαν στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιώντας τα μήκη κύματος 430 & 680 nm όπου απορροφά η χλωροφύλλη-α οδηγούμαστε σε ικανοποιητικές εξισώσεις ($R^2 > 0,90$). Επιπλέον ικανοποιητικές εξισώσεις πήραμε και για το ουδέτερο μήκος κύματος των 750 nm ($R^2 > 0,90$). Σε όλες τις περιπτώσεις καταγράφηκε γραμμικότητα για ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων και για μεγαλύτερες τιμές συγκεντρώσεων μπορεί η τεχνική να χρησιμοποιηθεί μέσω της διαδικασίας της αραιώσης.
4. Η φασματοφωτομετρία εκπομπής αποτελεί ένα εξαιρετικό εργαλείο παρακολούθησης της αύξησης της καλλιέργειας μόνο κατά τα αρχικά στάδια. Πάνω από μια ορισμένη πυκνότητα η συγκεκριμένη τεχνική δε μπορεί να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα καθώς δεν υπάρχει αύξηση της εκπομπής σε συνάρτηση με την πυκνότητα της καλλιέργειας λόγω φαινομένων αυτοαπορρόφησης.
5. Η συγκεκριμένη τεχνική μπορεί επίσης να βρει εφαρμογή **για την παρακολούθηση των μικροφυκών στα φυσικά νερά όπου κατά κανόνα οι πυκνότητες είναι χαμηλές. Αναγκαία προϋπόθεση η προηγούμενη μελέτη των φασμάτων εκπομπής των διαφόρων ειδών φυτοπλαγκτού.**
- 6.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Βιολογικά χαρακτηριστικά των εξετασθέντων μικροφυκών

Τα εξετασθέντα είδη μικροφυκών επιλέχθηκαν από λιμνοθαλάσσια νερά της Δ. Ελλάδας κατά τη διάρκεια του ερευνητικού προγράμματος ALGAVISION και συνοπτικά παρατίθενται τα παρακάτω στοιχεία που σχετίζονται με τη σημασία του καθενός.

Μεταξύ των μικροφυκών τα δινομαστιγωτά αποτελούν δυνητική πηγή διάφορων βιοδραστικών ουσιών (Gallardo-Rodriguez et al., 2012; Assunção et al., 2017). Από το *Amphidinium carterae* παράγονται αμφιδινόλες και καρλοτοξίνες μέσω απλών καλλιεργητικών διεργασιών (López-Rosales et al., 2016; Molina-Miras et al., 2018) με μόνο εμπόδιο την ευαισθησία τους σε υδροδυναμική καταπόνηση (García-Camacho et al., 2014). Επιπροσθέτως, η μαζική καλλιέργεια των ειδών του γένους *Amphidinium* με σκοπό την παραγωγή βιοδραστικών ουσιών μπορεί να αποδώσει και άλλα υψηλής αξίας χημικά προϊόντα όπως τα καρωτενοειδή (π.χ. περιδινίνη) και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (EPA και DHA) τα οποία χρησιμοποιούνται σε πλήθος διατροφικών και φαρμακολογικών εφαρμογών (Fuentes-Grunewald et al., 2016; Ishikawa et al., 2016). Έτσι, η μαζική καλλιέργεια του δινομαστιγωτού *Amphidinium* που έχει επιτυχώς δοκιμαστεί με τη χρήση φωτοδιοαντιδραστήρων φωτιζόμενων από λυχνίες LED (Molina-Miras et al., 2018) μπορεί να ωφεληθεί τα μέγιστα από μια πρότυπη εξίσωση συσχέτισης οπτικής απορρόφησης- αριθμού κυττάρων mL⁻¹.

Για την καλλιέργεια του χλωροφύκου *Nephroselmis* sp. τα δεδομένα είναι ελάχιστα. Η μαζική του καλλιέργεια παρόλα αυτά σύμφωνα με τους Ji et al. (2016) και Park et al. (2019) αποδείχθηκε επιτυχημένη και βρέθηκε ότι παράγει πολλά λίπη και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (C16-C18 FAME) της τάξεως των 39,4% και 77,8% αντίστοιχα σε αποδόσεις βιομάζας από 0,4116 έως 0,5468 g/L ξηρού βάρους κυττάρων. Άρα και για αυτό το μικροφύκος είναι ωφέλιμη η εύρεση της σχέσης οπτικής απορρόφησης-αριθμού κυττάρων mL⁻¹.

Το *Phormidium* είναι ένα νηματοειδές κυανοβακτήριο χωρίς αζωτοδεσμευτική ικανότητα, με δυνατότητες παραγωγής χρήσιμων ουσιών όπως αντιοξειδωτικών, καρωτενοειδών, φυκοβιλινών και νέων βιοδραστικών τοξινών για φαρμακολογικές εφαρμογές (Santhose, et al., 2011; Yalcin et al., 2020; Nascimento et al., 2020). Στο εργαστήριο καλλιέργειας πλαγκτού, οι καλλιέργειές του επέδειξαν υψηλό ρυθμό αύξησης σε ποικίλες αλατότητες καθώς και εντυπωσιακή ταχύτητα καθίζησης που μπορεί να οφελήσει μέγιστα στην τελική συγκομιδή του. Συνεπώς και για αυτό το μικροφύκος είναι ωφέλιμη η εύρεση της σχέσης οπτικής απορρόφησης-μάζας του ανά μονάδα όγκου που στην περίπτωση του μια και δεν μπορεί να υπολογιστεί ως κύτταρα mL⁻¹ εκφράζεται ως ξηρό βάρος κυττάρων L⁻¹.

Για τα είδη του γένους *Tetraselmis* σύμφωνα με τους Rodolfi et al., (2009), Rawat et al., (2013), Arora (2016), Pereira et al., (2018) και άλλων, υπάρχουν μεγάλες δυνατότητες παραγωγής βιοδραστικών, διατροφικών, φαρμακευτικών ουσιών καθώς και βιοκαυσίμων. Είναι είδη εύρωστα, ευρύαλα με μεγάλη περιεκτικότητα σε λίπη, μπορούν να αυξηθούν σε ευρεία ποικιλία συνθηκών νερού και περιβάλλοντος, κάτι που τα καθιστά και κατάλληλα για απορρύπανση αστικών λυμάτων (Pereira et al., 2016; Schulze et al., 2017). Παρουσιάζουν μάλιστα το πλεονέκτημα της σύντομης καθίζησης των κυττάρων της καλλιέργειας σε ηρεμία (~20% της μάζας τους σε 6 ώρες) κάτι που είναι ουσιαστικό στην περικοπή των εξόδων στη διαδικασία καλλιέργειας και συγκομιδής. Το συγκεκριμένο είδος που καλλιεργούμε και προσωρινά έχουμε ονομάσει *Tetraselmis* sp. var. red είναι μεν απροσδιόριστο επακριβώς, όμως παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της γρήγορης αύξησης του. Οι ώριμες καλλιέργειές του έχουν κοκκινοκαφέ χρώμα, λόγω μεγάλης παραγωγής καρωτενοειδών, το οποίο δημιουργεί νέες προοπτικές εκμετάλλευσής του και αξίζει η εύρεση της σχέσης οπτικής απορρόφησης-αριθμού κυττάρων mL⁻¹.

Τα κυανοβακτήρια γένους *Anabaena*, παρουσιάζουν την ιδιότητα της αζωτοδέσμευσης και έχουν μεγάλες δυνατότητες παραγωγής βιολογικών ουσιών που είναι χρήσιμες σε ποικίλες ιατρο-βιολογικές και γενικώς φαρμακευτικές χρήσεις (Videau et al., 2019).

Για το χλωροφύκος *Dunaliella* sp. υπάρχουν πολυάριθμες αναφορές στη βιβλιογραφία (Avron & Ben-Amotz, 1992; Oren, 2014; Borowitzka, 2018, κ.ά.) τόσο ως προς τη χρήση του στις ιχθυοκαλλιέργειες ως θρεπτικό υπόστρωμα για τα τροχόζωα που αποτελούν ζωντανή τροφή για τις λάρβες των θαλασσινών ψαριών στα ιχθυοεκκολαπτήρια, όσο και ως μικροφύκος πρώτης γραμμής για την παραγωγή πολύτιμων προϊόντων κυρίως της χρωστικής β-καρωτένιο (προβιταμίνη Α).



Εικόνα 1. Χαρακτηριστικά μακρά και λεπτά νημάτια του νηματοειδούς κυανοβακτηρίου *Phormidium* sp.

1. *Phormidium* sp.

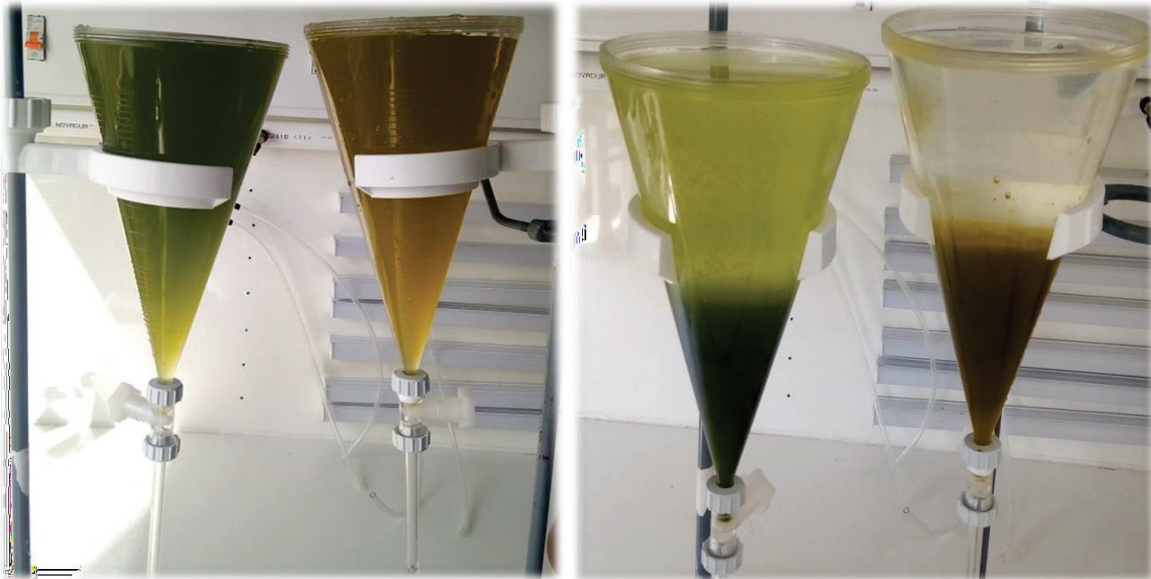
<u>Συστηματική κατάταξη</u>	
Υπερβασίλειο:	Προκαρυωτικά
Βασίλειο:	Ευβακτήρια
Φύλο:	Κυανοβακτήρια
Ομοταξία:	Cyanophyceae
Τάξη:	Oscillatoriales
Οικογένεια:	Oscillatoriaceae
Γένος:	<i>Phormidium</i>
Είδος:	<i>Phormidium</i> sp.

Αποτελεί κυανοβακτήριο νηματοειδούς τύπου (Guiry, 2020; Komarek et al. 2014) με μορφή νημάτων (τριχώματα) αδιακλάδωτα, γενικώς ευθύγραμμα, με μεγάλο μήκος, χωρίς πολλές συστροφές παρά μόνο περιστασιακά, καμπτόμενα ελαφρώς όταν βρίσκονται σε μεγάλες μάζες (Εικόνα 1). Ενίοτε ορισμένα νήματα βρίσκονται περιελιγμένα σε σπείρα. Είναι λεία στην εμφάνιση και έχουν ικανότητα αργής ολισθητικής κίνησης. Το χρώμα τους ποικίλλει ανάλογα με τη φάση της καλλιέργειας από ανοιχτό πράσινο, σε πράσινο-λαδί έως λαδί-κίτρινο. Τα τελικά μέρη των νηματίων (άκρες) δεν είναι οξύληκτα αλλά ελαφρώς κυρτά. Η θήκη βλέννας που καλύπτει τα νημάτια έχει συμπαγή δομή, πολύ μικρό πάχος και απουσιάζει στα κύτταρα των άκρων (τελικά κύτταρα).

Το είδος δεν είναι αζωτοδεσμευτικό, καθώς δεν παρουσιάζει ετερόκυτα (ειδικά κύτταρα δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου -N₂). Δεν σχηματίζει κύτταρα-ακινήτες. Τα νημάτια αποτελούνται από κυλινδρικού σχήματος κύτταρα με μήκος λίγο μεγαλύτερο από το πάχος τους [$2,37 \pm 0,2$ (sd) μm]. Τα γειτονικά κυτταρικά τοιχώματα δεν σχηματίζουν εμφανή χωρίσματα στην παρατήρησή τους από το μικροσκόπιο.

Στα κύτταρά τους δεν παρατηρούνται συνήθως αεροτόπια, ωστόσο, η εμφάνισή τους δεν

είναι απίθανη. Το περιεχόμενο του κυτταροπλάσματος σε μεγάλη μεγέθυνση εμφανίζεται κοκκώδες με πολύ μικρά κοκκία πράσινης- κυανοπράσινης απόχρωσης.



Εικόνα 2. Α) Χαρακτηριστικό χρώμα καλλιεργειών του κυανοβακτηρίου *Phormidium* sp. με πράσινο χρώμα κατά τις πρώτες ημέρες και λαδί-κίτρινο αργότερα.

Β) Η καθίζηση της μάζας των κυττάρων του *Phormidium* sp.

Ο πολλαπλασιασμός γίνεται με θραυσματοποίηση των νηματίων σε κομμάτια ποικίλου μήκους τα οποία στην συνέχεια επιμηκύνονται με κυτταρικές διχοτομήσεις. Οι διαιρέσεις των κυττάρων γίνονται εγκάρσιως δηλαδή κάθετα στον άξονα του νηματίου. Το κύτταρο αρχικά αυξάνεται έως να αποκτήσει διπλάσιο μέγεθος και κατόπιν διαιρείται. Τα τελικά κύτταρα του νηματίου δεν έχουν αυτή την ικανότητα. Τα σημεία του νήματος όπου πρόκειται να πραγματοποιηθεί η θραύση αναπτύσσουν νεκρίδια, δηλαδή κύτταρα που θα διαλυθούν ώστε να επέλθει θραύση και ο διαχωρισμός.



Εικόνα 3. Δοχεία με ποσότητα μάζας *Phormidium* sp. που έχουν υποστεί κατάψυξη- απόψυξη και έχει απελευθερωθεί από τα κύτταρα η χρωστική βιλιπρωτεΐνη φυκοκυανίνη η οποία χρωματίζει το νερό μπλε.

Το *Phormidium* αναπτύσσεται γρήγορα σε κανονικές συνθήκες (20-22 °C, ~4000 lux) και είναι ισχυρά αλοανθεκτικό, αντέχοντας εύρος αλατότητας 15-60 ppt με βέλτιστη ανάπτυξη

γύρω στα 40 ppt. Πολύ γρήγορα η αρχική του καλλιέργεια που έχει πράσινο χρώμα δημιουργεί μάζα νηματίων, ορατά και με γυμνό οφθαλμό καθώς στροβιλίζονται με τον αερισμό στο δοχείο καλλιέργειας. Μετά από λίγες ημέρες η καλλιέργεια αποκτά λαδοπράσινο χρώμα και τελικώς λαδοκίτρινο όταν η ανάπτυξη καταλήξει σε μεγάλη βιομάζα (Εικόνα 2). Το νερό με το *Phormidium* αφηρόμενο αδιατάρακτο για αρκετό διάστημα θα παρουσιάσει εντυπωσιακή καθίζηση (Εικόνα 2) των νηματίων δημιουργώντας συμπαγές ίζημα με σχεδόν διαφανές το υπερκείμενο υγρό. Η καθίζηση ολοκληρώνεται σε 3 περίπου ώρες και συμβαίνει με τον ίδιο ρυθμό ανεξαρτήτως της χρωματικής φάσης της καλλιέργειας. Αν το ίζημα από την πράσινη φάση αφηθεί για πολύ καιρό και ιδιαίτερα στην ψύξη (~4 °C) θα εμφανιστεί στο υπερκείμενο νερό έντονο μπλε χρώμα (Εικόνα 3) λόγω απελευθέρωσης της υδατοδιαλυτής χρωστικής φυκοκυανίνης, η οποία χρησιμοποιείται στην βιομηχανία ως ισχυρό αντιοξειδωτικό.

Συνεπώς το *Phormidium* διαθέτει πολλά πλεονεκτήματα για τη μαζική καλλιέργειά του καθώς:

- Αναπτύσσεται γρήγορα και φθάνει σε πυκνές συγκεντρώσεις.
- Συλλέγεται εύκολα καθώς σχηματίζει σύντομα με αδιατάρακτη καθίζηση πυκνό ίζημα.
- Παράγει πολλή φυκοκυανίνη.
- Η καλλιέργειά του διευκολύνεται πολύ ως προς την επίτευξη της μονοειδικότητας, καθώς τα νηματίά του διατηρούνται μόνο αυτά μέσω περάσματος του μέσου καλλιέργειας από πλαγκτονικό δίκτυο πόρων ~100 μm.

2. *Nephroselmis* sp.

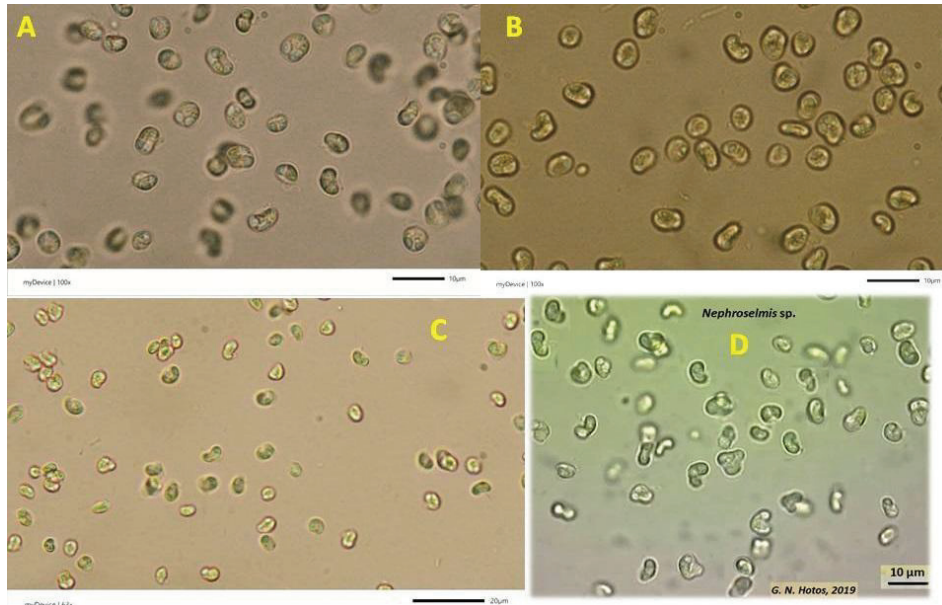
Συστηματική κατάταξη

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

Είναι μονοκύτταρο πλαγκτονικό χλωροφύκος (Εικόνα 4) με κύτταρα μονήρη, σχήματος πεπλατυσμένου φασολιού που φέρει κατά μήκος του δύο άνισα μαστίγια τα οποία εκφύονται από το μεσαίο τμήμα του κοίλου τμήματος του (Throndsen, 1996; Bérard-Therriault et al., 1999; Nakayama et al., 2007; Sluiman et al., 2008; Massjuk & Lilitska, 2011; Guiry, 2020).

Τα κύτταρα αυτά δεν διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα και οι διαστάσεις τους κυμαίνονται σε $5,28 \pm 0,35$ (sd) μm κατά τον επιμήκη άξονα και $3,81 \pm 0,5$ (sd) μm κατά το πλάτος. Η κίνηση των μαστιγίων προσφέρει έντονη κινητικότητα στο κύτταρο με χαρακτηριστική ευθύγραμμη κίνηση ελαφρά στροβιλιστική και ελαφρά τρομώδη. Το κοντότερο μαστίγιο κινείται κατά την εμπρόσθια κατεύθυνση και το μακρύτερο πάλλεται στο οπίσθιο μέρος. Το κάθε κύτταρο περιέχει ένα μεγάλο χλωροπλάστη σε πλευρική θέση μέσα στον οποίο βρίσκεται ένα πυρηνοειδές. Ο χλωροπλάστης καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας του κυττάρου και διαθέτει μια φωτοευαίσθητη κηλίδα σε θέση που αντιστοιχεί στο κάτω μέρος του τόπου έκφυσης του κοντού μαστιγίου. Το χρώμα των κυττάρων στο μικροσκόπιο είναι άτονο πράσινο ενώ στο δοχείο καλλιέργειας ανοικτό – θαμπό πράσινο. Αναπαράγονται με

με κυτταρική διαίρεση (συνήθως) αλλιώς αμφιγονικώς σύμφωνα με τον ολογαμικό τρόπο, δηλαδή με σύντηξη δύο πανομοιότυπων βλαστητικών κυττάρων προς δημιουργία ζυγώτη, χωρίς όμως σχηματισμό κύστεων. Αναπτύσσεται καλά σε αλατότητες 20-65 ppt, σε θερμοκρασίες 16-30 °C και σε φωτισμό 2000-8000 lux (παρατηρήσεις στο ερευνητικό πρόγραμμα ALGAVISION, επ. υπ. Γ. Χώτος).



Εικόνα 4. Φωτογραφίες μικροσκοπίου σε διάφορες μεγεθύνσεις του μικροφύκου *Nephroselmis* sp. Χαρακτηριστικό το νεφροειδές σχήμα των κυττάρων.

3. *Amphidinium* sp.

Συστηματική κατάταξη

Υπερβασιλείο: Ευκαρυωτικά

Βασιλείο: Πρώτιστα

Φύλο: Δινομαστιγωτά (Dinoflagellata)

Ομοταξία: Dinophyceae

Τάξη: Gymnodiniales

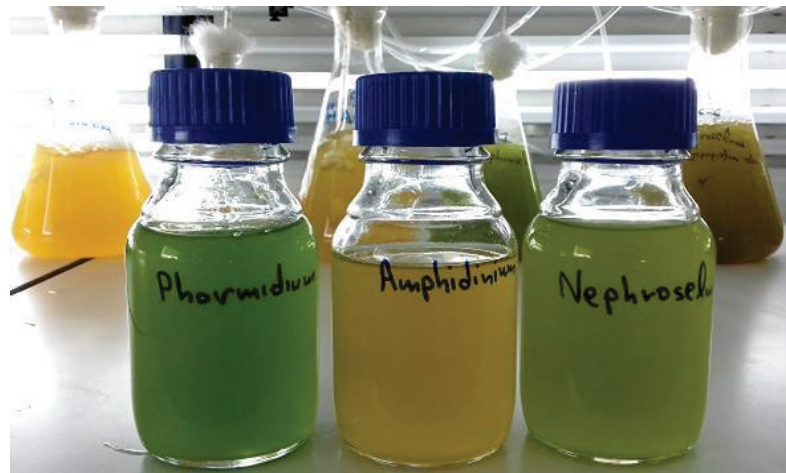
Οικογένεια: Gymnodiniaceae

Γένος: *Amphidinium*

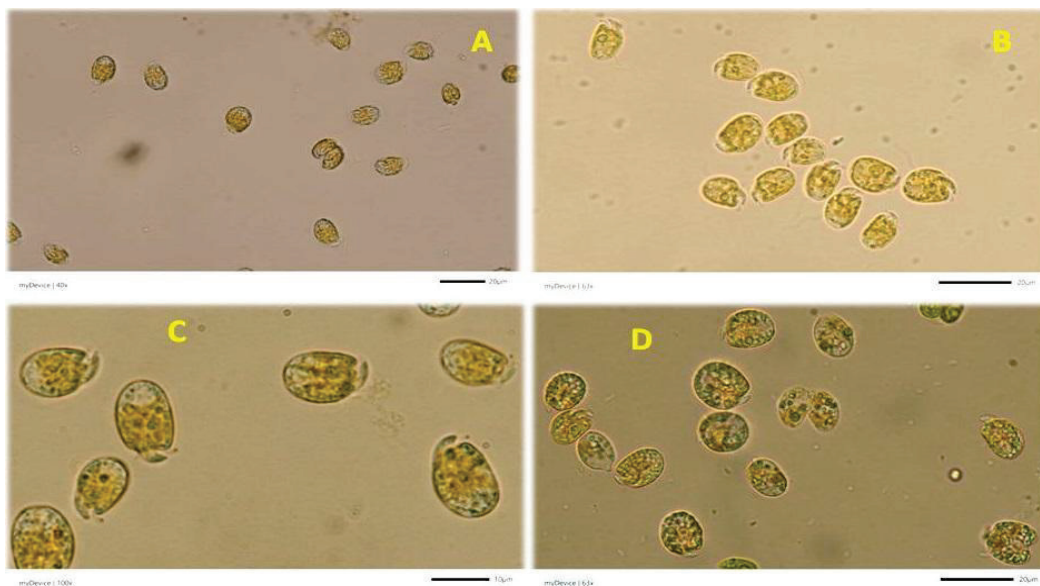
Είδος: *Amphidinium* sp.

Αποτελεί πλαγκτονικό είδος με μονήρη κύτταρα, ποικιλίας μεγεθών που κυμαίνεται στα $11,93 \pm 1,3$ (sd) μm κατά τον επιμήκη άξονα και $8,64 \pm 0,92$ (sd) μm κατά το πλάτος. Έχουν χαρακτηριστική κίνηση ευθύγραμμου τύπου και συχνή απότομη αλλαγή κατεύθυνσης (Parke & Dixon, 1976; Steidinger & Tangen, 1996; Murray et al., 2004; Guiry, 2020). Δεν στροβιλίζονται και επίσης δεν διαθέτουν "πανοπλία"-κέλυφος κυτταρίνης. Μερικές φορές παρουσιάζονται εντελώς ακίνητα μέσα σε υαλώδη κύστη. Η μορφή των κυττάρων του είδους ποικίλει μεταξύ σφαιροειδούς και ατρακτοειδούς και κατά τον μεγάλο άξονα συμπιεσμένα. Το χρώμα τους κυμαίνεται μεταξύ των αποχρώσεων λαδοκίτρινου και κιτρινοπορτοκαλί με μια ελαφρά πρασινωπή απόχρωση (Εικόνα 28). Η επιθήκη (epicone) πολύ μικρότερη από την υποθήκη και μοναδική στο σχήμα της μεταξύ των δινομαστιγωτών καθώς μοιάζει με καμπυλωτή "προβοσκίδα".

Μεταξύ των κυττάρων παρουσιάζεται ποικιλία στο μέγεθος της επιθήκης, σε μερικά είναι ογκώδης ενώ σε άλλα μικρότερη. Η εγκάρσια αύλακα (cingulum) δεν είναι τόσο εμφανής όσο σε άλλες κατηγορίες δινομαστιγών, καθώς η επιθήκη είναι μικρή σε σχέση με την υποθήκη (που καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του κυττάρου) και δεν χωρίζεται απ' αυτή με μια μεγάλη σε διάμετρο αύλακα. Η κάθετη αύλακα (sulcus) είναι εμφανής και διατρέχει κάθετα στην εγκάρσια αύλακα όλο το μήκος της υποθήκης. Τόσο το εγκάρσιο όσο και το κάθετο μαστίγιο εμφανή με το εγκάρσιο να βρίσκεται εν μέρει μέσα στην εγκάρσια αύλακα και ένα μέρος του να προεξέχει με χαρακτηριστική κυματοειδή κίνηση και το επίμηκες να προβάλλει αρκετά από την κάθετη αύλακα και να κινείται λιγότερο κυματοειδώς σε σχέση με το εγκάρσιο. Ο πυρήνας βρίσκεται στο κάτω μέρος της υποθήκης. Ο χλωροπλάστης χρώματος χρυσοπράσινου καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του πρωτοπλάσματος προσδίδοντάς στο κύτταρο χρυσαφί χρώμα (Εικόνα 6) και έχει λοβοειδή μορφή. Το κυτταρόπλασμα είναι υαλώδες με ποικιλία εγκλείστων σωματιδίων και ποικίλων αποχρώσεων ανάλογα με τη φάση ανάπτυξης των καλλιεργούμενων κυττάρων.



Εικόνα 5. Το χαρακτηριστικό κίτρινο-λαδί χρώμα καλλιέργειας του *Amphidinium carterae* (μέσον) συγκριτικά με το πράσινο των *Phormidium* sp. και *Nephroselmis* sp..



Εικόνα 6. Φωτογραφίες μικροσκοπίου σε διάφορες μεγεθύνσεις του δινοφύκου *Amphidinium carterae* με το χαρακτηριστικό χρυσαφί χρώμα των κυττάρων του.

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

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

4. *Tetraselmis* sp. (var. red)

Συστηματική _____ κατάταξη

Υπερβασιλείο: Ευκαρυωτικά

Βασίλειο: Πρώτιστα

Φύλο: Χλωρόφυτα (Chlorophyta)

Ομοταξία: Chlorophyceae

Τάξη: Chlorodendrales

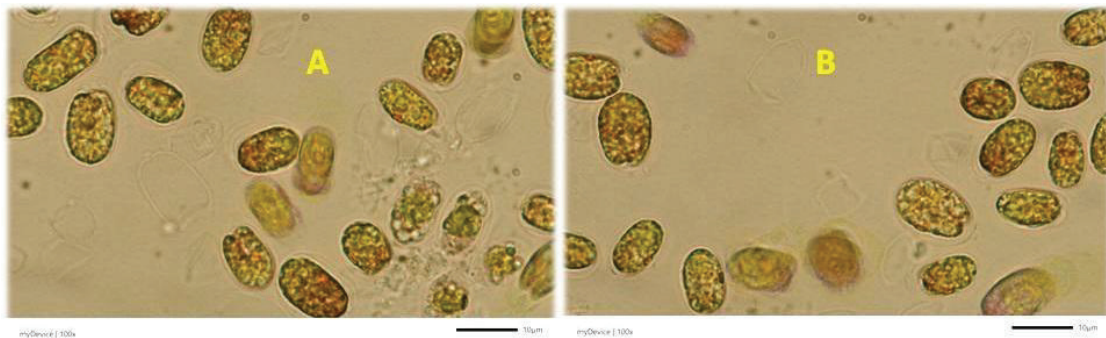
Οικογένεια: Chlorodendraceae

Γένος: *Tetraselmis*

Είδος: *Tetraselmis marina* (var. red)

Το είδος αυτό είναι μονοκύτταρο πλαγκτονικό χλωροφύκος (Norris et al., 1980; Guiry, 2020), *Tetraselmis marina* sensu lato το οποίο χαρακτηρίζουμε ως "var. red". Οι διαστάσεις του κυττάρου είναι $10,52 \pm 1,2$ (sd) μm κατά τον επιμήκη άξονα και $8,11 \pm 1,08$ (sd) μm κατά το πλάτος για το είδος που απομονώθηκε από τη λιμνοθάλασσα Κοτυχίου και $11,32 \pm 0,78$ (sd) μm κατά τον επιμήκη άξονα και $7,95 \pm 1,06$ (sd) μm κατά το πλάτος για το είδος που απομονώθηκε από τη λιμνοθάλασσα Πάππας Αχαΐας.

Το ενδιαφέρον χαρακτηριστικό αυτού του μικροφύκου είναι ο σκούρο-κόκκινος χρωματισμός που αποκτά το νερό στο δοχείο καλλιέργειάς του όταν η καλλιέργεια ωριμάσει. Ενώ στην αρχική της φάση (χαμηλή συγκέντρωση κυττάρων) η καλλιέργεια είναι χρώματος σκούρο-πράσινου όσο περνά ο χρόνος αποκτά φαιά-κόκκινη απόχρωση. Το κοκκινωπό χρώμα της καλλιέργειας οφείλεται στο αντίστοιχο κοκκινωπό χρώμα των κυττάρων του (Εικόνα 7) το οποίο παρατηρείται στο μικροσκόπιο ως κοκκώδη ποικίλων διαμέτρων έγκλειστα σε όλη τη μάζα του κυττάρου ανάμικτο με αντίστοιχα πράσινης απόχρωσης.



Εικόνα 7. Φωτογραφίες μικροσκοπίου σε διάφορες μεγεθύνσεις του μικροφυκικού χλωροφύκου *Tetraselmis* sp. (var. red) με το χαρακτηριστικό κοκκινωπό χρώμα των κυττάρων του που αρχίζει να εμφανίζεται.

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

Αμφότερες οι ποικιλίες όταν υποστούν φυγοκέντρηση σε δείγμα που λαμβάνεται από τις καλλιέργειές τους, παρουσιάζουν το μοναδικό φαινόμενο. Το υπερκείμενο νερό στο δοχείο φυγοκέντρησης εμφανίζεται κόκκινο, ενώ το ίζημα (κύτταρα) είναι πράσινο στο *Tetraselmis* var. red kotyhi και σκούρο-κόκκινο στο *Tetraselmis* var. red rappas. Στη βιβλιογραφία δεν απαντήθηκε παρόμοια περίπτωση. Προφανώς το κόκκινο χρώμα του νερού στο υπερκείμενο οφείλεται σε απροσδιόριστες ουσίες που παράγουν τα κύτταρα και αποβάλλουν στο νερό με ποικίλη ένταση.

5. *Anabaena* sp.

Συστηματική κατάταξη

Υπερβασίλειο: Προκαρυωτικά

Βασίλειο: Ευβακτήρια

Φύλο: Κυανοβακτήρια

Ομοταξία: Cyanophyceae

Τάξη: Nostocales

Οικογένεια: Nostocaceae

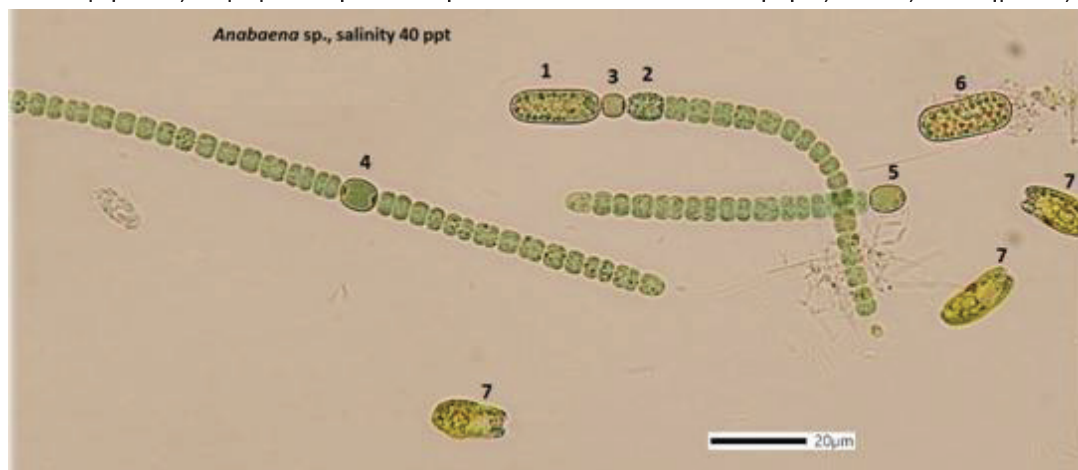
Γένος: *Anabaena*

Είδος: *Anabaena* sp.

Είναι κυανοβακτήριο νηματοειδούς τύπου, αζωτοδεσμευτικό, με ευδιάκριτα τα κύτταρα που αποτελούν το νήμα (Εικόνα 31). Τα νήματα είναι κυρίως αδιακλάδωτα ευθύγραμμα, ποικίλου μήκους, από πολύ κοντά, της τάξεως λίγων κυττάρων (5-10 μήκους ~20- 30 μm), έως πολύ μακρά (> 250 μm) της τάξεως των εκατοντάδων κυττάρων (Εικόνα 8).

Τα μακρά νημάτια αναδιπλώνονται σχηματίζοντας μεγάλες καμπύλες (Εικόνα 8). Δεν παρουσιάζονται συστροφές νημάτων ή περιπλεγμένα κύτταρα. Τα νήματα σε πυκνές καλλιέργειες διατάσσονται σε παράλληλες γραμμές. Η ολισθητική κατάσταση των νημάτων είναι σχεδόν απύσχα και μόνο περιστασιακώς εμφανίζεται ιδιαίτερα αργή ολισθητική κίνηση. Δεν παρουσιάζει εμφανή θήκη-κολεό που να καλύπτει το νημάτιο, αλλά μερικές φορές υπάρχει ένα λεπτό υαλώδες και άχρωμο κάλυμμα βλέννας.

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



Εικόνα 8. Ένα μακρύ και δύο κοντά νημάτια του κυανοβακτηρίου *Anabaena*. 1: ακρινός μεγάλος επιμήκης ακινήτης. 2: βλαστητικό κύτταρο που μετατρέπεται σε ακινήτη, 3: σφαιρικό ετερόκυτο μεταξύ δύο ακινήτων, 4: μεγάλο σφαιρικό ετερόκυτο, 5: ακρινό σφαιρικό ετερόκυτο, 6= αποσπασμένος από το νημάτιο ακινήτης, 7: κύτταρα *Tetraselmis*. Πολύ χαρακτηριστικό το έντονα κοκκώδες κυτταρόπλασμα των ακινήτων.

6. *Dunaliella* sp.

Συστηματική κατάταξη

Υπερβασίλειο: Ευκαρυωτικά

Βασίλειο: Πρώτιστα

Φύλο: Χλωρόφυτα (Chlorophyta)

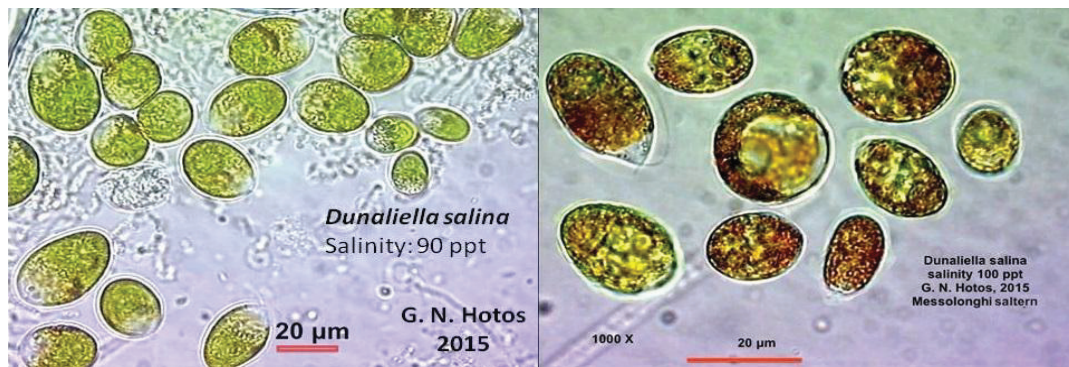
Ομοταξία: Chlorophyceae

Τάξη: Chlamydomonadales

Οικογένεια: Dunaliellaceae

Γένος: *Dunaliella*

Είδος: *Dunaliella salina*, *D. viridis*, *D. parva* κ.ά.



Εικόνα 9. Κύτταρα του αλοανθεκτικού φυτοπλαγκτονικού χλωροφύκου *Dunaliella* sp. (ενδεχομένως *Dunaliella salina*) σε δύο διαφορετικές φυσιολογικές καταστάσεις. Αριστερά τα κύτταρα είναι με το φυσιολογικό πράσινο χρώμα τυπικό των χλωροφυκών και σε ποικιλία μεγεθών. Δεξιά τα κύτταρα έχουν αρχίσει να αποκτούν κοκκινωπό χρώμα λόγω συσσώρευσης της φωτοσυνθετικής χρωστικής β-καρωτένιο (φωτ. αρχείο Γ. Χώτου).

Τα είδη του γένους *Dunaliella* είναι μονοκύτταρα (Εικόνα 9), χωρίς κυτταρικό τοίχωμα και διαθέτουν 2 ισομεγέθη μαστίγια μήκους μεγαλύτερου (1,5-2 φορές) από αυτό του θαλλού τους. Ο πυρήνας είναι ευμεγέθης και βρίσκεται σε κεντρική θέση στο εμπρόσθιο μέρος (το μέρος όπου εκφύονται τα μαστίγια) του αχλαδοειδούς τυπικού σχήματος κυττάρου (ονομάζοντας ως εμπρόσθιο το στενό τμήμα ενώ ως οπίσθιο το αποστρογγυλεμένο στην απέναντι άκρη). Ο πυρήνας περιβάλλεται κατά το μεγαλύτερο μέρος του από τον μεγάλο χλωροπλάστη που γεμίζει σχεδόν το πρωτόπλασμα και από διάφορα μικρά κενοτόπια. Η έλλειψη κυτταρικού τοιχώματος δεν επιτρέπει την ακαμπτότητα (σταθερότητα). Λόγω του ότι είναι πολύ εύπλαστο εύκολα επηρεάζεται από την ωσμωτική κατάσταση του περιβάλλοντος νερού και ανάλογα διογκώνεται ή συρρικνώνεται (με βάση τον μηχανισμό ωσμωρύθμισης) ανάλογα με το αν το νερό είναι πολύ αραιότερο ή πυκνότερο σε σχέση με το κυτταρόπλασμα. Το μέγεθος του κυττάρου ποικίλλει τόσο ανάμεσα στα διαφορετικά είδη όσο και ανάμεσα στο ίδιο, ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν. Ένα τυπικό μέγεθος είναι αυτό των 7-12 µm κατά τον επιμήκη άξονά του, αλλά συχνά απαντάται και σε μεγέθη 16-24 µm. Είναι πολύ κινητικό είδος και τα γρήγορα χτυπήματα των μαστιγίων του το προωθούν προς τα εμπρός σε μια χαρακτηριστική πορεία με απότομες και στριφογυριστές κινήσεις κατά τον οριζόντιο άξονα του. Το μέσου μεγέθους κύτταρο της *Dunaliella* πάντως είναι αρκετά μικρότερο συγκριτικά με υπόλοιπα είδη μαστιγιοφόρων χλωροφυκών που απαντώνται στην υπεραλατότητα, όπως αυτό της *Asteromonas gracilis* (18-25 µm) ή της *Tetraselmis marina* (20-30 µm) ή σε κανονική αλατότητα της *Rhodomonas salina*, (10-15 µm).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Almomani, F. & B., Ormeci, 2018 Monitoring and measurement of microalgae using the first derivative of absorbance and comparison with chlorophyll extraction method. *Environmental monitoring and assessment* 190 (2), DOI: 10.1007/s10661-018-6468-y.

American Public Health Association, 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* 22nd edition.

Arora, M., 2016. *Tetraselmis*: An Introduction. *The Botanica*, 66: 155-175. Avron, M. & Ben-Amotz, A., 1992. Ed: *Dunaliella*: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology Boca Raton: CRC Press.

Assunção, J., Guedes, A., Malcata, F.X., 2017. Biotechnological and pharmacological applications of biotoxins and other bioactive molecules from dinoflagellates. *Mar. Drugs* 15 (12), 393.

Bérard-Therriault, L., Poulin, M. & Bossé, L., 1999. Guide d'identification du phytoplancton marin de l'estuaire et du Golfe du Saint-Laurent incluant également certains protozoaires. *Publication Spéciale Canadienne des Sciences Halieutiques et Aquatiques* 128: 1-387.

Beutler, M., Wiltshire, K. H., Meyer, B. et al. (2002) A fluorometric method for the differentiation of algal populations in vivo and in situ. *Photosynth. Res.*, 72, 39–53.

Bobco, N., 2014. OPTIMIZED ANALYSIS OF VARIABLE CHLOROPHYLL FLUORESCENCE IN ALGAL PHYSIOLOGY UNDER STRESS CONDITIONS: MEASURING NOTHING WITH CONFIDENCE. Master thesis, California state university Monterey bay, 60 p.

Borowitzka, A., M., 2018. The mass culture of *Dunaliella salina*. Technical Resources Papers Regional Workshop on the Culture and Utilization of Seaweeds, vl. II, FAO.

Bricaud, A., Morel, A., Babin, M., Allali, K., Claustre, H., 1998. Variations of light absorption by suspended particles with chlorophyll a concentration in oceanic (case 1) waters: analysis and implications for bio-optical models. *J. Geophys. Res.* 103 (13), 31033–31044.

Cuellar-Bermudez, S.P., Garcia-Perez, J.S., Rittmann, B.E., Parra-Saldívar, R., 2015. Photosynthetic bioenergy utilizing CO₂: An approach on flue gases utilization for third generation biofuels. *J. Clean. Prod.* 98.

Do Nascimento, C.T., Nass, P.P., Fernandes, S.A., Vieira, R.K., Wagner, R., Jacob-Lopes, E., Zepka, Q.L., 2020. Exploratory data of the microalgae compounds for food purposes. *Data in Brief*, 29, 1-9. DOI. 10.1016/j.dib.2020.105182

Dziosa, K., Makowska, M., 2016. Monitoring of *Chlorella* sp. growth based on the optical density measurement. *Maintenance Problems*. 2, 197-205.

Ebenezer, V., Ki, J.S., 2013. Quantification of toxic effects of the herbicide metolachlor on marine microalgae *Ditylum brightwelli* (Bacillariophyceae), *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae), and *Tetraselmis suecica* (Chlorophyceae). *J. Microbiol.* 51 (1), 136–139.

Excoffieri, N., Bernard, C., Hamlaoui, S., Groleau, A. & C., Andarnaud, 2015. Quantifying phytoplankton communities using spectral fluorescence: the effects of species composition and physiological state. *J. Plankton Res.* (2015) 37(1): 233–247. doi:10.1093/plankt/fbu085.

Fuentes-Grunewald, C., Bayliss, C., Fonlut, F., Chapuli, E., 2016. Long-term dinoflagellate

culture performance in a commercial photobioreactor: *Amphidinium carterae* case. *Bioresour. Technol.* 218, 533–540.

Gallardo-Rodríguez, J., Sanchez-Miron, A., Garcia-Camacho, F., Lopez-Rosales, L., Chisti, Y., Molina-Grima, E., 2012. Bioactives from microalgal dinoflagellates. *Biotechnol. Adv.* 30 (6), 1673–1684.

García-Camacho, F., Sánchez-Mirón, A., Gallardo-Rodríguez, J., López-Rosales, L., Chisti, Y., Molina-Grima, E., 2014. Culture of microalgal dinoflagellates. In: Botana, L.M. (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection*, third ed. CRC Press, Boca Raton, pp. 551–566.

Geis, S.W., Fleming, K.L., Korthals, E.T., Searle, G., Reynolds, L., Karner, D.A., 2000. Modifications to the algal growth inhibition test for use as a regulatory assay. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 36–41.

Gómez, P. M., Romeral, G. J., Martorell, C.J., Aroca, S.A., 2016. Direct spectrophotometric method to determine cell density of *Isochrysis galbana* in serial batch cultures from a larger scale fed-batch culture in exponential phase. *NEREIS* 8, 35-43.

Grigoryeva, Y., N., 2020. Studying Cyanobacteria by Means of Fluorescence Methods: A Review. *IntechOpen*. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.93543>.

Guiry, M.D. in: Guiry, M.D. & Guiry, G.M., 2020. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>.

Havlik, I., Lindner, P., Scheper, T., Reardon, K.F., 2013. On-line monitoring of large cultivations of microalgae and cyanobacteria. *Trends Biotechnol.* 31 (7), 406–414.

Hugo Pereira, Jaime Páramo, Joana Silva, Ana Marques, Ana Barros, Dinis Maurício, Tamára Santos, Peter Schulze, Raúl Barros, Luísa Gouveia, Luísa Barreira & João Varela, 2018. Scale-up and large-scale production of *Tetraselmis* sp. CTP4 (Chlorophyta) for CO₂ mitigation: from an agar plate to 100-m³ industrial photobioreactors. *Scientific REPOrTS | (2018) 8:5112 | DOI:10.1038/s41598-018-23340-3*.

Ishikawa, C., Jomori, T., Tanaka, J., Senba, M., Mori, N., 2016. Peridinin, a carotenoid, inhibits proliferation and survival of HTLV-1-infected T-cell lines. *Int. J. Oncol.* 49 (4), 1713–1721.

Komárek, J., Kastovsky, J., Mares, J. & Johansen, J.R., 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera), using a polyphasic approach. *Preslia* 86: 295-335.

López-Rosales, L., García-Camacho, F., Sánchez-Mirón, A., Beato, E.M., Chisti, Y., Grima, E.M., 2016. Pilot-scale bubble column photobioreactor culture of a marine dinoflagellate microalga illuminated with light emission diodes. *Bioresour. Technol.* 216, 845–855.

Mani Arora, Arga Chandrashekar Anil, Frederik Leliaert, Jane Delany & Ehsan Mesbahi, 2013. *Tetraselmis indica* (Chlorodendrophyceae, Chlorophyta), a new species isolated from salt pans in Goa, India, *European Journal of Phycology*, 48:1, 61- 78, DOI: [10.1080/09670262.2013.768357](https://doi.org/10.1080/09670262.2013.768357)

Massjuk, N.P. & Lilitska, G.G., 2011. Prasinophyceae. In: *Algae of Ukraine: diversity, nomenclature, taxonomy, ecology and geography. Volume 3: Chlorophyta*. (Tsarenko, P.M., Wasser, S.P. & Nevo, E. Eds), pp. 17-20. Ruggell: A.R.A. Gantner Verlag K.-G.

Maxwell, K. and Johnson, G., 2000. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51(345).

Mikschofsky, H., Hammer, M., Schmidtke, J., König, P., Keil, G., Schirrmeier, H., Schmidt, K., Broer, I., 2009. Optimization of growth performance of freshly induced carrot suspensions concerning PMP production. *In Vitro Cel. Develop. Biol. Plant.* 45, 740–749.

Molina-Miras, A., Morales-Amador, A., de Vera, C., López-Rosales, L., Sánchez-Mirón, A., Souto, M., Fernández, J., Norte, M., García-Camacho, F., Molina-Grima, E., 2018. A pilot-scale bioprocess to produce amphidinols from the marine microalga *Amphidinium carterae*: isolation of a novel analogue. *Algal Res.* 31, 87–98.

Molina-Miras, A., López-Rosales, Sánchez-Mirón, A.L., Cerón-García, C.M., Seoane-Parrac, S., García-Camacho, F., Molina-Grima, E., 2018. Long-term culture of the marine dinoflagellate microalga *Amphidinium carterae* in an indoor LED-lighted raceway photobioreactor: Production of carotenoids and fatty acids. *Bioresource Technology* 265, 257-267.

Murray, S., Flo Jorgensen, M., Daugbjerg, N. & Rhodes, L., 2004. *Amphidinium* revisited. II. Resolving species boundaries in the *Amphidinium operculatum* species complex (Dinophyceae), including the descriptions of *Amphidinium trulla* sp. nov. and *Amphidinium gibbosum*. comb. nov.. *Journal of Phycology* 40: 366-382.

Nakayama, T., Suda, S., Kawachi, M. & Inouye, I., 2007. Phylogeny and ultrastructure of *Nephroselmis* and *Pseudoscourfieldia* (Chlorophyta), including the description of *Nephroselmis anterostigmatica* sp. nov. and a proposal for the Nephroselmidales ord. nov. *Phycologia* 46: 680-697.

Norris, R.E., Hori, T. & Chihara, M., 1980. Revision of the genus *Tetraselmis* (Class Prasinophyceae). *Botanical Magazine, Tokyo* 93: 317-339.

Ji, M.-K.; Yun, H.-S.; Hwang, B.S.; Kabra, A.N.; Jeon, B.-H.; Choi, J., 2016. Mixotrophic cultivation of *Nephroselmis* sp. using industrial wastewater for enhanced microalgal biomass production. *Ecol. Eng.*, 95, 527–533.

Oren, A., 2014. The ecology of *Dunaliella* in high-salt environments. *Journal of Biological Research*, 21:23.

Padovan, A., 1992. Isolation and culture of five species of freshwater algae from the alligator rivers region, northern territory. Technical Memorandum No. 37. Australian Government Publishing Service. Canberra.

Parke, M. & Dixon, P.S., 1976. Check-list of British marine algae - third revision. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 56: 527-594.

Park, S., Ahn, Y., Pandi, K., Ji, M.K., Yun, H.-S., Choi, J.-Y., 2019. Microalgae Cultivation in Pilot Scale for Biomass Production Using Exhaust Gas from Thermal Power Plants. In: João Fernando Pereira Gomes (ed.) Optimization of Biodiesel, Methanol and Methane Production and Air Quality Improvement. *MDPI Energies*, 12, 3497, 14-23

- Pereira, H. *et al.*, 2016. Isolation of a euryhaline microalgal strain, *Tetraselmis* sp. CTP4, as a robust feedstock for biodiesel production. *Sci. Rep.* **6**, 35663–final page.
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T. & Bux, F., 2013. Biodiesel from microalgae: a critical evaluation from laboratory to large scale production. *Appl. Energy*. **103**, 444–467.
- Ravindran, B., Gupta, K.S., Won-Mo Cho, Kim, K.J., Lee, R.S., Jeong, K.-H., Lee, J.D., and Choi, H.-C., 2016. Microalgae Potential and Multiple Roles—Current Progress and Future Prospects—An Overview. 2016. *Sustainability* **8**(12):1215 DOI: 10.3390/su8121215.
- Ribeiro-Rodrigues, L.H., Arenzon, A., Raya-Rodriguez, M.T., Fontoura, N.F., 2011. Algal density assessed by spectrophotometry: a calibration curve for the unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *J. Environ. Chem. Ecotoxicol.* **3** (8), 225–228.
- Richardson, T. L., Lawrenz, E., Pinckney, J. L. et al. (2010) Spectral fluorometric characterization of phytoplankton community composition using the Algae Online Analyserw. *Water Res.*, **44**, 2461–2472.
- Rodolfi, L. *et al.*, 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **102**, 100–112.
- Rosas, L., Riveros, H.G., 1990. *Iniciación al método científico experimental*. 2nd edition. Ed. Trillas, México, D.F.
- Santhose, I., Gnanadoss, J., Ramganes, S., Elumalai, S., 2011. Enhanced Carotenoid Synthesis of *Phormidium* sp. in Stressed Conditions. *Journal of Experimental Sciences*, **2**, (3), 38-44.
- Santos-Ballardo, U. D., Rossi, S., Hernandez, V., Vázquez Gómez, R., Rendón-Unceta, C. M., Caro-Corrales, J., Valdez-Ortiz, A., 2015. A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important microalgae species in aquaculture. *Aquaculture* **448**, 87-92.
- Shen, Y., 2014. Carbon dioxide bio-fixation and wastewater treatment via algae photochemical synthesis for biofuels production. *RSC Adv.* **4**, 49672–49722.
- Schulze, P. S. *et al.*, 2017. Urban wastewater treatment by *Tetraselmis* sp. CTP4 (Chlorophyta). *Bioresour. Technol.* **223**, 175–183.
- Sluiman, H.J., Guihal, C. & Mudimu, O., 2008. Assessing phylogenetic affinities and species delimitations in Klebsormidiales (Streptophyta): nuclear-encoded rDNA phylogenies and ITS secondary structure models in *Klebsormidium*, *Hormidiella*, and *Entransia*. *Journal of Phycology* **44**(1): 183-195.
- Steidinger, K.A. & Tangen, K., 1996. Dinoflagellates. In: *Identifying Marine Phytoplankton*. (Tomas, C.R. Eds), pp. 387-584. San Diego: Academic Press.
- Thronsdon, J., 1996. The planktonic marine flagellates. In: *Identifying marine phytoplankton*. (Tomas, C.R. Eds), pp. 591-730. San Diego: Academic Press.

Valer, R.M., Glock, L., 1998. Quantificação de algas clorofíceas de interesse ecotoxicológico a través do método espectrofotométrico. *Acta Limnol. Bras.* 11 (2), 149–156.

Videau, P., Wells, K., Singh, A., Eiting, J., Proteau, P. & B., Philmus, 2019. Expanding the Natural Products Heterologous Expression Repertoire in the Model Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120: Production of Pendolmycin and Teleocidin B-4. *ChemRxiv*, 1- 78. <http://doi.org/10.26434/chemrxiv.11316098.v1>

Yalcin, D., Katircioğlu, T.H., Özer, T., Shamchi, P.M., Acikgoz Erkaya, A. İl., 2020. Evaluation of phytotherapeutic activities and phytochemical content of *Phormidium autumnale* Gomont from natural freshwater sources. *Environ. Monit. Assess.* 192: 244, 1-11. DOI. 10.1007/s10661-020-8207-4.

Yoder, A., J., Moore, K., J. & S., N., Robert., 2001. Putting together the big picture: Remote-sensing observations of ocean color. *Oceanography*, 14 (4), 33-40.

Ζαφειρόπουλος, Β., Λαπιδάκης, Ν., Χατζάκη, Ε., 2007. Πειραματική μελέτη πάνω στην ανίχνευση της χλωροφύλλης και άλλων δεικτών ποιότητας διαφορετικών τύπων ελαιολάδου και σπορέλαιων για γρήγορο έλεγχο της υποβάθμισης της ποιότητας. Εφαρμογή του Φθορισμού σαν μία εναλλακτική μέθοδο, ελέγχου της ποιότητας του ελαιολάδου. Πτυχιακή εργασία. Τμήμα Διατροφής και Διαιτολογίας, Τ.Ε.Ι. Κρήτης.