

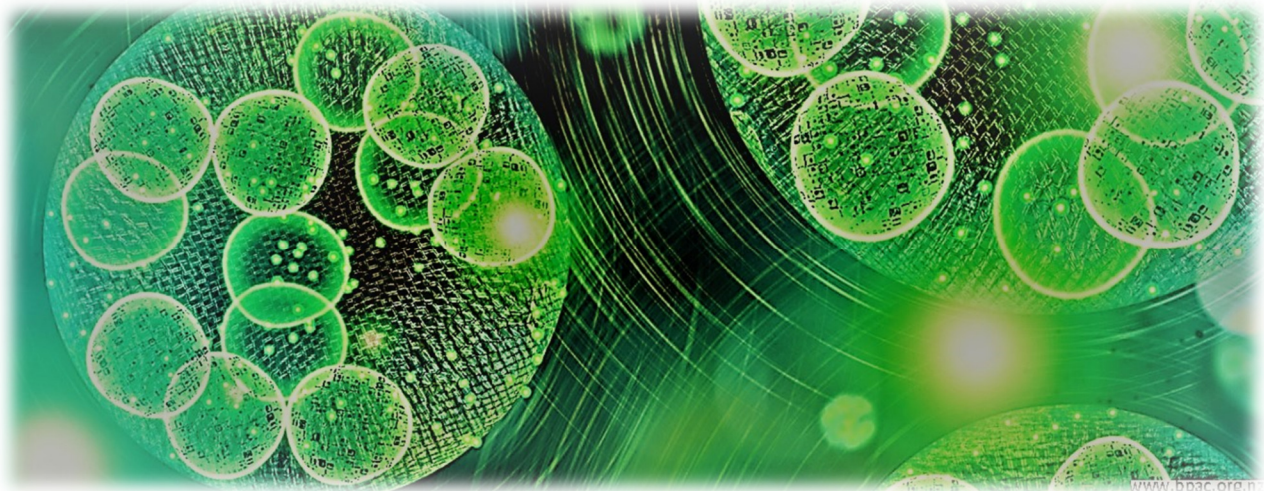


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΑΛΙΕΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΩΣΙΜΗ ΑΛΙΕΙΑ-ΥΔΑΤΙΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μελέτη της αύξησης των καλλιεργειών ειδών φυτοπλαγκτού
απομονωθέντων από αλμυρά νερά της Δ. Ελλάδας.»**



Κολυροπούλου Σαββούλα (Γεωπόνος Π.Ε.)

Επίβλεψη
Χώτος Γεώργιος,
Καθηγητής Πανεπιστημίου Πατρών

Μεσολόγγι, 2021

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με βοήθησαν και με στήριξαν.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου Κο Γεώργιο Χώτο για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την εργασία αυτή, η οποία μου ταίριαζε και με έμαθε πολλά για τον υπέροχο κόσμο των μικροφυκών, αλλά και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου και την υπέροχη συνεργασία που είχαμε όλους αυτούς τους μήνες στο πρόγραμμα ALGAVISION.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κα Δέσποινα Αβραμίδου για τη σημαντική συμβολή της στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Τέλος ευχαριστώ το σύζυγο μου Γιώργο για την απεριόριστη κατανόηση και τη ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχε.

*Η παρούσα εργασία διεκπεραιώθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο: «Απομόνωση και καλλιέργεια τοπικών ειδών φυτοπλαγκτού από λιμνοθάλασσες με απώτερο σκοπό την μαζική παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών, λιπαρών οξέων, χρωστικών και αντιοξειδωτικών» (ακρωνύμιο: ALGAVISION), Τ6ΥΒΡ - 00222, **MIS/ ΚΩΔ.ΠΡΟΓΡ:** 5048496 του ΕΠΑνΕΚ 2014-2020 και εκτελείται με επιστ. υπεύθυνο στο σκέλος που αφορά το Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, Αλιείας & Υδατοκαλλιεργειών τον καθηγητή κ. Γεώργιο Χώτο και με επιστ. υπεύθυνο του όλου προγράμματος τον αναπλ. καθηγητή του Βιολογικού Τμήματος Παν. Πατρών κ. Πάυλο Μακρίδη.*

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η επίδραση των παραγόντων ένταση φωτισμού και αλατότητα στην ανάπτυξη των ειδών *Tetraselmis sp.*, *Dunaliella salina* και *Phormidium sp.* απομονωμένων από τα αλμυρά νερά της Δ. Ελλάδας.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικό θάλαμο καλλιέργειας, σταθερής θερμοκρασίας (19-24°C) και φωτοπεριόδου (16h φως: 8h σκοτάδι), με παροχή αέρα. Τα *Phormidium sp.* και *Tetraselmis sp.* καλλιεργήθηκαν σε αλατότητες 20ppt, 40ppt και 60ppt ενώ το *Dunaliella salina* σε 20ppt, 40ppt, 60ppt και 100ppt και σε 2 εντάσεις φωτισμού, χαμηλή 2000 lux και υψηλή 8000 lux.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι στην υψηλή ένταση φωτισμού 8000lux και τα 3 μικροφύκη εμφάνισαν τη βέλτιστη ανάπτυξη τους αλλά και τη βέλτιστη απόδοση τους σε βιομάζα (για τα *Tetraselmis sp.* και *Phormidium sp.*). Το *Tetraselmis sp.* εμφάνισε διπλάσια βιομάζα από το *Phormidium sp.* μέχρι τη 15^η ημέρα της καλλιέργειας ενώ κάθε είδος έδειξε διαφορετική προτίμηση σε αλατότητα με το *Dunaliella salina* να εμφανίζει μέγιστη ανάπτυξη στη χαμηλή αλατότητα 20ppt παρόλο που είναι ένα είδος που ανέχεται ακραίες αλατότητες έως και 300ppt, το *Tetraselmis sp.* στη μεσαία και υψηλή (40ppt και 60ppt) ενώ το *Phormidium sp.* στη υψηλή αλατότητα 60ppt.

Abstract

At the present study is being examined the effect of light intensity and salinity on the growth of *Tetraselmis sp.*, *Dunaliella salina* and *Phormidium sp.* isolated from marine waters of Western Greece.

The samples were placed in a special culture chambers with constant temperature (19-24oC) and photoperiod (16h light: 8h dark), with air supply. *Phormidium sp.* and *Tetraselmis sp.* were grown in salinities of 20ppt, 40ppt and 60ppt while *Dunaliella salina* in 20ppt, 40ppt, 60ppt and 100ppt, and all of them in 2 light intensities, low 2000 lux and high 8000 lux.

The results of the experiments showed that at high light intensity (8000 lux) all 3 microalgae had their optimal growth and optimal performance in biomass (for *Tetraselmis sp.* and *Phormidium sp.*). *Tetraselmis sp.* showed twice as much biomass as *Phormidium sp.* up to the 15th day of cultivation while each species showed a different salinity preference with *Dunaliella salina* showing maximum growth at low salinity of 20ppt although it is a species that tolerates extreme salinities up to 300ppt, *Tetraselmis sp.* in medium and high (40ppt and 60ppt) while *Phormidium sp.* at high salinity 60ppt.

Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	2
Περίληψη.....	3
Abstract	3
A. Εισαγωγή.....	7
1. Ταξινόμηση.....	8
2. Δομή Ευκαρυωτικών φυκικών κυττάρων.....	10
3. Δομή Κυανοβακτηρίου	11
4. Δέσμευση Αζώτου	13
5. Φωτοσύνθεση	13
6. Ανοξυγενής Φωτοσύνθεση	19
7. Φωτοαναπνοή	19
8. Φωτοαναστολή.....	21
9. Φωτοεγκλιματισμός	23
10. Σχηματισμός ανθρακικών από τα φύκη – ενασβέστωση.....	23
11. Προβλήματα Φυκών Έναντι Φυτών Ξηράς	23
12. Αντιμέτωπιση προβλημάτων απόκτησης άνθρακα (CCMs).....	25
13. Βιολογικές χρωστικές	27
14. Νόμος Lambert-Beer - Φασματοφωτόμετρο απλής δέσμης	31
15. Εφαρμογές Φυκών	33
16. Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών	38
16.1 Φωτισμός.....	38
16.2 Θερμοκρασία.....	39
16.3 pH	40
16.4 Αλατότητα.....	41
16.5 Αερισμός.....	42
16.6 Θρεπτικά Συστατικά	43
17. Συστήματα καλλιεργειών	44
18. <i>Dunaliella salina</i>	48
19. <i>Tetraselmis sp.</i>	50
20. <i>Phormidium sp.</i>	51
B. Υλικά και Μέθοδοι	52
Γ. Αποτελέσματα	57

1. <i>Tetraselmis sp.</i>	57
1.1 Προσδιορισμός κυτταρικής πυκνότητας	57
α) με μικροσκόπιο	57
β) Οπτική απορρόφηση	62
1.2 Προσδιορισμός pH	68
1.3 Προσδιορισμός Βιομάζας	72
1.4 Προσδιορισμός Εδικού Ρυθμού Αύξησης (μ) και Χρόνου Γενεάς (tg) της Καλλιέργειας	73
2. <i>Dunaliella salina</i>	75
2.1 Προσδιορισμός κυτταρικής πυκνότητας	75
α) με μικροσκόπιο	75
β) με οπτική απορρόφηση	81
2.2 Προσδιορισμός καμπύλης βαθμονόμησης	87
2.3 Προσδιορισμός pH	89
2.4 Προσδιορισμός Εδικού Ρυθμού Αύξησης (μ) και Χρόνου Γενεάς (tg) της Καλλιέργειας	92
3. <i>Phormidium sp.</i>	94
3.1 Προσδιορισμός πυκνότητας καλλιέργειας	94
α) με μέτρηση Ξηρού Βάρους	94
β) με οπτική απορρόφηση	97
3.2 Προσδιορισμός βιομάζας	102
3.3 Προσδιορισμός καμπύλης βαθμονόμησης	102
3.4 Προσδιορισμός pH	104
Δ. Συζήτηση	107
1. Φωτισμός	107
2. Αλατότητα	108
3. <i>Tetraselmis sp.</i>	111
3.1 Ανάπτυξη Πληθυσμού	111
3.1.1. Φωτισμός	111
3.1.2. Αλατότητα	112
3.2 Βιομάζα	117
3.3 Ρυθμός Αύξησης	118
3.4 pH	119
3.5 Συμπέρασμα <i>Tetraselmis sp.</i>	119
2. <i>Dunaliella salina</i>	120
2.1 Ανάπτυξη	120
2.1.1. Φωτισμός	120

2.1.2. Αλατότητα.....	121
2.2 Βαθμονόμηση.....	126
2.3 pH.....	127
2.4 Φάσεις Ανάπτυξης.....	127
2.5 Ρυθμός Αύξησης.....	127
2.6 Συμπέρασμα για <i>Dunaliella salina</i>	128
3. <i>Phormidium sp.</i>	128
3.1 Ανάπτυξη	128
3.2. Βαθμονόμηση.....	133
3.3 Βιομάζα.....	133
3.4 pH.....	133
3.5 Συμπέρασμα για <i>Phormidium sp.</i>	134
Ε. Συμπεράσματα	134
ΣΤ. Βιβλιογραφία.....	135

A. Εισαγωγή

Η καλλιέργεια των φυκών παρουσιάζει ολοένα αυξανόμενη ανάπτυξη όχι μόνο λόγω της ζήτησης των καλλιεργούμενων ειδών για την ανθρώπινη διατροφή και την παρασκευή φαρμακευτικών ουσιών και συμπληρωμάτων, αλλά και λόγω νέων εφαρμογών όπως τα βιοκαύσιμα.

Τα φύκη συνιστούν μια μεγάλη και εξαιρετικά ετερογενή ομάδα οργανισμών με τεράστιες μεταξύ τους διαφορές σε επίπεδο κυτταρικής δομής, μορφολογίας, φυσιολογίας και φυλογένεσης. Τα φύκη ορίζονται ως «θαλλόφυτα (φυτά χωρίς ρίζες, βλαστούς και φύλλα) που έχουν ως κύρια φωτοσυνθετική χρωστική τη χλωροφύλλη-α και τα αναπαραγωγικά τους κύτταρα δεν περιβάλλονται από άγονα επικαλυπτικά κύτταρα». Στα φύκη συμπεριλαμβάνονται οργανισμοί που δεν εμπίπτουν αυστηρά σε αυτόν τον ορισμό, όπως π.χ. τα κυανοβακτήρια που φυλογενετικά είναι πιο κοντά στα βακτήρια απ' ό,τι στα υπόλοιπα φύκη. Κατά συνέπεια, τα φύκη οριοθετούνται κυρίως μέσω των οικολογικών και φυσιολογικών χαρακτηριστικών τους. Το βασικό ενδιαίτημα των φυκών είναι τα υδάτινα συστήματα κάθε είδους, λίμνες, ποτάμια, παράκτιες περιοχές και ωκεανοί, στα οποία ζουν είτε ως επιπλέοντες ή κολυμβητικοί οργανισμοί που αποτελούν το **φυτοπλαγκτό** ή ως βενθικοί οργανισμοί προσκολλημένοι στον θαλάσσιο πυθμένα, σε βράχους ή σε άλλα υποστρώματα αβαθών υδάτων, συν-αποτελώντας το περίφυτο (Γκέλης, 2015).

Η μορφολογία των φυκών είναι ποικίλη, από τα μικροσκοπικά μονήρη κύτταρα μέχρι τα γιγάντια θαλάσσια μακροφύκη. Πολλά μονοκύτταρα είδη εμφανίζονται ως κοκκοειδή φύκη που έχουν τη μορφή μικρών σφαιρών. Άλλα είδη φυκών σχηματίζουν αποικίες, όπως τα κοινόβια. Ένας κοινός μορφότυπος είναι το νήμα, γραμμική σειρά κυττάρων ενωμένων από άκρη σε άκρη που μπορεί να συντίθεται από μία, δύο ή περισσότερες σειρές κυττάρων. Στα μακροφύκη, οι θαλλοί είναι κατά κανόνα κοινοκυτταρικοί (ένα πολύ μεγάλο πολυπύρηνο κύτταρο) ή παρεγχυματώδεις (τρισδιάστατες σειρές κυττάρων) ή ψευδοπαρεγχυματώδεις (φαίνεται να συντίθενται από ιστό, αλλά κατά βάση είναι νηματοειδείς) (Γκέλης, 2015).

Τα φύκη αναπαράγονται αγενώς με μιτωτικές διαιρέσεις των βλαστητικών τους κυττάρων από τα οποία προκύπτουν δύο θυγατρικά κύτταρα, ή εγγενώς με σπόρια. Τα σπόρια δημιουργούνται από βλαστητικά κύτταρα με μιτωτικές διαιρέσεις και διακρίνονται στα πλανοσπόρια (κύτταρα με μαστίγια) και στα απλανοσπόρια (κύτταρα χωρίς μαστίγια). Τα σπόρια ακολούθως βλαστάνουν και δίνουν πανομοιότυπα με το μητρικό φύκος κύτταρα. Αρκετά φύκη αναπαράγονται εγγενώς (ή και εγγενώς) με τη σύντηξη δύο απλοειδών γαμετών σε ζυγώτη. Η εγγενής αναπαραγωγή των φυκών ποικίλλει σημαντικά στις διαφορετικές ομάδες και συνοδεύεται από πληθώρα μορφολογικών διαφοροποιήσεων στις επιμέρους φάσεις του κύκλου ζωής (απλοειδής, διπλοειδής). Ανάλογα με το μέγεθος τους τα φύκη διακρίνονται σε δυο μεγάλες ομάδες:

(α) στα **μικροφύκη** (δεν είναι ορατά με γυμνό μάτι) και έχουν μέγεθος από **0,2 μm - 200 μm** που απαντούν σε ορισμένες αποικιακές μορφές κυανοβακτηρίων και

(β) στα **μακροφύκη**, των οποίων το μέγεθος (κυρίως το μήκος τους) κυμαίνεται από **λίγα χιλιοστά** έως μερικές **δεκάδες μέτρα**, (πχ οι γιγάντιες κέλπιες που φτάνουν τα 60m) (Γκέλης, 2015).

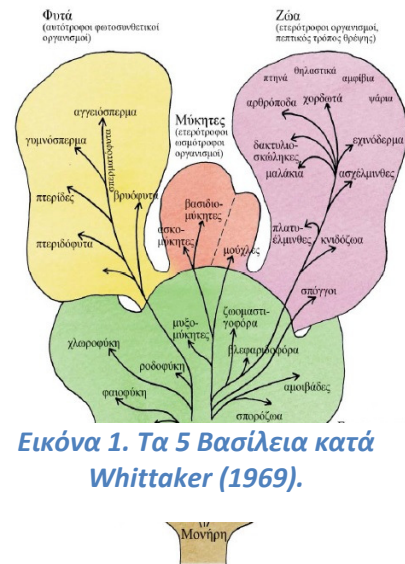
Οι βασικότερες ομάδες **μικροφυκών** είναι τα:

- Κυανοβακτήρια (Cyanobacteria ή Cyanophyta),

- Χλωροφύκη (Chlorophyta),
- φωτοσυνθετικά Σταχυομαστιγωτά με κύριες υποδιαίρεσεις τα:
 - ❖ Χρυσοφύκη (Chrysophyceae),
 - ❖ Διάτομα (Bacillariophyceae)
 - ❖ Ευστιγματοφύκη (Eustigmatophyceae)
 - ❖ Ραφιδοφύκη (Raphidophyceae)
- Απτόφυτα (Haptophyta)
- Κρυπτοφύκη (Cryptophyta)
- Δινοφύκη (Dinophyta).

Αντίστοιχα, οι βασικότερες ομάδες **μακροφυκών** είναι τα:

- Χλωρόφυτα (Chlorophyta)
- Ροδόφυτα (Rhodophyta)
- Φαιοφύκη (Phaeophyceae), τα οποία ανήκουν επίσης στη μεγάλη υπερομάδα των φωτοσυνθετικών σταχυομαστιγωτών. (Χώτος, 2018)



Εικόνα 1. Τα 5 Βασίλεια κατά Whittaker (1969).

1. Ταξινόμηση

Τα φύκη (algae) στον ενικό το φύκος (επονομάζονται λανθασμένα και άλγες) χαρακτηρίζονται συλλογικά από πολλές ταξινομικές ομάδες φωτοσυνθετικών οργανισμών που δεν ανήκουν σε ένα Βασίλειο. Στην κατηγορία αυτή των φυκών περιλαμβάνονται προκαρυωτικοί (κυανοβακτήρια) και ευκαρυωτικοί οργανισμοί (μονοκύτταροι και πολυκύτταροι νηματοειδείς και μακροφύκη) (Χώτος, 2018).

Η συστηματική κατάταξη των φυκών είναι μια περιπλεγμένη κατάσταση εξαιτίας των διαφορετικών «σχολών» που υπάρχουν. Υπάρχουν επιστήμονες που τα κατατάσσουν στο Βασίλειο Φυτά και στο φύλο θαλλόφυτα. Όμως δεν είναι φυτά και πρέπει να κατατάσσονται στο Βασίλειο Πρώτιστα. Ένα άλλο πεδίο που επιφέρει σύγχυση είναι η κατάταξη κάποιων κατηγοριών φυκών από άλλους σε επίπεδο Φύλου και από άλλους σε επίπεδο Ομοταξίας. Παλαιότερα πριν εξελιχθούν οι μικροσκοπικές και μοριακές τεχνικές βασικό κριτήριο της κατάταξης ήταν η μορφολογία του θαλλού τους. Σήμερα όμως παρόλο που η μορφολογία αποτελεί βασικό εργαλείο αναγνώρισης τους, οι μοριακές τεχνικές έχουν αποκαλύψει φυλογενετικές σχέσεις που αναδιαμορφώνουν το ταξινομικό τοπίο. (Χώτος, 2018).

Σύμφωνα με τον Whittaker (1969) οι οργανισμοί κατατάσσονται στα παρακάτω 5 βασίλεια:

1. Μονήρη
2. Πρώτιστα
3. Μύκητες
4. Φυτά
5. Ζώα

Σύμφωνα με αυτή την ταξινόμηση τα φύκη ανήκουν στα Βασίλεια Πρώτιστα και Μονήρη. Στο Βασίλειο Πρώτιστα ανήκουν τα ευκαρυωτικά φύκη. Στο Βασίλειο Μονήρη ανήκουν τα προκαρυωτικά (κυανοβακτηριακά) φύκη.

Τα τελευταία χρόνια με την εμφάνιση των φυλογενετικών αναλύσεων έχει ξεκινήσει μια εκτεταμένη αναδιάρθρωση και αναθεώρηση της ταξινόμησης των ειδών. Σήμερα έχει καθιερωθεί το σύστημα των 6 βασιλείων τα οποία είναι :

1. Αρχαία
2. Ευβακτήρια ή μονήρη
3. Πρωτόζωα
4. Μύκητες
5. Φυτά
6. Ζώα (Χώτος, 2018)

Τα φύκη είναι υδρόβιοι οργανισμοί και εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία ειδών σε πολλές ανόμοιες ομάδες. Όπως προαναφέρθηκε άλλα είδη είναι πολύ μικρά και άλλα είναι πολύ μεγάλα. Συνεχώς καταγράφονται νέα είδη και εκτιμάται ότι το υπάρχουν πάνω από 50.000 είδη. Δεν έχουν φύλλα, ρίζες, αγγεία, βλαστούς, άνθη, σπέρματα και καρπούς. Αντί για σπέρματα παράγουν σπόρια. Συνεπώς τα φύκη δεν είναι φυτά, επειδή διαφέρουν κατά πολύ από αυτά. Ο θαλλός τους μπορεί να είναι απλός έως πολύπλοκος (όπως στα πολυκύτταρα φύκη)(Χώτος, 2018).

Ο οικολογικός τους ρόλος είναι πολύ μεγάλος και υπολογίζεται ότι πάνω από το 50% του φωτοσυνθετικώς παραγόμενου οξυγόνου προέρχεται από τα φύκη. Επίσης μεγάλο μέρος των φυκών αποτελεί το φυτοπλαγκτόν και αποτελεί τη βάση της τροφικής αλυσίδας. Το μεγαλύτερο ποσοστό των φυκών είναι φωτοαυτότροφοι υπάρχουν όμως και μικροφύκη που έχουν την ικανότητα όχι μόνο να ακολουθούν διάφορους τύπους μεταβολισμού, αλλά και να εναλλάσσουν τον μεταβολισμό τους ανάλογα με τη διαθέσιμη πηγή ενέργειας και άνθρακα που υπάρχει στο περιβάλλον (Χώτος, 2018).

Ανάλογα το μεταβολικό τους τύπο τα φύκη διακρίνονται σε:

1. **φωτοαυτότροφοι:** η πιο συνηθισμένη περίπτωση κατά την οποία τα φύκη αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας ως πηγή ενέργειας το ηλιακό φως και ως πηγή άνθρακα το CO₂.
2. **Ετερότροφοι:** στην περίπτωση αυτή, πολλά μικροφύκη χρησιμοποιούν όπως οι τυπικοί ετερότροφοι οργανισμοί(τα ζώα) ως πηγή ενέργειας και άνθρακα διάφορες οργανικές ουσίες όπως γλυκόζη, οξικό οξύ, γλυκερίνη, κ.λπ.
3. **Μικτότροφοι:** αποτελούν συνδυασμό των δύο προηγούμενων περιπτώσεων. Πολλά μικροφύκη(π.χ. δινοφύκη, χρυσοφύκη και ευγληνοφύκη) είναι σε θέση να αυξάνονται είτε ως φωτοαυτότροφοι είτε ως ετερότροφοι οργανισμοί. Ορισμένα μάλιστα μπορούν να εναλλάσσουν τον μεταβολισμό τους από την αυτοτροφία στην ετεροτροφία και αντίστροφα.
4. **φωτοετερότροφοι:** στον τύπο αυτό ορισμένα μικροφύκη χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας τη φωτεινή ενέργεια και ως πηγή άνθρακα τις οργανικές ενώσεις. (Γκέλης, 2015).

Επομένως είναι δύσκολο να δοθεί ένας πλήρης ορισμός αλλά θα μπορούσαμε να πούμε ότι:

«Ως φύκη ορίζουμε εκείνους τους προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς όπου στο κύτταρο τους υπάρχει χλωροφύλλη, δεν διαθέτουν ρίζες, αγγεία, κορμό και φύλλα και τα αναπαραγωγικά τους κύτταρα δεν περιβάλλονται από άγονα επικαλυπτικά κύτταρα.» (Χώτος, 2018).

2. Δομή Ευκαρυωτικών φυκικών κυττάρων

Το φυκικό κύτταρο αποτελείται εξωτερικά από το κυτταρικό τοίχωμα που προσδίδει σταθερό σχήμα στο κύτταρο. Εσωτερικά του βρίσκεται η εύκαμπτη μεμβράνη. Εντός του κυττάρου υπάρχει το κυτταρόπλασμα και ο πυρήνας.

Εντός του κυτταροπλάσματος υπάρχει το ενδοπλασματικό δίκτυο (αδρό και λείο), το σύμπλεγμα Golgi, τα μιτοχόνδρια, τα χυμοτόπια, τα λυσοσώματα και οι χλωροπλάστες.

Οι χλωροπλάστες είναι οργανίδια (πλαστίδια) στα οποία λαμβάνει χώρα η φωτοσύνθεση. Οι χλωροπλάστες αποτελούνται από:

1. Την εξωτερική μεμβράνη
2. Το διαμεμβρανικό χώρο
3. Την εσωτερική μεμβράνη
4. Το στρώμα
5. Το εσωτερικό θυλακοειδούς (lumen)
6. Τη θυλακοειδή μεμβράνη
7. Τα grana
8. Το θυλακοειδές
9. Συσσωματώματα αμύλου
10. Ριβοσώματα
11. Dna
12. ΛιπιδΟΣφαιρίδια



Εικόνα 2. Δομή χλωροπλάστη.

Τα **θυλακοειδή** είναι επίπεδοι στρογγυλεμένοι σχηματισμοί και ομαδοποιούνται σχηματίζοντας τα grana. Κάθε granum αποτελείται από 2-100 θυλακοειδή. Κάθε χλωροπλάστης μπορεί να περιέχει 40-60 grana.

Η χλωροφύλλη στοιβάζεται σε μορφή κόκκων, τα **κβαντοσώματα** που βρίσκονται στα τοιχώματα των θυλακοειδών. Οι αντιδράσεις φωτός της φωτοσύνθεσης γίνονται μέσα σε αυτά τα κβαντοσώματα, ενώ ο κύκλος του κάλβιν ή αλλιώς οι σκοτεινές αντιδράσεις (δεν απαιτούν φως για να πραγματοποιηθούν) στο στρώμα που περιβάλλει τα ελάσματα των χλωροπλάστων.

Οι χλωροπλάστες παράγουν υδατάνθρακες πλούσιους σε ενέργεια οι οποίοι διασπώνται στα μιτοχόνδρια και η ενέργεια που απελευθερώνεται από τη διάσπαση τους χρησιμοποιείται για το σχηματισμό της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Η ATP χρησιμοποιείται σε όλες τις βιοχημικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στο κύτταρο (Χώτος, 2016).

3. Δομή Κυανοβακτηρίου

Τα κυανοβακτήρια παρουσιάζουν μια ποικιλία τύπων θαλλού από μονήρη κύτταρα (μονοκύτταρα) έως πιο σύνθετες μορφές πολυκυτταρικής δομής. Κάποια είδη παράγουν **βλέννη** κολλώδους υφής, που βοηθά το σχηματισμό ομάδων κυττάρων (αποικιών). Κύτταρα συνδεδεμένα σε σειρές εμφανίζονται με τη μορφή **νήματος** που ονομάζεται και τρίχωμα. Τα κύτταρα μερικών νημάτων συνδέονται με μικροσκοπικούς διαύλους (μικροπλασμοδέσμες) οι οποίες επιτρέπουν την επικοινωνία των κυττάρων και τη μεταφορά. Τα νήματα ενδέχεται να καλύπτονται από μια στρώση βλέννης που ονομάζεται κολεός. Πολλά νηματοειδή κυανοβακτήρια παράγουν κύτταρα γνωστά ως **ετερόκυτα** ή **ετεροκύστες**, τα οποία είναι εξειδικευμένα για να εξυπηρετούν τη δέσμευση του αζώτου (Graham et al., 2011).

Βλέννη

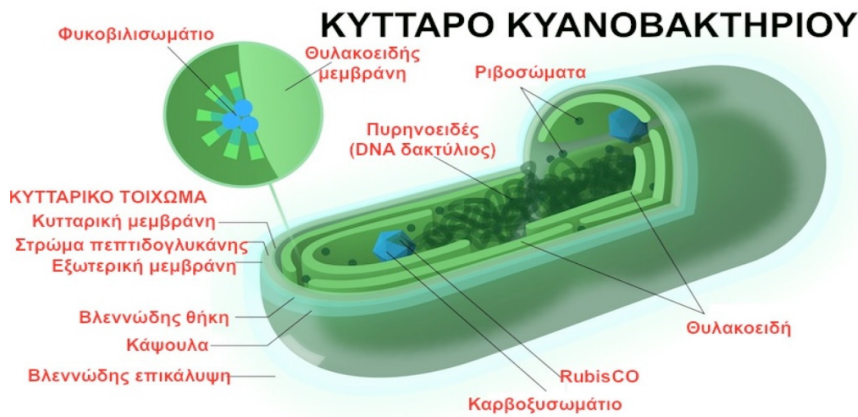
Τα κύτταρα των κυανοβακτηρίων είναι συνήθως σφαιρικά ή κυλινδρικά με δύσκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα. τα κυτταρικά τοιχώματα πολλών κυανοβακτηρίων περιβάλλονται από βλέννη. Έχει διάφορους σημαντικούς ρόλους και βοηθά στο σχηματισμό αποικιών προστατεύοντας έτσι τα κύτταρα από ενδεχόμενη βλάβη. Τα κυανοβακτήρια που έχουν βλεννώδεις θήκες επιβιώνουν σε ενδιαιτήματα εκτεθειμένα στον ήλιο. Η βλέννη μπορεί επίσης να βοηθά στην πλευστότητα και να αποτρέπει τους φυτοβόρους (καταναλώνουν φύκη ή φυτά ανάλογα του μεγέθους τους) θηρευτές (Reynolds et al., 1991) ή να φιλοξενεί μεγάλους πληθυσμούς μικρότερων βακτηριακών εταίρων.

Κυτταρικό Τοίχωμα

Το κυτταρικό τοίχωμα των κυανοβακτηρίων όπως και των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων αποτελείται από πεπτιδογλυκάνη. Αυτή είναι συχνά παχύτερη από εκείνη των άλλων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Ένας φάκελος (λιποπολυσακχαριτικός) εσωκλείει την πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος των κυανοβακτηρίων (όπως σε όλα τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια). Ο εξωτερικός αυτός φάκελος ενδέχεται να περιέχει καρτενοειδή και άλλα χημικά συστατικά που δεν υπάρχουν σε άλλα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Hoiczuk & Hansel 2000). Τα κυτταρικά τοιχώματα σχετίζονται με την κινητικότητα ή άλλες λειτουργίες. Επίσης μερικά κυανοβακτήρια κινούνται εκτοξεύοντας βλέννη μέσω μικρών πόρων που υπάρχουν σε όλο το κυτταρικό τοίχωμα (Hoiczuk & Hansel 2000).

Κυτόπλασμα

Στο κυτόπλασμα διακρίνονται τα **θυλακοειδή**, τα **καρβοξυσώματα**, αρκετοί τύποι **αποθησαυριστικών σωματιδίων** και **αεροτόπια**.



Εικόνα 3. Δομή κυττάρου κυανοβακτηρίου (Χώτος, 2018).

Θυλακοειδή: είναι φωτοσυνθετικές μεμβράνες που περιέχουν χλωροφύλλη-α και άλλα φωτοσυνθετικά συστατικά. Στην επιφάνεια τους εντοπίζονται τα **φυκοβιλισώματα**, τα οποία είναι ημισφαιρικά και περιέχουν συγκεκριμένες βοηθητικές φωτοσυνθετικές χρωστικές. Τα θυλακοειδή πλην μερικών εξαιρέσεων δεν συσσωρεύονται αλλά διατάσσονται κατά συγκεκριμένους κύκλους στην περιφέρεια των κυττάρων (Graham et al., 2011).

Καρβοξυσώματα: είναι πολυγωνικές συναθροίσεις του ενζύμου Rubisco και αποτελούν τη θέση δέσμευσης του άνθρακα στα κυανοβακτηριακά κύτταρα (Graham et al., 2011).

Αποθησαυριστικά: είναι η **κυανοφυκίνη** που λειτουργεί ως αποθήκη αζώτου, τα σωματίδια κυανοβακτηριακού αμύλου που λειτουργούν ως αποθήκες υδατανθράκων, λιπίδια τα οποία πιθανώς αποθηκεύονται ως κυτοπλασματικά σταγονίδια, ανόργανα φωσφορικά ιόντα που εμφανίζονται ως μικρά σφαιρίδια με εντονότερο χρωματισμό από εκείνο των ριβοσωμάτων (Graham et al., 2011).

Αεροτόπια: Οι δομές αυτές δεν περιέχουν όντως αέριο. Πρόκειται για συναθροίσεις κοίλων κυλίνδρων με τοιχώματα πάχους 2nm. Τα τοιχώματα αυτά αποτελούνται από συσσωματώματα πρωτεΐνης διαπερατά σε αέρια. Τα κύτταρα των υδρόβιων κυανοβακτηρίων συχνά περιέχουν ένα μεγάλο αριθμό αεροτοπίων τα οποία επιτρέπουν στα κύτταρα να κινούνται κάθετα στην υδάτινη στήλη. Η κίνηση αυτή επιτρέπει στα κύτταρα να χρησιμοποιούν το φως για την επιτέλεση της φωτοσύνθεσης, να αποφεύγουν τα επιβλαβή ποσά της ηλιακής ακτινοβολίας και να προσλαμβάνουν ανόργανα θρεπτικά συστατικά. Τα αεροτόπια επιτρέπουν στα κυανοβακτήρια να ανταγωνίζονται τα ευκαρυωτικά φύκη στις ευτροφικές λίμνες (Villareal & Carpenter 2003). Τα χαμηλά επίπεδα φωτός, τα οποία αναστέλλουν τη φωτοσύνθεση προωθούν την παραγωγή αεροτοπίων. Έτσι τα κύτταρα κινούνται ανοδικά προς το φως για να φωτοσυνθέσουν. Κατά τη φωτοσύνθεση αυξάνονται οι συγκεντρώσεις σακχάρων, η οποία δημιουργεί υψηλότερη κυτταρική πίεση σπαργής με αποτέλεσμα την κατάρρευση των αεροτοπίων και τη βύθιση των κυανοβακτηρίων στην υδάτινη στήλη. Στα βαθύτερα στρώματα οι υδατάνθρακες θα καταναλωθούν κατά την αναπνοή με αποτέλεσμα τον ανασχηματισμό των αεροτοπίων, τα κυανοβακτήρια θα κινηθούν ανοδικά στην υδάτινη στήλη κοκ. Ο κύκλος πλευστότητας μπορεί όμως να διακοπεί και να παγιδεύσει πληθυσμούς κυανοβακτηρίων στην επιφάνεια του νερού («ανθίσεις»). Οι πυκνές «ανθίσεις» μπορεί να εμποδίσουν την παραγωγή σακχάρων και τα

αεροτόπια να μείνουν άθικτα. Έτσι αν μείνουν εκτεθειμένα στο φως για μεγάλα χρονικά διαστήματα τα κυανοβακτήρια αφανίζονται. Τα κύτταρα αποσυντίθενται απελευθερώνονται τοξικές ουσίες και στα επιφανειακά ύδατα μειώνεται η συγκέντρωση οξυγόνου. Τέτοια νερά αν χρησιμοποιηθούν από τον άνθρωπο ή άλλους υδρόβιους οργανισμούς μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές προσβολές (Dow & Swoboda 2000, Oliver & Ganf 2000, Codd et al., 2005a,b).

Συνοψίζοντας παρατηρούμε ότι το σώμα των κυανοβακτηρίων παρουσιάζει μια πολυπλοκότητα παρόμοιο ή μεγαλύτερη από εκείνη πολλών ευκαρυωτικών φυκών (Graham et al., 2011).

4. Δέσμευση Αζώτου

Πολλά κυανοβακτήρια και ορισμένοι άλλοι προκαρυώτες είναι οι μόνοι γνωστοί οργανισμοί που μπορούν να μετατρέπουν το μοριακό αέριο άζωτο (N_2) σε αμμωνία, η οποία στη συνέχεια μπορεί να αφομοιωθεί προς σχηματισμό αμινοξέων, πρωτεϊνών και άλλων αζωτούχων συστατικών του κυττάρου. Άρα λοιπόν τα άζωτο δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα αύξησης για τα αζωτοδεσμευτικά κυανοβακτήρια. Η μετατροπή αυτή του αζώτου σε αμμωνία πραγματοποιείται με το ενζυμο αναγωγή νιτρικών. Το ενζυμο αυτό όμως απαιτεί ως συμπάροντες σίδηρο και μολυβδαίνιο τα οποία δεν είναι πάντα διαθέσιμα. Αυτού του είδους ο μεταβολισμός δηλαδή η μετατροπή του αερίου αζώτου προς αμμωνία είναι γνωστός ως **διαζωτροφία**. Η ικανότητα δέσμευσης αζώτου είναι ένας από τους παράγοντες που συμβάλει στη δημιουργία των κυανοβακτηριακών «ανθίσεων» σε αλμυρά και γλυκά νερά. Ένα ποσοστό 40-60% του δεσμευόμενου από τα κυανοβακτήρια αζώτου εκκρίνεται στα ανοιχτά υδατα προμηθεύοντας έτσι αυτό το βασικό θρεπτικό σε αλλά φύκη και υδρόβια φυτά (Graham et al., 2011).

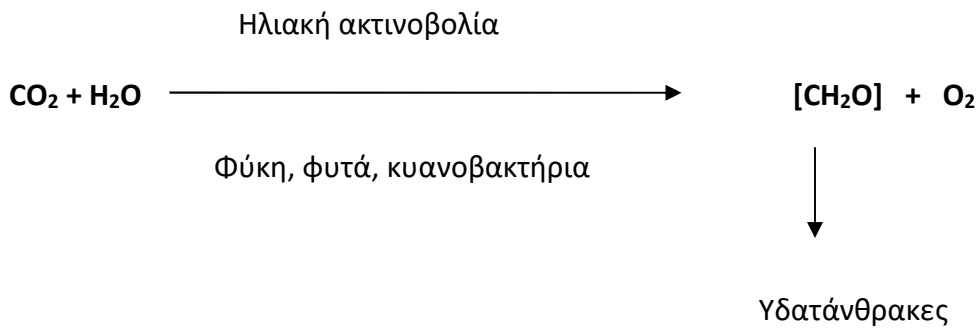
5. Φωτοσύνθεση

Η ενέργεια των βιολογικών καυσίμων τα οποία χρησιμοποιούνται από τους ζωντανούς οργανισμούς είναι μια μορφή τροποποιημένης ηλιακής ενέργειας που έχει δεσμευτεί από τη μοναδική λειτουργία της φωτοσύνθεσης και προορίζεται για μια μελλοντική χρήση. Η φωτοσύνθεση επομένως είναι μια διεργασία η οποία επιτρέπει τη σύνθεση οργανικών υλικών από ανόργανα, με την παρουσία του φωτός (Δροσόπουλος., 1998).

Στον κόσμο μας φωτοσυνθέτουν μερικά βακτήρια, τα φύκη και τα ανώτερα φυτά. Δεσμεύουν την ηλιακή ενέργεια κατ' ευθείαν από την ηλιακή ακτινοβολία και τη χρησιμοποιούν για τη βιοσύνθεση των ουσιαδών οργανικών τους υλικών (Δροσόπουλος., 1998).

Οι ετερότροφοι οργανισμοί δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν το ηλιακό φως κατ' ευθείαν ως πηγή ενέργειας λαμβάνουν την ενέργεια που έχουν ανάγκη τρώγοντας τους φωτοαυτότροφους. Η φωτοσύνθεση επομένως παρέχει την δυνατότητα στους οργανισμούς που την διαθέτουν ως λειτουργία, να χρησιμοποιούν το CO_2 και το H_2O και να βιοσυνθέτουν με την ηλιακή ενέργεια υδατάνθρακες εκλύοντας ταυτόχρονα O_2 προς την ατμόσφαιρα. Η δυνατότητα αυτή προσδίδει στη φωτοσυνθετική λειτουργία αποφασιστική σημασία για τη διατήρηση όλων των μορφών ζωής πάνω στη γη (Δροσόπουλος., 1998).

Η κύρια χημική αντίδραση κατά τη φωτοσύνθεση είναι η μετατροπή του CO_2 και του H_2O σε υδατάνθρακες με την ενέργεια της ηλιακής ακτινοβολίας και η έκλυση O_2 . Η αντίδραση αυτή συνοψίζεται ως εξής:



Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί με τη λειτουργία της **αναπνοής** καταναλώνουν οξυγόνο και μετατρέπουν τους υδατάνθρακες σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό με ταυτόχρονη απελευθέρωση ενέργειας, ένα μέρος της οποίας αποταμιεύεται με τη μορφή ATP. Η αναπνοή επομένως των ζωντανών οργανισμών προκαλεί κατανάλωση της οργανικής ύλης και του οξυγόνου της ατμόσφαιρας και αύξηση του διοξειδίου του άνθρακα αυτής. Υπολογίζεται ότι η αναπνευστική δραστηριότητα όλων των ζωντανών οργανισμών στην επιφάνεια της γης προκαλεί μια κατανάλωση οξυγόνου της τάξεως 10000 τόνων/δευτερόλεπτο. Για μια σταθερή κατανάλωση της τάξεως αυτής, αυτό σημαίνει μια εξάντληση του οξυγόνου της ατμόσφαιρας της γης σε διάστημα 3000 ετών. Οι απώλειες σε οργανική ύλη και οξυγόνο από την αναπνευστική δραστηριότητα αντισταθμίζονται από την παραγωγή οργανικής ύλης και οξυγόνου από τη φωτοσύνθεση. Κάτω από σταθερές συνθήκες η απόδοση της φωτοσύνθεσης είναι 30 φορές μεγαλύτερη της κατανάλωσης από την αναπνοή. Υπολογίζεται ότι η ανακύκλωση όλου του διοξειδίου του άνθρακα της ατμόσφαιρας δια μέσου της φωτοσυνθετικής λειτουργίας γίνεται κάθε 300 χρόνια, ενώ του οξυγόνου κάθε 2000 χρόνια (Δροσόπουλος., 1998).

Η φωτοσύνθεση πραγματοποιείται στους χλωροπλάστες, οι οποίοι εξειδικεύονται στην απορρόφηση του φωτός. Αυτό οφείλεται στις πράσινες χρωστικές που περιέχουν, τις χλωροφύλλες. Οι πολύπλοκες φωτοσυνθετικές αντιδράσεις οδηγούν στην οξείδωση του ύδατος και την απελευθέρωση του οξυγόνου, καθώς και στην αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα στο επίπεδο των οργανικών ουσιών. Κατά την καύση των υδατανθράκων στον αναπνευστικό μεταβολισμό, τα ηλεκτρόνια μετακινούνται προς σώματα ενεργειακά υποδεέστερα μέχρι του οξυγόνου του αέρα, που αποτελεί τον ισχυρότερο αποδέκτη, οπότε σχηματίζεται νερό. Αντίθετα με την προηγούμενη πορεία, η φωτοσύνθεση χρησιμοποιεί την ηλιακή ενέργεια για να οδηγήσει τα ηλεκτρόνια από την χαμηλή ενεργειακή στάθμη του νερού προς τα επάνω σε ένα ασθενή δέκτη ηλεκτρονίων το διοξείδιο του άνθρακα. Κατά την πορεία αυτή παράγονται σώματα με υψηλότερη ενεργειακή στάθμη (Δροσόπουλος., 1998).

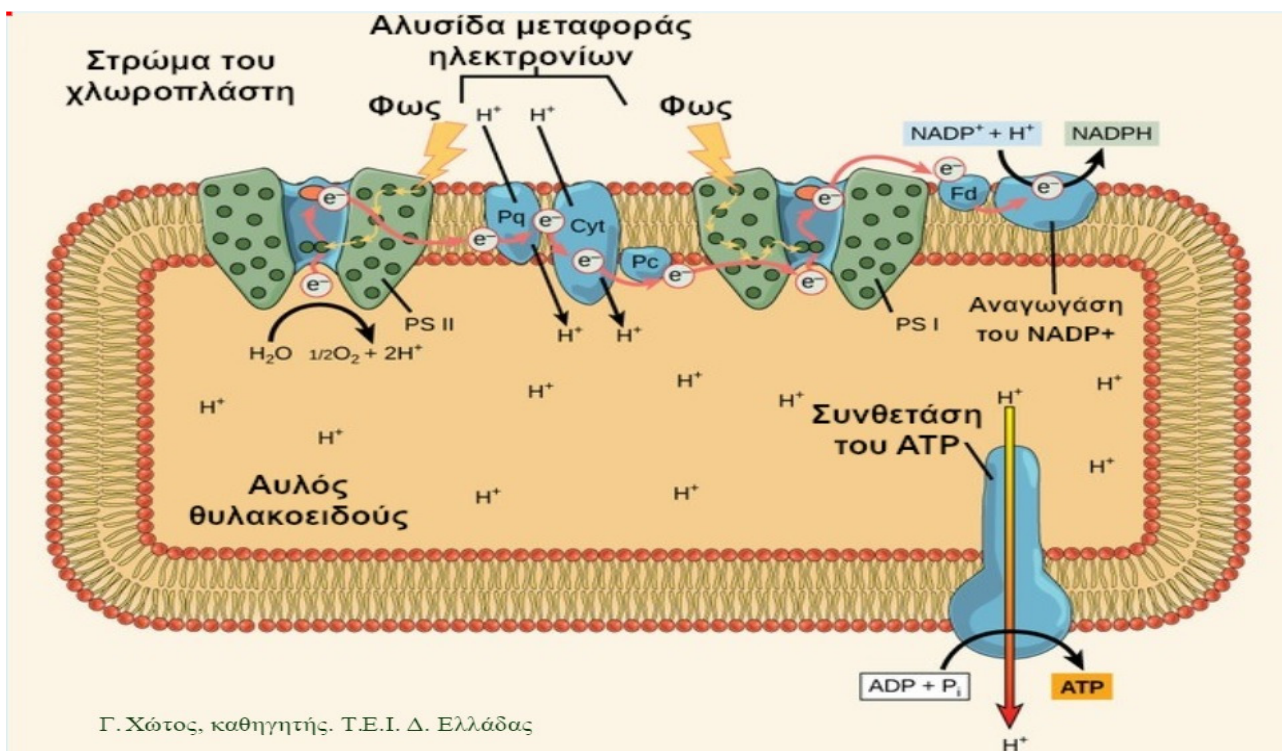
Το σύνολο των αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης διακρίνεται σε **φωτεινές αντιδράσεις** και **αντιδράσεις σκότους**.

5.1 Φωτεινές αντιδράσεις

Οι φωτεινές αντιδράσεις γίνονται πάνω στις εσωτερικές **μεμβράνες** των χλωροπλαστών, τα **θυλακοειδή**. Τα τελικά προϊόντα των φωτεινών αντιδράσεων είναι η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και το **NADPH**, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση των σακχάρων στην βιοσυνθετική φάση των αντιδράσεων σκότους. Οι αντιδράσεις σκότους (φωτοανεξάρτητες) πραγματοποιούνται

στο στρώμα των χλωροπλάστων και δεν απαιτούν την παρουσία φωτός. Η δέσμευση του φωτός στους χλωροπλάστες γίνεται με τη βοήθεια δυο διαφορετικών λειτουργικών μονάδων οι οποίες ονομάζονται φωτοσυστήματα (I και II). Η φωτεινή ενέργεια που απορροφάται χρησιμοποιείται για την μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ μιας σειράς παραγόντων, οι οποίοι λειτουργούν ως δοτές και αποδέκτες ηλεκτρονίων. Σ' αυτή την σειρά των παραγόντων τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι το **NADP** το οποίο ανάγεται σε **NADPH**. Επιπλέον η φωτεινή ενέργεια χρησιμοποιείται για την παραγωγή της κινούσας δύναμης μεταφοράς πρωτονίων δια μέσου της μεμβράνης των θυλακοειδών, γεγονός που εξασφαλίζει την διαβάθμιση πρωτονίων που είναι απαραίτητη στην βιοσύνθεση ATP (Δροσόπουλος,1998).

Τα φωτοσυστήματα I και II λειτουργούν σε σειρά. Το φωτοσύστημα I απορροφά εκλεκτικά την σκοτεινή-ερυθρή ακτινοβολία μήκους κύματος 700nm (χλωροφύλλη-α P700), ενώ το φωτοσύστημα II απορροφά ερυθρό φως με μήκος κύματος 680nm (χλωροφύλλη-α P680). Η διασύνδεση των 2 φωτοσυστημάτων είναι γνωστή ως **σχήμα Z**. Τα δυο φωτοσυστήματα συνδέονται μεταξύ τους με μια αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την οποία πραγματοποιούνται οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που οδηγούν από την οξείδωση του νερού μέχρι την αναγωγή του NADP.



Εικόνα 4. Μεμβράνη θυλακοειδούς χλωροπλάστη (Χώτος, 2018).

Φωτοσυστήματα I και II

Και τα 2 φωτοσυστήματα παίρνουν φωτεινή ενέργεια. Όταν απορροφήσουν τη φωτεινή ενέργεια και πιο συγκεκριμένα όταν απορροφήσουν φωτόνιο τότε διεγείρονται. Κατά τη διάρκεια αυτής της διέγερσης, τα 2 φωτοσυστήματα ελευθερώνουν ηλεκτρόνια. Τα ηλεκτρόνια αυτά παραλαμβάνονται από τον πρωτογενή δέκτη ηλεκτρονίων, δηλαδή και στα 2 φωτοσυστήματα

γίνεται ακριβώς το ίδιο πράγμα. Αυτό που **διαφέρει** είναι η **πορεία των ηλεκτρονίων** τους τα οποία ελευθερώνονται και παραλαμβάνονται από τον πρωτογενή δέκτη.

Πορεία ηλεκτρονίων φωτοσυστήματος II

Τα ηλεκτρόνια του φωτοσυστήματος II εισέρχονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Αυτή η αλυσίδα θα μεταφέρει τα ηλεκτρόνια από το φωτοσύστημα II στο φωτοσύστημα I. Κατά τη διάρκεια μεταφοράς των ηλεκτρονίων κάθε μεταφορέας που παραλαμβάνει ηλεκτρόνιο ανάγεται και μόλις το ελευθερώσει οξειδώνεται. Η τελευταία ουσία της οξειδοαναγωγικής αλυσίδας είναι η πλαστοκυανίνη (Pc) και από αυτήν τα ηλεκτρόνια θα καταλήξουν στο φωτοσύστημα I. Όταν λοιπόν τα ηλεκτρόνια αυτά φτάσουν στο φωτοσύστημα I και συγκεκριμένα στη P700 το φωτοσύστημα επαναφέρεται στη θεμελιώδη κατάσταση. Δηλαδή αφού στην αρχή το φωτοσύστημα I απορρόφησε φωτόνιο ελευθέρωσε 2 ηλεκτρόνια και μεταφέρθηκε σε διεγερμένη κατάσταση χρειάζεται να πάρει πίσω 2 ηλεκτρόνια έτσι ώστε να έλθει στην αρχική του κατάσταση που ονομάζεται θεμελιώδης κατάσταση. Από την άλλη πλευρά όμως η P680 παραμένει σε διεγερση γιατί και αυτή χρειάζεται 2 ηλεκτρόνια για να επανέλθει πίσω στη θεμελιώδη κατάσταση. Το φωτοσύστημα II λοιπόν για να επανέλθει σε θεμελιώδη κατάσταση αποσπάει ηλεκτρόνια από τη **φωτόλυση** του νερού. Ένα μόριο νερού διασπάται δίνοντας $1/2 O_2$, δυο H^+ και 2 ηλεκτρόνια. Αυτά τα 2 ηλεκτρόνια τα παίρνει το φωτοσύστημα II και επανέρχεται πίσω στη θεμελιώδη κατάσταση. Το μισό οξυγόνο ελευθερώνεται (Χώτος, 2019).

Πορεία ηλεκτρονίων φωτοσυστήματος I

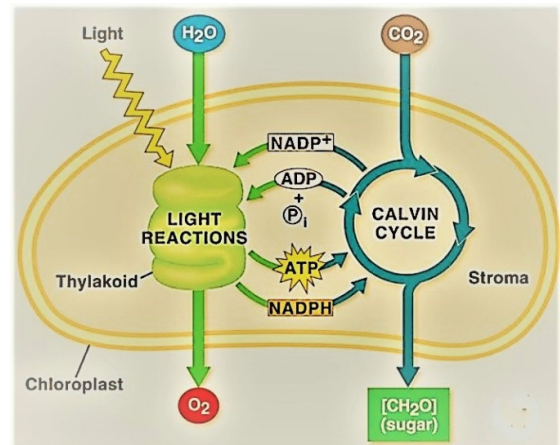
Όπως είπαμε τα ηλεκτρόνια παραλαμβάνονται πρώτα από τον πρωτογενή δέκτη στη συνέχεια εισέρχονται και αυτά σε μια αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων που έχει μια χαρακτηριστική ουσία, τη φερρεδοξίνη. Η φερρεδοξίνη θα παραδώσει τα ηλεκτρόνια στη NADP-αναγωγή η οποία μαζί με τα ηλεκτρόνια τα $2 H^+$ που θα πάρει από τη διάσπαση του νερού θα ανάγει το NADP σε NADPH. Είναι σημαντικό τα 2 φωτοσυστήματα μετά τη διεγερση να επαναφέρονται στη θεμελιώδη κατάσταση (Χώτος, 2019).

Παραγωγή ATP

Η σύνθεση της ATP ονομάζεται **χημειώσμωση**. Πρωτόνια (ή H^+) παράγονται από τη φωτόλυση του νερού στο φωτοσύστημα II όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Επίσης το σύμπλοκο κυτοχρωμάτων μεταφέρει τα πρωτόνια από το στρώμα του χλωροπλάστη (με την ενέργεια που προσδίδουν τα ηλεκτρόνια κατά τη μεταφορά τους) στο εσωτερικό του θυλακοειδούς. Τα πρωτόνια αυτά αποβάλλονται από το εσωτερικό του θυλακοειδούς στο στρώμα του χλωροπλάστη μέσω της ATP-συνθέσεως. Με τη έξοδο των πρωτονίων η ενέργεια δεσμεύεται από την ADP και μια φωσφορική ομάδα οπότε παράγεται ATP (Δροσόπουλος, 1998).

5.2 Κύκλος του Calvin (φωτοανεξάρτητες αντιδράσεις)

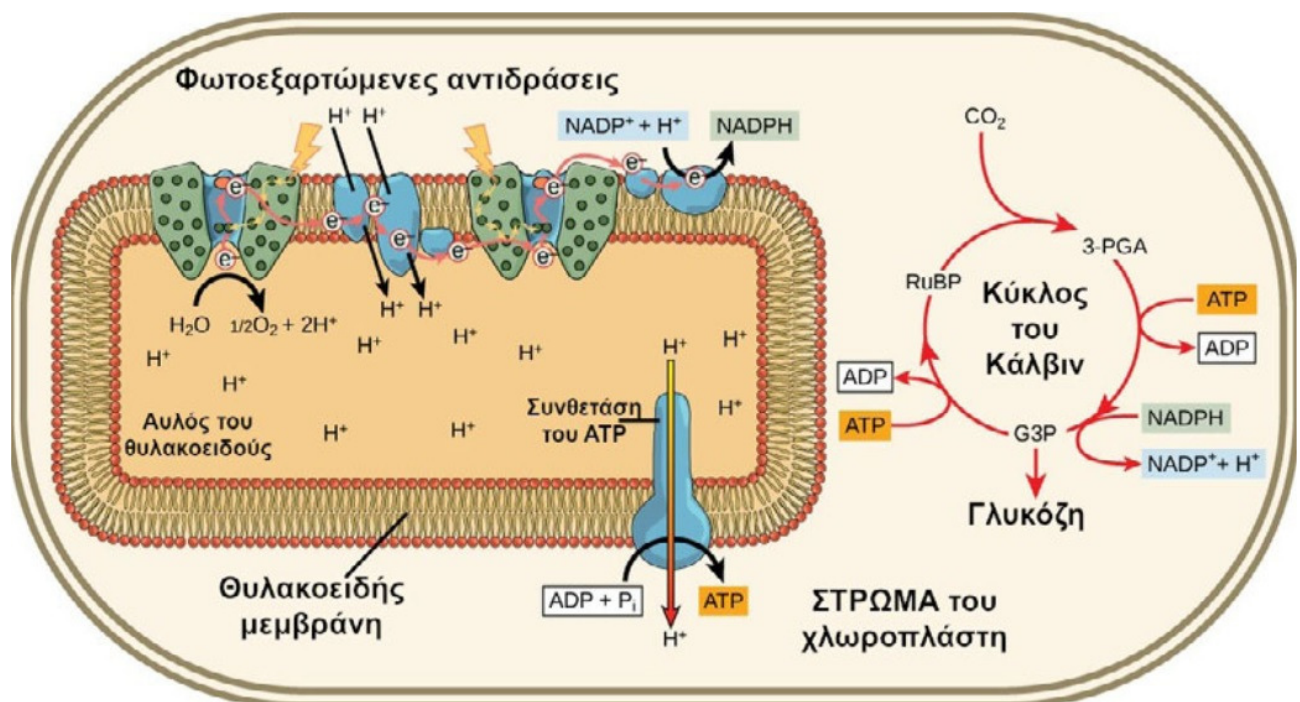
Στις **φωτοανεξάρτητες** αντιδράσεις γίνεται η αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα και η βιοσύνθεση της οργανικής ουσίας με τη βοήθεια της ενέργειας των παραγόμενων σωμάτων της φωτεινής φάσης (NADPH και ATP). Οι αντιδράσεις αυτές ονομάζονται και σκοτεινές γιατί δεν απαιτείται η παρουσία φωτός. Βέβαια αυτό δεν είναι ακριβές διότι μερικά ένζυμα του κύκλου της αναγωγής του άνθρακα ενεργοποιούνται από το φως και στο σκοτάδι είναι ανενεργά ή έχουν χαμηλή δραστηριότητα (Δροσόπουλος, 1998).



Εικόνα 5. Χλωροπλάστης.

Η αφομοίωση του διοξειδίου του άνθρακα σε όλους τους φωτοσυνθέτοντες ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι γνωστή ως **φωτοσυνθετικός κύκλος αναγωγής του άνθρακα** ή **κύκλος του Calvin** (από το όνομα του Melvin Calvin που τον ανακάλυψε).

Έτσι λοιπόν στις σκοτεινές αντιδράσεις στον κύκλο του Calvin οι βιοχημικές αντιδράσεις μεταμορφώνουν το νερό και το διοξείδιο του άνθρακα σε σάκχαρο. Οι αντιδράσεις αυτές γίνονται στο στρώμα του χλωροπλάστη.



Εικόνα 6. Εσωτερικό χλωροπλάστη (Χώτος, 2019).

Συγκεκριμένα κατά τον κύκλο του Calvin δεσμεύεται το CO_2 και το 1^ο προϊόν που σχηματίζεται στον φωτοσυνθετικό κύκλο αναγωγής του άνθρακα είναι ένα μόριο με 3 άτομα άνθρακα. Τη μεταβολική αυτή πορεία ακολουθούν τα φύκη και τα C_3 φυτά (υπάρχουν όμως και τα C_4 φυτά, δηλαδή εκείνα

που το 1^ο προϊόν που παράγεται στον κύκλο του Calvin είναι ένα μόριο με 4 άτομα άνθρακα). Ο κύκλος του Calvin αποτελείται από 3 στάδια.

1^ο στάδιο

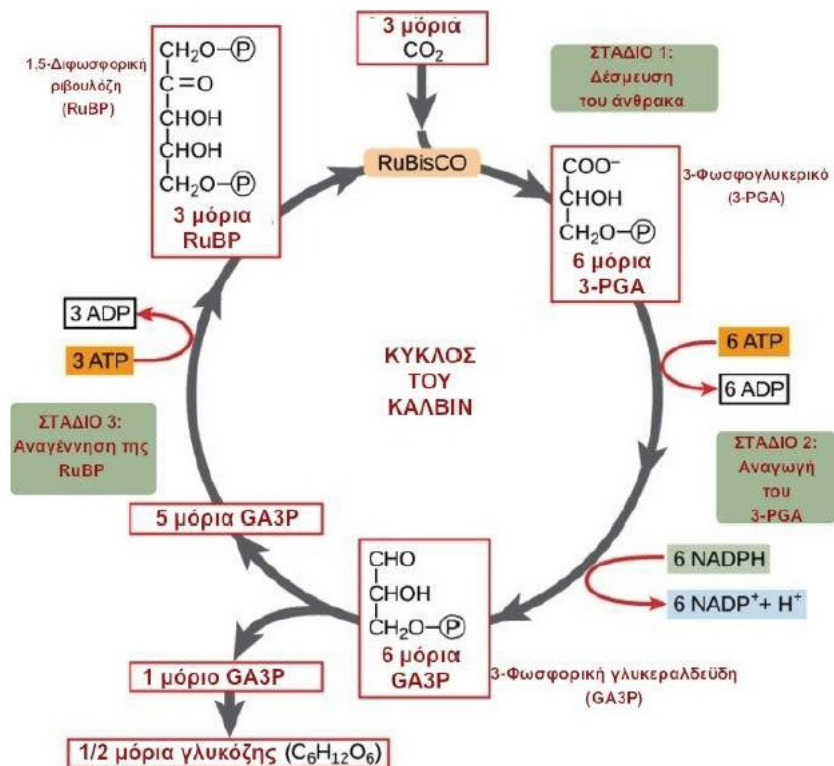
Ο κύκλος ξεκινά με την 1,5-διφωσφορο-ριβουλόζη (RuBP) που **καταλύεται** με δέσμευση του CO₂ από τη **Rubisco**. Παράγεται ένα ασταθές ενδιάμεσο, το οποίο ταχύτατα υδρολύεται σε 2 μόρια 3-PGA. Έτσι λοιπόν κατά το 1^ο στάδιο του κύκλου δεσμεύεται το CO₂ και παράγεται το μόριο 3-φωσφογλυκερικό οξύ (**3-PGA**).

2^ο στάδιο

Στη συνέχεια στο 2^ο στάδιο πραγματοποιείται αναγωγή του 3-PGA σε 3-φωσφορο-γλυκεραλδεΐδη (**GA3P**) με την κατανάλωση ενέργειας με τη μορφή ATP και NADPH, η οποία εξέρχεται από τον χλωροπλάστη προς το κυτόπλασμα μετά τη μετατροπή του σε φωσφορική διυδροξυακετόνη (DHAP). Εκεί συντίθεται φωσφορο-φρουκτόζη και φωσφορο-γλυκόζη και από αυτές σακχαρόζη.

3^ο στάδιο

Στο 3^ο στάδιο του κύκλου του Calvin γίνεται η αναγέννηση της RuBP. Η αναγέννηση της RuBP γίνεται με μια σειρά αντιδράσεων στην οποία λαμβάνουν μέρος σάκχαρα με 4,5,6 και 7 άτομα άνθρακα. Προς το τέλος των αντιδράσεων αυτών παράγονται 2 πεντόζες οι οποίες σχηματίζουν την 5-φωσφορο-ριβουλόζη (**Ru5P**). Η τελευταία φωσφορυλιώνεται σε 1,5-διφωσφορική-ριβουλόζη και ανανεώνει έτσι το δέκτη του CO₂.



Εικόνα 7. Κύκλος Κάλβιν (Χώτος, 2019).

Σε κάθε ολοκλήρωση του κύκλου δεσμεύεται ένα μόριο CO₂ με παραγωγή 2 μορίων 3-PGA. Απαιτούνται 3 συνεχόμενες ολοκληρώσεις του κύκλου για την απελευθέρωση 1 μορίου GA3P προκειμένου να ακολουθήσει η μεταβολική οδός της γλυκόζης. Ενώ τα υπόλοιπα 5 μόρια GA3P παραμένουν στον κύκλο. Συνεπώς σε κάθε 6 ολοκληρώσεις του κύκλου παράγονται επαρκείς ποσότητες GA3P προκειμένου να παραχθεί 1 μόριο γλυκόζης (Χώτος, 2016).

Κατά τη διάρκεια της νύχτας όταν η φωτοσύνθεση δεν λειτουργεί και υπάρχει ανάγκη άνθρακα για τις άλλες μεταβολικές δραστηριότητες, η συγκέντρωση της RuBP αλλά και των άλλων ενδιάμεσων του κύκλου του Calvin μειώνεται σημαντικά. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τις πρώτες πρωινές ώρες η ταχύτητα αφομοίωσης του CO₂ να είναι πολύ χαμηλή, λόγω της χαμηλής στάθμης του δέκτη RuBP. Εδώ θα πρέπει να τονιστεί ότι τα αποθέματα **αμύλου** παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση της συγκέντρωσης της RuBP. Όταν η συγκέντρωση της φτάσει σε ικανοποιητικά επίπεδα τότε αποκαθίσταται γρήγορα η υψηλή ταχύτητα φωτοσυνθετικής αφομοίωσης του CO₂ μέσα στον χλωροπλάστη (Δροσόπουλος, 1998).

6. Ανοξυγενής Φωτοσύνθεση

Τα φωτοσυνθετικά βακτήρια έκτος των κυανοβακτηρίων εμφανίζουν μη οξυγονοπαραγωγική φωτοσύνθεση ή **ανοξυγενή φωτοσύνθεση**. Δηλαδή η φωτοσύνθεση δεν παράγει **οξυγόνο** ως υποπροϊόν.

Τα μη οξυγονοπαραγωγά βακτήρια δεν απελευθερώνουν οξυγόνο από το νερό επειδή στερούνται του συμπλέγματος μαγγανίου-ασβεστίου το οποίο σχετίζεται με τη διάσπαση του ύδατος (υπάρχει στο φωτοσύστημα II των κυανοβακτηρίων και των πλαστιδίων). Αν' αυτού χρησιμοποιούν ανηγμένες ενώσεις όπως **υδρόθειο (H₂S)**, **αέριο H₂** ή **οργανικές ενώσεις** ως δοτές ηλεκτρονίων στη φωτοσύνθεση.

Μερικά κυανοβακτήρια επιτελούν επίσης ανοξυγενή φωτοσύνθεση σε αναερόβια περιβάλλοντα πλούσια σε υδρόθειο αν υπάρχει διαθέσιμο φως (πχ. *Oscillatoria limnetica*).

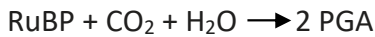
Κατά την αντίδραση $2\text{H}_2\text{S} + \text{CO}_2 \longrightarrow \text{CH}_2\text{O} + 2\text{S}^0 + \text{H}_2\text{O}$

το στοιχειώδες **θειο** εκκρίνεται από τα κύτταρα και σχηματίζει ευδιάκριτα κοκκία στις επιφάνειες των κυανοβακτηριακών νημάτων (Cohen et al., 1975).

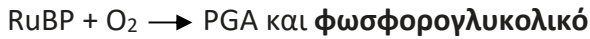
7. Φωτοαναπνοή

Στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς όμως η έκλυση CO₂ δεν οφείλεται μόνο στον αναπνευστικό μεταβολισμό αλλά και σε διεργασίες οι οποίες σχετίζονται με την φωτοσυνθετική δραστηριότητα. Οι διεργασίες αυτές είναι γνωστές ως **φωτοαναπνοή** και περιλαμβάνουν την επανοξείδωση των προϊόντων ακριβώς πριν την φωτοσυνθετική τους αφομοίωση. Η φωτοαναπνοή περιλαμβάνει τις μεταβολικές δραστηριότητες τριών κυτταρικών οργανιδίων δηλαδή των χλωροπλάστων, των υπεροξεισωμάτων και των μιτοχονδρίων και επειδή οδηγεί τελικά σε έκλυση CO₂ το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής εκφράζει μία καθαρή απώλεια άνθρακα από το κύτταρο (Graham et al., 2011). Το ένζυμο κλειδί για την εκδήλωση της φωτοαναπνοής είναι η Rubisco (Δροσόπουλος, 1998).

Το ένζυμο Rubisco εκτός από την έλξη του CO₂ έλκει και το O₂. Επιτελεί λοιπόν διπλό ρόλο. Στην πρώτη περίπτωση η Rubisco καταλύει την αντίδραση



και λειτουργεί ως **καρβοξυλάση** όταν τα επίπεδα του CO₂ είναι υψηλά και στην δεύτερη, την αντίδραση



Και λειτουργεί ως **οξυγενάση** όταν τα επίπεδα του CO₂ είναι χαμηλά.

Έτσι λοιπόν το παραγόμενο από τη φωτοσύνθεση O₂ είναι άφθονο με αποτέλεσμα να ανταγωνίζεται το CO₂ για τη θέση δέσμησης στη Rubisco (Graham et al., 2011).

Σε έναν όμως φωτοσυνθετικό οργανισμό κατά την διάρκεια της ημέρας λειτουργούν ταυτόχρονα και οι δύο διεργασίες.

Η Rubisco τροφοδοτεί ολόένα και περισσότερο οξυγόνο αντί για διοξείδιο του άνθρακα στον κύκλο του κάλβιν και με την προσθήκη αυτή του οξυγόνου μετατρέπει την RuBP σε 3PGA και **φωσφορογλυκολικό οξύ** (Δροσόπουλος., 1998).

Το 2-φωσφορογλυκολικό μεταβολίζεται με μία σειρά αντιδράσεων οι οποίες είναι γνωστές ως **C₂ γλυκολυτικός κύκλος**, γνωστός και ως **κύκλος φωτοσυνθετικής οξείδωσης του άνθρακα (PCO)**, κατά τον οποίο εκλύεται ένα μόριο CO₂ ενώ το άλλο άτομο άνθρακα εισέρχεται στον κύκλο κάλβιν. Το 3PGA που παράγεται μεταβολίζεται με τον κύκλο του κάλβιν. Το 2-φωσφορογλυκολικό αποφωσφορολιώνεται γρήγορα σε **γλυκολικό οξύ** μέσα στο χλωροπλάστη, εξέρχεται στο κυτόπλασμα και διαχέεται προς τα υπεροξεισώματα μέσα στα οποία οξειδώνεται σε **γλυοξυλικό** και **υπεροξειδίο του υδρογόνου**. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση αυτή είναι η οξειδάση του γλυκολικού (Δροσόπουλος., 1998).

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου διασπάται ενώ το **γλυοξυλικό** μέσα στα υπεροξεισώματα υφίσταται μία τρανσαμίνωση από την οποία σχηματίζεται η **γλυκίνη**. Η γλυκίνη στη συνέχεια μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια όπου μετατρέπεται σε **σερίνη**. Επειδή η σερίνη είναι σώμα με τρία άτομα άνθρακα, για τη σύνθεση της χρησιμοποιούνται δύο μόρια γλυκίνης ενώ το τέταρτο άτομο άνθρακα αποβάλλεται ως **CO₂**. Το CO₂ είναι αυτό που αποβάλλεται κατά την **φωτοαναπνοή**. Το διοξείδιο του άνθρακα είναι αυτό που αποβάλλεται κατά την φωτοαναπνοή. Η γλυκίνη επομένως αποτελεί την άμεση πηγή διοξειδίου του άνθρακα κατά την διεργασία αυτή. Η απελευθέρωση του διοξειδίου του άνθρακα κατά την μετατροπή της γλυκίνης σε σερίνη συνοδεύεται από **έκλυση** μιας ισοδύναμης ποσότητας **αζώτου** με τη μορφή **αμμωνίας**. Το άζωτο αυτό επαναχρησιμοποιείται στην **αναγέννηση** της **γλυκίνης** από γλυοξυλικό στα υπεροξεισώματα (Δροσόπουλος., 1998).

Η **σερίνη** εξέρχεται από το μιτοχόνδριο και επιστρέφει στο υπεροξεισώματα όπου υφίσταται μία απαμίνωση σε υδροξυ - πυροσταφυλικό οξύ το οποίο ανάγεται τελικά σε **γλυκερινικό οξύ**. Το γλυκερινικό οξύ επιστρέφει στο χλωροπλάστη και φωσφορυλιώνεται από το ATP σε **3-PGA** το τελευταίο κατά τα γνωστά συνθέτει τον δέκτη **RuBP**. Από τα παραπάνω λοιπόν βλέπουμε ότι ο

κύκλος του γλυκολικού οξέος συνδέει τη φωτοσύνθεση, την φωτοαναπνοή και το μεταβολισμό αζώτου δια μέσου των τριών αυτών διαφορετικών κυτταρικών οργανιδίων. Φαίνεται ότι για κάθε μόριο διοξειδίου του άνθρακα που εκλύεται από την φωτοαναπνοή απαιτούνται δύο μόρια οξυγόνου (Δροσόπουλος., 1998).

Ο φωτοσυνθετικός μεταβολισμός του άνθρακα (κύκλος κάλβιν) είναι ικανός να λειτουργήσει από μόνος του και ανεξάρτητα του κύκλου του γλυκολικού οξέος, λόγω της δυνατότητας αναγέννησης της RuBP, δέκτη του CO₂. Αντίθετα ο **κύκλος του γλυκολικού οξέος** είναι **παρασιτικός** διότι εξαρτάται από τον κύκλο κάλβιν δια μέσου της RuBP η οποία αναγεννάται σε αυτόν. Η ισορροπία στη λειτουργία μεταξύ των 2 κύκλων εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων CO₂ και O₂ (Δροσόπουλος., 1998).

Η Rubisco φαίνεται ότι εξελίχθηκε σε μια εποχή όταν η συγκέντρωση του CO₂ ήταν μεγάλη και η συγκέντρωση του O₂ μικρή. Κάτω από αυτές τις συνθήκες η διάκριση των 2 αερίων από το ενζυμο ελάχιστη σημασία θα είχε για την **επιβίωση** του οργανισμού. Το CO₂ και το O₂ θα αντιδρούσαν με την ίδια πλευρά σύνδεσης του ενζύμου. Με το πέρασμα του χρόνου το O₂ αυξήθηκε σε σημαντικά επίπεδα λόγω της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να αναπτυχθεί η διπλή φύση του ενζύμου (Δροσόπουλος., 1998).

Η ιδιότητα της Rubisco ως οξυγενάσης δεν φαίνεται να έχει κάποιον άμεσα χρήσιμο ρόλο ενώ η φωτοαναπνοή δεν προκαλεί σοβαρές επιπτώσεις. Είναι δηλαδή πιθανό, η οξυγόνωση να αποτελεί μια αναπόφευκτη συνέπεια της εξέλιξης, κατά την οποία οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί αξιοποίησαν μια εξελικτική αδυναμία και την μετέτρεψαν σε μια χρήσιμη μεταβολική διεργασία.

Σε κάθε **2 γύρους** του κύκλου αυτού παράγονται 2 μόρια φωσφορο-γλυκολικού, δηλαδή **4 άτομα άνθρακα**, από τα οποία το 1 χάνεται ως CO₂ και τα άλλα 3, δηλαδή το 75%, επιστρέφουν στον χλωροπλάστη. Μερικά ενδιάμεσα του κύκλου αυτού όπως η γλυκίνη και η σερίνη, είναι δυνατόν να χρησιμοποιούνται σε άλλες βιοσυνθετικές διεργασίες. Η φωτοαναπνοή πιθανόν να λειτουργεί και ως μια **βαλβίδα ασφαλείας**, στην περίπτωση **περίσσειας ενέργειας διέγερσης** της φωτοσυνθετικής συσκευής σε συνθήκες **απουσίας CO₂**. Σ' αυτές τις περιπτώσεις η λειτουργία της φωτοαναπνοής προστατεύει τον **φωτοσυνθετικό μηχανισμό** (Δροσόπουλος., 1998).

Η παρεμπόδιση της φωτοαναπνοής, ή ο γενετικός περιορισμός της, θα μπορούσαν να αυξήσουν σημαντικά την απόδοση της παραγωγής. Αύξηση της φωτοσυνθετικής λειτουργίας και της απόδοσης των φωτοσυνθετικών οργανισμών με αύξηση της συγκέντρωσης του CO₂ είναι περισσότερο αποτελεσματική διότι προκαλεί ταυτόχρονα και καταστολή της φωτοαναπνοής.

8. Φωτοαναστολή

Για μεγάλες τιμές ακτινοβολίας πέρα από μια συγκεκριμένη περιοχή το Φωτοσύνστημα II μπορεί να υποστεί βλάβη και η βιοπαραγωγικότητα να μειωθεί κατακόρυφα, καθώς η ροή φωτονίων είναι αρκετά υψηλή, ένα φαινόμενο γνωστό ως φωτοαναστολή (Carvalho et al., 2011).

Σε υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας, τα φύκη αρχικά ανταποκρίνονται με αύξηση του ρυθμού απορρόφησης του φωτός από τις χλωροφύλλες, που οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού αφομοίωσης

του CO₂. Υπό συνθήκες υπερπροσφοράς ενέργειας της φωτεινής ακτινοβολίας, προκαλείται διαταραχή στη φωτοσυνθετική λειτουργία (Καραμπουρνιώτης, 2003).

Σε συνθήκες υψηλής υπερτροφοδότησης της φωτοσυνθετικής συσκευής με ενέργεια, το ενεργειακό πλεόνασμα δεν μπορεί να αξιοποιηθεί κατά τη φωτοχημική ροή ηλεκτρονίων. Η κατάσταση αυτή οδηγεί σε συσσώρευση βλάβης στα φωτοσυστήματα, οπότε παρατηρείται μείωση της φωτοσυνθετικής ικανότητας, φαινόμενο γνωστό ως **φωτοαναστολή**. Το φαινόμενο αυτό γίνεται έκδηλο ιδιαίτερα στην περίπτωση κατά την οποία τα φύκη βιώνουν συνδυασμό των υψηλών εντάσεων ακτινοβολίας και άλλων **παραγόντων καταπόνησης** (Κυριακίδου, 2014).

Σύμφωνα με το μηχανισμό της φωτοαναστολής, το ενεργειακό πλεόνασμα, καθώς δεν μπορεί να αποσβεσθεί στις φωτοχημικές αντιδράσεις ροής ηλεκτρονίων, προκαλεί το σχηματισμό τοξικών προϊόντων όπως **βλαβερές μορφές οξυγόνου**, που είναι γνωστές ως ενεργές μορφές οξυγόνου (**ROS**, reactive oxygen species) και αποτελούν ελεύθερες ρίζες, ιδιαίτερα βλαβερές για τη φωτοσυνθετική συσκευή καθώς επιφέρουν οξειδώσεις και άλλους μετασχηματισμούς ευαίσθητων μορίων όπως αυτών των λιπιδίων, των πρωτεϊνών, των νουκλεϊκών οξέων και των χρωστικών, με συνέπεια την καταστροφή της λειτουργικότητάς τους και την κατάρρευση του κυττάρου λόγω οξειδωτικής καταπόνησης (Stroch et al., 2004).

Ο πλέον ευάλωτος στόχος τους στο **PS II** είναι η **πρωτεΐνη D1** που αποικοδομείται και **αποσπάται από τη μεμβράνη** του θυλακοειδούς. Για την αποφυγή της φωτοαναστολής, η φωτοσυνθετική συσκευή είναι εξαιρετικά δυναμική και ικανή να αντιδρά σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών στην ποιότητα και στην ποσότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Στην ασφαλής απόσβεση της πλεονάζουσας ενέργειας συμμετέχουν φαινόμενα όπως η επανεκπομπή φωτονίων με τη μορφή **φθορισμού**, η απόσβεση της πλεονάζουσας ενέργειας με τη μορφή **απωλειών θερμότητας** όπου πρωταγωνιστικό ρόλο διαδραματίζει ο κύκλος των ξανθοφυλλών, και τέλος η κατανάλωση της επιπλέον ενέργειας με τη μορφή ATP σε διαδικασίες όπως η **φωτοαναπνοή** (Καραμπουρνιώτης, 2003).

Γενικά, η **μείωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης** που παρατηρείται σε συνθήκες φωτοαναστολής δεν οφείλεται αποκλειστικά σε βλάβες στα κέντρα αντίδρασης του PS II, αλλά και στην επαγωγή **φωτοπροστατευτικών μηχανισμών** για τη διοχέτευση της πλεονάζουσας ενέργειας με εκπομπή θερμότητας (Demmig-Adams and Adams, 1992).

Όταν οι παραπάνω μηχανισμοί είναι επαρκείς, **αποφεύγονται οι μόνιμες βλάβες**, η **μείωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης** είναι **αντιστρεπτή** και έχει προστατευτικό ρόλο (δυναμική φωτοαναστολή). Αν ωστόσο, οι αμυντικοί μηχανισμοί αδυνατούν να ανταποκριθούν πλήρως στο ενεργειακό φορτίο, τότε οι **ROS** παράγονται με **αυξημένο ρυθμό**, παραμένουν και δημιουργούν μόνιμες βλάβες (**μόνιμη φωτοαναστολή**). Ακόμα όμως και στην περίπτωση κατά την οποία, οι διάφοροι φωτοπροστατευτικοί μηχανισμοί δεν δύνανται να προστατέψουν τη φωτοσυνθετική συσκευή, αντισταθμίζουν αυτήν τους την αδυναμία με τη δραστηριοποίηση **μηχανισμών επιδιόρθωσης των ζημιών** που έχουν προκύψει. Όσο ο ρυθμός επιδιόρθωσης των βλαβών υπερτερεί του ρυθμού συσσώρευσης τους, η φωτοσυνθετική συσκευή προστατεύεται επαρκώς. Στην αντίθετη περίπτωση, συσσωρεύεται υψηλό επίπεδο φωτοαναστολής με δυσμενείς επιπτώσεις (Takahashi and Murata, 2008).

9. Φωτοεγκλιματισμός

Λόγω των σχετικά γρήγορων αλλαγών του φωτός στις οποίες υποβάλλονται, τα μικροφύκη παρουσιάζουν μια αξιοσημείωτη ικανότητα για **φωτοεγκλιματισμό**. Πρόκειται για μια διαδικασία που αποτελείται από μια σειρά αλληλένδετων φυσικών, βιοφυσικών, βιοχημικών και φυσιολογικών αλλαγών που βοηθούν τα κύτταρα να **βελτιστοποιούν** τη χρήση του **διαθέσιμου φωτός**. Το αντίκτυπο από το υπερβολικό φως σε μια καλλιέργεια εξαρτάται σε κάποιο βαθμό από το επίπεδο του φωτοεγκλιματισμού: κύτταρα εγκλιματισμένα σε σχετικά χαμηλό φως (δηλ. προσαρμοσμένα σε σκιά) πριν εκτεθούν σε υψηλής έντασης ακτινοβολία θα υποστούν φωτοκαταστροφή σε χαμηλότερες τιμές φωτός, από ότι κύτταρα που έχουν εγκλιματιστεί σε υψηλότερο φωτισμό κυττάρων (Carvalho et al., 2011).

10. Σχηματισμός ανθρακικών από τα φύκη – ενασβέστωση

Τα κυανοβακτήρια κατά τη γεωλογική εποχή του προκαμβρίου και στη συνέχεια ποικίλες ομάδες φυκών μετέτρεψαν μεγάλα ποσά **άνθρακα** από την ατμόσφαιρα προς σχηματισμό ανθρακικών ιζημάτων και πετρωμάτων όπως **ασβεστολίθων**. Πράγματι, μεγάλο μέρος του CO₂ που κάποτε υπήρχε στην ατμόσφαιρα έχει μετατραπεί σε ανθρακικά πετρώματα, κυρίως με τη μεσολάβηση των φυκών (McConnaughey 1994). Τα ανθρακικά είναι επίσης **σημαντικά** επειδή περιέχουν τουλάχιστον το **40%** των παγκόσμιων γνωστών **αποθεμάτων υδατανθρακών** (Tucker & Wright 1990). Πρόσφατα οι ειδικοί έχουν εκφράσει την αγωνία ότι η αύξηση του **CO₂** στην ατμόσφαιρα που προκαλείται από τις ανθρωπίνες δραστηριότητες έχει οδηγήσει στην **οξύνιση** των ωκεάνιων υδάτων καθώς το επιπρόσθετο CO₂ μετατρέπεται σε **ανθρακικό οξύ** (H₂CO₃) (Feely et al., 2004). Το ανθρακικό οξύ **διαλύει** τα **ανθρακικά ορυκτά** ενώ πειράματα έδειξαν ότι τα φύκη παράγουν λιγότερα ανθρακικά όταν τα επίπεδα του ατμοσφαιρικού CO₂ αυξάνεται (Riebesell et al., 2000). Οι ειδικοί ανησυχούν ότι αν τα φύκη παράξουν λιγότερα ανθρακικά στο μέλλον μικρότερο ποσοστό οργανικού άνθρακα θα υφίσταται ανάσχεση στα βάθη των ωκεανών γεγονός που θα προκαλούσε αύξηση του ατμοσφαιρικού CO₂. Η διαδικασία κατά την οποία τα φύκη και μερικοί άλλοι οργανισμοί **παράγουν ανθρακικό ασβέστιο** είναι γνωστή ως **ενασβέστωση** ή **ασβεστοποίηση**. Μολονότι τα πλεονεκτήματα της ενασβέστωσης και του ακριβούς σχηματισμού επίτευξης αυτής δεν είναι πλήρως κατανοητά ακόμα. Η διαδικασία αυτή βοηθά ώστε κάποια κύτταρα φυκών να αποκτήσουν CO₂ (McConnaughey & Whelan 1996).

Σε μερικά φύκη η ενασβέστωση μπορεί να βοηθήσει στην αποτροπή του περιορισμού της φωτοσύνθεσης λόγω διαθεσιμότητας του CO₂.

11. Προβλήματα Φυκών Έναντι Φυτών Ξηράς

11.1 Προβλήματα απόκτησης φωτός

Αντίθετα από τα φυτά της ξηράς τα υδρόβια φύκη δεν έχουν στη διάθεση τους το πλήρες φάσμα του ηλιακού φωτός γιατί το νερό και πιθανές διαλυμένες ουσίες σε αυτό απορροφούν ορισμένα μήκη κύματος. Το ερυθρό φως απορροφάται από το νερό κοντά στην επιφάνεια με αποτέλεσμα στα μεγαλύτερα βάθη να εξαντλείται αυτό το μήκος κύματος. Επίσης τα φύκη μπορεί να καθιζάνουν ή να μεταφέρονται σε βαθιά σκοτεινά υδατα. Σε αυτές τις περιπτώσεις το ποσό φωτός που μπορεί να απορροφήσει η χλωροφύλλη-α ενδέχεται να μην είναι επαρκές για την κάλυψη των

αναγκών της φωτοσύνθεσης των φυκών. Τα φύκη ανταποκρίθηκαν στο πρόβλημα αυτό με 2 τρόπους (Graham et al., 2011).

Καταρχάς εμφανίζουν το φαινόμενο του **φωτοτακτισμού** σύμφωνα με το οποίο χρησιμοποιούν μόρια φωτο-υποδοχείς για να «δουν» το φως και να κινηθούν στις βέλτιστες περιοχές φωτισμού (μαστιγωτά). Κάθε είδος έχει αναπτύξει διαφορετικά μόρια φωτο-υποδοχέων όπως πχ οι κρυπτομονάδες, τα μαστιγοφόρα, χλωροφύκη και τα δινομαστιγωτά χρησιμοποιούν την ροδοψίνη, τα φωτοσυνθετικά σταχυομαστιγωτά και τα ευγληνοειδή το χρυσόσωμα και την φωτοτροπίνη. Ένας δεύτερος τρόπος αντιμετώπισης της διακύμανσης του φωτεινού περιβάλλοντος είναι η διαμόρφωση διαφορών βοηθητικών **χρωστικών** οι οποίες έχουν διαφορετικές ιδιότητες απορρόφησης φωτός. Η παρουσία αυτών των χρωστικών ερμηνεύει τις παραλλαγές χρωματισμού μεταξύ των φυκών. Αυτές οι χρωστικές έχουν την ικανότητα να απορροφούν σε χαμηλότερα μήκη κύματος και να μεταφέρουν την ενεργεία στα μόρια της χλωροφύλλης όπως για παράδειγμα η χλωροφύλλη-β. Τα φύκη ανταπεξέρχονται επίσης στη διακύμανση του διαθέσιμου φωτός για φωτοσύνθεση με την ικανότητα αυτών να προσλαμβάνουν και να μεταβολίζουν οργανικές ενώσεις από το περιβάλλον όπως κάνουν οι **ετερότροφοι** οργανισμοί. Η ικανότητα να φωτοσυνθέτουν και να αποκτούν θρεπτικές ουσίες από το περιβάλλον, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι γνωστή ως μικτοτροφία (μικτότροφοι οργανισμοί) (Graham et al., 2011).

11.2 Προβλήματα φωτοπροστασίας

Το δεύτερο σοβαρό πρόβλημα που αντιμετωπίζουν τα φύκη κατά την επιτέλεση της φωτοσύνθεσης στο νερό είναι η προσαρμογή στις απότομες αλλαγές των επιπέδων φωτός. Τα φύκη αντιμετωπίζουν το πρόβλημα αυτό όταν ρεύματα τα μεταφέρουν από μεγάλα βάθη στο έντονο επιφανειακό φως ή λόγω της παλίρροιας η οποία εκθέτει στο φως τα παράκτια μακροφύκη. Φως περισσότερο από εκείνο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη φωτοσύνθεση είναι επιβλαβές για τις φωτοσυνθετικές συσκευές, καταστρέφοντας τις ουσιώδεις πρωτεΐνες και τα μόρια χλωροφύλλης και προκαλώντας τον σχηματισμό καταστρεπτικών ριζών οξυγόνου. Τα φύκη ανταποκρίνονται σε αυτήν την απειλή αναπτύσσοντας φωτοπροστατευτικά συστήματα **καροτενοειδών** χρωστικών που απορροφούν την πλεονάζουσα φωτεινή ενεργεία και την αποδίδουν ως **θερμότητα**. Έχει βρεθεί ότι αρκετά είδη περιλαμβάνουν στελέχη ή οικοτύπους που προσαρμόζονται σε υψηλά ή χαμηλά επίπεδα φωτός (πχ το χλωροφύκος (*Osteococcus tauri*) (Graham et al., 2011).

11.3 Προβλήματα δέσμησης άνθρακα

Ένα τρίτο πρόβλημα σχετικό με τη φωτοσύνθεση, πρόβλημα που αντιμετωπίζουν τα υδρόβια φύκη είναι η δέσμηση CO₂ ένα συστατικό που αποτελεί το λιγότερο του 0,05% της ατμόσφαιρας της γης και διαχέεται 10.000 βραδύτερα στο νερό παρά στον αέρα. Μεγάλες ποσότητες CO₂ είναι απαραίτητες στις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης αλλιώς δεν μπορούν να παραχθούν οργανικές ενώσεις. Έτσι τα φύκη έχουν αναπτύξει ποικίλους μηχανισμούς συγκέντρωσης άνθρακα (**CCMs**), οι οποίοι εξυπηρετούν στην απόκτηση επαρκούς CO₂ για τη φωτοσύνθεση. Επίσης τα φύκη και τα φωτοσυνθετικά βακτήρια έχουν αναπτύξει διάφορες **μορφές** του ενζύμου **Rubisco**. Κάθε μορφή Rubisco έχει και **διαφορετική μοριακή έλξη** για CO₂ και οξυγόνο. Οι παραλλαγές Rubisco συντίθενται από διαφορετικούς αριθμούς και τύπους πρωτεϊνικών υπομονάδων και συνεπώς

εμφανίζουν διαφορετικές καταλυτικές ιδιότητες. Υπάρχουν 4 βασικές οικογένειες Rubisco: I, II, III και IV. Τα φύκη κατέχουν μονό τους τύπους I και II.

- Ο **τύπος II** αποτελείται από 2 υπομονάδες, απαντάται στον πιο κοινό τύπο φωτοσυνθετικών δινομαστιγωτών, εκείνων που έχουν μια χαρακτηριστική ουσία γνωστή ως περιδινίνη (Morse et al., 1995).
- Ο **τύπος I** απαντάται σε άλλα φωτοσυνθετικά φύκη και αποτελείται από 8 μεγάλες υπομονάδες και 8 μικρές υπομονάδες κωδικοποιημένες από διάφορα γονίδια.

Για τον τύπο I –Rubisco υπάρχουν 4 μορφές.

- Ο **τύπος I-A** απαντάται μόνο στους προκαρυώτες και σε πολλά θαλάσσια κυανοβακτήρια ωκεάνιων υδάτων με χαμηλά θρεπτικά.
- Ο **τύπος I-B** είναι χαρακτηριστικός σε παράκτια και γλυκών υδάτων κυανοβακτήρια και σε πλαστίδια χλωροφυκών, ευγληνοειδών, χλωραραχνοφύτων και φυτών ξηράς.
- Ο **τύπος I-C** εμφανίζεται αποκλειστικά σε προκαρυώτες που επιτελούν μονό μη-οξυγενή φωτοσύνθεση.
- Ο **τύπος I-D** απαντάται σε β-πρωτεοβακτήρια, ροδοφύκη κρυπτομονάδες, απτοφύκη, καθώς και σε φωτοσυνθετικά σταχυομαστιγωτά.

Εν κατακλείδι οι παραλλαγές ως προς το αισθητήριο φωτός και τον **φωτοτακτισμό**, τις **βοηθητικές χρωστικές**, τα **φωτοπροστατευτικά συστήματα**, τη **μικτοτροφική** ικανότητα και τη **μορφή Rubisco** συνδυάζονται ώστε να παράγεται μια εκπληκτική ποικιλομορφία στα φωτοσυνθετικά γνωρίσματα των φυκών (Graham et al., 2011).

12. Αντιμετώπιση προβλημάτων απόκτησης άνθρακα (CCMs)

Είναι ένα τρόπος προσαρμογής των φυκών στη μείωση του CO₂ και αύξηση του οξυγόνου. Αυτή ποικίλουν μεταξύ των φυκών αλλά εξυπηρετούν την αύξηση του CO₂ στο ενζυμο Rubisco. Οι CCMs συχνά περιλαμβάνουν τη χρήση **διττανθρακικού ιόντος** το οποίο είναι πιο άφθονο σε πολλά υδατικά ενδιαιτήματα έναντι του διαλυμένου CO₂. Σε pH=8-9 (χαρακτηριστική τιμή πολλών λιμνών και ωκεανών) η συγκέντρωση των διττανθρακικών είναι 200 φορές μεγαλύτερη από αυτήν του διαλυμένου CO₂. Σε pH~ 6 το διαλυμένο CO₂ γίνεται πιο άφθονο έναντι των διττανθρακικών. Οι μηχανισμοί CCMs για τα φύκη ενδέχεται να περιλαμβάνουν

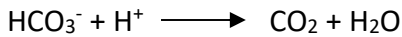
- Μεταφορείς ανόργανου άνθρακα της κυτταρικής μεμβράνης
- Ενζυμα ενδομετατροπής CO₂ και διττανθρακικών
- Διαδικασίες συνδεδεμένες με την ενασβέστωση
- Καθώς και εξειδικευμένες κυτταρικές δομές (Giordano et al., 2005).

12.1 Μηχανισμοί συγκέντρωσης άνθρακα στα κυανοβακτήρια

Επειδή το ενζυμο Rubisco στα κυανοβακτήρια έχει χαμηλή εξειδίκευση για CO₂ πολλά από αυτά στηρίζονται στους μηχανισμούς CCMs. Όταν υπάρχει διαθέσιμο CO₂ τότε το αέριο διαχέεται εντός των κυττάρων και πιθανότατα μετατρέπεται σε **διττανθρακικό ιόν** στις μεμβράνες των θυλακοειδών. Διττανθρακικά ιόντα προσλαμβάνουν επίσης από το νερό με τη χρήση μεταφορέων

της πλασματικής μεμβράνης. Επειδή τα διττανθρακικά είναι φορτισμένα δεν διαχέονται με ταχύτητα προς τα έξω και έτσι παγιδεύονται στα κύτταρα. Πριν χρησιμοποιηθεί στη φωτοσύνθεση το διττανθρακικό ιόν πρέπει να **μετατραπεί σε CO₂**.

Τα διττανθρακικά ιόντα και το CO₂ αλληλομετατρέπονται σύμφωνα με την αντίδραση:



Για να επιτευχθεί επιτάχυνση της παραπάνω αντίδρασης τα κυανοβακτήρια χρησιμοποιούν το ενζυμο **ανθρακική ανυδράση (CA)**.

Πράγματι η CA είναι αξιοσημείωτη μεταξύ των ενζύμων για την απίστευτα **υψηλή ταχύτητα ανακύκλωσης**-ένα γνώρισμα που διευκολύνει κατά πολύ την παροχή CO₂ στη φωτοσύνθεση των φυκών (Stemler 1997).

Στα κυανοβακτήρια η CA και η Rubisco εντοπίζονται εντός των **καρβοξυσωμάτων** (δομές πολυγωνικής πρωτεΐνης). Η κοινή ύπαρξη αυτών των 2 ενζύμων διευκολύνει την πρόσληψη μέσω Rubisco του CO₂ πριν από τη διάχυση αυτού έκτος των κυττάρων (Graham et al., 2011).

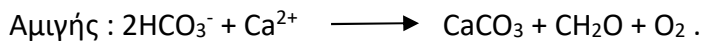
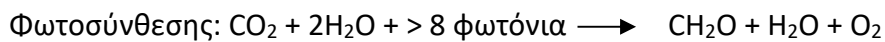
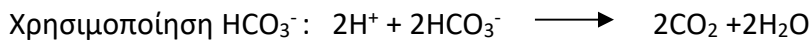
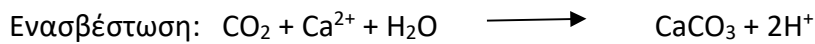
12.2 Μηχανισμοί συγκέντρωσης άνθρακα στα ευκαρυωτικά φύκη

Τα ευκαρυωτικά φύκη διαθέτουν ένα μεγάλο εύρος μηχανισμών για την απόκτηση ανόργανου άνθρακα για τη φωτοσύνθεση. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν **μεμβρανικούς μεταφορείς** και μερικούς τύπους ενζύμων **ανθρακικής ανυδράσης**, οι οποίοι συνήθως περιέχουν ψευδάργυρο αλλά επίσης μπορεί να χρησιμοποιούν κάδμιο ή κοβάλτιο. Επίσης **ορισμένα** φύκη διαθέτουν δομές πλαστιδίων γνωστές ως **πυρηνοειδή**, τα οποία θεωρείται ότι διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στους μηχανισμούς CCMs. Αυτά ενδέχεται να είναι δομικά ισοδύναμα των κυανοβακτηριακών καρβοξυσωμάτων (Badger & Price 1994). Ωστόσο πυρηνοειδή δεν υπάρχουν στα πλαστίδια όλων των φυκών που διαθέτουν μηχανισμούς CCMs. Μερικά ευκαρυωτικά φύκη μπορεί να παρουσιάζουν μια μορφή φωτοσύνθεσης, την **C4**, όπου το ενζυμο καρβοξυλάση παγιδεύει ανόργανο άνθρακα εντός μιας ένωσης με 4 άτομα άνθρακα. Στη συνέχεια **εκλύεται CO₂** από αυτή την ένωση προκειμένου να **δεσμευτεί** από το ενζυμο **Rubisco**. Πολλά ευκαρυωτικά φύκη είναι γνωστό ότι παράγουν **ανθρακική ανυδράση (CA)** εντός του περιπλασματικού χώρου που εντοπίζεται μεταξύ πλασματικής μεμβράνης και κυτταρικού τοιχώματος. Ο ρόλος αυτής της περιπλασματικής CA είναι η κατάλυση της μετατροπής του **εξωκυτταρικού διττανθρακικού** προς **CO₂**, το οποίο κατόπιν μετακινείται εντός του κυττάρου μέσω παθητικής ή ενεργητικής μεταφοράς. Σε κάποια ευκαρυωτικά φύκη η CA μπορεί να είναι πάντοτε παρούσα, σε κάποια να είναι σε χαμηλά επίπεδα ή ακόμα και σε κάποια άλλα να υπάρχει παντελής έλλειψη (Graham et al., 2011).

Σε μελέτη 18 ειδών θαλάσσιου φυτοπλαγκτού διαπιστώθηκε ότι η εξωκυτταρική CA είναι συστατικό στοιχείο 4 από 5 εξετασθέντων δινομαστιγιωτών και η εξωτερική CA ήταν ο επαγωγέας σε διάφορα οικολογικώς σημαντικά φύκη (πχ *Skeletonema costatum* και *Emiliania huxleyi*) (Nimer et al., 1997).

Ένας άλλος τρόπος με τον οποίο τα φύκη **παράγουν CO₂** από τα **διττανθρακικά** του περιβάλλοντος είναι η **έκκριση πρωτονίων (H⁺)** διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών. Τα πρωτόνια αντιδρούν με

τα διττανθρακικά προς παραγωγή CO₂ και νερού, οπότε το CO₂ μπορεί να προσληφθεί εντός των κυττάρων και των πλαστιδίων (Mc Connoughey 1998). Τέτοιες διαδικασίες **συνδέονται** με την **ενασβέστωση**. Οι αντιδράσεις που συνδέουν τη διαδικασία της ενασβέστωσης στα φύκη, με τη χρησιμοποίηση του διαλυμένου άνθρακα, και τη φωτοσύνθεσης είναι οι εξής:



13. Βιολογικές χρωστικές

Για να γίνει η δέσμευση της ενέργειάς του φωτός προκειμένου να γίνει η φωτοσύνθεση στα φυτά, φύκη, κυανοβακτήρια και ορισμένα φωτοσυνθετικά βακτήρια απαραίτητες είναι οι φωτοσυνθετικές χρωστικές. Αυτές είναι ειδικά μεγάλα μόρια που βρίσκονται είτε στις εσωτερικές μεμβράνες των χλωροπλαστών (θυλακοειδή) που διαθέτουν στα κύτταρά τους τα φυτά και τα ευκαρυωτικά φύκη είτε σε ειδικές μεμβράνες στο Κύτταρο τους (επίσης θυλακοειδή) στους προκαρυωτικούς οργανισμούς (κυανοβακτήρια και άλλα βακτήρια) (Χώτος, 2020).

Οι πιο σημαντικές χρωστικές είναι η **χλωροφύλλες** (χλωροφύλλη -α,-β,-γ,-δ). Το μόριο τους αποτελείται από ένα μεγάλο **δακτύλιο πορφυρίνης** σαν **κεφαλή** και μία μακρά **αλυσίδα υδρογονάνθρακα** σαν **ούρα**. Όλες οι χλωροφύλλες (και οι βακτηριοχλωροφύλλες) έχουν ένα άτομο μαγνησίου (**Mg**) σε **κεντρική** θέση του **δακτυλίου** της πρωτεΐνης. Από όλες τις μορφές χλωροφύλλης (-α, -β, -γ και -δ) στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς υπάρχει οπωσδήποτε η χλωροφύλλη-α. Οι υπόλοιπες απαντώνται όλες ή μερικές από αυτές ανάλογα με το είδος που αυτοί ανήκουν. Η χλωροφύλλη-α δεσμεύει την ενέργειά του φωτός ενώ οι άλλες χλωροφύλλες μαζί με τις επικουρικές χρωστικές βοηθούν τη χλωροφύλλη-α στο έργο της που είναι να δεσμεύει τα φωτόνια, να διεγερθεί, να διασπάσει το νερό σε αέριο οξυγόνο και πρωτόνια, να στείλει ηλεκτρόνια της σε ανώτερο ενεργειακό επίπεδο και κατόπιν να γίνουν διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις που θα καταλήξουν στη δέσμευση του διοξειδίου του άνθρακα και στη συνέχεια στον κύκλο των αντιδράσεων που καταλήγουν στην παραγωγή γλυκόζης (Χώτος, 2020)

Στα κύτταρα εκτός από τους χλωροφύλλης υπάρχουν και άλλες φωτοσυνθετικές χρωστικές όπως τα **καροτενοειδή**. Παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία και μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες τα **καροτένια** και τις **ξανθοφύλλες**. Στα κυανοβακτήρια και σε ορισμένα ευκαρυωτικά φύκη (ροδοφύκη και κρυπτοφύκη) εκτός από τις χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή υπάρχουν και άλλες ιδιαίτερες φωτοσυνθετικές χρωστικές οι **φυκοβιλίνες** (φυκοκυανίνη, φυκοερυθρίνη) οι οποίες βρίσκονται κοντά στις χλωροφύλλες αλλά είναι ομαδοποιημένες σε ειδικούς σχηματισμούς τα **φυκοβιλιώματα**. Οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή είναι λιποδιαλυτά μόρια ενώ οι φυκοβιλίνες υδατοδιαλυτά. Τα καροτένια και οι ξανθοφύλλες είναι σχεδόν πανομοιότυπα και διαφέρουν μόνο στο ότι οι **ξανθοφύλλες** έχουν και κάποια άτομα **οξυγόνου** στο μόριο τους ενώ τα **καροτένια καθόλου**. Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές στο σύνολό τους βοηθούν τη χλωροφύλλη-α να συλλέξει το μεγαλύτερο δυνατό αριθμό φωτονίων που είναι δυνατό στην εκάστοτε κατάσταση

φωτισμού και για αυτό το λόγο ονομάζονται επικουρικές ή βοηθητικές ή συμπληρωματικές χρωστικές. Επίσης η παρουσία τους δημιουργεί ένα κάλυμμα που προστατεύει τη χλωροφύλλη-α από περιπτώσεις έντονης ακτινοβολίας ή υπερϊώδους ακτινοβολίας που θα μπορούσαν να την βλάψουν. Δρουν δηλαδή και φωτοπροστατευτικά.

Τα φωτόνια του ορατού φάσματος χρησιμοποιούνται στη φωτοσύνθεση και ανήκουν στο φάσμα μεταξύ 400 και 700 nm. Στην περιοχή των 400-500 nm περίπου είναι οι μπλε ακτινοβολίες και στην περιοχή των 630-700 nm οι κόκκινες. Η χλωροφύλλη-α απορροφά φωτόνια στα 430 και 680 nm, στο υπόλοιπο μέρος του φάσματος από 440 - 670 nm απορροφούν οι επικουρικές χρωστικές οι οποίες δεσμεύουν και μεταφέρουν την ενέργεια των φωτονίων στη χλωροφύλλη-α. Οι επικουρικές χρωστικές δηλαδή οι χλωροφύλλες -β, -γ, -δ, τα καροτενοειδή και οι φυκοβιλίνες έχουν μέγιστα απορρόφησης σε αυτή την περιοχή του φάσματος. Δρουν σαν κεραίες και την ενέργεια που πέφτει πάνω τους την οδηγούν στο ενεργό κέντρο όπου βρίσκεται η χλωροφύλλη-α για να μπορέσει διεγερόμενη να κάνει αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω. (Χώτος, 2020)

Τα καροτενοειδή βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα που φωτοσυνθέτουν αλλά σε διαφορετικές αναλογίες ανάλογα με το είδος του οργανισμού (Χώτος, 2020).

Τα μικροφύκη έχουν σχετικά υψηλό περιεχόμενο χρωστικής, αποτελούμενο κυρίως από χλωροφύλλη και καροτενοειδή (Becker, 1994). Το περιεχόμενο χρωστικής μπορεί να κυμαίνεται από 0,1 έως 9,7% της υγρής βιομάζας (Nicholls and Dillon, 1978). Ο Healey (1975) ανέφερε ότι οι αναλογίες χλωροφύλλης-α (η κύρια χρωστική στα περισσότερα κύτταρα μικροφυκών) σε ξηρό βάρος (dw) ποικίλλει περισσότερο από υπερδιπλάσιο μεταξύ των ειδών, τη θερμοκρασία, τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και φωτός. Δεν υπάρχουν μελέτες που να ποσοτικοποιούν το σφάλμα λόγω αλλαγών στο περιεχόμενο χρωστικής σε έναν κανονικό κύκλο ανάπτυξης ή κάτω από διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας, κατά τη μέτρηση της βιομάζας από οπτική απορρόφηση (OD) (Griffiths, et al., 2011).

Η βιομηχανία έχει στραφεί διεθνώς στην καλλιέργεια φυτών αλλά και πολύ περισσότερο φυκών που περιέχουν στα κύτταρά τους μεγάλες ποσότητες καροτενοειδών τα οποία δρουν ως αντιοξειδωτικά στον ανθρώπινο οργανισμό. Το πιο γνωστό καροτενοειδές είναι το β-καροτένιο που βρίσκεται στα καρότα και το οποίο μετατρέπεται στον οργανισμό των ζώων που θα τα καταναλώσουν σε βιταμίνη Α. Υψηλές ποσότητες β-καροτένιου συσσωρεύονται και στο κύτταρο του χλωροφύκου *Dunaliella salina* σε συνθήκες υψηλής αλατότητας. Οι συγκεντρώσεις είναι τόσο μεγάλες που το κύτταρο του από πράσινο γίνεται κόκκινο. Η βιομηχανία καλλιεργεί *Dunaliella salina* για το β-καροτένιο το οποίο χρησιμοποιείται σε σκευάσματα και η αξία του ξεπερνά τα 12.000 ευρώ ανά κιλό (Χώτος, 2020).

Άλλα καροτενοειδή με αντιοξειδωτική δράση είναι το λυκοπένιο (τομάτες), η λουτεΐνη, η βιολαξανθίνη, η ασταξανθίνη (από το φύκος *Haematococcus*). Ισχυρή αντιοξειδωτική δράση έχουν και οι φυκοβιλίνες, οι χρωστικές των κυανοβακτηρίων και μάλιστα απορροφούν τόσο αποτελεσματικά στο φάσμα εκείνο του φωτός που καμία άλλη χρωστική δεν μπορεί να απορροφήσει (570-650nm) με αποτέλεσμα τα κυανοβακτήρια να αναπτύσσονται ταχύτατα στα νερά ξεπερνώντας σε πληθυσμό τα υπόλοιπα φύκη. Σήμερα το κυανοβακτήριο *Spirulina*

καλλιεργείται εντατικώς και εκτός από εξαιρετική τροφή για τον άνθρωπο είναι και εξαιρετική πηγή φυκοκυανίνης και φυκοερυθρίνης που είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά (Χώτος, 2020).

Στον παρακάτω **πίνακα 1** φαίνεται η κατανομή των διαφόρων τύπων χλωροφύλλης στα αθροίσματα των φυκών (φυτών).

Πίνακας 1. Κατανομή χλωροφυλλών στα φύκη (Χώτος, 2020)

Αθροίσματα φωτοσυνθετικών οργανισμών	Χλωροφύλλες			
	a	b	c ₁	c ₂
Φυτά	+	+	-	-
Φύκη (Φύλα)				
Χλωρόφυτα	+	+	-	-
Ευγληνόφυτα	+	+	-	-
Δινόφυτα (Δινομαστιγωτά)	+	-	-	+
Κρυπτόφυτα	+	-	-	+
Ροδόφυτα	+	-	-	-
Απτόφυτα	+	-	+	+
Ετεροκοντόφυτα (Ομοταξίες)				
• Φαιοφύκη (Phaeophyceae)	+	-	+	+
• Χρυσοφύκη (Chrysophyceae)	+	-	+	+
• Ευστιγματοφύκη (Eustigmatophyceae)	+	-	-	-
• Διάτομα (Bacillariophyceae)	+	-	+	+
• Ξανθοφύκη (Xanthophyceae)	+	-	-	-
Κυανοβακτήρια	+	-	-	-
Κυανοβακτήρια μόνο στην Τάξη Prochlorales	+	+	-	-

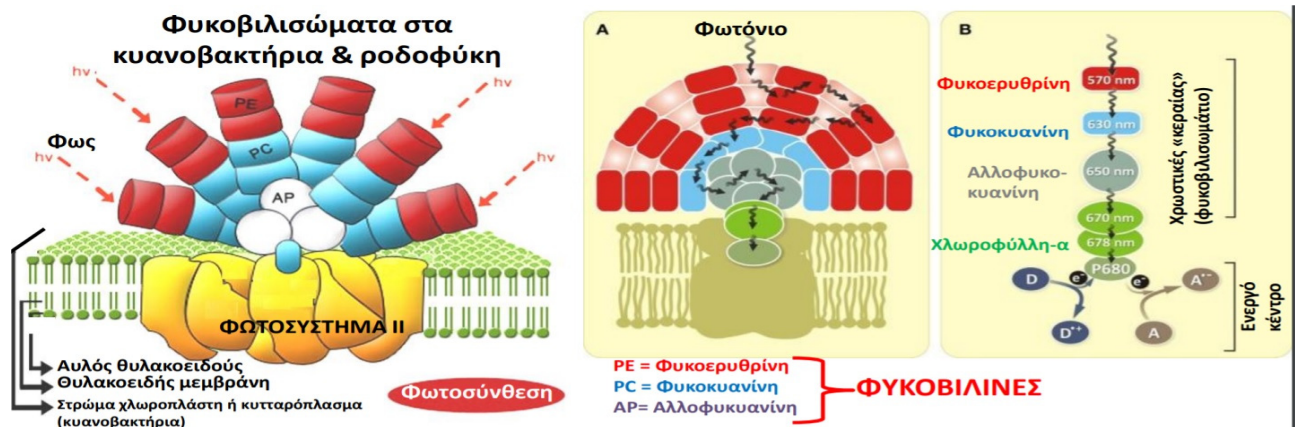
13.1 Χρωστικές στα Κυανοβακτήρια

Οι χλωροφύλλες των κυανοβακτηρίων πιθανώς εξελίχθηκαν από πρόδρομες βακτηριοχλωροφύλλες οι οποίες υπάρχουν σε άλλους τύπους βακτηρίων (Xiong et al., 2000).

Συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών γονιδιώματος από φωτοσυνθετικά βακτήρια υποδηλώνει ότι το PSI είναι το προγονικό κέντρο αντίδρασης (Mulkidjanian et al., 2006). Το PSII θεωρείται ότι έχει προέλθει από το PSI με διπλασιασμό δέσμης γονιδίων και απόκλιση. Οι πρόγονοι των κυανοβακτηρίων ενδέχεται να είχαν χρησιμοποιήσει αυτά τα 2 φωτοσυστήματα κατ' εναλλαγή, ως απόκριση σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Η προέλευση του υδατοδιασπαστικού συμπλόκου μαγγανίου-ασβεστίου στο φωτοσυστήμα II επέτρεψε τη χρήση του άφθονου νερού ως δότη ηλεκτρονίων από τα αρχέγονα κυανοβακτήρια, με το πρόσθετο πλεονέκτημα ότι το αέριο O₂ ως κατάλοιπο προϊόν απομακρυνόταν εύκολα από τα κύτταρα. Αυτό το εξελικτικό γεγονός επέτρεψε επίσης τη χρήση από τα κυανοβακτήρια των φωτοσυστημάτων I και II αλληλοδιαδόχως, βελτιώνοντας τη φωτοσυνθετική τους αποδοτικότητα (Allen & Martin 2007). Οι πρωτεΐνες πρόσδεσης της χλωροφύλλης α/β των γενεών *Prochloron*, *Prochlorococcus* και *Prochlorothrix* σχετίζονται στενά με τις κυανοβακτηριακές πρωτεΐνες της χλωροφύλλης α/β ή α/γ των ευκαρυωτών, υποδηλώνοντας ανεξάρτητη εξελικτική προέλευση αυτών των πρωτεϊνών (La Roche et al., 1996). Οι χλωροφύλλες εμφανίζουν φθορισμό στο ερυθρό φως, μια ιδιότητα που επιτρέπει τον έλεγχο των πληθυσμών φυκών σε δείγματα νερού ή σε φυσικά ενδιαίτηματα με τη χρήση ανιχνευτών φθορισμού του εμπορίου (Graham et al., 2011).

Χρωματική προσαρμογή κυανοβακτηρίων

Επίσης τα κυανοβακτήρια έχουν την ικανότητα να **ρυθμίζουν** τη **σύνθεση** των **χρωστικών** ουσιών τους ως απόκριση σε αλλαγές της ποιότητας του φωτός. Για παράδειγμα η έκθεση σε κιτρινέρυθρο φως αυξάνει τη σύνθεση της φυκοκυανίνης (κυανού χρώματος) ενώ η έκθεση σε κυανοπράσινο φως αυξάνει τη σύνθεση της φυκοερυθρίνης. Η διαφοροποίηση στη σύνθεση χρωστικών, γνωστή ως χρωματική προσαρμογή παρέχει ένα προσαρμοστικό πλεονέκτημα στα κυανοβακτήρια των οποίων το φωτεινό περιβάλλον υπάρχει περίπτωση να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ζωής τους (Graham et al., 2011). Το κυανοβακτήριο *Anabaena* εντοπίζει τον χρωματισμό του φωτεινού περιβάλλοντος μέσω της ροδοψίνης, ενός συμπλέγματος χρωστικής πρωτεΐνης (Vogelely et al., 2004).

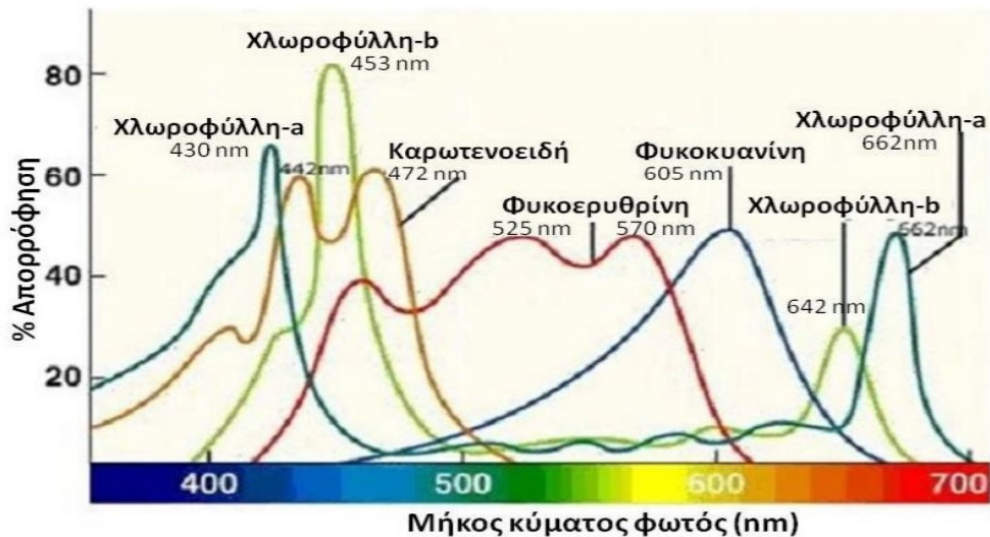


Εικόνα 8. Φυκοβιλιώματα κυανοβακτηρίων (Χώτος, 2020).

Φυκοβιλιώματα

Είναι μια κατασκευή των κυανοβακτηρίων η οποία βρίσκεται στα θυλακοειδή και αποτελείται από 3 είδη φυκοβιλιπρωτεϊνών: την **φυκοκυανίνη**, την **φυκοερυθρίνη** που περιέχουν **φυκοκυανοβιλίνη** και **αλλοφυκοκυανίνη** που περιέχει **φυκοερυθροβιλίνη**. Είναι μια ειδική δομή φωτοσυλλεκτικής κεραίας που συλλέγει φωτόνια με μήκη κύματος 570-650nm (πράσινο-κίτρινο-πορτοκαλί) που καμιά άλλη από τις χρωστικές δεν μπορεί να απορροφήσει. Έτσι τα φύκη που περιέχουν φυκοβιλιώματα μπορούν να εκμεταλλεύονται καλύτερα μεγαλύτερο εύρος του φωτεινού φάσματος. Παρουσιάζουν μια χαρακτηριστική δομή με τις φυκοβιλίνες τους σε 6 στήλες-στοίβες που εξέχουν ακτινωτά από την επιφάνεια του θυλακοειδούς προς το στρώμα του χλωροπλάστη. Εδράζονται στο σύμπλοκο του φωτοσυστήματος II (μόνο) το οποίο είναι βυθισμένο στη μεμβράνη και σ' αυτό μεταβιβάζουν τη συλλεχθείσα φωτονική ενέργεια. Η μεταφορά ενέργειας στα φυκοβιλιώματα ξεκίνα από την φυκοερυθρίνη (545 nm) προς την φυκοκυανίνη (555nm) στη συνέχεια στην αλλοφυκοκυανίνη (650nm) και τελικώς προς τη χλωροφύλλη-α στο φωτοσύστημα II. Ωστόσο όλες αυτές οι φυκοβιλίνες δεν παράγονται από όλα τα είδη κυανοβακτηρίων. Τα γλυκών υδάτων είδη τείνουν να παράγουν περισσότερη φυκοκυανίνη, ενώ η φυκοερυθρίνη συχνά αφθονεί στα θαλασσιά είδη. Κάθε φυκοβιλιπρωτεΐνη έχει ένα διακριτό διάγραμμα απορροφητικότητας και φθορισμού (Graham et al., 2011).

Στο παρακάτω διάγραμμα της **εικόνας 9** φαίνονται τα μήκη κύματος απορρόφησης της κάθε χρωστικής και το σε ποιο χρώμα του ορατού φάσματος αυτή αντιστοιχεί.



Εικόνα 9. Καμπύλες φάσματος απορρόφησης κάθε χρωστικής (Χώτος, 2020).

14. Νόμος Lambert-Beer - Φασματοφωτόμετρο απλής δέσμης

Η βιοτεχνολογία μικροφυκών είναι ένα πεδίο αυξανόμενου ενδιαφέροντος. Αρκετά γένη όπως *Chlorella*, *Dunaliella* και *Spirulina* καλλιεργούνται σε εμπορική κλίμακα (Borowitzka, 1992) για εφαρμογές συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής βιομάζας για τρόφιμα, ζωοτροφές και καύσιμα, παραγωγή χημικών υψηλής αξίας, βιοδραστικών ενώσεων, λιπάσματα, ζωοτροφές υδατοκαλλιέργειας, αντιοξειδωτικά και χρωστικές ουσίες (Pulz and Gross, 2004). Παρακολούθηση της βιομάζας μικροφυκών στο φυσικό περιβάλλον είναι επίσης ενδιαφέρουσα για τον προσδιορισμό της πρωτογενούς παραγωγικότητας των ωκεανών και παρακολούθηση των τοξικών φυκών (Griffiths et al., 2011).

Η ακριβής μέτρηση της συγκέντρωσης της βιομάζας των μικροφυκών είναι σημαντική στις περισσότερες μελέτες φυσιολογίας και βιοτεχνολογίας φυκών (Griffiths et al., 2011).

Η οπτική πυκνότητα (OD), επίσης γνωστή ως απορρόφηση, χρησιμοποιείται συχνά ως ταχεία και μη καταστροφική μέτρηση της βιομάζας σε καλλιέργειες βακτηρίων και άλλων μονοκύτταρων μικροοργανισμών (Toennies and Gallant, 1949, Shuler και Kargi, 2005).

Όταν μια ακτίνα φωτός περνά μέσω ενός εναιωρήματος σωματιδίων όπως μια κυτταρική καλλιέργεια, η ποσότητα του φωτός που μεταδίδεται είναι μειωμένη, σε σχέση με ένα υγρό χωρίς αιωρούμενα σωματίδια, το φαινόμενο αυτό ονομάζεται απορρόφηση (Clesceri et al., 1998).

Κάποια μόρια όταν ακτινοβοληθούν, απορροφούν μέρος της ακτινοβολίας και μάλιστα κάποια συγκεκριμένα μήκη κύματος. Όσο περισσότερα μόρια υπάρχουν στην δέσμη του φωτός, τόσο περισσότερο φως απορροφάται. Άρα μετρώντας την διαφορά της ποσότητας του φωτός, με και χωρίς τα προς μέτρηση μόρια μπορούμε να εκτιμήσουμε την ποσότητα τους. Αυτό μπορεί να συμβεί με το φασματοφωτόμετρο. Με το όργανο αυτό μπορούμε να βρούμε το ποσοστό του φωτός (T% - διαπερατότητα) ή το λογάριθμο της ποσότητας του φωτός που πέρασε από το προς μέτρηση διάλυμα. Έχοντας μετρήσει και τις τιμές διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων (πρότυπα διαλύματα) τότε μπορούμε να υπολογίσουμε και τις συγκεντρώσεις των προς εξέταση δειγμάτων.

Οι μετρήσεις γίνονται στο μήκος κύματος που παρουσιάζει την μέγιστη απορρόφηση η εξεταζόμενη ουσία, ώστε να περιοριστούν οι επιδράσεις από άλλες ουσίες που υπάρχουν στο ίδιο διάλυμα (και απορροφούν σε άλλα μήκη κύματος).

Το Φασματοφωτόμετρο είναι ένα όργανο που αποτελείται από 4 μέρη.

Στο πρώτο μέρος υπάρχει η πηγή παραγωγής της ακτινοβολίας από διάφορες λυχνίες ανάλογα το φάσμα φωτός που θέλουμε να παράγουμε.

Στο δεύτερο μέρος γίνεται ο διαχωρισμός του επιθυμητού μήκους κύματος από τα υπόλοιπα της πηγής με τη βοήθεια : α) μονοχρωματόρων, β) φίλτρων γ) πρισμάτων και δ) φραγμάτων περιθλάσεως. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που θα διέλθει από το διάλυμα πρέπει να έχει συγκεκριμένο μήκος κύματος τέτοιο ώστε να απορροφάται από την ουσία που θέλουμε να μετρήσουμε.

Στο τρίτο μέρος το επιθυμητό μήκος κύματος της ακτινοβολίας περνά μέσα από το προς εξέταση δείγμα (το οποίο βρίσκεται σε διαφανές άχρωμο δοχείο, την κυψελίδα).

Στο τέταρτο μέρος μετράται η ακτινοβολία που περνά από το δείγμα και δεν απορροφάται από αυτό, με ένα φωτόμετρο που βρίσκεται στην απέναντι πλευρά της κυψελίδας.

Έτσι λοιπόν το φως που παράγεται από ένα λαμπτήρα κατευθύνεται με μία ορισμένη ισχύ (P_0) προς ένα υδατικό διάλυμα που περιέχει μία ουσία σε ορισμένη συγκέντρωση. Το υδατικό διάλυμα απορροφάει τμήμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και έτσι η ακτινοβολία που απομακρύνεται από αυτό έχει ισχύ (P) μικρότερη από την αρχική (P_0). Η απορρόφηση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας είναι ανάλογη της συγκέντρωσης (C) της ουσίας μέσα στο υδατικό διάλυμα. Όσο πυκνότερο είναι το διάλυμα τόσο περισσότερη ακτινοβολία απορροφάται.

Το φως που χρησιμοποιείται στο Φασματοφωτόμετρο επιλέγεται να έχει συγκεκριμένο μήκος κύματος. Αυτό το μήκος κύματος αντιστοιχεί σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που απορροφάται από τα μόρια της ουσίας την οποία θέλουμε να μετρήσουμε. Στην πράξη κάθε ουσία έχει το δικό της μέγιστο απορρόφησης του φωτός που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο μήκος κύματος το οποίο οφείλουμε να γνωρίζουμε όταν θέλουμε να μετρήσουμε την συγκέντρωσή της.

Η απορρόφηση του φωτός (A) και η συγκέντρωση της ουσίας (C) συνδέονται με την παρακάτω σχέση (νόμος των Lambert-Beer).

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} = a \cdot b \cdot C$$

Όπου: C : η συγκέντρωση της ουσίας σε mole/l

b : το μήκος διανυθείσας διαδρομής μέσα στο διάλυμα (στην πράξη αντιστοιχεί στο πάχος της κυψελίδας που είναι συνήθως 1 cm)

a : η απορρόφηση που θα είχε το διάλυμα 1M της ουσίας (γραμμομοριακή απορροφητικότητα).

A : $-\log (I / I_0)$

I : ένταση ακτινοβολίας που εξέρχεται από την κυψελίδα

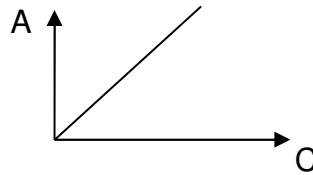
I_0 : ένταση προσπίπτοντος φωτός

T : διαπερατότητα

Άρα η διαφορά ($I_0 - I$) εκφράζει την απορροφημένη από το δείγμα ποσότητα. Ο λόγος (I / I_0) εκφράζει τη διαπερατότητα του δείγματος και παίρνει τιμές από 0-1. Έτσι γνωρίζοντας το a μπορούμε να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση του διαλύματος.

Τα μεγέθη b και a σε κάθε μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο είναι σταθερά με αποτέλεσμα η απορρόφηση A να είναι ανάλογη της συγκέντρωσης C (Καρκαλούσος, 2015).

Η σχέση της συγκέντρωσης με την απορρόφηση φαίνεται από το παρακάτω διάγραμμα:



Για να ισχύει ο νόμος Lambert-Beer πρέπει να ισχύουν οι παρακάτω προϋποθέσεις:

1. Η ακτινοβολία να είναι μονοχρωματική
2. Η απορρόφηση να είναι το μοναδικό φαινόμενο
3. Να είναι ομοιόμορφος ο όγκος του διαλύματος
4. Κάθε σωματίδιο να απορροφά ανεξάρτητα και να μην αλληλεπιδρά με τα με τα άλλα σωματίδια του διαλύματος

Σύμφωνα με τον παραπάνω νόμο η σχέση απορρόφησης και συγκέντρωσης του διαλύματος είναι γραμμική. Υπάρχουν όμως κάποιες αποκλίσεις (περιορισμοί) από το νόμο οι οποίες μεταβάλλουν τη γραμμικότητα της σχέσης. Οι αποκλίσεις αυτές οφείλονται σε πραγματικούς περιορισμούς του νόμου ή ως αποτέλεσμα αποκλίσεων που οφείλονται, είτε στον τρόπο μέτρησης, είτε σε μεταβολές της συγκέντρωσης λόγω χημικών μεταβολών στο διάλυμα.

Πραγματικοί περιορισμοί

Ο νόμος δεν ισχύει για πυκνά διαλύματα ($C > 0,01M$) γιατί οι αποστάσεις μεταξύ των μορίων είναι μικρές και αρχίζουν να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και χάνεται η ικανότητα τους να απορροφούν στο συγκεκριμένο αρχικό μήκος κύματος. Η γραμμομοριακή απορροφητικότητα, a , εξαρτάται από το δείκτη διάθλασης. Μεταβολή του δείκτη διάθλασης του διαλύματος (λόγω μεταβολής της συγκέντρωσης) μεταβάλλει και την γραμμομοριακή απορροφητικότητα, με αποτέλεσμα την απόκλιση από τη γραμμικότητα του νόμου του Lambert-Beer.

15. Εφαρμογές Φυκών

Το φυτοπλαγκτό, τα βενθικά μικροφύκη του εύφωτου πυθμένα και τα μακροφύκη που διαβιούν στην παραλιακή ζώνη, αποτελούν τους κύριους (ή μοναδικούς) πρωτογενείς παραγωγούς στην θάλασσα ή στα εσωτερικά ύδατα (Falkowski, 1980, Reynolds, 2006) καθώς και σε ακραία περιβάλλοντα όπως οι θερμοπηγές (Brock, 1967) ή οι παγετώνες (Bunt and Wood, 1963).

Αποτελούν την βάση διατροφής για το 70 % της γήινης παραγωγής βιομάζας (Andersen, 1996) ενώ ευθύνονται περίπου για το 50 % της γήινης φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου (Wiessner, et al., 1995) περιορίζοντας έτσι το φαινόμενο του θερμοκηπίου. Η χρήση τους στην ανθρώπινη διατροφή έχει καταγραφεί από αρχαιοτάτων χρόνων (Jassby, 1988) και έχει ευρέως τεκμηριωθεί στην παραδοσιακή και την σύγχρονη υδατοκαλλιέργεια (De Pauw and Persoone, 1988, Guedes and Malcata, 2012).

Η αναζήτηση νέων υλικών και πρώτων υλών για την βιομηχανία οδήγησε στην ανάπτυξη της λεγόμενης μπλε βιοτεχνολογίας εστιάζοντας στους υδρόβιους μικροοργανισμούς (Bongiorni and Pietra, 1996, Kreeger, 1996). Από την άλλη πλευρά η έντονη συζήτηση σχετικά με την αντιμετώπιση των συνεπειών του υπερπληθυσμού και την πίεση που αυτός ασκεί στους διαθέσιμους πόρους τις προηγούμενες δεκαετίες (Anonymous, 1994, Anonymous, 1999, Cairns, 1998, Greer, 1998, Klatzmann, 1996) οδήγησε πολλούς στην διερεύνηση της πιθανής καταφυγής και στα μικροφύκη είτε ως διατροφική λύση με παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (Kay and Barton, 1991, Kuhad, et al., 1997) είτε ως ανάκτηση του ρυπασμένου νερού (de la Noüe, et al., 1992) επαναφέροντας στο προσκήνιο και την πρόταση χρήσης τους στην αξιοποίηση άγονων εκτάσεων ιδίως με εξαλμυρισμένους υδροφόρους ορίζοντες για διάφορα προϊόντα (Barclay, et al., 1987, Dubinsky, et al., 1978, Isichei, 1990, Mitsui, 1980, Regan and Gartside, 1983). Όλη αυτή η συζήτηση κινητοποίησε πόρους και επιστημονικές ομάδες στην δεκαετία του 2000 προς την κατεύθυνση της αξιοποίησης μικροφυκών με πολλές προοπτικές για τις επόμενες δεκαετίες (Mata, et al., 2010, Spolaore, et al., 2006, Wijffels and Barbosa, 2010).

Η βιομάζα των φυκών που χρησιμοποιείται στις εμπορικές εφαρμογές είτε συλλέγεται από το περιβάλλον είτε ανακτάται μέσω ελεγχόμενης διαδικασίας καλλιέργειας σε ανοικτές δεξαμενές ή ειδικούς βιοαντιδραστήρες. Οι οργανισμοί καλλιεργούνται σε μεγάλη κλίμακα ως τροφή για τον άνθρωπο, ζωοτροφή, ζωντανή τροφή στις υδατοκαλλιέργειες, πηγή χρήσιμων βιοχημικών προϊόντων, επεξεργασία και καθαρισμό υδάτων. Επιτυχημένη εμπορική χρήση μικροφυκών έχει επιπλέον επιτευχθεί σε “μικρού όγκου- υψηλής αξίας” προϊόντα, όπως συμπληρώματα διατροφής, αντιοξειδωτικά, καλλυντικά, φυσικές χρωστικές, και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Η παγκόσμια ετήσια παραγωγή σε βιομάζα μικροφυκών υπολογίζεται στους 9.000 τόνους με μέση εμπορική αξία περίπου 240€ ανά κιλό. Περίπου το ένα πέμπτο αυτής της βιομάζας προορίζεται για τη σίτιση ιχθύων και οστράκων σε μονάδες υδατοκαλλιέργειας. Τα τελευταία χρόνια τα μικροφύκη εξετάζονται ως φάρμακα ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, ενώ έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως εδώδιμα εμβόλια για ανθρώπους και ψάρια (Γκέλης κ.α., 2015).

15.1 Ως Βιοκαύσιμα

Ως αποτέλεσμα των ανησυχιών για τις οικολογικές και οικονομικές επιπτώσεις της εξάρτησης από τα ορυκτά καύσιμα οι άνθρωποι συνεχώς ενδιαφέρονται για τις αειφόρους πηγές υδατανθρακών για ενέργεια και βιομηχανική σύνθεση. Ενώ ο αραβόσιτος ή άλλα φυτά έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αιθανόλης ως καυσίμου, έρευνες έδειξαν ότι τέτοιες πηγές δεν θα ικανοποιήσουν την ζήτηση και θα ανταγωνιστούν την παραγωγή τροφής (Hill et al., 2006). Από την άλλη πλευρά, η καλλιέργεια φυκών για παραγωγή βιοκαυσίμων δεν απαιτεί τη χρήση γεωργικών περιοχών. Τα φύκη προσφέρουν τη δυνατότητα παραγωγής βιοκαυσίμων με 3 κυρίως τρόπους:

- ζύμωση της βιομάζας
- βιομηχανική ανάπτυξη φυκών για εκχύλιση των λιπιδίων και
- συστήματα παραγωγής υδρογόνου.

Τα συστήματα παραγωγής υδρογόνου δεν είναι ακόμη ώριμα μέχρι του σημείου εφαρμογής τους, αλλά προσφέρουν δυνατότητες εκμετάλλευσης. Η ζύμωση της βιομάζας και η εκχύλιση των λιπιδίων έχουν αναπτυχθεί σε μεγάλης κλίμακας εμπορικές εφαρμογές (Graham et al., 2011).

Παρακάτω παρατίθενται ορισμένα από τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν τα μικροφύκη ως πρώτες ύλες για παραγωγή βιοκαυσίμων σε σύγκριση με άλλα ανώτερα φυτά:

- ✓ Συνθέτουν και συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες λιπιδίων ή ελαίων (20-50% κυτταρικού ξηρού βάρους) και αναπτύσσονται με πολύ ταχείς ρυθμούς (1-3 αναδιπλασιασμούς την ημέρα).
- ✓ Η απόδοση ελαίου ανά επιφάνεια σε καλλιέργειες μικροφυκών ξεπερνά κατά πολύ την απόδοση της βέλτιστης καλλιέργειας οποιουδήποτε ανώτερου φυτού.
- ✓ Τα μικροφύκη μπορούν να καλλιεργηθούν σε θαλασσινό ή υφάλμυρο νερό ή σε μη αροτραία γη, και έτσι δεν διεκδικούν γη από τις καλλιέργειες τροφίμων.
- ✓ Μπορούν να χρησιμοποιήσουν άζωτο και φώσφορο από ποικιλία αποβλήτων (γεωργίας, κτηνοτροφίας, βιομηχανικά και αστικά) συνεισφέροντας έτσι στη διαχείριση αποβλήτων.
- ✓ Προσλαμβάνουν CO₂ από τα αέρια που απελευθερώνουν τα εργοστάσια που λειτουργούν με ενέργεια από την καύση ορυκτών καυσίμων και άλλες πηγές, ελαττώνοντας έτσι τις εκπομπές ενός από τα βασικότερα αέρια του θερμοκηπίου. Για την παραγωγή 1kg βιομάζας φύκους απαιτούνται 1,8 kg CO₂.
- ✓ Για την παραγωγή τους δεν απαιτούνται εντομοκτόνα ή ζιζανιοκτόνα.

Αξίζει να αναφερθεί επίσης, ότι ενώ ο μηχανισμός της φωτοσύνθεσης στα φύκη είναι ίδιος με αυτόν των ανώτερων φυτών, τα μικροφύκη είναι πιο ικανοί μετατροπείς της ηλιακής ενέργειας λόγω της απλής κυτταρικής τους δομής. Επίσης, τα κύτταρά τους έχουν πιο επαρκή πρόσβαση σε νερό, CO₂ και άλλα θρεπτικά. Για τους λόγους αυτούς, τα μικροφύκη είναι ικανά να παράγουν 30 φορές μεγαλύτερη ποσότητα ελαίου ανά μονάδα έκτασης σε σχέση με τα ανώτερα φυτά. Έτσι, με βάση τις ποσότητες ελαίου που παράγουν, αποτελούν τη μόνη πηγή για βιοκαύσιμα που μπορεί να αντικαταστήσει πλήρως τα ορυκτά καύσιμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η παραγωγικότητα σε έλαιο ενός φύκους εξαρτάται από τον ρυθμό αύξησης του φύκους και το περιεχόμενο της βιομάζας σε έλαιο, και διαφέρει στα διάφορα είδη (Γκέλης κ.α., 2015).

15.2 Ως τροφή των θαλάσσιων οργανισμών

Στο Φυσικό Περιβάλλον

Τα **μικροφύκη** αποτελούν τους πρωτογενείς παραγωγούς και τη βάση της τροφικής αλυσίδας του υδάτινου οικοσυστήματος.

Πολλά φύκη είναι γνωστό ότι εκκρίνουν διαλυμένες οργανικές ενώσεις ή παράγουν θρύμματα που υποστηρίζουν την αύξηση ετερότροφων πρωτίστων και προκαρυωτικών οργανισμών. Εκκρίνουν ποικίλες οργανικές ενώσεις όπως αμινοξέα, αμινοσάκχαρα, πεπτίδια, υδατάνθρακες,

λιποπολυσακχαρίτες και το DMSP σε διαφορετικές αναλογίες από τον έναν τύπο φυκών στον άλλο (Graham et al., 2011).

(Το DMSP είναι μια ένωση που εμπεριέχει θείο και επηρεάζει την ωσμωρύθμιση, την αποφυγή φυτοβόρων οργανισμών και δρα ακόμη και ως κρυοπροστατευτικό σε ψυχρές συνθήκες. Το DMSP μπορεί να μετατραπεί σε DMS το οποίο εκλύεται από τα κύτταρα και στην ατμόσφαιρα μετατρέπεται σε διοξείδιο του θείου και θειικό, που προκαλούν κλιματική ψύξη. Οι ουσίες αυτές σκεδάζουν την ηλιακή ακτινοβολία, μειώνοντας το ποσό που φτάνει στην επιφάνεια της γης. Επίσης βοηθούν στο σχηματισμό νεφών τα οποία ανακλούν την ηλιακή ενέργεια στο διάστημα (Graham et al., 2011).)

Στις ανθίσεις του μικροφύκου *Dunaliella salina* παρατηρήθηκαν πολλά πουλιά και πελαγικά ψάρια (Abu-Rezq et al., 2010).

Τα θαλάσσια **μακροφύκη** που συσσωρεύονται στις παραλίες χρησιμεύουν ως τροφή για τα αμφίποδα και άλλα χερσαία ζώα και επίσης υποστηρίζουν την αύξηση των μικροοργανισμών αποικοδόμησης (Graham et al., 2011).

Σε υδατοκαλλιέργειες

Πολλά θαλάσσια ζώα δεν έχουν την ικανότητα σύνθεσης ορισμένων βασικών λιπαρών οξέων σε ποσότητες ικανές για την επιβίωση και ανάπτυξη τους και συνεπώς εξαρτώνται από τροφή βασισμένη σε φύκη για τον εφοδιασμό τους με τέτοιες ουσίες. Μη τοξικά θαλάσσια μικροφύκη καθώς και διάφορα διάτομα αντιπροσωπεύουν την πρωταρχική πηγή τροφής για κάποια στάδια του βιολογικού κύκλου των περισσότερων καλλιεργούμενων θαλάσσιων ζώων (Graham et al., 2011).

Η χρήση των ειδών *Dunaliella* για υδατοκαλλιεργητικούς σκοπούς ως πηγή β-καροτενίου συζητήθηκε από τους Al-Abdul-Elah et al. (1999). Ανέφεραν, ότι στο εκκολαπτήριο της γαρίδας μαύρη τίγρης στην Αυστραλία, η χρήση της *Dunaliella* 2-3 ημέρες πριν από τη συγκομιδή παρείχε τις επιθυμητές χρωστικές στις γαρίδες εκτροφής ώστε να αποκτήσουν ένα υγιές κόκκινο χρώμα και καλύτερη γεύση, για καλύτερο μάρκετινγκ και υψηλότερη τιμή πώλησης (Abu-Rezq et al., 2010).

Στην υδατοκαλλιέργεια, έχουν χρησιμοποιηθεί μόνο μικροφύκη με πολύτιμες ιδιότητες και η σύνθεση της βιομάζας των μικροφυκών σε λιπίδια, υδατάνθρακες και πρωτεΐνες καθορίζει το συνολικό οικονομικό δυναμικό τους (Williams & Laurens, 2010).

15.3 Ως ανθρώπινη κατανάλωση

Συμπληρώματα διατροφής - μικροφύκη

Η υψηλή περιεκτικότητα σε νουκλεϊνικά οξέα πολλών μικροφυκών περιορίζει τη χρήση τους ως τροφή του ανθρώπου αλλά αρκετά είδη καλλιεργούνται για την παραγωγή θρεπτικών συμπληρωμάτων ή προσθετικών τροφών όπως β-καροτένιο (Ben-Amotz et al., 1982).

Το επίπεδο πρωτεϊνών του κυανοβακτηρίου *Spirulina* μπορεί να είναι τόσο υψηλό όσο τα επίπεδα πρωτεϊνών σε ξηρούς καρπούς, σιτηρά και σπέρματα σόγιας και κυμαίνεται από 50-70% του ξηρού

βάρους. Συνεπώς ενθαρρύνεται η δυνατότητα εκμετάλλευσης του οργανισμού αυτού ως συμπληρώματος διατροφής σε υποσιτιζόμενους πληθυσμούς. Το κυανοβακτήριο αυτό έχει επίσης υψηλό ποσοστό βιταμινών Β και βασικών μη κορεσμένων λιπαρών οξέων (Richmond 1988). Επίσης έχει υψηλά επίπεδα β-καροτένιο η οποία μετατρέπεται σε βιταμίνη Α κατά τη διάρκεια της πέψης.

Τα φύκη καλλιεργούνται επίσης για τη παραγωγή προσθετικών στις τροφές όπως λιπαρών οξέων που βελτιώνουν τη διατροφική ποιότητα των παιδικών τροφών (Graham et al., 2011) και για αντιβιοτικά, βιταμίνες και αντιοξειδωτικά, καλλυντικά, φαρμακολογικά προϊόντα και τρόφιμα (Hu et al., 2008).

Πολλά είδη μικροφυκών είναι δυνητικοί παραγωγοί βιοδραστικών ενώσεων προστιθέμενης αξίας, όπως χρωστικές, βιταμίνες και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Pal et al., 2011).

Μετά την επιτυχία της παραγωγής *Spirulina* στις αρχές της δεκαετίας του 1970, η Cyanotech Corporation ιδρύθηκε το 1983, για να παράγει τη *Spirulina*, το πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά συμπλήρωμα διατροφής και τον *Haematococcus*, από τον οποίο παράγεται η ασταξανθίνη, η οποία χρησιμοποιείται ως ισχυρό αντιοξειδωτικό με επεκτεινόμενες εφαρμογές στην ανθρώπινη διατροφή καθώς και στην υδατοκαλλιέργεια και στη βιομηχανία ζωοτροφών (Abu-Rezq et al., 2010)

Μακροφύκη

Από το παρελθόν μέχρι σήμερα οι άνθρωποι χρησιμοποιούν περίπου 500 είδη μακροφυκών ως τροφή, νομή και εξαγωγή χημικών. Άνθρωποι από διαφορετικούς πολιτισμούς έχουν ανακαλύψει ότι πολλά μακροφύκη είναι εδώδιμα, ιδιαίτερα μερικά ροδοφύκη και φαιοφύκη (Castro & Huber 2015). Οι άνθρωποι στην κίνα συγκόμιζαν μακροφύκη για περισσότερο από 2000 χρόνια ενώ σήμερα οι κινέζοι συλλέγουν 74 είδη ροδοφυκών, χλωροφυκών, φαιοφυκών και κυανοβακτηρίων από 36 γένη (Xia & Abbott 1987). Ελάχιστα μακροφύκη αναπτύσσονται σε υδατοκαλλιέργειες για χρήση σε τροφές του ανθρώπου ή για εξαγωγή πτητικών ενώσεων. Κυρίως καλλιεργούνται ροδοφύκη και φαιοφύκη. Η καλλιέργεια μακροφυκών είναι ιδιαίτερα ανεπτυγμένη στην Κίνα, την Ιαπωνία, την Κορέα και άλλες χώρες (Castro & Huber 2015).

Τα μακροφύκη παράγουν αρκετούς τύπους ζελατινωδών χημικών ενώσεων που ονομάζονται φυκοκολλοειδή και χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία τροφίμων και την παραγωγή διάφορων προϊόντων. Είναι πολύτιμα λόγω της ικανότητας τους να σχηματίζουν παχύρρευστα αιωρήματα ή κολλοειδή πήγματα ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Castro & Huber 2015).

Τα σημαντικότερα φυκοκολλοειδή είναι η αλγίνη, η καραγενάνη και το άγαρ.

- ✓ Η αλγίνη χρησιμοποιείται ως γαλακτωματοποιητής στη βιομηχανία τροφίμων και στην αρτοποιία. Η κυριότερη πηγή αλγίνης είναι η κέλπια (*Macrocystis*).
- ✓ Η καραγενάνη που λαμβάνεται από ροδοφύκη χρησιμοποιείται επίσης ως γαλακτωματοποιητής στην βιομηχανία τροφίμων.
- ✓ Το άγαρ χρησιμοποιείται από τη βιομηχανία τροφίμων για να προστατεύει κρέατα και ψάρια κατά την κονσερβοποίηση τους αλλά και ως πηκτικό. Το άγαρ λαμβάνεται κυρίως από ροδοφύκη.

Επίσης τα μακροφύκη πωλούνται στην αγορά ως συμπληρώματα διατροφής.

Οι κινέζοι καταναλώνουν περισσότερο από 100 εκατομμύρια λίβρες νωπών και αποξηραμένων μακροφυκών ετησίως (Xia & Abbott 1987). Η ετήσια συγκομιδή *Porphyra* παγκοσμίως έχει εκτιμηθεί ότι αξίζει 2,5 εκατ. Δολάρια (van der Meer & Patwary 1995). Η τροφική αξία του ροδοφύκου αυτού βασίζεται κυρίως στην παροχή των βασικών βιταμινών όπως βιταμίνης Β και C, μετάλλων και ιωδίου. Ένα τεμαχισμένο, πιεσμένο και αποξηραμένο προϊόν φύκους (τροφή nori) περιέχει 27% της συνιστώμενης ημερησίας δόσης σε βιταμίνη Α υπό μορφή β-καροτενίου (Mumford & Miura 1988).

15.4 Άλλες χρήσεις φυκών

Επίσης πέραν της διατροφής τα **μακροφύκη** χρησιμοποιούνται ως σταθεροποιητές και γαλακτωματοποιητές στη φαρμακοβιομηχανία για την κατασκευή πλαστικών και εντομοκτόνων, ελαστικών, χαρτιού, χρωμάτων, καλλυντικών και μέσων καλλιέργειας, λιπασμάτων, προσθετικών ζωοτροφών και βελτιωτικών εδάφους. Επίσης ερευνάται η χρήση τους και ως πηγή βιοκαυσίμων (Castro & Huber 2015).

Επιπλέον τα φύκη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως σύνεργα στην γενωμική και στη πρωτεομική, ως περιβαλλοντικοί δείκτες ποιότητας υδατοσυστημάτων, ως απολιθωμένοι μάρτυρες περιβάλλοντος στην παλαιοντολογία – παλαιοοικολογία, ως βελτιωτικά εδάφους, ως συντελεστές στην απορρύπανση των υδάτων (Χώτος, 2018)

16. Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών

Οι καλλιέργειες των μικροφυκών είναι αρκετά πολύπλοκα συστήματα και η ανάπτυξή τους επηρεάζεται από διαφορετικούς βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες. Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών είναι:

- ✓ ο φωτισμός,
- ✓ η θερμοκρασία,
- ✓ τα θρεπτικά συστατικά (C, N, P και μικροστοιχείων),
- ✓ το pH του θρεπτικού υποστρώματος,
- ✓ η αλατότητα του θρεπτικού υποστρώματος,
- ✓ διάφορες παρεμποδιστικές και ανασταλτικές ουσίες που παράγονται από τα ίδια τα μικροφύκη ή που μπορεί να υπάρχουν στο θρεπτικό υπόστρωμα,
- ✓ ο αερισμός,
- ✓ η ανάδευση,
- ✓ η παρουσία άλλων ειδών μικροοργανισμών στην καλλιέργεια (επιμολύνσεις).

Παρακάτω θα γίνει μια σχετικά σύντομη ανάλυση ορισμένων από τους παραπάνω παράγοντες.

16.1 Φωτισμός

Η διάρκεια, η ένταση και η ποιότητα του φωτός που φτάνει σε ένα φύκος είναι καθοριστικοί παράγοντες για την ανάπτυξή του. Το φάσμα του φωτός που αξιοποιείται από τα φύκη είναι μεταξύ 400 και 700 nm. Τα διάφορα είδη φυκών περιέχουν σε διαφορετικές αναλογίες τις διάφορες

φωτοσυνθετικές χρωστικές ουσίες επομένως αξιοποιούν λιγότερο ή περισσότερο διαφορετικά μήκη κύματος. Γενικά, ο ρυθμός ανάπτυξης των φυκών αυξάνεται με την αύξηση της έντασης της ακτινοβολίας μέχρι ένα όριο (Γκέλης κ.α. 2015).

Η ένταση φωτός έχει τη μεγαλύτερη επίδραση αλλά οι απαιτήσεις ποικίλουν πολύ με το βάθος της καλλιέργειας και την πυκνότητα της καλλιέργειας των φυκών (Χώτος, 2016).

Ο φωτισμός είναι σε γενικές γραμμές ο καθοριστικότερος παράγοντας για την ανάπτυξη των μικροφυκών αλλά ειδικά στις ανοικτού τύπου καλλιέργειες αποτελεί και περιοριστικό παράγοντα (Suh and Lee, 2003).

Παρόλο που το φως είναι ζωτικής σημασίας, η ακτινοβολία της υπεριώδους περιοχής του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος ή ακτινοβολία υψηλής φωτεινής έντασης μπορεί να προκαλέσει αναστολή των φωτοχημικών αντιδράσεων, φωτοοξείδωση λόγω της βλάβης που υφίστανται τα κύτταρα (Carvalho, et al., 2011, Fernandes, et al., 2010, Molina Grima, et al., 1999), φωτοαναστολή, καταστροφή φωτοχρωστικών, κυτοχρωμάτων και άλλων συστατικών της φωτοσυνθετικής συσκευής, με αποτέλεσμα την ελάττωση του ρυθμού φωτοσύνθεσης (Γκέλης κ.α. 2015). Από την άλλη, σε ορισμένα είδη, όπως το χλωροφύκος *Dunaliella*, η υψηλή ένταση φωτός είναι ένας από τους απαραίτητους παράγοντες για την επαγωγή της σύνθεσης καροτενοειδών (Abu-Reza et al., 2010) .

Η πηγή του φωτός μπορεί να είναι είτε φυσική (ήλιος) είτε τεχνητή (λαμπτήρες). Ο τεχνητός φωτισμός παρέχει πιο σταθερές ελεγχόμενες συνθήκες και έτσι προτιμάται ειδικά σε περιπτώσεις μικροφυκών που καλλιεργούνται για υψηλής αξίας προϊόντα (Μάρκου κ.α., 2013). Νέες τεχνολογίες λαμπτήρων όπως τα LED τα οποία έχουν σχετικά μικρή κατανάλωση ενέργειας ή οι οπτικές ίνες ή και υβριδικά συστήματα φυσικού και τεχνητού φωτισμού θεωρούνται ότι θα συμβάλουν αρκετά στην βελτιστοποίηση της παραγωγής μικροφυκών (Chen, et al., 2011, Wang, et al., 2007).

Η υπερθέρμανση εξαιτίας του φυσικού ή τεχνητού φωτισμού πρέπει να αποφεύγεται. Οι σωλήνες φθορισμού που εκπέμπουν είτε σε μπλε είτε σε κόκκινο φάσμα φωτός πρέπει να προτιμώνται, καθώς είναι τα πιο ενεργά τμήματα του φωτεινού φάσματος, για τη φωτοσύνθεση (Χώτος, 2016).

Η φωτοπερίοδος πρέπει να έχει το ελάχιστο 18 ώρες φως και 4 ώρες σκοτάδι στο 24ωρο αν και το καλλιεργούμενο φυτοπλαγκτόν αναπτύσσεται κανονικά υπό σταθερό φωτισμό.

16.2 Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία είναι ο πιο καθοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη των φυκών μετά το φως και συνήθως έχει συνεργιστική δράση με αυτόν. Τα περισσότερα φύκη αναπτύσσονται μεταξύ 20-30°C, αλλά υπάρχουν θερμοφιλά είδη που μπορούν να αναπτυχθούν και σε θερμοκρασίες 40-42°C (Vonshak, 2002) ή ψυχρόφιλα είδη (ορισμένα φαιοφύκη)(Γκέλης κ.α., 2015).

Πολλά μικροφύκη μπορούν να αντέξουν θερμοκρασίες μέχρι και 15 °C χαμηλότερα από την βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους, αλλά υπάρχει πιθανότητα με μια μεταβολή της τάξης των 2-4°C πάνω από το βέλτιστο σημείο να υπάρξει πλήρης απώλεια της καλλιέργειας (Μάρκου κ.α., 2013).

Οι βέλτιστες θερμοκρασίες για φυτοπλαγκτονικές καλλιέργειες είναι μεταξύ 20-24°C αν και αυτό μπορεί να ποικίλει με τη σύνθεση του μέσου καλλιέργειας, τα είδη των φυκών και τον τύπο της καλλιέργειας. Τα πιο κοινά καλλιεργούμενα είδη μικροφυκών ανέχονται θερμοκρασίες μεταξύ 16-27°C. Θερμοκρασίες μικρότερες από 16°C θα επιβραδύνουν την αύξηση, ενώ υψηλότερες από 35°C είναι θανατηφόρες για ένα αριθμό ειδών (Χώτος, 2016).

Οι χαμηλές θερμοκρασίες συχνά μειώνουν την αύξηση των μικροφυκών, καθώς επιβραδύνουν κυτταρικές διεργασίες, περιορίζουν την πρόσληψη του αζώτου ή επηρεάζουν τις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης και την φωτοσυνθετική συσκευή. Κάποια είδη αντιδρούν στη χαμηλή θερμοκρασία με αύξηση των λιπιδίων που ρυθμίζουν τη ρευστότητα της μεμβράνης των θυλακοειδών (Γκέλης κ.α., 2015). Σε χαμηλές θερμοκρασίες μειώνεται και το σημείο έντασης του φωτισμού που δημιουργεί ανασταλτικές συνθήκες ή φωτοοξείδωση. Με άλλα λόγια σε ψυχρές περιοχές ή περιόδους του έτους η φωτοοξείδωση είναι πιο έντονη και συχνότερο φαινόμενο (Carvalho, et al., 2009, Jensen and Knutsen, 1993, Richmond, 1999). Η Sheehan (1998) επεσήμανε ότι η αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης προκάλεσε αύξηση πολλαπλασιασμού κυττάρων, πιθανώς λόγω των αλλαγών των κυτταρικών μεταβολικών δραστηριοτήτων σε απόκριση του περιβαλλοντικού στρες.

Η εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας για ένα είδος ή στέλεχος είναι πολύ σημαντική καθώς μόνο σε αυτή υπάρχει και βέλτιστη αύξηση. Ενδεικτικά αναφέρονται οι τιμές βέλτιστης θερμοκρασίας καλλιέργειας μερικών ειδών:

20-23 °C : *Nannocloropsis oculata*, *Dunaliella salina*, *Chorella sp.*, *Asteromonas gracilis*.

18-20 °C : *Isochrysis sp.*, *Tetraselmis suecica*, *Rodomonas salina* (Χώτος, 2016).

16.3 pH

Το εύρος του pH για τα περισσότερα καλλιεργούμενα είδη μικροφυκών κυμαίνεται από 7,0-9,0 ενώ το βέλτιστο εύρος είναι 8,2-8,7 (για τα θαλασσινά είδη), 7,0-8,0 (για τα είδη του γλυκού νερού) (Χώτος, 2016). Ωστόσο, υπάρχουν οξεόφιλα είδη (π.χ. χλωροφύκος *Chlamydomonas acidophila*) αλλά και αλκαλόφιλα (π.χ. κυανοβακτήρια του γένους *Arthrospira*). Το CO₂ στις τιμές pH στις οποίες αναπτύσσονται τα περισσότερα φύκη βρίσκεται διαλυμένο στο νερό είτε με μορφή διττανθρακικού (HCO₃⁻), είτε με μορφή ανθρακικού ιόντος (CO₃²⁻). Τόσο κατά τη φωτοσύνθεση όσο και κατά τη μετατροπή των ανθρακικών ιόντων σε CO₂ και την δέσμευσή του, παράγονται ιόντα OH⁻ και ως εκ τούτου η τάση στις καλλιέργειες των φυκών είναι να αυξάνεται το pH. Απότομες αλλαγές στο pH μπορεί να έχουν καταστροφικές επιπτώσεις σε μια καλλιέργεια (Γκέλης κ.α., 2015).

Αν το pH αυξηθεί πάνω από μια τιμή τότε επέρχεται κυτταρόλυση. Το αντίθετο συμβαίνει όταν χρησιμοποιείται αμμωνία ως πηγή αζώτου, όπου κατά την πρόσληψή της από τα μικροφύκη παράγονται ιόντα H⁺, ωθώντας το pH να μειωθεί (Μάρκου κ.α., 2013). Μεγάλες τιμές του pH ευνοούν την στερεοποίηση και καθίζηση του φωσφόρου με ανάλογες επιπτώσεις στην καλή ανάπτυξη των μικροφυκών (Borowitzka, 1998).

Ένας άλλος τρόπος ρύθμισης του pH είναι με παροχέτευση CO₂ που δεσμεύει ιόντα OH⁻ για την παραγωγή HCO₃⁻ (διττανθρακικού) (Γκέλης κ.α., 2015).

Η πλήρης αποτυχία της καλλιέργειας εξαιτίας της διακοπής πολλών κυτταρικών λειτουργιών, μπορεί να προκύψει από αποτυχία διατήρησης ενός αποδεκτού pH. Κάτι τέτοιο μπορεί να αποφευχθεί με τον αερισμό της καλλιέργειας. Στην περίπτωση της υψηλής πυκνότητας καλλιέργειας μικροφυκών, και επειδή η φωτοσύνθεση κάνει το pH αλκαλικό, προσθήκη CO₂ επιτρέπει να διορθωθεί (χαμηλώσει) το αυξανόμενο pH το οποίο μπορεί να φτάσει οριακές τιμές μέχρι pH=9,0 κατά τη φυκική αύξηση. (Χώτος, 2016).

16.4 Αλατότητα

Το θαλάσσιο φυτοπλαγκτό είναι εξαιρετικά ανεκτικό στις αλλαγές της αλατότητας. Τα περισσότερα είδη αναπτύσσονται καλύτερα σε μια αλατότητα η οποία είναι ελαφρώς χαμηλότερη από αυτή του βιοτόπου τους. Η αλατότητα αυτή επιτυγχάνεται με την αραιώση του θαλασσινού νερού με το νερό της βρύσης. Τα περισσότερα θαλάσσια είδη αναπτύσσονται σε αλατότητες 20-30 ‰ με βέλτιστες αυτές των 20-25‰ ανάλογα το είδος (Χώτος, 2016).

Υπάρχουν είδη που δεν αναπτύσσονται σε αλατότητα μεγαλύτερη από 4‰. Υπάρχουν όμως άλλα είδη μικροφυκών όπως πχ η *Dunaliella salina* που αναπτύσσεται καλύτερα σε αλμυρά ή υφάλμυρα νερά με μεγάλες συγκεντρώσεις αλάτων. Άλλα μικροφύκη όπως το *Chlorella* κ.α. είναι ανεκτικά-ανθεκτικά σε μεγάλες αλατότητες αλλά δεν τις προϋποθέτουν (Μάρκου κ.α., 2013). Η απόκριση διαφορετικών ειδών φυκών ποικίλλει σε διαφορετικές αλατότητες όπως έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες (Huang et al., 2011, Hu and Gao, 2006, Takagi et al., 2006, Zhang et al., 1999). Ο Sudhir και ο Murthy (2004) κατέδειξαν ότι αν και η υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι επηρεάζει τη φυσιολογική διαδικασία στον μικροοργανισμό, κάθε είδος διαφέρει στην απόκριση ανάπτυξης στην αλατότητα.

Τα μικροφύκη διαφέρουν ως προς την προσαρμοστικότητά τους στην αλατότητα και με βάση την ανοχή τους καθώς ομαδοποιούνται ως αλοφιλικά (halophilic) και αλοανθεκτικά (halotolerant) (Rao et al., 2007).

Η αλατότητα και η θερμοκρασία έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τα χαρακτηριστικά των θρεπτικών ιδιοτήτων στα μικροφύκη (Hemaiswarya et al., 2011). Οι μεταβολές στην αλατότητα επηρεάζουν επίσης αρκετούς βιοχημικούς και φυσιολογικούς μηχανισμούς όπως η παραγωγή λιπιδίων και η ανάπτυξη που είναι απαραίτητοι σε θαλάσσιους οργανισμούς (Fava and Martini, 1988). Επίσης έχει παρατηρηθεί πως το μικροφύκος *Dunaliella salina* «ανθίζει» και παράγει υψηλά ποσοστά β-καροτένιου σε συνθήκες υψηλής αλατότητας και έντασης φωτισμού όταν η συγκέντρωση του αζώτου είναι χαμηλή (Abu-Rezq et al., 2010).

Η αυξημένη αλατότητα επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη των μικροφυκών επιδρώντας άμεσα στο σύστημα της φωτοσύνθεσης (φωτοσύνστημα II) (Barsanti and Gualtieri, 2006, Bilanovic, et al., 2009, Richmond, 2004).

Αν και τα θαλάσσια μικροφύκη είναι ικανά να αναπτυχθούν και να φωτοσυνθέσουν σε αλατότητες που κυμαίνονται από 20 έως 30 ‰, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στα μοτίβα ανάπτυξης καθώς μειώθηκε η αλατότητα (πχ. *C. Calcitrans*) (Nurul et al., 2013). Αυτή η τάση μπορεί να συσχετίζεται με τον περιορισμό των θρεπτικών παραγόντων στο θαλασσινό νερό μετά την αραιώση (Raghavan et al., 2008).

16.5 Αερισμός

Για να διασφαλιστεί ότι όλα τα κύτταρα του πληθυσμού εκτίθενται εξίσου στο φως και στα θρεπτικά συστατικά είναι απαραίτητη η ανάδευση-αναμιξη του νερού. Με την ανάδευση αποτρέπεται επίσης η ιζματοποίηση των φυκών, η θερμική στρωματοποίηση (υπαίθριες καλλιέργειες) και βελτιώνεται η ανταλλαγή των αερίων μεταξύ καλλιέργειας και αέρα. Αυτή η ανταλλαγή των αερίων είναι ιδιαίτερα σημαντική διότι ο αέρας περιέχει την πηγή άνθρακα που απαιτείται για την επιτέλεση της φωτοσύνθεσης, σε μορφή CO₂. Για τις πολύ πυκνές καλλιέργειες το CO₂ προέρχεται από τις φυσαλίδες του παρεχόμενου αέρα (0,04%C). Θα μπορούσε να προστεθεί καθαρό CO₂ στην παροχή του αέρα (1% του όγκου του αέρα) για καλύτερη ανάπτυξη. Η προσθήκη του CO₂ επίσης εξισορροπεί το νερό απέναντι στις αλλαγές του pH (αλκαλοποίηση) που συμβαίνουν κατά τη φωτοσύνθεση (Χώτος, 2016).

Το CO₂ όταν είναι διαλυμένο στο νερό για τις τιμές του pH στο οποίο αναπτύσσονται τα περισσότερα μικροφύκη βρίσκεται είτε σε μορφή διττανθρακικής ρίζας (HCO₃⁻), είτε σε μορφή ανθρακικής ρίζας (CO₃²⁻) σε μεγαλύτερες τιμές του pH. Τα μικροφύκη (με εξαίρεση ορισμένες κατηγορίες όπως για παράδειγμα τα ροδοφύκη) έχουν έναν μηχανισμό κατά τον οποίο το διαλυμένο CO₂ συγκεντρώνεται γύρω από το κύτταρο και είτε ο άνθρακας απορροφάται ως διττανθρακική ρίζα είτε με την βοήθεια ενζύμων απορροφάται σε μορφή CO₂ (Badger and Price, 2003, Giordano, et al., 2005).

Η συγκέντρωση του CO₂ στην ατμόσφαιρα είναι περίπου 0,036% και δεδομένου ότι τα μικροφύκη μπορούν να αναπτυχθούν σε υπόστρωμα καλλιέργειας που να περιέχει ως και 15% διαλυμένο CO₂ και ότι για την παραγωγή 1 κιλού ξηρής βιομάζας μικροφυκών χρειάζονται περίπου 1,8 κιλά CO₂ η παροχή CO₂ από την ατμόσφαιρα προϋποθέτει να παροχετεύονται στις καλλιέργειες μεγάλοι όγκοι αέρα για την ικανοποιητική ανάπτυξη βιομάζας (Μάρκου κ.α., 2013). Για τον λόγο αυτό το CO₂ μπορεί να παρέχεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είτε χρησιμοποιώντας μη τοξικά καυσαέρια από παραγωγικές δραστηριότητες είτε χρησιμοποιώντας διάφορα ανθρακικά άλατα, όπως για παράδειγμα η ανθρακική ή διττανθρακική σόδα για είδη μικροφυκών που καλλιεργούνται σε υψηλά επίπεδα pH (Brennan and Owende, 2013, Doucha, et al., 2005, Ferreira, et al., 2012, Wang, et al., 2008).

Κατά την φωτοσύνθεση και κατά την μετατροπή της διττανθρακικής ρίζας σε CO₂ και την δέσμευσή του παράγονται ιόντα OH⁻, σύμφωνα με την χημική αντίδραση



και ως εκ τούτου η τάση στις καλλιέργειες των μικροφυκών είναι να αυξάνεται το pH τους. Σε περιπτώσεις μη-ρύθμισης του pH οι τιμές του μπορεί να ανέλθουν ακόμα και στο 11 με ανάλογες επιπτώσεις στην καλλιέργεια (Μάρκου κ.α., 2013). Ένας τρόπος ρύθμισης του pH είναι η παροχέτευση CO₂ που δεσμεύει ιόντα OH⁻ για την παραγωγή HCO₃⁻, ενώ επίσης μπορεί να γίνει με διάφορα οξέα (ανόργανα ή και οργανικά) (Grobbelaar, 2004).

Ορισμένα μικροφύκη, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, μπορούν να αξιοποιήσουν και οργανικό άνθρακα ως πηγή άνθρακα. Τα μικροφύκη έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται αξιοποιώντας διάφορες οργανικές ουσίες τις οποίες απορροφούν με συγκεκριμένους μηχανισμούς ανάλογα με την οργανική ουσία. Για παράδειγμα η απορρόφηση γλυκόζης γίνεται μετά από φωσφορυλίωση, η

γλυκερόλη με απλή διάχυση εντός των κυττάρων και τα οργανικά οξέα με τη χρήση μεταφορικών πρωτεϊνών των μεμβρανών (Perez-Garcia, et al., 2011).

16.6 Θρεπτικά Συστατικά

Τα μικροφύκη για να πολλαπλασιαστούν πέρα από την ενέργεια και τον άνθρακα χρειάζονται και διάφορα άλλα ανόργανα στοιχεία τα οποία είναι αναγκαία για τις διάφορες μεταβολικές κυτταρικές διεργασίες. Τα κυριότερα θρεπτικά στοιχεία (μακροστοιχεία) που είναι αναγκαία για την ανάπτυξη των μικροφυκών, πέρα από τον άνθρακα είναι το άζωτο (N), ο φώσφορος (P) και το κάλιο (K). Αναγκαία αλλά σε μικρότερες ποσότητες τα μικροστοιχεία όπως το θείο (S), ο σίδηρος (Fe), το μαγνήσιο (Mg), το ασβέστιο (Ca), όπως και διάφορα άλλα μέταλλα (πχ μόλυβδος, νικέλιο, κλπ) (Μάρκου κ.α., 2013).

Άζωτο

Το άζωτο είναι ένα από τα βασικότερα θρεπτικά στοιχεία γιατί συμμετέχει σε αρκετά σημαντικά βιοχημικά μακρομόρια (πρωτεΐνες, DNA, RNA κλπ) και η παροχή του είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Η περιεκτικότητα του αζώτου στην βιομάζα των μικροφυκών, ειδικά σε εκείνα που περιέχουν μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών, μπορεί να ανέλθει ακόμα και στο 10%. Το άζωτο μπορεί να προσληφθεί από διάφορες μορφές όπως αμμωνιακό άζωτο, νιτρικό και λιγότερο από τη νιτρώδη μορφή. Επίσης ορισμένα είδη μικροφυκών (όπως τα κυανοβακτήρια *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Anabaena* κλπ) μπορούν να δεσμεύσουν μοριακό άζωτο από την ατμόσφαιρα με τη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης. Όταν το άζωτο είναι σε μοριακή μορφή διαχέεται κατευθείαν εντός των κυττάρων διαπερνώντας τις μεμβράνες (Μάρκου κ.α., 2013).

Τα μικροφύκη γενικά προτιμούν την πρόσληψη αζώτου υπό αμμωνιακή μορφή γιατί δεν χρειάζονται να ξοδέψουν ενέργεια όπως χρειάζεται για τα νιτρικά τα οποία πρέπει πρώτα να αναχθούν σε αμμωνιακή μορφή (Boussiba and Gibson, 1991, Grobbelaar, 2004). Παρόλα αυτά η παροχή νιτρικών αλάτων έχει δείξει ότι έχει καλύτερα αποτελέσματα στην παραγωγή βιομάζας (Costa, et al., 2001). Επιπλέον, μεγάλες συγκεντρώσεις αμμωνίας στα υποστρώματα ανάπτυξης δρουν τοξικά και αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροφυκών (Azon and Goldman, 1982).

Για την μείωση του κόστους παραγωγής χρησιμοποιώντας νιτρικά άλατα, αρκετοί ερευνητές προσπάθησαν να τα αντικαταστήσουν με φτηνότερα υλικά. Αυτό που δείχνει να έχει ενδιαφέρον για την παραγωγή μικροφυκών σε μεγάλη κλίμακα είναι η χρήση ουρίας ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) (Μάρκου κ.α., 2013). Ένα από τα μειονεκτήματα της χρήσης ουρίας είναι ότι το παραγόμενο αμμώνιο, ειδικά σε αλκαλικά υποστρώματα ανάπτυξης διαφεύγει και χάνεται στην ατμόσφαιρα (Danesi, et al., 2002, Hsieh and Wu, 2009, Matsudo, et al., 2009).

Φώσφορος

Ο φώσφορος είναι ουσιαστικής σημασίας θρεπτικό στοιχείο για την ανάπτυξη των μικροφυκών και συμμετέχει ως στοιχείο σε διάφορα μακρομόρια, όπως φωσφολιπίδια, τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) κ.α. Τα μικροφύκη περιέχουν λιγότερο από 1% φώσφορο στη βιομάζα τους, παρόλα αυτά ο φώσφορος πολύ συχνά είναι ο περιοριστικός παράγοντας ανάπτυξης, ειδικότερα σε φυσικά περιβάλλοντα (πχ λίμνες). Η διαλυτότητα του φωσφόρου επηρεάζεται πολύ ισχυρά από την

παρουσία ιόντων (πχ Mg^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+}) με ποιο σημαντικό το ιόν του ασβεστίου (Ca^{2+}) (Μάρκου κ.α., 2013).

Όταν η συγκέντρωση φωσφόρου στο περιβάλλον είναι χαμηλή τότε τα μικροφύκη τον αποθηκεύουν σε μεγαλύτερες ποσότητες από αυτές που χρειάζονται άμεσα. Η αποθήκευση του φωσφόρου γίνεται υπό μορφή κόκκων πολυφωσφορικού οξέος και μπορεί να καλύψει τις ανάγκες δύο ή ακόμα και τριών γενεών (Oliver, et al., 2012, Powell, et al., 2011).

17. Συστήματα καλλιέργειών

Η καλλιέργεια των μικροφυκών μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ανοικτού ή κλειστού τύπου καλλιέργειες. Στις ανοικτού τύπου καλλιέργειες, τα μικροφύκη καλλιεργούνται σε τεχνητούς ή φυσικούς περιέκτες, όπως δεξαμενές, νερόλακκοι, λίμνες ή ακόμα και απευθείας στην ανοικτή θάλασσα, όπως στην περίπτωση των μακροφυκών. Στις κλειστού τύπου καλλιέργειες τα φύκη καλλιεργούνται σε κλειστούς περιέκτες που μπορεί να είναι από μία απλή γυάλινη ή πλαστική κωνική φιάλη μέχρι πολύπλοκες κατασκευές που ονομάζονται φωτοβιοαντιδραστήρες. Οι φωτοβιοαντιδραστήρες αποτρέπουν την άμεση επαφή της καλλιέργειας με τις εξωτερικές συνθήκες και έτσι την προστατεύουν από τους διάφορους περιβαλλοντικούς κινδύνους (Pulz, 2001, Richmond, 1992).

17.1 Ανοικτού τύπου καλλιέργειες

Οι ανοικτού τύπου καλλιέργειες των φυκών πλεονεκτούν έναντι των καλλιέργειών κλειστού τύπου γιατί έχουν μικρότερο κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας (Jorquera, et al., 2010).

Παρουσιάζουν όμως και αρκετά μειονεκτήματα. Τα κυριότερα είναι τα εξής:

1. Επιμολύνσεις:

Οι επιμολύνσεις συμβαίνουν γιατί σε αυτά τα συστήματα τα φύκη είναι εκτεθειμένα στους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Οι επιμολύνσεις αλλοιώνουν την σύσταση των καλλιέργειών και δυσκολεύουν την εφαρμογή της μονο-καλλιέργειας. Έντονες επιμολύνσεις μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την μικρή παραγωγή ή και σε ορισμένες περιπτώσεις την κατάρρευση της καλλιέργειας είτε λόγω της επικράτησης άλλων μικροοργανισμών είτε λόγω της εμφάνισης παρασιτικών ασθενειών (Day, et al., 2011).

2. Απώλειες λόγω εξάτμισης:

Η εξάτμιση του νερού έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια σημαντικών ποσοτήτων νερού και επομένως την αύξηση της συγκέντρωσης αλάτων που από ένα επίπεδο και πάνω επιδρούν ανασταλτικά στην αύξηση των μικροφυκών. Επομένως γίνεται χρήση μεγάλων ποσοτήτων νερού προκειμένου να αναπληρωθεί η ποσότητα του νερού που εξατμίστηκε. Βέβαια το νερό που θα χρησιμοποιηθεί μπορεί να είναι υφάλμυρο ή αλμυρό, ανάλογα με το είδος του μικροφύκου που καλλιεργείται και την ανεκτικότητά του στην παρουσία αλάτων (Bilanovic, et al., 2009) αντλώντας και χρησιμοποιώντας έτσι μη πόσιμο ή/και μη αρδεύσιμο νερό από διάφορες πηγές.

3. Θερμοκρασιακές μεταβολές:

Επίσης σε ορισμένες τοποθεσίες, οι περίοδοι καλλιέργειας είναι περιορισμένες, λόγω έντονων εποχιακών περιβαλλοντικών διακυμάνσεων ή χαμηλών θερμοκρασιών και

ηλιοφάνειας. Για τον λόγο αυτό χώρες με μεγάλη διάρκεια και ένταση ηλιοφάνειας, όπως η Ελλάδα, έχουν πλεονέκτημα για την εγκατάσταση καλλιέργειας μικροφυκών, δεδομένου ότι η παραγωγή σε βιομάζα μπορεί να είναι ως και δέκα φορές μεγαλύτερη σε σχέση με περιοχές με μικρή διάρκεια και ένταση ηλιοφάνεια (Brányiková, et al., 2011).

4. Μικρή αποτελεσματικότητα στην αξιοποίηση του CO₂

5. Αναποτελεσματική ανάδευση του υποστρώματος:

Η ανάδευση είναι αναγκαία γιατί εμποδίζει την συσσωμάτωση και καθίζηση των μικροφυκών, αυξάνει την αξιοποίηση του φωτός, ομογενοποιεί το υπόστρωμα καθιστώντας τα διαλυτά ανόργανα και οργανικά στοιχεία πιο προσιτά για την πρόσληψή τους από τα μικροφύκη (Chaumont, 1993).

6. Μικρή αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας (Brennan and Owende, 2010).

7. Υψηλό κόστος συγκομιδής:

Επίσης η παραγωγή ανά μονάδα επιφάνειας είναι μικρότερη σε σχέση με τις κλειστού τύπου καλλιέργειες με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της βιομάζας να είναι σχετικά μικρή ανεβάζοντας πολύ το κόστος συγκομιδής (Norsker, et al., 2011).

Τα προβλήματα των ανοικτών καλλιεργειών μπορούν να αντιμετωπιστούν με την χρήση κατάλληλων συνθηκών για το είδος του μικροφύκου που θα καλλιεργηθεί. Αποτελεσματικές συνθήκες είναι εκείνες όπου μόνο το επιλεγθέν μικροφύκος μπορεί να αναπτυχθεί, ενώ είναι ακατάλληλες για τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Παραδείγματα ειδών που καλλιεργούνται σε ακραίες συνθήκες είναι η *Dunaliella salina* που καλλιεργείται σε αλμυρά νερά (>20% άλας). Επίσης για μια αποτελεσματική καλλιέργεια μπορεί να χρησιμοποιηθούν είδη μικροφυκών με σχετικά υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης για την επικράτηση έναντι άλλων μικροοργανισμών όπως τα μικροφύκη των γενών *Chlorella*, *Scenedesmus* και *Phaeodactylum* (Borowitzka, 1999, Brennan and Owende, 2010, Chen, 1996, Ugwu, et al., 2008).

Το βάθος των ανοικτών δεξαμενών είναι σημαντικό και θεωρείται βέλτιστο όταν κυμαίνεται μεταξύ 20 και 30 cm, αλλά αναλόγως το είδος του μικροφύκου και τις κλιματικές συνθήκες της περιοχής μπορεί να είναι μεγαλύτερο ή μικρότερο (Borowitzka, 1999).

17.2 Κλειστού τύπου καλλιέργειες

Στατικές καλλιέργειες

Η καλλιέργεια ενός φύκου μπορεί να γίνει σε σταθερό όγκο θρεπτικού μέσου χωρίς καμία επέμβαση μέχρι την ολοκλήρωσή της. Ο συγκεκριμένος τύπος καλλιεργειών είναι γνωστός ως στατικές καλλιέργειες και χρησιμοποιείται κυρίως για τη συντήρηση αποθέματος καλλιεργειών, την απομόνωση στελεχών και τη δημιουργία νέων καλλιεργειών, τη διερεύνηση του ρυθμού

αύξησης ή των αναπτυξιακών φάσεων ενός φύκου. Οι στατικές καλλιέργειες μπορεί να γίνουν σε δοκιμαστικούς σωλήνες, τριβλία Petri ή κωνικές φιάλες (Γκέλης et al., 2015).

Στις στατικές καλλιέργειες, η μοναδική επέμβαση είναι η περιοδική ή συνεχής ανάμιξη του θρεπτικού μέσου, που επιτυγχάνεται είτε με μηχανική ανάδευση ολόκληρου του δοχείου της καλλιέργειας είτε με την παροχή αέρα (απαλλαγμένου από σωματίδια και μικροοργανισμούς) στη βάση των δοχείων καλλιέργειας. Μια τροποποίηση των στατικών καλλιέργειών είναι οι ημι-συνεχείς καλλιέργειες και διαφέρουν από τις στατικές λόγω της περιοδικής απομάκρυνσης-λήψης συγκεκριμένου όγκου καλλιέργειας και την αναπλήρωσή του με ισόποσο όγκο θρεπτικού μέσου. Αυτός ο τρόπος παραγωγής καλλιέργειας μικροφυκών ακολουθείται συνήθως όταν αυτά χρησιμοποιούνται ως τροφή σε εκκολαπτήρια ιχθυδίων καθώς και σε μαζικές εμπορικές καλλιέργειες (Γκέλης et al., 2015).

Η καλλιέργεια ενός φύκου σε δεδομένο θρεπτικό μέσο και σύστημα παραγωγής αρχίζει με τον ενοφθαλισμό, δηλαδή τη μεταφορά ζώντων κυττάρων στο μέσο ανάπτυξης. Ο τρόπος και η ποσότητα του αρχικού εμβολίου είναι καθοριστικής σημασίας για την εξέλιξη της καλλιέργειας καθώς επηρεάζει άμεσα την επιτυχία του ενοφθαλισμού και την καθαρότητα της καλλιέργειας. Η αύξηση των φυκών ανά μονάδα χρόνου συνδέεται **μη γραμμικά** με τον χρόνο, για αυτό συχνά εκφράζεται ως **ειδικός ρυθμός αύξησης**. Ο ειδικός ρυθμός αύξησης (μ) υπολογίζεται στην εκθετική φάση αύξησης και δίνεται από την σχέση:

$$\mu = \frac{(\ln x_2 - \ln x_1)}{(t_2 - t_1)}$$

όπου το X_1 αναφέρεται στην τιμή της παραμέτρου (π.χ. αριθμός κυττάρων, συγκέντρωση χλωροφύλλης-α, οπτική πυκνότητα κ.λπ.) που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του ρυθμού αύξησης στον χρόνο t_1 και το X_2 στην τιμή αυτής της παραμέτρου στον χρόνο t_2 (Guillard, 1973).

Ο χρόνος γενεάς (t_g) αναφέρεται στον χρόνο που απαιτείται για τον διπλασιασμό της παραμέτρου και προκύπτει από την παραπάνω σχέση:

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Από τον χρόνο του εμβολιασμού έως την παύση αύξησης του μικροοργανισμού (κατάρρευση καλλιέργειας) μεσολαβούν 5 φάσεις.

Φάση καθυστέρησης (1)

Στη φάση αυτή ο οργανισμός δεν αυξάνεται. Οι κυριότεροι βασικοί λόγοι καθυστέρησης της αύξησης του πληθυσμού είναι : η αδρανοποίηση κάποιων ένζυμων, ο μειωμένος μεταβολισμός, η απουσία κυτταρικών διαιρέσεων (Χώτος, 2016).

Φάση εκθετικού ρυθμού αύξησης (2)

Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από ένα σταθερό και ταχύ ρυθμό κυτταρικών διαιρέσεων. Στη φάση αυτή η πυκνότητα των κυττάρων αυξάνεται με το χρόνο σύμφωνα με τη λογαριθμική εξίσωση

$$C_t = C_0 e^{\mu t}$$

C_t και C_0 είναι οι συγκεντρώσεις κυττάρων σε χρόνο t και 0 αντίστοιχα και μ ο ειδικός ρυθμός αύξησης. Ο εκάστοτε ρυθμός αύξησης εξαρτάται από τα είδη της καλλιέργειας, την ένταση του φωτός και τη θερμοκρασία (Χώτος, 2016).

Φάση πτωτικής τάσης ρυθμού αύξησης (3)

Στη φάση αυτή αναστέλλονται οι κυτταρικές διαιρέσεις. Οι κυριότερες πιθανές αιτίες είναι: η εξάντληση των θρεπτικών συστατικών, η μειωμένη διαθεσιμότητα CO_2 , η αλλαγή του pH, η μειωμένη διαπερατότητα του φωτός, η παραγωγή τοξικών ουσιών (Χώτος, 2016).

Στατική φάση (4)

Στη φάση αυτή δε παρατηρείται πλέον αύξηση του αριθμού των ατόμων είτε λόγω μείωσης των θρεπτικών διαθεσίμων είτε λόγω απελευθέρωσης τοξικών υποπροϊόντων του μεταβολισμού των μικροοργανισμών (Γκέλης et al., 2015).

Φάση κατάρρευσης - θανάτου (5)

Καθώς τα θρεπτικά συστατικά έχουν εξαντληθεί και η ποιότητα του νερού έχει μειωθεί οι κυτταρικές διαιρέσεις έχουν σταματήσει και τελικώς η καλλιέργεια καταρρέει παρουσιάζοντας την εικόνα είτε ενός θολού νερού, είτε ενός διαυγούς νερού με ένα στρώμα ιζήματος νεκρών ατόμων στον πυθμένα του δοχείου. Η κατάρρευση της καλλιέργειας χαρακτηρίζεται από εκθετική μείωση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων (Χώτος, 2016).

Στην πράξη η κατάρρευση της καλλιέργειας μπορεί να προκληθεί από ποικίλους λόγους, συμπεριλαμβανομένου της μείωσης ενός θρεπτικού συστατικού, της ανεπάρκειας CO_2 , της υπερθέρμανσης, της διαταραχής του pH ή της επιμόλυνσης από πρωτόζωα. Το κλειδί για την επιτυχία μιας μικροφυκικής παραγωγής είναι να διατηρεί όλες τις καλλιέργειες στη φάση εκθετικής αύξησης. Επιπλέον η θρεπτική αξία των παραγόμενων φυκών είναι κατώτερη όταν η καλλιέργεια έχει ξεπεράσει τη φάση 3 εξαιτίας της παρατηρούμενης συχνά μειωμένης πεπτικότητάς των από τα τροχόζωα, της ανεπαρκούς σύνθεσης και της πιθανής παραγωγής τοξικών μεταβολιτών (Χώτος, 2016).

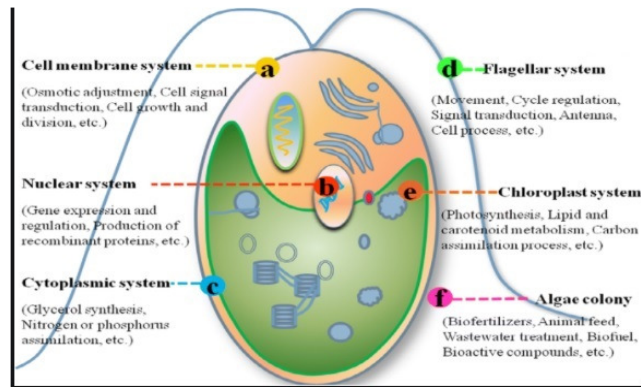
Συνεχείς καλλιέργειες - Φωτοβιοαντιδραστήρες

Σε μια κλειστού τύπου καλλιέργεια υπάρχει δυνατότητα καλλιέργειας φυκών παρατεταμένης διάρκειας. Στις καλλιέργειες αυτού του τύπου που ονομάζονται συνεχείς καλλιέργειες, η προγραμματισμένη σταδιακή αφαίρεση όγκου καλλιέργειας και η ταυτόχρονη προσθήκη ισόποσου όγκου θρεπτικού μέσου εξασφαλίζουν υψηλότερους ρυθμούς αύξησης και μεγαλύτερο βαθμό ασφάλειας σε ποιοτικά μεγέθη των προϊόντων της καλλιέργειας. Συστήματα συνεχούς

καλλιέργειας χρησιμοποιούνται σε πειραματικές καλλιέργειες, για παραγωγή βιομάζας που προορίζεται για χρήση στη φαρμακοβιομηχανία, για μετάβαση από μικρότερου σε μεγαλύτερου όγκου εμπορικές καλλιέργειες και σε μικρής-μεσαίας κλίμακας εμπορικές καλλιέργειες.

Στις καλλιέργειες κλειστού τύπου οι συνθήκες είναι περισσότερο ελεγχόμενες.

Οι κλειστού τύπου καλλιέργειες πραγματοποιούνται σε κλειστούς περιέκτες, τους φωτοβιοαντιδραστήρες (Γκέλης et al., 2015).



Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι:

1. καλύτερος έλεγχος των συνθηκών καλλιέργειας,
2. μεγαλύτερος λόγος επιφάνειας/όγκου,
3. σε ορισμένους τύπους φωτοβιοαντιδραστήρων καλύτερος έλεγχος της κίνησης των αερίων (πχ CO₂)
4. περιορισμός της εξάτμισης νερού
5. σχετικά εύκολη εγκατάσταση σε ανοιχτό χώρο
6. προστασία από επιμολύνσεις από διάφορους μικροοργανισμούς
7. σχετικά υψηλές αποδόσεις σε σχέση με τις ανοικτές δεξαμενές (Chen, 1996, Chisti, 2007).

Παρόλα τα πλεονεκτήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων σε σχέση με τις ανοικτές δεξαμενές οι καλλιέργειες αυτού του τύπου έχουν αυξημένο κόστος κατασκευής και λειτουργίας και επίσης περιορισμένη δυνατότητα να κατασκευαστούν σε μεγάλης κλίμακας εγκαταστάσεις. Ένας βασικός περιοριστικός παράγοντας για μεγάλης κλίμακας φωτοβιοαντιδραστήρες είναι η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου στο υγρό θρεπτικό μέσο. Το μοριακό οξυγόνο που παράγεται κατά τη φωτοσύνθεση, λόγω των συνθηκών εντός του φωτοβιοαντιδραστήρα, διαλύεται στο θρεπτικό μέσο και στη συνέχεια θα πρέπει να απομακρυνθεί με κάποιον τρόπο γιατί οι μεγάλες συγκεντρώσεις διαλυμένου οξυγόνου είναι ανασταλτικές της ανάπτυξης (Γκέλης et al., 2015).

18. *Dunaliella salina*

Υπερβασίλειο: Eukaryota

Βασίλειο: Plantae
 Φύλο: Chlorophyta
 Ομοταξία: Chlorophyceae
 Τάξη: Chlamydomonadales
 Οικογένεια: Dunaliellaceae
 Γένος: *Dunaliella*
 Είδος: *salina*

(algaebase.org/taxonomy)

Εικόνα 10.α Κύτταρο *Dunaliella salina*.

Είναι ένα μονοκύτταρο είδος με 2 ισομεγέθη μεγάλα μαστίγια. Δεν διαθέτει κυτταρικό τοίχωμα. Το γένος *Dunaliella* περιλαμβάνει 29 είδη. Το είδος *Dunaliella salina* όπως και πολλά από τα συγγενικά του, είναι θαλάσσιο και ειδικά αυτό αντέχει σε εξαιρετικά μεγάλες αλατότητες (έως περίπου 310 ppt). Παρουσιάζει αντοχή και στο pH ανεχόμενο ακόμα και τιμή 11. Επίσης είναι ανθεκτικό και σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (από <math><0^{\circ}\text{C}</math> έως $>38^{\circ}\text{C}$). Λόγω αυτών των ιδιοτήτων ενδημεί σε όλες τις αλμυρές λίμνες του κόσμου καθώς και στις λεκάνες των αλυκών όπου κατά τα τελικά στάδια συμπύκνωσης του νερού, χρωματίζει το νερό πορτοκαλοκόκκινο λόγω της συσσώρευσης στα κύτταρα της μεγάλων ποσοτήτων β-καροτενίου. Το β-καροτένιο είναι πολύτιμο προϊόν για τον άνθρωπο γι' αυτό η *Dunaliella salina* καλλιεργείται εντατικά σε πολλά μέρη του κόσμου για την παραγωγή αυτής της χρωστικής (Χώτος, 2016).



Εικόνα 10.β. Κύτταρα *Dunaliella salina*

Το σχήμα και το μέγεθος του κυττάρου της ποικίλει. Μπορεί να είναι αχλαδοειδές, οβάλ ή σφαιρικό. Το μέγεθος κυμαίνεται από 8-22 μm και το χρώμα των κυττάρων της μπορεί να είναι πράσινο, πορτοκαλοπράσινο, πορτοκαλί ή κόκκινο ανάμεσα στα είδη ή και ανάμεσα στο ίδιο είδος. Είναι εξαιρετική τροφή για τα τροχόζωα στις υδατοκαλλιέργειες καθώς έχει ικανοποιητική περιεκτικότητα και σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Χώτος, 2016).

Αναπαράγεται κυρίως αγενώς με απλή κυτταρική διαίρεση αλλά και εγγενώς με ένωση 2 κυττάρων συμπεριφερόμενων ως γαμέτες. Το προϊόν της ένωσης των γαμετών είναι ένας ευμεγέθης διπλοειδής ζυγωτής πολύ ανθεκτικός (ακόμα και στο γλυκό νερό ή την ξηρότητα). Σε ευνοϊκές συνθήκες ο ζυγωτής που έχει υποστεί μείωση και κατόπιν διαδοχικές μιτωτικές διαιρέσεις απελευθερώνει μέχρι και 32 απλοειδή θυγατρικά κύτταρα (Χώτος, 2016).

Το κύτταρο αποτελείται από έναν μεγάλο χλωροπλάστη με ένα ομόκεντρο (single centered) συσσωμάτωμα άμυλου που περιβάλλεται από πυρηνοειδές, μερικά κενοτόπια, έναν πυρηνίσκο και έναν πυρήνα. Τα κύτταρα του *Dunaliella* περικλείονται από μια λεπτή ελαστική μεμβράνη πλάσματος που καλύπτεται από μια επιφανειακή επίστρωση βλεννογόνου η οποία επιτρέπει ταχείες αλλαγές στον όγκο των κυττάρων σε απόκριση σε εξωκυτταρικές αλλαγές (Abu-Reza et al., 2010). Προς το παρόν η *Dunaliella salina* αναγνωρίζεται ως ο πιο ανθεκτικός ευκαρυωτικός οργανισμός στην υψηλή αλατότητα (Ben-Amotz et al., 1982, Loeblich, 1982, Garcia-Gonzalez et al., 2003, Gomez et al., 2003, Gomez & Gornzalez 2005).

19. *Tetraselmis* sp.

Υπερβασιλείο: Eukaryota

Βασίλειο: Plantae

Φύλο: Chlorophyta

Ομοταξία: Chlorodendrophyceae

Τάξη: Chlorodendrales

Οικογένεια: Chlorodendraceae

Γένος: *Tetraselmis*

(algaebase.org/taxonomy)



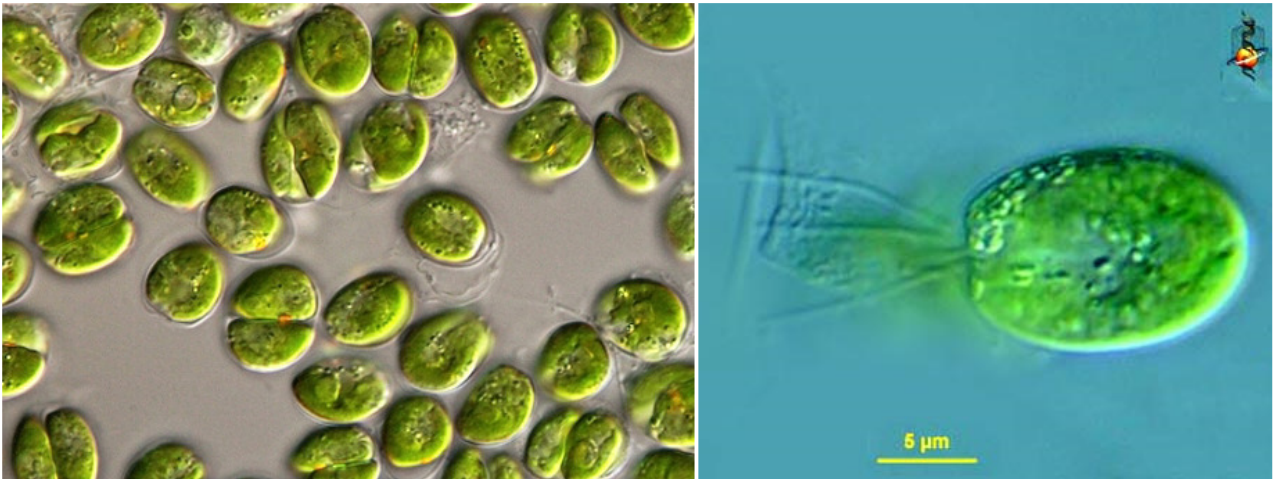
Εικόνα 11.α. Κύτταρο *Tetraselmis* sp.

Για το γένος *Tetraselmis* έχουν αναφερθεί περίπου 26 είδη από θαλάσσια και γλυκών υδάτων ενδιαιτήματα (Syn & Pienaar 1993) αλλά περιλαμβάνει πάνω από 50 είδη. Οι αντιπρόσωποι του γένους αφθονούν κυρίως σε αλμυρά και υφάλμυρα ύδατα αλλά τους συναντούμε και σε γλυκά και υπεράλμυρα περιβάλλοντα (λίμνες και αλυκές). Επιβιώνουν υπό πληθώρα διαφορετικών συνθηκών και σημαντικό εύρος αβιοτικών παραμέτρων όπως αλατότητα και θερμοκρασία. Επιπλέον, ορισμένα είδη χρησιμοποιούνται εκτενώς στην υδατοκαλλιέργεια ενώ πολλοί αντιπρόσωποι του γένους παράγουν σημαντικές ποσότητες απαραίτητων ω-3 λιπαρών οξέων.

Ενδέχεται να απαντάται ως μαστιγωτό ή ως ένα μη κινητό κύτταρο με έναν βλενώδη μίσχο. Τα μαστιγοφόρα κύτταρα έχουν 4 μαστίγια αναδυόμενα από 1 βοθρίο, σε 2 ζεύγη. Ένα ευκρινές τοίχωμα (θήκη) καλύπτει τα κύτταρα. Τα κινητά κύτταρα συχνά δεν επιδίδονται σε κολύμβηση για μεγάλες χρονικές περιόδους, ενώ τα μαστίγια ενίοτε χάνονται. Παρά το γεγονός ότι συνήθως είναι πράσινα, μερικά αποκτούν ερυθρά απόχρωση λόγω της συσσώρευσης καροτενοειδών.

Υπάρχει ανάγκη για σαφέστερη ταξινόμηση και εκτενέστερη μελέτη του γένους για την διερεύνηση της ποικιλομορφίας του αλλά και των εγχώριων καλλιεργήσιμων ειδών προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία.

Το *Tetraselmis* sp. είναι κοινό είδος μικροφύκους που έχει πολλά υποσχόμενο δυναμικό, ιδίως στην υδατοκαλλιέργεια (Hemaiswarya et al., 2011). Επιπλέον, έχει υψηλή θρεπτική αξία, ευκολία καλλιέργειας, έλλειψη τοξικότητας, σωστό μέγεθος κυττάρου και το εύπεπτο κυτταρικό τοίχωμα πληροί τα κριτήρια επιλογής για χρήση στην υδατοκαλλιέργεια (Hemaiswarya et al., 2011).



Εικόνα 11.β. Κύτταρα *Tetraselmis sp.*

20. *Phormidium sp.*

Υπερβασίλειο: Prokaryota
 Βασίλειο: Eubacteria
 Φύλο: Cyanobacteria
 Κλάση: Cyanophyceae
 Τάξη: Oscillatoriales
 Οικογένεια: Oscillatoriaceae
 Γένος: *Phormidium*

(algaebase.org/taxonomy)

Βασίλειο: Bacteria
 Φύλο: Cyanobacteria
 Κλάση: Cyanophyceae
 Τάξη: Oscillatoriales
 Οικογένεια: Phormidiaceae
 Γένος: *Phormidium*

Κατά (John Gibson 18-Jun-2004)

Έχει ανευρεθεί σε ευρεία ποικιλία βιοτόπων, μεταξύ των οποίων σε θερμοπηγές, θαλάσσια ενδιαιτήματα και λίμνες εύκρατων, τροπικών και πολικών περιοχών, καθώς επίσης και σε χερσαία υγρά υποστρώματα. Αυτοί οι οργανισμοί μπορούν να περιστρέφονται να ταλαντεύονται και να εμφανίζουν ολισθητική κίνηση. Έχει δισκοειδή κύτταρα που ενώνονται και σχηματίζουν νήματα. Το επάκριο κύτταρο ενδέχεται να είναι στρογγυλεμένο ή διακριτό κατά τρόπους που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό μερικών εκ των ειδών.



Εικόνα 11.γ. *Phormidium sp.*

B. Υλικά και Μέθοδοι

1. Σκοπός του Πειράματος

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της αύξησης των καλλιεργειών ειδών φυτοπλαγκτού απομονωθέντων από αλμυρά νερά της Δυτικής Ελλάδας. Απομονώθηκαν τα είδη : *Dunaliella salina*, *Tetraselmis sp.*, *Phormidium sp.* και καλλιεργήθηκαν σε τρεις και τέσσερις διαφορετικές αλατότητες (20, 40, 60 ή και 100 ppt) και δυο διαφορετικές εντάσεις φωτισμού (χαμηλή-L) 2000 lux και (υψηλή-XL) 8000 lux.

2. Γενικά

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο καλλιέργειας πλαγκτού του τμήματος Ζωικής Παραγωγής Αλιείας και Υδατοκαλλιεργειών του Πανεπιστημίου Πατρών στο Μεσολόγγι. Άρχισε την Τρίτη 13 Οκτωβρίου του 2020 και έληξε στις 8 Δεκεμβρίου του 2020.

3. Υλικά

Για τη διεξαγωγή του πειράματος έγινε χρήση των παρακάτω υλικών και μηχανημάτων:

1. Κωνικές φιάλες Erlenmeyer 1 και 2 λίτρων
2. Γυάλινες Πιπέτες
3. Πιπέτες Παστέρ
4. Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer και καλυπτρίδες
5. Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες 50 mL και 15 mL
6. Στατώ δοκιμαστικών σωλήνων
7. Εξάρτημα πιπέτας για εξαγωγή δείγματος
8. Μηχανική πιπέτα και πλαστικές μύτες
9. Πλαστικές κυψελίδες
10. Ποτήρια ζέσεως
11. Μετρητής χειρός
12. Λαβίδες
13. Στρογγυλά χάρτινα φίλτρα Whatman πόρων 11 μm με διάμετρο 9 cm
14. Πυρίμαχα σκεύη με καπάκι
15. Υδρόφοβο βαμβάκι
16. Κουρτίνα συσκότισης

4. Μηχανήματα

1. Πεχάμετρο (Hach)
2. Θερμόμετρο
3. Φασματοφωτόμετρο (UV mini-1240 μονής δέσμης Shimadzu)
4. Αντλία κενού (Heto SUE 3Q)
5. Κλίβανος (Fermaks)
6. Ζυγαριά (KERN, ALJ 220-4NM)
7. Φυγόκεντρος (Sigma, 3K10)

8. Σύστημα αερισμού
9. Μικροσκόπιο (LEICA, DM 1000)
10. Αυτόκαυστο (Rayra)
11. Κλιματισμός
12. Λάμπες Led
13. Μαγνητικός αναδευτήρας (VELP, SIENTIFICA)
14. Voltex (VELP, SIENTIFICA, new ZX)
15. Λουξόμετρο (Bioblock, Scientific, LX-101)
16. Μηχανική Πιπετα (TIPOR-V, 5mL)

5. Διαλύματα

1. Lugol
2. Φορμικό αμμώνιο
3. Θρεπτικό μέσο Walne
4. Βιταμίνες
5. Διοξειδίο γερμανίου
6. Κυκλοεξιμίδιο

6. Εργαστηριακή μέθοδος απομόνωσης και καλλιέργειας φυκών

Τα είδη που καλλιεργήθηκαν συλλέχτηκαν από περιοχές της Δυτικής Ελλάδας και απομονώθηκαν στο εργαστήριο καλλιέργειας πλαγκτού του τμήματος Ζωικής Παραγωγής, Αλιείας και Υδατοκαλλιεργειών στο Μεσολόγγι.

Για την απομόνωση των ειδών πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες θαλασσινού νερού με κατάλληλες φιάλες δειγματοληψίας. Το νερό φιλτραρίστηκε με φίλτρο 100 μm ώστε να μείνει το πλαγκτόν μεγέθους μικρότερο του μεγέθους αυτού.

Κατόπιν τα δείγματα αφού εμπλουτίστηκαν με θρεπτικά και βιταμίνες έμειναν για αρκετό καιρό σε γυάλινες κωνικές φιάλες Erlenmeyer 1L σε συνθήκες συνεχούς φωτισμού με ελαφρύ αερισμό μέχρι να επικρατήσουν μερικά είδη. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε αρκετές φορές ώσπου να επιζήσουν λίγα είδη στο δοχείο. Η εξακρίβωση των ειδών εντός των φιαλών έγινε με παρακολούθηση δειγμάτων στο μικροσκόπιο και ταυτόχρονη αναγνώριση τους. Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις των δειγμάτων σε δοκιμαστικούς σωλήνες και στρώσεις σε άγαρ με σκοπό την απομόνωση των διαφόρων ειδών. Έπειτα από αρκετό καιρό (σχεδόν 1 χρόνο) τα είδη απομονώθηκαν και άρχισαν να καλλιεργούνται στο εργαστήριο.

Από το άγαρ με τη βοήθεια της λούφας κάτω από ασηπτικές συνθήκες το κάθε είδος μεταφερόταν σε 3 δοκιμαστικούς σωλήνες των 10mL με νερό αλατότητας 40 ppt και παρέμενε εκεί 15 μέρες μέχρι να ωριμάσει. Ακολουθούσε η αραιώση των δειγμάτων σε μικρές κωνικές φιάλες των 50 mL (10 mL εμβολίου και 40 mL νερού). Οι καλλιέργειες αναβαθμίστηκαν διαδοχικά σε καλλιέργειες μεγαλύτερου όγκου έως τις φιάλες του 1 και 2 L (που χρησιμοποιήσαμε για τις ανάγκες του πειράματος) με όγκο εμβολίου κάθε φορά τουλάχιστον 10% (ασφαλής ποσότητα) του τελικού όγκου της φιάλης. Οι τελικές κωνικές φιάλες αφού προστέθηκαν τα εμβόλια και το νερό

της αντίστοιχης προς μελέτη αλατότητας τοποθετήθηκαν στις αντίστοιχες προς μελέτη εντάσεις φωτισμού, προστέθηκε συνεχόμενη παροχή αέρα με τη βοήθεια πλαστικών λεπτών σωλήνων και πιπετών, κλείστηκαν με υδρόφοβο βαμβάκι και προστατεύθηκαν από τον εξωτερικό φωτισμό μέσω κουρτίνας συσκότισης από μαύρο πλαστικό υλικό. Η κουρτίνα άνοιγε μόνο τη στιγμή που λαμβάνονταν τα δείγματα ώστε να μην επηρεαστούν οι συνθήκες. Οι διαφορετικές αλατότητες νερού παρασκευάζονται από το θαλασσινό νερό το οποίο αραιώνεται με αποσταγμένο νερό ή προστίθεται σε αυτό τεχνητό θαλασσινό αλάτι (Instant Ocean) εμπλουτίζεται με θρεπτικό μέσο Walne. Τοποθετείται στο αυτόκαυστο και τέλος αφού κρυώσει προστίθενται βιταμίνες.

Για κάθε είδος καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν 6 κωνικές φιάλες Erlenmeyer 1 (ή 2) L στο θάλαμο καλλιέργειών, 1 σε κάθε συνθήκη (2 εντάσεις φωτισμού (L-XL) και 3 ή 4 αλατότητες, 20-40-60-100 ppt)). Έγιναν 3 διαδοχικές καλλιέργειες μικροφυκών. Οι μετρήσεις λαμβάνονταν καθημερινά συγκεκριμένες ώρες (πρωινές).

7. Συνθήκες διεξαγωγής πειράματος

Οι κωνικές φιάλες του πειράματος τοποθετήθηκαν σε θάλαμο καλλιέργειών με διαφορετικές εντάσεις τεχνητού φωτισμού. Οι λάμπες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν Led και εξέπεμπαν λευκό φως. Η φωτοπερίοδος ρυθμίστηκε μέσω χρονοδιακόπτη σε 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι. Για να αποφευχθεί υψηλότερης έντασης φωτισμός στις φιάλες που μελετήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε κουρτίνα συσκότισης ώστε να υπάρχει μια μόνο πηγή φωτός επιθυμητής έντασης. Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος ελεγχόταν με κλιματιστικό ρυθμισμένο στους 21°C και κυμαινόταν από 19-24 °C.

8. Παρασκευή διαλύματος Iugol

Αποτελείται από 10 g ουδέτερου KI διαλυμένου σε 20 mL αποσταγμένου νερού.

9. Παρασκευή φορμικού αμμωνίου

Για να παρασκευαστεί το διάλυμα 0,5 M φορμικού αμμωνίου το οποίο χρησιμοποιήθηκε για ιστονική έκπλυση της εκάστοτε μάζας φυτοπλαγκτού στα φίλτρα διήθησης διαλύθηκε ποσότητα 35 g κρυσταλλικού φορμικού αμμωνίου σε 500 mL αποσταγμένου νερού.

10. Παρασκευή διαλύματος βιταμινών

Σε 1000 mL αποσταγμένου νερού προστίθενται υπό ασηπτικές συνθήκες:

- 200 mL χλωροενυδατωμένη θειαμίνη
- 10 mg κυανοκοβαλαμίνη
- 5 mg biotin

Προσθέτουμε 0,1 mL ανά καλλιέργεια.

11. Παρασκευή θρεπτικού διαλύματος Walne

Για την παρασκευή του διαλύματος αυτού απαιτείται η παρασκευή 3 διαλυμάτων τα οποία συμμετέχουν σε διαφορετικές αναλογίες.

1^ο διάλυμα:

Σε 1 λίτρο αποσταγμένου νερού προστίθενται:

1. 45 g Na_2EDTA
2. 33,6 g H_3BO_3
3. 100 g NaNO_3 ή KNO_3
4. 20 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
5. 0,36 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
6. 1,3 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
7. 1 mL 2^{ου} διαλύματος
8. 2 mL 3^{ου} διαλύματος

2^ο διάλυμα:

Σε 100 mL αποσταγμένου νερού προστίθενται:

1. 2.1 g ZnCl_2
2. 2 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
3. 0.9 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
4. 2 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
5. 10 mL HCl

3^ο διάλυμα :

Σε 100mL αποσταγμένου νερού προστίθενται:

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

Όλα τα διαλύματα θερμαίνονται και αναδεύονται με μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι την τελική διάλυση, αποστειρώνονται για 30 λεπτά στους 121°C (αυτόκαυστο) και αποθηκεύονται στους $\pm 4^\circ\text{C}$ (ψυγείο) και σε συνθήκες σκότους.

12. Παρασκευή διαλύματος διοξειδίου του γερμανίου GeO_2 .

Η δράση του συνίσταται στην αναστολή της αύξησης των διατόμων διακόπτοντας τον μεταβολισμό του βασικού τους συστατικού που είναι το πυρίτιο. Δόσεις 1mL/L (βασικού διαλύματος -0,9 g GeO_2 σε 200 mL αποσταγμένου νερού) επιφέρουν σαφή μείωση των αριθμού των κυττάρων των διατόμων σε μία περίπου εβδομάδα και αργότερα πλήρη εξαφάνισή τους από τις καλλιέργειες των άλλων φυκών στις οποίες μπορούν να εμφανιστούν και να τις κατακλύσουν.

13. Μέθοδοι μέτρησης φυτοπλαγκτονικών πληθυσμών και βιομάζας.

13.1 Με αιμοκυτταρόμετρο (Neubauer)

Λαμβάνεται δείγμα από την κωνική φιάλη με πιπέτα και τοποθετείται σε δοκιμαστικούς σωλήνες 50 mL. Στη συνέχεια αφού αναδευτεί καλά το δείγμα του δοκιμαστικού σωλήνα λαμβάνεται μια μικρή ποσότητα με πιπέτα και τοποθετείται σε 2^ο δοκιμαστικό σωλήνα 15 mL. Στον ίδιο σωλήνα προστίθεται Iugol σε ποσότητες ανάλογες της αραιώσης που θέλουμε να πετύχουμε με τη βοήθεια πιπέτας ώστε να ακινητοποιήσουμε τον πληθυσμό. Στη συνέχεια το αραιωμένο δείγμα αναδύεται πολύ καλά και με πιπέτα Παστέρ τοποθετείται στην πλάκα Neubauer. Ακολουθεί η καταμέτρηση των κυττάρων με τη βοήθεια μετρητή χειρός. Η αντικειμενοφόρος αυτή πλάκα διαθέτει 2 πλαίσια (θαλάμους) για καλύτερα στατιστικά αποτελέσματα. Κάθε πλαίσιο περιέχει μια τετράγωνη περιοχή η οποία χωρίζεται σε 9 μικρότερα τετράγωνα, κάθε ένα από τα οποία χωρίζεται σε 16 ακόμα πιο μικρά. Η περιοχή καταμέτρησης οριοθετείται από τριπλές γραμμές και περιβάλλει την αρχική μεγάλη τετράγωνη περιοχή που εμπεριέχει όλα τα υπόλοιπα τετράγωνα. Τα άτομα εκτός των περιοχών αυτών δεν προσμετρούνται. Η ικανότητα μέτρησης είναι 10⁴-10⁵ κύτταρα /mL διαφορετικά απαιτείται αραιώση. Όταν το δείγμα είναι αραιό μετράμε τα κύτταρα που βρίσκονται και στα 9 τετράγωνα (όλα). Στα πυκνά δείγματα μετράμε μόνο τα 3 διαγώνια τετράγωνα. Η διαφορά ανάμεσα στις μετρήσεις των 2 πλαισίων δεν πρέπει να είναι πάνω του 10% (διαφορετικά το δείγμα απορρίπτεται).

Αφού μετρηθούν όλα τα άτομα του πληθυσμού και στα 2 πλαίσια της πλάκας ακολουθεί ο υπολογισμός του πληθυσμού της καλλιέργειας ως εξής:

Υπολογίζουμε :

- Μέσο όρο κυττάρων A πλαισίου (σύνολο κυττάρων A πλαισίου/ 9)
- Μέσο όρο κυττάρων B πλαισίου (σύνολο κυττάρων B πλαισίου/ 9)
- Μέσο όρο κυττάρων A και B πλαισίου
- Ο αριθμός που προκύπτει πολλαπλασιάζεται με την αραιώση που έχουμε κάνει και με 10⁴.

$$\frac{(\text{Μέσος όρος κυττάρων A πλαισίου}) + (\text{Μέσο όρο κυττάρων B πλαισίου})}{2} * \text{αραιώση} * 10.000$$

13.2 Με οπτική απορρόφηση (φασματοφωτόμετρο απλής δέσμης).

Λαμβάνονται 3 δείγματα (1 από κάθε αλατότητα) που θα αποτελέσουν τα τυφλά, με τη βοήθεια πιπέτας και τοποθετούνται σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 50 mL. Τοποθετούνται στη φυγόκεντρο στις 5000 στροφές για 5 λεπτά. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία, από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα λαμβάνεται το υπερκείμενο με τη βοήθεια λεπτής σύριγγας και με την τοποθέτηση στο στόμιο αυτής φίλτρου 0,45 μm απελευθερώνεται το διάλυμα σε πλαστική κυψελίδα. Αφού ολοκληρωθεί η παραπάνω διαδικασία λαμβάνονται τα προς μέτρηση δείγματα από τις κωνικές φιάλες. Στη συνέχεια, αφού αναδευτούν με τη βοήθεια ηλεκτρονικής πιπέτας τοποθετούνται στις κυψελίδες. Αρχικά αφού έχουμε ρυθμίσει το φασματοφωτόμετρο στο επιθυμητό μήκος κύματος τοποθετούμε το τυφλό και μηδενίζουμε το όργανο. Στη συνέχεια τοποθετούμε το δείγμα μας και σημειώνουμε

την πρώτη τιμή που αναγράφεται στο φασματοφωτόμετρο. Συνεχίζουμε τη διαδικασία για όλα τα δείγματα.

13.3 Μέτρηση του ξηρού βάρους (βιομάζα).

Για τη μέτρηση του ξηρού βάρους χρησιμοποιούνται φίλτρα τα οποία έχουν ζυγιστεί και το βάρος τους είναι γνωστό. Στη συνέχεια λαμβάνονται δείγματα 20 ή 100 mL με τη βοήθεια πιπέτας και τοποθετούνται σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Έπειτα αφού τοποθετήσουμε το φίλτρο στο ειδικό χωνί της αντλίας κενού με τη βοήθεια λαβίδας (για αποφυγή φθοράς και αλλαγή του βάρους του από τη λιπαρότητα των δαχτύλων) ανοίγουμε την αντλία κενού και ρίχνουμε το δείγμα. Μόλις περάσει όλο το δείγμα από το φίλτρο ξεπλένουμε με Φορμικό αμμώνιο για να απομακρύνουμε τα άλατα τα οποία θα μας οδηγούσαν σε λάθος μετρήσεις λόγω του βάρους τους. Εν συνεχεία το δείγμα λαμβάνεται με στεγνή καθαρή λαβίδα και τοποθετείται σε ειδικά αλουμινένια δοχεία και τοποθετούνται σε κλίβανο στους 80°C για 24 ώρες. Η παραπάνω διαδικασία ολοκληρώνεται για ένα δείγμα και μετά ακολουθεί το επόμενο. Αφήνουμε τα δείγματα μέσα στον κλίβανο να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου και τα ζυγίζουμε ένα-ένα σε ζυγό 3 δεκαδικών ψηφίων. Από το βάρος που αναγράφεται στη ζυγαριά αφαιρούμε το βάρος του φίλτρου και υπολογίζουμε το βάρος του φύκους (καθαρό βάρος).



Εικόνα 12. Όργανα που βοηθούν στον υπολογισμό του ξηρού βάρους των μικροφυκών (χωνί αντλίας κενού, κλίβανος, ζυγός ακριβείας).

Γ. Αποτελέσματα

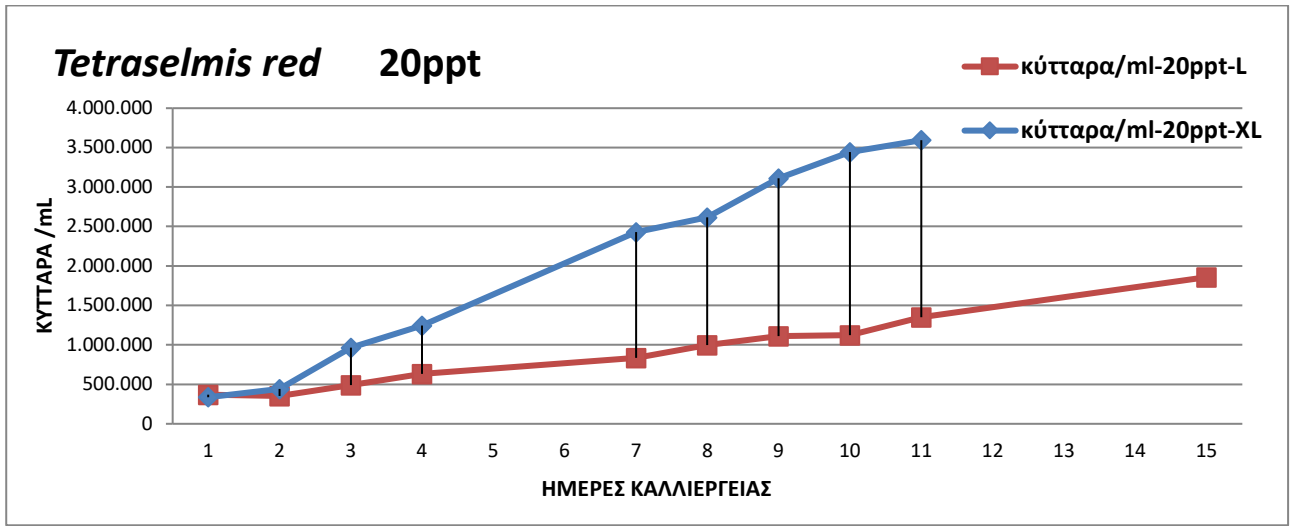
1. *Tetraselmis sp.*

1.1 Προσδιορισμός κυτταρικής πυκνότητας

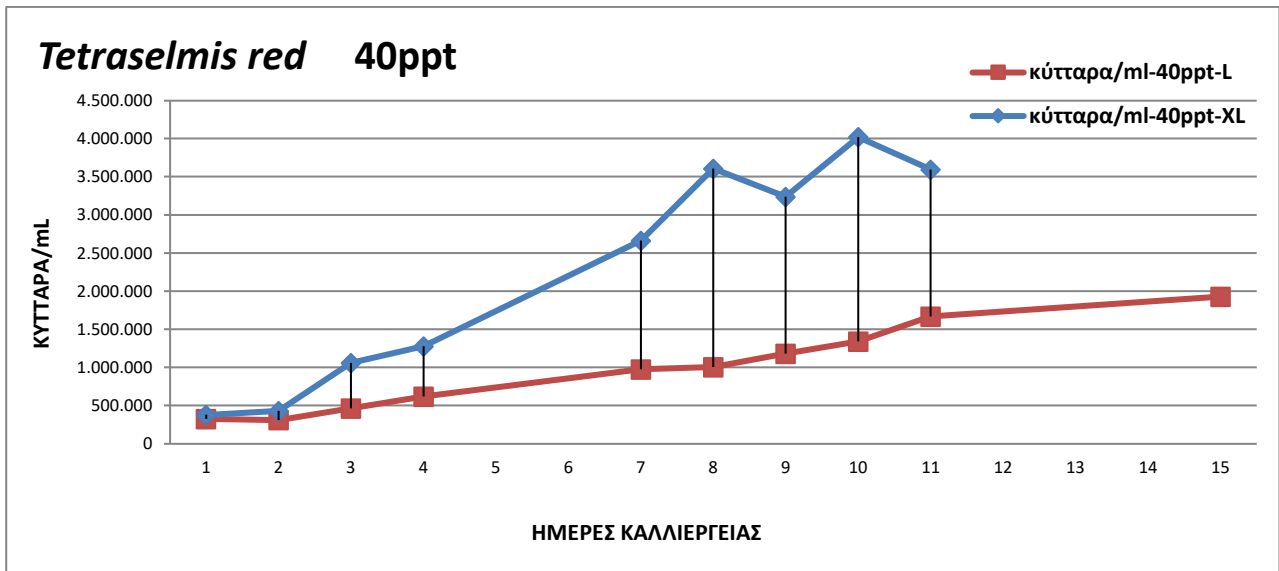
α) με μικροσκόπιο

Ο προσδιορισμός της πυκνότητας των κυττάρων έγινε με τη χρήση αιμοκυτταρομέτρου Neubauer και της οπτικής απορρόφησης με το φασματοφωτόμετρο. Οι μετρήσεις ήταν καθημερινές. Η καλλιέργεια διήρκησε συνολικά 17 ημέρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω.

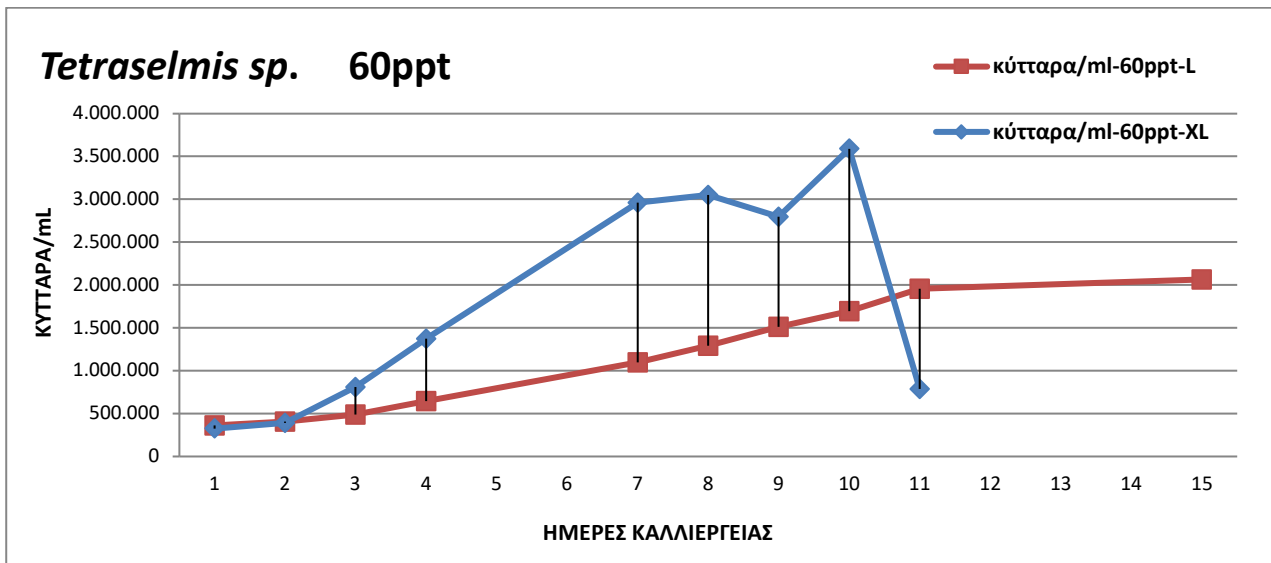
Η πυκνότητα των κυττάρων του *Tetraselmis sp.* που καλλιεργήθηκε σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού και αλατότητες φαίνεται στις εικόνες 13-17 και 19.



Εικόνα 13. *Tetraselmis sp* κύτταρα/mL αλατότητας 20 ppt στις δυο εντάσεις φωτισμού (L-XL).



Εικόνα 14. *Tetraselmis sp* κύτταρα/mL αλατότητας 40 ppt στις δυο εντάσεις φωτισμού (L-XL)



Εικόνα 15. *Tetraselmis sp* κύτταρα/mL αλατότητας 60 ppt στις δυο εντάσεις φωτισμού (L-XL).

Στις καλλιέργειες μεταξύ της ίδιας αλατότητας με διαφορετικό φωτισμό υπήρξαν διαφορές στην πυκνότητα των κυττάρων. Συγκεκριμένα στο δείγμα με την αλατότητα **20ppt** μέγιστη τιμή πυκνότητας κυττάρων εμφανίστηκε στην **υψηλή ένταση φωτισμού** με τιμή 3.594.444 κύτταρα/mL έναντι του χαμηλού φωτισμού με 1.350.000 κύτταρα/mL κατά την 11^η ημέρα της καλλιέργειας.

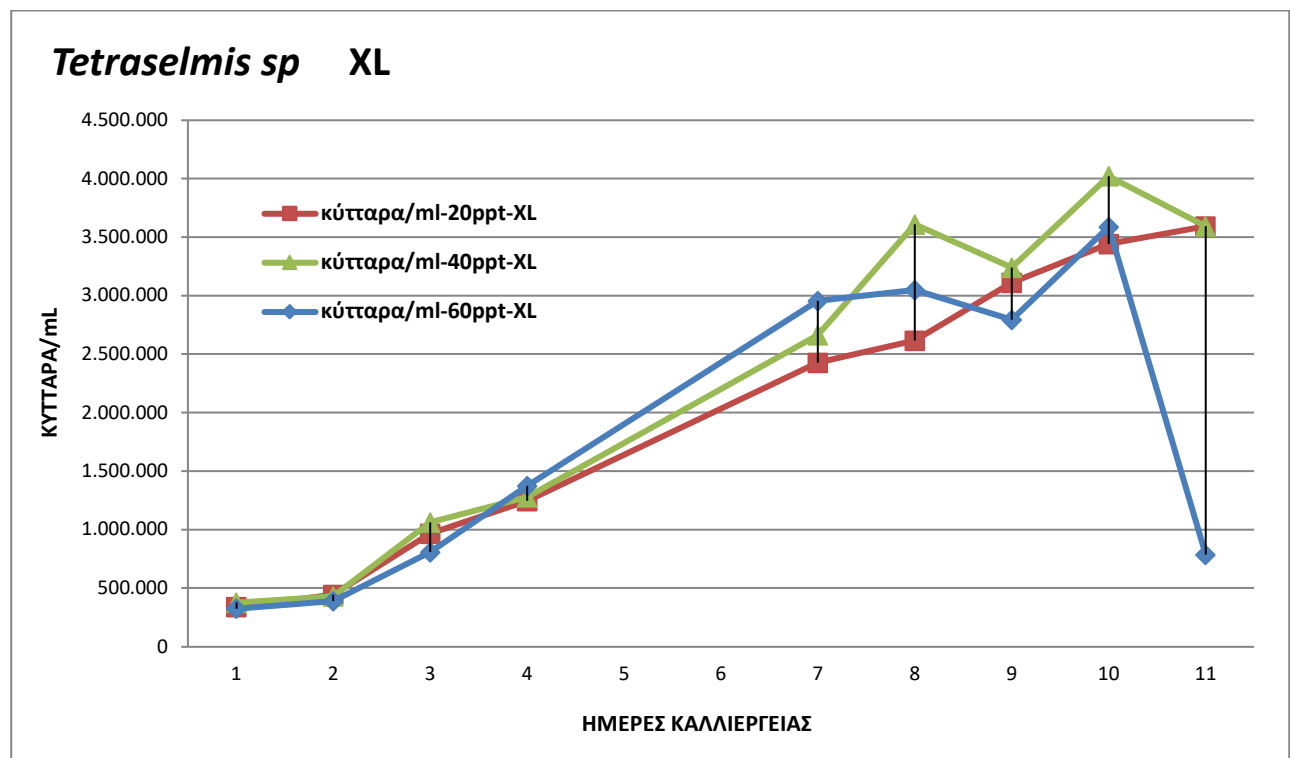
Στην αλατότητα **40ppt** μέγιστη τιμή πυκνότητας παρουσιάστηκε στην **υψηλή ένταση φωτισμού** με 4.022.222 κύτταρα/mL κατά την 10^η ημέρα της καλλιέργειας. Στη χαμηλή ένταση φωτός η τιμή της πυκνότητας των κυττάρων ήταν 1.341.667 κύτταρα/mL, την ίδια ημέρα.

Στην αλατότητα **60ppt** μέγιστη τιμή πυκνότητας εμφανίστηκε και πάλι στην **υψηλή ένταση φωτισμού** με τιμή κυττάρων 3.588.889 ανά mL την 10^η ημέρα της καλλιέργειας. Το δείγμα στη χαμηλή ένταση φωτισμού τη συγκεκριμένη ημέρα είχε τιμή 1.955.556 κύτταρα/mL.

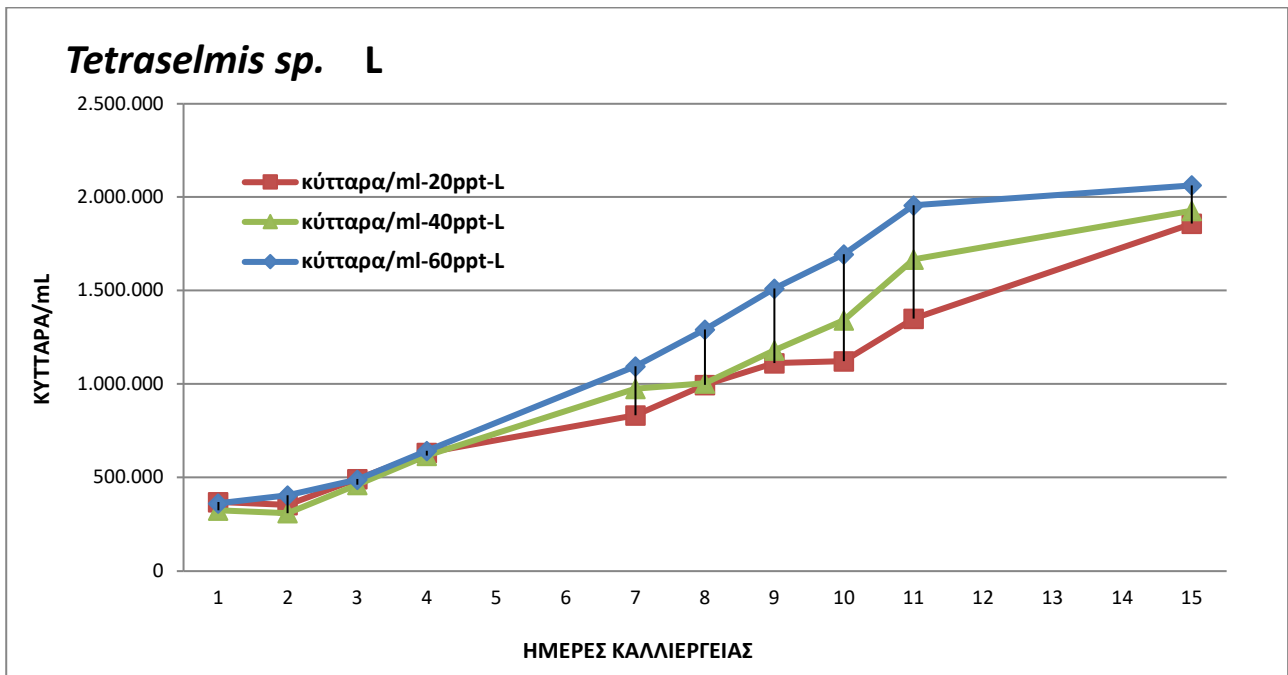
Στον **πίνακα 2** αναγράφονται οι εντάσεις φωτός στις οποίες εμφανίστηκαν οι μέγιστες πυκνότητες κυττάρων σε κάθε αλατότητα.

Πίνακας 2. Μέγιστες τιμές πυκνότητας πληθυσμών του *Tetraselmis sp.* σε κάθε αλατότητα.

Αλατότητα (ppt)	Ένταση φωτισμού	Μέγιστη Πυκνότητα (κύτταρα/mL)	Ημέρα καλλιέργειας
20 ppt	Υψηλή	3.594.444	11 ^η
40 ppt	Υψηλή	4.022.222	10 ^η
60 ppt	Υψηλή	3.588.889	10 ^η



Εικόνα 16. *Tetraselmis red* κύτταρα/mL αλατότητας 20-40-60 ppt στην υψηλή ένταση φωτισμού (XL).



Εικόνα 17. *Tetraselmis red* κύτταρα/mL αλατότητας 20-40-60 ppt στη χαμηλή ένταση φωτισμού (L).

Μεταξύ των δειγμάτων διαφόρων αλατοτήτων κατά την επίδραση της **υψηλής έντασης φωτισμού** μέγιστη πυκνότητα κυττάρων παρατηρήθηκε στην αλατότητα **40ppt** με τιμή **4.022.222 κύτταρα/mL** και ακολούθησε το δείγμα με αλατότητα 60ppt (3.588.889 κύτταρα/mL) και το δείγμα της αλατότητας 20 ppt με πλήθος κυττάρων 3.441.667 κύτταρα/mL, κατά την 10^η ημέρα της καλλιέργειας.

Στη **χαμηλή ένταση φωτισμού** μέγιστη τιμή πυκνότητας κυττάρων εμφάνισε το δείγμα αλατότητας **60ppt** με πλήθος **2.063.889 κύτταρα/mL** και ακολούθησαν κατά φθίνουσα σειρά τα δείγματα αλατότητας 40ppt και 20ppt με τιμές 1.927.778 κύτταρα/mL και 1.858.333 κύτταρα/mL αντίστοιχα κατά την 15^η ημέρα της καλλιέργειας.

Στον **πίνακα 3** και **4** παρουσιάζονται οι αλατότητες με τις μέγιστες και ελάχιστες τιμές της πυκνότητας του πληθυσμού της καλλιέργειας *Tetraselmis sp.* σε κάθε ένταση φωτισμού αντίστοιχα.

Πίνακας 3. Μέγιστες τιμές πυκνότητας πληθυσμών του *Tetraselmis sp.* σε κάθε ένταση φωτισμού.

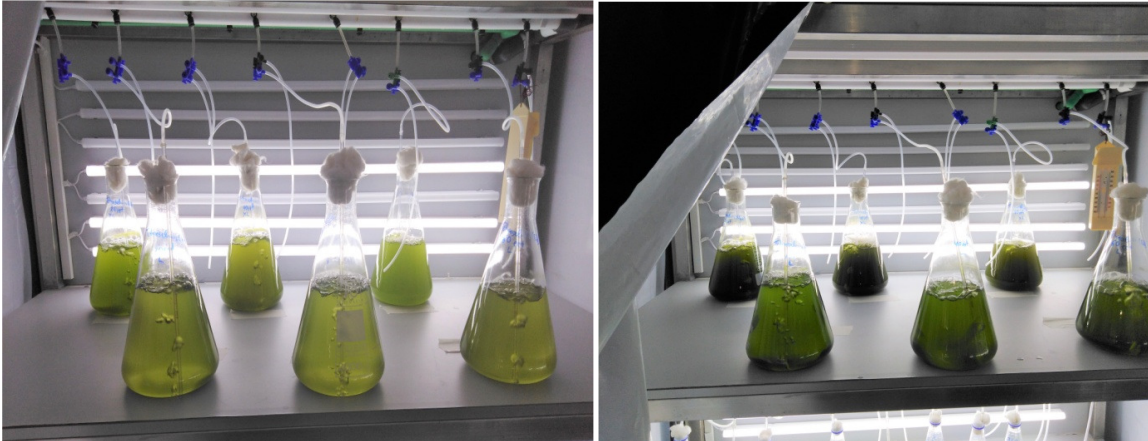
Ένταση φωτισμού	Αλατότητα (ppt)	Μέγιστη Πυκνότητα (κύτταρα/mL)	Ημέρα καλλιέργειας
Υψηλή	40ppt	4.022.222	10 ^η
Χαμηλή	60ppt	2.063.889	15 ^η

Πίνακας 4. Ελάχιστες τιμές πυκνότητας πληθυσμών του *Tetraselmis sp.* σε κάθε ένταση φωτισμού.

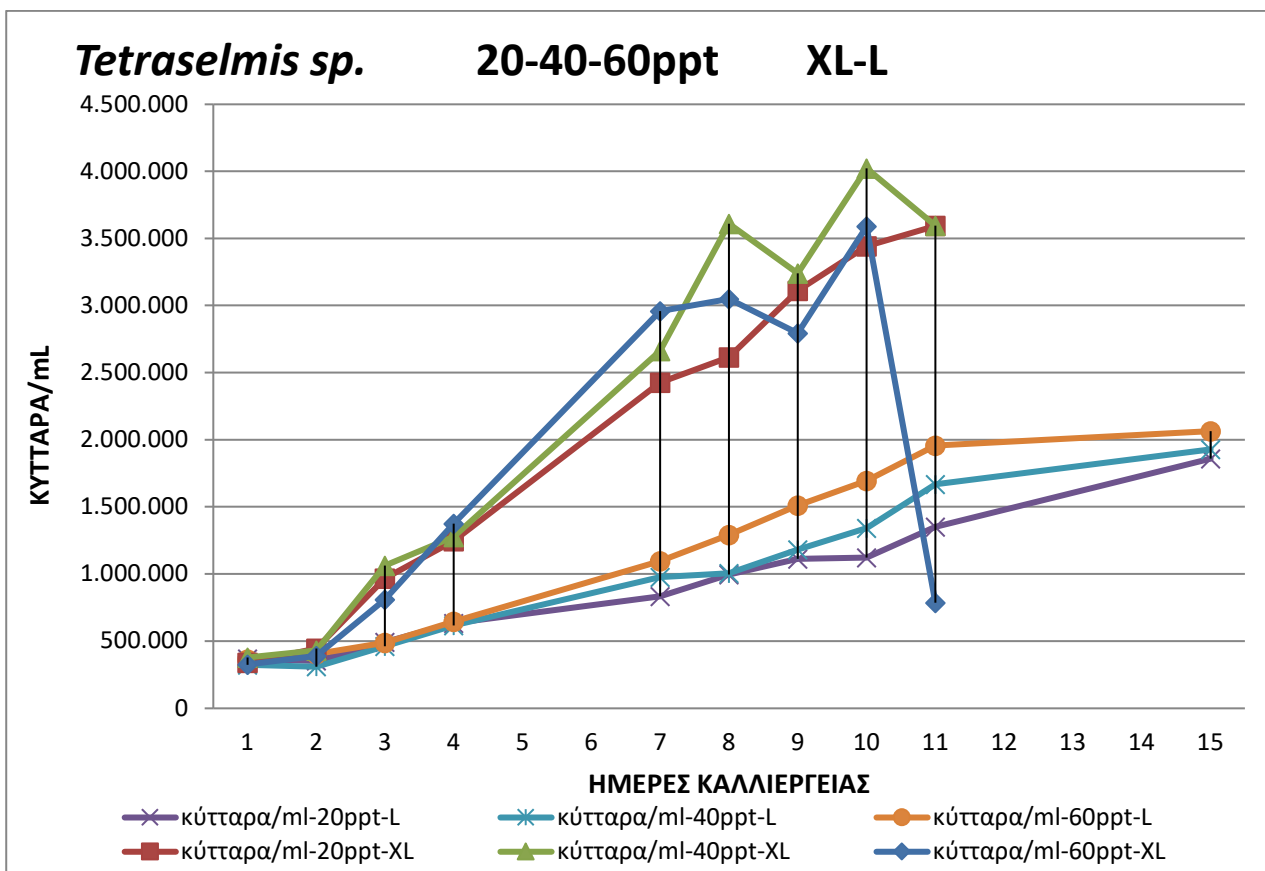
Ένταση φωτισμού	Αλατότητα (ppt)	Ελάχιστη Πυκνότητα (κύτταρα/mL)	Ημέρα καλλιέργειας
Υψηλή	20ppt	3.441.667	10 ^η
Χαμηλή	20ppt	1.858.333	15 ^η

Στην **εικόνα 19** φαίνονται οι πυκνότητες των κυττάρων της καλλιέργειας του *Tetraselmis sp.* σε όλες τις αλατότητες και τις εντάσεις φωτισμού.

Η **μέγιστη** πυκνότητα κυττάρων παρατηρήθηκε στην αλατότητα **40ppt** και ήταν 4.022.222 κύτταρα/mL κατά την επίδραση **υψηλής έντασης φωτισμού (XL)** κατά τη 10^η ημέρα της καλλιέργειας, ενώ η **ελάχιστη** πυκνότητα κυττάρων παρατηρήθηκε στη **χαμηλή ένταση φωτισμού** στην αλατότητα **20ppt** με πλήθος κυττάρων 1.122.222 κύτταρα/mL τη 10^η ημέρα της καλλιέργειας.



Εικόνα 18. *Tetraselmis sp.* την 4^η (αριστερά) και 8^η (δεξιά) ημέρα της καλλιέργειας.



Εικόνα 19. *Tetraselmis red* κύτταρα/mL αλατότητας 20-40-60ppt στη χαμηλή και υψηλή ένταση φωτισμού (XL).

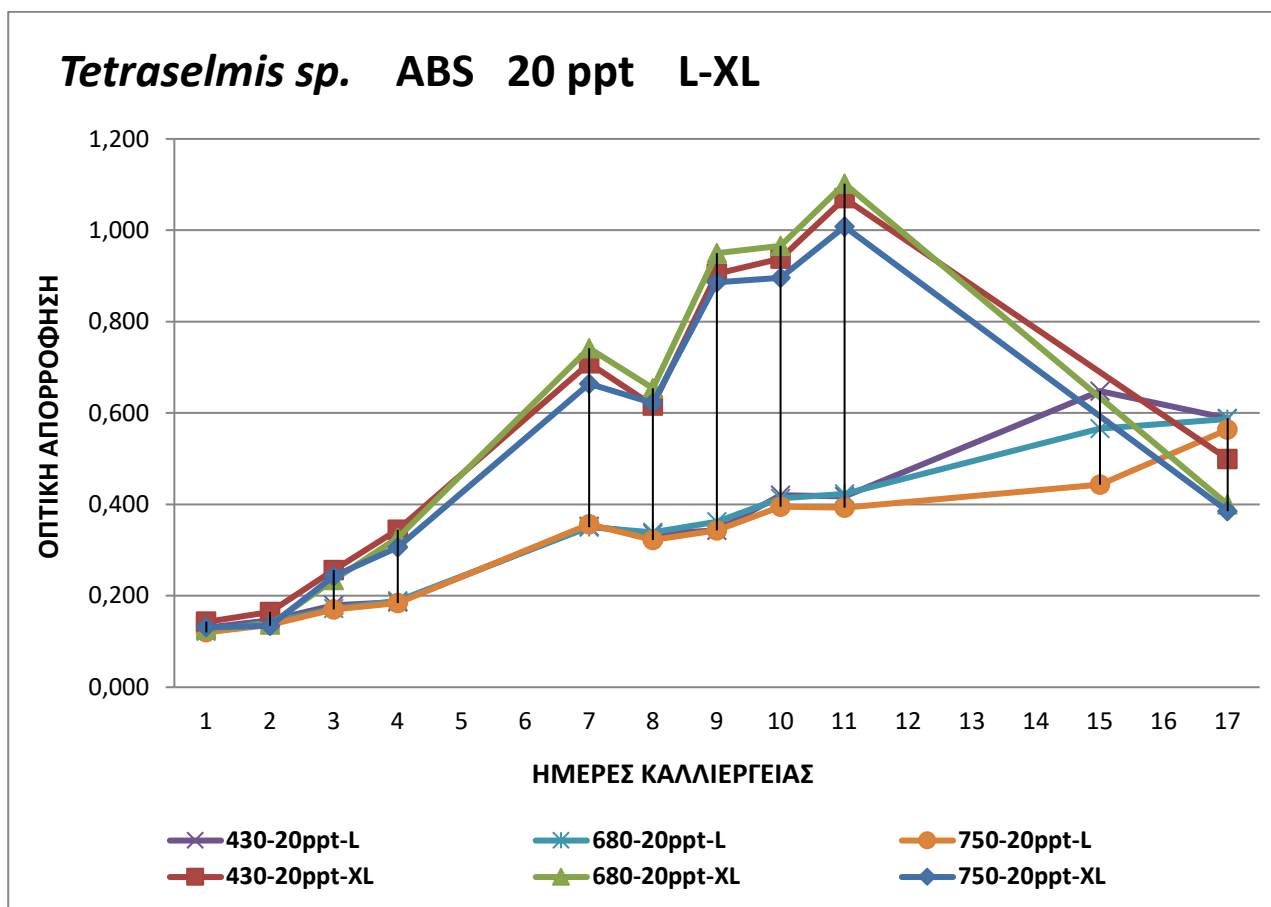
Στον **πίνακα 5** παρουσιάζονται οι συνθήκες της καλλιέργειας με τις αντίστοιχες πυκνότητες πληθυσμού κατά φθίνουσα σειρά τη 10^η ημέρα της καλλιέργειας που εμφανίστηκε η μέγιστη πυκνότητα του πληθυσμού.

Πίνακας 5. Πυκνότητες πληθυσμών δειγμάτων κατά φθίνουσα σειρά τη 10^η ημέρα καλλιέργειας *Tetraselmis sp.*

Αλατότητα	Ένταση φωτισμού	Πλήθος κυττάρων /mL
40	XL	4.022.222
60	XL	3.588.889
20	XL	3.441.667
60	L	1.694.444
40	L	1.341.667
20	L	1.122.222

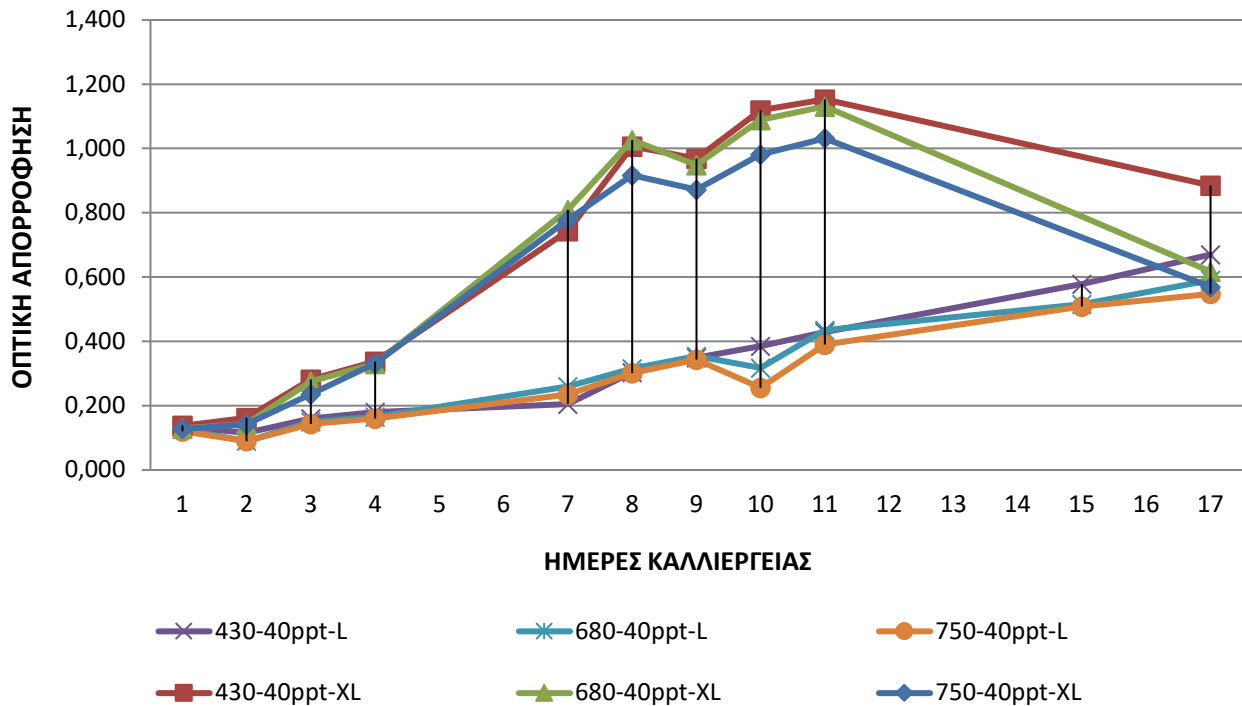
β) Οπτική απορρόφηση.

Η οπτική απορρόφηση του *Tetraselmis sp.* που καλλιεργήθηκε σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού (L-XL) και αλατότητας (20-40-60ppt) φαίνεται στις **εικόνες 20-25**. Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε σε 3 μήκη κύματος 430nm, 680nm και 750nm.



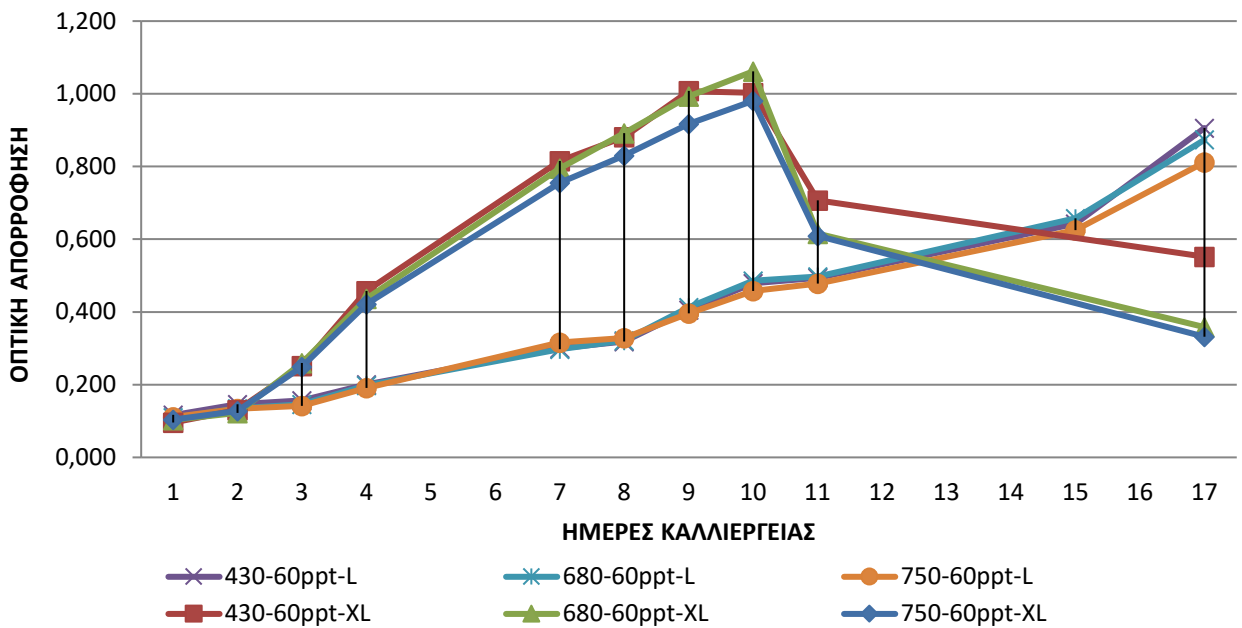
Εικόνα 20. *Tetraselmis sp.* – Οπτική απορρόφηση σε 430-680-750 nm αλατότητας 20ppt στην χαμηλή (L) και υψηλή ένταση φωτός (XL).

Tetraselmis sp. ABS 40ppt L-XL

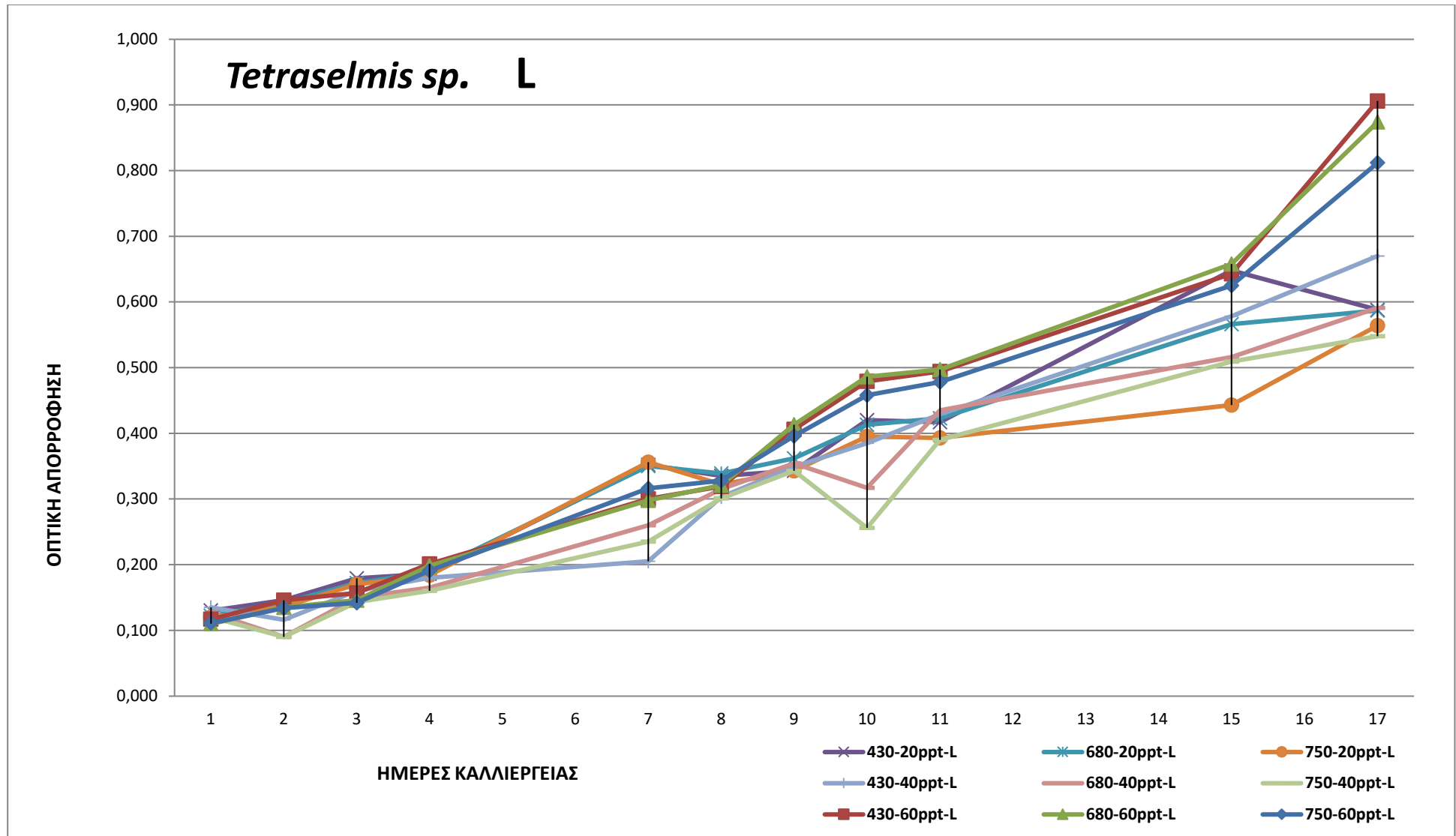


Εικόνα 21. *Tetraselmis sp.* – Οπτική απορρόφηση σε 430-680-750 nm αλατότητας 40ppt στην χαμηλή (L) και υψηλή ένταση φωτός (XL).

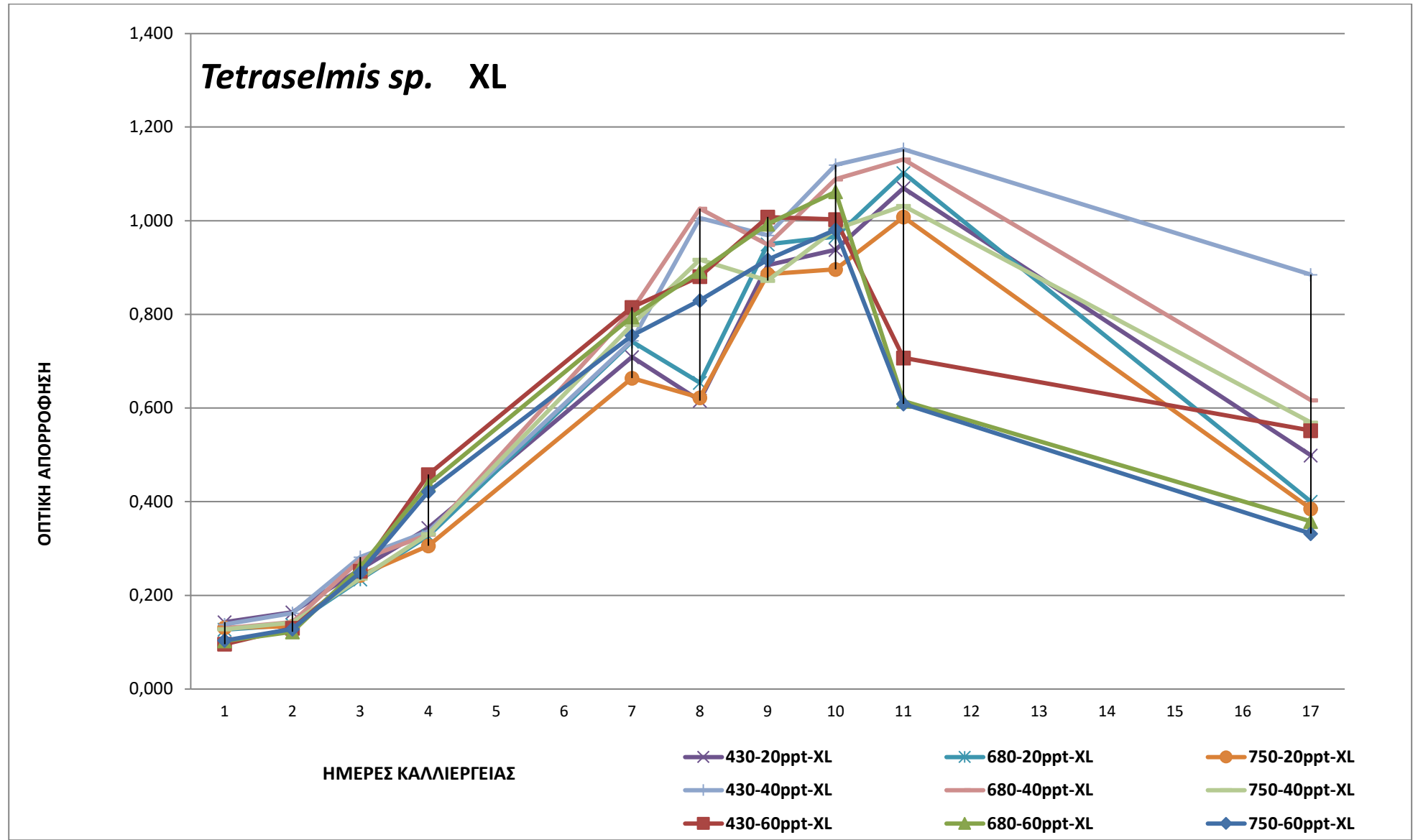
Tetraselmis sp. ABS 60ppt L-XL



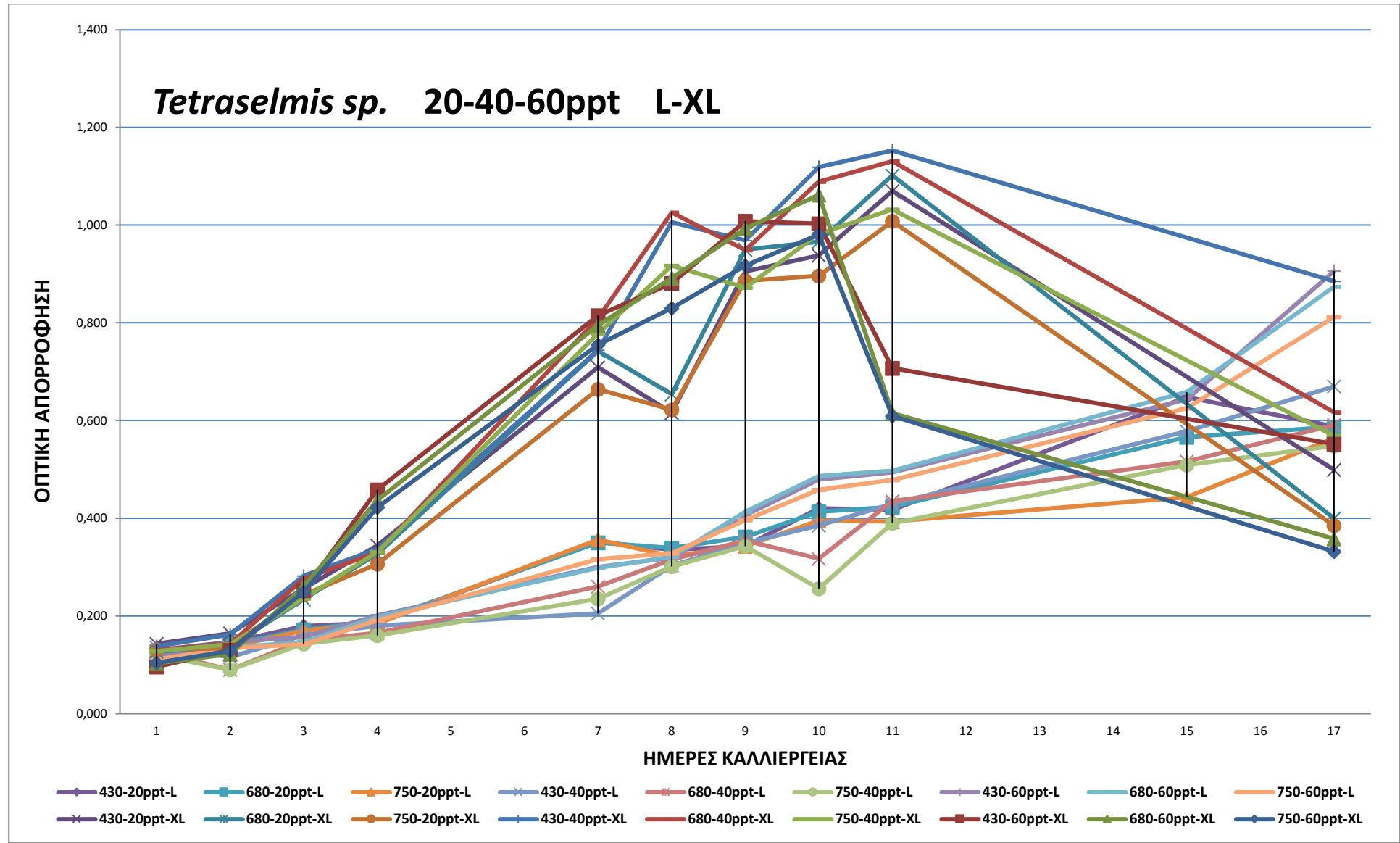
Εικόνα 22. *Tetraselmis sp.* – Οπτική απορρόφηση σε 430-680-750 nm αλατότητας 60ppt στην χαμηλή (L) και υψηλή ένταση φωτός (XL).



Εικόνα 23. *Tetraselmis sp.* – Οπτική απορρόφηση σε 430-680-750 nm αλατοτήτων 20-40-60 ppt στην χαμηλή (L).



Εικόνα 24. *Tetraselmis sp.* – Οπτική απορρόφηση σε 430-680-750 nm αλατοτήτων 20-40-60 ppt στην υψηλή ένταση φωτός (XL).



Εικόνα 25. *Tetraselmis sp.*, Οπτική απορρόφηση σε 430-680-750 nm αλατοτήτων 20-40-60 ppt στην χαμηλή (L) και υψηλή ένταση φωτός (XL).

Η οπτική απορρόφηση της καλλιέργειας *Tetraselmis sp.* στην αλατότητα 20ppt παρουσίασε μέγιστη τιμή στην υψηλή ένταση φωτισμού σε μήκος κύματος 680nm με τιμή 1,102 την 11^η ημέρα της καλλιέργειας. Ακολούθησε η απορρόφηση στα 430 nm (1,070) και στα 750nm (1,008) επίσης στις συνθήκες υψηλού φωτισμού την ίδια μέρα (11η). οι χαμηλότερες τιμές εμφανιστήκαν, κατά φθίνουσα σειρά στα μήκη κύματος 680nm (0,423), 430nm (0,417) και 750nm (0,393) στο δείγμα χαμηλής έντασης φωτισμού.

Στην αλατότητα 40 ppt μέγιστη τιμή απορρόφησης εμφανίστηκε την 11^η ημέρα της καλλιέργειας στην υψηλή ένταση φωτισμού και συγκεκριμένα στο μήκος κύματος 430nm με τιμή 1,153 και ακολούθησαν τα μήκη κύματος 680 nm και 750nm με τιμές 1,131 και 1,032 αντίστοιχα επίσης την ίδια μέρα στην υψηλή ένταση φωτισμού. Ακολούθησαν με χαμηλότερες τιμές απορρόφησης τα μήκη κύματος 430nm (0,426), 680nm (0,453) και 750nm (0,390) στο δείγμα χαμηλής έντασης φωτισμού κατά φθίνουσα σειρά.

Στα δείγματα με αλατότητα 60ppt εμφανίστηκε μέγιστη τιμή απορρόφησης στην υψηλή ένταση φωτισμού τη 10^η ημέρα της καλλιέργειας, συγκεκριμένα στο μήκος κύματος 680nm με τιμή 1,062. Ακολούθησε η απορρόφηση στο μήκος κύματος 430nm και 750nm επίσης στο δείγμα της υψηλής έντασης φωτισμού με τιμές 1,003 και 0,981 αντίστοιχα. Τις χαμηλότερες απορροφήσεις εμφάνισε το δείγμα της χαμηλής έντασης φωτισμού ως εξής: 680nm, 430nm και 750nm με απορροφήσεις 0,486, 0,479 και 0,453 αντίστοιχα.

Στη χαμηλή ένταση φωτισμού η μέγιστη τιμή απορρόφησης εμφανίστηκε την 17^η ημέρα της καλλιέργειας. Συγκεκριμένα στο δείγμα αλατότητας 60ppt και στο μήκος κύματος 430nm με τιμή 0,906. Ακολούθησαν τα μήκη κύματος 680nm και 750nm του ίδιου δείγματος με τιμές 0,874 και 0,812 αντίστοιχα. Μέτριες τιμές εμφανίστηκαν στο δείγμα της αλατότητας 40ppt και συγκεκριμένα στο μήκος κύματος 430nm (0,670) και 680nm (0,591), ακολούθησε το δείγμα αλατότητας 20ppt με οπτική απορρόφηση 0,588 στα 430nm, 0,587 στα 680nm 0,564 στα 750nm. Ελάχιστη τιμή απορρόφησης εμφανίστηκε στο μήκος κύματος 750nm της αλατότητας 40ppt με τιμή 0,548.

Στην υψηλή ένταση φωτισμού την 11^η ημέρα της καλλιέργειας παρουσιάστηκε η μέγιστη τιμή οπτικής απορρόφησης στο δείγμα της αλατότητας 40ppt και συγκεκριμένα στο μήκος κύματος 430nm με τιμή 1,153. Ακολούθησε το μήκος κύματος 680nm του ίδιου δείγματος με τιμή 1,131. Επόμενη τιμή κατά φθίνουσα σειρά εμφανίστηκε στο δείγμα αλατότητας 20ppt στα 680nm (1,102), έπειτα στο δείγμα αλατότητας 40ppt στα 750nm (1,003) και οι μικρότερες τιμές οπτικής απορρόφησης εμφανίστηκαν στο δείγμα αλατότητας 60ppt με ελάχιστη αυτή του μήκους κύματος 750nm (0,609).

Και στις **3 αλατότητες μέγιστη** τιμή οπτικής απορρόφησης εμφανίστηκε στα δείγματα που ήταν εκτεθειμένα σε συνθήκες **υψηλής έντασης φωτισμού** και συγκεκριμένα για τις αλατότητες 20-40-60ppt μέγιστες τιμές εμφανίστηκαν στα **680nm, 430nm και 680nm** αντίστοιχα, την **11^η** για τα 2 πρώτα και τη **10^η** ημέρα της καλλιέργειας για το δείγμα αλατότητας 60ppt.

Μεταξύ των δειγμάτων της **χαμηλής έντασης φωτισμού μέγιστη** τιμή απορρόφησης εμφάνισε το δείγμα με αλατότητα **60ppt** και στο μήκος κύματος **430nm** με τιμή 0,906 την **17^η** ημέρα της

καλλιέργειας. Ελάχιστη τιμή οπτικής απορρόφησης εμφάνισε το δείγμα αλατότητας 40ppt στο μήκος κύματος 750nm με τιμή 0,548.

Μεταξύ των δειγμάτων της **υψηλής έντασης** φωτισμού **μέγιστη** τιμή απορρόφησης εμφάνισε το δείγμα με αλατότητα **40ppt** στο μήκος κύματος **430nm** με τιμή 1,153 την **11^η** ημέρα της καλλιέργειας. Ελάχιστη τιμή οπτικής απορρόφησης εμφάνισε το δείγμα αλατότητας 60ppt στο μήκος κύματος 750nm με τιμή 0,609.

Μεταξύ όλων των δειγμάτων **μέγιστη** τιμή εμφάνισε το δείγμα αλατότητας **40ppt** στο μήκος κύματος **430nm** στην **υψηλή** ένταση φωτισμού την 11^η ημέρα της καλλιέργειας και **ελάχιστη** τιμή εμφάνισε το δείγμα **40ppt** στο μήκος κύματος **750nm** στη **χαμηλή** ένταση φωτισμού την 17^η ημέρα της καλλιέργειας. Ενώ κατά τη 17^η ημέρα δηλαδή στο τέλος της καλλιέργειας η σειρά με την οποία εμφανίστηκαν οι τιμές φαίνονται στον παρακάτω **πίνακα 6**.

Πίνακας 6. Τιμές απορρόφησης *Tetraselmis sp.* τη 17^η ημέρα της καλλιέργειας.

Ημέρα	ppt	nm	Ένταση φωτισμού	Απορρόφηση
17 ^η	60	430	L	0,906
17 ^η	40	430	XL	0,885
17 ^η	60	680	L	0,874
17 ^η	60	750	L	0,812
17 ^η	40	430	L	0,670
17 ^η	40	680	XL	0,617
17 ^η	40	680	L	0,591
17 ^η	20	430	L	0,588
17 ^η	20	680	L	0,587
17 ^η	40	750	XL	0,569
17 ^η	20	750	L	0,564
17 ^η	60	430	XL	0,552
17 ^η	40	750	L	0,548
17 ^η	20	430	XL	0,499
17 ^η	20	680	XL	0,400
17 ^η	20	750	XL	0,385
17 ^η	60	680	XL	0,358
17 ^η	60	750	XL	0,332

1.2 Προσδιορισμός pH

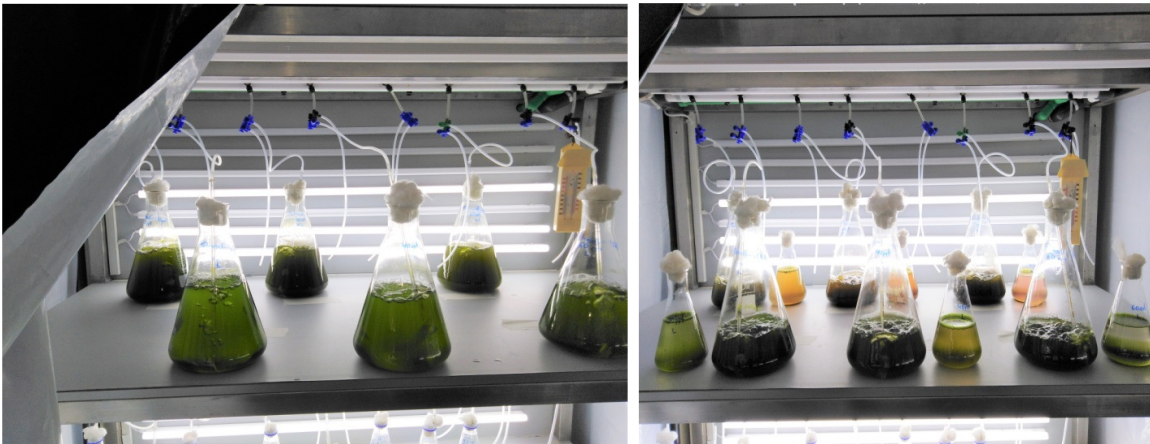
Οι μετρήσεις του pH δεν γίνονταν καθημερινά γιατί το pH δεν μεταβάλλεται τόσο γρήγορα. Οι μετρήσεις παρουσιάζονται στις **εικόνες 29-34**.

Την 11^η ημέρα της καλλιέργειας αποσυνδέθηκε απροσδόκητα ο αερισμός στη φιάλη 60 ppt XL. Το δείγμα είχε αλλάξει χρώμα από πράσινο σε κόκκινο. Μετρήθηκε το pH, συνδέθηκε πάλι η παροχή του αέρα και στη συνέχεια μετρήθηκε ξανά. Υπήρξε διαφορά στις μετρήσεις και από κάθε φιάλη εξαιρέθηκε μια ποσότητα η οποία τοποθετήθηκε σε μικρότερη φιάλη (θυγατρική). Στη συνέχεια οι

Θυγατρικές φιάλες τοποθετήθηκαν δίπλα από τη μητρική τους στις ίδιες συνθήκες χωρίς παροχή αέρα, με σκοπό να μετρηθεί ξανά το pH και να διαπιστώσουμε αν θα υπάρξει αλλαγή στο χρώμα των διαλυμάτων τις επόμενες μέρες.



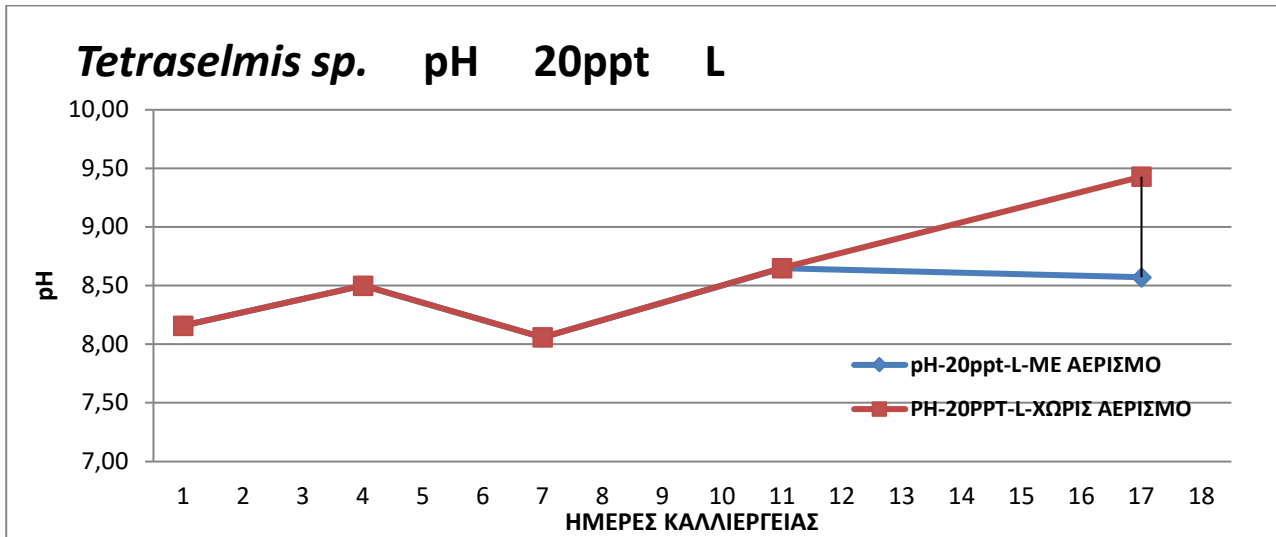
Εικόνα 26. Αριστερά το δείγμα 60rrt-XL την 11^η ημέρα που βρέθηκε χωρίς αερισμό. Δεξιά διαφορές στο χρωματισμό μεταξύ 60rrt-L και 40rrt-XL τη 17^η ημέρα της καλλιέργειας.



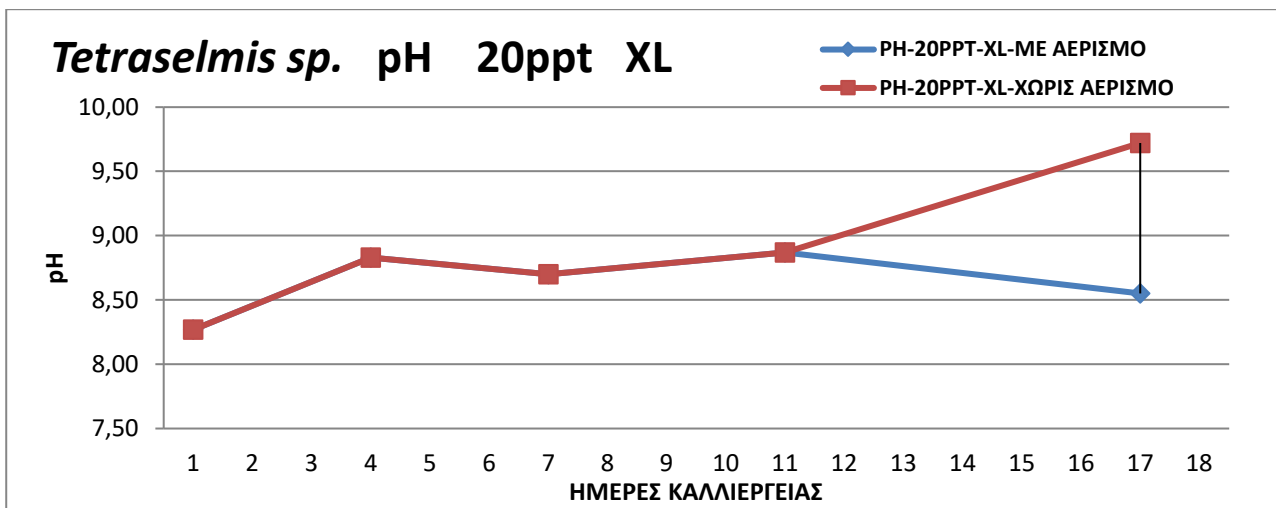
Εικόνα 27. Αριστερά η 8^η ημέρα της καλλιέργειας και δεξιά η 14^η ημέρα της καλλιέργειας.



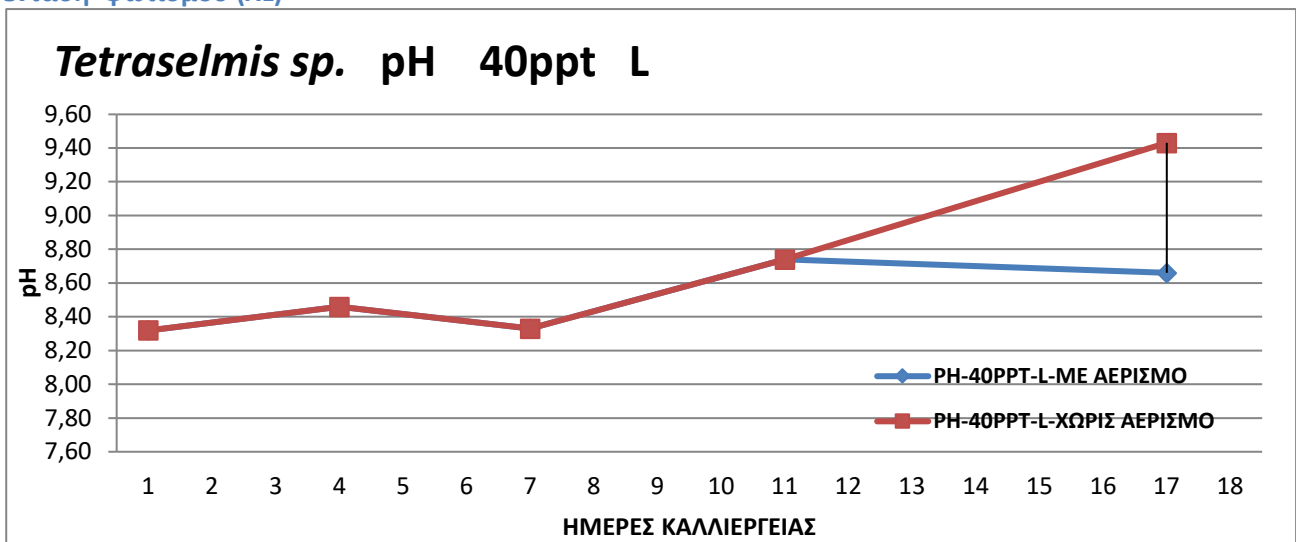
Εικόνα 28. *Tetraselmis sp.*, 17^η ημέρα της καλλιέργειας



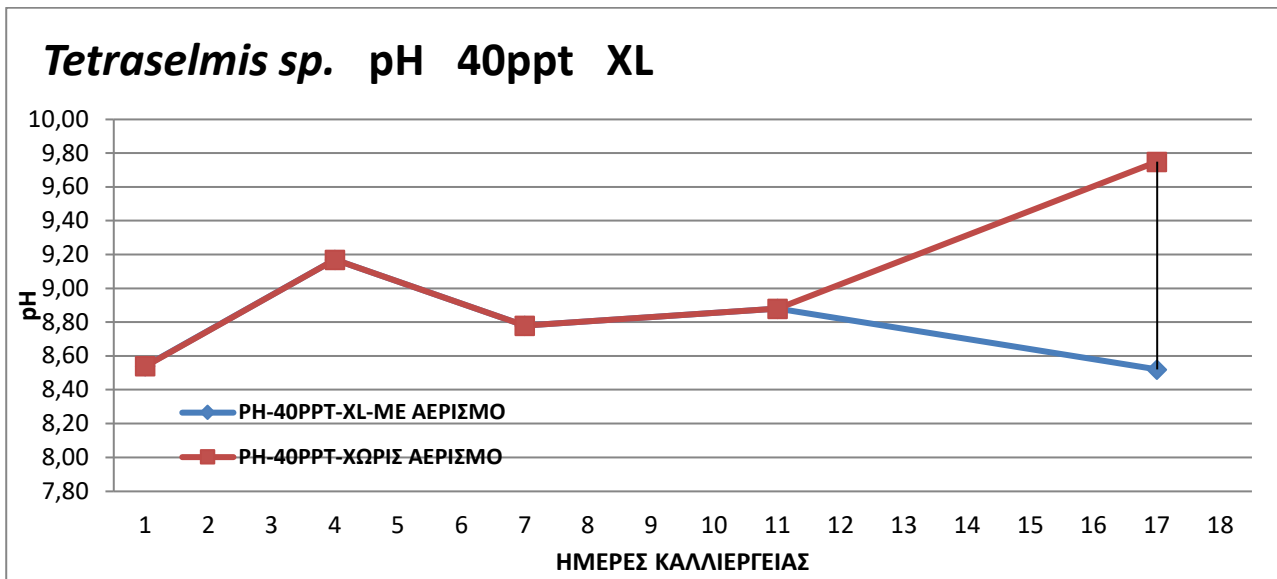
Εικόνα 29. *Tetraselmis sp.*, τιμές pH αλατότητας 20 ppt σε συνθήκες αερισμού και μη, στη χαμηλή ένταση φωτισμού (L).



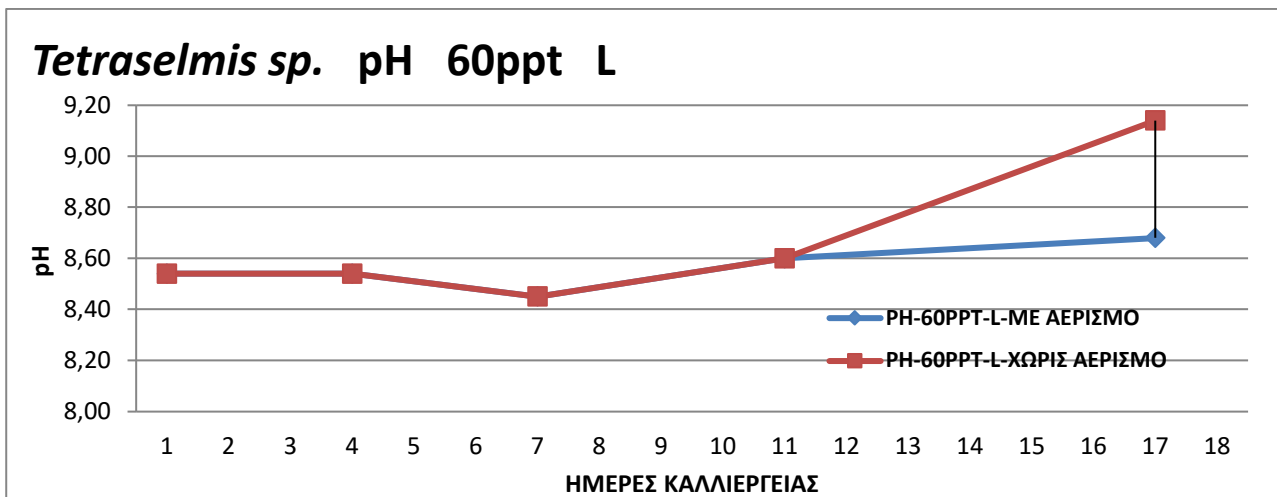
Εικόνα 30. *Tetraselmis sp.*, τιμές pH αλατότητας 20 ppt σε συνθήκες αερισμού και μη, στην υψηλή ένταση φωτισμού (XL)



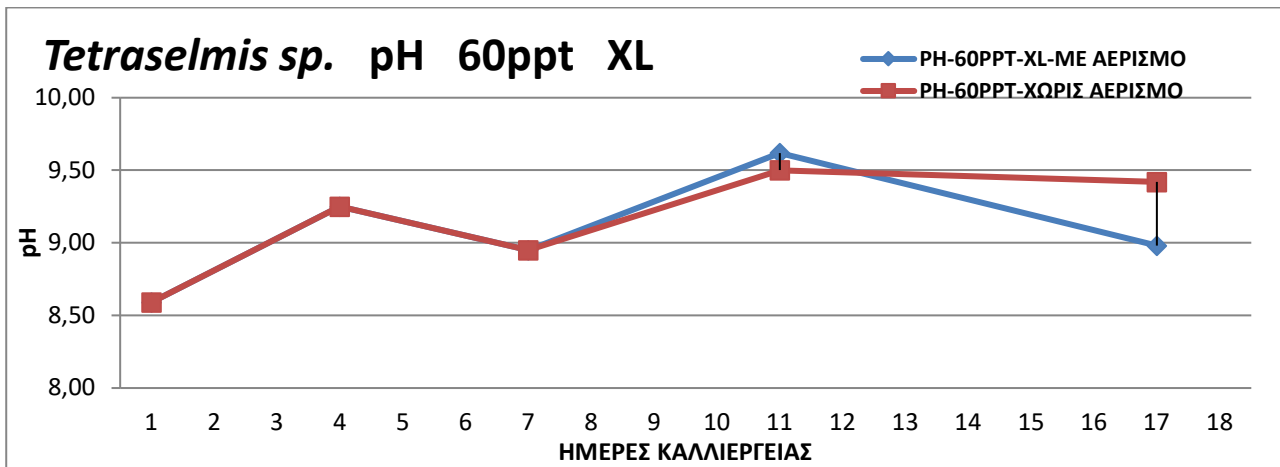
Εικόνα 31. *Tetraselmis sp.*, τιμές pH αλατότητας 40 ppt σε συνθήκες αερισμού και μη, στη χαμηλή ένταση φωτισμού (L).



Εικόνα 32. *Tetraselmis sp.*, τιμές pH αλατότητας 40 ppt σε συνθήκες αερισμού και μη, στην υψηλή ένταση φωτισμού (XL).



Εικόνα 33. *Tetraselmis sp.*, τιμές pH αλατότητας 60 ppt σε συνθήκες αερισμού και μη, στη χαμηλή ένταση φωτισμού (L).



Εικόνα 34. *Tetraselmis sp.*, τιμές pH αλατότητας 60 ppt σε συνθήκες αερισμού και μη, στην υψηλή ένταση φωτισμού (XL).

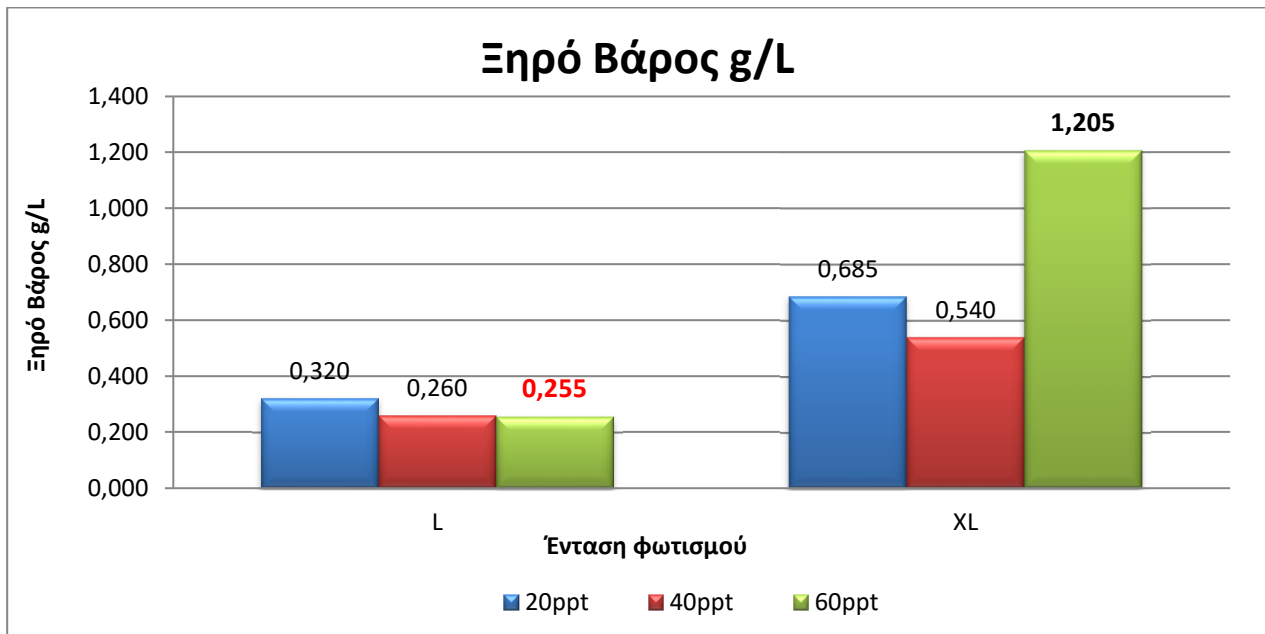
Σε όλα τα δείγματα το pH παρουσίαζε μικρές μεταβολές στις τιμές του και στο τέλος της καλλιέργειας κατά την 17^η ημέρα εμφάνισε μια μικρή αύξηση, εκτός από το δείγμα της αλατότητας 40ppt που εμφάνισε μια ελάχιστη, σχεδόν αμελητέα πτώση από 8,54 στην αρχή της καλλιέργειας σε 8,52 στο τέλος της.

Την 17^η ημέρα στα αντίστοιχα θυγατρικά δείγματα οι τιμές ήταν μεγαλύτερες. Συγκεκριμένα παρουσίασαν τη μέγιστη τιμή τους την ημέρα αυτή.

Εξάιρεση αποτέλεσε το δείγμα αλατότητας 60ppt στην υψηλή ένταση φωτισμού το οποίο παρουσίασε μέγιστο την 11^η ημέρα της καλλιέργειας σε συνθήκες αερισμού. Το δείγμα βρέθηκε χωρίς αερισμό και ελαφρώς κόκκινο την 11^η ημέρα και μετρήθηκε το pH του σε συνθήκες ηρεμίας. Η τιμή του ήταν 9,50. Το δείγμα επανασυνδέθηκε στον αερισμό και μετρήθηκε ξανά το pH του και μετά την ανάδευση βρέθηκε 9,62, που αποτέλεσε και τη μέγιστη τιμή του pH για αυτό το δείγμα στην καλλιέργεια.

1.3 Προσδιορισμός Βιομάζας

Τα ξηρά βάρη μετρήθηκαν στο τέλος της καλλιέργειας (15^η ημέρα) και φαίνεται στο ραβδόγραμμα της **εικόνας 35**.



Εικόνα 35. *Tetraselmis sp.*, τιμές ξηρού βάρους στο τέλος της καλλιέργειας στις χαμηλές και υψηλές εντάσεις φωτισμού (XL).

Τη 15^η ημέρα της καλλιέργειας υπολογίστηκαν τα Ξηρά Βάρη από 20mL κάθε δείγματος.

Στην **υψηλή ένταση** φωτισμού τη **μέγιστη** τιμή εμφάνισε το δείγμα αλατότητας **60ppt** με τιμή **Ξ.Β. 1,205 g/L** ακολούθησε το δείγμα 20ppt με Ξ.Β. 0,685 g/L και τέλος το δείγμα αλατότητας 40ppt με Ξ.Β. 0,540 g/L.

Στη **χαμηλή ένταση** φωτισμού **μέγιστη** τιμή εμφανίστηκε στο δείγμα αλατότητας **20ppt** με **Ξ.Β. 0,320 g/L**, ακολούθησε το δείγμα 40ppt με Ξ.Β. 0,260 g/L και τέλος την **ελάχιστη** τιμή Ξ.Β. είχε το δείγμα αλατότητας 60ppt με Ξ.Β. 0,255 g/L.

Οι υψηλότερες τιμές Ξ.Β. εμφανιστήκαν στα δείγματα της **υψηλής έντασης** φωτισμού και τη **μέγιστη** τιμή είχε το δείγμα αλατότητας **60ppt**. Την **ελάχιστη** τιμή είχε το δείγμα αλατότητας **60ppt** στη **χαμηλή ένταση** φωτισμού.

1.4 Προσδιορισμός Εδικού Ρυθμού Αύξησης (μ) και Χρόνου Γενεάς (t_g) της Καλλιέργειας

Στην φάση του εκθετικού ρυθμού αύξησης υπολογίζεται ο ειδικός ρυθμός αύξησης(μ) του φυτοπλακτονικού πληθυσμού. Στη συνέχεια μπορούμε να υπολογίσουμε το χρόνο γενεάς δηλαδή το χρόνο σε ημέρες που απαιτείται για να διπλασιαστεί ο πληθυσμός(t_g).

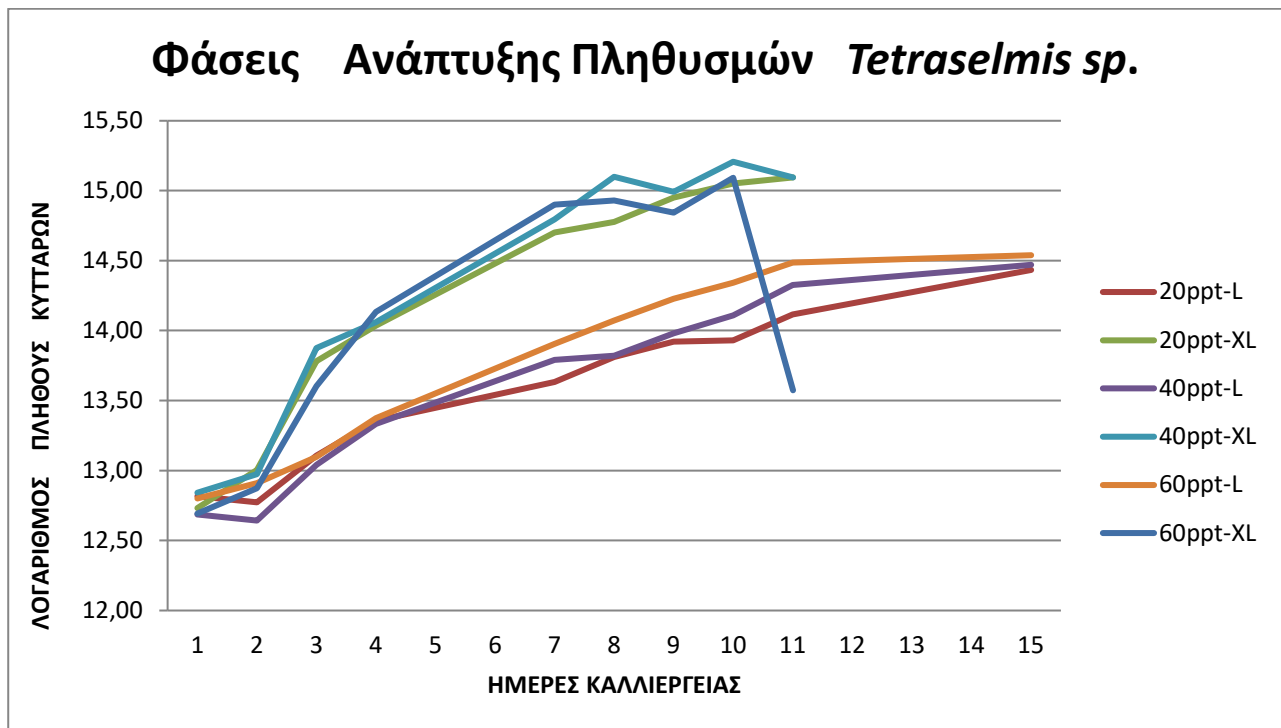
Ο ειδικός ρυθμός αύξησης (μ) και ο χρόνος γενεάς (t_g) υπολογίζονται ως εξής:

$$\mu = \frac{(\ln x_2 - \ln x_1)}{(t_2 - t_1)} \quad \text{και} \quad t_g = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Πίνακας 7. *Tetraselmis sp.*, λογάριθμοι πυκνότητας πληθυσμών αλατότητας 20ppt, 40ppt και 60ppt.

ΗΜΕΡΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	20ppt-L		20ppt-XL		40ppt-L		40ppt-XL		60ppt-L		60ppt-XL	
	ΚΥΤΤΑΡΑ/ mL	LN	ΚΥΤΤΑΡΑ/ mL	LN	ΚΥΤΤΑΡΑ /mL	LN	ΚΥΤΤΑΡΑ /mL	LN	ΚΥΤΤΑΡΑ/ mL	LN	ΚΥΤΤΑΡΑ/ mL	LN
1	368.148	12,816	338.889	12,733	323.333	12,686	377.407	12,841	362.222	12,800	325.556	12,693
2	352.963	12,774	443.704	13,003	309.630	12,643	430.741	12,973	404.074	12,909	389.630	12,873
3	492.222	13,107	965.926	13,781	460.741	13,041	1.060.741	13,874	487.778	13,098	808.148	13,603
4	631.667	13,356	1.245.000	14,035	616.667	13,332	1.277.500	14,060	643.333	13,374	1.373.333	14,133
5												
6												
7	833.333	13,633	2.426.389	14,702	975.000	13,790	2.662.963	14,795	1.094.444	13,906	2.956.944	14,900
8	995.556	13,811	2.615.556	14,777	1.004.444	13,820	3.608.889	15,099	1.291.111	14,071	3.048.889	14,930
9	1.111.111	13,921	3.111.111	14,950	1.180.556	13,981	3.238.889	14,991	1.511.111	14,228	2.794.444	14,843
10	1.122.222	13,931	3.441.667	15,051	1.341.667	14,109	4.022.222	15,207	1.694.444	14,343	3.588.889	15,093
11	1.350.000	14,116	3.594.444	15,095	1.666.667	14,326	3.594.444	15,095	1.955.556	14,486	785.184	13,574
12												
13												
14												
15	1.858.333	14,435			1.927.778	14,472			2.063.889	14,540		

Από τον πίνακα 7 προκύπτουν τα διαγράμματα της εικόνας 36 που μας δείχνουν τις φάσεις ανάπτυξης του πληθυσμού της καλλιέργειας του *Tetraselmis sp.*



Εικόνα 36. Φάσεις ανάπτυξης των καλλιεργειών *Tetraselmis sp.* σε όλες τις συνθήκες αλατότητας και φωτισμού.

Στον πίνακα 8 φαίνονται οι ημέρες της εκθετικής φάσης της κάθε καλλιέργειας από τις οποίες στη συνέχεια υπολογίστηκε ο ειδικός ρυθμός αύξησης (μ) και ο χρόνος γενεάς (tg).

Πίνακας 8. *Tetraselmis sp.*, ειδικός ρυθμός αύξησης και χρόνος γενεάς στα δείγματα όλων των αλατοτήτων και εντάσεων φωτισμού κατά φθίνουσα σειρά.

Αλατότητα (ppt)	Ένταση Φωτισμού	Ημέρες Εκθετικής Αύξησης	Ρυθμός Αύξησης μ	Χρόνος γενεάς tg
60	XL	2-7	0,41	1,71
40	XL	2-7	0,36	1,90
20	XL	2-7	0,34	2,04
40	L	2-7	0,23	3,02
60	L	3-7	0,20	3,43
20	L	2-7	0,17	4,03

Στα δείγματα αλατότητας 20ppt μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης είχε το δείγμα της υψηλής έντασης φωτισμού με τιμή 0,34. Ομοίως στο δείγμα αλατότητας 40ppt με ρυθμό αύξησης 0,36 και στο δείγμα αλατότητας 60ppt με ρυθμό αύξησης 0,41.

Μεταξύ των δειγμάτων της υψηλής έντασης φωτισμού την υψηλότερη τιμή είχε το δείγμα αλατότητας 60ppt με $\mu=0,41$.

Μεταξύ των δειγμάτων της χαμηλής έντασης φωτισμού την υψηλότερη τιμή είχε το δείγμα 40ppt με ρυθμό αύξησης 0,23

Οι μικρότερες τιμές στην υψηλή και χαμηλή ένταση φωτισμού παρατηρηθήκαν στα δείγματα αλατότητας 20ppt με $\mu=0,34$ και 20ppt με $\mu=0,17$ αντίστοιχα.

Μεταξύ όλων των δειγμάτων **μέγιστο** ειδικό ρυθμό αύξησης εμφάνισε το δείγμα αλατότητας **60ppt** της **υψηλής έντασης** φωτισμού με $\mu=0,41$ και χρόνο γενεάς 1,71 ημέρες και **ελάχιστο** ειδικό ρυθμό αύξησης εμφάνισε το δείγμα αλατότητας **20ppt** της **χαμηλής έντασης** φωτισμού με $\mu=0,17$ και χρόνο γενεάς 4,03 ημέρες.

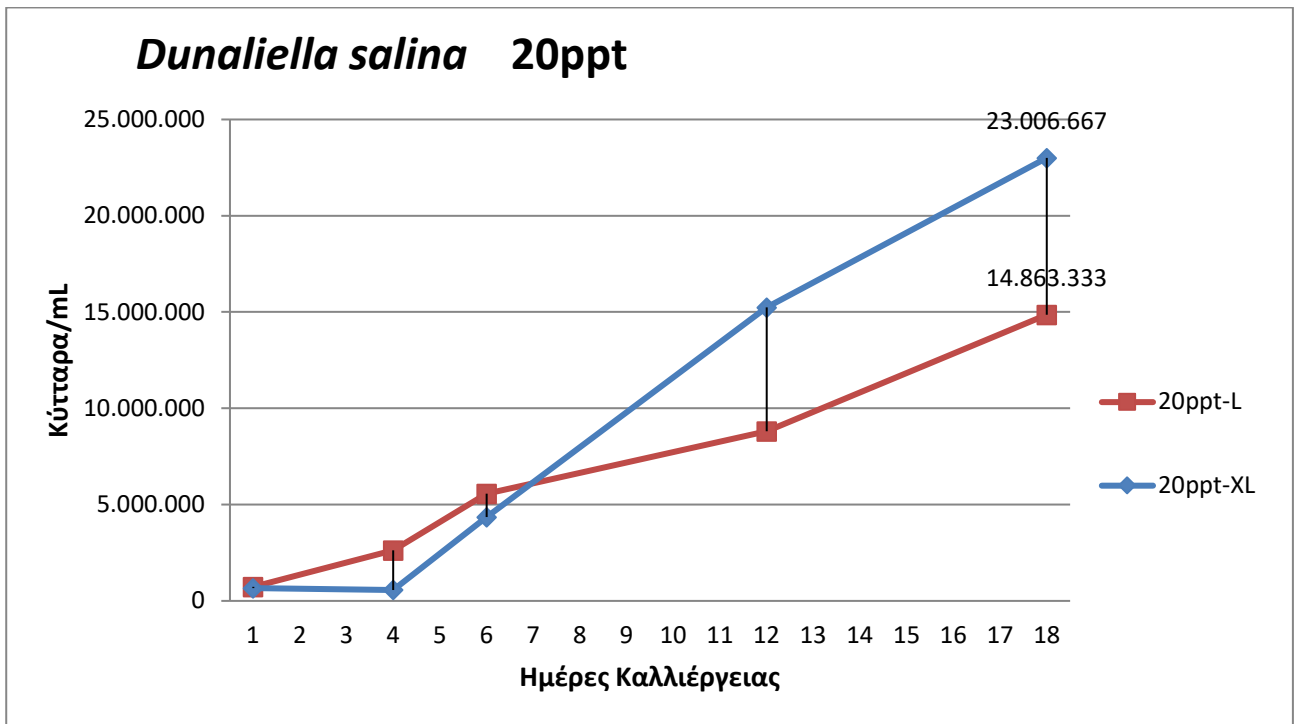
2. *Dunaliella salina*

2.1 Προσδιορισμός κυτταρικής πυκνότητας

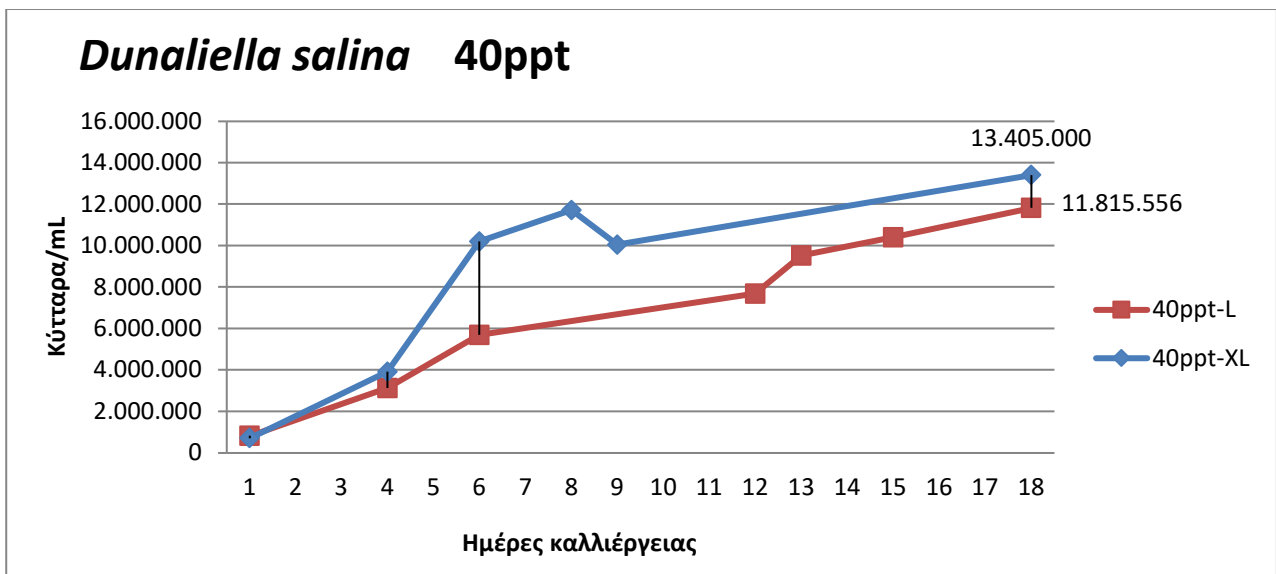
α) με μικροσκόπιο

Ο προσδιορισμός της πυκνότητας των κυττάρων έγινε με τη χρήση αιμοκυτταρομέτρου Neubauer και της οπτικής απορρόφησης με το φασματοφωτόμετρο. Οι μετρήσεις ήταν καθημερινές. Η καλλιέργεια του φύκου *Dunaliella salina* διήρκησε 19 ημέρες και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω.

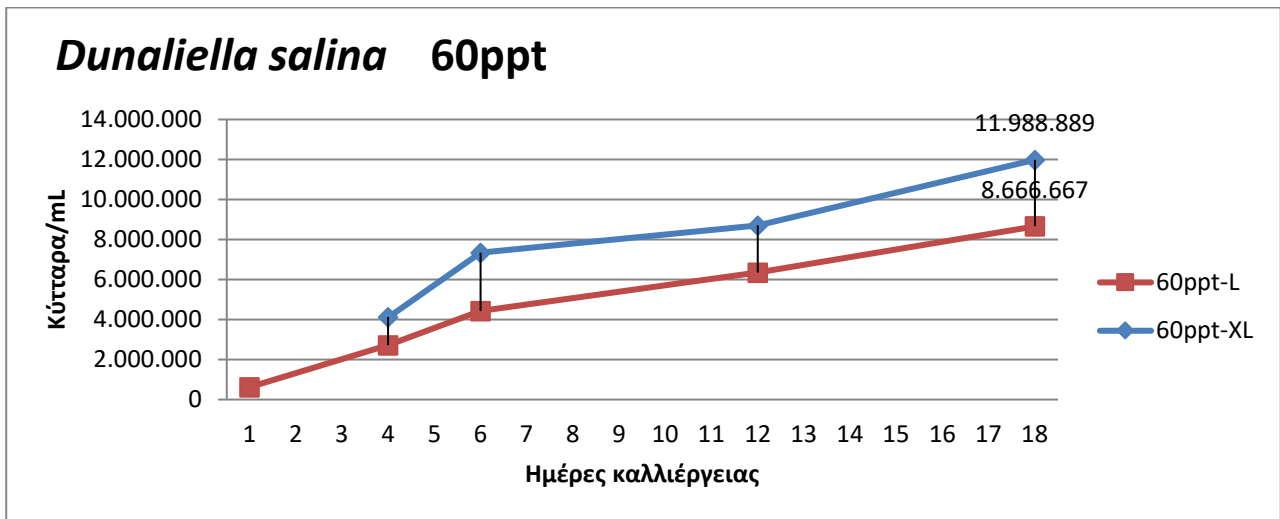
Η πυκνότητα των κυττάρων του *Dunaliella salina* που καλλιεργήθηκε σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού και αλατότητας φαίνεται στις **εικόνες 37-42**.



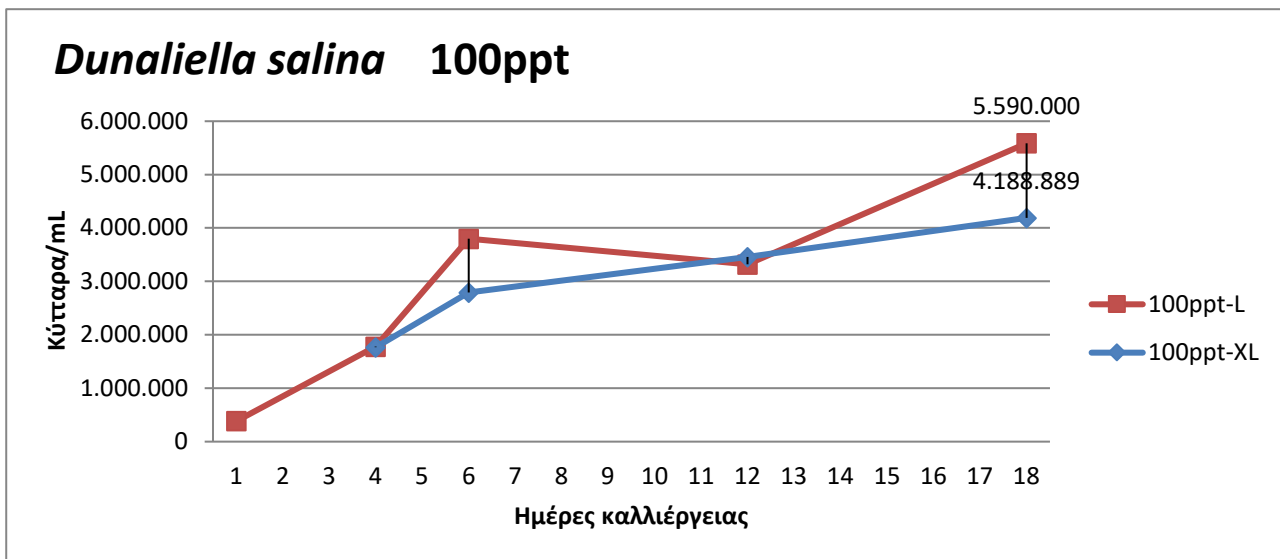
Εικόνα 37. *Dunaliella salina*, κύτταρα/mL αλατότητας 20 ppt στις δυο εντάσεις φωτισμού (L-XL).



Εικόνα 38. *Dunaliella salina*, κύτταρα/mL αλατότητας 40 ppt στις δυο εντάσεις φωτισμού (L-XL).



Εικόνα 39. *Dunaliella salina*, κύτταρα/mL αλατότητας 60 ppt στις δυο εντάσεις φωτισμού (L-XL).



Εικόνα 40. *Dunaliella salina*, κύτταρα/mL αλατότητας 100 ppt στις δυο εντάσεις φωτισμού (L-XL).

Στις καλλιέργειες μεταξύ της ίδιας αλατότητας με διαφορετικό φωτισμό υπήρξαν διαφορές στην πυκνότητα των κυττάρων. Συγκεκριμένα στο δείγμα με την αλατότητα **20ppt** μέγιστη τιμή πυκνότητας κυττάρων εμφανίστηκε στην **υψηλή ένταση φωτισμού** με τιμή 23.006.667 κύτταρα/mL έναντι του χαμηλού φωτισμού με 14.863.333 κύτταρα/mL κατά την 18^η ημέρα της καλλιέργειας.

Στην αλατότητα **40ppt** μέγιστη τιμή πυκνότητας παρουσιάστηκε στην **υψηλή ένταση φωτισμού** με 13.405.000 κύτταρα/mL κατά την 18^η ημέρα της καλλιέργειας. Στη χαμηλή ένταση φωτός η τιμή της πυκνότητας των κυττάρων ήταν 11.815.556 κύτταρα/mL, την ίδια ημέρα.

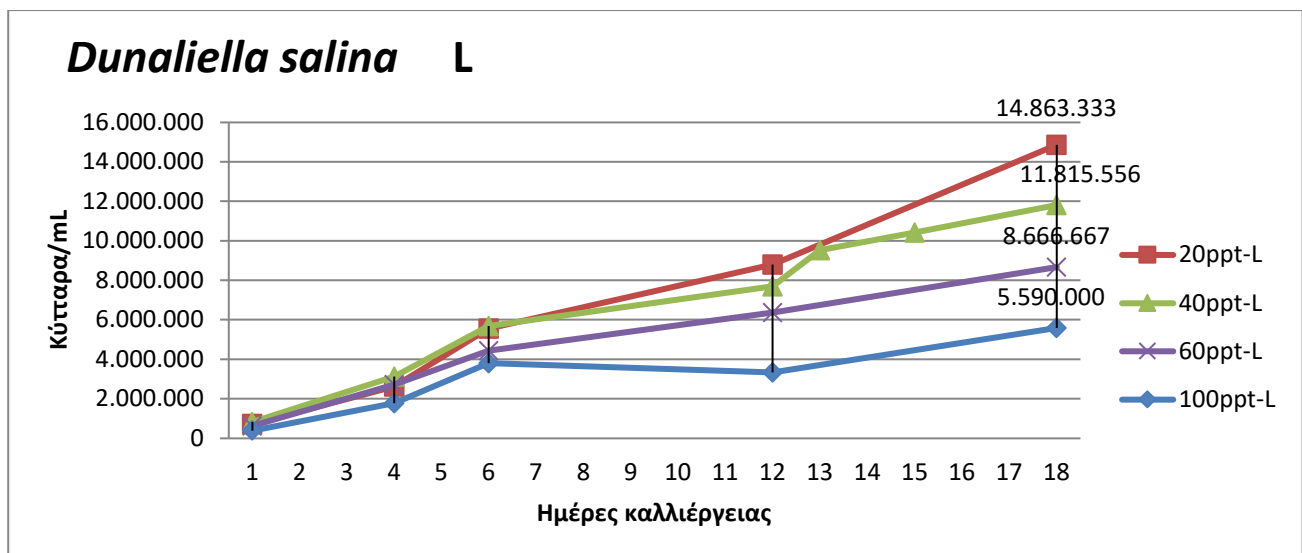
Στην αλατότητα **60ppt** μέγιστη τιμή πυκνότητας εμφανίστηκε και πάλι στην **υψηλή ένταση φωτισμού** με τιμή κυττάρων 11.988.889 ανά mL την 18^η ημέρα της καλλιέργειας. Το δείγμα στη χαμηλή ένταση φωτισμού τη συγκεκριμένη ημέρα είχε τιμή 8.666.667 κύτταρα/mL.

Στην αλατότητα **100ppt** μέγιστη τιμή πυκνότητας παρουσιάστηκε στην **χαμηλή ένταση φωτισμού** με 5.590.000 κύτταρα/mL κατά την 18^η ημέρα της καλλιέργειας. Στη υψηλή ένταση φωτός η τιμή της πυκνότητας των κυττάρων ήταν 4.188.889 κύτταρα/mL, την ίδια ημέρα.

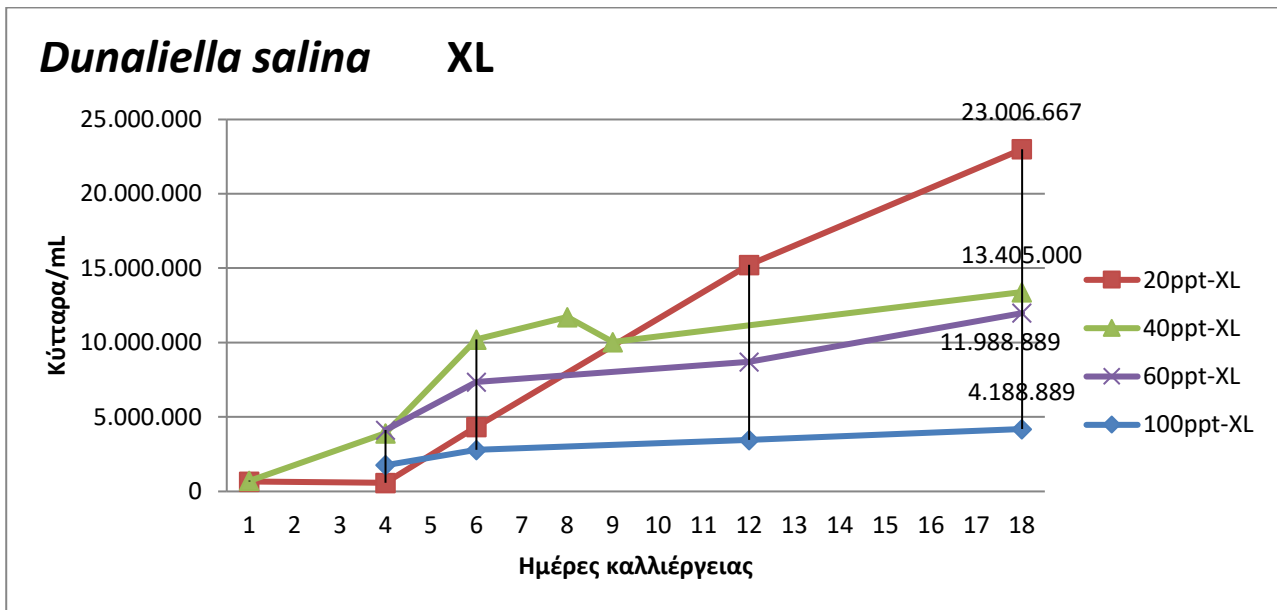
Στον **πίνακα 9** αναγράφονται οι εντάσεις φωτός στις οποίες εμφανίστηκαν οι μέγιστες πυκνότητες κυττάρων σε κάθε αλατότητα.

Πίνακας 9. Μέγιστες τιμές πυκνότητας πληθυσμών του *Dunaliella salina*. σε κάθε αλατότητα.

Αλατότητα (ppt)	Ένταση φωτισμού	Μέγιστη Πυκνότητα (κύτταρα/mL)	Ημέρα καλλιέργειας
20 ppt	Υψηλή	23.006.667	18 ^η
40 ppt	Υψηλή	13.405.000	18 ^η
60 ppt	Υψηλή	11.988.889	18 ^η
100 ppt	Χαμηλή	5.590.000	18 ^η



Εικόνα 41. *Dunaliella salina*, κύτταρα/mL σε όλες τις αλατότητας (20-40-60-100 ppt) σε χαμηλή ένταση φωτισμού (L).



Εικόνα 42. *Dunaliella salina*, κύτταρα/mL σε όλες τις αλατότητας (20-40-60-100 ppt) σε υψηλή ένταση φωτισμού (XL).

Μεταξύ των δειγμάτων διαφόρων αλατοτήτων κατά την επίδραση της **χαμηλής έντασης φωτισμού** μέγιστη πυκνότητα κυττάρων παρατηρήθηκε στην αλατότητα **20ppt** με τιμή **14.863.333 κύτταρα/mL** και ακολούθησε το δείγμα με αλατότητα 40ppt (11.815.556 κύτταρα/mL), το δείγμα της αλατότητας 60 ppt με πλήθος κυττάρων 8.666.667 κύτταρα/mL και το δείγμα αλατότητας 100ppt με πλήθος 5.590.000 κατά την 10^η ημέρα της καλλιέργειας.

Στη **υψηλή ένταση φωτισμού** μέγιστη τιμή πυκνότητας κυττάρων εμφάνισε το δείγμα αλατότητας **20ppt** με πλήθος **23.006.667 κύτταρα/mL** και ακολούθησαν κατά φθίνουσα σειρά τα δείγματα αλατότητας 40ppt, 60ppt και 100ppt με τιμές 13.405.000 κύτταρα/mL, 11.988.889 κύτταρα/mL και 4.188.889 αντίστοιχα κατά την 18^η ημέρα της καλλιέργειας.

Στους **πίνακες 10 & 11** παρουσιάζονται οι αλατότητες με τις μέγιστες και ελάχιστες τιμές της πυκνότητας του πληθυσμού της καλλιέργειας *Dunaliella salina* σε κάθε ένταση φωτισμού, αντίστοιχα.

Πίνακας 10. Μέγιστες τιμές πυκνότητας πληθυσμών του *Dunaliella salina*. σε κάθε ένταση φωτισμού.

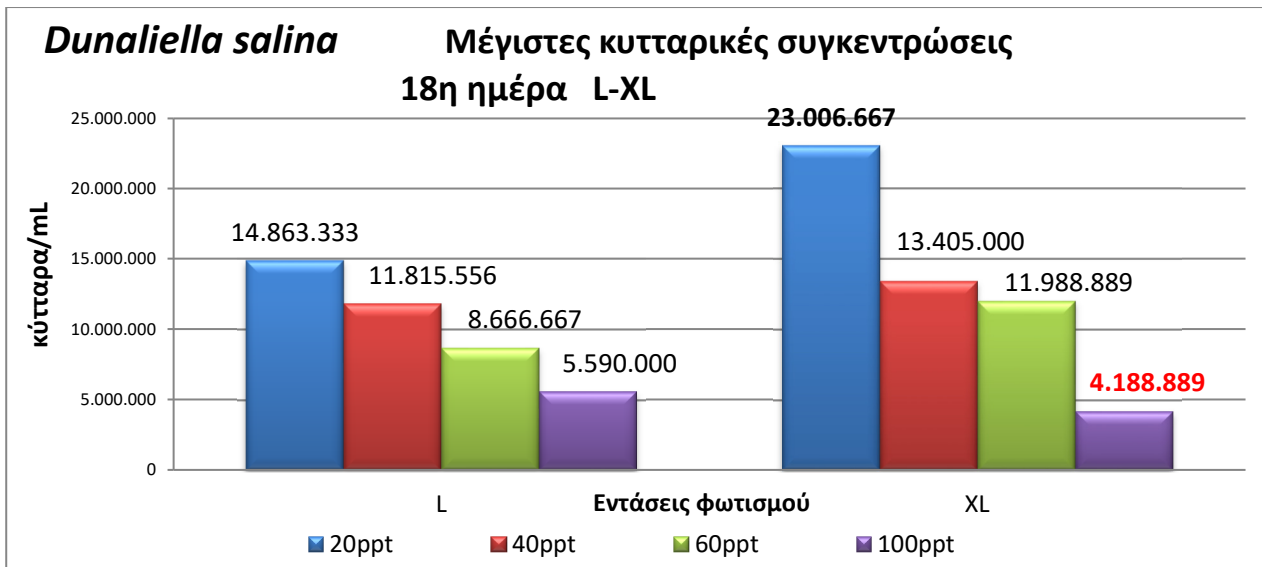
Ένταση φωτισμού	Αλατότητα (ppt)	Μέγιστη Πυκνότητα (κύτταρα/mL)	Ημέρα καλλιέργειας
Χαμηλή - L	20ppt	14.863.333	18 ^η
Υψηλή - XL	20ppt	23.006.667	18 ^η

Πίνακας 11. Ελάχιστες τιμές πυκνότητας πληθυσμών του *Dunaliella salina*. σε κάθε ένταση φωτισμού.

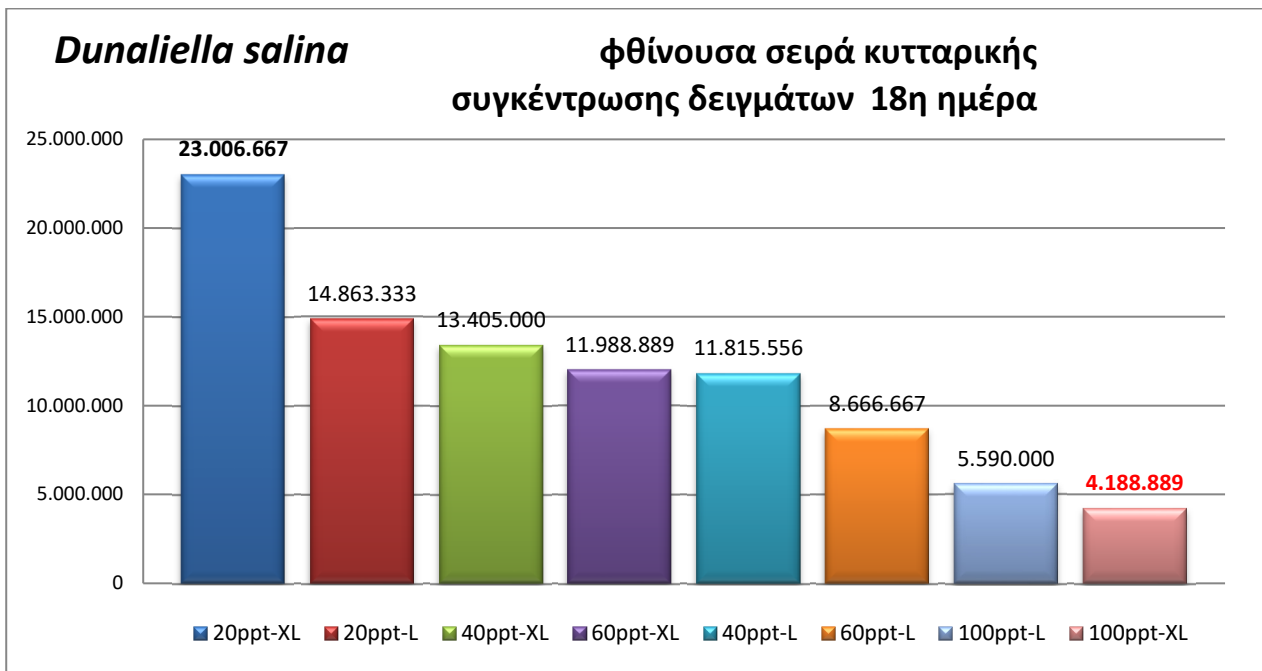
Ένταση φωτισμού	Αλατότητα (ppt)	Ελάχιστη Πυκνότητα (κύτταρα/mL)	Ημέρα καλλιέργειας
Χαμηλή - L	100ppt	5.590.000	18 ^η
Υψηλή - XL	100ppt	4.188.889	18 ^η

Στις **εικόνες 43 & 44** φαίνονται οι πυκνότητες των κυττάρων της καλλιέργειας του *Dunaliella salina*, σε όλες τις αλατότητες και τις εντάσεις φωτισμού κατά τη 18^η ημέρα της καλλιέργειας, ανά ένταση φωτισμού και κατά φθίνουσα σειρά αντίστοιχα.

Η **μέγιστη** πυκνότητα κυττάρων παρατηρήθηκε στην αλατότητα **20ppt** και ήταν 23.006.667 κύτταρα/ mL κατά την επίδραση **υψηλής έντασης φωτισμού (XL)** κατά τη 18^η ημέρα της καλλιέργειας, ενώ η **ελάχιστη** πυκνότητα κυττάρων παρατηρήθηκε επίσης στη **υψηλή ένταση φωτισμού** στην αλατότητα **100ppt** με πλήθος κυττάρων 4.188.889 κύτταρα/mL τη 18^η ημέρα της καλλιέργειας.



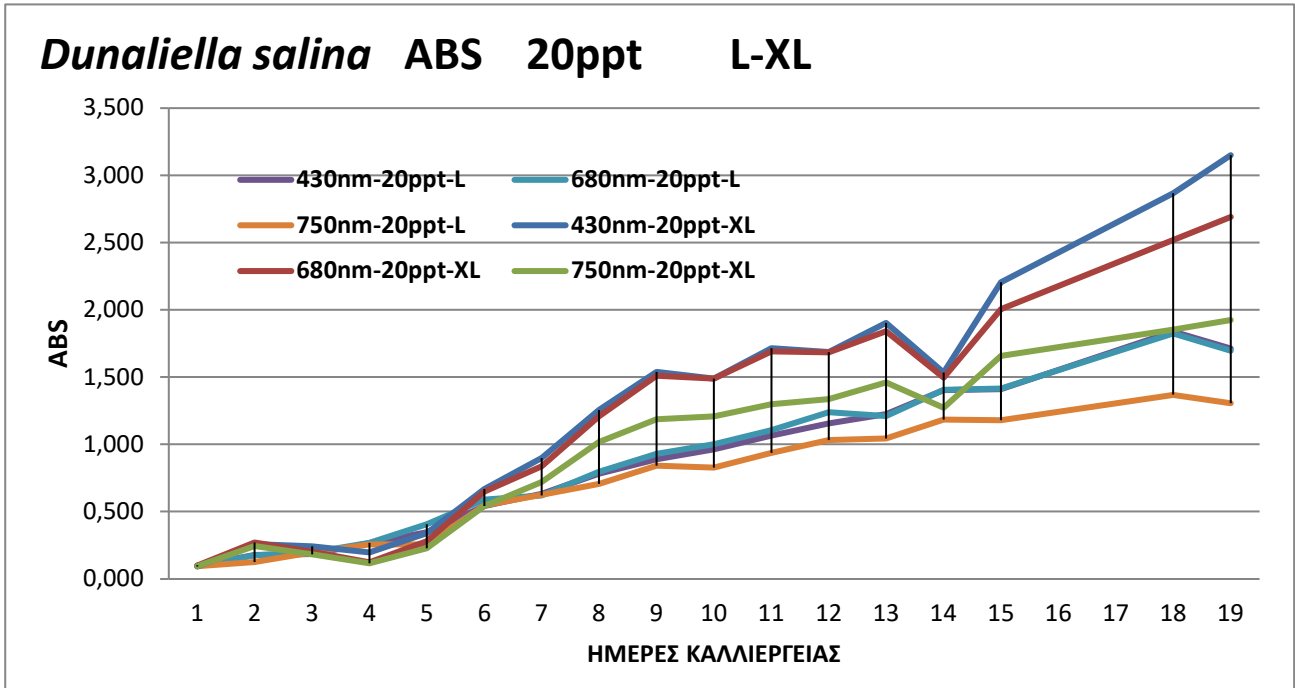
Εικόνα 43. *Dunaliella salina*, μέγιστες τιμές καλλιιεργιών την 18^η ημέρα της καλλιέργειας.



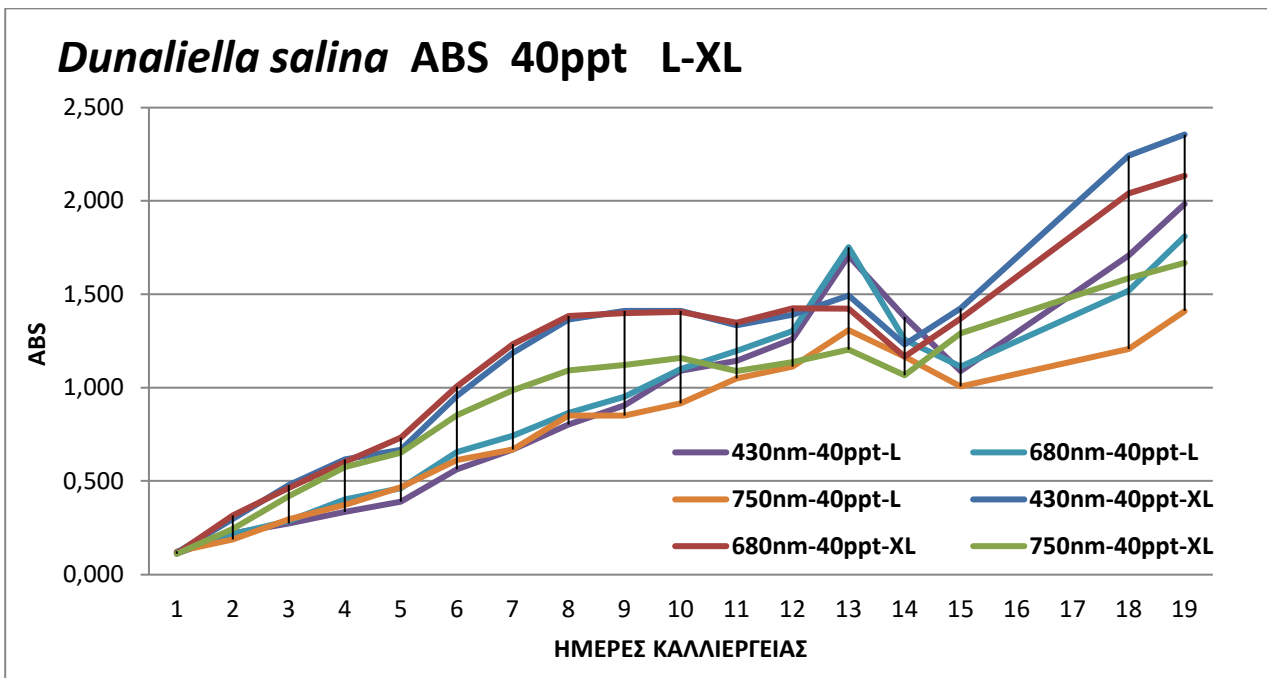
Εικόνα 44. *Dunaliella salina*, μέγιστες πυκνότητες κυττάρων την 18^η ημέρα της καλλιέργειας κατά φθίνουσα σειρά.

β) με οπτική απορρόφηση

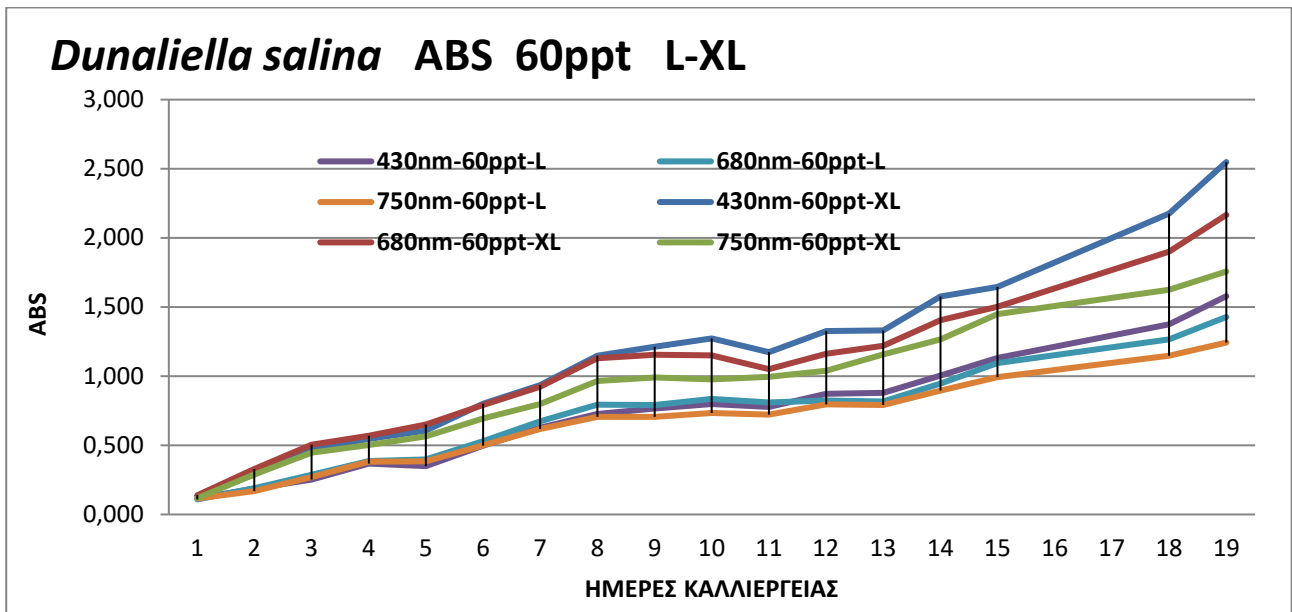
Η οπτική απορρόφηση του *Dunaliella salina* που καλλιεργήθηκε σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού (L-XL) και αλατότητες (20-40-60-100ppt) φαίνεται στις εικόνες 45-48 & 51-52. Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε σε 3 μήκη κύματος 430nm, 680nm και 750nm.



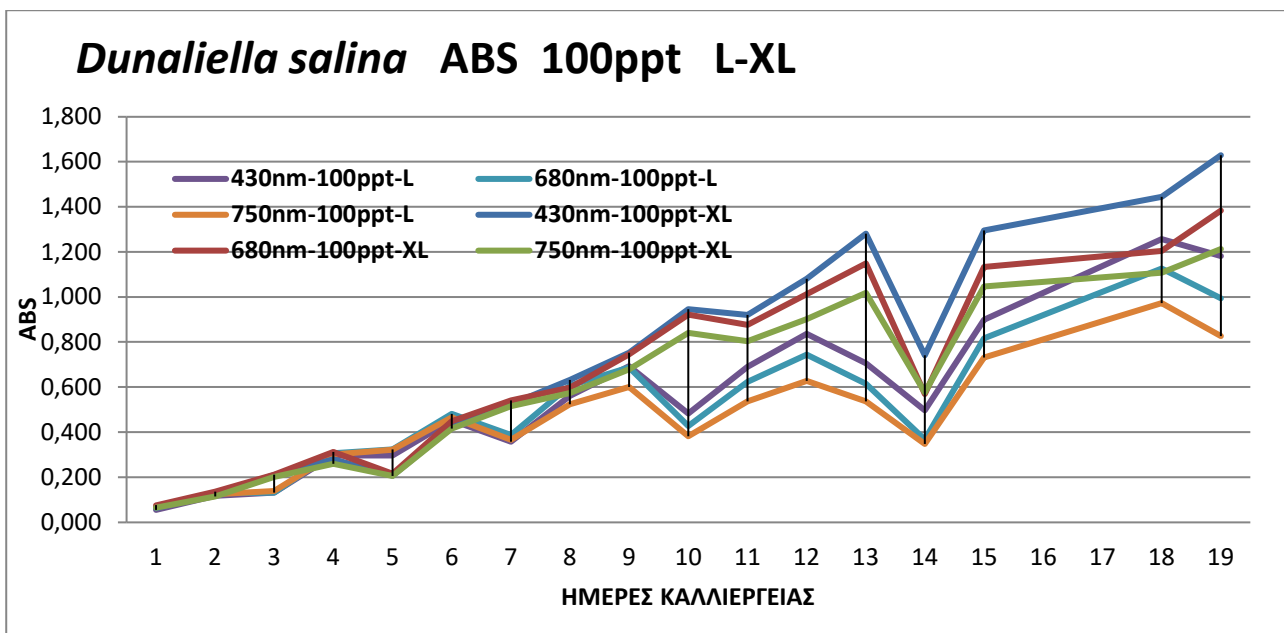
Εικόνα 45. *Dunaliella salina*, Οπτική απορρόφηση σε 430-680-750 nm αλατότητας 20ppt στην χαμηλή (L) και υψηλή ένταση φωτός (XL).



Εικόνα 46. *Dunaliella salina*, Οπτική απορρόφηση σε 430-680-750 nm αλατότητας 40ppt στην χαμηλή (L) και υψηλή ένταση φωτός (XL).



Εικόνα 47. *Dunaliella salina*, Οπτική απορρόφηση σε 430-680-750 nm αλατότητας 60ppt στην χαμηλή (L) και υψηλή ένταση φωτός (XL).



Εικόνα 48. *Dunaliella salina*, Οπτική απορρόφηση σε 430-680-750 nm αλατότητας 100ppt στην χαμηλή (L) και υψηλή ένταση φωτός (XL).

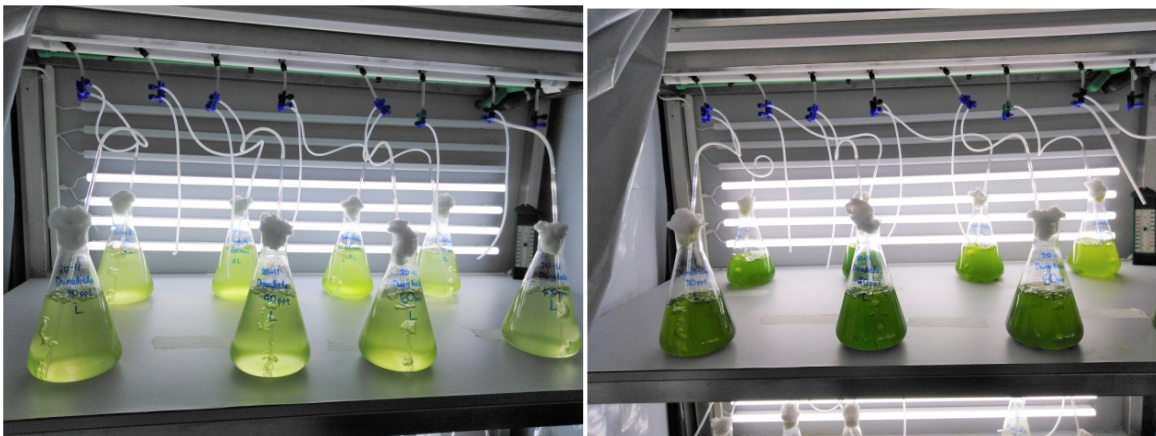
Η οπτική απορρόφηση της καλλιέργειας *Dunaliella salina* στην αλατότητα **20ppt** παρουσίασε μέγιστη τιμή στην υψηλή ένταση φωτισμού σε μήκος κύματος 430nm με τιμή 3,149 τη 19^η ημέρα της καλλιέργειας. Ακολούθησε η απορρόφηση στα 680 nm (2,691) και στα 750nm (1,924) επίσης στις συνθήκες υψηλού φωτισμού την ίδια μέρα (19η). Οι χαμηλότερες τιμές εμφανιστήκαν, κατά φθίνουσα σειρά στα μήκη κύματος 430nm (1,712), 680nm (1,696) και 750nm (1,305) στο δείγμα χαμηλής έντασης φωτισμού.

Στην αλατότητα **40ppt** μέγιστη τιμή απορρόφησης εμφανίστηκε την 19^η ημέρα της καλλιέργειας στην υψηλή ένταση φωτισμού και συγκεκριμένα στο μήκος κύματος 680nm με τιμή 2,355 και

ακολουθήσε το μήκος κύματος 680 nm με τιμή 2,135. Ακολούθησε το μήκος κύματος 430nm της χαμηλής έντασης φωτισμού με τιμή 1,810. Ακολούθησαν κατά φθίνουσα σειρά τα μήκη κύματος 680 nm της χαμηλής έντασης φωτισμού με τιμή 1,669, τα 750nm της υψηλής έντασης φωτισμού με τιμή απορρόφησης 1,410 και τέλος ελάχιστη απορρόφηση εμφανίστηκε στο μήκος κύματος 750nm με τιμή 1,206.

Στα δείγματα με αλατότητα **60ppt** εμφανίστηκε μέγιστη τιμή απορρόφησης στην υψηλή ένταση φωτισμού τη 19^η ημέρα της καλλιέργειας, συγκεκριμένα στο μήκος κύματος 430nm με τιμή 2,549. Ακολούθησε η απορρόφηση στο μήκος κύματος 680nm και 750nm επίσης στο δείγμα της υψηλής έντασης φωτισμού με τιμές 2,167 και 1,757 αντίστοιχα. Τις χαμηλότερες απορροφήσεις εμφάνισε το δείγμα της χαμηλής έντασης φωτισμού ως εξής: 430nm,680nm και 750nm με απορροφήσεις 1,579, 1,429 και 1,242 αντίστοιχα.

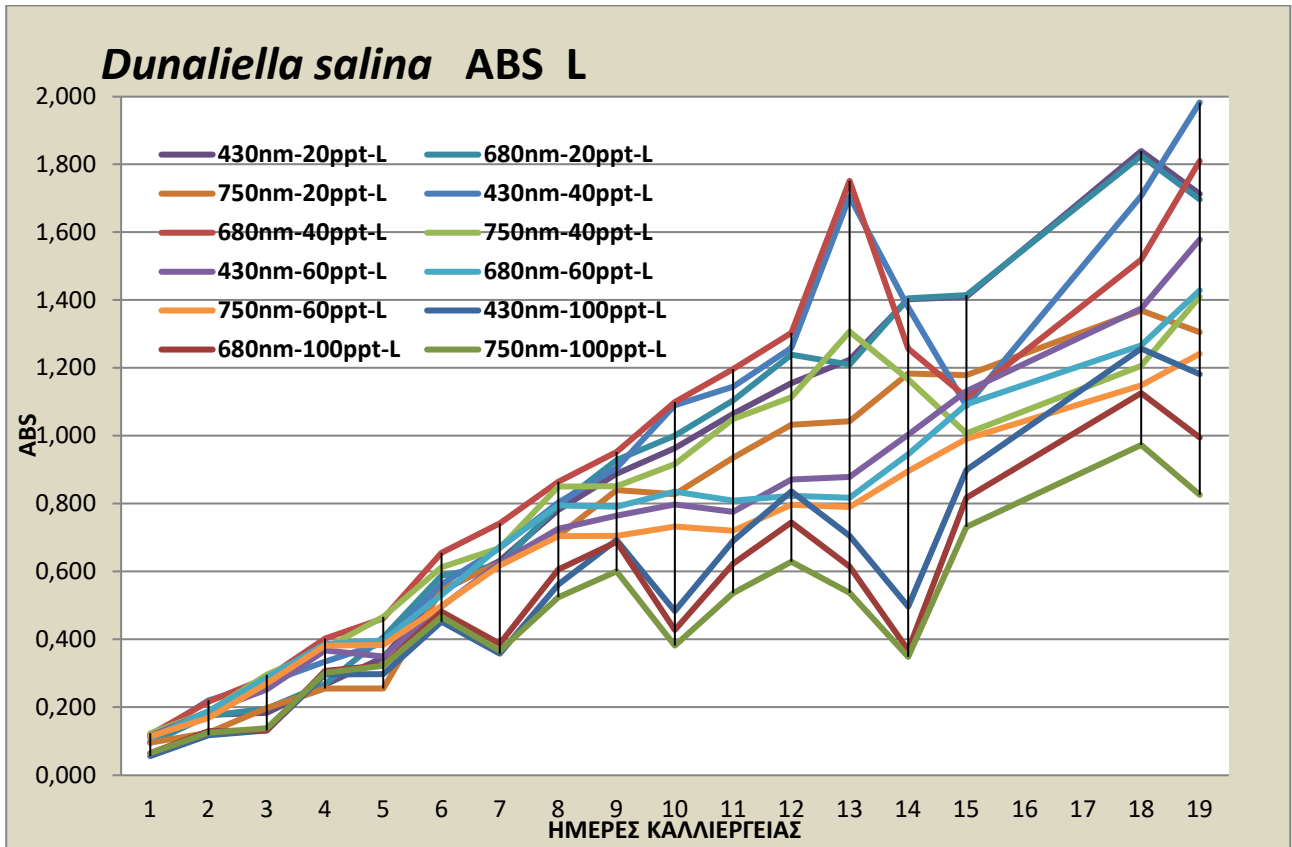
Στα δείγματα με αλατότητα **100ppt** εμφανίστηκε μέγιστη τιμή απορρόφησης στην υψηλή ένταση φωτισμού τη 19^η ημέρα της καλλιέργειας, συγκεκριμένα στο μήκος κύματος 430nm με τιμή 1,629. Ακολούθησε η απορρόφηση στο μήκος κύματος 680nm και 750nm επίσης στο δείγμα της υψηλής έντασης φωτισμού με τιμές 1,384 και 1,214 αντίστοιχα. Τις χαμηλότερες απορροφήσεις εμφάνισε το δείγμα της χαμηλής έντασης φωτισμού ως εξής: 430nm,680nm και 750nm με απορροφήσεις 1,181, 0,994 και 0,826 αντίστοιχα. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα 3 τελευταία μήκη κύματος την 18^η ημέρα της καλλιέργειας παρουσίασαν μέγιστη τιμή απορρόφησης.



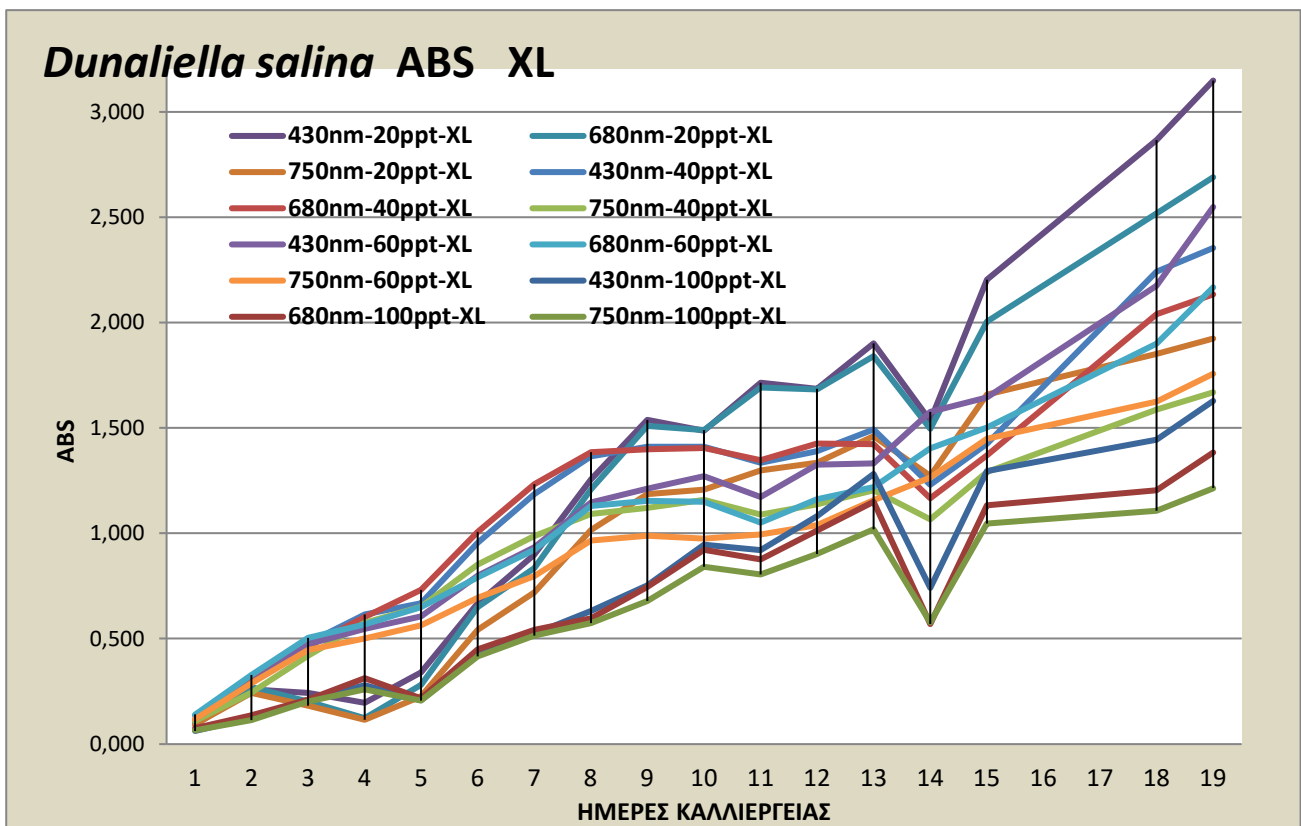
Εικόνα 49. Αριστερά καλλιέργεια του *Dunaliella salina* την 1^η ημέρα και δεξιά την 7^η ημέρα.



Εικόνα 50. Αριστερά καλλιέργεια του *Dunaliella salina* την 12^η ημέρα κα δεξιά την 15^η ημέρα της καλλιέργειας.



Εικόνα 51. *Dunaliella salina*, Οπτική απορρόφηση σε 430-680-750 nm αλατοτήτων 20-40-60-100ppt στην χαμηλή ένταση φωτισμού (L).



Εικόνα 52. *Dunaliella salina*, Οπτική απορρόφηση σε 430-680-750 nm αλατοτήτων 20-40-60-100ppt στην υψηλή ένταση φωτισμού (XL).

Στη **χαμηλή** και **υψηλή** ένταση φωτισμού η μέγιστη τιμή απορρόφησης εμφανίστηκε την 19^η ημέρα της καλλιέργειας και τα δείγματα με τα αντίστοιχα μήκη κύματος και τις τιμές τους παρουσιάζονται στους **πίνακες 12 & 13** κατά φθίνουσα σειρά αντίστοιχα.

Πίνακας 12. *Dunaliella salina*, Τιμές οπτικής απορρόφησης στη χαμηλή ένταση φωτισμού (L) τη 19^η ημέρα των καλλιεργειών κατά φθίνουσα σειρά.

Δείγμα-Μήκος κύματος-L	Τιμή Απορρόφησης
40ppt-L-430nm	1,983
40ppt-L-680nm	1,810
20ppt-L-430nm	1,712
20ppt-L-680nm	1,696
60ppt-L-430nm	1,579
60ppt-L-680nm	1,429
40ppt-L-750nm	1,410
20ppt-L-750nm	1,305
60ppt-L-750nm	1,242
100ppt-L-430nm	1,181
100ppt-L-680nm	0,994
100ppt-L-750nm	0,826

Πίνακας 13. *Dunaliella salina*, Τιμές οπτικής απορρόφησης στην υψηλή ένταση φωτισμού (XL) τη 19^η ημέρα των καλλιεργειών κατά φθίνουσα σειρά.

Δείγμα-Μήκος κύματος-XL	Τιμή Απορρόφησης
20ppt-XL-430	3,149
20ppt-XL-680	2,691
60ppt-XL-430	2,549
40ppt-XL-430	2,355
60ppt-XL-680	2,167
40ppt-XL-680	2,135
20ppt-XL-750	1,924
60ppt-XL-750	1,757
40ppt-XL-750	1,669
100ppt-XL-430	1,629
100ppt-XL-680	1,384
100ppt-XL-750	1,214

Όλες οι απορροφήσεις των δειγμάτων της 19^{ης} ημέρας της καλλιέργειας παρουσιάζονται στον **πίνακα 14** κατά φθίνουσα σειρά.

Πίνακας 14. *Dunaliella salina*, απορροφήσεις των δειγμάτων τη 19^η ημέρα της καλλιέργειας κατά φθίνουσα σειρά.

Ημέρα Καλλιέργειας	Αλατότητα (ppt)	Ένταση Φωτισμού	Μήκος Κύματος	Τιμή Απορρόφησης
19η	20	XL	430	3,149
19η	20	XL	680	2,691
19η	60	XL	430	2,549
19η	40	XL	430	2,355
19η	60	XL	680	2,167
19η	40	XL	680	2,135
19η	40	L	430	1,983
19η	20	XL	750	1,924
19η	40	L	680	1,810
19η	60	XL	750	1,757
19η	20	L	430	1,712
19η	20	L	680	1,696
19η	40	XL	750	1,669
19η	100	XL	430	1,629
19η	60	L	430	1,579
19η	60	L	680	1,429
19η	40	L	750	1,410
19η	100	XL	680	1,384
19η	20	L	750	1,305
19η	60	L	750	1,242
19η	100	XL	750	1,214
19η	100	L	430	1,181
19η	100	L	680	0,994
19η	100	L	750	0,826

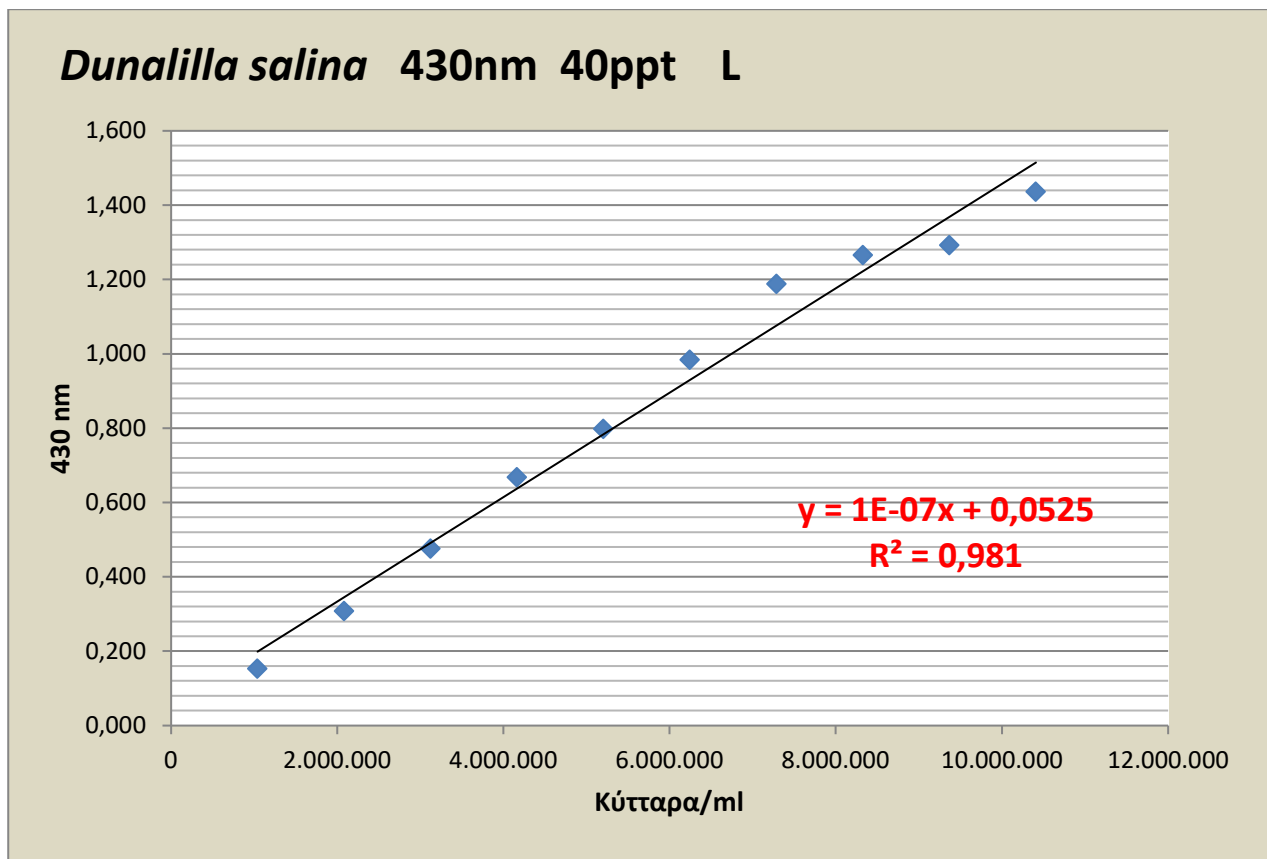
Μεταξύ όλων των δειγμάτων της καλλιέργειας του *Dunaliella salina* **μέγιστη** τιμή απορρόφησης εμφανίστηκε στο δείγμα αλατότητας **20ppt** στην **υψηλή** ένταση φωτισμού στο μήκος κύματος **430nm** με τιμή 3,149. Την **ελάχιστη** απορρόφηση είχε το δείγμα αλατότητας **100ppt** της **χαμηλής** έντασης φωτισμού στο μήκος κύματος **750nm** με τιμή 0,826.

2.2 Προσδιορισμός καμπύλης βαθμονόμησης

Παρακάτω στις εικόνες 53, 54 και 55 παρουσιάζονται οι καμπύλες βαθμονόμησης στα 430nm, 680nm και 750nm μήκη κύματος, που προέκυψαν από τις μετρήσεις της φιάλης 40ppt L την 15^η ημέρα της καλλιέργειας (πίνακας 15).

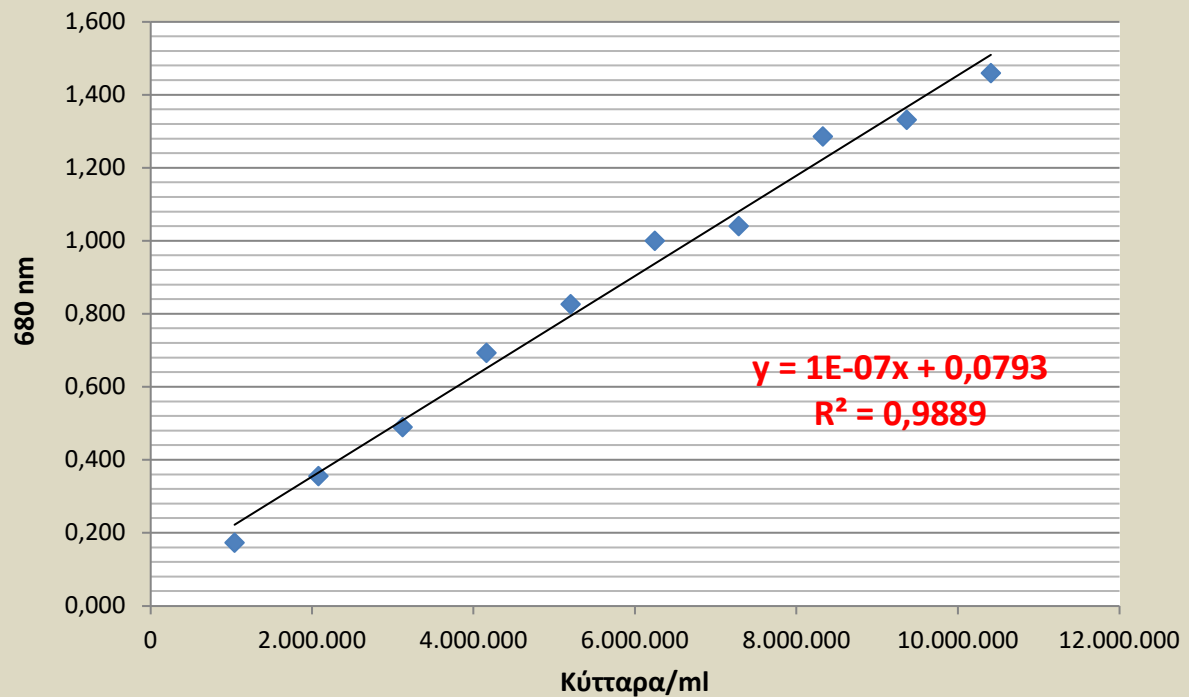
Πίνακας 15. *Dunaliella salina*, πυκνότητα κύτταρων και οπτική απορρόφηση σε 430nm, 680nm και 750nm.

	Κύτταρα/mL	430nm	680nm	750nm
10mL δείγματος	10.406.667	1,436	1,460	1,237
9:1	9.366.000	1,292	1,332	1,187
8:2	8.325.334	1,266	1,287	1,091
7:3	7.284.667	1,188	1,041	0,997
6:4	6.244.000	0,984	1,001	0,895
5:5	5.203.334	0,798	0,827	0,775
4:6	4.162.667	0,668	0,694	0,643
3:7	3.122.000	0,476	0,490	0,509
2:8	2.081.333	0,308	0,356	0,359
1:9	1.040.667	0,153	0,174	0,179



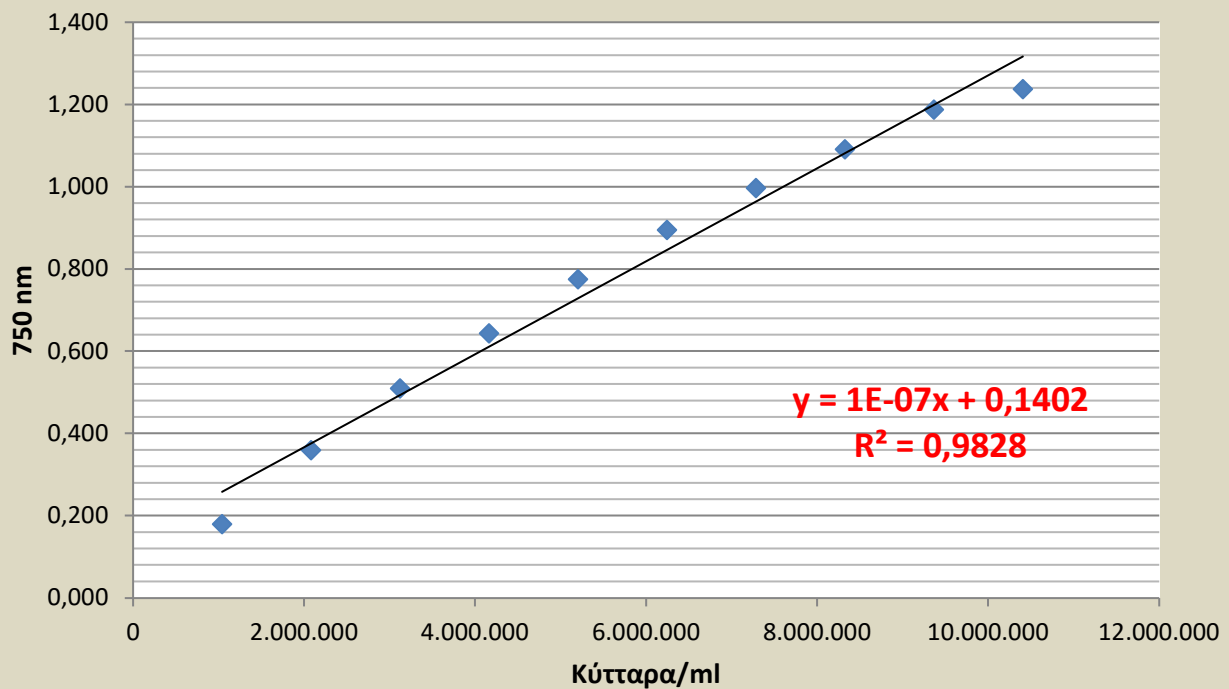
Εικόνα 53. *Dunaliella salina* καμπύλη βαθμονόμησης- συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 430nm και πυκνότητας κυττάρων της αλατότητας 40ppt την χαμηλή ένταση φωτισμού (L).

Dunaliella salina 680nm 40ppt L



Εικόνα 54. *Dunaliella salina* καμπύλη βαθμονόμησης- συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 680nm και πυκνότητας κυττάρων της αλατότητας 40ppt την χαμηλή ένταση φωτισμού (L).

Dunaliella salina 750nm 40ppt L



Εικόνα 55. *Dunaliella salina* καμπύλη βαθμονόμησης- συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 750nm και πυκνότητας κυττάρων της αλατότητας 40ppt την χαμηλή ένταση φωτισμού (L).

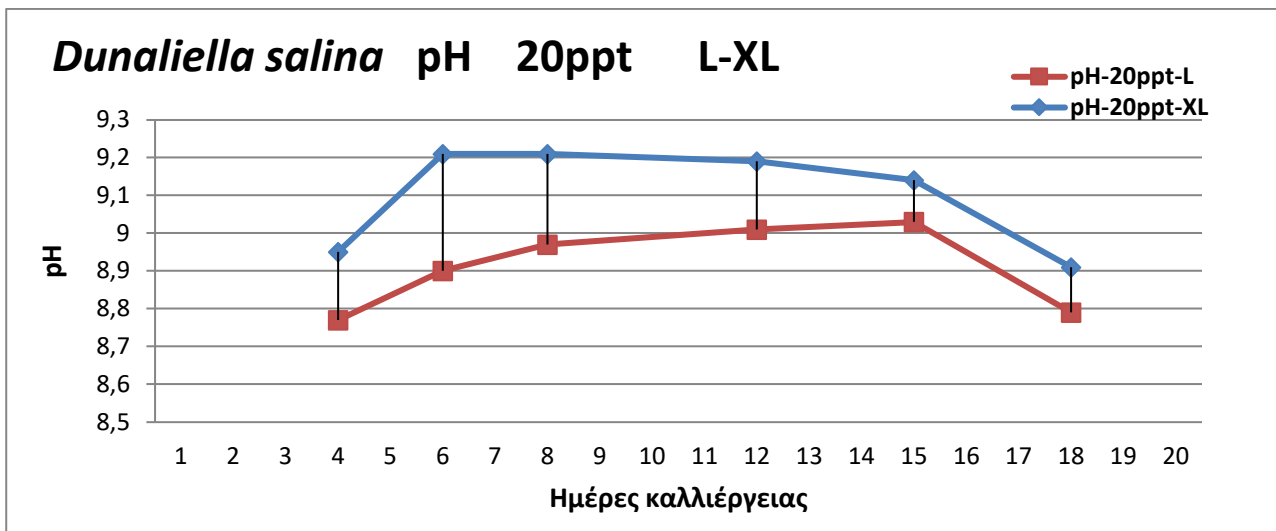
Οι συσχετίσεις είναι γραμμικές και οι μεταβλητές είναι θετικά γραμμικά συσχετισμένες όπως προκύπτει από τους αντίστοιχους θετικούς συντελεστές συσχέτισης Pearson οι οποίοι παρουσιάζονται στον **πίνακα 16**.

Πίνακας 16. *Dunaliella salina*, εξισώσεις συσχέτισης και συντελεστής συσχέτισης R^2 .

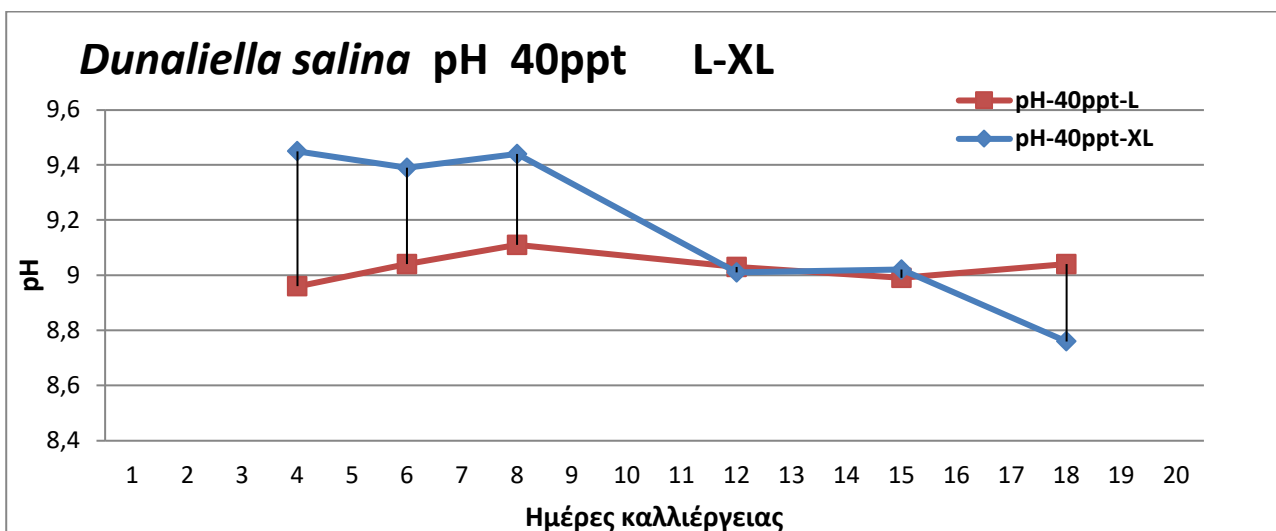
Μήκος κύματος (nm)	Εξίσωση γραμμικής συσχέτισης	Συντελεστής Pearson R^2
430nm	$1E-07X+0,0525$	0,981
680nm	$1E-07X+0,0793$	0,9889
750nm	$1E-07X+0,1402$	0,9828

2.3 Προσδιορισμός pH

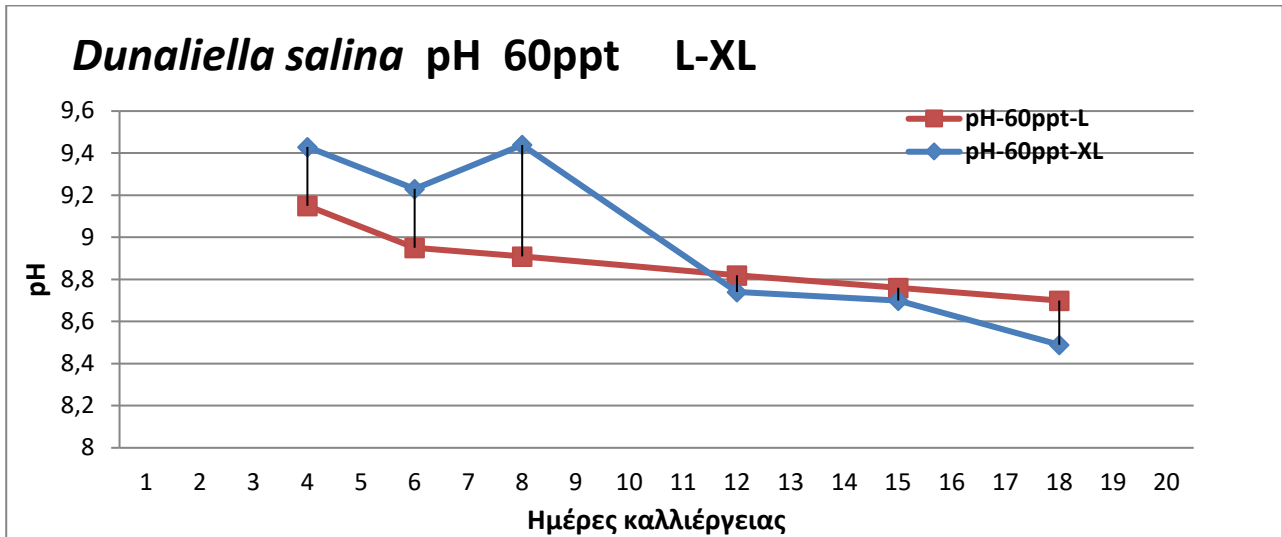
Οι μετρήσεις του pH δεν γίνονταν καθημερινά γιατί το pH δεν μεταβάλλεται τόσο γρήγορα. Οι μετρήσεις παρουσιάζονται στις **εικόνες 56-61**.



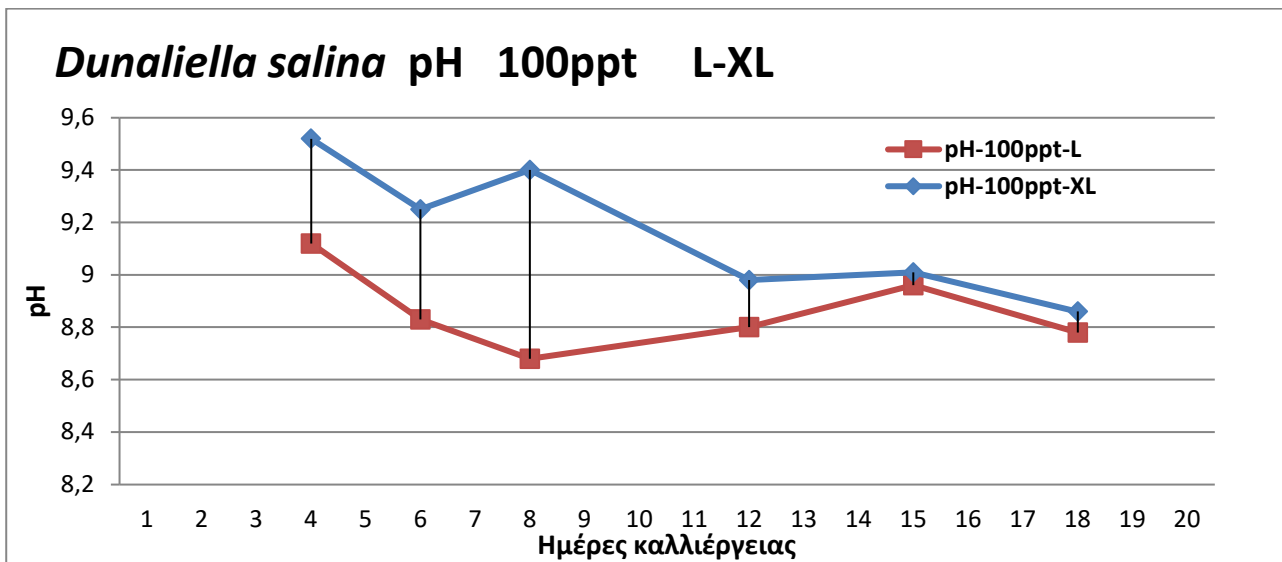
Εικόνα 56. *Dunaliella salina*, τιμές pH αλατότητας 20 ppt στις δυο εντάσεις φωτισμού (L-XL).



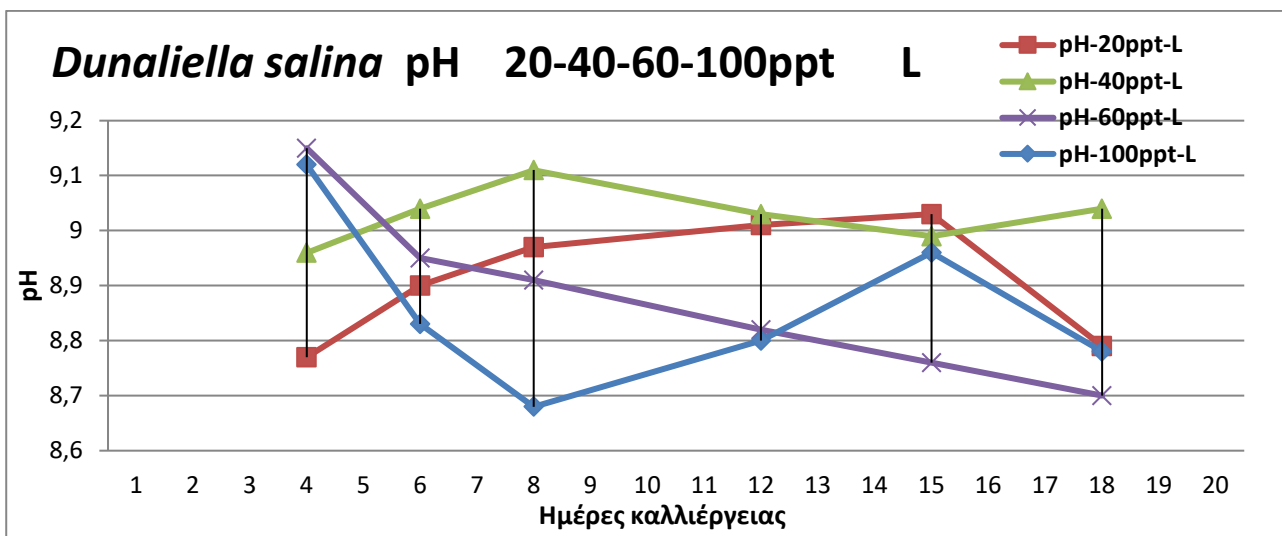
Εικόνα 57. *Dunaliella salina*, τιμές pH αλατότητας 40 ppt στις δυο εντάσεις φωτισμού (L-XL).



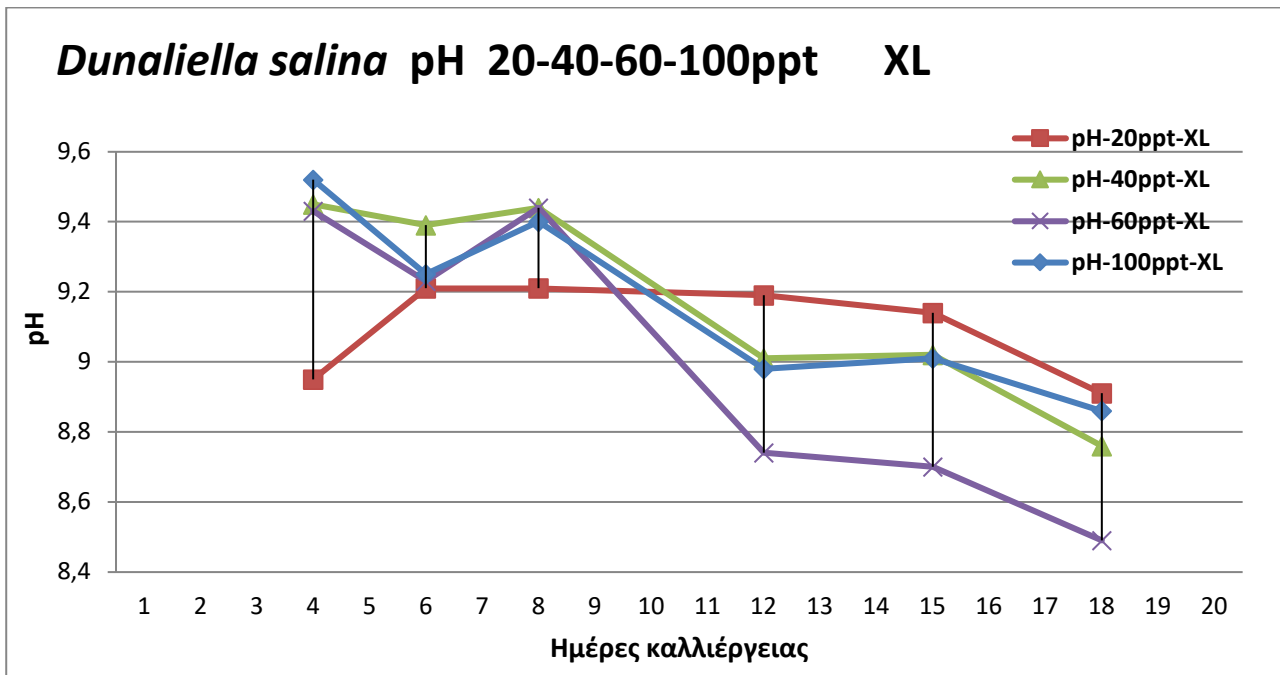
Εικόνα 58. *Dunaliella salina*, τιμές pH αλατότητας 60 ppt στις δυο εντάσεις φωτισμού (L-XL).



Εικόνα 59. *Dunaliella salina*, τιμές pH αλατότητας 100 ppt στις δυο εντάσεις φωτισμού (L-XL).



Εικόνα 60. *Dunaliella salina*, τιμές pH αλατότητες 20-40-60-100 ppt στη χαμηλή ένταση φωτισμού (L).



Εικόνα 61. *Dunaliella salina*, τιμές pH αλατότητας 20-40-60-100 ppt στη υψηλή ένταση φωτισμού (XL).

Στα δείγματα αλατότητας **20ppt** το δείγμα της υψηλής έντασης φωτισμού είχε μεγαλύτερες τιμές pH. Η μέγιστη τιμή pH της χαμηλής έντασης φωτισμού εμφανίστηκε τη 15^η ημέρα με τιμή 9,03 και για το δείγμα της υψηλής έντασης φωτισμού την 6^η ημέρα με τιμή 9,21.

Στα δείγματα αλατότητας **40ppt** το δείγμα της υψηλής έντασης φωτισμού είχε μέχρι και την 8^η ημέρα υψηλότερη τιμή. Στη συνέχεια (12^η – 15^η ημέρα) οι τιμές των 2 εντάσεων σχεδόν ταυτίστηκαν, αλλά τη 18^η ημέρα (τέλος καλλιέργειας) το δείγμα της χαμηλής έντασης φωτός παρουσίασε τιμή μεγαλύτερη εκείνης του δείγματος της υψηλής έντασης φωτισμού. Ελάχιστη τιμή εμφάνισε το δείγμα υψηλής έντασης φωτισμού κατά τη 18^η ημέρα με τιμή pH=8,76.

Στα δείγματα της αλατότητας **60ppt** το δείγμα υψηλής έντασης φωτισμού είχε υψηλότερες τιμές από το δείγμα της χαμηλής έντασης φωτισμού μέχρι την 8^η ημέρα όπου εμφάνισε και τη μέγιστη τιμή του pH=9,44. Το δείγμα της υψηλής έντασης φωτισμού είχε παρόμοιες τιμές με το δείγμα της χαμηλότερης έντασης φωτισμού. Τη 18^η ημέρα (τέλος καλλιέργειας) το δείγμα υψηλής έντασης φωτισμού ήταν μικρότερο από εκείνο της χαμηλής έντασης φωτισμού με τιμή 8,49, που αποτέλεσε και την ελάχιστη τιμή μεταξύ των 2 αυτών δειγμάτων στο σύνολο της καλλιέργειας.

Στα δείγματα αλατότητας **100ppt** υψηλότερες τιμές pH εμφανίζονται στο δείγμα της υψηλής έντασης φωτισμού καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας. Μέγιστη τιμή εμφανίστηκε την 4^η ημέρα στο δείγμα υψηλής έντασης φωτισμού και ελάχιστο pH εμφάνισε το δείγμα χαμηλής έντασης φωτισμού την 8^η ημέρα με τιμή 8,68.

Στη **χαμηλή ένταση** φωτισμού οι τιμές του pH κυμάνθηκαν από 8,68, η ελάχιστη, στο δείγμα αλατότητας 100ppt την 8^η ημέρα της καλλιέργειας έως 9,15, η μέγιστη, για το δείγμα αλατότητας 60ppt την 4^η ημέρα της καλλιέργειας.

Στην **υψηλή ένταση** φωτισμού οι τιμές του pH κυμάνθηκαν από 8,49, η ελάχιστη, στο δείγμα αλατότητας 100ppt έως 9,52 η μέγιστη στο δείγμα αλατότητας 100ppt.

2.4 Προσδιορισμός Εδικού Ρυθμού Αύξησης (μ) και Χρόνου Γενεάς (tg) της Καλλιέργειας

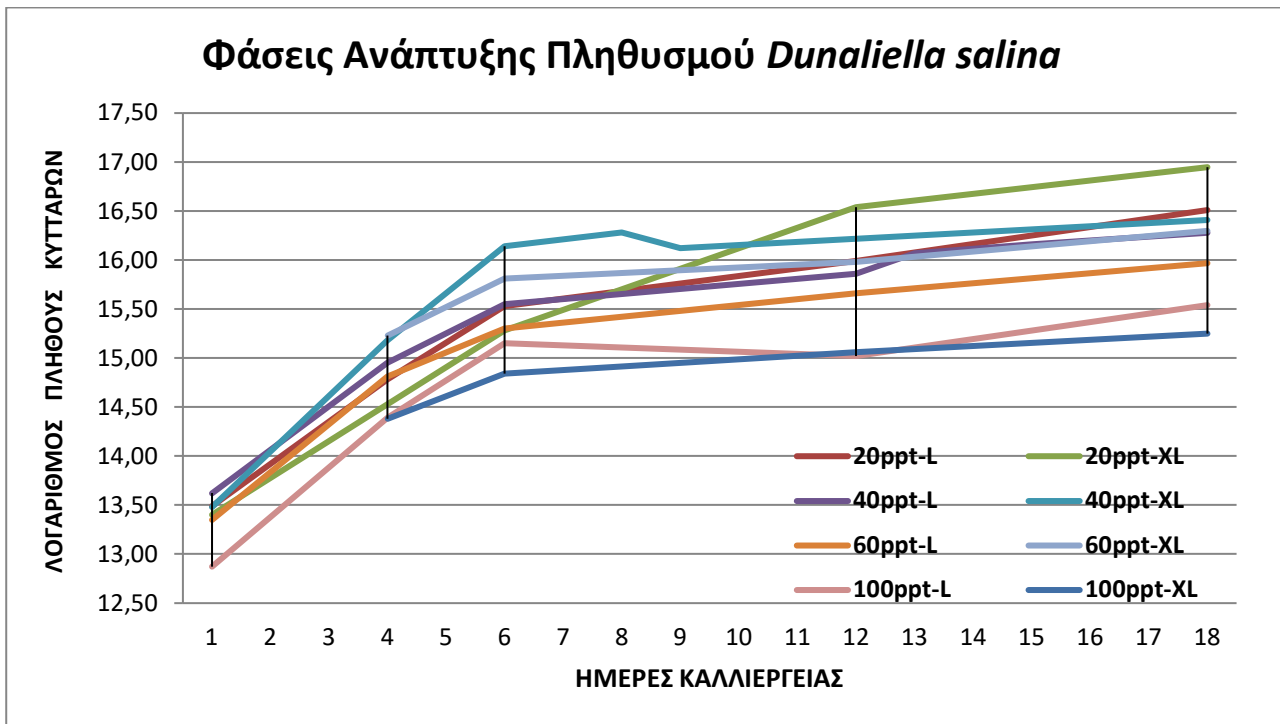
Από τους **πίνακες 17 & 18** προκύπτουν τα διαγράμματα της **εικόνας 62** που μας δείχνουν τις φάσεις αύξησης των πληθυσμών των καλλιεργειών του *Dunaliella salina*.

Πίνακας 17. *Dunaliella salina*, λογάριθμοι πυκνότητας πληθυσμών αλατότητας 20ppt και 40ppt.

ΗΜΕΡΕΣ ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑ Σ	20ppt-L		20ppt-XL		40ppt-L		40ppt-XL	
	ΚΥΤΤΑΡΑ /mL	LN	ΚΥΤΤΑΡΑ /mL	LN	ΚΥΤΤΑΡΑ /mL	LN	ΚΥΤΤΑΡΑ /mL	LN
1	723.333	13,49	661.667	13,40	820.000	13,62	713.333	13,48
2								
3								
4	2.615.000	14,78			3.119.444	14,95	3.911.111	15,18
5								
6	5.558.333	15,53	4.341.667	15,28	5.683.333	15,55	10.200.000	16,14
7								
8							11.706.667	16,28
9							10.044.444	16,12
10								
11								
12	8.800.000	15,99	15.233.333	16,54	7.688.889	15,86		
13					9.520.000	16,07		
14								
15					10.406.667	16,16		
16								
17								
18	14.863.333	16,51	23.006.667	16,95	11.815.556	16,28	13.405.000	16,41

Πίνακας 18. *Dunaliella salina*, λογάριθμοι πυκνότητας πληθυσμών αλατότητας 60ppt και 100ppt.

ΗΜΕΡΕΣ ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑ Σ	60ppt-L		60ppt-XL		100ppt-L		100ppt-XL	
	ΚΥΤΤΑΡΑ /mL	LN	ΚΥΤΤΑΡΑ /mL	LN	ΚΥΤΤΑΡΑ /mL	LN	ΚΥΤΤΑΡΑ /mL	LN
1	625.000	13,35			386.667	12,87		
2-3								
4	2.713.889	14,81	4.120.000	15,23	1.776.667	14,39	1.766.667	14,38
5								
6	4.427.778	15,30	7.339.444	15,81	3.800.000	15,15	2.791.667	14,84
7-11								
12	6.355.556	15,66	8.700.000	15,98	3.322.222	15,02	3.455.556	15,06
13-17								
18	8.666.667	15,97	11.988.889	16,30	5.590.000	15,54	4.188.889	15,25



Εικόνα 62. Φάσεις ανάπτυξης των καλλιεργειών *Dunaliella salina* σε όλες τις συνθήκες αλατότητας και φωτισμού.

Από τις καμπύλες αύξησης των φυτοπλαγκτονικών καλλιεργειών προκύπτει ότι οι πληθυσμοί όλων των δειγμάτων έχουν φτάσει στη στατική τους φάση.

Στον **πίνακα 19** φαίνονται οι ημέρες από τις οποίες στη συνέχεια υπολογίστηκε ο ειδικός ρυθμός αύξησης (μ) και ο χρόνος γενεάς (tg).

Πίνακας 19. *Dunaliella salina*, ρυθμός αύξησης και χρόνος γενεάς καλλιεργειών κατά φθίνουσα σειρά.

Αλατότητα (ppt)	Ένταση Φωτισμού	Ημέρες Εκθετικής Αύξησης	Ρυθμός Αύξησης μ	Χρόνος γενεάς tg
20	XL	4-12	0,41	1,69
40	XL	4-9	0,19	3,69
20	L	4-12	0,15	4,58
40	L	4-12	0,11	6,09
60	L	4-12	0,11	6,52
60	XL	4-12	0,09	7,39
100	XL	4-12	0,09	8,15
100	L	4-12	0,08	8,80

Στα δείγματα αλατότητας **20ppt** μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης είχε το δείγμα της υψηλής έντασης φωτισμού με τιμή 0,41. Ομοίως στο δείγμα αλατότητας **40ppt** με ρυθμό αύξησης 0,19. Στο δείγμα αλατότητας **60ppt** μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης είχε το δείγμα στη χαμηλή ένταση φωτισμού με ρυθμό αύξησης $\mu = 0,11$. Στην αλατότητα 100ppt το δείγμα της υψηλής έντασης φωτισμού είχε μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης με $\mu = 0,09$.

Μεταξύ των δειγμάτων της **υψηλής έντασης φωτισμού** την υψηλότερη τιμή είχε το δείγμα αλατότητας 20ppt με $\mu=0,41$.

Μεταξύ των δειγμάτων της **χαμηλής έντασης φωτισμού** την υψηλότερη τιμή είχε το δείγμα 20ppt με ρυθμό αύξησης 0,15

Οι μικρότερες τιμές στην χαμηλή και υψηλή ένταση φωτισμού παρατηρηθήκαν στα δείγματα αλατότητας 100ppt με $\mu=0,08$ και 100ppt με $\mu=0,09$ αντίστοιχα.

Μεταξύ όλων των δειγμάτων **μέγιστο** ειδικό ρυθμό αύξησης εμφάνισε το δείγμα αλατότητας **20ppt** της **υψηλής έντασης** φωτισμού με $\mu=0,41$ και χρόνο γενεάς 1,69 ημέρες και **ελάχιστο** ειδικό ρυθμό αύξησης εμφάνισε το δείγμα αλατότητας **100ppt** της **χαμηλής έντασης** φωτισμού με $\mu=0,08$ και χρόνο γενεάς 8,80 ημέρες.

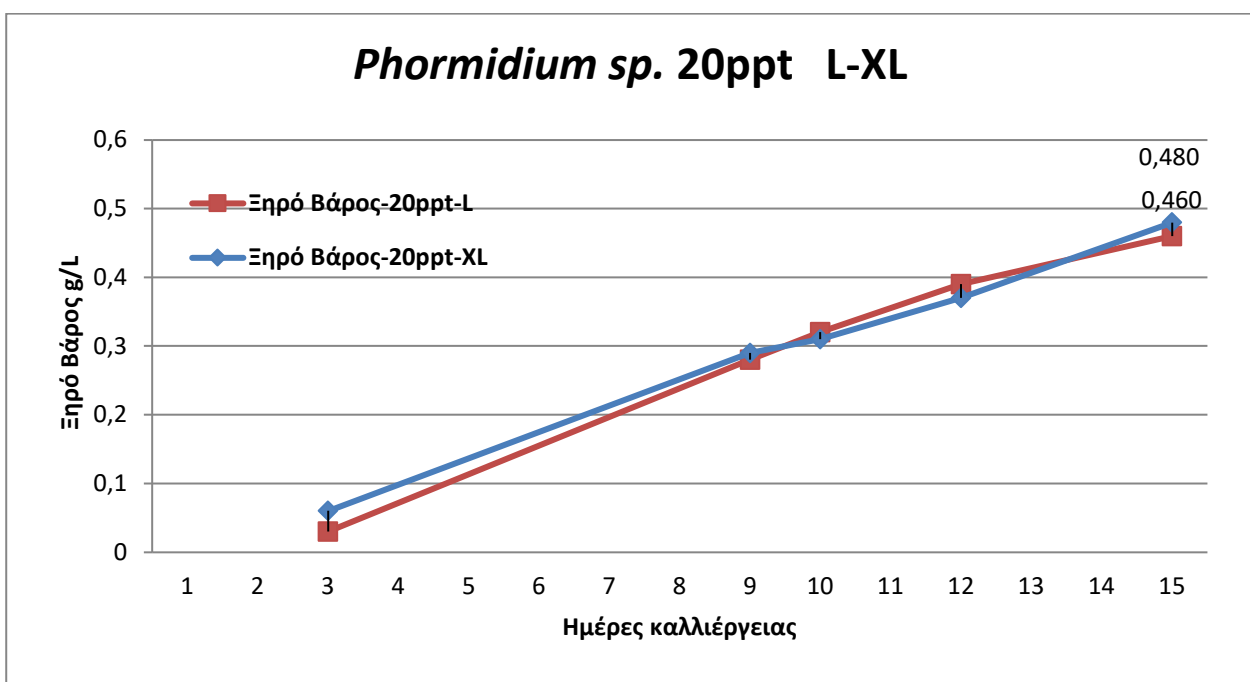
3. *Phormidium sp.*

3.1 Προσδιορισμός πυκνότητας καλλιέργειας.

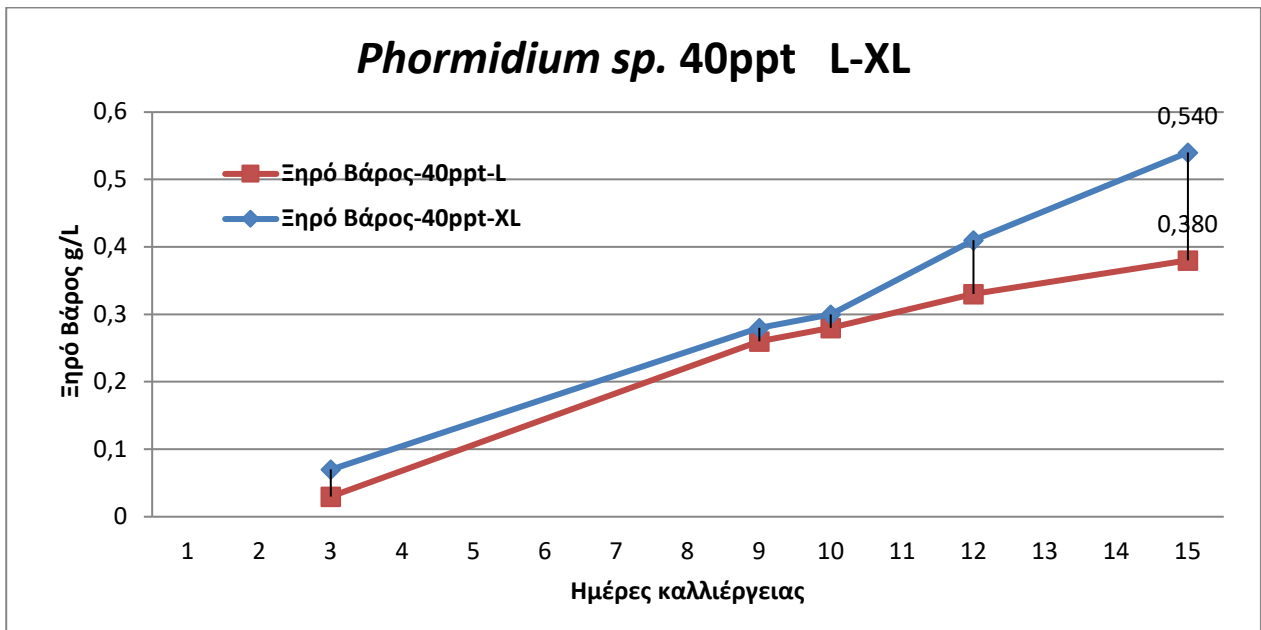
α) με μέτρηση Ξηρού Βάρους

Ο προσδιορισμός του Ξηρού Βάρους προέκυψε από τη ζύγιση 100mL δείγματος, τα οποία είχαν τοποθετηθεί σε κλίβανο προκειμένου να εξατμιστεί το φορμικό αμμώνιο, που χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία του φιλτραρίσματος των δειγμάτων και το νερό.

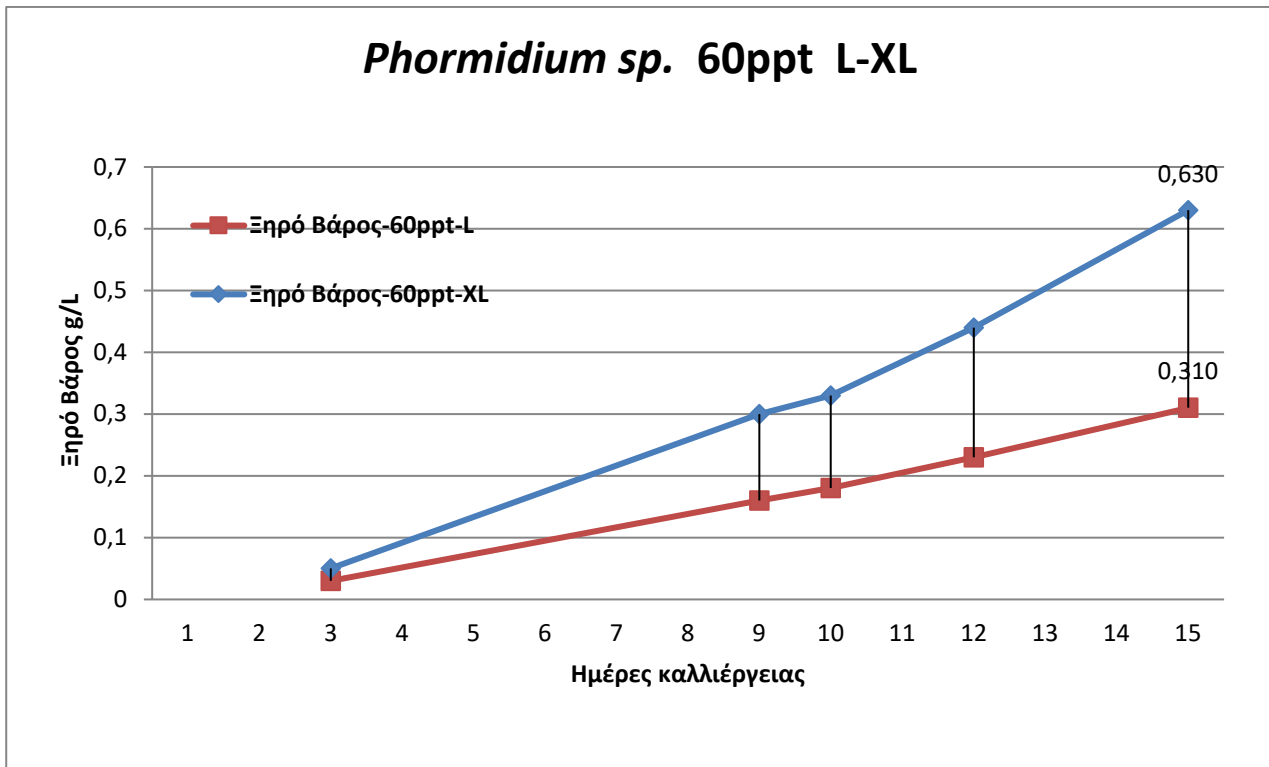
Τα Ξηρά Βάρη του *Phormidium sp.* που καλλιεργήθηκε σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού και αλατότητας φαίνεται στις **εικόνες 63-68**.



Εικόνα 63. *Phormidium sp.*, Ξηρό Βάρος g/L αλατότητας 20 ppt στις δυο εντάσεις φωτισμού (L-XL).



Εικόνα 64. *Phormidium sp.*, Ξηρό Βάρος g/L αλατότητας 40 ppt στις δυο εντάσεις φωτισμού (L-XL)

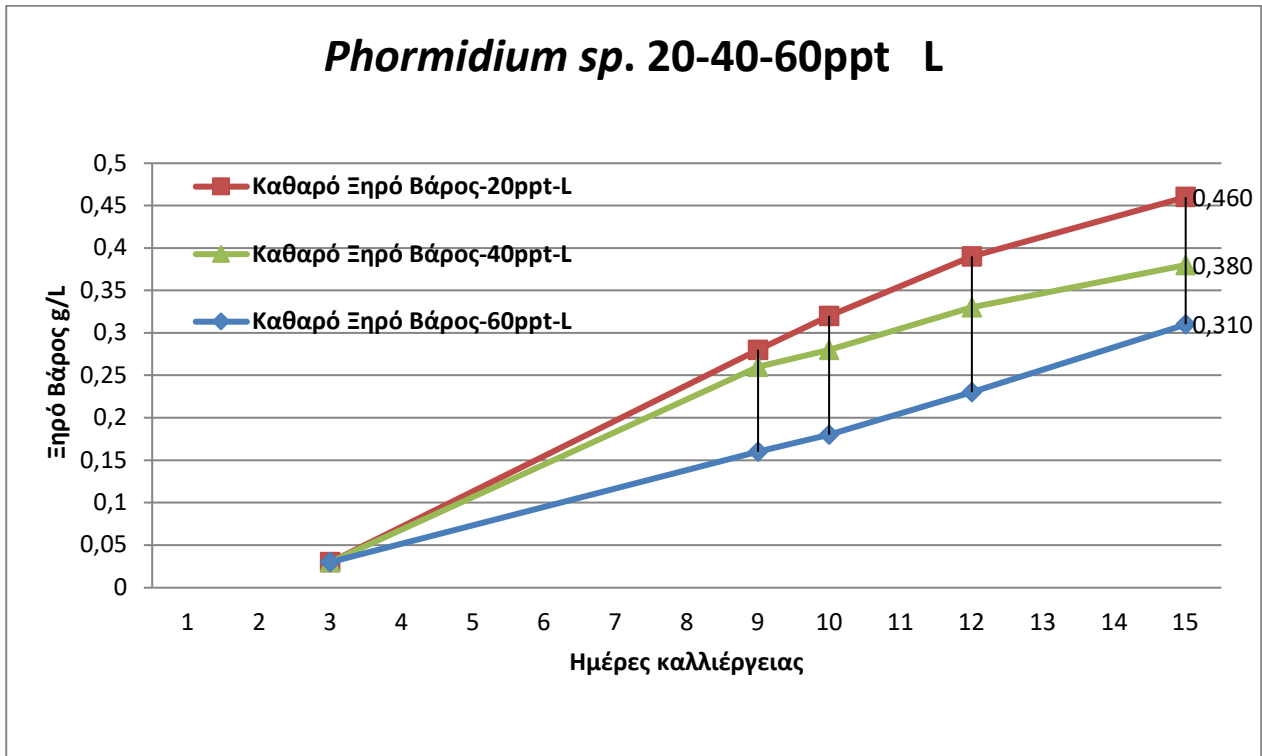


Εικόνα 65. *Phormidium sp.*, Ξηρό Βάρος g/L αλατότητας 60 ppt στις δυο εντάσεις φωτισμού (L-XL).

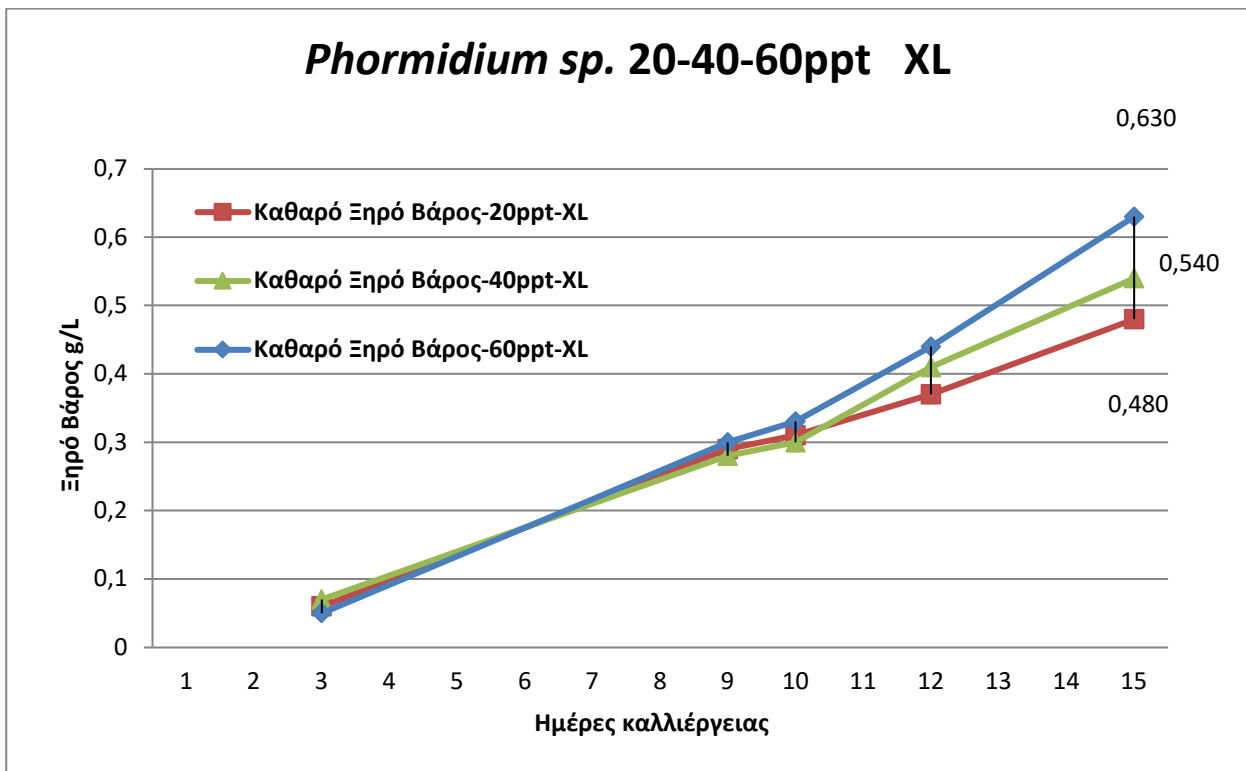
Στο δείγμα με την αλατότητα **20ppt** μέγιστο Ξηρό Βάρος εμφανίστηκε στην **υψηλή ένταση φωτισμού** με τιμή 0,48 g/L έναντι του χαμηλού φωτισμού με 0,46 g/L κατά την 15^η ημέρα της καλλιέργειας.

Στην αλατότητα **40ppt** μέγιστο Ξηρό Βάρος παρουσιάστηκε στην **υψηλή ένταση φωτισμού** με 0,54 g/L κατά την 15^η ημέρα της καλλιέργειας. Στη χαμηλή ένταση φωτός το Ξ.Β. ήταν 0,38 g/L, την ίδια ημέρα.

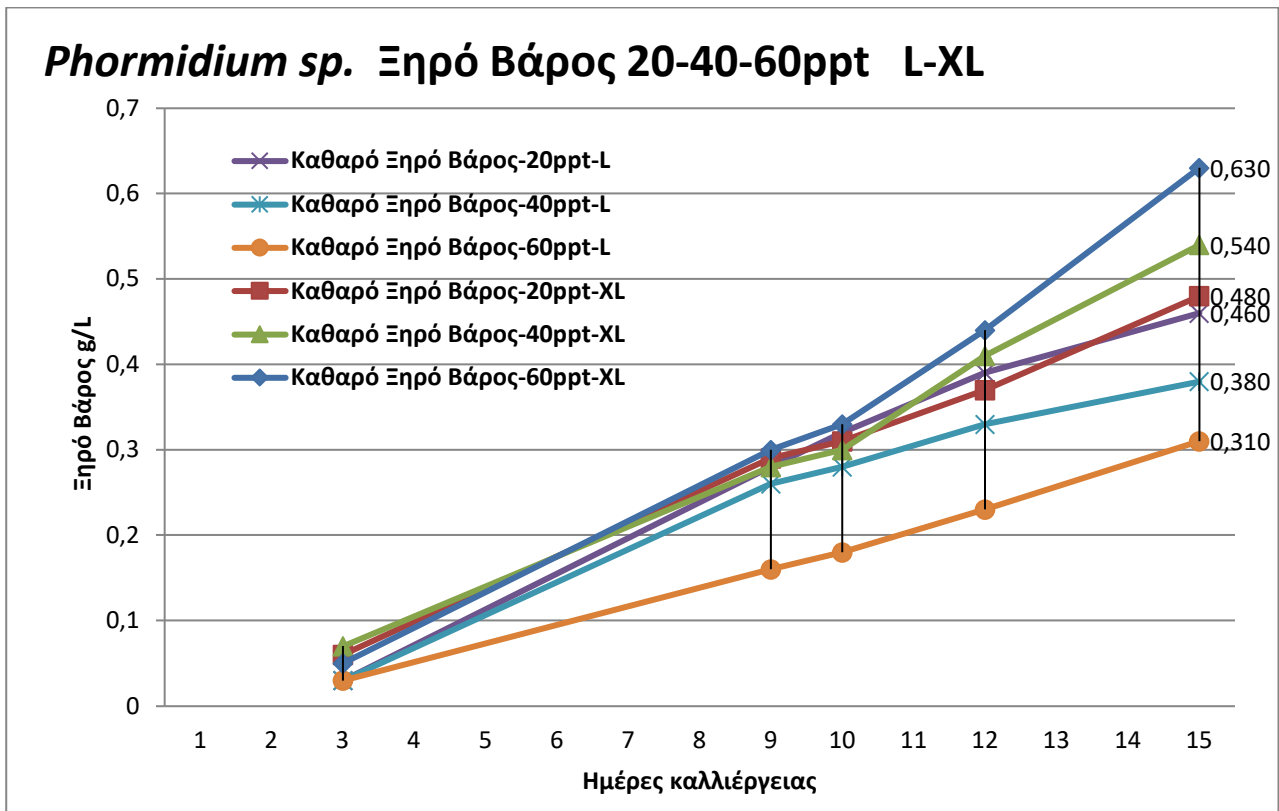
Στην αλατότητα **60ppt** μέγιστο Ξηρό Βάρος εμφανίστηκε και πάλι στην **υψηλή ένταση φωτισμού** με τιμή 0,63 g/L την 15^η ημέρα της καλλιέργειας. Το δείγμα στη χαμηλή ένταση φωτισμού τη συγκεκριμένη ημέρα είχε τιμή 0,31 g/L..



Εικόνα 66. *Phormidium sp.*, Ξηρό Βάρος g/L αλατότητας 20-40-60 ppt στη χαμηλή ένταση φωτισμού (L).



Εικόνα 67. *Phormidium sp.*, Ξηρό Βάρος g/L αλατότητας 20-40-60 ppt στην υψηλή ένταση φωτισμού (XL).



Εικόνα 68. *Phormidium sp.*, Ξηρό Βάρος g/L αλατότητας 20-40-60ppt στη χαμηλή και υψηλή ένταση φωτισμού (XL).

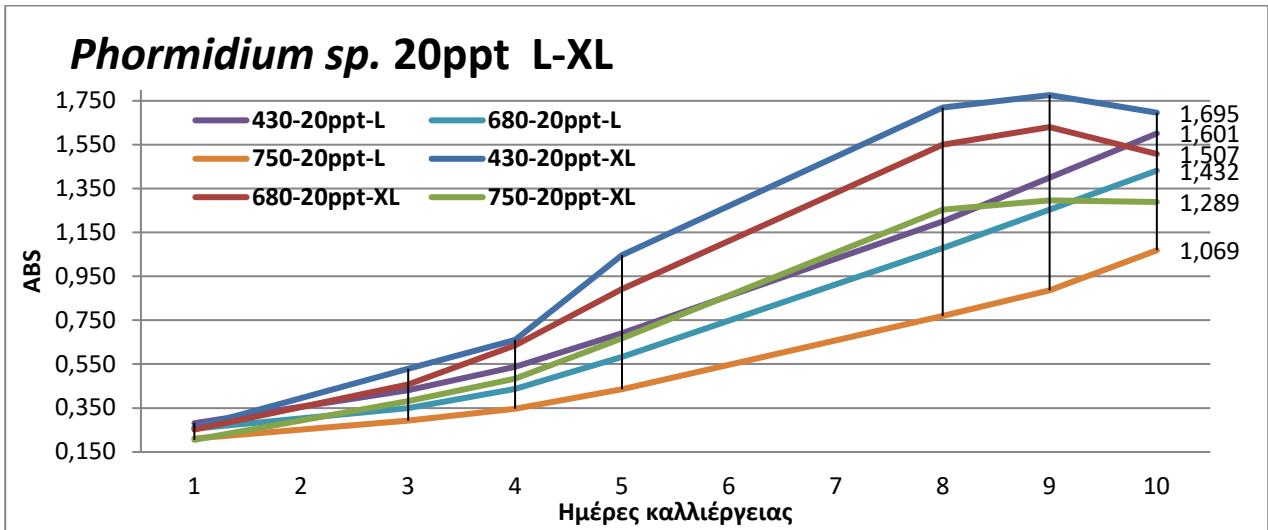
Μεταξύ των δειγμάτων διαφόρων αλατοτήτων κατά την επίδραση της **χαμηλής έντασης φωτισμού** μέγιστο Ξ.Β. παρατηρήθηκε στην αλατότητα **20ppt** με τιμή **0,46 g/L** και ακολούθησε το δείγμα με αλατότητα 40ppt (0,38 g/L) και το δείγμα της αλατότητας 60 ppt με Ξ.Β.= 0,31 g/L, κατά την 15^η ημέρα της καλλιέργειας.

Στην **υψηλή ένταση φωτισμού** μέγιστο Ξ.Β. εμφάνισε το δείγμα αλατότητας **60ppt** με πλήθος **0,63 g/L** και ακολούθησαν κατά φθίνουσα σειρά τα δείγματα αλατότητας 40ppt και 20ppt με τιμές 0,54 g/L και 0,48 g/L αντίστοιχα κατά την 15^η ημέρα της καλλιέργειας.

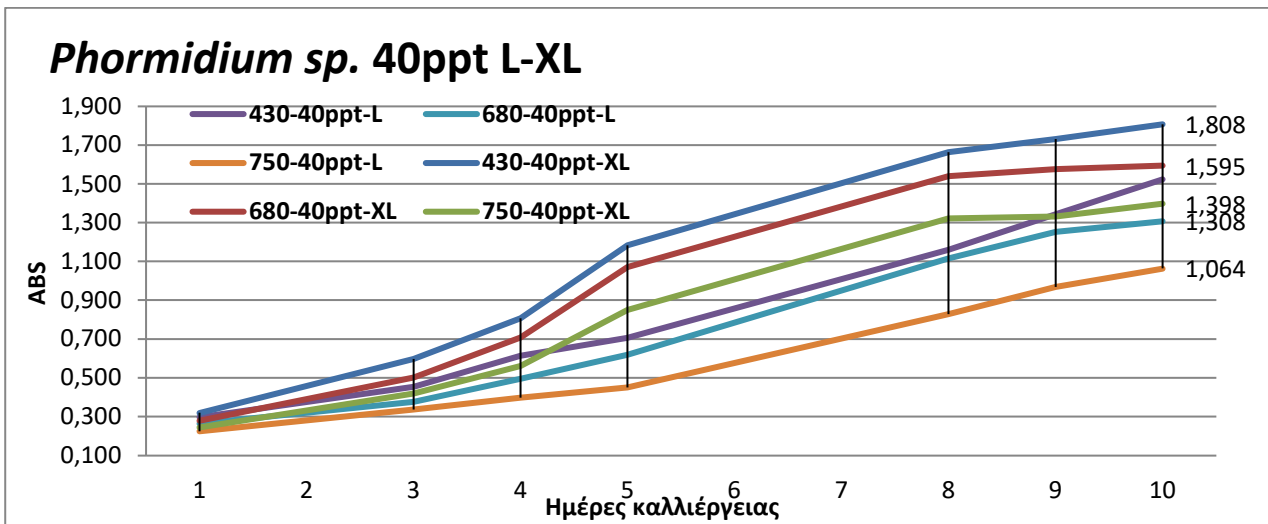
Μεταξύ όλων των δειγμάτων το μέγιστο Ξ.Β. παρατηρήθηκε στην αλατότητα **60ppt** και ήταν **0,63 g/L** κατά την επίδραση **υψηλής έντασης φωτισμού (XL)** κατά τη 15^η ημέρα της καλλιέργειας, ενώ το **ελάχιστο** Ξ.Β. παρατηρήθηκε στη **χαμηλή ένταση φωτισμού (L)** στην αλατότητα **60ppt** με τιμή **0,31 g/L** τη 15^η ημέρα της καλλιέργειας

β) με οπτική απορρόφηση

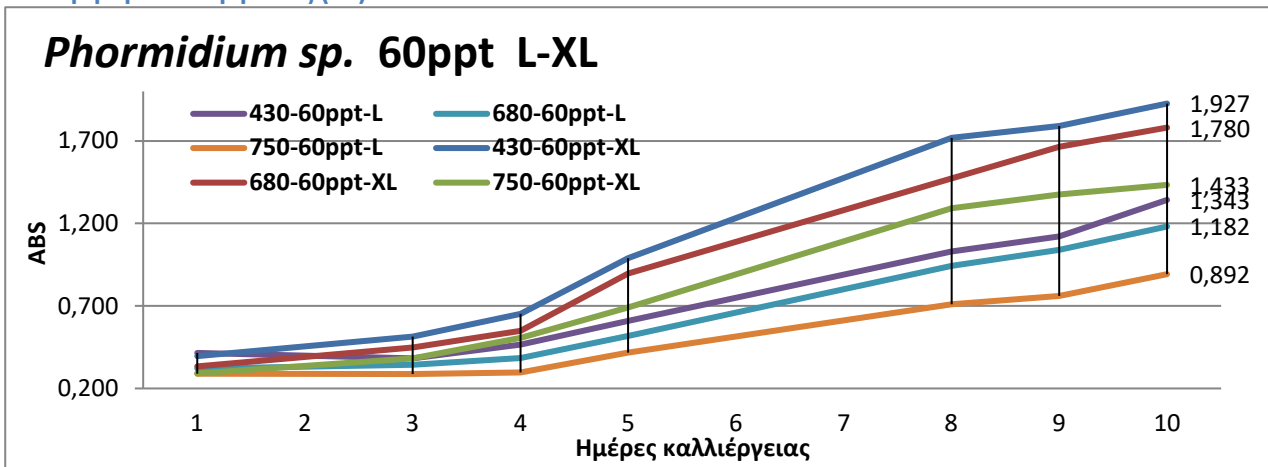
Η οπτική απορρόφηση του *Phormidium sp.* που καλλιεργήθηκε σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού (L-XL) και αλατότητες (20-40-60ppt) φαίνεται στις **εικόνες 69-71** και **74-75**. Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε σε 3 μήκη κύματος 430nm, 680nm και 750nm.



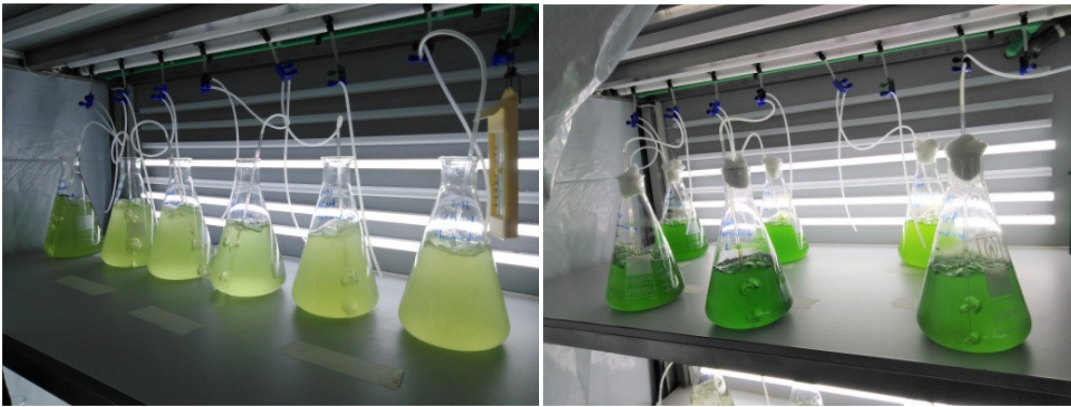
Εικόνα 69. *Phormidium sp.*, Οπτική απορρόφηση σε 430-680-750 nm αλατότητας 20ppt στην χαμηλή (L) και υψηλή ένταση φωτός (XL).



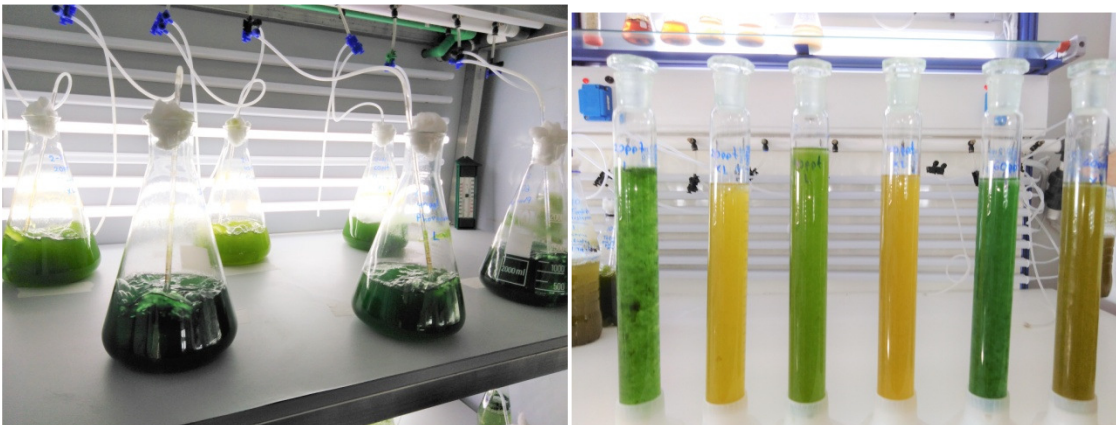
Εικόνα 70. *Phormidium sp.*, Οπτική απορρόφηση σε 430-680-750 nm αλατότητας 40ppt στην χαμηλή (L) και υψηλή ένταση φωτός (XL).



Εικόνα 71. *Phormidium sp.*, Οπτική απορρόφηση σε 430-680-750 nm αλατότητας 60ppt στην χαμηλή (L) και υψηλή ένταση φωτός (XL).



Εικόνα 72. Αριστερά καλλιέργεια *Phormidium sp.* την 1^η ημέρα και δεξιά την 4^η ημέρα.



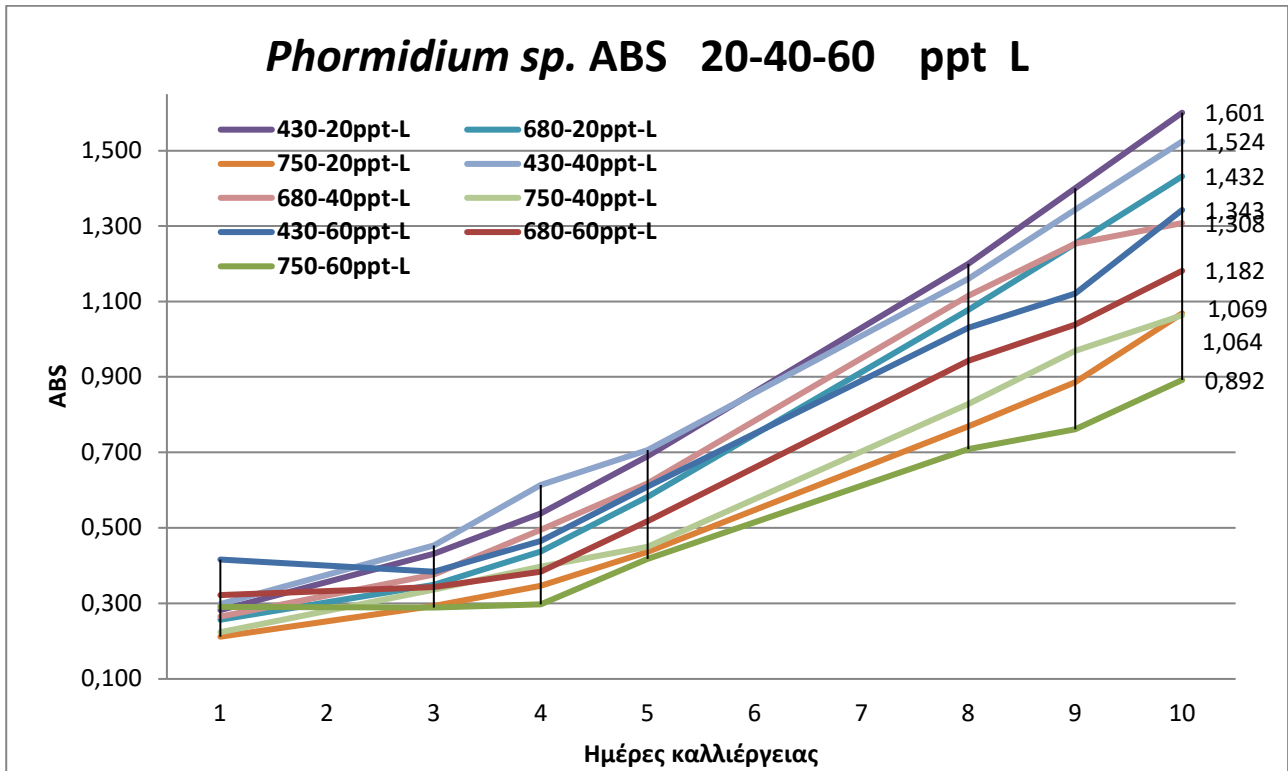
Εικόνα 73. Αριστερά καλλιέργεια *Phormidium sp.* την 9^η ημέρα και δεξιά δείγματα της καλλιέργειας (20ppt-L, 20ppt-XL, 40ppt-L, 40ppt-XL, 60ppt-L, 60ppt-XL) την 15^η ημέρα.

Η οπτική απορρόφηση της καλλιέργειας *Phormidium sp.* στην αλατότητα **20ppt** παρουσίασε **μέγιστη** τιμή στην **υψηλή** ένταση φωτισμού σε μήκος κύματος **430nm** με τιμή 1,777 την 9^η ημέρα της καλλιέργειας και ακολούθησε η απορρόφηση στα 680 nm (1,630) της ίδιας έντασης φωτισμού. Τρίτη στη σειρά τιμή οπτικής απορρόφησης εμφανίστηκε στα 430nm (1,400) για το δείγμα χαμηλής έντασης φωτισμού την ίδια μέρα (9η). Οι χαμηλότερες τιμές εμφανιστήκαν, κατά φθίνουσα σειρά στα μήκη κύματος 750nm (1,297) της υψηλής έντασης φωτισμού, 680nm (1,253) της χαμηλής έντασης φωτισμού και **750nm** (0,886) στο δείγμα **χαμηλής** έντασης φωτισμού.

Η αλατότητα **40ppt** παρουσίασε **μέγιστη** τιμή στην **υψηλή** ένταση φωτισμού σε μήκος κύματος **430nm** με τιμή 1,808 την 10^η ημέρα της καλλιέργειας και ακολούθησε η απορρόφηση στα 680 nm (1,595) της ίδιας έντασης φωτισμού. Τρίτη στη σειρά τιμή οπτικής απορρόφησης εμφανίστηκε στα 430nm (1,524) για το δείγμα χαμηλής έντασης φωτισμού την ίδια μέρα (10η). Οι χαμηλότερες τιμές εμφανιστήκαν, κατά φθίνουσα σειρά στα μήκη κύματος 750nm (1,398) της υψηλής έντασης φωτισμού, 680nm (1,308) της χαμηλής έντασης φωτισμού και **750nm** (1,064) στο δείγμα **χαμηλής** έντασης φωτισμού.

Η αλατότητα **60ppt** παρουσίασε **μέγιστη** τιμή στην **υψηλή** ένταση φωτισμού σε μήκος κύματος **430nm** με τιμή 1,927 την 10^η ημέρα της καλλιέργειας και ακολούθησε η απορρόφηση στα 680 nm (1,780) της ίδιας έντασης φωτισμού. Τρίτη στη σειρά τιμή οπτικής απορρόφησης εμφανίστηκε στα 750nm (1,433) για το δείγμα υψηλής έντασης φωτισμού την ίδια μέρα (10η). Οι χαμηλότερες τιμές

εμφανιστήκαν, κατά φθίνουσα σειρά στα μήκη κύματος 430nm (1,343) της χαμηλής έντασης φωτισμού, 680nm (1,182) της χαμηλής έντασης φωτισμού και 750nm (0,892) στο δείγμα χαμηλής έντασης φωτισμού.



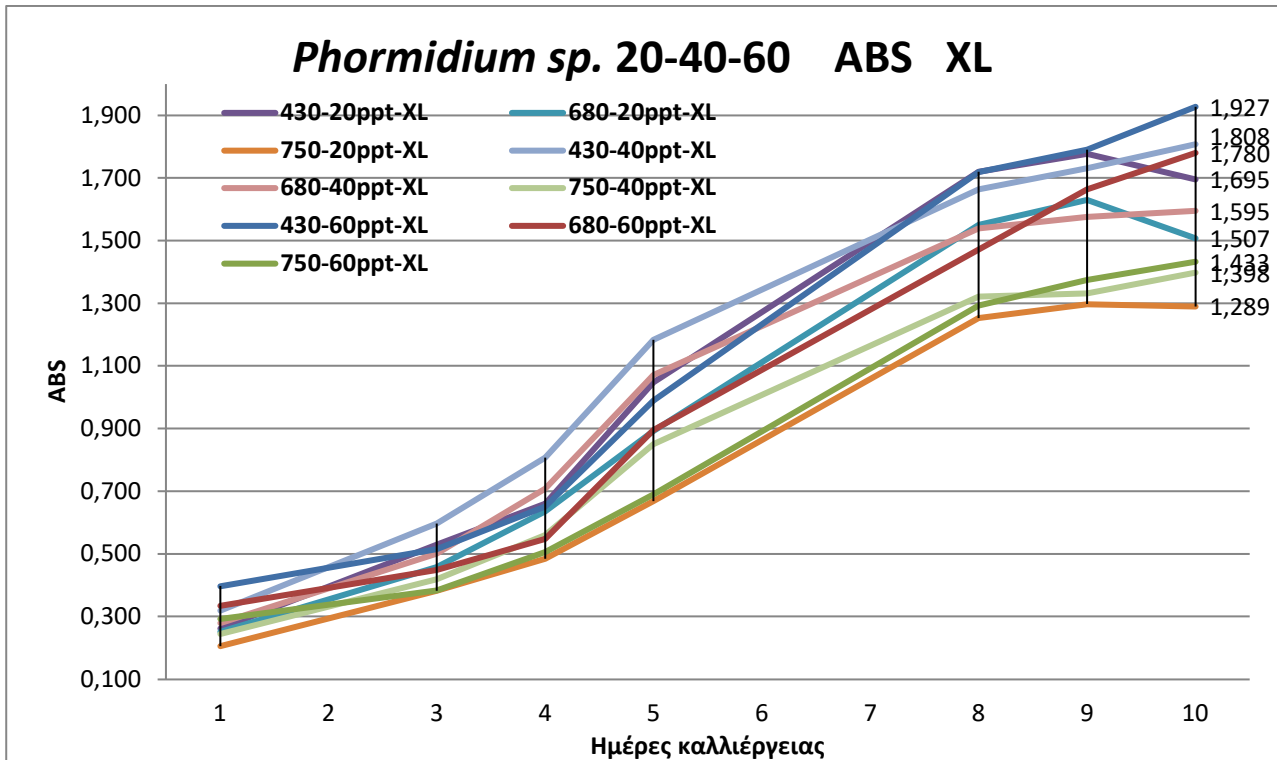
Εικόνα 74. *Phormidium sp.*, Οπτική απορρόφηση σε 430-680-750 nm αλατότητας 20-40-60ppt στην χαμηλή (L) ένταση φωτός.

Στη **χαμηλή** ένταση φωτισμού η μέγιστη τιμή απορρόφησης εμφανίστηκε την 10^η ημέρα της καλλιέργειας. Συγκεκριμένα στο δείγμα αλατότητας **20ppt** και στο μήκος κύματος **430nm** με τιμή **1,601**. Ακολούθησαν τα μήκη κύματος 430nm (1,524) της αλατότητας 40ppt και 680nm του δείγματος αλατότητας 20ppt με τιμή 1,432. Ακολούθησαν τα μήκη κύματος 430nm για τα δείγματα αλατότητας 60ppt, 680 40ppt, 680 60ppt με τιμές 1,343, 1,308 και 1,182 αντίστοιχα. Οι χαμηλότερες τιμές εμφανίστηκαν στο μήκος κύματος **750nm** της αλατότητας 20ppt, 40ppt και **60ppt** με τιμές 1,069, 1,064και 0,892 αντίστοιχα.

Στην **υψηλή** ένταση φωτισμού την 10^η ημέρα της καλλιέργειας παρουσιάστηκε η **μέγιστη** τιμή οπτικής απορρόφησης στο δείγμα της αλατότητας **60ppt** και συγκεκριμένα στο μήκος κύματος **430nm** με τιμή **1,927**. Ακολούθησε το μήκος κύματος 430nm του δείγματος αλατότητας 40ppt με τιμή 1,808. Επόμενη τιμή κατά φθίνουσα σειρά εμφανίστηκε στο δείγμα αλατότητας 60ppt στα 680nm (1,780), έπειτα στο δείγμα αλατότητας 20ppt στα 430nm (1,695), στο δείγμα αλατότητας 40ppt στα 680nm (1,595), το δείγμα αλατότητας 20ppt στα 680nm (1,507) και οι μικρότερες τιμές οπτικής απορρόφησης εμφανίστηκαν στο μήκος κύματος **750nm** της αλατότητας 60ppt, 40ppt και **20ppt** με τιμές 1,433, 1,398 και 1,289 αντίστοιχα.

Μεταξύ όλων των δειγμάτων **μέγιστη** τιμή εμφάνισε το δείγμα αλατότητας **60ppt** στο μήκος κύματος **430nm** στην **υψηλή** ένταση φωτισμού την 10^η ημέρα της καλλιέργειας και **ελάχιστη** τιμή

εμφάνισε το δείγμα **60ppt** στο μήκος κύματος **750nm** στην **χαμηλή** ένταση φωτισμού την 10^η ημέρα της καλλιέργειας.



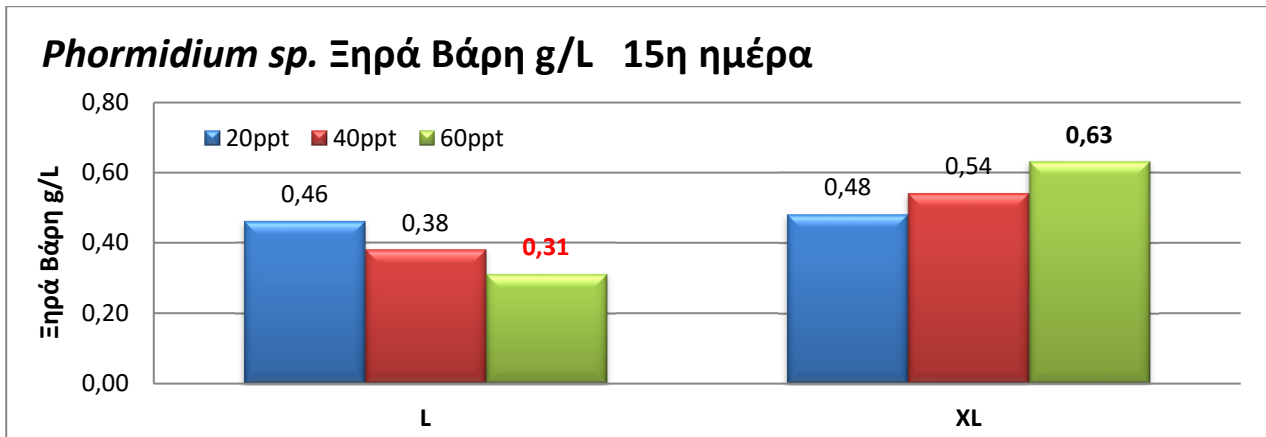
Εικόνα 75. *Phormidium sp.*, Οπτική απορρόφηση σε 430-680-750 nm αλατότητας 20-40-60ppt στην υψηλή ένταση φωτός (XL).

Πίνακας 20. *Phormidium sp.*, Οπτική απορρόφηση σε 430-680-750 nm αλατότητας 20-40-60ppt στην χαμηλή (L) και υψηλή ένταση φωτός (XL).

Ημέρα Καλλιέργειας	Αλατότητα (ppt)	Ένταση Φωτισμού	Μήκος Κύματος	Τιμή Απορρόφησης
10η	60	XL	430	1,927
10η	40	XL	430	1,808
10η	60	XL	680	1,780
10η	20	XL	430	1,695
10η	20	L	430	1,601
10η	40	XL	680	1,595
10η	40	L	430	1,524
10η	20	XL	680	1,507
10η	60	XL	750	1,433
10η	20	L	680	1,432
10η	40	XL	750	1,398
10η	60	L	430	1,343
10η	40	L	680	1,308
10η	20	XL	750	1,289
10η	60	L	680	1,182
10η	20	L	750	1,069
10η	40	L	750	1,064
10η	60	L	750	0,892

3.2 Προσδιορισμός βιομάζας

Στην **εικόνα 76** φαίνονται τα Ξηρά Βάρη των καλλιεργειών στο τέλος της καλλιέργειας (15^η ημέρα).



Εικόνα 76. *Phormidium sp.*, Ξηρά Βάρη g/L αλατότητας 20-40-60ppt στην χαμηλή (L) και υψηλή ένταση φωτός (XL) τη 15^η ημέρα της καλλιέργειας.

Τη 15^η ημέρα της καλλιέργειας υπολογίστηκαν τα Ξηρά Βάρη από 20mL κάθε δείγματος.

Στην **υψηλή ένταση** φωτισμού τη **μέγιστη** τιμή εμφάνισε το δείγμα αλατότητας **40ppt** με τιμή **Ξ.Β. 0,876 g/L** ακολούθησε το δείγμα 20ppt με Ξ.Β. 0,731 g/L και τέλος το δείγμα αλατότητας 60ppt με Ξ.Β. 0,532 g/L.

Στη **χαμηλή ένταση** φωτισμού **μέγιστη** τιμή εμφανίστηκε στο δείγμα αλατότητας **60ppt** με **Ξ.Β. 0,419 g/L**, ακολούθησε το δείγμα 40ppt με Ξ.Β. 0,260 g/L και τέλος την ελάχιστη τιμή Ξ.Β. είχε το δείγμα αλατότητας 20ppt με Ξ.Β. 0,240 g/L.

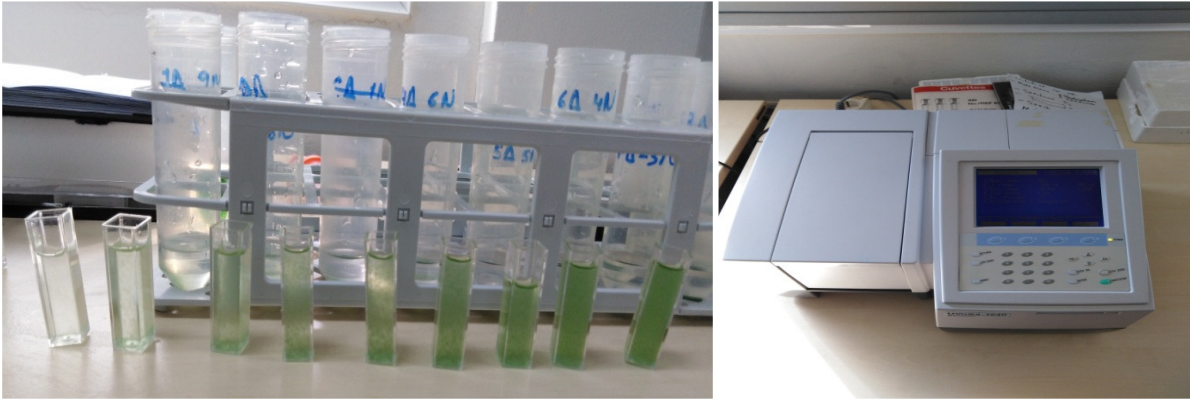
Οι υψηλότερες τιμές Ξ.Β. εμφανιστήκαν στα δείγματα της **υψηλής έντασης** φωτισμού και τη **μέγιστη** τιμή είχε το δείγμα αλατότητας **40ppt**. Την **ελάχιστη** τιμή είχε το δείγμα αλατότητας **20ppt** στη **χαμηλή ένταση** φωτισμού

3.3 Προσδιορισμός καμπύλης βαθμονόμησης.

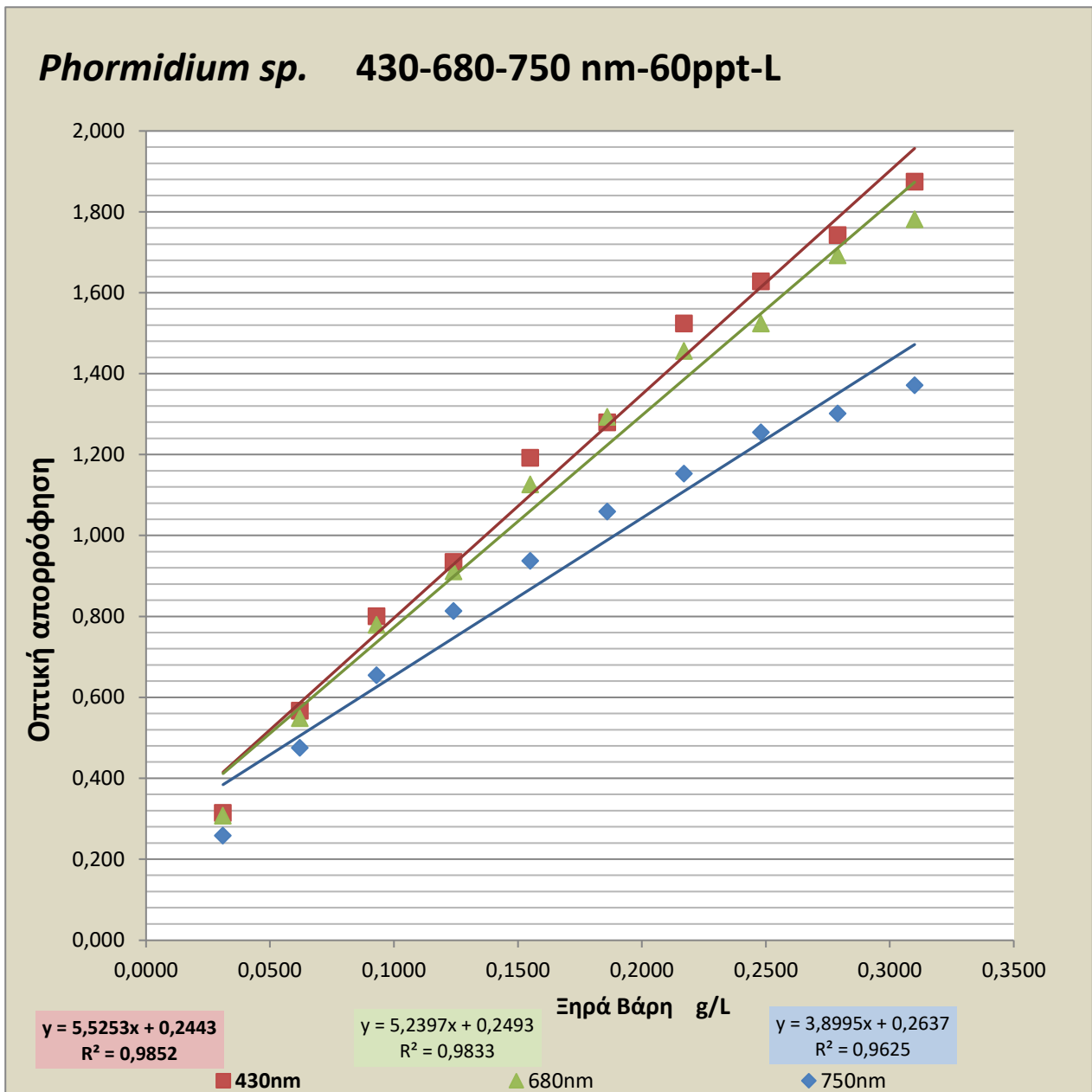
Στην **εικόνα 78** παρουσιάζονται οι καμπύλες βαθμονόμησης που πρόεκυψαν από τις μετρήσεις της φιάλης 60ppt L την 15^η ημέρα της καλλιέργειας.

Πίνακας 21. *Phormidium sp.*, Ξηρά Βάρη g/L και οπτική απορρόφηση σε 430nm, 680nm και 750nm.

	g/100mL	g/L			
	πληθυσμός	πληθυσμός	430nm	680nm	750nm
100mL δείγματος	0,0310	0,3100	1,875	1,782	1,372
9Δ:1N	0,0279	0,2790	1,743	1,693	1,302
8Δ:2N	0,0248	0,2480	1,629	1,525	1,256
7Δ:3N	0,0217	0,2170	1,525	1,457	1,154
6Δ:4N	0,0186	0,1860	1,280	1,294	1,060
5Δ:5N	0,0155	0,1550	1,193	1,127	0,938
4Δ:6N	0,0124	0,1240	0,935	0,912	0,814
3Δ:7N	0,0093	0,0930	0,801	0,780	0,655
2Δ:8N	0,0062	0,0620	0,568	0,549	0,476
1Δ:9N	0,0031	0,0310	0,315	0,308	0,259



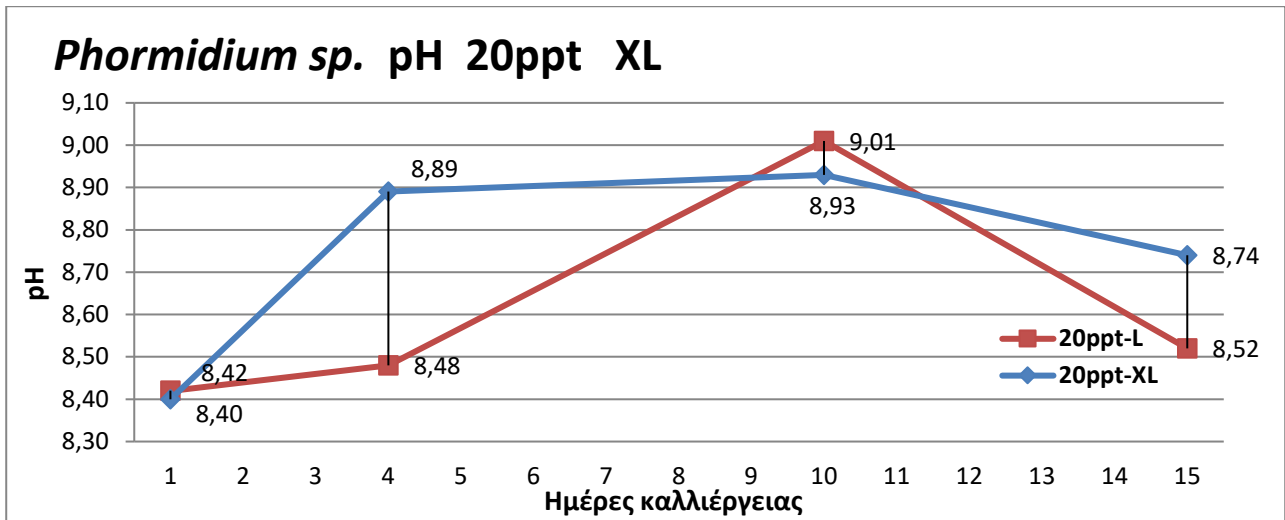
Εικόνα 77. Αριστερά δείγματα *Phormidium sp.* έτοιμα προς μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο (βαθμονόμηση). Δεξιά το φασματοφωτόμετρο.



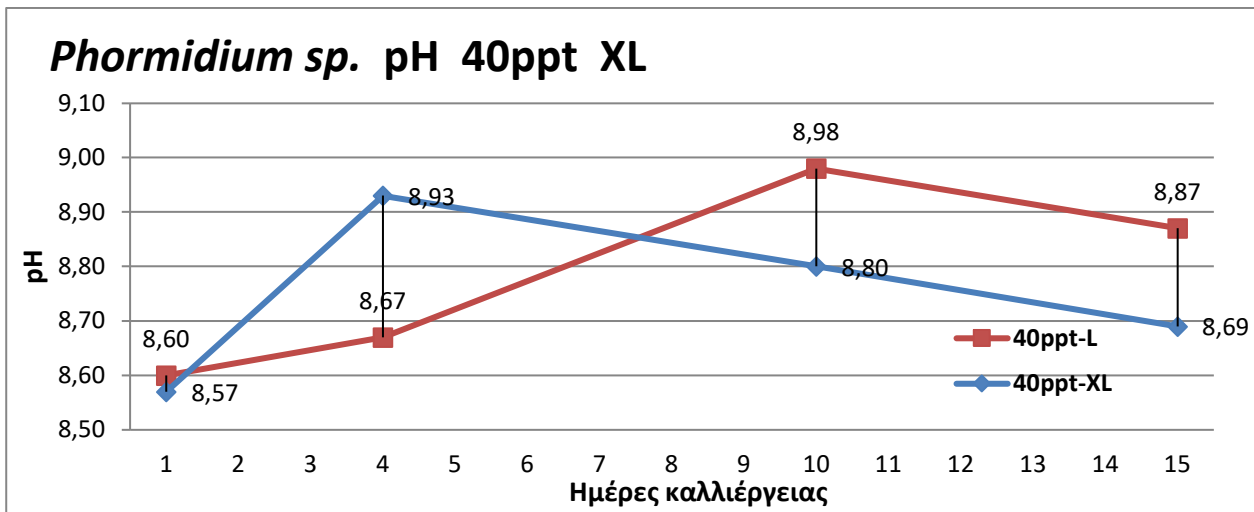
Εικόνα 78. *Phormidium sp.*, καμπύλη βαθμονόμησης- συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 430-680-750nm και Ξηρού Βάρους σε g/L της αλατότητας 60ppt την χαμηλή ένταση φωτισμού (L).

3.4 Προσδιορισμός pH

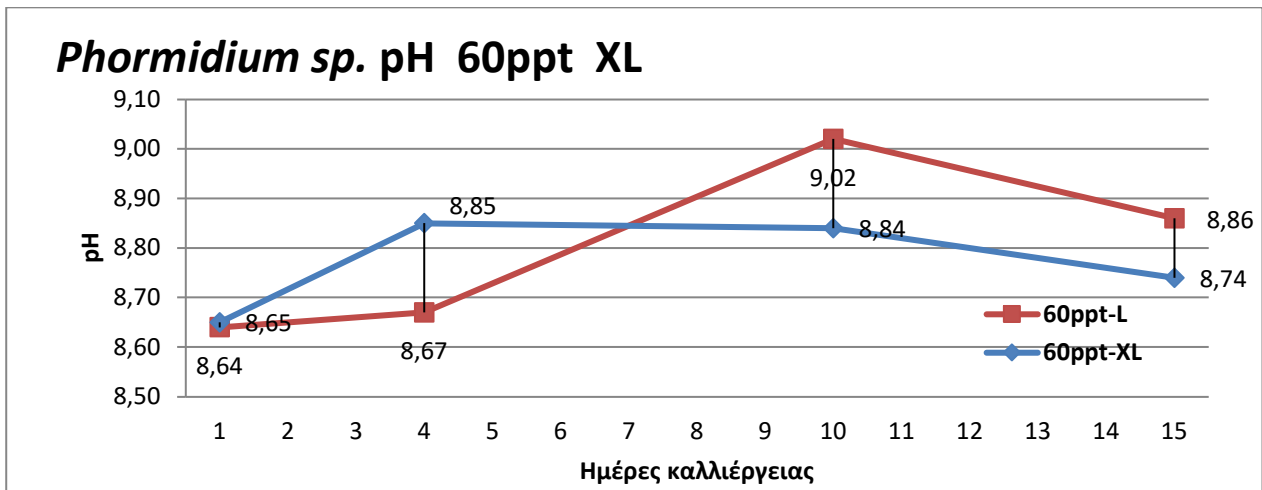
Οι μετρήσεις του pH δεν γίνονταν καθημερινά γιατί το pH δεν μεταβάλλεται τόσο γρήγορα. Οι μετρήσεις παρουσιάζονται στις **εικόνες 79-84**.



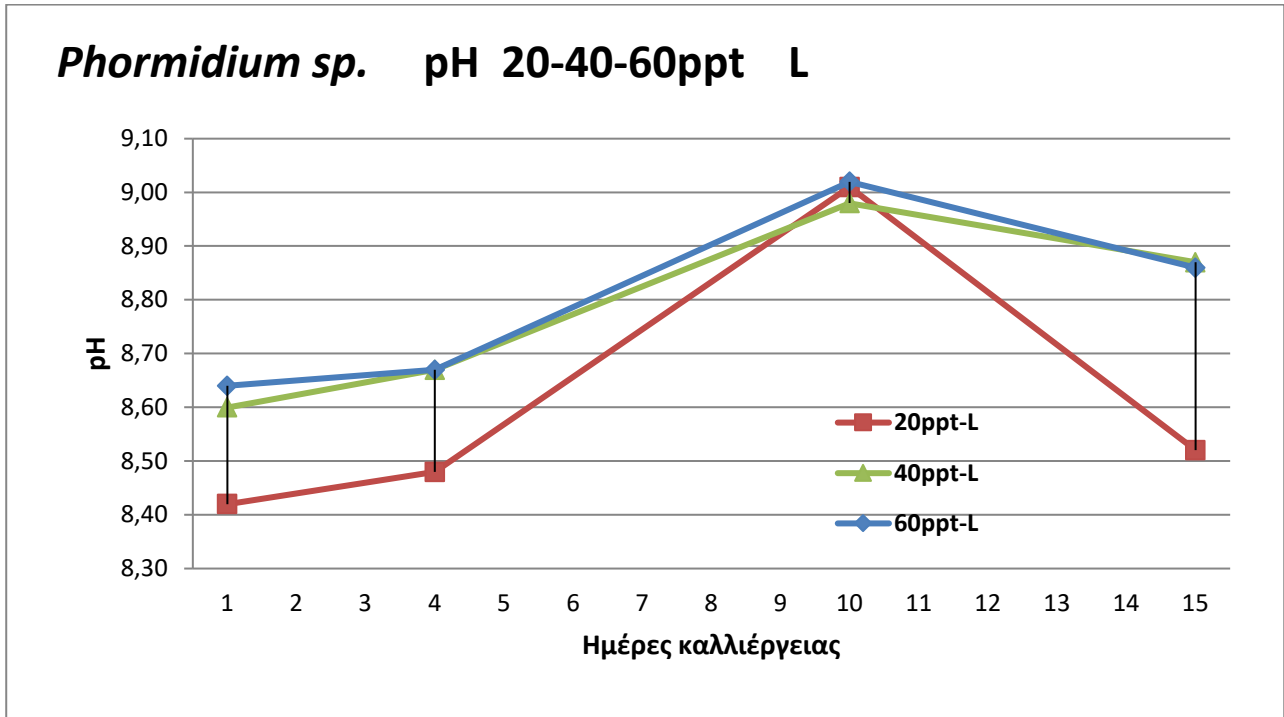
Εικόνα 79. *Phormidium sp.*, τιμές pH αλατότητας 20 ppt στις δυο εντάσεις φωτισμού (L-XL).



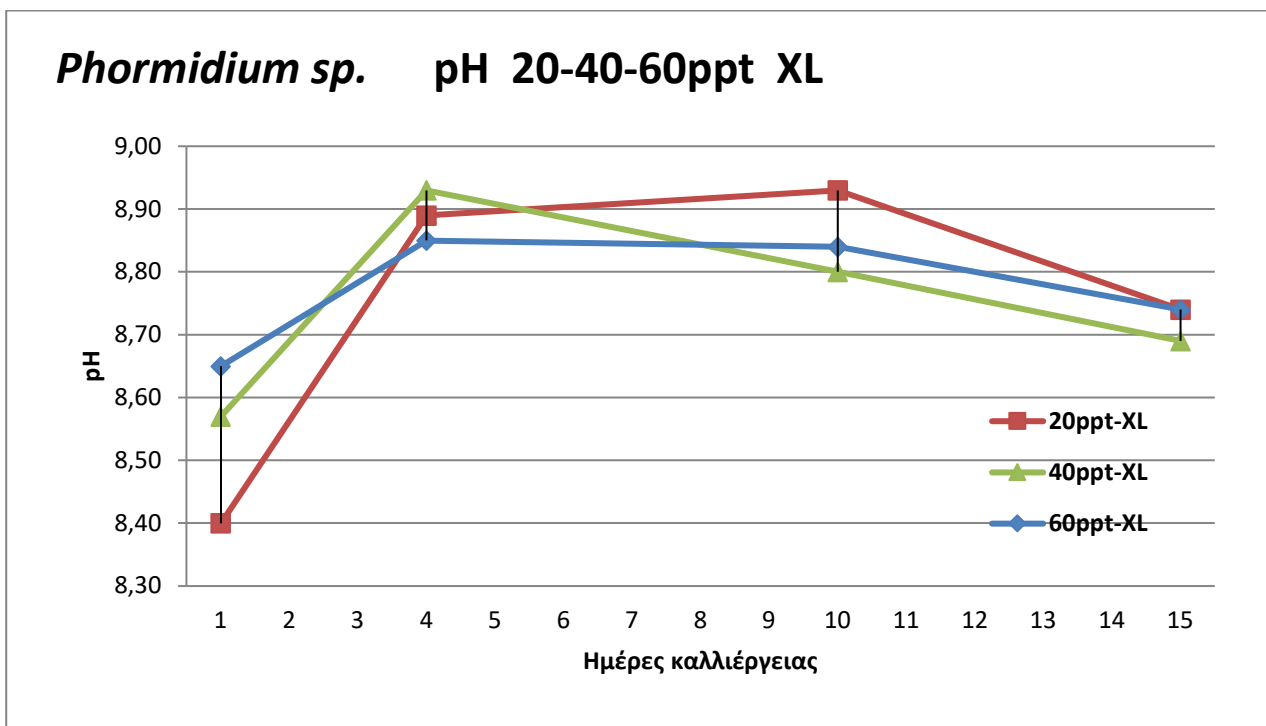
Εικόνα 80. *Phormidium sp.*, τιμές pH αλατότητας 40 ppt στις δυο εντάσεις φωτισμού (L-XL).



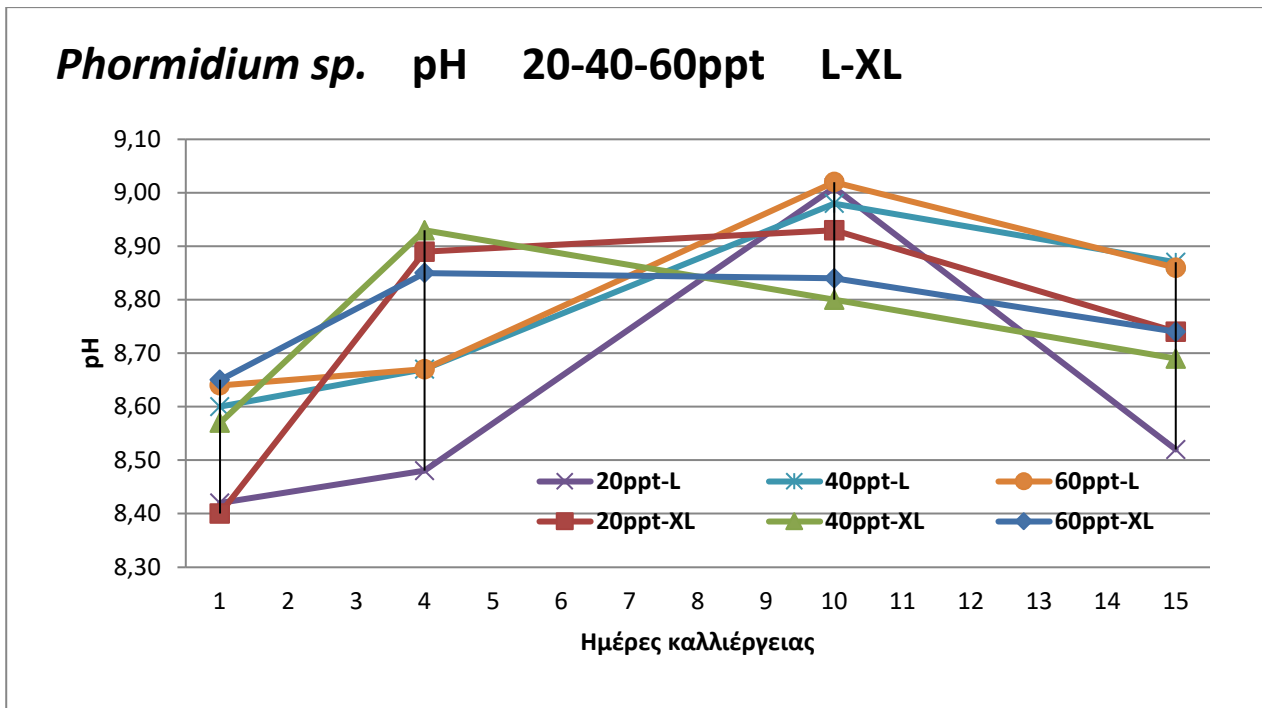
Εικόνα 81. *Phormidium sp.*, τιμές pH αλατότητας 60 ppt στις δυο εντάσεις φωτισμού (L-XL).



Εικόνα 82. *Phormidium sp.*, τιμές pH αλατότητας 20-40-60ppt στη χαμηλή ένταση φωτισμού (L).



Εικόνα 83. *Phormidium sp.*, τιμές pH αλατότητας 20-40-60ppt στη υψηλή ένταση φωτισμού (XL).



Εικόνα 84. *Phormidium sp.*, τιμές pH αλατότητες 20-40-60ppt στις δυο εντάσεις φωτισμού (L-XL).

Στα δείγματα αλατότητας **20ppt** το δείγμα της υψηλής έντασης φωτισμού είχε μεγαλύτερες τιμές pH. Η μέγιστη τιμή pH της χαμηλής έντασης φωτισμού εμφανίστηκε τη 10^η ημέρα με τιμή 9,01 και για το δείγμα της υψηλής έντασης φωτισμού την 4^η ημέρα με τιμή 8,89.

Στα δείγματα αλατότητας **40ppt** το δείγμα της υψηλής έντασης φωτισμού είχε μέχρι και την 4^η ημέρα υψηλότερη τιμή. Στη συνέχεια τη 10^η ημέρα το δείγμα χαμηλής έντασης φωτισμού είχε υψηλότερη τιμή (8,98) μέχρι και το τέλος της καλλιέργειας (8,87). Ελάχιστη τιμή εμφάνισε το δείγμα χαμηλής έντασης φωτισμού κατά τη 4^η ημέρα με τιμή pH=8,67.

Στα δείγματα της αλατότητας **60ppt** το δείγμα υψηλής έντασης φωτισμού είχε υψηλότερες τιμές από το δείγμα της χαμηλής έντασης φωτισμού μέχρι την 4^η ημέρα όπου εμφάνισε και τη μέγιστη τιμή του pH=8,85. Τη 10^η ημέρα της καλλιέργειας το δείγμα της χαμηλής έντασης φωτισμού εμφανίζει μεγαλύτερο pH=9,02, που αποτελεί και το μέγιστο αυτής της έντασης φωτισμού αλλά και ολόκληρης της καλλιέργειας. Τη 15^η ημέρα (τέλος καλλιέργειας) το δείγμα υψηλής έντασης φωτισμού ήταν μικρότερο από εκείνο της χαμηλής έντασης φωτισμού με τιμή 8,74. Η ελάχιστη τιμή pH παρουσιάστηκε στο δείγμα χαμηλής έντασης φωτισμού την 4^η ημέρα της καλλιέργειας με τιμή 8,67.

Στη **χαμηλή ένταση** φωτισμού οι τιμές του pH κυμάνθηκαν από 8,48, η ελάχιστη, στο δείγμα αλατότητας 20ppt την 4^η ημέρα της καλλιέργειας έως 9,02, η μέγιστη, για το δείγμα αλατότητας 60ppt την 10^η ημέρα της καλλιέργειας.

Στην **υψηλή ένταση** φωτισμού οι τιμές του pH κυμάνθηκαν από 8,69, η ελάχιστη, στο δείγμα αλατότητας 40ppt την 15^η ημέρα της καλλιέργειας έως 8,93 η μέγιστη στα δείγματα αλατότητας 40ppt την 4^η ημέρα και 20ppt τη 10^η ημέρα καλλιέργειας αντίστοιχα.

Δ. Συζήτηση

1. Φωτισμός

Τα μικροφύκη είναι μονοκύτταροι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί που χρησιμοποιούν ηλιακή ενέργεια για τη σύνθεση οργανικής ύλης από CO₂ και απελευθερώνουν O₂ στην ατμόσφαιρα (Huzisige and Ke 1993). Τα μικροφύκη είναι πιο κατάλληλα από τα φυτά ή τα μακροφύκη ως παραγωγοί επειδή παρουσιάζουν υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης και είναι σε θέση να εγκλιματιστούν σε διάφορες φυσικές ή τεχνητές συνθήκες που ενισχύουν την παραγωγή πρωτεϊνών, υδατανθράκων και λιπιδίων (Rocha et. al., 2003; Brennan and Owende 2010). Τα μικροφύκη διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως πρωτογενείς παραγωγοί τόσο στη θαλάσσια καλλιέργεια (ψάρια, προνύμφες, δίθυρα κ.α.) όσο και στην ανοιχτή θάλασσα (Ayadi et. al., 2004; Guermazi et. al., 2008; Elloumi et. al., 2009).

Τα μικροφύκη μπορούν να εγκλιματιστούν σε διαφορετικές συνθήκες φωτός τροποποιώντας τη φωτοσυνθετική τους συσκευή (Guermazi et. al., 2014). Επίσης οι συγκεντρώσεις των μικροφυκών είναι μεγαλύτερες στις καλλιέργειες απ' ότι στη φύση. Οι καλλιέργειες πρέπει να εμπλουτίζονται με θρεπτικά συστατικά ώστε να αντισταθμιστούν οι ελλείψεις από το φυσικό περιβάλλον (θαλασσινό νερό). Τα μακροθρεπτικά στοιχεία περιλαμβάνουν νιτρικά, φωσφορικά και πυριτικά. (Pal et. al., 2013).

Η καλλιέργεια των μικροφυκών πρέπει να διεξάγεται υπό εξειδικευμένες συνθήκες και όπως εξηγεί ο Coutteau (1996), οι πιο σημαντικοί παράμετροι που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών είναι : η ποσότητα και η ποιότητα των θρεπτικών, το φως, το pH, οι αναταραχές, η αλατότητα και η θερμοκρασία (Pal et. al., 2013).

Το φως είναι η πηγή ενέργειας που οδηγεί την αντίδραση της φωτοσύνθεσης και από αυτήν την άποψη πρέπει να ληφθούν υπόψη : η ένταση, η φασματική ποιότητα και η φωτοπερίοδος (Pal et. al., 2013). Επίσης το φως ελέγχει τον κύκλο των κυττάρων παρέχοντας ενέργεια που απαιτείται για την κυτταρική διαίρεση αλλά αποτελεί και το σήμα για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (Claquin et. al., 2002; Hagiwara et. al., 2002; Kromkamp and Claquin, 2006).

Η ένταση φωτισμού και η φωτοπερίοδος είναι οι πρωταρχικοί και κρίσιμοι παράγοντες που καθορίζουν το ρυθμό ανάπτυξης των καλλιεργειών των μικροφυκών (Parmar et. al., 2011; Wahidin et. al., 2013). Το φως παρέχει την απαιτούμενη ενέργεια για την υποστήριξη του μεταβολισμού αλλά και υπερβολική ακτινοβολία μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες που εμποδίζει το μεταβολισμό των κυττάρων (Li et. al., 2009; Sforza et. al., 2012) και κατά συνέπεια να επιβραδύνει το ρυθμό ανάπτυξης τους (Beardall et. al., 2001; Ihnken et. al., 2011). Επίσης η έκθεση σε υψηλή ένταση φωτισμού οδηγεί σε βλάβη από το φως, του φωτοσυστήματος II όταν ο ρυθμός φωτοβλάβης υπερβαίνει τον κύκλο επισκευής οδηγώντας σε φωτοαναστολή και μειωμένη φωτοσυνθετική απόδοση (Melis, 1999; Yokthongwattana and Melis, 2008).

Η ένταση φωτισμού επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροφυκών, τη φωτοσυνθετική αποδοτικότητα, την πρόσληψη θρεπτικών, τη μορφολογία, το ρυθμό ανάπτυξης, τη συγκέντρωση χρωστικών, τη βιοχημική σύνθεση μικροφυκών κ.α.

Η μελέτη των Khatoon et. al. (2014) συμφωνεί με αυτές των Chen et. al. (2011) οι οποίες αναφέρουν ότι η ανάπτυξη των μικροφυκών είχε ανασταλεί καθώς αυξήθηκε, πέρα από το σημείο κορεσμού, η ένταση του φωτός. Διαφορετικές εντάσεις φωτισμού και φωτοπερίοδοι επηρεάζουν την ανάπτυξη και την πρόσληψη θρεπτικών του *Tetraselmis chui* (Singh S.P. and Singh P., 2015). Κατάλληλη ένταση φωτισμού έχει μεγάλη σημασία για την εξασφάλιση υψηλού ρυθμού ανάπτυξης στα φύκη (Guermazi et. al., 2014).

Στο γένος *Dunaliella sp.* εμφανιστήκαν διαφορές στη μορφολογία ως απόκριση των διαφορετικών εντάσεων φωτισμού (Park et. al., 2013).

Διαφορετικές εντάσεις φωτισμού και θερμοκρασίες έχουν μεγάλη επιρροή στην κυτταρική πυκνότητα και την περιεκτικότητα σε λιπίδια στα μικροφύκη (Khatoon et. al., 2014). Το συνεχές φως προκάλεσε στο *Dunaliella sp.* μεταβολική μετατόπιση με αποτέλεσμα τη συσσώρευση πρωτεϊνών και κυρίως λιπιδίων. Γενικά ορισμένα μικροφύκη σε υψηλές εντάσεις φωτισμού και θερμοκρασίες παράγουν περισσότερα κορεσμένα λιπαρά οξέα από συνθήκες χαμηλής έντασης φωτισμού και χαμηλής θερμοκρασίας (Sushchik et. al., 2003; Olofsson et. al., 2012). Υψηλή ένταση φωτισμού οδηγεί σε υπερπαραγωγή β-καροτένιου (Lers et. al., 1990). Η παραγωγή β-καροτένιου είναι στενά συνδεδεμένη με η συσσώρευση λιπαρών οξέων (Park et. al., 2013). Το επίπεδο του β-καροτένιου μπορεί να ρυθμίζεται από τη συνολική ποσότητα ακτινοβολίας που παρατηρείται κατά τη διάρκεια του κύκλου κυτταρικής διαίρεσης (Ben-Amotz and Avron 1983; Lers et. al., 1990). Στα είδη *Dunaliella salina* και *D. bardawil* η αύξηση της έντασης του φωτός αύξησε την περιεκτικότητα σε ζεαξανθίνη και β-καροτένιο (Park et. al., 2013). Η ζεαξανθίνη έχει στενή σχέση με παραμέτρους φυτοπροστασίας (Demming-Adams and Adams 1992; Muller et. al., 2001).

Επίσης σε συνθήκες στρες λόγω έντονου φωτισμού η φωτοσύνθεση ενισχύεται και συνοδεύεται από σύνθεση γλυκερόλης (Iskander et. al., 2016).

Η φωτοσυνθετική αποδοτικότητα των φυκών καθορίζεται από συγκεκριμένες τιμές pH, θερμοκρασίας, έντασης φωτισμού, φωτοπερίοδου και θρεπτικών (Sheng et. al., 2004). Το μικροφύκος *Dunaliella salina* μπορεί να αναπτύξει αποτελεσματικό κύκλο επισκευής που του επιτρέπει να ανατρέπει τις βλάβες στο φωτοσύστημα II με πολύ ταχύτερο ρυθμό στην υψηλή ένταση φωτός διατηρώντας τη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση (Xu et. al., 2016).

2. Αλατότητα

Φυσικά δεν απαιτείται μόνο φως για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Όπως προαναφέρθηκε υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών όπως η αλατότητα, το σωστό pH, η σωστή ποσότητα θρεπτικών στοιχείων και βιταμινών (Leonardos and Geider, 2004).

Τα μικροφύκη διαφέρουν ως προς την ανεκτικότητα τους σε αλατότητα σε αλόφιλα και αλοαυθεκτικά (Rao et. al., 2007). Κάθε είδος ανταποκρίνεται διαφορετικά σε διαφορετικές αλατότητες όπως έχουν αναφερθεί προηγούμενες μελέτες (Huang et. al., 2011; Hu and Gao, 2006; Takagi et. al., 2006; Zhang et. al., 1999). Οι μεταβολές της αλατότητας επηρεάζουν την ανάπτυξη και τη σύνθεση των μικροφυκών παρόλο που είναι ανθεκτικά στις αλλαγές της (Khatoon et. al., 2014).

Παρόλο που το κάθε είδος ανταποκρίνεται διαφορετικά στην υψηλή αλατότητα μελέτες των Sudhir and Murthy (2004) κατέδειξαν ότι επηρεάζουν τη φυσιολογική διαδικασία σε κάθε μικροοργανισμό. Οι Saros και Fritz (2000) έδειξαν ότι η φυσιολογία του διατόμου *Skeletonema costatum* μπορεί να επηρεαστεί άμεσα ή έμμεσα μέσω αλληλεπίδρασης με άλλους αυξητικούς παράγοντες όπως η σύνθεση ιόντων στο αλατούχο σύστημα. Σε μερικά είδη διατόμων η υψηλή αλατότητα οδηγεί σε μείωση διαστάσεων κυττάρων (Lynn et. al., 2000), ενώ στο γένος *Dunaliella sp.* μελέτες έδειξαν ότι το μέγεθος των κυττάρων αυξήθηκε λόγω χαμηλότερου ρυθμού διαίρεσης (Kusumaningrum et. al., 2004).

Το στρες της αλατότητας οδηγεί σε μια σειρά αλλαγών:

- ✓ Στη φωτοσύνθεση
- ✓ Τη φωτοαναπνοή
- ✓ Την ωσμωτική ρύθμιση
- ✓ Στη σύνθεση αμινοξέων και υδατανθράκων (Ozturk et. al., 2002)

και επίσης επηρεάζει ποικίλους φυσιολογικούς και βιοχημικούς μηχανισμούς που συνδέονται με την ανάπτυξη των μικροφυκών (Khatoon et. al., 2014).

Όταν τα κύτταρα εκτεθούν στην αλατότητα συγκεκριμένες διαδικασίες ενεργοποιούνται όπως:

- Η ρύθμιση πρόσληψης και εξαγωγής ιόντων μέσω των μεμβρανών των κυττάρων
- Αποκατάσταση της σπαργής
- Συσσώρευση ωσμωπροστατευτικών ουσιών και πρωτεϊνών στρες

οδηγώντας σε κατάσταση σταθερής ανάπτυξης (Allakhverdiev et. al., 2000; Talebi et. al., 2013).

Η αλατότητα επηρεάζει τη σύνθεση πρωτεϊνών, υδατανθράκων, λιπαρών οξέων, λιπιδίων, γλυκερόλης, αμύλου, χρωστικών, το ρυθμό αύξησης, τη μέγιστη κυτταρική πυκνότητα και το χρόνο που απαιτείται για να επιτευχθεί, μεταβολικές δραστηριότητες των μικροφυκών κ.α.

Αν και πειράματα των Khatoon et. al. (2014) έδειξαν ότι το γένος *Tetraselmis sp.* δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές στην ολική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη σε διαφορετικές αλατότητες οι Arun και Singh (2013) βρήκαν υψηλές ποσότητες πρωτεϊνών στα *Dunaliella salina* και *Dunaliella tetriolecta* σε συνθήκες υψηλής αλατότητας. Επιπλέον, πειράματα των Ben-Amotz et. al. (1985) έδειξαν ότι σε χαμηλές αλατότητες παρουσιάστηκαν χαμηλά επίπεδα πρωτεϊνών σε κάποια είδη μικροφυκών. Η υψηλή αλατότητα ενισχύει την περιεκτικότητα του αμύλου στα κύτταρα των μικροφυκών γλυκών υδάτων (Siaut et. al., 2011) όμως το *Dunaliella sp.* στην υψηλή αλατότητα εμφάνισε χαμηλή περιεκτικότητα σε άμυλο σύμφωνα με τους Chen and Jiang (2009). Η σύνθεση λιπαρών οξέων στα μικροφύκη επηρεάστηκε επίσης από τις περιβαλλοντικές συνθήκες της καλλιέργειας όπως η θερμοκρασία, η ένταση φωτισμού, τα θρεπτικά και η αλατότητα (Richmond, 1986; Renaud SM et. al., 1995; Thompson et. al., 1992). Οι αναλογίες μονοακόρεστων, κορεσμένων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων διαφέρουν ανάλογα το είδος (Guermazi et. al., 2014).

Οι οργανισμοί που μπορούν να επιβιώσουν σε υψηλές αλατότητες και υψηλές εντάσεις φωτισμού συνθέτουν β-καροτένιο και γλυκερόλη για προστασία από την υψηλή ένταση φωτισμού και την ωσμωτική πίεση αντίστοιχα (Rad et. al., 2011). Η αλατότητα προκαλεί την παραγωγή γλυκερόλης (Arun and Singh, 2011). Φαίνεται ότι η γλυκερόλη χρησιμεύει ως ωσμωτικός ρυθμιστής του

κυτταροπλάσματος των κυττάρων σε συνθήκες υψηλής αλατότητας Hadi et. al., 2008). Σε χαμηλές αλατότητες η γλυκερόλη μετατρέπεται σε άμυλο προκειμένου να διατηρηθεί το ενδοκυτταρικό ωσμωτικό δυναμικό (Chitlaru and Pick, 1999). Σε αλατότητες μεγαλύτερες από 15% NaCl εμφανίστηκε αύξηση των επίπεδων καροτενοειδών και γλυκερόλης στο κύτταρο του *Dunaliella salina* ενώ μειώθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης και το επίπεδο χλωροφύλλης σύμφωνα με τους Arun and Singh (2012). Ο Pick (2002) μετά από μελέτες διαπίστωσε ότι το *Dunaliella sp.* ανταποκρίνεται στο στρες της αλατότητας με:

- Μαζική συσσώρευση γλυκερόλης
- Βελτιωμένη απομάκρυνση ιόντων Na⁺
- Συσσώρευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών (Arun and Singh, 2013).

Επίσης αύξηση της αλατότητας οδηγεί σε μικρή αύξηση της ολικής περιεκτικότητας σε λιπίδια ως αντίδραση στην ωσμωτική πίεση (Hu, 2004). Οι μηχανισμοί που πραγματοποιούνται κατά την αύξηση της αλατότητας οδηγούν σε αύξηση της ολικής περιεκτικότητας σε λιπίδια τα οποία δρουν σαν αποθέματα ενέργειας μέχρι ευνοϊκές συνθήκες να προκύψουν (Asulabh et. al., 2012; Talebi et. al., 2013). Πολλές μελέτες αναφέρουν ότι η συσσώρευση των λιπιδίων στα μικροφύκη συμβαίνει κατά τη διάρκεια περιβαλλοντικού στρες (Asulabh et.al., 2012).

Κάποια πράσινα μικροφύκη όπως η *Dunaliella salina* επιβιώνει σε ευρύ φάσμα αλατότητας μέσω μηχανισμών που εμπλέκονται στη σύνθεση και αποικοδόμηση γλυκερόλης και εκμεταλλεύονται μεγάλες ποσότητες διατροφικών καροτενοειδών παραγόμενων κάτω από συνθήκες στρες (Xu, 2016). Τα καροτενοειδή παίζουν αποτελεσματικό ρόλο στην προστασία των φωτοσυνθετικών χρωστικών έναντι της φωτοξειδωτικής βλάβης (Gotz et. al., 1999). Το μικροφύκος *Dunaliella salina* συνθέτει β-καροτένιο υπό συνθήκες στρες (Riyahi et. al., 2007; Guedes et. al., 2011). Λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων το καροτένιο πιστεύεται ότι προστατεύει τους οργανισμούς από το οξειδωτικό στρες (Sforza et. al., 2012). Συμφωνά με τις μελέτες των Arun και Singh (2013) στα είδη *Dunaliella salina* και *Dunaliella tetriolecta*, αύξηση της αλατότητας οδήγησε σε αύξηση καροτογένεσης. Επίσης αύξηση της αλατότητας πάνω από 30% NaCl οδήγησε σε χαμηλή περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη ενώ αύξηση της αλατότητας πάνω από 15% NaCl αύξησε τα ποσοστά χλωροφύλλης-α. Η παραγωγή καροτενοειδών επηρεάζεται από το ρυθμό αύξησης. Καθώς μειώνεται ο ρυθμός αύξησης το επίπεδο των καροτενοειδών αυξάνεται (Ben-Amotz and Avron, 1982; Borowitzka et. al., 1984). Το β-καροτένιο είναι η πιο σημαντική και άφθονη χρωστική στη φύση και μόνο τα φυτά, τα φύκη και μικροοργανισμοί μπορούν να τα παράγουν φυσικά (Arun et. al., 1984).

Η αύξηση της αλατότητας συνδέεται συνήθως με μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και της φωτοσυνθετικής αποτελεσματικότητας πιθανώς επειδή η αλατότητα επηρεάζει τη χρήση του φωτός και το μεταβολισμό για την εξουδετέρωση των ιονικών και ωσμωτικών τάσεων (Rosales et. al., 2005). Η αλατότητα είναι ο κύριος παράγοντας για τη διαδικασία της ζωής στα φυτά και μπορεί να προκαλέσει καθυστέρηση στις κεντρικές μεταβολικές δραστηριότητες όπως η φωτοσύνθεση (Liska et. al., 2004). Η αντοχή ορισμένων μικροφυκών στην αλατότητα οφείλεται

- Στη σύνθεση γλυκερόλης που βοηθά στη διατήρηση δυναμικού πίεσης του κυττάρου (Ben-Amotz and Avron, 1973; Chitlaru and Pick, 1989).

- Αντικατάσταση κυτταρικού τοιχώματος με ένα εύκαμπτο στρώμα βλεννίνης (Kirs, 1989)
- Παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων αλοανθεκτικών που διατηρούν σταθερότητα και διαλυτότητα κυττάρου (Premkumar et. al., 2005).

Είναι σαφές ότι η γλυκερόλη έχει πολλές λειτουργίες. Χρησιμεύει για την προστασία και τη διατήρηση της ανάπτυξης των κυττάρων όχι μόνο σε συνθήκες υψηλής αλατότητας αλλά και σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού (Iskander et. al., 2016).

3. *Tetraselmis sp.*

3.1 Ανάπτυξη Πληθυσμού

3.1.1. Φωτισμός

Η ανάπτυξη των πληθυσμών στις συνθήκες υψηλού φωτισμού εμφανίζουν σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους αντίστοιχους της χαμηλής έντασης φωτισμού. Οι πληθυσμοί με έντονο φωτισμό (XL) ανεξάρτητα από την αλατότητα τους εμφανίζουν μεγαλύτερη πυκνότητα σε σύγκριση με τους αντίστοιχους της χαμηλής έντασης φωτός (L). Οι χλωροφύλλες α και β που έχουν τα Chlorophyta είναι οι κύριες χρωστικές απορρόφησης στο ερυθρό και κυανό φως. Η αύξηση αυτή πιθανόν να οφείλεται στην αύξηση της προσληφθείσας ενέργειας από τις χρωστικές αυτές η οποία οδηγεί σε αυξημένη φωτοσύνθεση και επομένως αφομοίωση ατόμων C η οποία οδηγεί σε αύξηση των παραγόμενων σακχάρων και επομένως αύξηση του πληθυσμού και αύξηση βιομάζας (Singh, S.P. and Singh, P., 2015) .

Παρόμοια αποτελέσματα έδωσαν και τα πειράματα των Pal et. al.(2013) για το *Chaetoceros muelleri* , όπου αύξηση της έντασης φωτισμού αύξησε την ανάπτυξη και το ρυθμό αύξησης του. Επίσης και στη μελέτη των Singh SP και Singh P (2015) το *Chlorella sp.* εμφάνισε γρήγορη κυτταρική διαίρεση στην παρουσία φωτός, CO₂ και θρεπτικών.

Τα δείγματα της υψηλής έντασης φωτισμού εμφάνισαν μεγαλύτερες κυτταρικές πυκνότητες λόγω της αυξημένης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας μέχρι τη 10^η ημέρα της καλλιέργειας. Τα αντίστοιχα δείγματα της χαμηλής έντασης φωτισμού δείχνουν να μην έχουν φτάσει στη μέγιστη κυτταρική πυκνότητα τους μέχρι και την 15^η ημέρα της καλλιέργειας αλλά το πλήθος των κυττάρων/mL ήταν σχεδόν το μισό από εκείνα της υψηλής έντασης φωτισμού. Παρόμοια αποτελέσματα έδωσαν και οι μελέτες των Cheirsil και Torpee (2012) για την ανάπτυξη του *Nannochloropsis sp.*, όπου ο πληθυσμός του αυξανόταν συνεχώς μέχρι το μέγιστο επίπεδο με την αύξηση της έντασης του φωτός έως και τα 10000 lux.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι στο δείγμα 60ppt XL παρουσιάστηκε μια απότομη και κατακόρυφη πτώση της πυκνότητας του πληθυσμού κατά την 11^η ημέρα της καλλιέργειας. Ο πληθυσμός του δείγματος αυτού ήταν από τους μεγαλύτερους της καλλιέργειας και ήταν ο πρώτος που μειώθηκε τόσο αισθητά. Στο δείγμα αυτό βγήκε αναπάντεχα η παροχή του αέρα για κάποιες ώρες. Το φαινόμενο αυτό πιθανώς να οφείλεται σε συνδυασμό 4 παραγόντων:

1. στην εξάντληση των θρεπτικών του μέσου της καλλιέργειας, μιας και στο συγκεκριμένο δείγμα οι ανάγκες για θρεπτικά ήταν αυξημένες λόγω της αυξημένης φωτοσυνθετικής

δραστηριότητας που παρουσίασε. Ο παράγοντας που περιορίζει την ανάπτυξη των μικροφυκών είναι ο φώσφορος. Μόλις εξαντληθεί ο φώσφορος το άζωτο δεν μπορεί να αφομοιωθεί από το κύτταρο των φυκών (Dziosa and Makowska, 2016). Το άζωτο είναι στοιχείο των αμινοξέων, των νουκλεϊκών οξέων (δομικά στοιχεία πρωτεΐνης) και των χλωροπλαστών. Ο φώσφορος παίζει σημαντικό ρόλο στις μεταβολικές διεργασίες των ζωντανών οργανισμών μέσω ενδοκυτταρικών διεργασιών (Dziosa and Makowska, 2016). Στο υδάτινο οικοσύστημα ο φώσφορος είναι η αιτία της αυξημένης ανάπτυξης των φυκών (Bednarz et. al., 2002).

2. στην αναστολή της ανάπτυξης των μικροφυκών λόγω συσσώρευσης συμβατών διαλυμένων ουσιών που δρουν ωσμωπροστατευτικά για να σταθεροποιήσουν τα ενζυμα του μεταβολισμού (Fatma et. al., 2007) και
3. σε φωτοαναστολή λόγω καταστροφής της φωτοσυνθετικής συσκευής ή των συστατικών της λόγω υψηλής έντασης φωτισμού με αποτέλεσμα την ελάττωση του ρυθμού φωτοσύνθεσης.
4. Στη μειωμένη ποσότητα CO₂ που οδηγεί σε μειωμένη φωτοσυνθετική ικανότητα.

Παρόμοια πορεία δείχνει πως θα ακολουθούσε και το δείγμα 40ppt XL το οποίο είχε υψηλές πυκνότητες κυττάρων και μάλιστα τις μέγιστες ανάμεσα σε όλα τα δείγματα όλων των συνθηκών πιθανώς για τους 3 πρώτους λόγους.

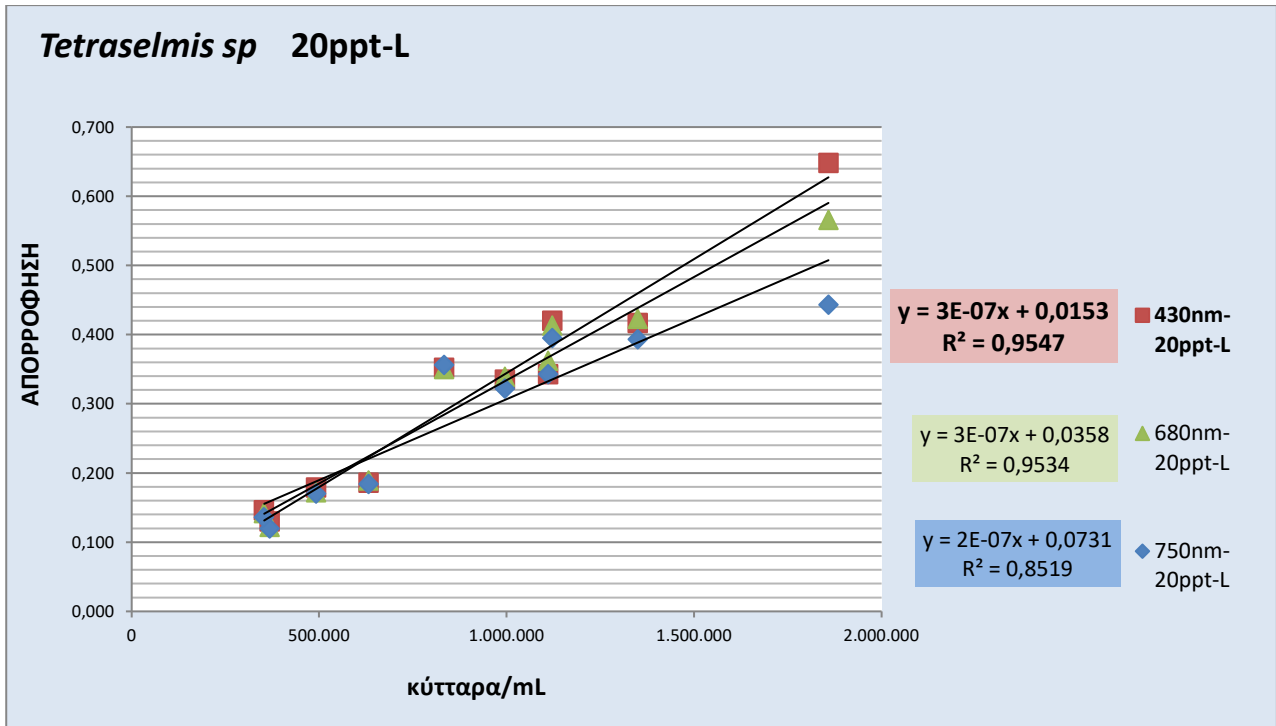
3.1.2. Αλατότητα

Μεταξύ των δειγμάτων της υψηλής έντασης φωτισμού αλλά με διαφορετική αλατότητα τα δείγματα με τις υψηλότερες αλατότητες 60ppt-XL και 40ppt-XL είχαν τις μεγαλύτερες πυκνότητες αλλά όπως αναφέρθηκε παραπάνω η καλλιέργεια καταρρέει σχετικά σύντομα. Η αλατότητα επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροφυκών επιδρώντας άμεσα στο φωτοσύστημα II της φωτοσύνθεσης (Barsanti and Gualtieri, 2006; Bilanovic, 2009) και ο θρεπτικός περιορισμός όπως το N μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και αλλαγές στη φωτοσυνθετική απόδοση (Parkhill et. al., 2001). Το δείγμα όμως της αλατότητας 20ppt-XL ενώ έχει επίσης υψηλές πυκνότητες είναι στη στατική φάση όπως φαίνεται και από την **εικόνα 36** ενώ οι άλλοι 2 πληθυσμοί έχουν εισέλθει στη φάση κατάρρευσης – θανάτου.

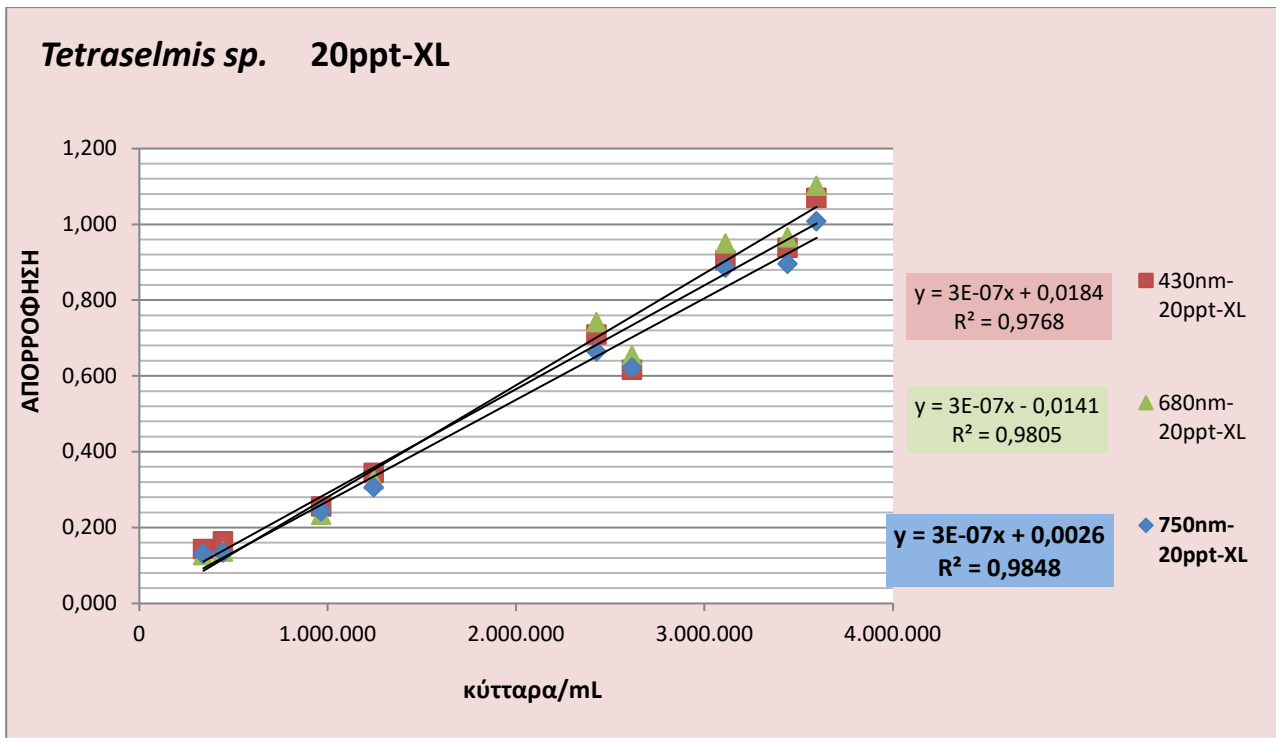
Μεταξύ των δειγμάτων της χαμηλής έντασης φωτισμού τις μέγιστες πυκνότητες εμφάνισαν επίσης τα δείγματα με τις υψηλές αλατότητες 60ppt-L και 40ppt-L κατά τη 15^η ημέρα της καλλιέργειας. Και τα 3 αυτά δείγματα όπως φαίνεται επίσης στην **εικόνα 36** έχουν μπει στη στατική φάση της καλλιέργειας όμως την 15^η ημέρα της καλλιέργειας.

Αντίστοιχα πειράματα των Khatoon et. al. (2014) έδειξαν ότι το *Tetraselmis sp.* και το *Nannochloropsis sp.* εμφάνισαν καλύτερη κυτταρική πυκνότητα σε αλατότητα 30ppt σε ένταση φωτισμού 1588 lux. Οι διαφορές πιθανώς να οφείλονται σε διαφορετικά είδη του ίδιου γένους.

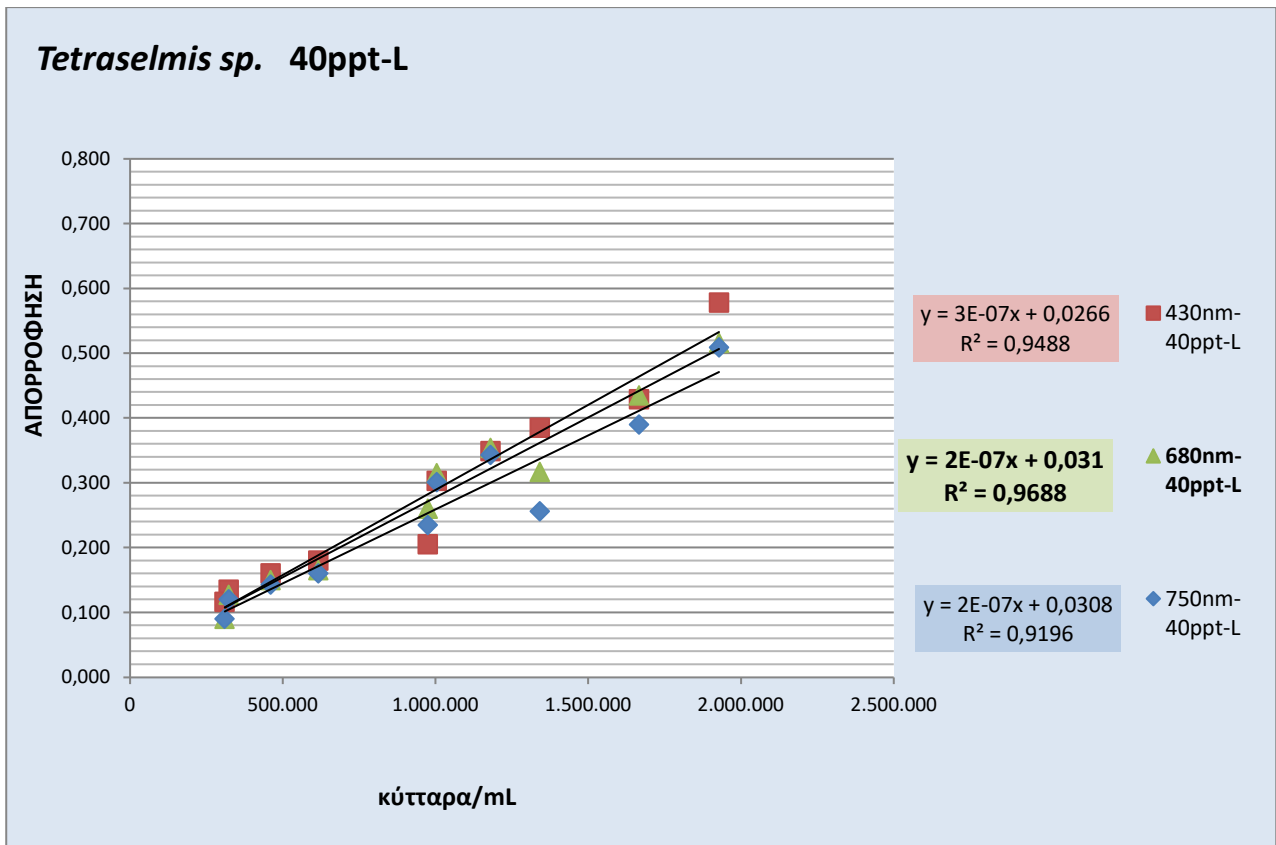
Τα δεδομένα από τις μετρήσεις στο μικροσκόπιο συσχετίστηκαν σε μεγάλο βαθμό με τις οπτικές απορροφήσεις κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου και οι συσχετίσεις με τους αντίστοιχους συντελεστές συσχέτισης R² παρουσιάζονται παρακάτω στις **εικόνες 85-90**



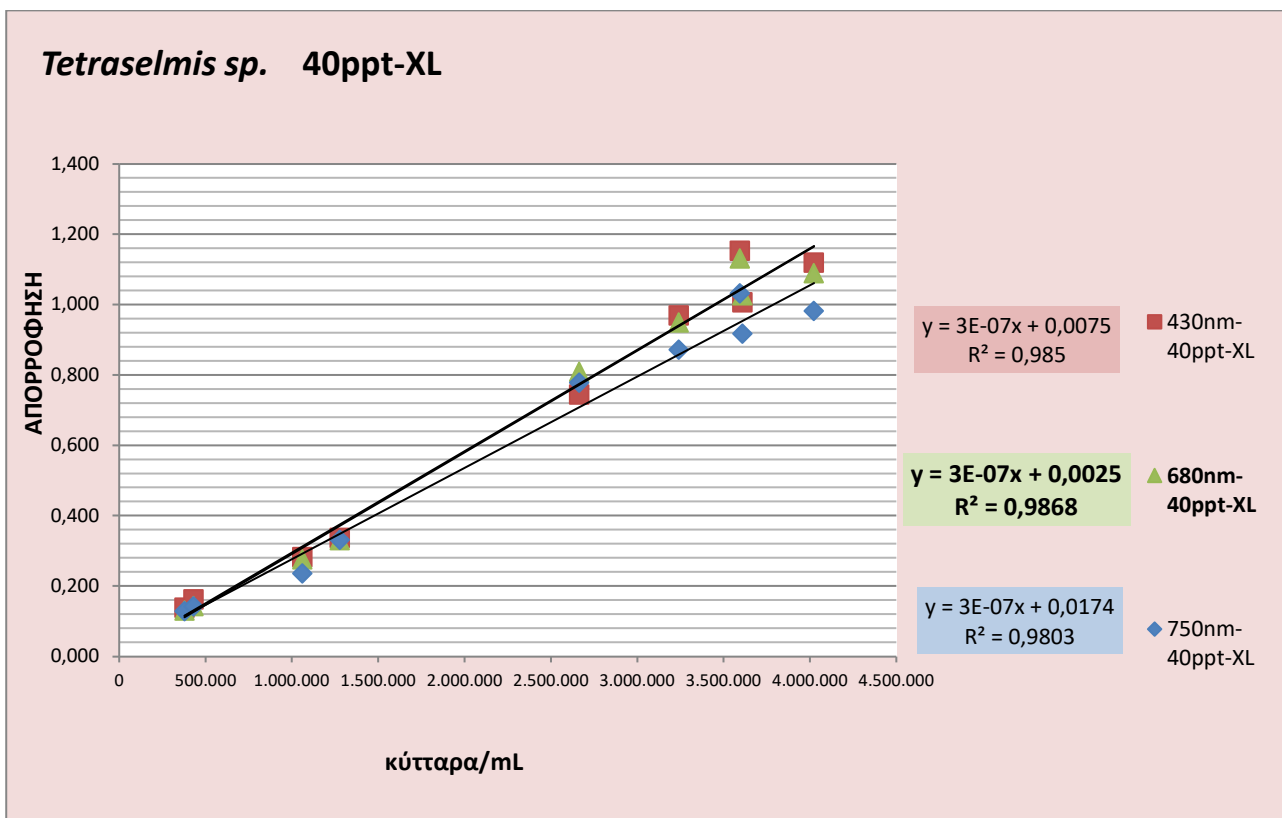
Εικόνα 85. *Tetraselmis sp.*, συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 430-680-750nm και πυκνότητας σε αλατότητα 20ppt και χαμηλή ένταση φωτισμού(2000 lux).



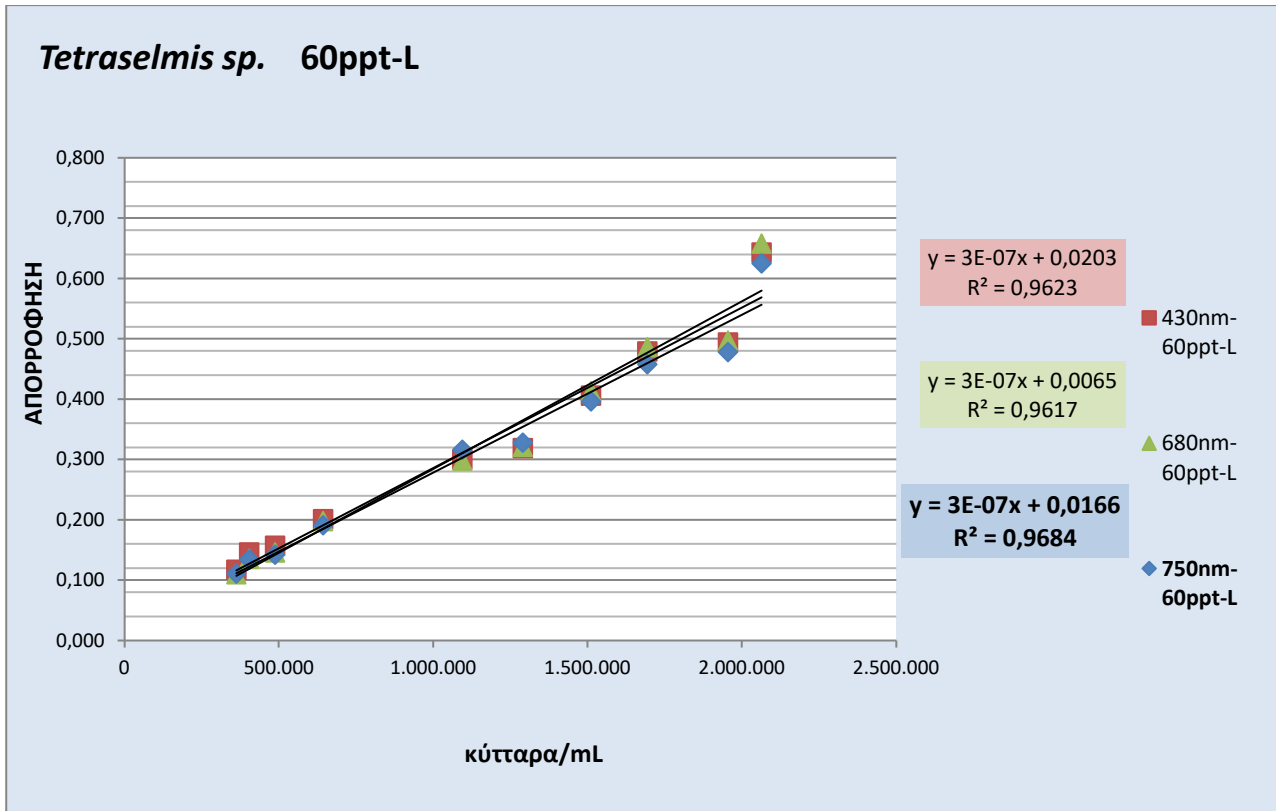
Εικόνα 86. *Tetraselmis sp.*, συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 430-680-750nm και πυκνότητας σε αλατότητα 20ppt και υψηλή ένταση φωτισμού(8000 lux).



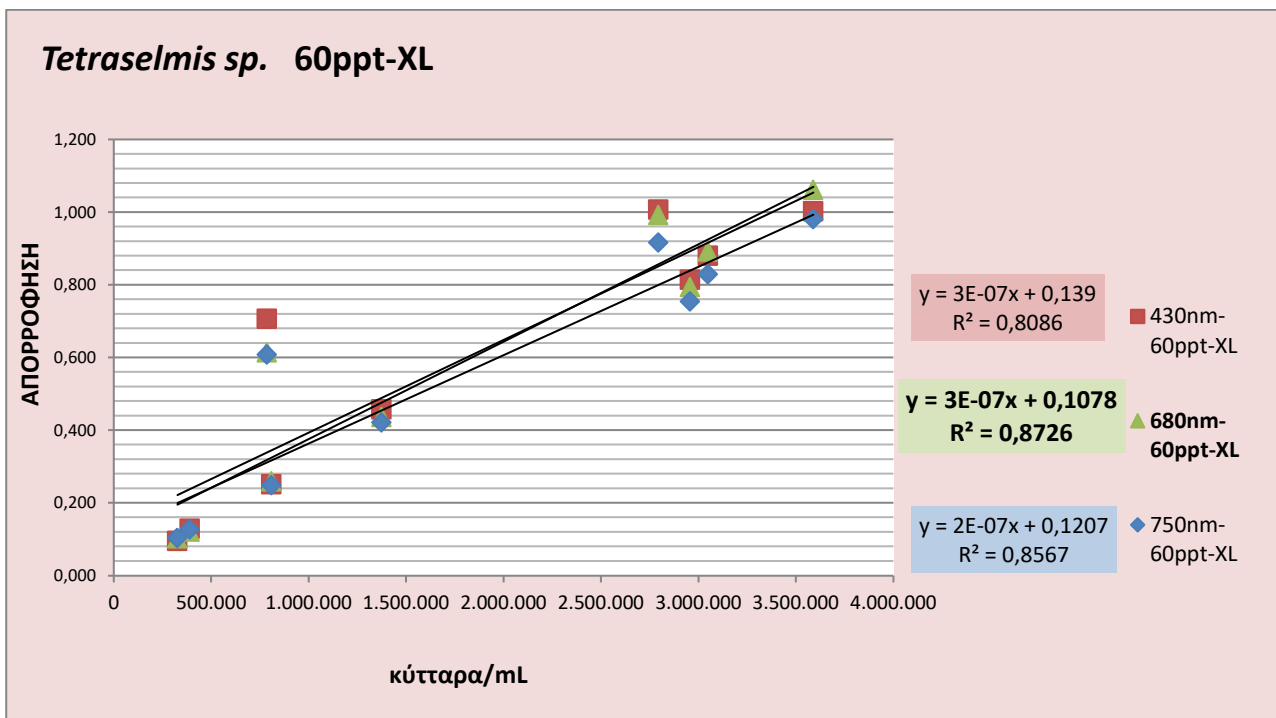
Εικόνα 87. *Tetraselmis sp.*, συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 430-680-750nm και πυκνότητας σε αλατότητα 40ppt και χαμηλή ένταση φωτισμού(2000 lux).



Εικόνα 88 *Tetraselmis sp.*, συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 430-680-750nm και πυκνότητας σε αλατότητα 40ppt και υψηλή ένταση φωτισμού(8000 lux).



Εικόνα 89 *Tetraselmis sp.*, συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 430-680-750nm και πυκνότητας σε αλατότητα 60ppt και χαμηλή ένταση φωτισμού(2000 lux).



Εικόνα 90 *Tetraselmis sp.*, συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 430-680-750nm και πυκνότητας σε αλατότητα 60ppt και υψηλή ένταση φωτισμού(8000 lux).

Η οπτική πυκνότητα έδειξε παρόμοια τάση όπως οι μετρήσεις από το μικροσκόπιο επειδή σχετίζονται άμεσα. Λόγω των υψηλών συντελεστών συσχέτισης μπορούμε μέσω της οπτικής πυκνότητας να προσδιορίζουμε την κυτταρική συγκέντρωση της καλλιέργειας που είναι μια πιο

εύκολη διαδικασία από τον προσδιορισμό της στο μικροσκόπιο. Σύμφωνα με τους Nur et. al., (2017) η άμεση σχέση του αριθμού κυττάρων και της οπτικής πυκνότητας αποδεικνύει την ορθή διαχείριση της καλλιέργειας. Καλύτερο μήκος κύματος για το προσδιορισμό της κυτταρικής συγκέντρωσης είναι αυτό στο οποίο εμφανίζεται ο μεγαλύτερος συντελεστής συσχέτισης.

Στο δείγμα αλατότητας **20ppt-L** μεγαλύτερος συντελεστής συσχέτισης εμφανίζεται στα **430nm**. Στο δείγμα **20ppt-XL** μεγαλύτερη συσχέτιση εμφανίστηκε στα **750nm**. Στο δείγμα αλατότητας **40ppt-L** μεγαλύτερη συσχέτιση εμφανίστηκε στα **680nm**. Στο δείγμα **40ppt-XL** στα **680nm**. Στο δείγμα αλατότητας **60ppt-L** μεγαλύτερη συσχέτιση παρουσιάστηκε στα **750nm** και στο δείγμα **60ppt-XL** στα **680nm**. Παρατηρήθηκε ότι στην αλατότητα 40ppt το μήκος κύματος με τη μεγαλύτερη συσχέτιση ήταν τα 680nm και στις 2 εντάσεις φωτισμού ενώ στα άλλα δείγματα υπήρχαν διαφοροποιήσεις τόσο μεταξύ της ίδιας αλατότητας όσο και μεταξύ της ίδιας έντασης φωτισμού.

Οι υψηλές συσχετίσεις που εμφανίζονται στα 430nm και 680nm ίσως οφείλονται στις υψηλές συγκεντρώσεις διαφόρων χρωστικών ουσιών στο κύτταρο του *Tetraselmis sp.* γιατί σύμφωνα με τους Griffiths et. al. (2011) η εκτίμηση της συγκέντρωσης μέσω της οπτικής απορρόφησης μπορεί να οδηγήσει σε σφάλμα λόγω απορρόφησης μέρος της ακτινοβολίας από τις χρωστικές του κυττάρου. Επίσης οι Rahija και Hui (2019) υποστηρίζουν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του μεγέθους των κυττάρων και της οπτικής απορρόφησης (μεγαλύτερα κύτταρα οδηγούν σε μεγαλύτερη οπτική απορρόφηση). Τα κύτταρα των μικροφυκών έχουν την τάση να αλλάζουν μέγεθος και σχήμα ως απόκριση στις περιβαλλοντικές συνθήκες, στην αλατότητα, στη φάση της καλλιέργειας αλλά ακόμα και κατά τη διάρκεια της νύχτας λόγω σημαντικών μεταβολικών διεργασιών. (Σύμφωνα με τους Xu et. al. (2016) αλλαγή (μείωση) στον όγκο των κυττάρων του *Dunaliella salina* κατά τη διάρκεια της νύχτας, μπορεί να είναι αποτέλεσμα της αλλαγής της περιεκτικότητας του κυττάρου σε γλυκερόλη επειδή κατά τη διάρκεια της νύχτας λόγω της απουσίας της φωτοσύνθεσης δεν αφομοιώνεται C για παραγωγή γλυκερόλης και το άμυλο καταναλώνεται κατά την αναπνοή). Επίσης η αλλαγή του όγκου των κυττάρων μπορεί να είναι αποτέλεσμα της αλλαγής της περιεκτικότητας των κυττάρων σε γλυκερόλη (Iskander et. al., 2016). Το πραγματικό μέγεθος της γλυκερόλης μπορεί να είναι η αντανάκλαση πολλαπλών στρατηγικών επιβίωσης υπό καθεστώς υψηλής έντασης φωτισμού δεδομένου ότι η γλυκερόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μεμβρανική αναγέννηση ή να αποθηκεύεται με τη μορφή αμύλου. Επίσης μπορεί να χρησιμεύσει ως βιοσυμβατική διαλυμένη ουσία ή να βοηθήσει στην αναδίπλωση κατεστραμμένων πρωτεϊνών (Lamitina et. al., 2006).

Σύμφωνα με τους Rad et. al., (2011) οι οργανισμοί που μπορούν να επιβιώσουν σε υψηλές αλατότητες και υψηλές εντάσεις φωτισμού για να επιβιώσουν συνθέτουν γλυκερόλη και β-καροτένιο για προστασία από την ωσμωτική πίεση και την υψηλή ένταση φωτισμού αντίστοιχα. Επίσης σε μελέτες των Arun και Singh (2013) στα είδη *Dunaliella salina* και *Dunaliella tetriolecta* η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη α αυξήθηκε με την αύξηση της αλατότητας. Όπως προκύπτει και στην **εικόνα 24** οι υψηλές συσχετίσεις στα 430nm και τα 680nm πιθανώς να συνδέονται με την αυξημένη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη και καροτενοειδή.

Παρακολουθώντας την καλλιέργεια και μετά την 11^η ημέρα που σταματάνε οι μετρήσεις με το μικροσκόπιο, μέχρι και την 17^η ημέρα παρατηρήθηκε η μεγίστη τιμή απορρόφησης σε δείγμα

χαμηλής έντασης φωτισμού (60pprt-L). Όλα τα δείγματα της χαμηλής έντασης φωτισμού εμφανίζουν αυξητική πορεία κατά τη 17^η ημέρα. Η καλλιέργεια φαίνεται ότι θα ξεπερνούσε σίγουρα τις 20 ημέρες σε αντίθεση με τα αντίστοιχα δείγματα της υψηλής έντασης φωτισμού τα οποία είχαν εισέλθει στη φάση της κατάρρευσης-θανάτου από τη 10^η με 11^η ημέρα της καλλιέργειας σύμφωνα με την **εικόνα 24**. Η κατάρρευση των δειγμάτων αυτών ίσως οφείλεται σε συνδυασμό της επίδρασης της μείωση των θρεπτικών του μέσου της καλλιέργειας λόγω έντονης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και της φωτοαναστολής. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για μια εμπορικής κλίμακας καλλιέργεια. Από τα δείγματα του χαμηλού φωτισμού εκείνα των υψηλών αλατοτήτων 60pprt και 40pprt εμφάνισαν υψηλότερες τιμές. Επίσης στον **πίνακα 6** στις πρώτες θέσεις εμφανίζονται τα μήκη κύματος 430nm και 680nm ίσως για τους ίδιους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω (σφάλμα εκτίμησης λόγω παραγωγής χρωστικών στο κύτταρο).

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι με βάση την οπτική απορρόφηση τα δείγματα του υψηλού φωτισμού είχαν τις μέγιστες πυκνότητες αλλά σύντομα κατέρρευσαν ενώ τα δείγματα του χαμηλού φωτισμού αυξάνονταν με πολύ αργότερο ρυθμό αλλά δεν είχαν φτάσει στη φάση κατάρρευσης μέχρι και την 17^η ημέρα.

3.2 Βιομάζα

Τα ξηρά βάρη μετρήθηκαν στο τέλος της καλλιέργειας προκειμένου να προσδιοριστεί η βιομάζα των καλλιερειών. Στην **εικόνα 35** βλέπουμε ότι μεγαλύτερες τιμές σε ξηρά βάρη εμφανίζουν τα δείγματα υψηλού φωτισμού και ιδιαίτερα το δείγμα 60pprt-XL το οποίο μπήκε στη φάση κατάρρευσης-θανάτου πρώτο από όλα τα δείγματα. Ενώ οι πληθυσμοί αυτοί ήταν στη φάση της κατάρρευσης παρουσιάζουν αυξημένα ξηρά βάρη. Τα ξηρά βάρη και κατά συνέπεια η βιομάζα συνδέονται με το περιεχόμενο του κυττάρου σε λιπίδια και λιπαρά οξέα.

Μεγάλης διάρκειας ημέρες και υψηλή ένταση φωτισμού οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή βιομάζας σε σχέση με μικρής διάρκειας ημέρες και χαμηλής έντασης φωτισμό (Meseck et. al., 2005). Οι μελέτες αυτές έρχονται σε συμφωνία με αντίστοιχες των Sushchik et. al. (2003) και Olofsson et. al., (2012) όπου ανέφεραν ότι οι υψηλές θερμοκρασίες και οι υψηλές εντάσεις φωτισμού προωθούν την παραγωγή περισσότερων λιπαρών οξέων από συνθήκες χαμηλής έντασης φωτισμού και χαμηλής θερμοκρασίας. Αν και ο παράγοντας θερμοκρασία παρέμενε σχετικά σταθερός στο χώρο του εργαστηρίου (19-24°C) η θερμοκρασία στα δοχεία που είναι κοντά στις λάμπες για να εκτίθενται σε 8000 lux πιθανώς να ήταν μεγαλύτερη από εκείνη στα αντίστοιχα της χαμηλής έντασης φωτισμού (2000 lux).

Η εξάντληση των θρεπτικών και η ηλικία της καλλιέργειας μπορεί να προκαλέσουν αύξηση της συνολικής περιεκτικότητας λιπιδίων και υδατανθρακών στα μικροφύκη (Zhu et. al., 1997). Επίσης οι Richmond (1986) και Henley et. al. (2002) υποστήριξαν ότι η αλατότητα, τα θρεπτικά, η θερμοκρασία, το pH και το φως είναι μερικοί από τους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή βιομάζας, την ανάπτυξη και τη βιοχημική σύνθεση των μικροφυκών. Η σύνθεση των λιπιδίων στο *Isochrysis galbana* πραγματοποιείται στη στατική φάση (Zhu et. al., 1997; Espinoza et. al., 2002; Guermazi et. al., 2014). Τέλος πειράματα στα *Dunaliella salina* και *Dunaliella bardawil* έδειξαν ότι η παραγωγή β-καροτενίου ήταν στενά συνδεδεμένη με τη συσσώρευση λιπαρών οξέων (Park et. al., 2013). Η παραγωγή καροτενοειδών συνδέεται με συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού

(Lers et. al., 1990) ως μηχανισμός προστασίας από τις πολύ υψηλές εντάσεις φωτισμού (Rad et. al., 2011). Αυτά ίσως μπορούν να εξηγήσουν τις υψηλές τιμές στα ξηρά βάρη αυτών των δειγμάτων υψηλής έντασης φωτισμού του *Tetraselmis sp.*

Ενώ η οπτική πυκνότητα είναι ένα βολικό έμμεσο μέτρο της εκτίμησης της συγκέντρωσης της βιομάζας σε χρωματισμένα κύτταρα όπως τα μικροφύκη, σύμφωνα με τους Griffiths et. al. (2011) μπορεί να προκύψουν σφάλματα από τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης για τον προσδιορισμό του πραγματικού ξηρού βάρους λόγω της συγκέντρωσης στο εσωτερικό των κυττάρων, χρωστικών ουσιών λόγω ηλικίας της καλλιέργειας ή ανάπτυξης. Οι προτεινόμενες στρατηγικές είναι η επιλογή μήκους κύματος που ελαχιστοποιεί την απορρόφηση από τις χρωστικές (Griffiths et. al., 2011).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα των μετρήσεων των ξηρών βαρών έδειξαν ότι τα δείγματα της υψηλής έντασης φωτισμού της χαμηλής (20rpt) και ιδιαίτερα της υψηλής (60rpt-που ήταν στη φάση κατάρρευσης) αλατότητας έδωσαν υψηλές τιμές σε βιομάζα τη 15^η ημέρα της καλλιέργειας σε αντίθεση με τα δείγματα της χαμηλής έντασης φωτισμού τα οποία σύμφωνα με την **εικόνα 24** βρίσκονταν στη στατική φάση και ίσως η βιομάζα τους τότε θα άρχιζε να αυξάνεται γεγονός που δείχνει ότι θα χρειαζόνταν περισσότερο χρόνο για να αποκτήσουν τις μέγιστες τιμές τους σε βιομάζα. Το δείγμα 60rpt-XL ήταν αυτό που ολοκλήρωσε πιο γρήγορα την ανάπτυξη του με την υψηλότερη απόδοση σε βιομάζα συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα. Αυτό το γεγονός είναι ιδιαίτερα σημαντικό για εμπορικής κλίμακας καλλιέργειες για παραγωγή βιομάζας.

3.3 Ρυθμός Αύξησης

Οι ρυθμοί αύξησης των μικροφυκών επηρεάζονται από ένα συνδυασμό περιβαλλοντικών παραμέτρων όπως η ένταση του φωτός, η φωτοπερίοδος, η θρεπτική σύσταση του μέσου της καλλιέργειας (Groom et. al., 2008; Kitaya et. al., 2008; Mata et. al., 2010) και η αλατότητα.

Μέγιστο ρυθμό αύξησης είχε το δείγμα αλατότητας 60rpt-XL με $\mu=0,41$. Παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα που εκτέθηκαν στις υψηλές εντάσεις φωτισμού είχαν μεγαλύτερους ρυθμούς αύξησης από εκείνα της χαμηλής έντασης φωτισμού. Ο ρυθμός αύξησης των μικροφυκών είναι πολύ ευαίσθητος σε συνθήκες καλλιέργειας όπως η ακτινοβολία και η φωτοπερίοδος (Hue et. al., 2011; Ho et. al., 2013). Αυτό σημαίνει ότι η κατάλληλη ένταση φωτισμού έχει μεγάλη σημασία για την εξασφάλιση υψηλού ρυθμού αύξησης των φυκών.

Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν στο *Skeletonema costatum* όπου υψηλές εντάσεις φωτισμού οδήγησαν σε υψηλό ρυθμό αύξησης (Singh S.P. and Singh P., 2015). Ενώ κατά τους Rosales et. al. (2005) η αύξηση της αλατότητας συνδέεται συνήθως με μείωση του ρυθμού αύξησης και της φωτοσυνθετικής ικανότητας, αντίθετα το *Tetraselmis sp.* εμφάνισε τους χαμηλότερους ρυθμούς αύξησης στα δείγματα 20rpt-L και 60rpt-L. Πιθανώς η επίδραση της αλατότητας στο ρυθμό αύξησης είναι διαφορετική σε κάθε είδος και επηρεάζεται και από το φωτισμό.

Από το ρυθμό αύξησης υπολογίζεται και ο χρόνος γενεάς της καλλιέργειας που μας δείχνει το χρόνο που χρειάζεται ο πληθυσμός για να διπλασιαστεί. Όπως φαίνεται και από τον **πίνακα 8** τα δείγματα με τους μεγαλύτερους ρυθμούς αύξησης είχαν το λιγότερο χρόνο γενεάς δηλαδή λιγότερες μέρες μέχρι να διπλασιαστεί ο πληθυσμός. Άρα οι παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό αύξησης επηρεάζουν και το χρόνο γενεάς της καλλιέργειας.

3.4 pH

Το pH σε όλα τα δείγματα παρουσίασε αύξηση με την αύξηση της ηλικίας της καλλιέργειας. Τόσο κατά τη φωτοσύνθεση όσο και κατά τη μετατροπή των ανθρακικών ιόντων σε CO₂ και την δέσμευσή του, παράγονται ιόντα OH⁻ και ως εκ τούτου η τάση στις καλλιέργειες των φυκών είναι να αυξάνεται το pH (Γκέλης κ.α., 2015). Επίσης η φωτοσυνθετική διαδικασία στα μικροφύκη προκαλεί αύξηση του pH στο υδάτινο περιβάλλον ως αποτέλεσμα της κυτταρικής πρόσληψης πρωτονίων παρά ως αποτέλεσμα της κατανάλωσης CO₂ (Zerveas et. al., 2021).

Την 11^η ημέρα της καλλιέργειας αποσυνδέθηκε αναπάντεχα η παροχή του αέρα και το δείγμα 60ppt-XL άλλαξε χρώμα και από πρασινωπό έγινε κοκκινωπό. Μετρήθηκε το pH του σε ηρεμία όπως βρέθηκε και είχε pH= 9,50 ενώ μετά την σύνδεση με τον αέρα και αφού αναδεύτηκε καλά το pH του ήταν περισσότερο και ίσο με 9,62. Από εκείνη τη στιγμή οι φιάλες ονομαστήκαν μητρικές και από αυτές χωρίστηκε μικρή ποσότητα σε μικρότερες φιάλες τις θυγατρικές και τοποθετήθηκαν στις αντίστοιχες εντάσεις φωτισμού με τις μητρικές, αλλά χωρίς παροχή αέρα. Κατά τη διάρκεια των επόμενων ημερών όλα τα δείγματα της υψηλής έντασης φωτισμού άλλαξαν χρώμα από πράσινα έγιναν κόκκινα. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στο δείγμα 60ppt-XL η αλλαγή του χρώματος που πιθανώς οφείλεται σε παραγωγή χρωστικών δεν οφειλόταν στην διακοπή της παροχής του αέρα αλλά στην υψηλή ένταση του φωτός. Δηλαδή το φαινόμενο αυτό ενδεχομένως θα εμφανιζόταν και χωρίς την αποσύνδεση του αέρα στη φιάλη 60ppt-XL. Ίσως η πιθανή έλλειψη CO₂ σε συνδυασμό με την υψηλή ένταση φωτός και την επίσης υψηλή αλατότητα οδήγησαν τον πληθυσμό σε παραγωγή καροτενοειδών ως απόκριση στις στρεσογόνες συνθήκες νωρίτερα από τα άλλα δείγματα.

Το pH των θυγατρικών δειγμάτων (χωρίς αέρα) από την 11^η- 17^η ημέρα της καλλιέργειας ήταν πολύ μεγαλύτερο από εκείνο των μητρικών δειγμάτων που είχαν παροχή αέρα. Παρατηρήθηκε αλκαλοποίηση των διαλυμάτων λόγω αύξησης OH⁻ στο διάλυμα, γιατί τα μικροφύκη κατά τη φωτοσύνθεση απορροφούν μεγάλες ποσότητες πρωτονίων από το υδάτινο περιβάλλον τους και αυξάνουν το pH αναλογικά (Zerveas et. al., 2021). Χωρίς να παρέχεται στο διάλυμα επιπλέον CO₂ από την παροχή του αέρα ώστε να εξισορροπήσει τις αλλαγές του pH από τη φωτοσύνθεση (Χώτος, 2016) το pH στο δείγμα αυξάνεται.

Οι αντίστοιχες οπτικές απορροφήσεις ήταν πολύ χαμηλές αλλά μετά τη σύνδεση του αέρα οι τιμές άρχισαν να αυξάνονται. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην αύξηση του CO₂ αλλά και στην ανάδευση του δείγματος η οποία ευνοεί την έκθεση όλων των κυττάρων στο φως ώστε να φωτοσυνθέσουν.

3.5 Συμπέρασμα *Tetraselmis sp.*

Μεταξύ των 2 παραγόντων ο παράγοντας ένταση φωτισμού ήταν ο σημαντικότερος. Επηρέασε σημαντικά όλα τα δείγματα. Στα 8000 lux παρατηρηθήκαν οι μέγιστες κυτταρικές πυκνότητες, οι μέγιστες οπτικές απορροφήσεις, τα μέγιστα ξηρά βάρη και οι μέγιστοι ρυθμοί αύξησης.

Η αλατότητα επηρέασε σημαντικά τα δείγματα της υψηλής έντασης φωτισμού, όχι όμως τα δείγματα χαμηλής έντασης φωτισμού τα οποία είχαν παρόμοιες τιμές τόσο σε κυτταρική πυκνότητα όσο και σε βιομάζα. Στην υψηλή αλατότητα εμφανίστηκε η μέγιστη και ελάχιστη βιομάζα του *Tetraselmis sp.* ανάλογα την ένταση του φωτισμού.

2. *Dunaliella salina*

2.1 Ανάπτυξη

2.1.1. Φωτισμός

Η ανάπτυξη των πληθυσμών στις συνθήκες υψηλού φωτισμού (XL) εμφανίζουν σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους αντίστοιχους της χαμηλής έντασης φωτισμού (L). Οι πληθυσμοί με έντονο φωτισμό (XL) εμφανίζουν μεγαλύτερη πυκνότητα σε σύγκριση με τους αντίστοιχους της χαμηλής έντασης φωτός (L) εκτός από το δείγμα της αλατότητας 100ppt που η χαμηλή ένταση φωτισμού εμφανίζει μεγαλύτερη κυτταρική συγκέντρωση από το αντίστοιχο της υψηλής έντασης φωτισμού. Η υψηλή ένταση φωτισμού έδειξε να ευνοεί την ανάπτυξη του μικροφύκου *Dunaliella salina*.

Παρόμοια συμπεριφορά, αναφέρουν και οι Singh et. al. (2000) όπου με αύξηση της έντασης φωτισμού αυξήθηκε με ταχύτερο ρυθμό η ανάπτυξη της *Dunaliella salina* απ' ό,τι σε συνθήκες με χαμηλή ένταση φωτισμού. Επίσης οι Abu-Rezq et. al. (2010) αναφέρουν ότι 2 διαφορετικά στελέχη του *Dunaliella salina* από το Κουβέιτ και την Αυστραλία παρουσίασαν βέλτιστη ανάπτυξη σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού (18000 lux). Με αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν και τα πειράματα των Xu et. al. (2016) σύμφωνα με τους οποίους, τα κύτταρα του στελέχους *Dunaliella salina* CCAP 19/30 διατηρήσαν το μέγιστο δυνατό επίπεδο φωτοσυνθετικής ικανότητας και ο ρυθμός ανάπτυξης αυξήθηκε καθώς αυξήθηκε η ένταση φωτισμού.

Η ικανότητα του *Dunaliella salina* να έχει ενισχυμένη φωτοσυνθετική λειτουργία σε συνθήκες στρες έχει αναφερθεί και από τους Liska et. al. (2004). Όταν τα κύτταρα του *Dunaliella* εκτεθούν σε υψηλές εντάσεις φωτισμού συνθέτουν καροτενοειδή, ως προστατευτικό μηχανισμό έναντι στη φθορά (Kim et. al., 2013; Mulders et. al., 2014; Park et. al., 2013; Salguero et. al., 2003), βέβαια διαφορετικά στελέχη μπορεί να εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στην απόκριση τους στο στρες από το φωτισμό και διαφορετική ευαισθησία στην ένταση φωτισμού (Xu et. al., 2016). Μελέτες των Xu et. al. (2016) στη σύνθεση και την περιεκτικότητα των κυττάρων σε γλυκερόλη κατά την έκθεση τους σε διάφορες συνθήκες έντονου φωτισμού, ανέφεραν ότι η περιεκτικότητα της γλυκερόλης στα κύτταρα διπλασιάστηκε σε έντονο φωτισμό. Η γλυκερόλη μπορεί να βοηθήσει τη φωτοσυνθετική απόδοση σε υψηλές εντάσεις φωτισμού γιατί η σύνθεση της μπορεί να μειώσει την πιθανότητα φωτοαναστολής με απομάκρυνση ηλεκτρονίων από τον πρωταρχικό δέκτη ηλεκτρονίων του φωτοσυστήματος II κατά τη φωτοσύνθεση (Xu et. al., 2016).

Σύμφωνα με τους Yilancioglu et. al. (2014) υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της γλυκερόλης και της μέγιστης αποτελεσματικής φωτοσυνθετικής απόδοσης, δηλαδή η γλυκερόλη εκτός από τη ρύθμιση της ωσμωτικής ισορροπίας καθορίζει την απόδοση και τη βιοχημική σύνθεση της βιομάζας υπό οξειδωτικό στρες. Επίσης οι Davis et. al. (2015) διαπίστωσαν ότι τα κύτταρα του *Dunaliella* περιείχαν υψηλότερο περιεχόμενο γλυκερόλης σε υψηλές εντάσεις φωτισμού.

Η υψηλότερη κυτταρική περιεκτικότητα σε γλυκερόλη που αναπτύσσεται σε υψηλές εντάσεις φωτισμού υποδεικνύει μεγαλύτερης διαμέτρου κύτταρα σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού

και ο μέσος όγκος των κυττάρων αυξάνεται πράγματι με την ένταση του φωτός (Xu et. al., 2016; Park et. al., 2013).

2.1.2. Αλατότητα

Ενώ στα δείγματα μεταξύ της ίδιας αλατότητας οι διαφορές στην κυτταρική συγκέντρωση είναι σχετικά μικρή, στο δείγμα με αλατότητα 20ppt η διαφορά είναι πολύ μεγάλη. Το δείγμα της υψηλής έντασης έχει σχεδόν 23.000.000 κύτταρα/mL ενώ το αντίστοιχο της χαμηλής έντασης φωτισμού είναι στα 14.863.000 κύτταρα/mL. Επίσης παρατηρήθηκε ότι όσο αυξανόταν η αλατότητα η συγκέντρωση των κυττάρων ήταν μικρότερη. Αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι η υψηλή αλατότητα συνδέεται συνήθως με μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και της φωτοσυνθετικής αποτελεσματικότητας πιθανώς επειδή η αλατότητα επηρεάζει τη χρήση του φωτός και το μεταβολισμό για την εξουδετέρωση των ιονικών και ωσμωτικών τάσεων (Rosales et. al., 2005).

Φαίνεται ότι και οι 2 παράγοντες τόσο η ένταση φωτισμού όσο και η αλατότητα επηρεάζουν την ανάπτυξη της *Dunaliella salina*.

Μεταξύ των δειγμάτων της ίδιας έντασης φωτισμού και διαφορετικών αλατοτήτων, στην υψηλή ένταση φωτισμού μεγαλύτερη ανάπτυξη εμφανίστηκε στην αλατότητα 20ppt (23.006.667) και μάλιστα με μεγάλη διαφορά από το αμέσως επόμενο της αλατότητας 40ppt (13.405.000). Την χαμηλότερη τιμή είχε το δείγμα της αλατότητας 100ppt (4.188.889). φαίνεται πως η αύξηση της αλατότητας έχει αρνητική επίδραση στην αύξηση του πληθυσμού του *Dunaliella salina*. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα στη χαμηλή ένταση φωτισμού. Όσο αυξανόταν η αλατότητα η κυτταρική συγκέντρωση μειωνόταν. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με τα αποτελέσματα των πειραμάτων των Khatoun et. al. (2017) οι οποίοι καλλιέργησαν το *Dunaliella salina* σε αλατότητες 10ppt 30ppt και 50ppt και διαπίστωσαν ότι η ανάπτυξη του ήταν σημαντικά υψηλότερη και γρηγορότερη στην χαμηλή αλατότητα 10ppt συγκριτικά με τις άλλες δυο αλατότητες.

Οι Murata και Miyago (1985) έδειξαν ότι όταν οι μεμβράνες του φωτοσυστήματος II εκτίθενται σε υψηλές συγκεντρώσεις NaCl οι εξωτερικές πρωτεΐνες του μηχανισμού που αναπτύσσει το οξυγόνο αποσυνδέονται από τη μεμβράνη του εσωτερικού συγκροτήματος. Στο *Porphyra perforate* το στρες της αλατότητας μείωσε τη δραστηριότητα του PS II λόγω μειωμένης ενέργειας διέγερσης που έφτανε στα κέντρα αντίδρασης του PS II, δηλαδή βλάβη στην οξειδωτική πλευρά του PS II. Οι Gilmour et. al. (1985) είχαν δείξει τη σημαντική αναστολή της φωτοσύνθεσης λόγω μείωσης των δραστηριοτήτων του PS II από το στρες της αλατότητας στη *Dunaliella tetriolecta*. Επίσης αντίστοιχες μελέτες των Liu et. al. (2012) στη *Dunaliella salina* έδειξαν ότι υψηλές αλατότητες προκάλεσαν αναστολή της δραστηριότητας του φωτοσυστήματος II πιθανώς λόγω σχηματισμού ενεργών μορφών O₂ (βλαβερές μορφές-ROS).

Τα κύτταρα του *Dunaliella* αποκρίνονται αμέσως σε υπερωσμωτικό στρες μειώνοντας τον όγκο των κυττάρων τους λόγω της εκροής νερού κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης (Chen and Jiang, 2009). Οι στερόλες της πλασματικής μεμβράνης αισθάνονται την αλλαγή του όγκου των κυττάρων και ενεργοποιούν τη σύνθεση της γλυκερόλης (Zelazny et. al., 1995).

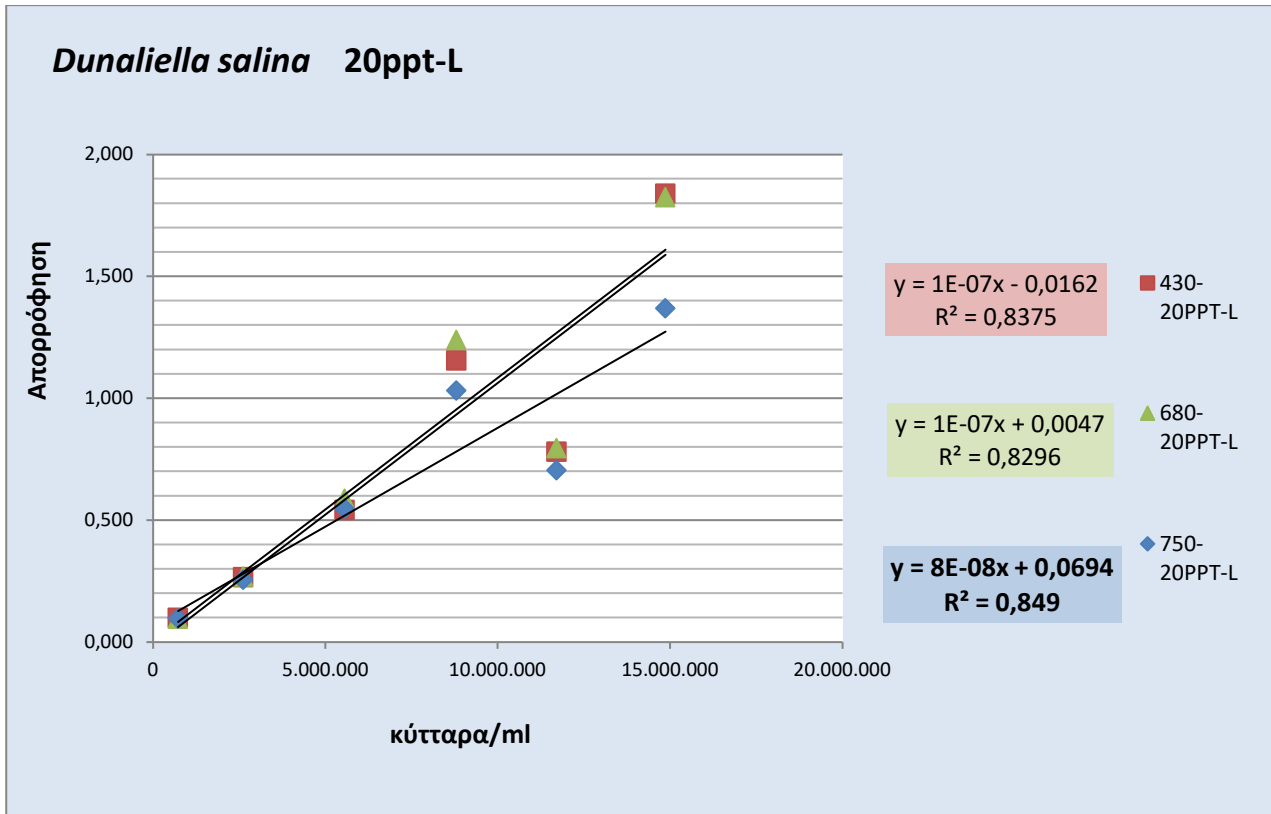
Επίσης στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι με αύξηση της αλατότητας αυξάνονταν τα συσσωματώματα και μειωνόταν η κινητικότητα. Στα δείγματα 100ppt δεν υπήρχε καθόλου κινητικότητα. Οι Lurling and Beekman (2006) επίσης παρατήρησαν ότι σε υψηλές αλατότητες υπήρχαν συσσωματώματα στο *Chlamydomonas reinhardtii* είτε λόγω απουσίας/δυσλειτουργίας του μαστιγίου είτε λόγω ζελατινοποιήσεων της μεμβράνης μετά την αλληλεπίδραση της με το περιβάλλον.

Παρατηρώντας όλα τα δείγματα όλων των συνθηκών τη 18^η ημέρα της καλλιέργειας (τελευταία), θα μπορούσαμε να πούμε ότι η χαμηλή αλατότητα 20ppt (20ppt-L και 20ppt-XL) ήταν η ευνοϊκότερη για τη βέλτιστη ανάπτυξη η οποία δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την ένταση φωτισμού σε σύγκριση με τις υπόλοιπες αλατότητες (40-60ppt) διότι σε αυτές εμφανίστηκαν οι μεγαλύτερες πυκνότητες κυττάρων. Αντίστοιχα στις υψηλές αλατότητες (100ppt-L και 100ppt-XL) επειδή εμφανίστηκαν οι χαμηλότερες πυκνότητες κυττάρων μπορεί επίσης να θεωρηθεί ότι ο φωτισμός δεν επηρέασε σημαντικά τα 2 δείγματα συγκριτικά με τα υπόλοιπα (40-60ppt).

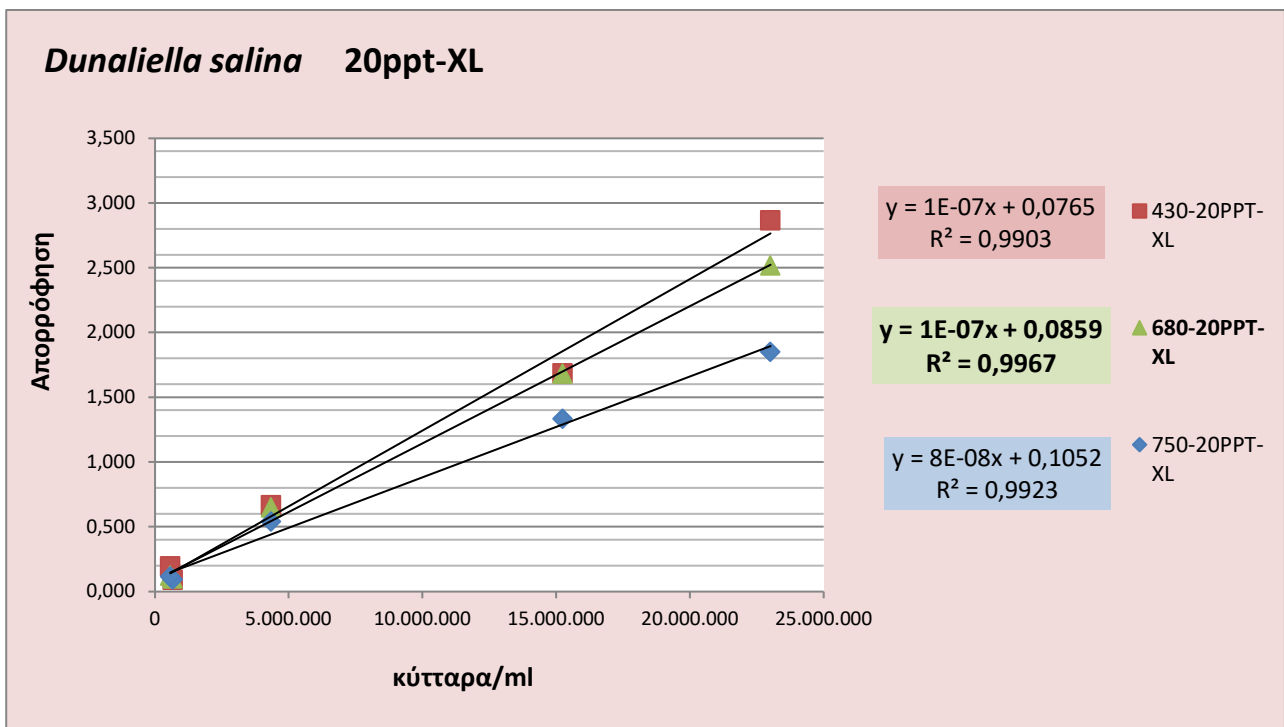
Στις μεσαίες αλατότητες 40 και 60ppt παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα της υψηλής έντασης φωτισμού εμφάνισαν μεγαλύτερες πυκνότητες κυττάρων άρα στις αλατότητες αυτές ο παράγοντας φωτισμός επηρέασε την ανάπτυξη του *Dunaliella salina* σημαντικά.

Συνοπτικά στις ακραίες αλατότητες 20 και 100 ppt εμφανίζονται αντίστοιχα οι μεγαλύτερες και οι μικρότερες πυκνότητες κυττάρων και η αλατότητα φαίνεται να είναι ο κυριότερος παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη του μικροφύκου, ενώ στις μεσαίες αλατότητες 40 και 60ppt και οι δυο παράγοντες φαίνεται να επηρεάζουν εξίσου την ανάπτυξη του *Dunaliella salina*.

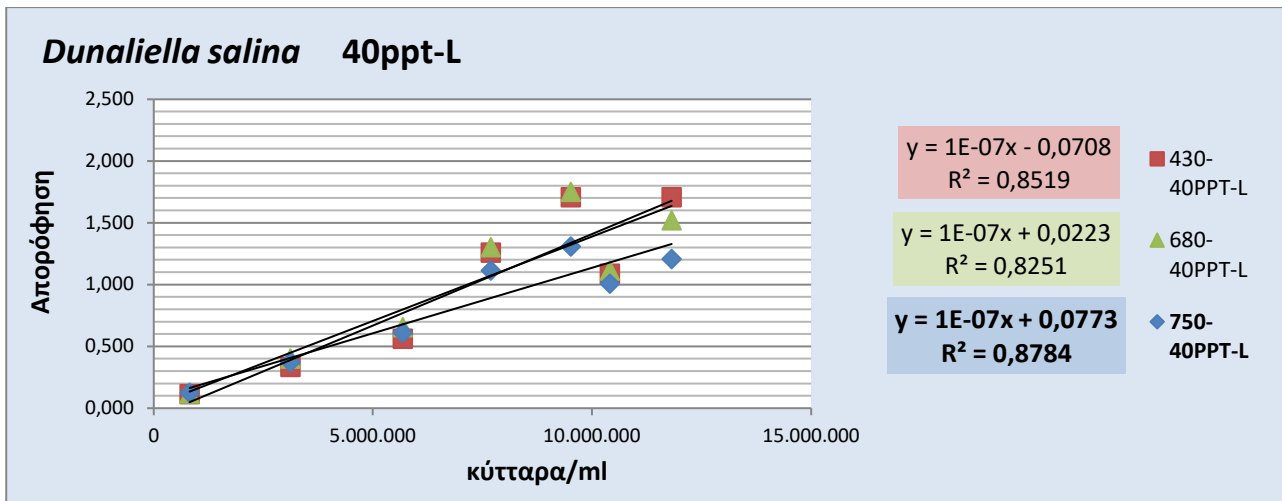
Η κυτταρική συγκέντρωση συσχετίστηκε με την οπτική απορρόφηση η οποία έδειξε παρόμοια τάση. Οι συσχετίσεις φαίνονται στις [εικόνες 91-98](#).



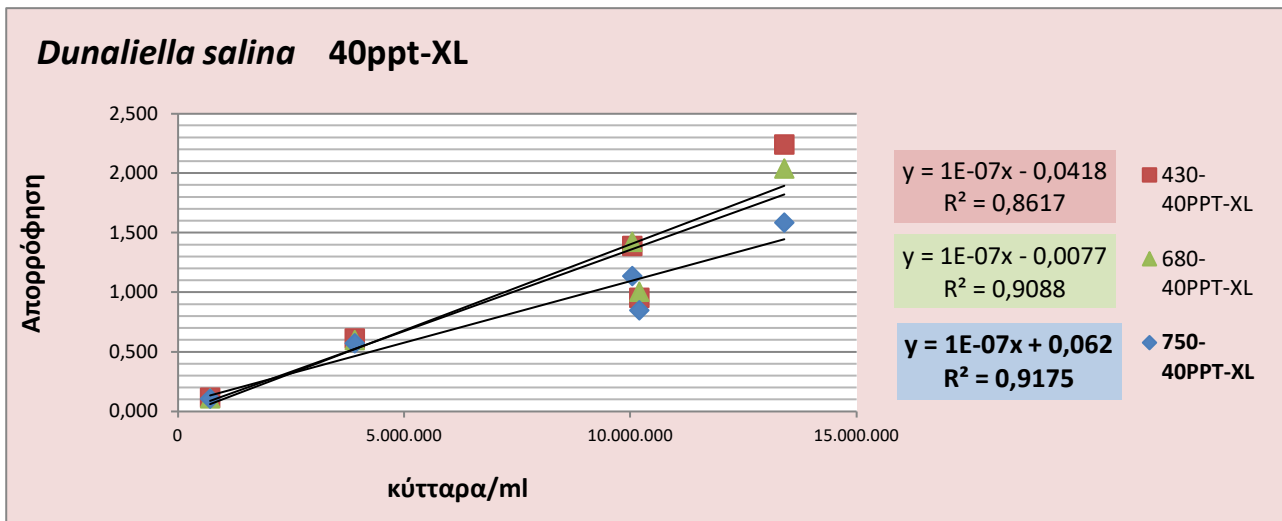
Εικόνα 91. *Dunaliella salina*, συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 430-680-750nm και πυκνότητας σε αλατότητα 20ppt και χαμηλή ένταση φωτισμού(2000 lux).



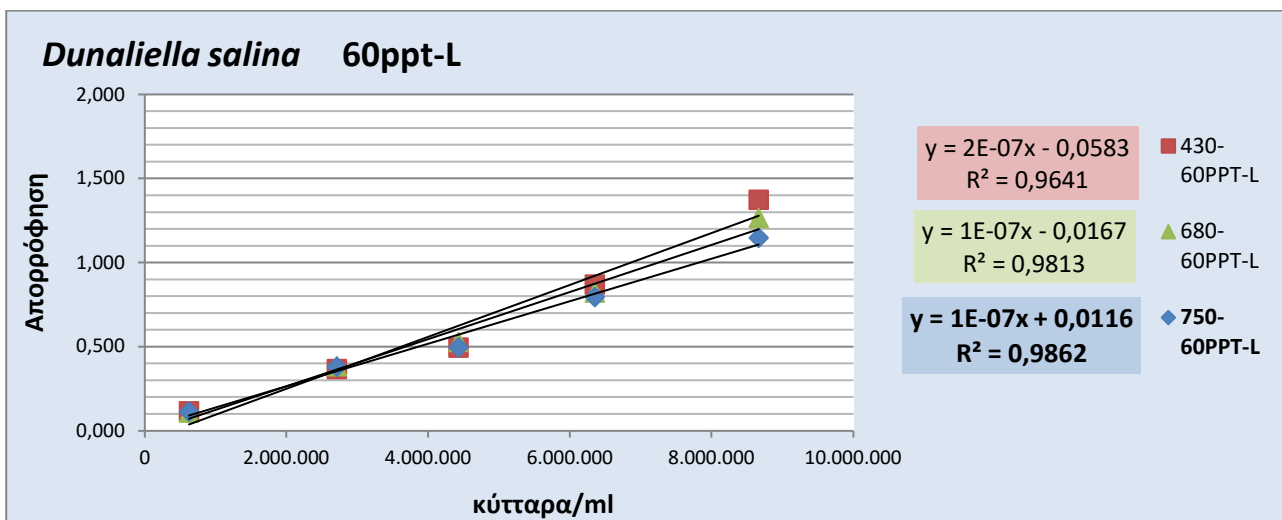
Εικόνα 92. *Dunaliella salina*, συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 430-680-750nm και πυκνότητας σε αλατότητα 20ppt και υψηλή ένταση φωτισμού(8000 lux).



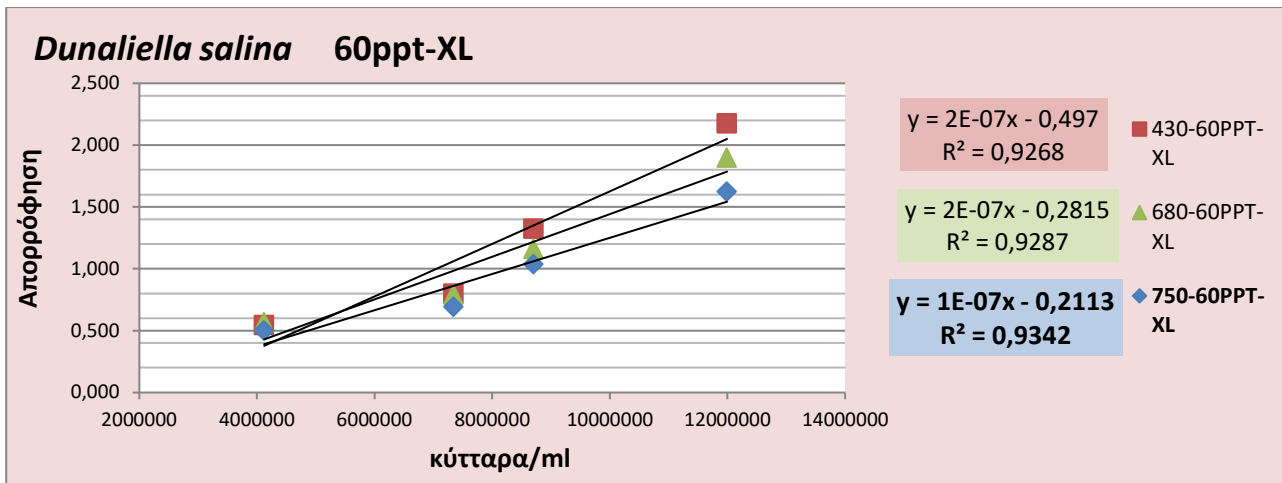
Εικόνα 93. *Dunaliella salina*, συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 430-680-750nm και πυκνότητας σε αλατότητα 40ppt και χαμηλή ένταση φωτισμού(2000 lux).



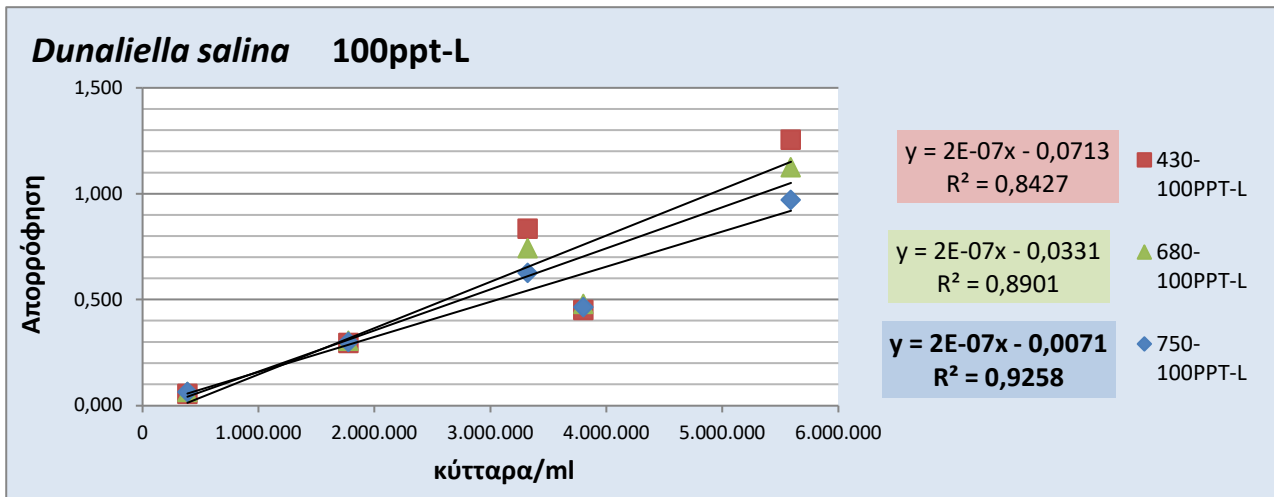
Εικόνα 94. *Dunaliella salina*, συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 430-680-750nm και πυκνότητας σε αλατότητα 40ppt και υψηλή ένταση φωτισμού(8000 lux).



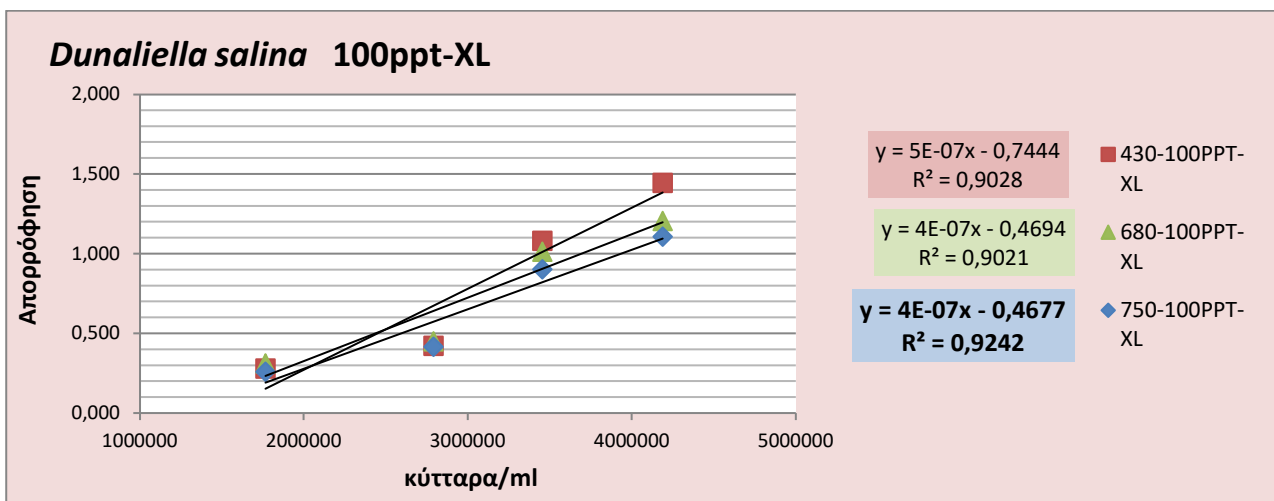
Εικόνα 95. *Dunaliella salina*, συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 430-680-750nm και πυκνότητας σε αλατότητα 60ppt και χαμηλή ένταση φωτισμού(2000 lux).



Εικόνα 96. *Dunaliella salina*, συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 430-680-750nm και πυκνότητας σε αλατότητα 60ppt και υψηλή ένταση φωτισμού(8000 lux).



Εικόνα 97. *Dunaliella salina*, συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 430-680-750nm και πυκνότητας σε αλατότητα 100ppt και χαμηλή ένταση φωτισμού(2000 lux).



Εικόνα 98. *Dunaliella salina*, συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 430-680-750nm και πυκνότητας σε αλατότητα 100ppt και υψηλή ένταση φωτισμού(8000 lux).

Από τους συντελεστές συσχέτισης παρατηρήθηκε υψηλή συσχέτιση μεταξύ της κυτταρικής συγκέντρωσης με την οπτική απορρόφηση. Εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι σε όλα τα δείγματα εκτός ενός δείγματος (20ppt-XL) η μεγαλύτερη συσχέτιση εμφανίζεται στα 750nm. Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα λόγω των πιθανών χρωστικών που μπορεί να παραχθούν από τα μικροφύκη αυτά, μετρώντας στα μήκη κύματος που απορροφούν και οι χρωστικές (οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή) μπορεί να οδηγηθούμε σε σφάλμα (Griffiths et. al. 2011). Οπότε μπορεί να θεωρηθεί ότι με τις συσχέτισες στα 750nm δεν θα οδηγηθούμε σε σφάλμα εκτίμησης της πυκνότητας.

Στο δείγμα 20ppt-XL η συσχέτιση με τα 680nm μπορεί να οφείλεται στην παραγωγή χρωστικών (χλωροφυλλών) αν και οι συντελεστές συσχέτισης έχουν πολύ μικρή διαφορά.

Από τις οπτικές απορροφήσεις των δειγμάτων κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας παρατηρήθηκε ότι μέγιστες τιμές απορρόφησης εμφανίστηκαν στην αλατότητα 20ppt-XL στα 430 και 680nm. Γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τις παραπάνω συσχετίσεις. Επίσης τις επόμενες υψηλότερες τιμές εμφανίζουν τα δείγματα 60ppt-XL και 40ppt-XL στα μήκη κύματος 430nm και 680nm. Αυτό δεν συμφωνεί απόλυτα με τις παραπάνω συσχετίσεις και πιθανώς οι τιμές απορρόφησης σε αυτά τα μήκη κύματος έχουν επηρεαστεί από την παραγωγή χρωστικών. Επίσης τα δείγματα της υψηλότερης αλατότητας (100ppt) εμφανίζουν τις χαμηλότερες τιμές απορρόφησης όπως και στις μετρήσεις από το μικροσκόπιο. Γενικά τα περισσότερα μήκη κύματος που εμφανίζουν τις μεγαλύτερες τιμές απορρόφησης είναι τα 430nm και τα 680nm, πιθανώς λόγω σύνθεσης χρωστικών (καροτενοειδών και χλωροφυλλών).

Το μικροφύκος αυτό παράγει μεγάλες ποσότητες β-καροτένιου υπό συνθήκες στρες όπως η υψηλή ένταση φωτισμού (Vorst et. al., 1994; Coesel et. al., 2008; Lamers et. al., 2010), η υψηλή αλατότητα (Vorst et. al., 1994; Hadi et. al., 2008), ο περιορισμός θρεπτικών συστατικών (Marin et. al., 1998; Coesel et. al., 2008), η στέρση πρόσληψης αζώτου (Sanchez-Estudillo et. al., 2006; Lamers et. al., 2012). Εκτός από την παραγωγή β-καροτένιου η *Dunaliella salina* παράγει και ζεαξανθίνη η οποία συσχετίζεται με παραμέτρους της φυτοπροστασίας (Demming-Adams and Adams 1992; Muller et. al., 2001). Στο *Dunaliella bardawil* η παραγωγή ζεαξανθίνη κορέστηκε στα 14.800 lux ενώ στο στέλεχος *Dunaliella salina* CCAP 19/18 όχι (Park et. al., 2013). Γενικά στα πειράματα των Park et. al., (2013) το *Dunaliella salina* CCAP 19/18 είχε αυξημένη παραγωγή β-καροτένιου λόγω υψηλού φωτισμού και εμφανίστηκε ανθεκτικό σε συνθήκες στρες από υψηλές εντάσεις φωτισμού.

Συμπερασματικά λόγω των υψηλών συσχετίσεων μεταξύ οπτικής απορρόφησης και κυτταρικής συγκέντρωσης η πυκνότητα του πληθυσμού μπορεί να παρακολουθηθεί από την οπτική απορρόφηση σε ένα μήκος κύματος που δεν απορροφάται από τις χρωστικές.

2.2 Βαθμονόμηση

Η καμπύλη βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των μικροφυκών είναι κοινή και αποτελείται από τη συσχέτιση μεταξύ οπτικής πυκνότητας και αριθμού κυττάρων. Είναι ένα πολύ χρηστικό εργαλείο για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των μικροφυκών.

Από τις καμπύλες βαθμονόμησης μπορούμε να υπολογίσουμε την κυτταρική συγκέντρωση όλων των δειγμάτων μέσω της οπτικής απορρόφησης που παρουσιάζουν. Η καλύτερη συσχέτιση είναι

αυτή στα 680nm. Σύμφωνα με τους Rahija and Hui (2019) απαιτείται δημιουργία νέας καμπύλης βαθμονόμησης όταν στο περιβάλλον οι συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού αλλάζουν, καθώς το μέγεθος των μικροφυκών μπορεί να ποικίλει από μια κατάσταση σε άλλη. Υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του μεγέθους των μικροφυκών και της οπτικής απορρόφησης.

2.3 pH

Το pH των δειγμάτων θα έπρεπε να αυξάνεται σταδιακά με την αύξηση της ηλικίας της καλλιέργειας. Όμως εδώ εμφανίζεται μια πτώση, έκτος από το δείγμα 20ppt-L, που η αύξηση είναι αμελητέα και το δείγμα 40ppt-L, που επίσης η αύξηση είναι πολύ μικρή. Σε αυτούς τους έντονα φωτοσυνθετικούς πληθυσμούς που οι πυκνότητες των πληθυσμών ειδικά στο δείγμα 20ppt-XL φτάνουν τα 23.000.000 κύτταρα /mL το pH θα έπρεπε να είναι υψηλότερο του αρχικού. Ο αερισμός των φιαλών κατεβάζει το pH της καλλιέργειας γιατί το CO₂ που διαλύεται στο νερό μειώνει την ποσότητα των OH⁻ και κατά συνέπεια το pH μειώνεται. Αντίθετα η έντονη φωτοσυνθετική δραστηριότητα αυξάνει την πρόσληψη των H⁺ και του CO₂ του κυττάρου από το υδατικό περιβάλλον του με αποτέλεσμα το pH να αυξάνεται (Zerveas et. al., 2021). Άρα λοιπόν η μείωση του pH των δειγμάτων οφείλεται είτε σε ρυθμό παροχής CO₂ μεγαλύτερο από την ρυθμό πρόσληψης αυτού αλλά και του H⁺, είτε σε σφάλμα του οργάνου. Το πιθανότερο είναι να οφείλεται σε σφάλμα του οργάνου.

2.4 Φάσεις Ανάπτυξης

Από την **εικόνα 62** παρατηρούμε ότι οι πληθυσμοί μέχρι τη 18^η ημέρα της καλλιέργειας είναι στην στατική φάση ανάπτυξης με παροχή αέρα, ενώ πειράματα των Abu-Reza et. al. (2010) έδειξαν ότι η καλλιέργεια του *Dunaliella salina* διήρκησε 15 ημέρες με παροχή CO₂ ενώ χωρίς παροχή η διάρκεια της καλλιέργειας ήταν μεγαλύτερη, πάνω από 20 ημέρες.

Στη φάση καθυστέρησης τα κύτταρα είναι βιώσιμα αλλά δεν ήταν σε κατάσταση να υποστούν διαίρεση επειδή απαιτούν ένα ορισμένο χρονικό διάστημα για προσαρμογή στο νέο περιβάλλον (Barsanti and Gualtieri, 2006). Επίσης στην εκθετική φάση ο μεταβολισμός των κυττάρων προσαρμόστηκε σε ανάπτυξη με παραγωγή περισσότερων ενζύμων και μεταβολιτών για δέσμευση του άνθρακα και για κυτταρική διαίρεση (Barsanti and Gualtieri, 2006). Σύμφωνα με τους Mohan et. al., (2012) η συγκέντρωση λιπιδίων στα μικροφύκη παρατηρείται στην αρχή ή στο τέλος του σταδίου ανάπτυξης. Διαφέρει όμως από είδος σε είδος.

2.5 Ρυθμός Αύξησης

Οι ρυθμοί αύξησης των μικροφυκών επηρεάζονται από ένα συνδυασμό περιβαλλοντικών παραμέτρων όπως η ένταση του φωτός, η φωτοπερίοδος, η θρεπτική σύσταση του μέσου της καλλιέργειας (Groom et. al., 2008; Kitaya et. al., 2008; Mata et. al., 2010) και η αλατότητα.

Μέγιστο ρυθμό αύξησης είχε το δείγμα αλατότητας 20ppt-XL με $\mu=0,41$. Ακολούθησε το δείγμα 40ppt-XL και στη συνέχεια το 20ppt-L. Παρατηρήθηκε ότι όσο η αλατότητα αυξανόταν (έκτος από το δείγμα 40ppt-XL) ο ρυθμός αύξησης των δειγμάτων μειωνόταν. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα από τα πειράματα των Arun and Singh (2013) για το *Dunaliella salina* το οποίο με την αύξηση της αλατότητας εμφάνισε μείωση του ρυθμού αύξησης και του επιπέδου της χλωροφύλλης αλλά αύξηση του συνολικού επιπέδου καροτενοειδών και γλυκερόλης στο κύτταρο.

Αυτό δείχνει ότι ο παράγοντας αλατότητα επηρεάζει σημαντικά το ρυθμό ανάπτυξης και περισσότερο από ότι ο παράγοντας φωτισμός.

Ο ρυθμός αύξησης των μικροφυκών είναι πολύ ευαίσθητος σε συνθήκες καλλιέργειας όπως η ακτινοβολία και η φωτοπερίοδος (Xue et. al., 2011; Ho et. al., 2013). Αυτό σημαίνει ότι η κατάλληλη ένταση φωτισμού έχει μεγάλη σημασία για την εξασφάλιση υψηλού ρυθμού αύξησης των φυκών. Επίσης κατά τους Rosales et. al. (2005) η αύξηση της αλατότητας συνδέεται συνήθως με μείωση του ρυθμού αύξησης και της φωτοσυνθετικής ικανότητας. Ίσως γι' αυτούς τους λόγους τα δείγματα των υψηλών αλατοτήτων έχουν τους μικρότερους ρυθμούς αύξησης.

Από το ρυθμό αύξησης υπολογίζεται και ο χρόνος γενεάς της καλλιέργειας που μας δείχνει το χρόνο που χρειάζεται ο πληθυσμός για να διπλασιαστεί. Όπως φαίνεται και από τον [πίνακα 19](#) τα δείγματα με τους μεγαλύτερους ρυθμούς αύξησης είχαν το λιγότερο χρόνο γενεάς δηλαδή λιγότερες μέρες μέχρι να διπλασιαστεί ο πληθυσμός. Άρα οι παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό αύξησης επηρεάζουν και το χρόνο γενεάς της καλλιέργειας.

2.6 Συμπέρασμα για *Dunaliella salina*

Συμπερασματικά, η ανάπτυξη του *Dunaliella salina* έδειξε ότι επηρεάστηκε σημαντικά από την αλατότητα. Με την αύξηση της αλατότητας οι κυτταρικές συγκεντρώσεις, οι οπτικές απορροφήσεις και οι ρυθμοί αύξησης μειώνονταν, παρόλο που είναι ένα είδος ανθεκτικό σε εξαιρετικά υψηλές αλατότητες. Ο παράγοντας φωτισμός επίσης επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξη του *Dunaliella salina*, κάτω από υψηλές εντάσεις φωτισμού εμφάνισε τη μέγιστη κυτταρική πυκνότητα.

3. *Phormidium sp.*

3.1 Ανάπτυξη

Μετρώντας τα ξηρά βάρη του *Phormidium sp.* προκειμένου να προσδιορίσουμε την ανάπτυξη του, παρατηρήθηκε ότι στην αλατότητα 20ppt δεν εμφανίστηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των πληθυσμών υψηλής και χαμηλής έντασης φωτισμού. Όμως με την αύξηση της αλατότητας τα δείγματα που ήταν εκτεθειμένα σε υψηλές εντάσεις φωτισμού (8000lux) παρουσίασαν μεγαλύτερη ανάπτυξη, με το δείγμα της υψηλής αλατότητας 60ppt να έχει εμφανίσει τη μέγιστη ανάπτυξη. Η ένταση φωτισμού και η φωτοπερίοδος είναι πρωταρχικοί και κρίσιμοι παράγοντες που καθορίζουν το ρυθμό ανάπτυξης των καλλιεργειών των μικροφυκών (Parmar et. al., 2011; Wahidin et. al., 2013). Επίσης τα φύκη διαφέρουν ως προς την ανεκτικότητα τους στην αλατότητα (Rao et. al., 2007). Τα κυανοβακτήρια *Phormidium foveolarum* και *Nostoc muscorum* κάτω από συνθήκες χαμηλού φωτισμού (1300 lux) εμφανίζουν αυξημένη περιεκτικότητα σε υπεροξείδιο υδρογόνου (H₂O₂), ελεύθερες ρίζες υδροξειδίου και υπεροξειδωση λιπιδίων (Kumar et. al., 2015).

Και οι δυο παράγοντες φαίνεται να επηρεάζουν το *Phormidium sp.* και πιθανώς να δρουν συνεργιστικά.

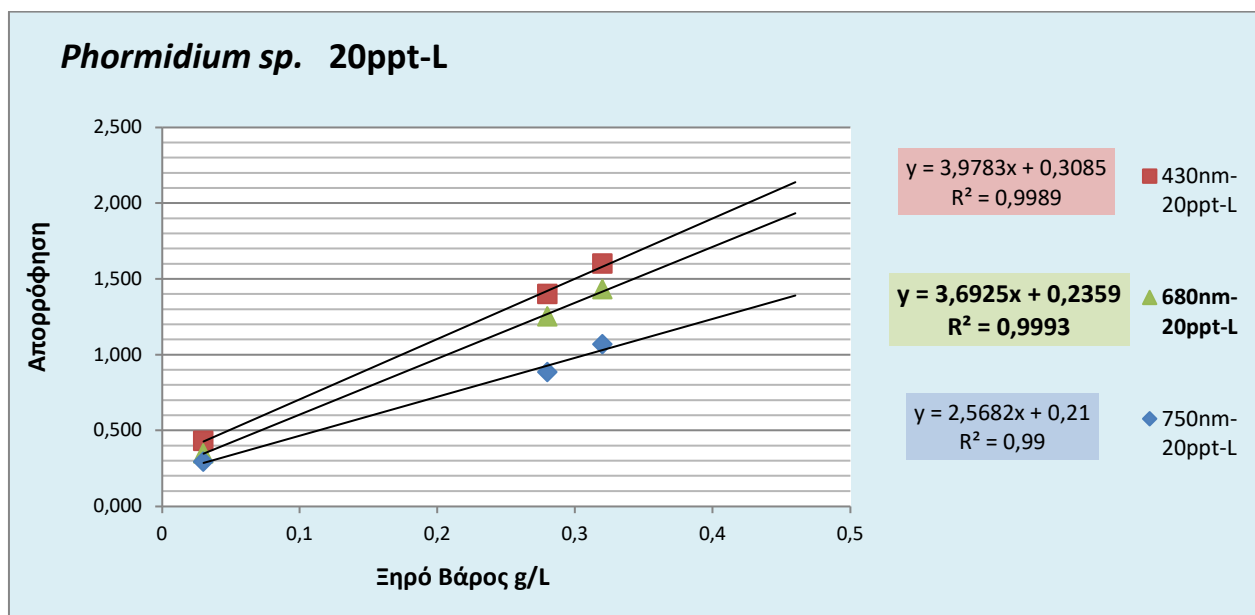
Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έρχονται σε απολυτή συμφωνία με τη μελέτη των Kumar et. al. (2015) σύμφωνα με τους οποίους τα *Phormidium foveolarum* και *Nostoc muscorum* όπου

(καλλιιεργήθηκαν κάτω από διάφορες συνθήκες φωτισμού και αλατότητας) η ανάπτυξη των εγκλιματισμένων στη αλατότητα πληθυσμών εμφάνιζε αύξηση όσο αυξανόταν η ένταση φωτισμού ενώ σε χαμηλή ένταση φωτισμού τα κύτταρα δεν μπορούσαν να απομακρύνουν τα υπεροξείδια υδρογόνου και τις ελεύθερες ρίζες υδροξειδίου που σχηματίζονταν εξαιτίας της, με αποτέλεσμα να προκαλούν σοβαρό οξειδωτικό στρες. Αντίθετα στις καλλιέργειες υψηλής έντασης φωτισμού (12.000 lux) έδειξαν μεγαλύτερη φωτοσυνθετική προσαρμογή και οι ενισχυμένες δραστηριότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων αντισταθμίζουν με επιτυχία το οξειδωτικό στρες αποδεικνύοντας τις τεράστιες δυνατότητες εγκλιματισμού.

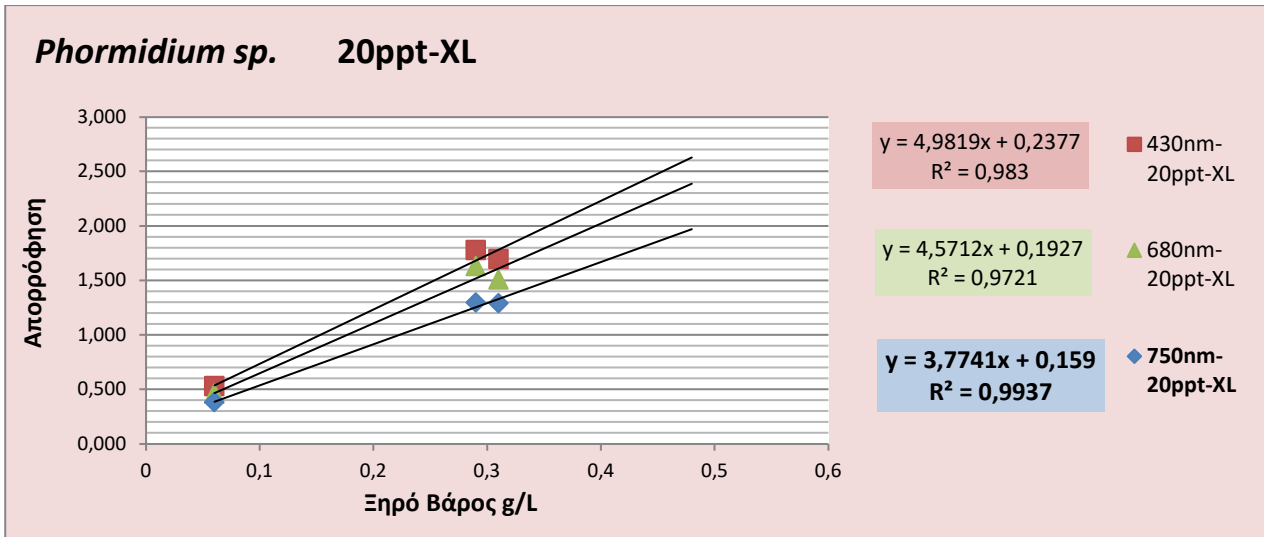
Ενδεχομένως στην υψηλή ένταση φωτισμού και κάτω από την πίεση της υψηλής αλατότητας η παραγωγή καροτενοειδών (ή και άλλων επικουρικών χρωστικών) και γλυκερόλης ως αποτέλεσμα του μηχανισμού προστασίας από την υψηλή ένταση φωτισμού και της αλατότητας, δρα αντιοξειδωτικά και εξισορροπεί το οξειδωτικό στρες.

Η οπτική πυκνότητα (OD), επίσης γνωστή ως οπτική απορρόφηση, χρησιμοποιείται συχνά ως ταχεία και μη καταστροφική μέτρηση της βιομάζας σε καλλιέργειες βακτηρίων και άλλων μονοκύτταρων μικροοργανισμών (Toennies and Gallant, 1949, Shuler και Kargi, 2005).

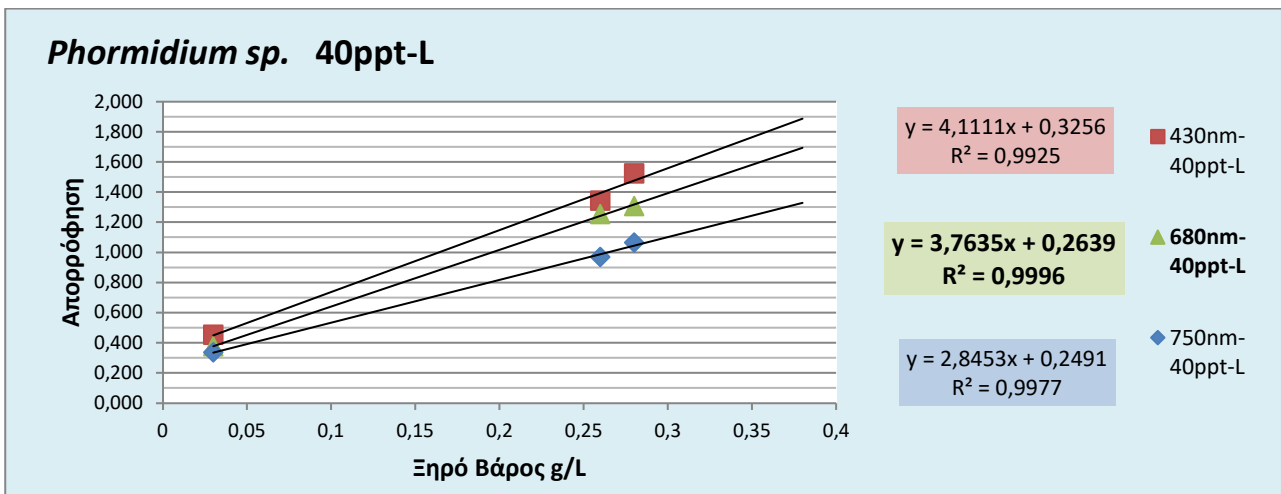
Οι οπτικές απορροφήσεις έδειξαν παρόμοια τάση και τα δεδομένα συσχετίστηκαν μεταξύ τους. Στις παρακάτω **εικόνες 99-104** φαίνονται οι συσχετίσεις όλων των δειγμάτων για τα μήκη κύματος 430-680-750nm.



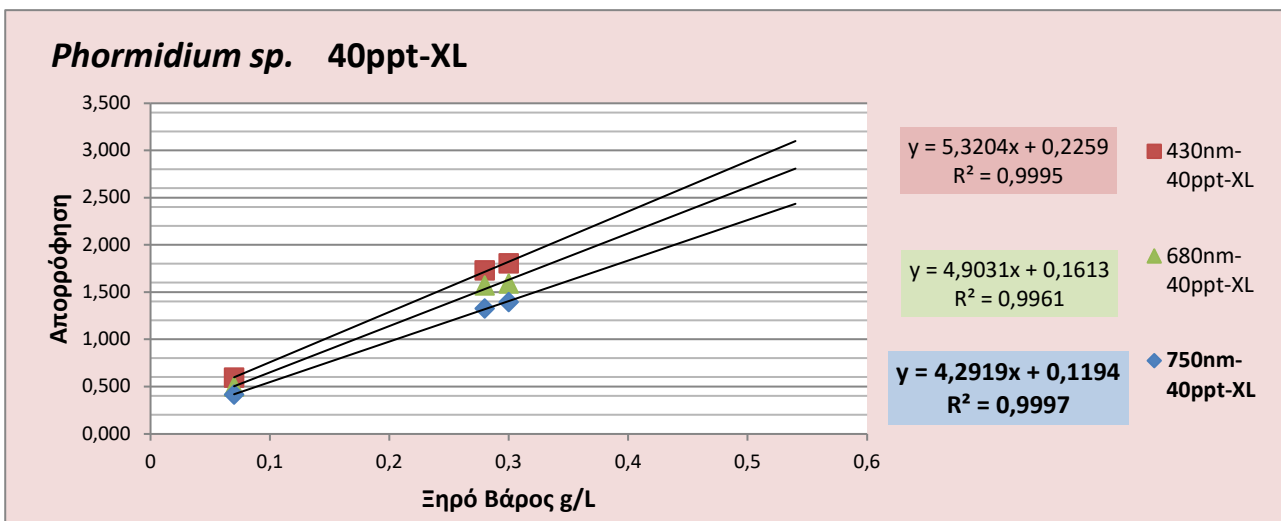
Εικόνα 99. *Phormidium sp.*, συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 430-680-750nm και ξηρού βάρους σε αλατότητα 20ppt και χαμηλή ένταση φωτισμού(2000 lux).



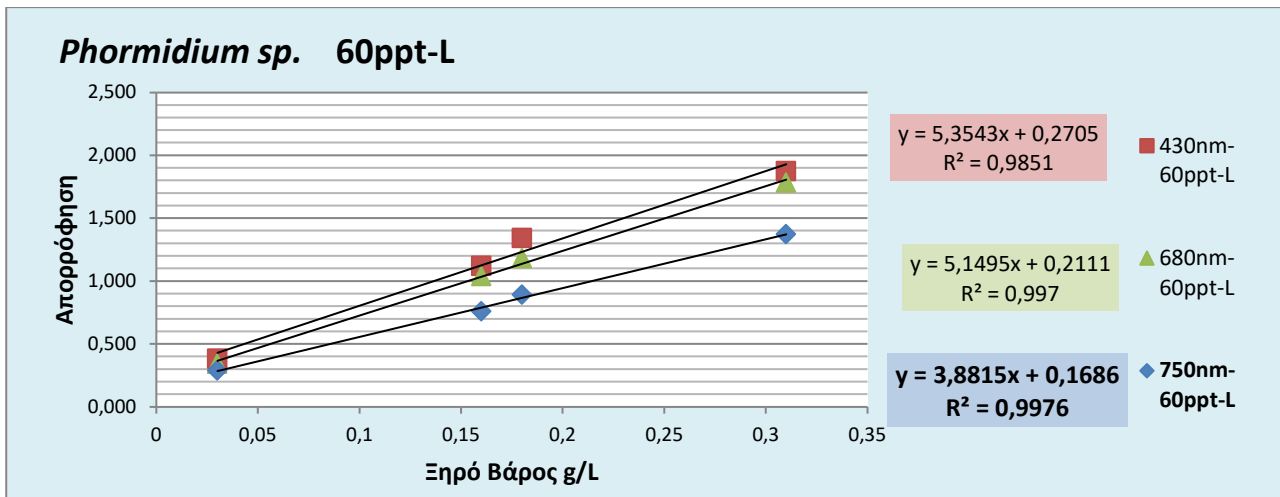
Εικόνα 100. *Phormidium sp.*, συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 430-680-750nm και ξηρού βάρους σε αλατότητα 20ppt και υψηλή ένταση φωτισμού(8000 lux).



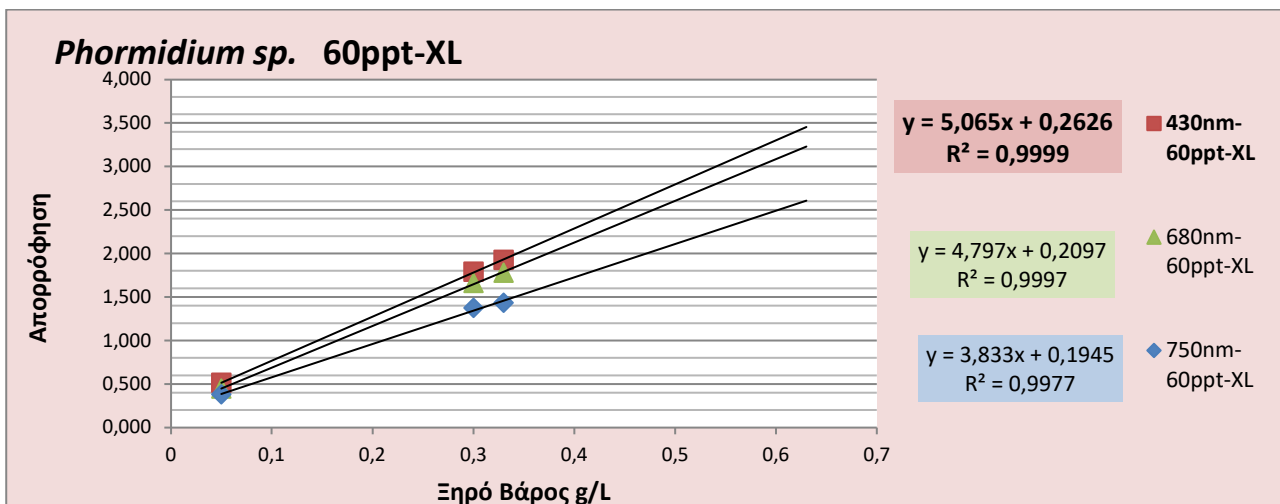
Εικόνα 101. *Phormidium sp.*, συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 430-680-750nm και ξηρού βάρους σε αλατότητα 40ppt και χαμηλή ένταση φωτισμού(2000 lux).



Εικόνα 102. *Phormidium sp.*, συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 430-680-750nm και ξηρού βάρους σε αλατότητα 40ppt και υψηλή ένταση φωτισμού(8000 lux).



Εικόνα 103. *Phormidium sp.*, συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 430-680-750nm και ξηρού βάρους σε αλατότητα 60ppt και χαμηλή ένταση φωτισμού(2000 lux).



Εικόνα 104. *Phormidium sp.*, συσχέτιση οπτικής απορρόφησης στα 430-680-750nm και ξηρού βάρους σε αλατότητα 60ppt και υψηλή ένταση φωτισμού(8000 lux).

Υπάρχει υψηλή συσχέτιση μεταξύ των ξηρών βαρών και της οπτικής απορρόφησης. Υψηλότερες συσχετίσεις εμφανίζονται στα 680nm και τα 750nm έκτος του δείγματος 60ppt-XL που εμφανίζει υψηλή συσχέτιση με το ξηρό βάρος στα 430nm, αν και οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης των 3 μηκών κύματος έχουν πολύ μικρή διαφορά μεταξύ τους.

Σύμφωνα με τους Rodrigues et. al. (2015) η βιομάζα του *Phormidium autumnale* παρουσίασε ικανότητα να παράγει ένα σημαντικό περιεχόμενο σε καροτενοειδή, χλωροφύλλες και φυκοκυανίνες κάτω από φωτοαυτότροφους συνθήκες όπως:

- 24 είδη καροτενοειδών (β-καροτένιο, λουτεΐνη, ζεαξανθίνη και τα χαρακτηριστικά των κυανοβακτηρίων καροτενοειδή, εχινόνη, μυξοξανθίνη και κανθαξανθίνη)
- 3 φυκοβιλιπρωτεΐνες και
- χλωροφύλλη (χλωροφύλλη-α).

Ίσως η υψηλή συσχέτιση με τα μήκη κύματος 680nm και 430nm σχετίζεται με την παραγωγή χρωστικών. Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές στο σύνολο τους βοηθούν τη χλωροφύλλη-α να συλλέξει το μεγαλύτερο δυνατό αριθμό φωτονίων που είναι δυνατό στην εκάστοτε κατάσταση φωτισμού, γι' αυτό και ονομάζονται επικουρικές χρωστικές (Χώτος, 2020). Επίσης η παρουσία τους προστατεύει τη χλωροφύλλη-α από περιπτώσεις έντονης ακτινοβολίας ή υπερϊόδους ακτινοβολίας που θα μπορούσαν να βλάψουν τη χλωροφύλλη-α, δρουν δηλαδή φωτοπροστατευτικά (Χώτος, 2020). Από τις μελέτες των Kumar et. al. (2015) στο *Phormidium foveolarum* και *Nostoc muscorum* βρέθηκε ότι η χαμηλή ένταση φωτισμού διεγείρει την παραγωγή φυκοκυανίνης και η υψηλή ένταση φωτισμού την παραγωγή καροτενοειδών.

Επομένως στα δείγματα 20rpt-L και 40rpt-L που έχουν καλύτερη συσχέτιση με τα 680nm ίσως λόγω χαμηλού φωτισμού έχουν παραχθεί φυκοκυανίνες οι οποίες απορροφούν σε αυτά τα μήκη κύματος και αντίστοιχα στο δείγμα 60rpt-XL να έχουν παραχθεί καροτενοειδή τα οποία απορροφούν αντίστοιχα στα 430 nm.

Τα μικροφύκη έχουν σχετικά υψηλό περιεχόμενο χρωστικής, αποτελούμενο κυρίως από χλωροφύλλη και καροτενοειδή (Becker, 1994). Το περιεχόμενο σε χρωστική μπορεί να κυμαίνεται από 0,1 έως 9,7% της υγρής βιομάζας (Nicholls και Dillon, 1978).

Ο Healey (1975) ανέφερε ότι οι αναλογίες χλωροφύλλης-α (η κύρια χρωστική στα περισσότερα κύτταρα μικροφυκών) σε ξηρό βάρος, ποικίλλει περισσότερο από το 30-πλασιο από είδος σε είδος ανάλογα με τις δυνατότητα σύνθεσης κάθε είδους, τη θερμοκρασία τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και το φως.

Πειράματα των Schubert et. al. (2012) στο κυανοβακτήριο *Synechocystis sp.* PCC 6803 έδειξαν ότι τα κύτταρα που προσαρμόστηκαν σε υψηλή αλατότητα (60rpt) είχαν αυξημένα επίπεδα καροτενοειδών. Αντίθετα το κυανοβακτήριο *Spirulina platensis* σε υψηλές αλατότητες (46rpt) παρουσίασε σημαντική μείωση φυκοκυανίνης και αναστολή μεταφοράς ηλεκτρονίων στις πλευρές του δοτή και του δέκτη στο φωτοσύστημα II, με αποτέλεσμα βλάβη στο φυκοβιλίσωμα (Lu and Vonshak, 2002), όπως και στο κυανοβακτήριο *Synchococcus* το NaCl προκάλεσε αποικοδόμηση της πρωτεΐνης CP47 οδηγώντας σε μειωμένη ενέργεια στο κέντρο αντίδρασης του PS II (Parida et. al., 2003; Murata and Miyao, 1985).

Στις μελέτες των Gao et. al. (2007) υπό την επίδραση ακτινοβολίας (400-700nm) κυανοβακτήριο *Anabaena sp.* εμφάνισε υψηλότερες συγκεντρώσεις καροτενοειδών και διπλάσια αύξηση του καροτενοειδούς σε σχέση με τη χλωροφύλλη-α, ως μηχανισμός προστασίας από τις υψηλές εντάσεις φωτισμού.

Η επιλογή μήκους κύματος εντός του μέγιστου εύρους απορρόφησης της χρωστικής αναμένεται να δώσει μεγαλύτερο σήμα, αλλά και το μεγαλύτερο σφάλμα σε περίπτωση αλλαγής της περιεκτικότητας σε χρωστική των κυττάρων. Παρ' όλα αυτά, η χρήση του μήκους κύματος εντός της μέγιστης περιοχής απορρόφησης της χλωροφύλλης-α (400–460 nm και 650–680 nm) έχει αναφερθεί συχνά (An et al., 2003; Bopp and Lettieri, 2007; Chiu et al., 2007; Greque de Morais and Vieira Costa, 2007; Hsieh and Wu, 2009; Linschitz and Sarkanen, 1958; Piorreck et al., 1984; Sung et al., 1999; Takagi et al., 2000). Σύμφωνα με τους Griffiths et. al. (2011) τα μέγιστα απορρόφησης των

κυττάρων του *Chlorella vulgaris* στις περιοχές των 440, 480 και 680 nm οφειλόταν στην απορρόφηση από τις χρωστικές ουσίες που περιέχονται στα κύτταρα. Έτσι καλλιέργησαν το μικροφύκος σε 2 διαφορετικές συνθήκες. Η μια ευνοούσε την παραγωγή χρωστικών η άλλη όχι και βρέθηκε ότι η απορρόφηση στα 680 nm ήταν υψηλότερη στην καλλιέργεια με υψηλή περιεκτικότητα σε χρωστικές ουσίες παρά στην καλλιέργεια με χαμηλή περιεκτικότητα σε χρωστική ουσία. Η απορρόφηση στα 750 nm επηρεάστηκε πολύ λιγότερο από την περιεκτικότητα σε χρωστική ουσία. Οι ευθείες παλινδρόμησης και για τα δύο μήκη κύματος ήταν παρόμοιες (κλίσεις 3.3 και 3.2 για 680 nm και 750 nm αντίστοιχα). Αυτό έδειξε ότι, για μια δεδομένη συγκέντρωση βιομάζας, η απορρόφηση στα 680 nm ήταν μεγαλύτερη εάν τα κύτταρα περιείχε υψηλή συγκέντρωση χρωστικής, ενώ η απορρόφηση στα 750 nm ήταν παρόμοια παρά τις διαφορές στο περιεχόμενο χρωστικής (Griffiths et. al. (2011).

3.2. Βαθμονόμηση

Η καμπύλη βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των μικροφυκών είναι κοινή και αποτελείται από τη συσχέτιση μεταξύ οπτικής πυκνότητας και αριθμού κυττάρων. Είναι ένα πολύ χρηστικό εργαλείο για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των μικροφυκών.

Από τις καμπύλες βαθμονόμησης μπορούμε να υπολογίσουμε την κυτταρική συγκέντρωση όλων των δειγμάτων μέσω της οπτικής απορρόφησης που παρουσιάζουν. Η καλύτερη συσχέτιση είναι αυτή στα 430nm. Σύμφωνα με τους Rahija and Hui (2019) απαιτείται δημιουργία νέας καμπύλης βαθμονόμησης όταν στο περιβάλλον οι συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού αλλάζουν, καθώς το μέγεθος των μικροφυκών μπορεί να ποικίλει από μια κατάσταση σε άλλη. Επίσης υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του μεγέθους των μικροφυκών και της οπτικής απορρόφησης

3.3 Βιομάζα

Τα ξηρά βάρη είχαν επίσης παρόμοια τάση με την οπτική απορρόφηση του *Phormidium sp.* Τα μεγαλύτερα ξηρά βάρη εμφανίστηκαν στα δείγματα της υψηλής έντασης φωτισμού αλλά και στο δείγμα 20ppt-L. Μέγιστο ξηρό βάρος εμφανίστηκε το δείγμα 60ppt-XL. Ο παράγοντας φωτισμός αλλά και η αλατοτητα φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στη παραγωγή βιομάζας του *Phormidium sp.*

3.4 pH

Το pH εμφανίζει μια αναμενόμενη αύξηση με της αύξηση της ηλικίας της καλλιέργειας. Υπάρχει αυτή η τάση στις καλλιέργειες (Γκέλης κ.α., 2015). Επίσης η φωτοσυνθετική διαδικασία στα μικροφύκη προκαλεί αύξηση του pH στο υδάτινο περιβάλλον ως αποτέλεσμα της κυτταρικής πρόσληψης πρωτονίων παρά ως αποτέλεσμα της κατανάλωσης CO₂ (Zerveas et. al., 2021).

Στην αρχή το pH άρχισε να αυξάνεται και στη συνέχεια παρουσίασε μια πτώση αλλά γενικά αυξήθηκε. Το pH στα δείγματα της υψηλής έντασης φωτισμού μεταβλήθηκε κατά τον ίδιο τρόπο ανεξαρτήτως αλατότητας. Το ίδιο συνέβη και στα δείγματα της χαμηλής έντασης φωτισμού. Φαίνεται οι μεταβολές του pH να ακολουθούν τις μεταβολές στο υδάτινο μέσο από τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα των μικροφυκών. Τη 10^η ημέρα το pH των δειγμάτων της υψηλής έντασης φωτισμού παρουσιάζει μια πτώση που φαίνεται να συμπίπτει με το τέλος της στατικής φάσης και την αρχή της φάσης κατάρρευσης (παρακολούθηση μέσω οπτικής απορρόφησης). Στις

φάσεις αυτές η φωτοσυνθετική δραστηριότητα είναι μειωμένη. Αντίστοιχα, εκείνη τη χρονική στιγμή, στα δείγματα της χαμηλής έντασης φωτισμού, σύμφωνα με την οπτική απορρόφηση συμπίπτει το τέλος της εκθετικής αύξησης του *Phormidium sp.* με την έναρξη της στατικής φάσης ανάπτυξης.

3.5 Συμπέρασμα για *Phormidium sp.*

Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να πούμε ότι ο παράγοντας φωτισμός επηρέασε σημαντικά και θετικά την ανάπτυξη και την απόδοση του *Phormidium sp.*, σε βιομάζα. Η αλατότητα επίσης επηρέασε την ανάπτυξη του. Σε υψηλές εντάσεις φωτισμού η αύξηση της επιδρούσε θετικά στην ανάπτυξη του *Phormidium sp.*, όμως στις χαμηλές εντάσεις φωτισμού η αλατότητα επηρέασε αρνητικά την ανάπτυξη του *Phormidium sp.* δηλαδή σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού όσο αυξανόταν η αλατότητα η πυκνότητα του μικροφύκου μειωνόταν.

Ε. Συμπεράσματα

Το *Tetraselmis sp.* καλλιεργήθηκε σε 3 αλατότητες (20-40-60ppt) και 2 εντάσεις φωτισμού (2000-8000 lux). Η βέλτιστη ανάπτυξη του παρατηρήθηκε σε αλατότητες 40 και 60ppt και σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού, ενώ το μέγιστο ξηρό βάρος εμφανίστηκε σε αλατότητα 60ppt σε υψηλή έντασης φωτισμό 8000lux.

Το *Dunaliella salina* καλλιεργήθηκε σε 4 αλατότητες (20, 40, 60 και 100ppt) και 2 εντάσεις φωτισμού (2000 και 8000 lux) και παρουσίασε βέλτιστη ανάπτυξη και υψηλότερο ρυθμό αύξησης σε αλατότητα 20ppt και σε ένταση φωτισμού 8000lux.

Το *Phormidium sp.* καλλιεργήθηκε σε 3 αλατότητες (20, 40 και 60ppt) και σε 2 συνθήκες φωτισμού (2000 και 8000lux) και εμφάνισε βέλτιστη ανάπτυξη και παραγωγή βιομάζας σε αλατότητα 60ppt και σε υψηλές συνθήκες φωτισμού 8000lux.

Συγκριτικά και τα 3 μικροφύκη είχαν βέλτιστη ανάπτυξη και μέγιστα ξηρά βάρη σε υψηλή ένταση φωτισμού 8000lux που αποδεικνύει τη σπουδαιότητα του παράγοντα αυτού για την ανάπτυξη των μικροφυκών αλλά και την παραγωγή τους σε βιομάζα. Κάθε είδος εμφάνισε βέλτιστη ανάπτυξη σε διαφορετικές αλατότητες. Ο παράγοντας αλατότητα επηρέασε την ανάπτυξη των μικροφυκών αυτών αλλά σε μικρότερο βαθμό από ότι ο φωτισμός.

ΣΤ. Βιβλιογραφία

Ξένη Βιβλιογραφία

- Abu-Rezq, T. S., Al-Hooti, S. & Dangly, A. J. (2010). Optimum culture conditions required for the locally isolated *Dunaliella salina*. *Journal of algal biomass utilization* 1(2),12-19.
- Adenan, N.S., Yusoff, Md. F., & Shariff, M. (2013). Effect of Salinity and Temperature on the Growth of Diatoms and Green Algae. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 8, 397-404.
- Allakhverdiev, S.I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Inaba, M., Murata, N., (2000). Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiol.* 123, 1047e1056
- Allen, J.G., and W. Martin. Out of thin air. *Nature* 445,610-612
- An, J.Y., Sim, S.J., Lee, J.S., Kim, B.W. (2003). Hydrocarbon production from secondarily treated piggery wastewater by the green alga *Botryococcus braunii*. *J. Appl. Phycol.* 15, 185–191.
- Andersen, R. A. (1996). Algae. In: J. C. Hunter-Cevera and C. A. Belt (Eds.) *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*(pp. 29-64). London, UK.
- Anonymous. (1994). World reserves growing faster than production. *Gas World International*,199(4907),11-13
- Anonymous.(1999). Resurgent Oil Demand, OPEC Cohesion Set Stage for Optimistic Outlook for Oil Industry at the Turn of the Century. *Oil Gas Journal*,97(42),49-55
- Arun, N.,Gupta, S., Singh, D. P. (2012). Antimicrobial and Antioxidant Property of Commonly found Microalgae *Spirulina platensis*, *Nostoc muscorum* and *Chlorella pyrenoidosa* against some Pathogenic Bacteria and Fungi. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 3(10), 4866-4875.
- Arun, N., Singh, D.P.(2013). Differential response of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* isolated from brines of Sambhar Salt Lake of Rajasthan (India) to salinities: A study on growth, pigment and glycerol synthesis. *J. Mar. Biol. Ass. India*, 55 (1), 5-10.
- Asulabh, K., Supriya, G., Ramachandra, T., (2012). Effect of Salinity Concentrations on Growth Rate and Lipid Concentration in *Microcystis* sp., *Chlorococum* sp. and *Chaetoceros* sp. National Conference on Conservation and Management of Wetland Ecosystems. School of Environmental Sciences, Mahatma Gandhi University, Kottayam, Kerala
- Ayadi, H., Elloumi, J., Guermazi, W., Bouain, A., Hammami, M., Giraudoux, P., Aleya, L.(2008). Fatty acid composition in relation to the microorganisms in the Sfax solar saltern, Tunisia. *Acta Protozool* 47,189–203
- Azov, Y., and Goldman J. C.(1982). Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures. *Applied and Environmental Microbiology*,43(4),735-739
- Badger, M. R., & Price, G. D. (1994). The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*,45,369-392
- Badger, M. R. & Price, G. D. (2003). CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany*, 54,609-622
- Bagchi, S.N., Bitz, T., Pistorius, E.K., & Michel, K.P.(2007). *Synechococcus elongates* PCC 7942 mutant with a higher tolerance towards the herbicide bentazone also confers resistance to sodium chloride stress. *Photosynth. Res*,92,87–101.
- Barclay, W. R., Terry, K. L., Nagle, N. J., Weissman, J. C. & Goebel R. P. (1987). Potential of New Strains of Marine and Inland Saline-Adapted Microalgae for Aquacultur. *Journal of the World Aquaculture Society*,18(4),218-228
- Barsanti, L. & Gualtieri, P. (2006). *Algae: Anatomy, biochemistry and biotechnology*. New York: CRC Taylor & Francis
- Beardall, J., Young, E., Robert, S.(2001). Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation. *Aquat Sci* ,63,44-69.
- Bednarz, T., Starzeck, A., Mazurkiewicz-Boroń, G.(2002). Microbiological processes accompanied by algal and blue-greens water blooms. *Wiadomości Botaniczne*,16, 45–55.
- Becker, E.W.(1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge: Cambridge University Press,
- Ben-Amotz, A., Avron, M., (1973). Role of glycerol in osmotic regulation of the halophilic alga *Dunaliella parva*. *Plant Physiol.*51, 875–878.

- Ben-Amotz, A., Katz, A., & Avron, M. (1982). Accumulation of β -carotene in halotolerant algae: Purification and characterization of β -carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 18, 529-537
- Ben-Amotz, A., Avron, M. (1982). The potential use of *Dunaliella* for the production of glycerol, β -carotene and high-protein feed. In: San Pietro A (ed). *Biosaline research: A look to the future*. New York, USA: Plenum Publishing Corporation.
- Ben-Amotz, A. & Avron, M. (1983). On the factors which determine massive beta-carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant. Physiol*, 72, 593-597.
- Ben-Amotz, A., Tornabene, T.G., Thomas, W.H. (1985). Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J. Phycol.* 21, 72e81. [http:// dx.doi.org/10.1111/j.0022-3646.1985.00072.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-3646.1985.00072.x).
- Bilanovic, D., Andargatchew, A., Kroeger T. & Shelef, G. (2009). Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C and N concentrations Response surface methodology analysis. *Energy Conversion and Management*, 50(2), 262-267
- Bongiorni, L. M. & Pietra, F. (1996). Marine natural products for industrial applications. *Chemistry and Industry*, 2, 54-58
- Bopp, S.K., & Lettieri, T. (2007). Gene regulation in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* upon exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Gene* 396, 293-302.
- Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70(1-3), 313-321
- Borowitzka, M. (1998). Limits to growth. In: Y. S. Wong and N. F. Y. Tam (eds). *Wastewater treatment with algae* (pp. 203-226)
- Borowitzka, M.A., (1992). Algal biotechnology products and processes matching science and economics. *J. Appl. Phycol.* 4, 267-279.
- Borowitzka, L.J, Borowitzka, M.A, Moulton, T (1984). Mass culture of *Dunaliella*: from laboratory to pilot plant. *Hydrobiologia*, 116/117, 115- 121.
- Boussiba, S. & Gibson, J. (1991). Ammonia translocation in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 88(1), 1-14
- Brányiková, I., Maršálková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V. and Vítová, M. (2011). Microalgae novel highly efficient starch producers. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4), 766-776
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557-577
- Brennan, L., & Owende, P. (2013). Biofuels from microalgae: Towards meeting advanced fuel standards. In: J. W. Lee (Eds). *Advanced biofuels and bioproducts* (pp. 553-599).
- Brock, T. D. (1967). Life at high temperatures. *Science*, 158, 1012-1019
- Bunt, J. S., & Wood E. J. C. (1963). Microbiology and Antarctic sea ice. *Nature*, 199, 1254-1255
- Cairns, J. (1998). Malthus, exemptionism and the risk/uncertainty paradox. *Hydrobiologia*, 384, 1-5
- Carvalho, A., Monteiro, C., & Malcata, F. (2009). Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova lutheri*. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 543-552
- Carvalho, A., Silva, S., Baptista, J. & Malcata F. (2011). Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1275-1288
- Castro, H., & Huber, M. E. (2013). *Marine Biology*. (9th ed.). USA: McGraw-Hill.
- Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 73(3), 203-66. doi:9809012. ISSN 1464-7931
- Chaumont, D. (1993). Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture". *Journal of Applied Phycology*, 5(6): 593-604
- Cheirsilp, B., Torpee, S. (2012). Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresour. Technol*, 110, 510e516.
- Chen, C.Y., Yeh K.L., Aisyah R., Lee D.J. & Chang J.S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102(1), 71-81

- Chen, F.(1996).High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in Biotechnology*, 14(11),421-426
- Chen, H., Jiang, J.G.(2009). Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *J. Cell. Physiol*,219, 251e258.
- Chen, X., Goh, Q.Y., Tan,W., Hossain, I., Chen,W.N., Lau, R.(2011). Lumostatic strategy for microalgae cultivation utilizing image analysis and Chlorophyll a content as design parameters. *Bioresour. Technol*,102, 6005e6012.
- Chitlaru, E., & Pick, U. (1991). Regulation of glycerol synthesis in response to osmotic changes in *Dunaliella*. *Plant Physiol.*, 96,50-60.
- Chisti, Y. (2007).Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3),294-306
- Chiu, S.Y., Kao, C.Y., Chen, C.H., Kuan, T.C., Ong, S.C., Lin, C.S.(2007). Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresour. Technol*,99(9), 3389–3396
- Cho, H.S., Ji, C.S., Hur, B.S., Bae, J., Park, S.I., & Song, C.Y.(2007). Optimum temperature and salinity conditions for growth of green algae *Chlorella ellipsoidea* and *Nannochloris oculata*.*FISHERIES SCIENCE*, 73, 1050-1056.
- Claquin, P., Martin-Jézéquel, V., Kromkamp, J.C., Veldhuis, M.J.W., Kraay, G.W. (2002). Uncoupling of silicon compared with carbon and nitrogen metabolisms and the role of the cell cycle in continuous cultures of *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) under light, nitrogen, and phosphorus control. *J Phycol*, 38,922–930
- Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., Eaton, A.D.(1998).Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater(20th ed.). Washington DC:American Public Health Association.
- Coesel, S. N., Baumgartner, A. C., Teles, L. M., Ramos, A. A., Henriques, N. M., Cancela, L. & Varela, J. C. (2008). Nutrient limitation is the main regulatory factor for carot-enoid accumulation and for Psy and Pds steady state transcript levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress. *Mar. Biotechnol*,10,602-611.
- Cohen, Y., Jrogensen, B.B., Padan, E. & Shilo, M. (1975). Sulphide-dependent anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Nature* 257,489-492.
- Costa, J. A. V., Cozza, K. L., Oliveira, L., & Magagnin G. (2001).Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(5),439-442
- Coutteau, P.(1996).Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper ,361
- Danesi, E. D. G., de O. Rangel-Yagui C., de Carvalho J. C. M., & Sato S. (2002).An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, 23(4),261-269
- Day, J. G., Slocombe, S. P., & Stanley, M. S.(2012).Overcoming biological constraints to enable the exploitation of microalgae for biofuels. *Bioresource Technology*, 109, 245-251
- Davis, R.W., Carvalho, B.J., Jones, H.D.T., Singh, S. (2015). The role of photo-osmotic adaptation in semi-continuous culture and lipid particle release from *Dunaliella viridis*. *J. Appl. Phycol*, 27, 109-123. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-014-0331-5>.
- De Pauw, N., & Persoone, G. (1988). Micro-algae for aquaculture. In M. A. Borowitzka & L. J. Borowitzka (Eds.). *Micro-Algal Biotechnology*,(pp. 197-221). Cambridge.
- Demmig-Adams, B., & Adams, W. W. (1992). Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43,599-626.
- Doucha, J., Straka F., & Lívanský, K.(2005).Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella* sp.) in an outdoor open thin layer photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*,17(5),403-412
- Ducret, A., Aebersold, R., Li, R., Golden, S. S., Hiller, R. G., Wrench, P. M., Larkum, A. W. D & Green, B. R.(1996). Independent evolution of the prochlorophyte and green plant chlorophyll a/b light-harvesting proteins. *Proceedings of the national Academic of Sciences of the USA*, 93,15244-15248.
- Dubinsky, Z., Berner, T., & Aaronson, S.(1978). Potential of large-scale algal culture for biomass and lipid production in arid lands. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*United States.
- Dziosa, K., & Makowska, M.(2016). Monitoring of *Chlorella* sp. Growth based on the optical density measurement. *Institute for Sustainable Technologies – National Research Institute*, 197-206.
- Ebrahimi, E., & Salarzadeh, A.(2016). The Effect of Temperature and Salinity on the Growth of *Skeletonema costatum* and *Chlorella capsulata* in vitro. *International Journal of Life Sciences*, 10(1), 40-44.

- Elloumi, J., Guermazi, W., Ayadi, H., Bouain, A., & Aleya, L.(2009). Abundance and biomass of prokaryotic and eukaryotic microorganisms coupled with environmental factors in an arid multi-pond solar saltern (Sfax, Tunisia). *J Mar Biol Assoc UK* 89,243–253
- Espinoza, E.V., Nùñez, R.M., Cebrero, F.N.(2002).Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll a content in *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacult Eng*, 25,207–216
- Falkowski, P. G.(1980).Primary Productivity in the Sea. New York: Plenum Press
- Fatma, T., Khan, M.A., Choudhary, M.(2007). Impact of environmental pollution on cyanobacterial proline content. *J. Appl. Phycol*, 19, 625-629
- Fava, G., & Martini, E.(1988). Effect of inbreeding and salinity on quantitative characters and asymmetry of *Tisbe holothuriae* (Humes). *Hydrobiologia*, 167, 463-467.
- Feely, R. A., Sabine, C. L., Lee, K. Berelson,W., Kleypas, J., Fabry, V. J., & Millero, F. J.(2004). Impact of anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ system in the oceans. *Science*, 305, 362-372.
- Fernández, A.F.G., Camacho, F.G., & Chisti, Y . (1999). Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *Journal of Biotechnology*, 70(1–3), 231-247
- Fernandes, B., Dragone, G., Teixeir,a J.. & Vicente, A.(2010).Light regime characterization in an airlift photobioreactor for production of microalgae with high starch content. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161(1), 218-226
- Ferreira, L. S., Rodrigues, M. S., Converti, A., Sato, S., & Carvalho, J. C. M. (2012).Arthrospira (*Spirulina*) platensis cultivation in tubular photobioreactor: Use of no-cost CO₂ from ethanol fermentation. *Applied Energy*, 92(0), 379-385
- Garcia-Gonzalez, M., Moreno, J., Canavate, J. P., Anguis, V., Prieto, A., Manzano, C., Florencio, F. J., Guerrero, M. G.(2003) Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain. *Journal of Applied Phycology*, 15(2-3), 177-184
- Gilmour, D.J., Hipkins, M.F., Webber, A.N., Baker, N.R., Boney, A.D.(1985). The effect of ionic stress on photosynthesis in *Dunaliella tertiolecta*: chlorophyll fluorescence kinetics and spectral characteristics. *Planta* 163, 250–256.
- Giordano, M., Beardall, J., & Raven, J.(2005).CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 99-131
- Gomez, P. I., Barriga, A., Cifuentes, A. S., Gonzalez, M. A.(2003). Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC-30861) Chlorophyta. *Journal of Biological Research*, 36, 185-192.
- Gomez, P. I., Gonzalez, M. A. (2005). The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. *Journal of Biological Research* 38, 151-162.
- Götz, T., Windhövel, U. Böger, P. & Sandman, G.(1999). Protection of photosynthesis against ultraviolet-B radiation by carotenoids in transformants of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC79421. *Plant Physiol.*, 120, 599-604.
- Greep, R. O.(1998).Whither the global population problem. *Biochemical Pharmacology*, 55(4),383-386
- Greque de Morais, M., Vieira Costa, J. A.(2007). Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *J. Biotechnol*, 129, 439–445.
- Griffiths, M., Garcin, C., van Hille, P.R., Harrison, T.L.S.(2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, 85, 119-123.
- Grobbelaar, J. U. (2004).Algal niutrition. Mineral nutrition. In: A. Richmond (Eds.). *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology* (pp. 97-115). Oxford
- Groom, M.J., Gray, E.M., Townsend, P.A. (2008). Biofuels and biodiversity: principles for creating better policies for biofuel production. *Conserv Biol*, 22, 602–609
- Guedes, A. C., & Malcata, F. X. (2012).Nutritional Value and Uses of Microalgae in Aquaculture. In: Z. Muchlisin (Eds). *Aquaculture*.
- Guedes, A.C., Amaro, H.M., Malcata, F.X. (2011). Microalgae as sources of carotenoids. *Mar Drugs*, 9,625–644
- Guermazi, W., Elloumi, J., Ayadi, H., Bouain, A., Aleya, L.(2008).Rearing of *Fabrea salina* Henneguy (Ciliophora, Heterotrichida) with three unicellular feeds. *Comptes Rendus Biol*, 331, 56–63

- Guermazi, W., Masmoudi, S., Boukhris, S., Ayadi, H., & Morant-Manceau, A. (2014). Under low irradiation, the light regime modifies growth and metabolite production in various species of microalgae. *J Appl Phycol.*, 26, 2283–2293.
- Guillard, R.R.L. (1973). Division Rates. In J.R. (Eds.). *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*, Stei (pp: 303-304). Cambridge, London: Cambridge University Press.
- Hadi, M. R., Shariati, M. & Afsharzadeh, A. (2008). Microalgal biotechnology: carotenoid and glycerol production by the green algae *Dunaliella* isolated from the Gave-Khooni salt marsh Iran. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 13, 540-544
- Hagiwara, S., Bolige, A., Zhang, Y., Takahashi, M., Yamagishi, A., Goto, K. (2002). Circadian gating of photoinduction of commitment to cell cycle transitions in relation to photoperiodic control of cell reproduction in *Euglena*. *Photochem Photobiol* 76, 105–115
- Healey, F.P. (1975). Physiological indicators of nutrient deficiency in algae. Tech. Rep. 585. Department of the Environment, Fisheries and Marine Service Research and Development Directorate, Winnipeg, Man
- Hemaiswarya, S., Raja, R. Ravi Kumar, R. Ganesan V. & Anbazhagan, C. (2011). Microalgae: A sustainable feed source for aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 1737-1746.
- Henley, J.W., Major, M.K., Hironaka, L.J. (2002). Response to salinity and heat stress in two halotolerant Chlorophyte algae. *J. Phycol.*, 38, 757–766.
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., & Tiffany, D. (2006). Environmental, economic and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of the national Academic of Sciences of the USA*, 103, 11206-11210.
- Ho, S.H., Huang, S.W., Chen, C.Y., Hasunuma, T., Kondo, A., Chang, J.S. (2013). Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. *Bioresour Technol.* 135, 157–165
- Hsieh, C.H. & Wu W.T. (2009). Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresour Technol.*, 100(17), 3921-3926
- Hu, Q. (2004). Environmental effects on cell composition. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. (pp. 83-94). Blackwell Publishing Ltd.,
- Hu, H. & Gao, K. (2006). Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO₂ concentration. *Biotechnol. Lett.*, 28, 987-992.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54, 621e639.
- Huang, W. W., Dong, B. Z., Cai, Z. P., & Duan, S. S. (2011). Growth effects on mixed culture of *Dunaliella salina* and *Phaeodactylum tricornutum* under different inoculation densities and nitrogen concentrations. *Afr. J. Biotechnol.*, 10, 13164-13174.
- Huzisige, H., Ke, B. (1993). Dynamics of the history of photosynthesis. *Photosynth Res* 38, 185–209
- Ihnken, S., Roberts, S., Beardall, J. (2011). Differential responses of growth and photosynthesis in the marine diatom *Chaetoceros muelleri* to CO₂ and light availability. *Phycologia* 50, 182-193.
- Isichei, A. O. (1990). The role of algae and cyanobacteria in arid lands. A review. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 4(1), 1-17
- Jassby, A. (1988). *Spirulina: a model of microalgae as human food*. In: C. Lembi and J. R. Waaland (Eds.). *Algae and Human Affairs* (pp. 149-179). Cambridge.
- Jensen, S. & Knutsen, G. (1993). Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 5(5): 495-504
- Jorquera, O., Kiperstok, A., Sales, E. A., Embiruçu, M., & Ghirardi, M. L. (2010). Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresour Technol.*, 101(4): 1406-1413
- Kay, R. A., & Barton, L. L. (1991). Microalgae as food and supplement. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30(6): 555-573
- Khatoon, H., Haris, N., Banerjee, S., Rahman, N.A., Mian, S., Abol-Munafi, B.A., & Endut, A. (2017). Effects of different salinities on the growth and proximate composition of *Dunaliella* sp. Isolated from South China Sea at different growth phases. *Process Safety and Environmental Protection*, 112, 280-287

- Khatoon, H., Rahman, A.N., Banerjee, S., Harun, N., Suleiman, S.S., Zakaria, H.N., Lananan, F., Hamid, A.H.S., & Endut, A. (2014). Effects of different salinities and pH on the growth and proximate composition of *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis* sp. isolated from South China Sea cultured under control and natural condition. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95, 11-18.
- Kim, S.H., Liu, K.H., Lee, S.Y., Hong, S.J., Cho, B.K., Lee, H., Lee, C.G., Choi, H.K. (2013). Effects of light intensity and nitrogen starvation on glycerolipid, glycerophospholipid, and carotenoid composition in *Dunaliella tertiolecta* culture. *PLoS One*, 8, e72415. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072415>.
- Kirst, G.O. (1989). Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 40, 21–53.
- Kitaya, Y., Xiao, L., Masuda, A., Ozawa, T., Tsuda, M., Omasa, K. (2008) Effects of temperature, photosynthetic photon flux density, photoperiod and O₂ and CO₂ concentrations on growth rates of the symbiotic dinoflagellate, *Amphidinium* sp. *J Appl Phycol* 20,737–742
- Klatzmann, J. (1996). Overpopulation, threat or myth?. *Comptes Rendus de l' Academie d'Agriculture de France*, 82, 83-89
- Komárek, J., Kaštovský J., Mareš, J., & Johansen, J. R. (2014). Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 86, 295–335.
- Kreeger, K. Y. (1996). Industry investors show increased interest in denizens of the deep. *The Scientist*, 10, 8-9
- Kromkamp, J.C., Claquin, P. (2006) Role of cell cycle in the metabolism of marine microalgae. In: R,Subba (Eds.), *Algal cultures, analogues of blooms and applications* (pp 385–406). NY;Science Publishers.
- Kuhad, R. C., Singh, A., Tripathi, K. K., Saxena, R. K., & Eriksson, K.E. L. (1997). Microorganisms as an Alternative Source of Protein. *Nutrition Reviews*, 55(3), 65-75
- Kumar, J., Singh, P.V., & Prasad, M.S. (2015). NaCl-induced physiological and biochemical changes in two cyanobacteria *Nostoc muscorum* and *Phormidium foveolarum* acclimatized to different photosynthetically active radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 151, 221-232.
- Kusumaningrum, H.P., Kusdiyantini, E., Yuwono, T., Soedarsono, J. (2004). The effect of various salinity levels on the growth and characterization of *Dunaliella* sp. isolated from Jepara waters. *Ilmu Kelautan*, 9(3), 136–140.
- Lamers, P. P., Janssen, M., De Vos, R. C., Bino, R. J. & Wijffels, R. H. (2012). Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *J. Biotechnol.* 162,21-27.
- Lamers, P. P., van de Laak, C. C., Kaasenbrood, P. S., Lorier, J., Janssen, M., De Vos, R. C., Bino, R. J. & Wijffels, R. H. (2010). Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. *Biotechnol. Bioeng.* 106, 638-648
- Lamitina, T., Huang, C.G., Strange, K. (2006). Genome-wide RNAi screening identifies protein damage as a regulator of osmoprotective gene expression. *PNAS* 103, 12173e12178. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0602987103>.
- Leonardos, N., Geider, R.J. (2004). Responses of Elemental and Biochemical Composition of *Chaetoceros muelleri* to Growth under Varying Light and Nitrate: Phosphate Supply Ratios and Their Influence on Critical N:P. *Limnol. Oceanogr.*, 49(6), 2105–2114
- Lers, A., Biener, Y. & Zamir, A. (1990). Photoinduction of massive beta-carotene accumulation by the alga *Dunaliella bardawil*: kinetics and dependence on gene activation. *Plant Physiol.* 93,389-395.
- Li, Z., Wakao, S., Fischer, B.B., Niyogi, K.K. (2009). Sensing and responding to excess light. *Annu Rev Plant Biol* 60,239–260
- Linschitz, H., Sarkanen, K., (1958). The absorption spectra and decay kinetics of the metastable states of chlorophyll a and b. *J. Am. Chem. Soc.* 80 (18), 4826–4832
- Liska, A.J., Shevchenko, A., Pick, U., Katz, A. (2004). Enhanced photosynthesis and redox energy production contribute to salinity tolerance in *Dunaliella* as revealed by homology-based proteomics. *Plant Physiol.* 136, 2806-2817. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.104.039438>.
- Liu, W., Au, D.W.T., Anderson, D.M., Lam, P.K.S., Wu, R.S.S. (2007). Effects of nutrients, salinity, pH and light:dark cycle on the production of reactive oxygen species in the algae *Chattonella marina*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 346, 76e86.
- Liu, W., Ming, Y., Li, P., Huang, Z. (2012). Inhibitory effects of hypo-osmotic stress on extracellular carbonic anhydrase and photosynthetic efficiency of green alga *Dunaliella salina* possibly through reactive oxygen species formation. *Plant Physiol. Biochem.* 54, 43–48.

- Loeblich, L. A. (1982). Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halophile *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 62, 493-508.
- "Lu, C., & Vonshak, A. (2002). Effects of salinity stress on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM*, 114, 405–413."
- Lurling, M., & Beekman, W. (2006). Palmelloids formation in *Chlamydomonas reinhardtii*: defence against rotifer predators?, *Ann Limnol. Int. J. Lim.* 42, 65–72.
- Lynn, S.G., Kilham, S.S., Kreege, D.A. & Interlandi, S.J. (2000) Effect of nutrient availability on the biochemical and elemental stoichiometry in the freshwater diatom *Stephanodiscus minutulus* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 36, 510-522.
- Marín, N., Morales, F., Lodeiros, C., & Tamigneaux, E. (1998). Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities. *J. Appl. Phycol.* 10,405-411
- Markou, G., Tzovenis, I., Nerantzis, E. (2013). *Microalgae: cultivation and applications*. Research Gate.
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217-232
- Matsudo, M. C., Bezerra, R. P., Sato, S., Perego, P., Converti, A., & Carvalho, J. C. M. (2009). Repeated fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* using urea as nitrogen source". *Biochemical Engineering Journal*, 43(1), 52-57
- McConnaughey, T. A. (1994). Calcification, photosynthesis, and global carbon cycles. *Bulletin de l'Institut Océanographique, Monaco* 13,137-161.
- McConnaughey, T. A. (1998). Acid secretion, calcification, and photosynthetic carbon concentrating mechanisms. *Canadian Journal of Botany* 76,1119-1126.
- McConnaughey, T. A., & Whelan, J. F. (1996). Calcification generates protons for nutrient and bicarbonate uptake. *Earth Science Reviews* 42,95-118.
- Melis, A. (1999). Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage. *Trends Plant Sci.* 4, 130e135.
- Meseck, S. L., Alix, J.H., Wikfors, H.G. (2005). Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga, *Tetraselmis chui* (PLY429). *Aquaculture*, 246,393–404
- Mitsui, A. (1980). Biosaline Research: The Use of Photosynthetic Marine Organisms in Food and Feed Production. In A. Hollaender, J. C. Aller, E. Epstein, A. San Pietro and O. R. Zaborsky (Eds.), *The Biosaline Concept* (pp. 177-215). New York
- Mohan, N., Rajaram, M.G., Boopathy, A.B., Rengasamy, R. (2012). Biomass and lipid production of marine diatom *Amphiprora paludosa* W. Smith at different nutrient concentrations. *J. Algal Biomass Utln.* 3 (4), 52–59.
- Morse, D. M., Salois, P., Markovic, P., & Hastings, J. W. (1995). A nuclear-encoded form II RuBisCO in dinoflagellates. *Science*, 268,1622-1624.
- Mulders, K.J.M., Lamers, P.P., Martens, D.E., Wijffels, R.H. (2014). Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. *J. Phycol.* 50, 229e242. <http://dx.doi.org/10.1111/jpy.12173>.
- Müller, P., Li, X. P. & Niyogi, K. K. (2001). Non-photochemical quenching: a response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125, 1558-1566.
- Mumford, T. F., & Miura, A. (1988). Porphyra as food: Cultivation and economics. In: C.A. Lembi & J. R. Waaland (Eds.), *Algae and Human Affairs* (pp. 87-118). Cambridge, UK; Cambridge University Press.
- Murata, N., & Miyao, M. (1985). Extrinsic membrane proteins in the photosynthetic oxygen-evolving complex. *Trends Biochem. Sci.* 10 122–124.
- Neelam, S., & Subramanyam, R. (2013). Alteration of photochemistry and protein degradation of photosystem II from *Chlamydomonas reinhardtii* under high salt grown cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 124, 63-70.
- Nicholls, K.H., Dillon, P.J. (1978). An evaluation of phosphorus–chlorophyll–phytoplankton relationships for lakes. *Int. Rev. Hydrobiol.* 63 (2), 141–154.

- Nimmer, N. A., Inlesias-Rodriguez, M. D. & Merrett, M. J.(1997). Bicarbonate utilization by marine phytoplankton species. *Journal of Phycology* 33, 625-631.
- Norsker, N.H., Barbosa, M. J., Vermuë, M. H., & Wijffels, R. H. (2011). Microalgal production A close look at the economics. *Biotechnology Advances*, 29(1), 24-27
- de la Noüe, J., Laliberté, G., & Proulx, D. (1992). Algae and waste water. *Journal of Applied Phycology*, 4(3), 247-254
- Nur, N.N., Ali, M.M., Das, M., Rahman, M.M., Farid, S.M. (2008).Development of low cost medium for the culture of *Chlorella ellipsoidea* using poultry waste. *J. Agrofor. Environ*, 2 (1), 1–6.
- Oliver, R. L., Hamilton, D. P., Brookes, J. D., & Ganf, G. G. (2012). Physiology, Blooms and Prediction of Planktonic Cyanobacteria. In: B. A. Whitton (Eds.), *Ecology of Cyanobacteria II*, (pp. 155-194)
- Olofsson, M., Lamela, T., Nilsson, E., Bergé, J.P., del Pino, V., Uronen, P., Legrand, C. (2012). Seasonal variation of lipids and fatty acids of the microalgae *Nannochloropsis oculata* grown in outdoor largescale photobioreactors. *Energy*, 5,1577–1592
- Ozturk, Z. N., Talame, V., Deyholos, M., Michalowski, C. B., Galbraith, D. W., Gozukirmizi, N., Tuberosa, R., & Bohnert, H. J. (2002). Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Mol. Biol.*, 48,551-573.
- Pahija, E., & Hui, W.C.(2019). A systematic study on the effects of dynamic environments on microalgae concentration. *Algal Research*, 42, 101599.
- Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., Boussiba, S. (2011). The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 90, 1429-1441.
- Pal, W.S., Singh, K.N., & Azam, K. (2013). Evaluation of Relationship between Light Intensity (Lux) and Growth of *Chaetoceros muelleri*. *Journal of Oceanography and Marine Research*, 1,111.
- Parida, A.K., Das, A.B., & Mitra, B.(2003). Effects of NaCl stress on the structure, pigment complex composition, and photosynthetic activity of mangrove *Bruguiera parviflora* chloroplasts. *Photosynthetica*, 41, 191–200.
- Park, S., Lee, Y., Jin, E. (2013). Comparison of the responses of two *Dunaliella* strains, *Dunaliella salina* CCAP 19/18 and *Dunaliella bardawil* to light intensity with special emphasis on carotenogenesis. *ALGAE* 28, 203-211.
- Parkhill, J.P., Maillet, G., Cullen, J.J. (2001). Fluorescence-based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress. *J. Phycol.* 37, 517–529.
- Parmar, A., Singh, N.K., Pandey, A., Gnansounou, E., Madamwar, D. (2011). Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. *Bioresour Technol.*, 102,10163–10172
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 45(1), 11-36
- Pick, U. (2002). Adaptation of the halotolerant alga *Dunaliella* to high salinity. In A. Lauchli, Luthge (Eds.), *Salinity: Environment, Plants, Molecules*.(pp. 97-112). Dordrecht, the Netherlands; Kluwer Academic Publishers.
- Piorreck, M., Baasch, K.L., Pohl, P. (1984). Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*, 23 (2), 207–216
- Powell, N., Shilton, A., Pratt, S., & Chisti Y. (2011). Luxury uptake of phosphorus by microalgae in full-scale waste stabilisation ponds. *Water Science and Technology*, 63(4): 704-709
- Premkumar, L., Greenblatt, H.M., Bageshwar, U.K., Savchenko, T., Gokhman, I., Sussman, J.L., Zamir, A. (2005). Three-dimensional structure of a halotolerant algal carbonic anhydrase predicts halotolerance of a mammalian homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102, 7493–7498
- Pulz, O. P. (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(3), 287-293
- Pulz, O., Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 635–648
- Rad, A.F., Aksoz, N., & Hejazi, A.M.(2011).Effect of salinity on cell growth and β -carotene production in *Dunaliella* sp. isolates from Urmia Lake in northwest of Iran. *Afr.J.Biotechnol.*,10(12),2282-2289

- Raghavan, G., Haridevi, C.K., & Gopinathan, C.P.(2008). Growth and proximate composition of the *Chaetoceros calcitrans* f. *pumilus* under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. *Aquac. Res.*, 39, 1053-1058.
- Rao, A.R., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala T.R. & Ravishankar, G.A.(2007). Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresour. Technol.*, 98, 560-564.
- Regan, D. L., & Gartside, G. (1983). *Liquid Fuels from Microalgae in Australia*. Melbourne: CSIRO
- Renaud, S.M., Zhou, H.C., Parry, D.L., Thinh, L.V., Woo, K.C.(1995). Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea* and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T.ISO). *J. Appl. Phycol.*, 7, 595–602.
- Reynolds, C. S. (2006). *The ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press
- Richmond, A.(1986). Microalgae of economic potential. In A, Richmond (Eds.). *Handbook of Microalgal Mass Cultures*,(pp. 199-243). Boca Raton, FL;CRC Press Inc.
- Richmond, A. (1986). Cell response to environmental factors. In A, Richmond, (Eds.), *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 69-99). Boca Raton; CRC Press.
- Richmond, A. (1988). *Spirulina*. In M. A. Borowitzka, and L. J. Borowitzka (Eds.), *Micro-Algal Biotechnology*, (pp. 85-121). Cambridge, UK; Cambridge University Press.
- Richmond, A. (1992). Open systems for the mass production of photoautotrophic microalgae outdoors: physiological principles. *Journal of Applied Phycology*, 4(3), 281-286
- Richmond, A. (1999). Physiological principles and modes of cultivation in mass production of photoautotrophic microalgae. In Z. Cohen (Eds.), *Chemical from Microalgae*(pp.353-386). Philadelphia.
- Riebesell, U., Zondervan, I., Rost, B., Tortell, P. D., Zeebe, R. C. & Morel, F. M. M. (2000). Reduced calcification in marine plankton in response to increased atmospheric CO₂. *Nature* 407,634-637.
- Riyahi, J., Houazine, Y., Akallal, R., Mouradi, A., Creach, A., Givernaud, T., Mouradi, A. (2007). Influence des nitrates, de la salinité et du stress lumineux sur la teneur en acides gras et en -carotène de *Dunaliella salina*. *Bull Soc Pharm Bordeaux*, 146,235–250
- Rocha, J.M.S., Garcia, J.E.C., Henriques, M.H.F. (2003). Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomol Eng*, 20,237–242
- Rodrigues, B.D., Menezes, R. C., Mercadante, Z.A., Jacob-Lopes, E., & Zepka, Q.L.(2015). Bioactive pigments from microalgae *Phormidium autumnale*. *Food Research International*, 77, 273-279.
- Rosales, N., Ortega, J., Mora, R., Morales, E. (2005). Influence of salinity on the growth and biochemical composition of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Cienc Mar*. 31, 349–355
- Salguero, A., la Morena, de, B., Vígara, J., Vega, J.M., Vílchez, C., Leon, R. (2003). Carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. *Biomol. Eng.*, 20, 249e253. [http://dx.doi.org/10.1016/S1389-0344\(03\)00065-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00065-0).
- Sánchez-Estudillo, L., Freile-Pelegrin, Y., Rivera-Madrid, R., Robledo, D., & Narváez-Zapata, J. A. (2006). Regulation of two photosynthetic pigment-related genes during stress-induced pigment formation in the green alga, *Dunaliella salina*. *Biotechnol. Lett.* 28,787-791
- Saros, J.E. & Fritz, S.C. (2000). Changes in the growth rates of saline-lake diatoms in response to variation in salinity, brine type and nitrogen form. *J. Plankton, Res.*, 22, 1071-1083.
- Satoh, K., Smith, C.M., Fork, D.C. (1983). Effects of salinity on primary processes of photosynthesis in the red alga *Porphyra perforata*, *Plant Physiol.* 73, 643–647.
- Sforza, E., Simionato, D., Giacometti, G.M., Bertuccio, A., Morosinotto, T. (2012). Adjusted light and dark cycles can optimize photosynthetic efficiency in algae growing in photobioreactors. *PLoS ONE*, 7(6), e38975. doi:10.1371/journal.pone.0038975
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., & Roessler, P.(1998). Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae; Close-Out Report. United States. <https://doi.org/10.2172/15003040>
- Sheng, Y.J., Chen, D.H.(2004). Effect of different light cycle on the growth of *P. Millirod* algae and green *Millirod* algae. *J. Lake Sci.*, 16(3), 21–5.

- Shuler, M.L., Kargi, F. (2005). *Bioprocess Engineering: Basic Concepts* (2nd ed.). Singapore: Pearson Education
- Siaut, M., Cuine, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylides, C., Li-Beisson, Y., Peltier, G. (2011). Oil accumulation in the model green algae *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnol*, 11, 7.
- Singh, S.P., & Singh, P. (2015). Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 431-444.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87-96
- Stemler, A. J. (1997). The case for chloroplast thylakoid carbonic anhydrase. *Physiologia plantarum*, 99,348-353.
- Stroch, M., Spunda, V., Kurasova, I. (2004). Non-radiative dissipation of absorbed excitation energy within photosynthetic apparatus of higher plants. *Photosynthetica*, 42(3), 323-337.
- Schubert, H., Fulda, S., Hagemann, M. (2012). Effects of Adaptation to Different Salt Concentrations on Photosynthesis and Pigmentation of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Plant Physiology*, 142(3), 291-295.
- Sudhir, P., & Murthy, S.D.S. (2004). Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica*, 42, 481-486.
- Sudhir, P., Pogoryelov, D., Kovács, L., Garab, G., Murthy, S.D.S. (2005). The effects of salt stress on photosynthetic electron transport and thylakoid membrane proteins in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 38, 481-485.
- Suh, I., & Lee, C.G. (2003). Photobioreactor engineering: Design and performance. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8(6), 313-321
- Sung, K.D., Lee, J.S., Shin, C.S., Park, S.C., Choi, M.J. (1999). CO₂ fixation by *Chlorella* sp. KR-1 and its cultural characteristics. *Bioresour. Technol.* 68, 269-273
- Sushchik, N.N., Kalacheva, G.S., Zhila, N.O., Gladyshev, M.I., Volova, T.G. (2003). A temperature dependence of the intra- and extracellular fatty acid composition of green algae and cyanobacterium. *Russ J Plant Physiol* 50,374-380
- Sym, S. D., & Pienaar, R. N.(1993). The class Prasinophyceae. *Progress in Phycological Research*, 9,281.
- Takagi, M., Watanabe, K., Yamaberi, K., Yoshida, T. (2000). Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp. UTEX LB1999. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 112-117
- Takagi, M., Karseno & Yoshida, T.(2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglycerides in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J. Biosci. Bioeng.*, 101, 223-226.
- Takahashi, S., & Murata, N. (2008). How do environmental stresses accelerate photoinhibition. *Trends in Plant Science*, 13(4).
- Talebi, A.F., Tabatabaei, M., Mohtashami, S.K., Thidfar, M., Moradi, F. (2013). Comparative salt stress study on intracellular ion concentration in Marine and salt adapted freshwater strains of microalgae. *Not. Sci. Biol.* 5, 309-315
- Thompson, P.A., Guo, M., Harrison, P.J., Whyte, J.N.C.(1992). Effects of variation in temperature. II. On the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. *J. Phycol.*, 28, 488-497.
- Toennies, G., Gallant, D.L. (1949). The relation between photometric turbidity and bacterial concentration. *Growth* 13, (1), 7-20.
- Tucker, M. E., & Wright, V. P. (1990). *Carbonate Sedimentology*, Blackwell Scientific, Oxford, UK.
- Ugwu, C. U., Aoyagi H., & Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99(10): 4021-4028
- Van der Meer, J. P., Patwary. (1995). Genetic studies on marine macroalgae: A status report. In: W,Wiessner, E. Schnepf, & R. C. Starr (Eds.), *Algae, Environment and Human Affairs*,(pp.235-258). Bristol, UK; BioPress.
- Vogeley, L., Sineshchekov, O. A., Trivedi, V. D., Sasaki, J., Spudlich, J. L., & Luecke, H.(2004). Anabaena sensory rhodopsin: Aphotochromic color sensor at 2.0 Å. *Science* ,306,1390-1393.
- Vonshak, A. (2002). *Spirulina: Growth, physiology and biochemistry*. In: A. Vonshak (Eds.). *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and Biotechnology* (pp. 43-65). London.

- Vorst, P., Baard, R. L., Mur, L. R., Korthals, H. J. & van den Ende, H. (1994). Effect of growth arrest on carotene accumulation and photosynthesis in *Dunaliella*. *Microbiology*, 140,1411-1417.
- Wahidin, S, Idris, A, Muhamad, Shaleh, S.R. (2013). The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology*, 129, 7-11
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., & Lan, C. (2008). CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(5): 707-718
- Wang C.Y., Fu C.C. and Liu Y.C. (2007).Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 21-25
- Wiessner, W., Schnepf, E. & Starr, R. C. (1995). *Algae, Environment Human Affairs*. Bristol, UK; Biopress Ltd
- Wijffels, R. H., & Barbosa, M. J. (2010). An outlook on microalgal biofuels. *Science*, 329(5993), 796-799
- Williams, P.J.I.B., Laurens, L.M. (2010). Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy Environ. Sci.*, 3, 554-590.
- Xia, B., & Abbott, I. A.(1987). Edible seaweeds of China and their place in the Chinese diet. *Economic Botany*, 41,341-353.
- Xu, Y., Milledge, J.J., Abubakar, A., Swamy, R.A.R., Bailey, D., Harvey, P.J.(2015). Effects of centrifugal stress on cell disruption and glycerol leakage from *Dunaliella salina*. *Microalgae Biotechnol.* 1, 20e27. <http://dx.doi.org/10.1515/micbi-2015-0003>.
- Xu, Y., Ibrahim, M.I., & Harvey, J.P. (2016). The influence of photoperiod and light intensity on the growth and photosynthesis of *Dunaliella salina* (chlorophyta) CCAP 19/30. *Plant Physiology and Biochemistry*,106, 305-315.
- Xue, S., Su, Z, Cong, W. (2011). Growth of *Spirulina platensis* enhanced under intermittent illumination. *J Biotechnol* ,151, 271–277
- Yilancioglu, K., Cokol, M., Pastirmaci, I., Erman, B., Cetiner, S.(2014). Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated *Dunaliella salina* strain. *PLoS ONE* 9, e91957. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0091957>.
- Yokthongwattana, K., Melis, A.(2008). Photoinhibition and recovery in oxygenic photosynthesis: mechanism of a photosystem II damage and repair cycle. In: *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment, Advances in Photosynthesis and Respiration*. Springer, Netherlands, Dordrecht, 175-191. http://dx.doi.org/10.1007/1-4020-3579-9_12.
- Zelazny, A.M., Shaish, A., Pick, U., 1995. Plasma membrane sterols are essential for sensing osmotic changes in the halotolerant alga *Dunaliella*. *Plant Physiol.* 109, 1395e1403.
- Zerveas, S., Mente, S.M., Tsakiri, D., & Kotzabasis, K.(2021). Microalgal photosynthesis induces alkalization of aquatic environment as a result of H⁺ uptake independently from CO₂ concentration – New perspectives for environmental applications. *Journal of Environmental Management*, 289, 112546.
- Zhang, Q., Gradinger, R. & Spindler, M.(1999). Experimental study on the effect of salinity on growth rates of Arctic-sea-ice algae from the Greenland Sea. *Boreal. Environ. Res.*, 4, 1-8.
- Zhu, C.J., Lee, Y.K., Chao, T.M. (1997). Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *J Appl Phycol* 9,451–457

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Graham L. E., Graham J. M., Wilcox L. W.(2011). Φύκη. Εκδόσεις Κωσταράκη.
- Δροσόπουλος, Ι. Β. (1998). Φυσιολογία φυτών. Μέρος Ι. Αθήνα, σελ. 361.
- Γκέλης, Σ. 2015. Καλλιέργεια φυκών. In Ε. Βουλτσιάδου, Θ. Ι. Αμπατζόπουλος, Ε. Αντωνοπούλου, Κ. Γκανιάς, Α. Στάικου, Α. Τριανταφυλλίδης (Eds.), *Υδατοκαλλιέργειες* (pp.150-179). Αθήνα: Κάλλιπος. [Http://hdl.handle.net/11419/5083](http://hdl.handle.net/11419/5083).

Καραμπουρνιώτης, Γ. 2003. Φυσιολογία Καταπονήσεων των Φυτών. Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο.

Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούπης, Χ., Παπαϊωάννου, Ά., Πλαγεράς, Π., Σπυρόπουλος, Β., Τσότσου, Γ., Φούντζουλα, Χ. (2015). Βασικές αρχές φωτομετρίας και χρωματομετρικών αναλύσεων. Στο Π. Καρκαλούσος, Ζ. Γεωργίου, Χ.Κρούπης, Ά. Παπαϊωάννου, Π. Πλαγεράς, Β. Σπυρόπουλος, Γ. Τσότσου, Χ. Φούντζουλα (Eds.), Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας. Αθήνα: Κάλλιπος. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/5383>

Κυριακίδου, Χ.(2014). Εκτίμηση του φωτοπροστατευτικού δυναμικού των ανθοκυανινών στο φυτό *Berberis cretica* μέσω της μελέτης φθορισμού χλωροφύλλης in vivo. Πτυχιακή εργασία. Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Χώτος, Γ., (Hotos, G.) 2016. Καλλιέργειες Πλαγκτού (ζωντανή τροφή σε ιχθυοεκκολαπτήρια). Research Gate. DOI: 10.13140/RG.2.2.24664.03849. Available from: https://www.researchgate.net/publication/338103351_Kalliergeies_Planktou_zontane_trophe_se_ichthyoekkolapteria

Χώτος, Γ.(2018). Φύκη-Τεχνολογικές Εφαρμογές.

Χώτος, Γ.(2018). Βιολογία Φυκών.

Χώτος, Γ.(2019). Φυκολογία 1ο μέρος. Το κύτταρο και το νερό. DOI:10.13140/RG.2.2.24352.94728

Χώτος, Γ.(2019). Φυκολογία 2ο μέρος. Μεταβολισμός-φωτοσύνθεση-απόκτηση άνθρακα-θρεπτικά. DOI:10.13140/RG.2.2.26030.66887

Χώτος, Γ.(2019). Φυκολογία 3ο μέρος. Κυανοβακτήρια. DOI:10.13140/RG.2.2.24772.37761/1

Χώτος, Γ.(2019). *Dunaliella*, το θαυμαστό φύκος των αλυκών. DOI:10.13140/RG.2.2.36763.41763

Χώτος, Γ.(2020). Βιολογικές χρωστικές & φωτοσύνθεση. DOI:10.13140/RG.2.2.13148.54406/1