

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ»

Τμήμα Κτηνιατρικής

Μεταπτυχιακή εργασία

Ντέτσικας Σωτήριος

*Εκτροφή Τροχοζώων *Brachionus plicatilis* με στελέχη φυτοπλαγκτού από ελληνικές λιμνοθάλασσες*

Υπεύθυνος καθηγητής: Δρ. Τζοβενής Ιωάννης

Ιούνιος 2012

1 Περιεχόμενα

2	Περίληψη.....	3
3	Abstract	4
4	Σκοπός της εργασίας	5
5	Εισαγωγή	6
5.1	Κατηγορίες πλαγκτού	6
5.1.1	Φυτοπλαγκτόν.....	7
5.1.2	Ταξινόμηση φυκών.....	9
5.1.3	Μέθοδοι παραγωγής των μικροφυκών	11
5.1.4	Εναλλακτικοί τρόποι παραγωγής των μικροφυκών.....	13
5.1.5	Άλλες χρήσεις μικροφυκών	15
5.2	Τροχόζωα.....	16
5.2.1	Ταξινόμια.....	17
5.2.2	Εσωτερική δομή και εξωτερική μορφολογία.....	18
5.2.3	Αναπαραγωγή	20
5.2.4	Οικολογία του γένους <i>Brachionus</i>	22
5.2.5	Εφαρμογή καλλιεργειών <i>Brachionus</i> στα εκκολαπτήρια.....	24
5.2.6	Οι ιδιαιτερότητες των <i>Brachionus plicatilis</i>	27
6	Υλικά και Μέθοδοι	29
6.1	Υλικά.....	29
6.2	Μέθοδοι.....	30
6.2.1	Κριτήρια επιλογής	30
6.2.2	Προετοιμασία καλλιεργειών	30
6.2.3	Μαζική καλλιέργεια μικροφυκών	31
6.2.4	Εκτροφή πληθυσμών τροχόζωων.....	33
6.2.5	Καλλιέργειες σε φιάλες όγκου 250 ml	34
6.2.6	Πειραματικό στάδιο	34
6.2.7	Αναλυτική μεθοδολογία	35
7	Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	38
8	Βιβλιογραφία.....	47

2 Περίληψη

Στην εργασία αυτή έγινε συγκριτική μελέτη μεταξύ εννέα ειδών (ταυτοποιημένων σε επίπεδο γένους - *Tetraselmis sp.*) καθώς και του *Tetraselmis chuii*, σε αντιδιαστολή με ένα είδος προερχόμενο από το εμπόριο (*Tetraselmis suecica*) το οποίο κυριαρχεί στις εφαρμογές της παγκόσμιας θαλασσοκαλλιέργειας. Τα εννέα είδη προέρχονται από τις λιμνοθάλασσες Βατάτσα, Ροδιά και Τσουκαλιό, που βρίσκονται στην περιοχή του Δρεπάνου της Ηγουμενίτσας, η πρώτη και στην περιοχή του Αμβρακικού οι άλλες δύο. Το *Tetraselmis chuii* αποτελεί εμπορικό είδος αλλά με ελάχιστη εφαρμογή στις θαλασσοκαλλιέργειες

Για την επίτευξη αυτής της σύγκρισης αναπτύχθηκαν καλλιέργειες εκτροφής τροχοζώων του είδους *Brachionus plicatilis*, όπου ως διατροφικό μέσο χρησιμοποιήθηκαν τα είδη των μικροφυκών που αναφέρθησαν.

Οι καλλιέργειες έγιναν σε φιάλες τύπου Erlenmeyer τελικού όγκου 250 ml και καθημερινά γινόταν καταγραφή των ατόμων του πληθυσμού των τροχοζώων καθώς και των κυττάρων των μικροφυκών. Επίσης γινόταν εμπλουτισμός των καλλιεργειών με φύκη που απαιτούνταν για την διατροφή των αναπτυσσόμενων πληθυσμών των *Brachionus plicatilis*.

Μέσω της παρούσης έρευνας απεδείχθη ότι τέσσερα από τα είδη είναι ακατάλληλα για χρήση στην θαλασσοκαλλιέργεια. Από τα υπόλοιπα, τρία είναι αδιάφορα ως προς τις αποδόσεις που είχε η χρήση τους ως διατροφικά μέσα στις καλλιέργειες των τροχοζώων. Ξεχώρισαν τα τελευταία τρία είδη (ένα από την λιμνοθάλασσα της Ροδιάς, ένα από την λιμνοθάλασσα της Βατάτσας και το εμπορικό στέλεχος του είδους *Tetraselmis chuii*) των οποίων οι αποδόσεις ήταν σε πολύ κοντινά επίπεδα σε σχέση με την ανάπτυξη, την παραγωγικότητα και το ποσοστό αύξησης των πληθυσμών των τροχοζώων που αποδόθηκαν με την χρήση του μικροφύκου *Tetraselmis suecica*

Λέξεις – Κλειδιά: *Tetraselmis sp.*, *Brachionus plicatilis*, θαλασσοκαλλιέργεια, ελληνικές λιμνοθάλασσες, ανάπτυξη πληθυσμών.

Stockfarming of rotifers *Brachionus plicatilis* using strains of microalgae sampled from greek lagoons.

Postgraduate student: **Detsikas Sotirios**

Graduate Thesis Submitted for the Degree

“Master in Aquaculture”

University of Thessaly - Faculty of Veterinary Science

Supervisor: **Dr. Tzovenis John**

3 Abstract

In the current research studied 10 species of phytoplankton (nine identified only in genus *Tetraselmis* sp. and one of the specie *Tetraselmis chuii*) in comparison with strains of *Tetraselmis suecica*, which is used most often in global aquaculture. These nine spieces collected from the lagoons of Vatatsa (Drepanos area in Igumenitsa), Rodia (Ambrakikos area) and Tsukalio (Ambrakikos area). *Tetraselmis chuii* is also (like *Tetraselmis suecica*) an commercial spiece, but it has minimal usage in aquaculture.

For this experimental research, cultures of rotifer of the specie *Brachionus plicatilis* developed and fed with the above reported microalgae.

The cultures took place in Erlenmeyers bottles volume 250 ml and in daily bases recorded the number of the rotifers and the cells of microalgae. In continuity, the needed quantity of microalgae used for enrichment of the rotifers cultures for nutritious purposes.

In conclusion of this research, have been proved that four of these 10 species doesn't meets the essentially criteria for usage in aquaculture. Three species of the rest doesn't have any significant results as nutritious mediums for rotifer cultures. But the last three, one from the lagoon of Rodia, one from lagoon of Vatatsa and the commercial specie *Tetraselmis chuii*, have scored very good results for the development of the rotifers cultures. Their nutritious value is near the value of the commercial *Tetraselmis suecica*.

Key-words: *Tetraselmis* sp., *Brachionus plicatilis*, sea aquaculture, greek lagoons, culture development.

4 Σκοπός της εργασίας

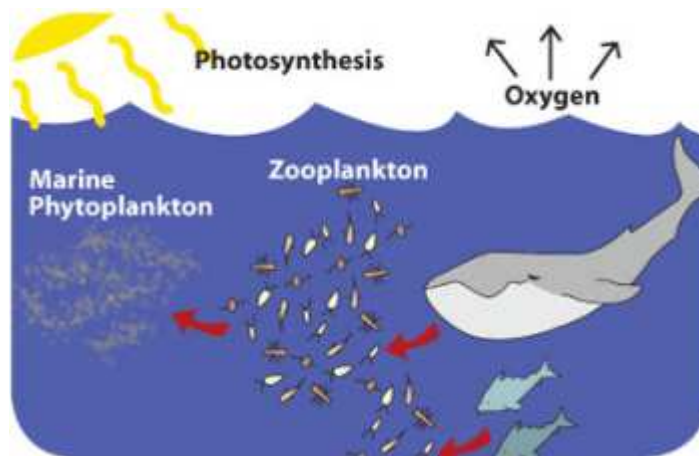
Στις ελληνικές επιχειρήσεις που δραστηριοποιούνται στον τομέα των θαλασσοκαλλιέργειών χρησιμοποιούνται, για την παραγωγή ζωντανής τροφής και για την τεχνική των πράσινων νερών στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς, εισαγόμενα στελέχη φυτοπλαγκτού. Αυτά τα στελέχη προέρχονται κυρίως από τις Βόρειες θάλασσες, από όπου και απομονώθηκαν. Τα περισσότερα είδη από αυτά θεωρούνται εξωτικά για την περιοχή της Μεσογείου. Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτελεί μια παρουσίαση συγκριτικών αποτελεσμάτων από στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από τις λιμνοθάλασσες της Ηπείρου, με σκοπό την απόδειξη καταλληλότητας τους για τις υδατοκαλλιέργειες ή άλλες εμπορικές εφαρμογές, αλλά και της ευχέρειας στην ολική ή μερική αντικατάσταση των εισαγόμενων στελεχών, στις εν λόγω εφαρμογές.

Τα στελέχη των μικροφυκών του γένους *Tetraselmis* που χρησιμοποιήθηκαν για τις εκτροφές των τροχοζώνων έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί σε επίπεδο γένους από λιμνοθάλασσες του Καλαμά (Βατάτσα) και του Λούρου (Ροδιά, Τσουκαλιό). Αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδιαστολή με τα εισαγόμενα στελέχη *Tetraselmis suecica* και *Tetraselmis chuii*. Για την πειραματική εκτροφή χρησιμοποιήθηκαν εμπορικές καλλιέργειες *Brachionus plicatilis* (Φύλο: Τροχόζωα, Κλάση: Monogononta, Τάξη: Pliota, Οικογένεια: Brachionidae, Γένος: Brachionus, Είδος: Brachionus plicatilis) από εκκολαπτήριο θαλάσσιας ιχθυοκαλλιέργειας. Οι μεικτές καλλιέργειες φυτοπλαγκτού και τροχοζώνων έγιναν σε δοχεία των 250 ml, με αρχικό όγκο 100 ml, με αρχικό αριθμό 50 τροχωζώνων ανά ml και συγκεντρώσεις φυκών κατά αντιστοιχία, 1×10^3 κύτταρα ανά τροχόζωο.

5 Εισαγωγή

5.1 Κατηγορίες πλαγκτού

Το επίθετο πλαγκτός είναι αρχαιοελληνικό (απαντά στον Όμηρο και τον Ευριπίδη) και σημαίνει περιπλανώμενος, αλήτης και μεταφορικά παράφρων, ταραγμένος. Το ουδέτερο του επιθέτου (πλαγκτόν ή πλαγκτό) χρησιμοποιείται στην επιστημονική ορολογία για να περιγράψει τους μικρούς φυτικούς ή ζωικούς οργανισμούς που πλανιούνται στη θάλασσα και εξαιτίας της περιορισμένης ικανότητάς τους για κίνηση, μεταφέρονται από τις διάφορες μορφές κινήσεως των υδάτινων μαζών. Οι πλαγκτονικοί οργανισμοί (Εικόνα 1.) χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τους φυτοπλαγκτονικούς και τους ζωοπλαγκτονικούς.



Εικόνα 1. Ο ρόλος του φυτοπλαγκτονικών και των ζωοπλαγκτονικών οργανισμών στην φύση (πηγή: <http://phytoononline.mdamirpp.net/sitebuilder/images/untitled-350x225.png>).

Επίσης μπορούμε να χωρίσουμε τους πλαγκτονικούς οργανισμούς σε διάφορες άλλες κατηγορίες με βάση κυρίως το μέγεθός τους (μακροπλαγκτόν, μικροπλαγκτόν, νανοπλαγκτόν, υπερπλαγκτόν), την περιοχή διαβιώσεώς τους (επιπλαγκτόν, βαθυ-πλαγκτόν, υποπλαγκτόν) και την μόνιμη ή όχι κατά τη διάρκεια της ζωής τους πλαγκτονική μορφή (ολοπλαγκτόν, μεροπλαγκτόν) (Αθανασάκη, 2004).

5.1.1 Φυτοπλαγκτόν

Το φυτοπλαγκτόν και οι άλλοι μικροσκοπικοί αυτότροφοι οργανισμοί ονομάζονται συλλογικά φυτοπλαγκτόν και είναι οι πιο σημαντικοί πρωτογενείς παραγωγοί σε πολλά θαλάσσια οικοσυστήματα. Είναι αυτότροφοι οργανισμοί που φωτοσυνθέτουν. Περιλαμβάνει διάφορες ομάδες φυκών, βακτηρίων κλπ (Καρύδης, 1989).

Τα φύκη είναι οι πρώτιστοι οργανισμοί παραγωγής οξυγόνου στα υδρόβια περιβάλλοντα, κυρίως τα πλαγκτικά μικροφύκη. Αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι ευρέως διαδεδομένοι στα γλυκά νερά, στη θάλασσα και σε εδάφη διαφόρων τύπων, κατ' επέκταση βρίσκονται σε όλα τα φυσικά ύδατα. Έχουν προσαρμοστεί σε διαφορετικά περιβάλλοντα και χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλία μεγεθών, μορφολογίας, κύκλου ζωής, χρωματισμού, αναπαραγωγικών μηχανισμών, μεταβολισμού και οικολογικών ρόλων. Παρόλα αυτά οι βασικοί βιοχημικοί μηχανισμοί τους, φαίνεται να είναι οι ίδιοι, όπως για παράδειγμα όλα έχουν χλωροφύλλη α και όλα έχουν φωτοσυνθετικό σύστημα που λειτουργεί με αυτή τη φωτοχρωστική.

Περίπου η μισή παγκόσμια παραγωγή οξυγόνου είναι αποτέλεσμα της φωτοσύνθεσης αυτών των μικροοργανισμών. Παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην ανακύκλωση του διοξειδίου του άνθρακα - CO₂, η οποία επιτυγχάνεται δια μέσου της φωτοσύνθεσης, που είναι παρόμοια αυτής των μεγάλων φυτικών οργανισμών της χέρσου.

Το μεγαλύτερο ποσοστό της φυτικής βλαστήσεως των αλμυρών υδάτων αποτελείται από φύκη, ενώ οι αντιπρόσωποι των τραχειοφύτων (φυτά που δεν αντέχουν στη συγκέντρωση των αλμυρών υδάτων) σε αυτά τα ύδατα είναι πολύ λίγοι. Στα γλυκά ύδατα βρίσκουμε μία μεγάλη ποικιλία φυκών και τραχειοφύτων. Η κατάταξη των φυκών βασίζεται στη χημική σύσταση των ουσιών που αποταμιεύουν, στο κυτταρικό τοίχωμα, καθώς και στις χρωστικές που χαρακτηρίζουν το κάθε είδος. Τονίζεται ότι πολλά φύκη, καθώς και ορισμένα είδη των πρωτίστων (μικροσκοπικοί μαστιγοφόροι οργανισμοί, που χαρακτηρίζονται από την παρουσία ή μη χλωροπλαστών, καθώς και από την παρουσία πυρήνων και μιτοχονδρίων), αποτελούν τους φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς, δηλαδή τον πρώτο κρίκο της διατροφικής αλυσίδας του υδρόβιου περιβάλλοντος, δημιουργώντας με τη φωτοσυνθετική τους ικανότητα οργανικές ουσίες, που μέσω των ζωοπλαγκτονικών οργανισμών μεταφέρονται στα ψάρια και από αυτά στον άνθρωπο. Στα φύκη ανήκουν τα χλωροφύκη, τα ευγληνόφυτα, τα χρυσόφυτα, τα φαιοφύκη, τα πυρόφυτα και τα ροδοφύκη. Πιο κάτω ακολουθούν περισσότερα στοιχεία γι' αυτές τις ομάδες.

Η μορφολογία των φυκών είναι σχετικά απλή και μπορεί να αποτελούνται:

- Από ένα κύτταρο
- Από σειρά κυττάρων διατεταγμένων σε νηματοειδή σχηματισμό
- Από επιφάνειες κυττάρων (φυλλοειδής σχηματισμοί).
- Από εξωτερικά χαρακτηριστικά παρόμοια με εκείνα των ανωτέρων φυτών.

Δεν έχουν όμως, τη σύνθετη οργάνωση των ιστών που απαντάται στα ανώτερα φυτά.

Τα μονοκύτταρα φύκη διαφέρουν μεταξύ τους στο είδος των μαστιγίων και σε ορισμένα βιοχημικά χαρακτηριστικά. Ενώ όλα περιέχουν χλωροφύλλη, υπάρχει μεγάλη ποικιλία καροτινοειδών κατανεμημένων σε διάφορες ομάδες.

Προφανές είναι ότι τα ονόματα των διαφόρων ταξινομικών ομάδων προέρχονται από τις διάφορες χρωστικές που επικαλύπτουν το πράσινο των χλωροφυλλών. Μεγάλη ποικιλία παρατηρείται στο είδος των αποθησαυριστικών ουσιών που βρίσκονται στις διάφορες ομάδες.

Έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες σχετικά με τις φυσιολογικές πτυχές των μικροφυκών, αλλά και για την παραγωγή χρήσιμων βιολογικών υλικών. Τα πλεονεκτήματα της χρησιμοποίησής τους στην παραγωγή είναι:

α) Η ιδιότητά τους να μετατρέπουν το CO₂ σε χρήσιμες οργανικές ενώσεις διαμέσου της φωτοσύνθεσης.

β) Η δυνατότητά που έχουν να αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα οργανικών συνθηκών.

Για παράδειγμα, μπορούν να αναπτυχθούν καλλιέργειες θαλάσσιων μικροφυκών χρησιμοποιώντας θαλασσινό νερό, CO₂ και ηλιακό φως. Πρόσφατες έρευνες σχετικά με την βιοτεχνολογία των μικροφυκών έχουν επικεντρωθεί στην παραγωγή χρήσιμων συστατικών εφαρμόσιμα στους τομείς των καλλυντικών και της ιατρικής.

Εργαλεία γενετικής και μοριακής τροποποίησης έχουν αναπτυχθεί κυρίως σε κυανοβακτήρια. Γενετικές τροποποιήσεις έχουν βαθμιαία εφαρμοστεί σε ευκαριωτικά μικροφύκη. Πρόσφατα, ολόκληρες γονιδιακές ακολουθίες και αναλύσεις EST έχουν εκτελεστεί σε θαλάσσια είδη. Η διευκρίνιση των πληροφοριών του γονιδιακού εύρους μπορεί να βοηθήσει στην ανάπτυξη νέων βιοτεχνολογικών εφαρμογών με την χρήση μικροφυκών (Tadashi et al., 2005).

Η αναπαραγωγή είναι συνήθως μονογονική και επιτυγχάνεται με τη συνεχόμενη κυτταρική διαίρεση του μητρικού κυττάρου ή το σχηματισμό σπορίων ικανών να αναπτύσσονται σε τέλεια άτομα. Επιπλέον, νέα άτομα μπορούν να παραχθούν από τη σύντηξη δύο γαμετών. Ο ζυγωτής που αναπτύσσεται, σαν συνέπεια αυτής της ένωσης, μπορεί να δώσει τέλειο άτομο ή να παράγει σπόρια.

5.1.2 Ταξινόμηση φυκών

Η διάκριση των φυκών σε ομάδες έγινε με βάση τις χρωστικές ύλες που περιέχουν (το χρώμα τους), τη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος, τη χημική αποθηκευτική μορφή και την ύπαρξη ή όχι μαστιγίου (flagellum):

- Χλωρόφυτα (Chlorophyta): Είναι από τις πλέον ποικιλόμορφες οικογένειες φυκών περιλαμβάνοντας από μονοκύτταρους οργανισμούς, μέχρι αποικίες και μεγάλου μεγέθους οργανωμένες δομές. Παρουσιάζονται σε θαλασσινά και γλυκά νερά. Τα θαλάσσια είδη παρουσιάζουν μεγάλο χημικό ενδιαφέρον και είναι από τις πλέον μελετημένες ομάδες φυκών. Η κατηγορία αυτή των υδρόβιων φυκών χαρακτηρίζεται από την παρουσία χλωροφύλλης α και β και διαφόρων καροτινών και ξανθοφυλλών. Ορισμένα από τα φύκη αυτά δεν έχουν απόλυτα πράσινο χρώμα, λόγω της παρουσίας σε μεγάλη ποσότητα άλλων χρωστικών. Η σπουδαιότερη από τις ουσίες που αποταμιεύουν είναι το άμυλο, ενώ τα κύτταρά τους φέρουν δύο μαστίγια. Τα χλωρόφυτα αποτελούνται από 500 γένη και 16000 είδη, εκ των οποίων το 10% μόνο είναι θαλάσσια είδη (Tadashi et al., 2005).

- Ευγληνόφυτα (Euglenophyta): Είναι συγγενή με τα χλωροφύκη, παρουσιάζονται όμως σαν μονοκύτταροι οργανισμοί με μαστίγιο. Βρίσκονται κυρίως σε περιβάλλοντα με μεγάλο οργανικό φορτίο. Πρόκειται για αυτότροφους οργανισμούς που ζουν ελεύθεροι και συνήθως έχουν ένα ή δύο μαστίγια. Έχουν την ικανότητα να φωτοσυνθέτουν και μάλιστα έχουν ένα φωτοευαίσθητο όργανο, το οποίο χρησιμεύει στο να διακρίνουν την κατεύθυνση του φωτός. Χρησιμοποιώντας το όργανο αυτό και το μαστίγιο, μπορούν να μετακινηθούν ή να περιστραφούν έτσι ώστε να φωτίζεται «ράχη» τους.

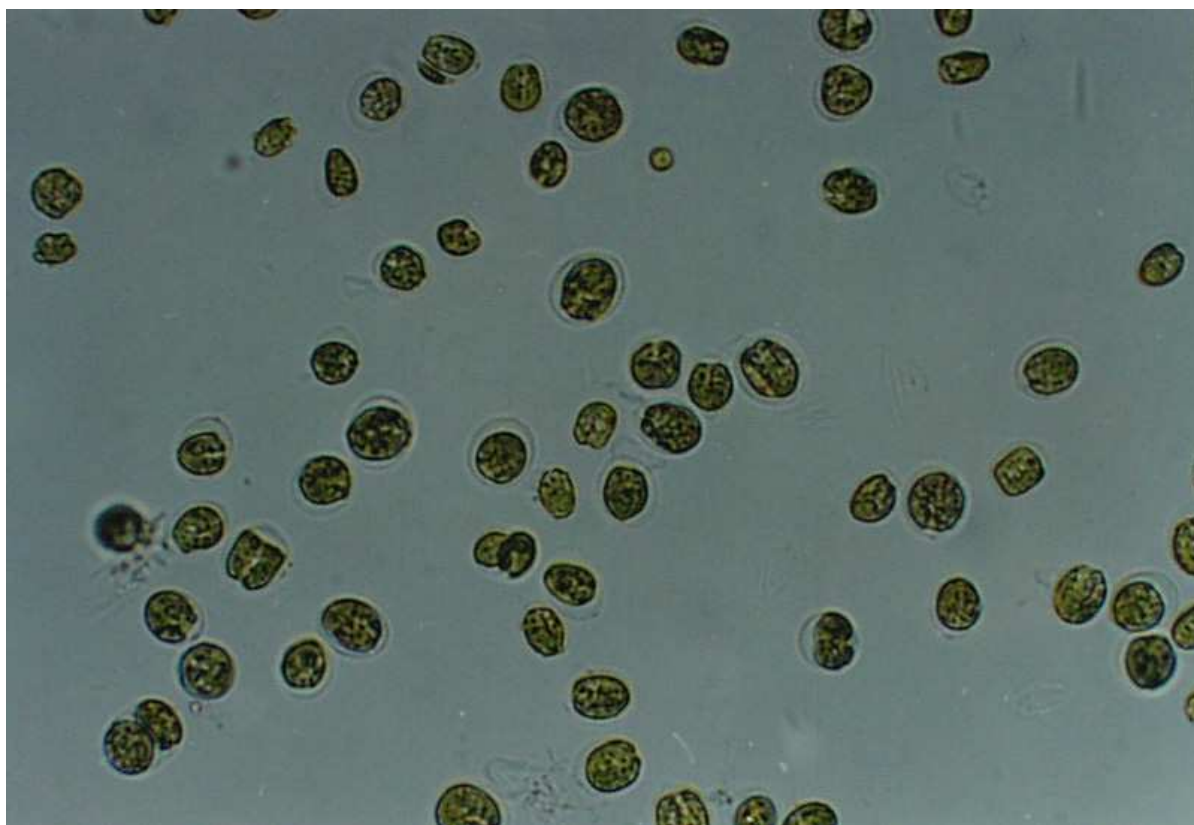
- Φαιοφύκη (phaeophyta): Είναι πολυκύτταροι υδρόβιοι φυτικοί οργανισμοί, κυρίως κάτοικοι των αλμυρών και υφάλμυρων υδάτων, ενώ πολύ λίγα είδη βρίσκονται στο γλυκό νερό. Οι χρωστικές που χαρακτηρίζουν τα φαιοφύκη είναι οι χλωροφύλλες α και γ, καροτίνη και ξανθοφύλλες, από τις οποίες υπερέχει η φυκοξανθίνη, όπου οφείλεται και το χρώμα των φαιοφυκών. Από τις ουσίες που αποταμιεύουν τα φαιοφύκη αναφέρονται τα σάκχαρα, η μανιτόλη και η λαμιναρίνη, η οποία αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό όλων των φαιοφυκών. Οι πολυκύτταρες μορφές, αντίθετα με τα χλωροφύκη, παρουσιάζουν διαφοροποίηση, ενώ μερικά έχουν εξειδικευμένα αγωγή κύτταρα (Αθανασάκη, 2004).

- Χρυσόφυτα (Diatoms and gold-brown algae): Είναι μάλλον ανομοιογενής ομάδα φυκών, που περιέχει χλωροφύλλη α και στις χρυσόφαιες μορφές και χλωροφύλλη γ, β-καροτίνη και ξανθοφύλλες (φυκοξανθίνη). Δεν αποταμιεύουν άμυλο, αλλά ορισμένες διαφορετικές μορφές υδατανθράκων και άλατα. Είναι μονοκύτταροι οργανισμοί και τα κύτταρά τους είναι ευκίνητα και φέρουν δύο μαστίγια. Από την κατηγορία αυτή εκείνα που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη σπουδαιότητα είναι τα

διάτομα (Bacillariophyceae), που αποτελούν σημαντικό μέρος του φυτοπλαγκτού όλων των φυσικών υδάτων. Τα διάτομα αναγνωρίζονται σχετικά εύκολα, από την κατασκευή και το σχήμα του κυτταρικού τους τοιχώματος και από τους καστανούς ή κιτρινωπούς χλωροπλάστες τους. Χαρακτηρίζονται από την παρουσία κυτοπλάσματος που περιέχει πυρήνα. Ιδιαίτερο γνώρισμα των διατόμων αποτελεί το κυτταρικό τους τοίχωμα, που χωρίζεται σε δύο μέρη από τα οποία το ένα εισχωρεί στο άλλο. Τα διάτομα διακρίνονται σε δύο κυρίως υποκλάσεις, τα Centricae και τα Pennatae και η διαφορά τους αφορά το σχήμα του κυτταρικού τους τοιχώματος. Στα Centricae το σχήμα του κυτταρικού τοιχώματος είναι συμμετρικό ως προς ένα κεντρικό ή πλάγιο σημείο ή σημεία, ενώ στα Pennatae το σχήμα είναι επιμήκες και δίνει την εντύπωση πτερού.

- Ροδοφύκη (Rhodophyta): Το 98% αυτών των ειδών είναι θαλάσσια είδη. Διαβιούν σε τροπικές περιοχές κοντά στην ακτή. Έχουν ταυτοποιηθεί 600 γένη και 5500 είδη. Οι περισσότεροι είναι πολυκύτταροι οργανισμοί, που τους χαρακτηρίζει μεγάλη ποικιλία χρωμάτων. Το μέγεθός τους κυμαίνεται από μικροσκοπικά μέχρι μεγάλου μεγέθους φύκη. Οι χρωστικές των φυκών αυτών είναι η χλωροφύλλη α και δ, ξανθοφύλλη, καροτίνη, φυκοκυανίνη και φυκοερυθρίνη. Οι δύο τελευταίες είναι διαφορετικής συστάσεως από τις ουσίες που με το ίδιο όνομα βρίσκονται στα κυανόφυτα (γνωστά και ως κυανοβακτήρια τα οποία βρίσκονται ως συσσωματώματα επιπλέοντα ή προσκολλώμενα σε διάφορα αντικείμενα μέσα στα διάφορα είδη των φυσικών υδάτων). Η παρουσία στα φύκη αυτά της χρωστικής ουσίας φυκοερυθρίνη, τους δίνει τη δυνατότητα να βρίσκονται σε βάθος ύδατος τέτοιο, που δεν μπορεί να βρεθεί κανένα άλλο είδος φυκών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η φυκοερυθρίνη μπορεί και χρησιμοποιεί το τμήμα εκείνο του ηλιακού φάσματος που αντιστοιχεί στην κυανή ακτινοβολία. Η ακτινοβολία αυτή διεισδύει στο νερό πιο βαθιά από κάθε άλλη ακτινοβολία (Tadashi et al., 2005).

- Πυρόφυτα ή Δινομαστιγωτά (Pyrrhophyta ή Dinoflagellates): Τα πυρόφυτα είναι κοινός πλαγκτονικός οργανισμός (κυρίως θαλάσσιος), μονοκύτταρος με μαστίγιο, που εμφανίζουν εξαιρετική ποικιλομορφία. Θεωρούνται από τις πλέον πρωτόγονες μορφές. Είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία των ερυθρών πλημμυρίδων, καθώς και τοξικών φαινομένων σε παράλιες περιοχές. Παρουσιάζουν μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον. Το πιο διακριτικό χαρακτηριστικό τους είναι η παρουσία δύο άνισων μαστιγίων, το ένα περιελιγμένο στο κύτταρο μέσα σε μια αύλακα και το άλλο ελεύθερο. Τα περισσότερα έχουν ένα κυτταρικό τοίχωμα που είναι εξωτερικά θωρακισμένο με πλάκες κυτταρίνης, το χαρακτηριστικό συστατικό του τοιχώματος των φυκών και των φυτών της ξηράς. Αν και τα περισσότερα δινομαστιγωτά έχουν χλωροφύλλη, πολλά μπορούν επίσης να προσλαμβάνουν μερίδια τροφής. Τα δινομαστιγωτά αναπαράγονται σχεδόν αποκλειστικά με απλή κυτταρική διαίρεση (Αθανασάκη, 2004).



Εικόνα 2. Κύτταρα του γένους *Tetraselmis* sp.(πηγή:
http://www.kmmcc.re.kr/dataroom/product_img/8-25/p02501.jpg).

5.1.3 Μέθοδοι παραγωγής των μικροφυκών

Το 90% του όγκου των μικροφυκών που παράγεται στις μονάδες και στα ερευνητικά κέντρα βασίζεται κυρίως στην καλλιέργεια οκτώ ειδών (Coutteau και Sorgeloos, 1992). Αυτά τα είδη επιλέχθηκαν με κριτήρια τη διατροφική τους αξία και τον βαθμό ευκολίας στην καλλιέργειά τους, όπως για παράδειγμα τα *Isochrysis galbana* και *Tetraselmis suecica* (Laing και Millican, 1986).

Για τη μαζική παραγωγή μικροφυκών υψηλής ποιότητας απαιτούνται: α) μεγάλοι όγκοι νερού, β) εξειδικευμένο προσωπικό, γ) κατάλληλος εξοπλισμός, δ) χρήση εμπλουτιστικών μέσων (ανόργανα άλατα) και βιταμινών στο νερό, μέσα στο οποίο γίνεται η ανάπτυξη των μικροφυκών και ε) χρήση ενέργειας για φωτισμό, θέρμανση, αερισμό, αποστείρωση, άντληση και κυκλοφορά του νερού.

Στις υδατοκαλλιέργειες, απαντώνται τρεις βασικές μέθοδοι καλλιέργειας μικροφυκών που διαφέρουν ως προς τον τρόπο καλλιέργειας:

1. Ασυνεχής καλλιέργεια (batch cultures)
2. Ημισυνεχής καλλιέργεια (semi-continuous)
3. Συνεχόμενη καλλιέργεια (continuous)

Πιο αναλυτικά:

1. Η μέθοδος της ολικής συγκομιδής είναι η απλούστερη και η περισσότερο διαδεδομένη στην πράξη. Αφορά στον ενοφθαλμισμό κυττάρων μικροφυκών σε δεξαμενές με θαλασσινό νερό που είναι εμπλουτισμένο με ανόργανα άλατα και βιταμίνες. Ακολουθεί μια περίοδος ανάπτυξης των καλλιεργειών για μερικές ημέρες και έπειτα γίνεται η συλλογή όλου του περιεχομένου των δεξαμενών.

2. Η ημι-συνεχής μέθοδος είναι σε γενικές γραμμές παρόμοια με την προηγούμενη, με την μόνη διαφορά ότι δεν γίνεται συγκομιδή όλου του όγκου των μικροφυκών αλλά ενός τμήματος (5-30%). Μετά τη συγκομιδή, συμπληρώνεται αμέσως στις δεξαμενές θαλασσινό νερό, εμπλουτισμένο με θρεπτικά και βιταμίνες, ίσου όγκου με αυτόν που απομακρύνθηκε. Όταν αυξηθεί η πυκνότητα των καλλιεργειών μέσα στις δεξαμενές λίγες ώρες αργότερα, ακολουθεί νέα συγκομιδή (Helm και Laing, 1981).

3. Η συνεχόμενη μέθοδος απαιτεί τη χρήση κατάλληλου εξοπλισμού, που συνήθως αποτελείται από έναν θάλαμο ανάπτυξης (μικροφυκών) με μόνιμο φωτισμό και ένα σύστημα ροής θαλασσινού νερού, εμπλουτισμένου με θρεπτικά στοιχεία και βιταμίνες. Ο ρυθμός ροής ελέγχεται από ηλεκτρονικά όργανα και όταν η συγκέντρωση των κυττάρων φτάσει στον μέγιστο βαθμό, μέρος του όγκους απομακρύνεται για να προστεθεί νερό με την απαιτούμενη ποσότητα θρεπτικών. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι κατά κάποιο τρόπο, μία αυτοματοποιημένη ημι-συνεχής μέθοδος. Προσφέρει όμως μεγαλύτερη δυνατότητα εκτίμησης της απόδοσης και της ποιότητας των μικροφυκών (Laing και Jones, 1983).

Οι παραπάνω μέθοδοι καλλιέργειας μικροφυκών βρίσκουν εφαρμογή σε τρία κύρια φωτοαντότροφα συστήματα παραγωγής. Αυτά είναι: α) οι ανοικτές δεξαμενές, β) οι κλειστοί φωτοβιοαντιδραστήρες που αξιοποιούν το ηλιακό φως και γ) οι κλειστοί φωτοβιοαντιδραστήρες που χρησιμοποιούν τεχνητό φωτισμό (Art και Behrens, 1999).

Η μαζική παραγωγή στις ανοικτές δεξαμενές είναι η παλαιότερη και η ευκολότερη μέθοδος, κατά την οποία τα μικροφύκη αναπτύσσονται σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές που απαντώνται στο φυσικό περιβάλλον. Σε βιομηχανική όμως κλίμακα και καθώς οι παραγωγές γίνονται σε εξωτερικούς χώρους, υπάρχουν αρκετά προβλήματα. Αυτά οφείλονται στις επιμολύνσεις των καλλιεργειών από ανεπιθύμητα στελέχη μικροφυκών, από βακτήρια και από πρωτόζωα-θηρευτές (Wen και Chen, 2003). Είναι επίσης δύσκολο να διατηρηθούν οι ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης, ενώ η διαδικασία συγκομιδής της βιομάζας των μικροφυκών από μεγάλους όγκους νερού είναι δαπανηρή ως μέθοδο (Molina Grima et al., 2003).

Οι κλειστοί φωτοβιοαντιδραστήρες έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές φορές, τα τελευταία χρόνια, με σκοπό την παραγωγή βιομάζας μικροφυκών και την αποφυγή των προβλημάτων που υπάρχουν στις ανοικτές δεξαμενές (Kitto et al., 1999). Αυτά τα συστήματα είναι κατασκευασμένα από διαφανή υλικά και συνήθως τοποθετούνται σε εξωτερικούς χώρους για να αξιοποιηθεί το φως του ήλιου. Οι ερευνητικές προσπάθειες επικεντρώθηκαν στην ανάπτυξη φωτοβιοαντιδραστήρων περισσότερο αποδοτικών, με υψηλό δείκτη στη σχέση της επιφάνειας προς τον όγκο (Tredici, 2004). Μερικά από αυτά τα συστήματα χρησιμοποιήθηκαν σε εργαστηριακές μελέτες ή σε μικρής κλίμακας καλλιέργειες σε εξωτερικούς χώρους για την παραγωγή μικροφυκών, όπως για παράδειγμα το *Tetraselmis* sp. (Pedroni et al., 2004). Σε γενικές γραμμές πιστεύεται ότι, οι φωτοβιοαντιδραστήρες είναι περισσότερο αποδοτικοί από τις δεξαμενές, στην πραγματικότητα όμως η μεγαλύτερη αποδοτικότητα τους δεν έχει ποτέ αποδειχτεί ξεκάθαρα (Chini Zitteli et al., 2006). Αν και είναι δυνατόν να μειωθούν οι κίνδυνοι των επιμολύνσεων, η ανάπτυξη των μικροφυκών στα συστήματα αυτά είναι κατώτερη της αναμενόμενης, επειδή υπάρχουν διακυμάνσεις στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και στην ένταση του φωτός (Wen και Chen, 2003).

Σε αντίθεση με την προηγούμενη κατηγορία, στους κλειστούς φωτοβιοαντιδραστήρες, στους οποίους χρησιμοποιείται τεχνητός φωτισμός, απαιτείται και η παροχή διοξειδίου του άνθρακα στο σύστημα. Σε ορισμένες περιπτώσεις μάλιστα, απαιτείται και εξοπλισμός για την απομάκρυνση του οξυγόνου, για να μειώνονται οι τοξικές επιπτώσεις των υψηλών συγκεντρώσεων του οξυγόνου στην ανάπτυξη των κυττάρων των μικροφυκών. Το κόστος αυτών των συστημάτων είναι μεγάλο, εξαιτίας της πολυπλοκότητας τους. Επιπλέον, τα προβλήματα του στο φωτισμό δεν είναι δυνατόν να ξεπεραστούν εντελώς, επειδή η διείσδυση του φωτός στην καλλιέργεια είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης των κυττάρων σε αυτήν (Chen και Johns, 1995).

5.1.4 Εναλλακτικοί τρόποι παραγωγής των μικροφυκών

Υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με τις τεχνικές και προϊόντα που είναι αποτέλεσμα των προσπαθειών να βρεθούν τρόποι για να μειωθεί το κόστος παραγωγής των μικροφυκών. Κάποιες από τις αναφορές αυτές αφορούν στη χρήση εναλλακτικών θρεπτικών μέσων, όπως είναι για παράδειγμα τα γεωργικά λιπάσματα που είναι φθηνότερα από τα ανόργανα άλατα εργαστηριακής κλίμακας. Υπάρχει μια ποικιλία μέσων καλλιέργειας που παρέχουν την κατάλληλη συγκέντρωση θρεπτικών ουσιών για τη σωστή ανάπτυξη των μικροφυκών. Πολλά από αυτά αναπτύχθηκαν από τους Giulard και Ryther, Mathiessen και Toner, Walne, Provasoli και Guilard. Αυτά τα θρεπτικά μέσα αποτέλεσαν ουσιαστικά τη βάση της έρευνας για την ανάπτυξη εμπλουτιστικών μέσων χαμηλού κόστους. Μεγάλη βαρύτητα δόθηκε στη δυνατότητα αντικατάστασης των πιο σημαντικών θρεπτικών στοιχείων, όπως είναι το άζωτο και ο φώσφορος. Στις εναλλακτικές αυτές μεθόδους καλλιέργειας μικροφυκών και χρήσης εμπλουτιστικών μέσων, περιλαμβάνονται η χρήση κοπράνων αγελάδων και ορνίθων μετά από αερόβια χώνευση, υγρά εκχυλίσματα από θαλάσσια μακροφύκη και γεωργικά λιπάσματα. Υπάρχουν αναφορές ότι τα προϊόντα αυτά είναι

φθηνότερα και παράγουν ίση ή ακόμα και μεγαλύτερη βιομάζα μικροφυκών σε σχέση με άλλες μεθόδους. Λίγοι όμως ερευνητές έχουν μελετήσει τον ρυθμό πρόσληψης των θρεπτικών ουσιών από τα μικροφύκη. Η καθημερινή πρόσληψή τους είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που καθορίζουν την ποιότητα του μέσου καλλιέργειας, καθώς η συγκέντρωση των θρεπτικών ουσιών στο νερό επηρεάζει τον ρυθμό ανάπτυξης των μικροφυκών, τη σύνθεση του κυτταρικού τους περιεχομένου, τη συγκέντρωση της χλωροφύλλης και την τελική παραγόμενη βιομάζα (Valenzuela-Espinoza et al., 1999).

Λαμβάνοντας υπόψη την θρεπτική αξία των παραγόμενων μικροφυκών, εναλλακτικές δίαιτες έχουν θεωρηθεί ότι μπορεί να είναι φθηνότερες, σε σχέση με τα μικροφύκη που παράγονται στον χώρο εκτροφής. Από τις δίαιτες που έχουν μελετηθεί αυτές που φάνηκαν να είναι περισσότερο υποσχόμενες στο να μειώσουν το κόστος λειτουργίας των εκκολαπτηρίων, περιλάμβαναν πάστες από συμπυκνωμένα μικροφύκη. Συμπυκνώματα μικροφυκών που προέκυψαν με φυγοκέντριση και στη συνέχεια συντηρήθηκαν με ψύξη στους 2-4 °C, χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία από εκκολαπτήρια. Διαφορετικά όμως στελέχη μικροφυκών ποικίλλουν ως προς την καταλληλότητά τους για συμπύκνωση με την μέθοδο της φυγοκέντρισης. Σε αυτά που έχουν υψηλή θρεπτική αξία και τη μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, περιλαμβάνονται τα στελέχη *Chaetoceros calcitrans*, *Skeletonema costatum* και *Tetraselmis* sp., ενώ τα μαστιγοφόρα *Pavlova lutheri* και *Isochrysis* sp. (T.ISO) καταστρέφονται εύκολα και υποβαθμίζεται η ποιότητα τους γρήγορα. Μια εναλλακτική μέθοδος για την αντιμετώπιση ανάλογων προβλημάτων, κατά την συγκομιδή των μικροφυκών, είναι η κροκίδωση, μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρύτατα για την απομάκρυνση αιωρούμενων σωματιδίων σε διάλυμα (Heasman et al., 2000).

Κάποια είδη μικροφυκών μπορούν και αναπτύσσονται χωρίς φως, χρησιμοποιώντας ως πηγή ενέργειας το άζωτο που υπάρχει σε διάφορες οργανικές ενώσεις. Σάκχαρα, λίπη, οργανικά οξέα και άλλα υποστρώματα που μπορούν να δώσουν την ενέργεια και τον άνθρακα που απαιτούνται για την ανάπτυξη των κυττάρων. Το σημαντικό με τις ετεροτροφικές καλλιέργειες εκείνων των φωτοαυτότροφων καλλιεργειών με ότι αυτό συνεπάγεται στην εξοικονόμηση χώρου, νερού, ενέργειας και απασχόλησης (Wen και Chen, 2003).

Παρόλο που η ετεροτροφική ανάπτυξη φαίνεται να αποτελεί μια φθηνή εναλλακτική λύση και μια αποδοτική μέθοδο παραγωγής μικροφυκών, ετεροτροφικά συστήματα μαζικής παραγωγής βρίσκουν εφαρμογή μόνο για λίγα είδη μικροφυκών. Τα πλέον γνωστά είδη με τη μεγαλύτερη θρεπτική αξία, όπως είναι για παράδειγμα τα *Chaetoceros*, *Isochrysis*, *Skeletonema*, *Thalassiosira* και *Pavlova*, δεν αναπτύσσονται στο σκοτάδι (Gladue, 1991). Επιπλέον, οι ετεροτροφικές συνθήκες μπορεί να μεταβάλλουν δραστικά τη βιοχημική σύσταση των κυττάρων των μικροφυκών. Το είδος *Tetraselmis suecica*, όταν αναπτύσσεται σε ετεροτροφικές συνθήκες έχει μειωμένα επίπεδα (n-3) HUFAs σε σύγκριση με εκείνα του ίδιου στελέχους από καλλιέργειες που αναπτύσσονται στο φως (Laing et al., 1990). Κάποια από αυτά τα μειονεκτήματα μπορεί να λυθούν στο μέλλον. Ορισμένες έρευνες, όπως αυτές των Vazhappilly και Chen, αναφέρουν ότι υπάρχουν αρκετά είδη μικροφυκών που είναι ικανά να αναπτυχθούν γρήγορα σε ετεροτροφικές συνθήκες. Γεγονός πάντως είναι, ότι η τεχνική αυτή απαιτεί ειδικό και δαπανηρό εξοπλισμό, όπως επίσης και προσωπικό με ανώτερο επίπεδο εκπαίδευσης, κριτήρια δηλαδή αποτρεπτικά για πολλές μικρομεσαίες επιχειρήσεις (Αθανασάκη, 2004).

5.1.5 Άλλες χρήσεις μικροφυκών

Η καλλιέργεια μικροφυκών, εκτός της χρήσης της στην ιχθυοκαλλιέργεια έχει και άλλες εφαρμογές, οι περισσότερες εκ των οποίων δεν είναι διαδεδομένες στον Ελλαδικό χώρο ή είναι σε μικρό βαθμό.

Κάποιες από αυτές είναι οι ακόλουθες:

- Παραγωγή βιο-ντίζελ. Πλεονεκτήματα σε σχέση με την χρησιμοποίηση καλλιεργειών χειρσαίων φυτών (καλαμπόκι, σόγια, κράμβη): δέκα στρέμματα καλλιέργειας μικροφυκών μπορούν να αποδώσουν 45.000 L βιοκαυσίμου ετησίως ενώ 10 στρέμματα καλαμπόκι αποδίδουν 2.500 L αιθανόλης ετησίως και 10 στρέμματα σόγιας αποδίδουν 560 L βιοντίζελ ετησίως.

- Συστατικά ζωοτροφών. Με την χρήση της τεχνολογίας αφυδάτωσης μικροφυκών (spray-dried, freeze-dried micro-algae) επιτυγχάνεται η συσκευασία και η συντήρηση τους για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα. Επίσης η τεχνολογία αυτή επιτρέπει την ενσωμάτωση αφυδατωμένων μικροφυκών σε ιχθυοτροφές – ζωοτροφές με σκοπό την ενίσχυση τους σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ω-3 / ω-6 και επομένως τη μερική αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου και του ιχθυελαίου που είναι σπανιότερα και ακριβότερα. Λόγω της καλής περιεκτικότητας των μικροφυκών σε πρωτεΐνη καλής βιολογικής αξίας (40-70% της Ξηρής Ουσίας), σε βιταμίνες (Θειαμίνη, Ριβοφλαβίνη, Πυριδοξίνη 3-55 ppm της Ξηρής Ουσίας, Προβιταμίνη Α 500-1000 ppm της Ξηρής Ουσίας) μεταλλικά στοιχεία και χρωστικές (λουτεΐνη, ζεαξανθίνη, ασταξανθίνη κ.α. μέχρι και 5% της Ξηρής Ουσίας), τα αφυδατωμένα μικροφύκη δύνανται να ενσωματωθούν μέχρι και 10% της Ξηρής Ουσίας των σιτηρεσιών χειρσαίων αγροτικών ζώων (πουλερικά, χοίροι, μηρυκαστικά) με αποδεδειγμένη επιτυχία στην βελτίωση των αποδόσεων τους.

- Φαρμακοβιομηχανία – καλλυντικά. Στη περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται και ολόκληρη η κυτταρική αφυδατωμένη μάζα (ενισχυτικά διατροφής) ή και ορισμένα συστατικά της (λιπαρά οξέα, χρωστικές, βιταμίνες) που έχουν εκχειλιστεί / διαχωριστεί από την συνολική κυτταρική βιομάζα. Στα ζώα (χειρσαία και υδρόβια) έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι η ενσωμάτωση μικροφυκών στην τροφή ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα και γενικότερα την αντίσταση του οργανισμού σε προσβολές από πάσης φύσης παθογόνα.

- Επεξεργασία λυμάτων. Τα μικροφύκη μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας αστικών (και άλλων) λυμάτων, διότι χρησιμοποιούν τα αμμωνιακά και νιτρικά άλατα και ταυτόχρονα παράγουν οξυγόνο που αποβαίνει πολύ χρήσιμο για τα αερόβια βακτήρια που χρησιμοποιούνται στις εγκαταστάσεις αυτές.

Μια πολύ σημαντική ιδιότητα των μικροφυκών για την περίπτωση επεξεργασίας λυμάτων είναι η αυξημένη ικανότητα τους για δέσμευση διαφόρων πολυσθενών ιόντων: έχει αποδειχθεί ότι δύνανται να απορροφούν ιόντα χρωμίου, ουρανίου, σιδήρου και αργύρου με αποτέλεσμα την μείωση των συγκεντρώσεων τους στα λύματα. Επίσης, κατά την διάρκεια της δράσης τους σε δεξαμενές επεξεργασίας λυμάτων, αυξάνουν την θερμοκρασία των λυμάτων (διότι μέρος της δεσμευόμενης ηλιακής ακτινοβολίας μετατρέπεται σε θερμότητα) με αποτέλεσμα την καταστροφή διαφόρων παθογόνων (κολοβακτηρίδια και άλλα εντερικά βακτηρίδια που συναντώνται στα αστικά λύματα).

· Απορρόφηση διοξειδίου του άνθρακα από ρυπογόνες βιομηχανίες. Επειδή η καλλιέργεια των αυτότροφων φωτοσυνθετικών μικροφυκών απαιτεί διαθέσιμο διοξείδιο του άνθρακα, πολλές από τις προαναφερόμενες εφαρμογές μπορούν να συνδυαστούν με την παροχέτευση μεγάλων ποσοτήτων διοξειδίου του άνθρακα από την βαριά ή και ελαφριά βιομηχανία (π.χ. ζυθοποιεία). Έτσι μειώνεται η εκπομπή διοξειδίου του άνθρακα στην ατμόσφαιρα με όλες τις συνεπακόλουθες ευεργετικές επιπτώσεις για την διάσωση του περιβάλλοντος (π.χ. φαινόμενο θερμοκηπίου).

5.2 Τροχόζωα

Τα τροχόζωα (Εικόνα 3.) αποτελούν μια ταξινομική ομάδα μικροσκοπικών κυρίως υδρόβιων ασπόνδυλων οργανισμών, στην οποία έχουν περιγραφεί περισσότερα από 1850 είδη (Segers 2002). Σε γενικές γραμμές τα τροχόζωα χαρακτηρίζονται από τα εξής βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά: α) την κορώνα ή στεφάνη (corona) που βρίσκεται στο πρόσθιο μέρος του σώματος, φέρει τις βλεφαρίδες κίνησης (trochus) και χρησιμεύει στην κολύμβηση και στην πρόσληψη τροφής, β) τη μασητική συσκευή (mastax) η οποία είναι μια περίπλοκη κατασκευή που φέρει μεταξύ άλλων γνάθους (trophi) και γ) στις περιπτώσεις των γενών που έχουν σκληρό εξωτερικό περίβλημα, το σωματικό τοίχωμα (lorica) το οποίο δίνει σταθερό σχήμα στο συγκυτιακό εσωτερικό των τροχοζώων (Wallace et al. 2006).



Εικόνα 3. Τροχόζωο *Brachionus plicatilis*, λήψη φωτογραφίας από στερεοσκόπιο (πηγή:

http://www.sintef.no/upload/Fiskeri_og_havbruk/Marin%20ressursteknologi/Rotatori en%20Brachionus%20plicatilis.jpg).

Αν και υπάρχουν ορισμένες αντικρουόμενες απόψεις όσον αφορά την κατάταξη των τροχοζώων σε κλάσεις, αναγνωρίζονται στο Φύλο τρεις βασικοί κλάδοι (Wallace 2002):

α) Η Κλάση Seisonidea (ή Pararotatoria) που αποτελείται από συνολικά τρία είδη που ομαδοποιούνται σε δύο γένη και είναι επιζωικοί συμβιωτικοί οργανισμοί με αμφιγονική αναπαραγωγή.

β) Η (Υπο)Κλάση Bdelloidea (κατά άλλους Κλάση Eurotatoria) που περιλαμβάνει περίπου 400 είδη. Χαρακτηριστικό γνώρισμα της ομάδας είναι ο αποκλειστικά παρθενογενετικός τρόπος αναπαραγωγής.

γ) Η (Υπο)Κλάση Monogononta (κατά άλλους Κλάση Eurotatoria), στην οποία ανήκει το *Brachionus*, περιλαμβάνει περισσότερα από 1400 γνωστά είδη και όπως προκύπτει και από το όνομά τους έχουν μια γονάδα σε σχέση με τις προηγούμενες δύο ομάδες που έχουν δύο γονάδες. Αναπαράγονται τόσο με παρθενογένεση όσο και με αμφιγονία (κυκλική παρθενογένεση). Με βάση κυρίως τη μορφολογία των γνάθων (trophi - γενικά στα τροχόζωα απαντώνται εννέα βασικοί τύποι trophi) αλλά και ορισμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά (π.χ. σχήμα σώματος, δομή κορώνας κ.ά.), τα Monogononta διακρίνονται σε τρεις τάξεις, τις: Flosculariaceae, Colothecaceae και Ploima. Στην τελευταία ανήκει το γένος *Brachionus* (trophi τύπου malleate) (Wallace et al. 2006).

Στενή φυλογενετική σχέση με τις παραπάνω τρεις κλάσεις που αναφέρθηκαν, έχει και η κλάση Acanthocephala που περιλαμβάνει υποχρεωτικά ενδοπαράσιτα με περίπλοκους κύκλους ζωής. Πρόσφατα, μοριακά κυρίως, δεδομένα συνηγορούν στην κοινή κατάταξη των τεσσάρων παραπάνω ταξινομικών ομάδων κάτω από την ονομασία Syndermata (Garcia-Varela & Nadler 2006), ενώ τόσο μορφολογικά όσο και μοριακά δεδομένα δικαιολογούν τη διάκριση των Monogononta και την ομαδοποίηση των υπόλοιπων τριών (υπο)κλάσεων κάτω από την ονομασία Hemirotifera.

5.2.1 Ταξινόμια

Σύμφωνα με τον Segers (2002), στο γένος *Brachionus* υπάρχουν 55 καταγεγραμμένα είδη. Ωστόσο, όπως έχει ήδη αναφερθεί και θα παρουσιαστεί αναλυτικότερα και παρακάτω, στο γένος έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη κρυπτικών ειδών. Συνεπώς, ο πραγματικός αριθμός των ειδών ενδέχεται να είναι μεγαλύτερος. Η ταξινομική κατάταξη του γένους *Brachionus* έχει ως εξής (σύμφωνα με τον Segers 2002):

Φύλο: Rotifera (Cuvier, 1817)

Κλάση: Eurotatoria (De Ridder, 1957)

Υπόκλαση: Monogononta (Plate, 1889)

Υπέρταξη: Pseudotrocha (Kutikova, 1970)

Τάξη: Ploima (Hudson & Gosse, 1886)

Οικογένεια: Brachionidae (Ehrenberg, 1838)

Γένος: *Brachionus* (Pallas, 1766)

Στο γένος *Brachionus* η ταξινομική διάκριση μεταξύ των ειδών του γένους βασίζεται κυρίως:

- α) στο σχήμα και στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του σώματος,
- β) στη δομή του ποδίσκου προσκόλλησης, και
- γ) στη δομή της περιοχής της στεφάνης (Ruttner-Kolisko 1974).

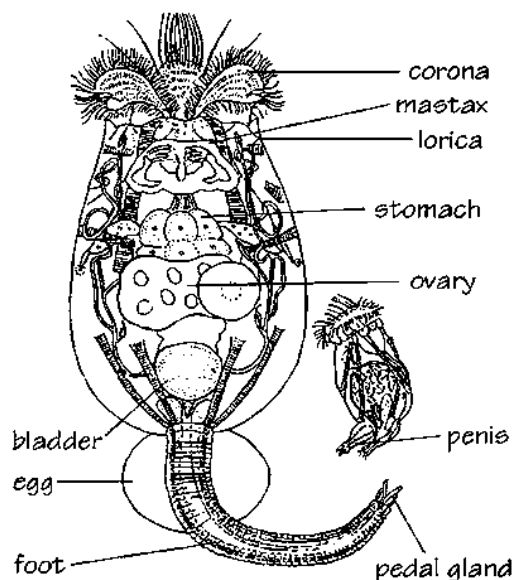
Η μορφολογική διάκριση μεταξύ των βασικών ομάδων του γένους μπορεί να γίνει εύκολα με παρατήρηση των οργανισμών σε οπτικό μικροσκόπιο ή ακόμη σε στερεοσκόπιο με κατάλληλη μεγέθυνση. Η αποκάλυψη της παρουσίας κρυπτικών ειδών στο γένος έχει οδηγήσει στην εφαρμογή και τεχνικών ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, προκειμένου να διαπιστωθούν οι ενδεχόμενες μορφολογικές διαφορές μεταξύ των κρυπτικών ειδών (Fontaneto et al. 2007).

5.2.2 Εσωτερική δομή και εξωτερική μορφολογία

Το σώμα των τροχοζώων του γένους *Brachionus* είναι ωοειδές, νωτοκοιλιακά πλατυσμένο (Εικόνα 4). Το μέγεθος των ώριμων ατόμων κυμαίνεται από 120 μm μέχρι περίπου 500 μm στα θηλυκά, ενώ είναι πολύ μικρότερο στα αρσενικά των αντίστοιχων ειδών. Στο εσωτερικό τους παρατηρείται μια ευρύχωρη κοιλότητα. Όπως και τα υπόλοιπα τροχόζωα, έτσι και τα είδη *Brachionus* χαρακτηρίζονται: α) από την παρουσία συγκυτιακών σχηματισμών (εξαφάνιση των μετά-εμβρυικών κυτταρικών μεμβρανών με αποτέλεσμα ορισμένα όργανα να καταλήγουν να είναι πολυπύρηννα, π.χ. η γονάδα) και β) από την απουσία κυτταρικής διαίρεσης στα ώριμα άτομα (ευτέλεια - eutely). Έτσι, ο αριθμός των κυττάρων τους, από τη στιγμή που αυτά σχηματιστούν κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, παραμένει σταθερός καθόλη τη διάρκεια της ζωής τους (αναφέρεται η παρουσία περίπου 1.000 κυττάρων - Mills 2006). Όσον αφορά τη γενικότερη μορφολογία τους, τα τροχόζωα του γένους *Brachionus* μπορούν να διακριθούν σε τρία τμήματα: α) το πρόσθιο που αποτελείται κυρίως από τη στεφάνη, β) το τμήμα του σώματος που περιέχει την πλειονότητα των εσωτερικών οργάνων του οργανισμού και γ) το οπίσθιο, κύριο χαρακτηριστικό του οποίου είναι ο ποδίσκος προσκόλλησης.

Η στεφάνη αποτελείται από πέντε διακριτούς λοβούς μεταξύ των οποίων υπάρχουν αισθητήρια τριχίδια (Ruttner-Kolisko 1974). Αισθητήριες κεραίες υπάρχουν και σε άλλες περιοχές του σώματος και περιέχουν μηχανοϋποδοχείς και χημειοϋποδοχείς. Στην πρόσθια περιοχή υπάρχουν επίσης και υποδοχείς φωτεινών ερεθισμάτων. Επιπλέον, στην περιοχή της στεφάνης των ειδών *Brachionus* κατά κανόνα υπάρχουν έξι, τέσσερις ή δύο άκανθες. Ο αριθμός και το σχήμα αυτών των

ακανθών αλλά και η γενικότερη μορφολογία της περιοχής συνεξετάζονται κατά τη διάκριση των διαφορετικών ειδών *Brachionus* (Παπακώστας, 2008).



Εικόνα 4. Δομή εσωτερικών οργάνων και εξωτερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά του *Brachionus plicatilis* (πηγή: www.fao.org/DOCREP/003/W3732E/w3732e0m.gif)

Το σώμα εξωτερικά μπορεί να είναι λείο ή να φέρει επιφανειακές γραμμώσεις. Το εξωτερικό περίβλημα των ειδών *Brachionus* είναι διαπερατό στο φως και επομένως το σύνολο των εσωτερικών οργάνων του οργανισμού είναι ορατό κατά τη μικροσκοπική του παρατήρηση. Έτσι μπορούν εύκολα να παρατηρηθούν αρκετά από τα τμήματα του πεπτικού, του απεκκριτικού και του αναπαραγωγικού συστήματος. Χαρακτηριστικό του πεπτικού συστήματος είναι η μασητική συσκευή (mastax) με τις γνάθους. Μεταξύ των κύριων δομών που μπορούν να παρατηρηθούν στην περιοχή του σώματος είναι ακόμη ο οισοφάγος και το στομάχι του πεπτικού όπως επίσης και το πρωτονεφρίδιο του απεκκριτικού και η γονάδα του αναπαραγωγικού συστήματος. Η γονάδα στα είδη *Brachionus* περιλαμβάνει συνολικά οκτώ πυρήνες. Τέλος, να σημειωθεί πως η περιοχή του σώματος αλλά και γενικότερα ολόκληρος ο οργανισμός διατρέχεται από ένα σχετικά απλό νευρικό (κεντρικό και περιφερικά γάγγλια και βλ. παραπάνω υποδοχείς ερεθισμάτων) και ένα σχετικά σύνθετο μυϊκό δίκτυο, τα οποία αναλαμβάνουν κυρίως την κίνηση αλλά και την απόκριση του οργανισμού στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα.

Στην οπίσθια περιοχή, κύριο χαρακτηριστικό είναι ο ποδίσκος προσκόλλησης με τον οποίο ο οργανισμός μπορεί να προσκολληθεί σε σταθερά υποστρώματα, ενώ έχει αναφερθεί και επιζωική προσκόλλησή του. Ο ποδίσκος προσκόλλησης στα είδη *Brachionus* καταλήγει σε δύο άκρα που συχνά αναφέρονται και ως «δάκτυλα» (toes). Στην άκρη αυτών των «δακτύλων» καταλήγει ο αδένας του ποδίσκου προσκόλλησης με το έκκριμα του οποίου επιτυγχάνεται η προσκόλληση. Η δομή του ποδίσκου

προσκόλλησης έχει ταξινομική αξία στη διάκριση μεταξύ των ειδών του γένους *Brachionus*, ενώ θα πρέπει επίσης να αναφερθεί πως κατά την ελεύθερη κολύμβηση του ζώου ο ποδίσκος αναδιπλώνεται (Παπακώστας, 2008).

Να σημειωθεί, τέλος, ότι δίπλα από το άνοιγμα του ποδίσκου προσκόλλησης μεταφέρονται και τα (αμικτικά) αβγά του ζώου. Τα αρσενικά άτομα των ειδών *Brachionus*, είναι πολύ μικρότερα (περισσότερο από 50%) σε μέγεθος από τα αντίστοιχα θηλυκά. Το φαινόμενο αναφέρεται ως «νανισμός του άρρενος» (male dwarfism) και στο Φύλο των Τροχοζώων απαντάται μόνο στην (Υπο)Κλάση *Monogononta* (Ricci & Melone, 1998). Στην πρόσθια περιοχή, η στεφάνη των αρσενικών χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο σειρών κινητήριων βλεφαρίδων σε αντίθεση με τη μια των θηλυκών, ενώ έχουν ακόμη και ιδιαίτερα μεγάλα σε μήκος αισθητήρια τριχίδια. Το μικρό μέγεθος και ο μεγαλύτερος αριθμός βλεφαρίδων θεωρούνται οι κυριότεροι λόγοι της μεγαλύτερης ταχύτητας που μπορούν να αναπτύξουν τα αρσενικά σε σχέση με τα θηλυκά. Στα αρσενικά απουσιάζει η μασητική συσκευή (mastax), ενώ το πεπτικό σύστημα, στο σύνολό του, είναι υποτυπώδες και έχει χάσει το λειτουργικό του ρόλο. Τα περισσότερα από τα υπόλοιπα συστήματα είναι επίσης υποτυπώδη (απεκκριτικό) ή απλούστερα σε δομή και οργάνωση (νευρικό, μυϊκό) (Gilbert & Williamson, 1983). Συνέπεια των παραπάνω είναι τα αρσενικά άτομα να παρουσιάζουν σημαντικά μικρότερο μέσο όρο ζωής σε σχέση με τα αντίστοιχα θηλυκά. Όσον αφορά το αναπαραγωγικό σύστημα, αυτό περιλαμβάνει περίπου 30 σπερματοζωάρια (Ricci & Melone, 1998) και ένα εκτατό πέος που προεκβάλλει μαζί με τον ποδίσκο προσκόλλησης στο οπίσθιο μέρος του ζώου. Τα αρσενικά, όπως θα παρουσιαστεί αναλυτικότερα και παρακάτω, παίρνουν μέρος στην αμφιγονική αναπαραγωγή και συνεπώς εμφανίζονται κυκλικά και ευκαιριακά σε φυσικούς πληθυσμούς ειδών *Brachionus*, κάτω από την επίδραση συγκεκριμένων περιβαλλοντικών ερεθισμάτων. Η ευκαιριακή και σύντομη παρουσία τους, σε συνδυασμό με το μικρό τους μέγεθος και την ταχύτητα κίνησής τους είναι μεταξύ των βασικότερων παραγόντων που κάνουν δύσκολη τη μελέτη τους. Σε φυσικούς πληθυσμούς η παρουσία τους διαπιστώνεται συνήθως με διαρκείς και υψηλής συχνότητας δειγματοληψίες (Ricci & Melone, 1998).

Κλείνοντας, να σημειωθεί ότι στο γένος *Brachionus* έχουν παρατηρηθεί σε ορισμένες περιπτώσεις σημαντικές αποκλίσεις του μεγέθους αλλά και της γενικότερης εξωτερικής μορφολογίας μεταξύ των ατόμων του ίδιου είδους ως απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα όπως η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα τροφής και η παρουσία θηρευτών.

5.2.3 Αναπαραγωγή

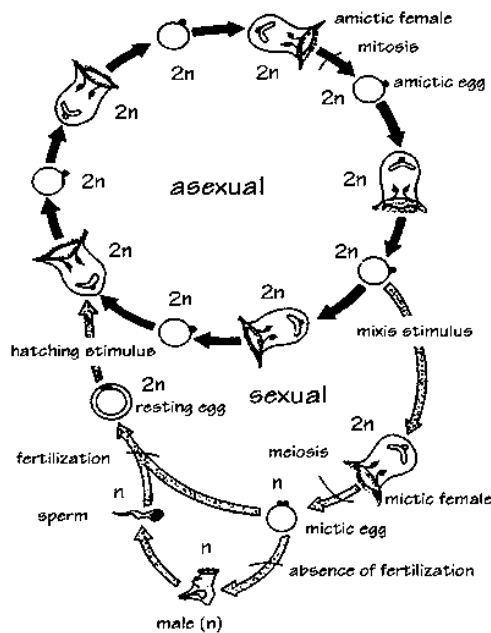
Τα τροχοζώα του γένους *Brachionus*, όπως και τα υπόλοιπα μέλη της (Υπο)Κλάσης *Monogononta*, είναι κυκλικά παρθενογενετικοί οργανισμοί. Κατά την παρθενογενετική φάση, ένα διπλοειδές παρθενογενετικό (amictic) θηλυκό άτομο παράγει με μίτωση ένα επίσης διπλοειδές (amictic) αβγό. Το τελευταίο αναπτύσσεται σ' ένα νέο παρθενογενετικό θηλυκό, γενετικά όμοιο με εκείνο από το οποίο προήλθε. Μέσα από διαδοχικούς παρθενογενετικούς κύκλους οι πληθυσμοί των ειδών *Brachionus* μπορούν να επιτύχουν υψηλούς ρυθμούς αύξησης, τους υψηλότερους μάλιστα γνωστούς μεταξύ των μεταζώων (Wallace et al. 2006).

Περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπως ο συνωστισμός, μπορούν να αλλάξουν τον τρόπο αναπαραγωγής από παρθενογένεση σε αμφιγονία. Ως συνέπεια τέτοιων ερεθισμάτων, τα τροχόζωα εκκρίνουν μια πρωτεΐνη μοριακού μεγέθους 39 kDa (παράγοντας επαγωγής μίξης), η οποία φαίνεται πως αλληλεπιδρά με το ώριμο θηλυκό άτομο πριν την ωρίμανση των αβγών του. Η ειδικότητα του παράγοντα επαγωγής μίξης έχει βρεθεί χαμηλή μεταξύ στενά συγγενικών ειδών, αν και κάτι τέτοιο δε φαίνεται να ισχύει πάντα. Σε κάθε περίπτωση, μετά την επίδραση τέτοιων ερεθισμάτων, τα διπλοειδή αμικτικά αβγά δίνουν γένεση πλέον σε διπλοειδή αμφιγονικά (mictic) θηλυκά. Τα τελευταία, ενώ δεν παρουσιάζουν μορφολογική διαφοροποίηση σε σχέση με τα παρθενογενετικά θηλυκά (Gilbert, 2003a), επιτελούν ωστόσο μειωτικές διαιρέσεις και:

α) Σε περίπτωση που δε γονιμοποιηθούν, δημιουργούν απλοειδή μικτικά αβγά που εκκολάπτονται σε αρσενικά άτομα, και τα οποία γεννιούνται γεννητικά ώριμα (Ricci & Melone, 1998). Τα απλοειδή αβγά φαίνεται να είναι κατά κανόνα μικρότερα σε μέγεθος από τα αντίστοιχα διπλοειδή, κάτι που δείχνει να είναι απόρροια των μειωτικών διαιρέσεων που συμβαίνουν κατά την παραγωγή τους (Ricci & Melone 1998).

β) Σε περίπτωση που γονιμοποιηθούν από κάποιο αρσενικό άτομο δημιουργούν διπλοειδή διαπαυσιακά αβγά (resting eggs). Η διαδικασία της γονιμοποίησης στο *Brachionus* μπορεί να χωριστεί σε πέντε διακριτά στάδια (Wallace et al., 2006): 1) Συνάντηση ενός αρσενικού με ένα θηλυκό *Brachionus*. 2) Το αρσενικό κολυμπάει γύρω από το θηλυκό, το οποίο μένει σχετικά ακίνητο. Στη διάρκεια του σταδίου αυτού το αρσενικό «εξερευνά» την εξωτερική επιφάνεια του θηλυκού με την περιοχή της στεφάνης του, 3) μετά την πάροδο λίγων δευτερολέπτων το αρσενικό εισάγει το πέος του στο ψευδοκοίλωμα του θηλυκού διαμέσου της περιοχής της στεφάνης, οπότε και στο σημείο αυτό, 4) λαμβάνει χώρα η μεταφορά του σπέρματος και μετά 5) το θηλυκό και το αρσενικό χωρίζουν. Ο μέσος χρόνος της όλης διαδικασίας κρατάει λιγότερο από δύο λεπτά. Τυχαίες συναντήσεις αρσενικών και θηλυκών διαφορετικών ειδών *Brachionus* μπορούν να συμβούν, αλλά συνήθως διαρκούν πολύ λίγο. Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αναγνώρισης του θηλυκού από το αρσενικό του ίδιου είδους φαίνεται να έχει μια πρωτεΐνη μοριακού μεγέθους 29 kDa στην επιφάνεια του σώματος των θηλυκών. Να σημειωθεί ακόμη ότι και στις σπάνιες περιπτώσεις που οι προσυζευκτικοί μηχανισμοί αναπαραγωγικής απομόνωσης παρακαμφθούν και πραγματοποιηθεί τελικά η γονιμοποίηση, φαίνεται πως υπάρχουν και μετασυζευκτικοί μηχανισμοί που αποτρέπουν την εκκόλαψη των υβριδίων (Παπακώστας, 2008).

Όλα τα διπλοειδή έμβρυα αναπτύσσονται σε θηλυκά άτομα και όλα τα απλοειδή σε αρσενικά (Εικόνα 5). Τα νεοεκκολαφθέντα από τα αβγά διάπαυσης θηλυκά άτομα έχουν όλα τους τα κύτταρα και είναι αρχικά μικρότερα σε μέγεθος. Στη συνέχεια αυξάνονται εξαιτίας της αύξησης του όγκου του κυττάρων τους. Ακολούθως, ξεκινούν να αναπαράγονται παρθενογενετικά (Snell et al., 2006).



Εικόνα 5. Παρθενογενετική και σεξουαλική αναπαραγωγή των *Brachionus plicatilis* (πηγή: <http://www.fao.org/DOCREP003W3732Ew3732e0n.gif>)

Τα διαπαυσιακά αυγά στο γένος *Brachionus* χαρακτηρίζονται από ανάγλυφη εξωτερική επιφάνεια και περιβάλλονται από τρία προστατευτικά τοιχώματα. Είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος από τα διπλοειδή αμικτικά αυγά και περιέχουν περισσότερα ενεργειακά αποθέματα. Για το λόγο αυτό η παραγωγή τους έχει ιδιαίτερο ενεργειακό κόστος για το αμφιγονικό θηλυκό το οποίο δε μπορεί να παράγει μεγάλο αριθμό τους (Ricci 2001).

5.2.4 Οικολογία του γένους *Brachionus*

Ο Mills (2006), κάνοντας μια εκτεταμένη ανασκόπηση 139 δημοσιεύσεων που αναφέρονται στο *B. plicatilis*, βρήκε πως φυσικοί πληθυσμοί του έχουν αναφερθεί σε οικοσυστήματα τα οποία αφορούν στην πλειονότητά τους ηπειρωτικές υδάτινες μάζες (λίμνες και εφήμερες υδατοσυλλογές) αλλά και υδάτινα ρεύματα (ποτάμια, ρυάκια και κανάλια), όπως και παραλιακά υδάτινα συστήματα που ωστόσο δε συνδέονται άμεσα με το νερό των ωκεανών ή των θαλασσών. Διαπιστώνεται δηλαδή ότι τα είδη του γένους ζουν και αναπτύσσονται σ' ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών και κυρίως σε εσωτερικές υδατοσυλλογές.

Μεταξύ των κύριων αβιοτικών παραμέτρων που έχουν μελετηθεί και έχουν βρεθεί πως επηρεάζουν την παρουσία αλλά και την κατανομή των ειδών *Brachionus* είναι η θερμοκρασία, η αλατότητα (ή η ιοντική σύσταση του νερού), το pH και το διαλυμένο στο νερό οξυγόνο. Ως σύνολο, το γένος *Brachionus* είναι ικανό να επιβιώσει σ' ένα μεγάλο εύρος των παραπάνω παραμέτρων. Ενδεικτικά αναφέρεται η παρουσία φυσικών πληθυσμών σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 4 °C μέχρι και πάνω από 30 °C (Aka et al., 2000), ενώ εγκλιματισμός με ικανοποιητική αύξηση έχει επιτευχθεί ακόμη και σε θερμοκρασίες 40 °C στο εργαστήριο. Παρόμοια, οι τιμές της

αλατότητας στις οποίες μπορούν να αναπτυχθούν τα *Brachionus* μπορούν να είναι της τάξεως ακόμη και του 1 psu για ορισμένα είδη, ενώ είναι αξιοσημείωτο πως έχει αναφερθεί παρουσία πληθυσμών *Brachionus* και σε εξαιρετικά υψηλές αλατότητες της τάξεως των 300 psu. Όσον αφορά το pH, στις περισσότερες περιπτώσεις οι φυσικοί πληθυσμοί των ειδών *Brachionus* βρίσκονται σ' ένα εύρος τιμών μεταξύ 7 και 11 (Wallace et al. 2006). Ωστόσο, έχουν αναφερθεί πληθυσμοί και σε υδάτινα περιβάλλοντα υψηλής οξύτητας με pH 3 ή και λιγότερο. Τέλος, έχουν βρεθεί είδη *Brachionus* που είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις διαλυμένου στο νερό οξυγόνου (< 1 mgL⁻¹, Aka et al. 2000).

Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό και με δεδομένα άλλων ερευνών, προτείνουν ότι τα τροχόζωα του γένους *Brachionus* μπορεί να είναι ιδιαίτερα άφθονα σε ευτροφικές συνθήκες. Παρά το γεγονός ότι το γένος *Brachionus* ως σύνολο παρουσιάζει ικανότητα προσαρμογής σ' ένα ευρύ φάσμα αβιοτικών συνθηκών, τα επιμέρους είδη σε αρκετές περιπτώσεις φαίνονται περισσότερο ή λιγότερο εξειδικευμένα σε ένα στενότερο εύρος τιμών των περιβαλλοντικών παραμέτρων (Παντελιδάκης, 2005). Έτσι, έχει διαπιστωθεί πως στις υψηλότερες θερμοκρασίες αναπτύσσονται καλύτερα τα μικρότερα σε μέγεθος είδη, ενώ στις χαμηλότερες, τα μεγαλύτερου μεγέθους είδη (Ortells et al., 2003). Μάλιστα, η αρνητική συσχέτιση μεγέθους σώματος - θερμοκρασίας επιβεβαιώνεται και από ανάλογες παρατηρήσεις σε κλωνικές καλλιέργειες ειδών *Brachionus*. Επίσης, υπάρχουν είδη που προτιμούν χαμηλές τιμές αλατότητας (π.χ. *B. angularis*, *B. urceolaris*, *B. calyciflorus*) σε σχέση με άλλα που προτιμούν πιο υψηλές (π.χ. *B. quadridentatus*, *B. plicatilis*) (Santangelo et al., 2007). Ακόμη, έχει βρεθεί ότι ορισμένα είδη μπορούν να αναπτυχθούν κατά κύριο λόγο σε αλκαλικά περιβάλλοντα (π.χ. *B. calyciflorus*) σε αντίθεση με άλλα που έχουν βρεθεί σε νερά υψηλής οξύτητας (*B. sericus*) (Deneke, 2000). Τέλος, σε συνδυασμό με τις παραπάνω αβιοτικές παραμέτρους, το διαλυμένο στο νερό οξυγόνο φαίνεται επίσης να επηρεάζει σε κάποιο βαθμό την κατανομή των διαφορετικών ειδών *Brachionus*. Έτσι, το *B. plicatilis* s.s. βρέθηκε να προτιμά σχετικά υψηλότερες συγκεντρώσεις οξυγόνου σε σύγκριση με τα μικρότερου μεγέθους είδη (*B. ibericus*, *B. Rotundiformis*) (Ortells et al., 2003). Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν ειδικές έρευνες που να σχετίζουν το εύρος ανθεκτικότητας σε οξυγόνο των ειδών *Brachionus* με την αναπνευστική φυσιολογία τους και το αναπαραγωγικό τους δυναμικό (Wallace et al., 2006).

Η εφαρμογή ορισμένων μοριακών τεχνικών που επέτρεψαν την ενίσχυση και ανάλυση γενετικού υλικού από μικρές ποσότητες DNA, οδήγησε στην παραπέρα εξέταση, σε μοριακό επίπεδο, της οικολογίας των τροχόζωων *Brachionus* (Gomez 2005). Έτσι, η ανακάλυψη και γενετική περιγραφή ορισμένων κρυπτικών ειδών (βλ. παρακάτω) επέτρεψε την ακριβέστερη περιγραφή των περιβαλλοντικών προτιμήσεων αρκετών ειδών που μέχρι πρόσφατα ήταν άγνωστα. Έγινε ακόμη δυνατή η μελέτη των παρθενογενετικά αναπτυσσόμενων κλωνικών σειρών σε φυσικούς πληθυσμούς του είδους *B. plicatilis* s.s., οπότε και διαπιστώθηκε πως συμβαίνουν και φαινόμενα επιλογής μεταξύ των κλώνων («επιλογή κλώνων» - clonal selection). Βρέθηκε, επίσης, πως γειτονικοί πληθυσμοί ειδών *Brachionus* μπορεί να χαρακτηρίζονται από μεγάλο βαθμό γενετικής διαφοροποίησης κάτι που αρχικά φάνηκε παράδοξο με βάση τη δυνατότητα παθητικής διασποράς μέσω των αβγών διάπαυσής τους. Τα φαινόμενα αυτά σε συνδυασμό με αντίστοιχες παρατηρήσεις σε πληθυσμούς του κλαδοκερωτού, επίσης κυκλικά παρθενογενετικού, γένους *Daphnia*, οδήγησαν τελικά στην υιοθέτηση της «υπόθεσης του μονοπωλίου» (monopolisation hypothesis). Σύμφωνα με αυτή, τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν να ερμηνευτούν μέσα από φαινόμενα ανάπτυξης

τοπικά προσαρμοσμένων ιδρυτικών πληθυσμών (Mills et al. 2007). Οι πληθυσμοί αυτοί εμφανίζονται ανθεκτικοί στις μεταναστεύσεις άλλων πληθυσμών, τόσο λόγω προσαρμογής στο περιβάλλον που ζουν όσο και λόγω αριθμητικού πλεονεκτήματος (dilution effect of immigrant genotypes). Επομένως, ο παρατηρούμενος οικολογικός («επιλογή κλώνων») αλλά και έως ένα βαθμό τυχαίος (ιδρυτικά φαινόμενα) πληθυσμιακός ενδημισμός (regional endemism), φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη διακριτών, συμπατρικά αναπτυσσόμενων κρυπτικών ειδών *Brachionus*. Πρέπει όμως να γίνουν πρόσθετες μελέτες προκειμένου να ελεγχθούν οι παραπάνω υποθέσεις. Η τροφή είναι από τις βιοτικές παράμετρους που επιδρούν σημαντικά στην οικολογία των ειδών *Brachionus*. Οι βλεφαρίδες της στεφάνης χρησιμεύουν για να οδηγήσουν σωματίδια τροφής στη στοματική περιοχή των τροχοζώων. Η οικονομική σημασία της καλλιέργειας των ειδών *Brachionus* στις υδατοκαλλιέργειες προσέλκυσε από νωρίς το ερευνητικό ενδιαφέρον ως προς τις διατροφικές συνήθειες και τις προτιμήσεις των τροχοζώων αυτών. Έτσι, το είδος και το μέγεθος της τροφής έχουν καθοριστική επίδραση στην επιβίωση και τους ρυθμούς ανάπτυξης των διαφορετικών ειδών *Brachionus* (Wallace et al. 2006). Σε γενικές γραμμές, τα είδη *Brachionus* αναπτύσσονται καλύτερα όταν καταναλώνουν χλωροφύκη. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι μπορούν να καταναλώσουν σε μικρότερο βαθμό βακτήρια αλλά και πρωτόζωα. Τέλος, κύτταρα ζύμης χρησιμοποιούνται αρκετά συχνά ως διατροφική βάση στην καλλιέργεια των τροχοζώων στα εκκολαπτήρια (Παπακώστας, 2008).

Τέλος, τα είδη *Brachionus* αποτελούν λεία για ορισμένους οργανισμούς, ενώ με άλλους έχει βρεθεί πως ανταγωνίζονται για πόρους του περιβάλλοντος. Έτσι, στους θηρευτές των τροχοζώων αυτών συγκαταλέγονται ορισμένοι ζωοπλαγκτικοί οργανισμοί, όπως άλλα τροχόζωα (π.χ. *Asplanchna* - Urabe 1992) και καρκινοειδή (όπως κάποια κωπήποδα - Brandl 2005). Όταν υπάρχουν θηρευτές, έχει παρατηρηθεί σε αρκετές περιπτώσεις πως ορισμένα είδη *Brachionus* γίνονται πιο ακανθώδη προκειμένου να προστατευτούν (Wallace et al. 2006). Σημαντικοί θηρευτές των ειδών *Brachionus* αποτελούν επίσης οι προνύμφες πολλών ειδών ψαριών, γεγονός στο οποίο οφείλεται κατά κύριο λόγο η οικονομική σπουδαιότητα της καλλιέργειας των τροχοζώων αυτών από τον άνθρωπο. Σημαντικοί ανταγωνιστές των ειδών *Brachionus* είναι ορισμένα πρωτόζωα (Παπακώστας, 2008)).

5.2.5 Εφαρμογή καλλιιεργειών *Brachionus* στα εκκολαπτήρια

Η χρησιμοποίηση των τροχοζώων του γένους *Brachionus* ως τροφή σε προνύμφες *Engraulis mordax* (γαύρος), αλλά και λίγο αργότερα σε προνύμφες *Pagrus major* (φαγκρί), έδωσε νέες προοπτικές στις προσπάθειες καλλιέργειας αρκετών ειδών ψαριών ιδιαίτερης οικονομικής σημασίας. Από τότε, ορισμένα είδη *Brachionus* χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια ολοένα και περισσότερων ειδών ψαριών. Σήμερα, η παγκόσμια άνθιση της ιχθυοκαλλιεργητικής βιομηχανίας οφείλεται σε σημαντικό βαθμό στην παράλληλη επιτυχία αύξησης της απόδοσης και της σταθερότητας των μαζικών καλλιιεργειών ειδών του γένους *Brachionus*.

Χαρακτηριστικό είναι πως οι καθημερινές ανάγκες ενός ιχθυογεννητικού σταθμού σε τροχόζωα μπορούν να ξεπεράσουν το ένα δισεκατομμύριο άτομα. Στις

ιχθυοκαλλιέργειες, η συνήθης τακτική περιλαμβάνει τη χορήγηση τροχοζώων για χρονικό διάστημα από 10 μέχρι και 30 ημέρες, από τη στιγμή που ανοίξει το στόμα των προνυμφών των ψαριών. Στα πλεονεκτήματα της καλλιέργειας και χρήσης των τροχοζώων ως τροφής συμπεριλαμβάνονται τα εξής:

α) έχουν σχετικά μικρό μέγεθος (120 - 500 μm , με το κατώτερο όριο να είναι και μικρότερο για τα νεαρά θηλυκά ορισμένων), και επομένως μπορούν να καταναλωθούν ακόμη και από προνύμφες με πολύ μικρό στοματικό άνοιγμα,

β) είναι πλαγκτικοί οργανισμοί με σχετικά μικρή κολυμβητική ταχύτητα και επομένως μπορούν να θηρευτούν εύκολα από τις προνύμφες,

γ) χαρακτηρίζονται από υψηλούς ρυθμούς αύξησης και αναπαραγωγής, γεγονός που επιτρέπει τη σχετικά γρήγορη απόκτηση μεγάλων αριθμών τους, δ) μπορούν να καλλιεργηθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις, κάτι που διευκολύνει το χειρισμό τους,

ε) η διατροφική τους αξία (π.χ. περιεχόμενο σε πρωτεΐνες ή λιπαρά οξέα) μπορεί να προσαρμοστεί με κατάλληλη δίαιτα («βιοενσωμάτωση») στις ανάγκες των αναπτυσσόμενων προνυμφών, ενώ τέλος,

στ) μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως φορείς μεταφοράς θρεπτικών στοιχείων, αντιμικροβιακών παραγόντων, ουσιών που μπορούν να δράσουν ως εμβόλια αλλά και προβιοτικών βακτηρίων (Παπακώστας, 2008).

Για να ικανοποιηθούν οι απαιτήσεις των ιχθυογεννητικών σταθμών σε τροχόζωα είναι απαραίτητη προηγουμένως η καλλιέργειά τους σε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις. Σε γενικές γραμμές μπορούν να διακριθούν τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις για την απόκτηση υψηλής συγκέντρωσης καλλιεργείων *Brachionus*:

α) Ασυνεχείς καλλιέργειες (batch cultures): Αυτός ο τύπος καλλιέργειας γίνεται με τον ενοφθαλμισμό μιας σχετικά μικρής ποσότητας τροχοζώων σε νερό (κατάλληλης αλατότητας, pH, θερμοκρασίας κ.ά.), στο οποίο έχουν προηγουμένως αναπτυχθεί τα μικροφύκη (green water). Μετά την κατανάλωση του συνόλου των φυκών, το μεγαλύτερο μέρος των τροχοζώων συλλέγεται και χορηγείται στις προνύμφες των καλλιεργούμενων ψαριών. Ένα μικρό ποσό της καλλιέργειας ενοφθαλμίζεται σε νέο καλλιεργητικό μέσο, σε επανάληψη του προηγούμενου κύκλου. Σήμερα, η δυνατότητα χρησιμοποίησης συντηρημένου και υψηλής συγκέντρωσης θρεπτικού μέσου (π.χ. συμπυκνωμένα κατεψυγμένα μικροφύκη, τεχνητές τροφές με βάση κύτταρα ζύμης), έχει επιτρέψει την αύξηση της συγκέντρωσης των καλλιεργούμενων τροχοζώων. Έτσι, αυτά καλλιεργούνται πλέον σε δεξαμενές μεγάλου όγκου (π.χ. 1.000 L - mass culture tanks) σε αρχικές συγκεντρώσεις της τάξεως των 10² τροχόζωα mL⁻¹. Μετά την πάροδο ωστόσο δύο με τριών ημερών, η συγκέντρωσή τους κατά κανόνα αυξάνεται στα 2-3 × 10³ τροχόζωα mL⁻¹. Στο σημείο αυτό το μεγαλύτερο μέρος της καλλιέργειας συλλέγεται (ολοκληρώνεται ένας κύκλος -batch- της καλλιέργειας), ενώ σε αυτό που παραμένει προστίθεται όγκος, ίσος με εκείνον που αφαιρέθηκε, νέου καλλιεργητικού μέσου με θρεπτικό υλικό. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται κάθε 2-3 ημέρες. Σημειώνεται πως η υψηλή συγκέντρωση των τροχοζώων στα δοχεία επιβάλλει την απομάκρυνση των οργανικών απορριμμάτων (με κατάλληλο φίλτρο), τη χορήγηση οξυγόνου στις καλλιέργειες όπως επίσης και την τακτική ρύθμιση της αλατότητας, της θερμοκρασίας και του pH (με παροχή υδροχλωρικού οξέος προκειμένου να

απομακρυνθεί η παραγόμενη αμμωνία). Σ' ένα εκκολαπτήριο μπορούν να υπάρχουν παράλληλα πολλές τέτοιες καλλιέργειες, ενώ η ανακύκλωσή τους κάθε 2-3 ημέρες περιορίζει σημαντικά το φόρτο εργασίας σε σχέση με άλλες κατηγορίες καλλιιεργειών (Παπακώστας, 2008).

β) Ημισυνεχείς καλλιέργειες (semi-continuous cultures): Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την καθημερινή απομάκρυνση ενός μέρους της καλλιέργειας και την αναπλήρωση με αντίστοιχο όγκο νερού κατάλληλης αλατότητας που περιέχει και το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Ο όγκος που απομακρύνεται εξαρτάται από τον αναπαραγωγικό ρυθμό των τροχοζώων. Τέτοιες καλλιέργειες γίνονται συνήθως σε δεξαμενές ιδιαίτερα μεγάλου όγκου (3.000 - 300.000 L), ενώ η συγκέντρωση των τροχοζώων είναι σχετικά μικρή (100-300 άτομα mL⁻¹). Οι καλλιέργειες αυτού του τύπου διαρκούν για αρκετές ημέρες ή ακόμη και εβδομάδες μέχρι τελικά η συνεχής συσσώρευση απορριμμάτων να οδηγήσει στην κατάρρευσή τους. Συνεχής απομάκρυνση των απορριμμάτων αύξησε σημαντικά τη διάρκειά τους, για περισσότερο και από 30 ημέρες. Μάλιστα, σε τέτοιου είδους συστήματα (που ονομάζονται καλλιέργειες ανάδρασης - feedback cultures), τα στερεά απορρίμματα αφού επεξεργαστούν, χρησιμοποιούνται ως θρεπτικό υπόστρωμα για τις καλλιέργειες των μικροφυκών που αργότερα δίνονται ως τροφή στα τροχόζωα.

γ) Συνεχείς καλλιέργειες (continuous cultures) (βλ. και Fu et al. 1997): Οι καλλιέργειες αυτές γίνονται σε δεξαμενές σχετικά μικρού όγκου (π.χ. 100 L), στις οποίες ελέγχονται κυρίως η θερμοκρασία, η αλατότητα, το pH, η παροχή οξυγόνου και η πυκνότητα των καλλιεργούμενων τροχοζώων. Στοχεύουν στη συνεχή διατήρηση των καλλιεργούμενων στελεχών *Brachionus* σε λογαριθμική φάση αύξησης. Στο συγκεκριμένο τύπο καλλιέργειας, καθαρό νερό κατάλληλης αλατότητας εισέρχεται με σταθερό ρυθμό σε αυτή και ο αντίστοιχος όγκος εξέρχεται από αυτή και μεταφέρεται σε δοχείο συλλογής. Τα τροχόζωα που συλλέγονται χορηγούνται ως τροφή στις προνύμφες των ψαριών. Ο ρυθμός ανακύκλωσης (όγκος νερού που εισάγεται-όγκος καλλιέργειας που απομακρύνεται) ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες και τον όγκο της καλλιέργειας, αλλά και τον τύπο του καλλιεργούμενου τροχοζώου.

Σε κάθε περίπτωση, χρειάζεται αρκετή προσπάθεια προκειμένου να βρεθούν οι ιδανικές συνθήκες καλλιέργειας και ρυθμού ανακύκλωσης. Θα πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι ο συγκεκριμένος τύπος εμφανίζει μεγαλύτερη αποδοτικότητα στην καθημερινή παραγωγή των τροχοζώων (τουλάχιστον τρεις φορές παραπάνω), σε σχέση με τις ασυνεχείς καλλιέργειες.

Τα παραπάνω βασικά συστήματα καλλιέργειας, όπως φαίνεται επιτρέπουν στα εκκολαπτήρια να εκτρέφουν τροχόζωα σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις. Πρόσφατα μάλιστα έχουν αρχίσει να δοκιμάζονται και συστήματα καλλιέργειας στελεχών *Brachionus* σε ακόμη μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (ultra-high-density), τα οποία μπορούν να ξεπεράσουν ακόμη και τα 10⁵ τροχόζωα mL⁻¹ (Παπακώστας, 2008). Τα τροχόζωα σε τέτοιες μεγάλες πληθυσμιακές πυκνότητες είναι επόμενο να εκτίθενται σε συνθήκες αρκετά διαφορετικές και ίσως πιο αντίξοες από εκείνες που αντιμετωπίζουν στη φύση. Έτσι, σε ορισμένες περιπτώσεις μαζικών καλλιιεργειών παρατηρούνται φαινόμενα μειωμένης αύξησης, κακής απόδοσης ή και μαζικών θανάτων (καταρρεύσεις - crashes) των τροχοζώων. Έρευνες έχουν δείξει ότι οι παράγοντες που αυξάνουν την αστάθεια των καλλιιεργειών μπορεί να είναι τόσο αβιοτικοί, όπως: η θερμοκρασία, το οξυγόνο, το pH, η συσσώρευση απορριμμάτων,

όσο και βιοτικοί, όπως: η παρουσία ανταγωνιστικών ή βλαβερών πρωτόζωων, βακτηρίων ή ακόμη και ιών.

Σε κάθε περίπτωση, μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους που φαίνεται να καθορίζει τις συνθήκες της καλλιέργειας, αλλά και που μπορεί να επηρεάσει φαινόμενα καταρρεύσεων ή μειωμένης παραγωγικότητας, είναι το καλλιεργούμενο είδος *Brachionus*. Τα είδη *Brachionus* που καλλιεργούνται συνήθως είναι τα *B. plicatilis*, *B. rotundiformis*, *B. calyciflorus* και *B. rubens* (Wallace et al. 2006). Έχει διαπιστωθεί ότι διαφορετικοί πληθυσμοί των παραπάνω ειδών δεν αντιδρούν το ίδιο στις συνθήκες καλλιέργειας των εκκολαπτηρίων ((Παπακώστας, 2008). Παρουσιάστηκε εξάλλου παραπάνω το μεγάλο εύρος των αβιοτικών συνθηκών στο οποίο μπορούν να αναπτυχθούν τα διαφορετικά είδη *Brachionus* (βλ. οικολογία του γένους). Οι διαφορετικοί αυτοί πληθυσμοί συνήθως χαρακτηρίζονται από τα εκκολαπτήρια ως στελέχη. Διαφορετικά στελέχη χρησιμοποιούνται από τα εκκολαπτήρια προκειμένου να ικανοποιήσουν τις εκάστοτε ανάγκες τους. Αναφέρεται χαρακτηριστικά η περίπτωση ενός εκκολαπτηρίου στο Ισραήλ που καλλιεργούσε στελέχη *Brachionus* σε υπαίθριες δεξαμενές και αντιμετώπιζε μαζικούς θανάτους στα καλλιεργούμενα τροχόζωα, όταν η θερμοκρασία του περιβάλλοντος άλλαζε κατά τη διαδοχή των εποχών. Το πρόβλημα αυτό λύθηκε με τη χρησιμοποίηση δύο, διαφορετικού μεγέθους, στελεχών *Brachionus*. Το μεγαλύτερο σε μέγεθος στέλεχος βρέθηκε πως αναπτύσσεται καλύτερα κατά τους χειμερινούς μήνες, ενώ το μικρότερο σε μέγεθος στους θερμότερους (Παπακώστας, 2008). Στελέχη με ικανοποιητική απόδοση σε ορισμένες συνθήκες συνήθως κυκλοφορούν μεταξύ των εκκολαπτηρίων.

5.2.6 Οι ιδιαιτερότητες των *Brachionus plicatilis*

Με την έναρξη της χρησιμοποίησης του *B. plicatilis* στις υδατοκαλλιέργειες, έγινε αντιληπτό ότι ορισμένα στελέχη του παρουσίαζαν διαφορετική οικολογία αλλά και μέγεθος σώματος. Η πρώτη ομαδοποίηση έγινε με βάση το μέγεθος του σώματος, οπότε και τα στελέχη διακρίθηκαν σε δύο μορφотύπους: «μεγάλο» (Large, L) και «μικρό» (Small, S). Αργότερα, διαφορές μεταξύ των στελεχών L και S οδήγησαν τελικά στον χαρακτηρισμό τους ως ξεχωριστά είδη, τα *B. plicatilis* και *B. rotundiformis* αντίστοιχα (Παπακώστας, 2008). Οι διαφορές αυτές αφορούσαν:

- α) το μέγεθος και τη μορφολογία των πρόσθιων-νωτιαίων ακανθών της στεφάνης (Fu et al. 1991a),
- β) τα αλλοενζυμικά πρότυπα,
- γ) τον τρόπο αναπαραγωγής (παρθενογένεση ή αμφιγονία) ανάλογα με τη θερμοκρασία,
- δ) τον αριθμό των χρωμοσωμάτων και
- ε) την ικανότητα διάκρισης των θηλυκών από τα αντίστοιχα αρσενικά κάθε μορφотύπου.

Παράλληλα, ανάλυση δειγμάτων *B. plicatilis* από υδατοσυλλογές της Ιβηρικής χερσονήσου αποκάλυψε διαφορές:

- α) στη μορφολογία,
- β) στα αλλοενζυμικά πρότυπα,
- γ) στην οικολογία και
- δ) στην ικανότητα διάκρισης των θηλυκών από τα αντίστοιχα αρσενικά.

Έτσι, δημιουργήθηκαν τρεις ομάδες τροχοζώων *Brachionus*. Οι ομάδες αυτές διακρίθηκαν στους μορφοτύπους «μεγάλος» (Large, L), «μεσαίος» (Small Medium, SM) και «πολύ μικρός» (Super Small, SS), με βάση το μέγεθος του σώματος των τροχοζώων (μήκος περίπου 220-240 μm, 150-165 μm, 115-125 μm και πλάτος 160-175 μm, 110-125 μm, 100-105 μm αντίστοιχα) (Gomez et al. 1995). Μορφομετρικά δεδομένα, σε συνδυασμό με τα παραπάνω, οδήγησαν στην αναγνώριση και περιγραφή ενός είδους σε καθεμιά από τις παραπάνω ομάδες. Έτσι στην ομάδα L αναγνωρίστηκε και περιγράφηκε το είδος *B. plicatilis* και στις ομάδες SM και SS τα είδη *B. ibericus* και *B. rotundiformis* αντίστοιχα (Ciros-Perez et al., 2001).

Η μελέτη ωστόσο της μορφολογίας, της γενετικής (αλλοένζυμα) και της ικανότητας των αρσενικών τροχοζώων να διακρίνουν και να αναπαραχθούν με θηλυκά άτομα σε δείγματα πληθυσμών και από άλλες περιοχές της Ευρώπης αλλά και από την Αμερική, την Ασία και την Αυστραλία, οδήγησε από νωρίς στο συμπέρασμα πως οι παραπάνω τρεις ομάδες φαίνεται να απαρτίζονται από περισσότερα από τρία είδη.

Με τη χρήση γενετικών κυρίως δεδομένων διαπιστώθηκε δηλαδή πως η μέχρι πρόσφατα θεώρηση του είδους *B. plicatilis* δεν ανταποκρινόταν στην πραγματικότητα και πως με το ίδιο όνομα χαρακτηρίζονταν ορισμένα διαφορετικά, μορφολογικά όμοια, είδη (*B. plicatilis sensu lato* ή σύμπλεγμα *B. plicatilis*). Σήμερα οι ερευνητές έχουν καταλήξει σε μια πιο αντιπροσωπευτική περιγραφή του είδους *B. plicatilis* (*B. plicatilis sensu stricto* ή *B. plicatilis s.s.*). Έρευνες με δείγματα από περισσότερες περιοχές, διαπίστωσαν την παρουσία και άλλων ειδών/βιοτύπων στο σύμπλεγμα *B. plicatilis*, ενώ προσπάθειες καταβάλλονται και για τη μορφολογική περιγραφή αρκετών από αυτά. Πρόσφατα μάλιστα δεδομένα από την ανάλυση ακολουθιών DNA και πειραματικών διασταυρώσεων υποστηρίζουν την παρουσία κρυπτικών ειδών και στο είδος *B. calyciflorus*, γεγονός που προκαλεί έντονο ενδιαφέρον όσον αφορά την περιγραφή των ειδών αυτών, αλλά και τον έλεγχο αντίστοιχων περιπτώσεων σε άλλα είδη *Brachionus*.

Η παρουσία επομένως κρυπτικών ειδών στο γένος *Brachionus* επιβάλλει τη χρήση γενετικών δεικτών για το χαρακτηρισμό των πληθυσμών τους. Είναι γεγονός ότι πολλές από τις απόψεις που αφορούν τη βιοποικιλότητα, την προσαρμογή στα διάφορα περιβάλλοντα και τη γεωγραφική κατανομή των ειδών *Brachionus* έχουν ήδη αρχίσει να αναθεωρούνται μέσα από εργασίες γενετικού χαρακτηρισμού των πληθυσμών τους όπως η παρούσα. Τα αποτελέσματα τέτοιων ερευνών αναμένεται να προσφέρουν δεδομένα που θα επιτρέψουν την ευκρινέστερη ταυτοποίηση των ειδών *Brachionus*, την καλύτερη μελέτη των μηχανισμών εξέλιξης που δρουν στο γένος, ενώ τέλος, μπορούν να οδηγήσουν και στη βελτίωση των διαχειριστικών πρακτικών σε καλλιέργειες των τροχοζώων αυτών.

6 Υλικά και Μέθοδοι

6.1 Υλικά

Για την διεξαγωγή των εκτροφών και τον εμπλουτισμό τους χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά και εμπλουτιστικά μέσα:

- Φιάλες Erlenmeyer τελικού όγκου 10 L.
- Φιάλες Erlenmeyer τελικού όγκου 4 L.
- Φιάλες Erlenmeyer τελικού όγκου 1 L.
- Φιάλες Erlenmeyer τελικού όγκου 250ml.
- Αιματοκυτταρόμετρο Neubauer
- Μικροσκόπιο
- Στερεοσκόπιο
- Μαϊάνδρο μέτρησης τροχοζώων

Για την διατήρηση σταθερής αλατότητας σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις στο θαλασσινό νερό των καλλιέργειών, την παρασκευή του εμπλουτιστικού διαλύματος Walne καθώς και των βιταμινών, χρησιμοποιήθηκε υπερκαθαρό νερό που παράγεται στο εργαστήριο με την χρήση συσκευής διπλής απόσταξης.

Τα δύο εμπορικά είδη μικροφυκών (*Tetraselmis suecica* και *Tetraselmis chuii*) καθώς και τα είδη των τροχοζώων (*Brachionus plicatilis sp.*) ήταν προσφορά του ιχθυογεννητικού σταθμού θαλασσινών ειδών Τρίτωνα, που ανήκει στην εταιρία Selonda και εδρεύει στην περιοχή Λωρίδα, στη Σαγιάδα Θεσπρωτίας. Τα εννέα απομονωμένα στελέχη προέρχονται από την τράπεζα στελεχών του εργαστηρίου Θαλασσοκαλλιεργειών, του ΑΤΕΙ Ηπείρου της Ηγουμενίτσας, όπου διατηρούνται σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού και θερμοκρασίας εργαστηρίου. Οι ονομασίες που έχουν δοθεί σε αυτά τα μη ταυτοποιημένα είδη μαρτυρούν την τοποθεσία προέλευσης. Αναλυτικότερα, τα είδη με τις ονομασίες R 9-2, R 1-2, R 2-3, R 1-1, R 1-3 προέρχονται από την λιμνοθάλασσα της Ροδιάς, τα T 3-2, T 3-1 προέρχονται από την λιμνοθάλασσα Τσουκαλιό και τέλος τα είδη V 2-2, V 2-3 προέρχονται από την λιμνοθάλασσα της Βατάτσας.

6.2 Μέθοδοι

6.2.1 Κριτήρια επιλογής

Υπάρχουν ορισμένα σημαντικά κριτήρια για την επιλογή του κατάλληλου είδους στα πειράματα. Έτσι λοιπόν, τα είδη που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να αντιπροσωπεύουν το φάσμα ειδών το οποίο χρησιμοποιείτε στις θαλασσοκαλλιέργειες. Θα πρέπει επίσης να χρησιμοποιούνται είδη που υπάρχουν σε αφθονία. Σημαντικό είναι τα είδη που θα χρησιμοποιηθούν να είναι ενδογενή και να είναι μέρος του οικοσυστήματος της περιοχής που θα γίνεται η καλλιέργεια. Γενικά τα είδη που ελέγχονται θα πρέπει να είναι σημαντικά από οικολογική, οικονομική ή άλλη άποψη. Ακόμη θα πρέπει να είναι δυνατή η καλλιέργεια του οργανισμού στο εργαστήριο (σύλληψη, μεταφορά, αναπαραγωγή). Τέλος είναι καλό να υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα για το είδος (φυσιολογία, γενετική, συμπεριφορά) ή έστω το γένος ώστε να μπορούν να ερμηνευτούν ευκολότερα τα αποτελέσματα (Rand και Petrocelli, 1985).

6.2.2 Προετοιμασία καλλιεργειών

Αρχικά έγινε ανακαλλιέργεια στελεχών με εμβολιασμό καλλιέργειας μικροφυκών του κάθε είδους, σε 95 ml αποστειρωμένου διηθημένου θαλασσινού νερού (0.2 μm) αλατότητας 25 psu, σε κωνικές φιάλες χωρητικότητας 250 ml. Οι φιάλες με το θαλασσινό νερό πριν, κατά την διάρκεια και μετά την αποστείρωση σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης, είχαν σφραγιστεί με πώμα από υδρόφοβο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο. Η αποστείρωση επετεύχθη με παραμονή των φιαλών σε θερμοκρασία 120°C για 20 λεπτά, μια ημέρα πριν από τον εμβολιασμό με τα μικροφύκη.

Έπειτα έγινε εμπλουτισμός με βιταμίνες (0,1 ml βιταμίνης ανά καλλιέργεια) και θρεπτικό μέσο Walne (1 ml θρεπτικού μέσου ανά καλλιέργεια). Όλες οι διαδικασίες εκτελούνται υπό ασηπτικές συνθήκες και με την χρήση εξειδικευμένου εξοπλισμού (Εικόνα 6.).



Εικόνα 6. Αποστειρωμένος χώρος εργασίας (Laminar flow) για διαχείριση των καλλιιεργειών υπό ασηπτικές συνθήκες. Διακρίνεται στη βάση, η φιάλη υγραερίου για την χρήση του αυτόκαυστου (πηγή: φωτογραφία από τον συγγραφέα).

Ακολούθησε αποστείρωση του στομίου της φιάλης με την χρήση λύχνου και επανατοποθέτηση του πώματος (αποστειρωμένο υδρόφοβο βαμβάκι). Πιο συγκεκριμένα, οι φιάλες των 250 ml εμβολιάστηκαν με 5 ml αξενικής καλλιέργειας πάντα δουλεύοντας υπό ασηπτικές συνθήκες, κοντά στο λύχνο, καίοντας τα χείλη της φιάλης κάθε φορά μετά την αφαίρεση και πριν την τοποθέτηση του πώματος. Με μαρκαδόρο σημειώθηκαν τα στοιχεία της κάθε καλλιέργειας πάνω στη φιάλη: ονομασία στελεχών, η αλατότητα του νερού και η ημερομηνία εμβολιασμού. Έπειτα οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε ειδικό χώρο του εργαστηρίου όπου εφαρμόστηκαν κατάλληλες συνθήκες για τις καλλιέργειες, σε γυάλινους πάγκους με φωτισμό από Cool white fluorescent tubes – 1500 lux και θερμοκρασία χώρου 18 °C. Καθημερινά γινόταν ανάδευση των καλλιιεργειών και τακτικός έλεγχος ως προς το χρώμα και την πυκνότητά τους.

6.2.3 Μαζική καλλιέργεια μικροφυκών

Η μέθοδος της μαζικής καλλιέργειας που εφαρμόστηκε είναι η μέθοδος της ασυνεχούς καλλιέργειας (Batch Culture Method) σε συνδυασμό με την μέθοδο της διαδοχικής αναβάθμισης (Milford batch scale-up) μέχρι το στάδιο καλλιέργειας τελικού όγκου 10 L όπου και θα εφαρμοστή αποκλειστικά το πρωτόκολλο ασυνεχούς καλλιέργειας .

Μετά από 5 ημέρες ανάπτυξης των 100 ml κάθε καλλιέργειας στις φιάλες των 250 ml, ακολούθησε η μεταφορά τους σε κωνικές φιάλες του 1 L (Εικόνα 7), όπου περιείχαν 900 ml διηθημένου θαλασσινού νερού (0.2 μm) αλατότητας 25 psu, εμπλουτισμένο με βιταμίνες (0,1ml βιταμίνης ανά καλλιέργεια) και θρεπτικό μέσο Walne (1 ml θρεπτικού μέσου ανά καλλιέργεια). Σε αυτό το στάδιο της διαδικασίας προστέθηκε αερισμός μέσω πιπέτας συνδεδεμένης με την παροχή φιλτραρισμένου ατμοσφαιρικού αέρα μέσω της εγκατάστασης του εργαστηρίου, στις φιάλες του 1 L ώστε να επιτευχθεί ανάδευση που να επιτρέπει τον σωστό αερισμό, την κυκλική κίνηση της καλλιέργειας ώστε να αυξηθεί η εισχώρηση του φωτός σε όλη τη στήλη της καλλιέργειας και να μην δημιουργηθεί ίζημα από βυθισμένα κύτταρα στον πυθμένα της φιάλης.



Εικόνα 7. Φιάλη του 1 λίτρου. Ακολουθεί αραιώση των μικροφυκών που περιέχονται στην φιάλη έπειτα από 5 ημέρες (πηγή: φωτογραφία από τον συγγραφέα).

Οι καλλιέργειες παρέμειναν στις φιάλες όγκου 1 L για 5 ημέρες. Έπειτα ακολούθησε η μεταφορά τους σε μεγαλύτερες φιάλες 10 L (Εικόνα 8) στις οποίες είχαμε προσθέσει 9 L νερού αντίστοιχης αλατότητας, αναλογιών εμπλουτισμού με θρεπτικά και βιταμίνες όπως κατά την μεταφορά τους στις φιάλες του 1 L. Η

παρουσία παροχής αέρα κρίθηκε απαραίτητη και σε αυτό το στάδιο. Η παραγόμενη βιομάζα μικροφυκών που περιέχονταν μέσα στις φιάλες των 10 L αποτελούσε την πηγή διατροφής για τις εκτροφές τροχοζώων που θα ακολουθούσε στις φιάλες των 250 ml.



Εικόνα 8. Φιάλες των 10 Λίτρων το περιεχόμενο των οποίων χρησιμοποιήθηκε για τον εμπλουτισμό των φιαλών των 250 ml (πηγή: φωτογραφία από τον συγγραφέα).

Οι μετρήσεις γινόταν σε καθημερινή βάση και η επιθυμητή συγκέντρωση, ώστε να προχωρήσει στην επόμενη φάση το πείραμα, ήταν τουλάχιστον 1×10^6 κύτταρα φυτοπλανκτού ανά ml καλλιέργειας. Όταν η καλλιέργεια έφτανε αυτή τη συγκέντρωση ξεκινούσαν οι προετοιμασίες για την εκτροφή των τροχοζώων σε φιάλες των 250 ml με την χρήση των μικροφυκών της κάθε καλλιέργειας.

6.2.4 Εκτροφή πληθυσμών τροχοζώων

Τα τροχοζώα είχαν τοποθετηθεί σε φιάλη όγκου 4 L, όπου διαβιούσαν σε νερό αλατότητας 25 psu, σε θερμοκρασία χώρου 25 °C, φωτισμό από Cool white fluorescent tubes (έντασης 1500 lux) και διατρέφονταν με το κύτταρα του είδους *Tetraselmis suecica*. Προτιμήθηκε αυτό το είδος λόγω της αποδεδειγμένης καλής

απόδοσης του σε αυτές τις εκτροφές, καθώς και γιατί έχει πολλά κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά με τα άλλα είδη που μελετήθηκαν, καθώς αποτελεί είδος του ίδιου γένους και περίπου μεγέθους με τα άλλα είδη. Τα κοινά εξωτερικά μορφολογικά στοιχεία των ειδών συνέβαλαν στην ομαλή διατροφική προσαρμογή των τροχοζώων ώστε να ελαττωθεί ο παράγοντας στρες κατά την μεταφορά της καλλιέργειας σε άλλο δοχείο. Η παροχή αέρα εντός της φιάλης, για ανάδευση της καλλιέργειας, είναι απαραίτητη.

Καθημερινά γινόταν μετρήσεις του πληθυσμού των τροχοζώων, των μικροφυκών και υπολογισμός της βιομάζας των καλλιεργειών της κάθε φιάλης (όγκου 4 L) ώστε τελικά να υπολογιστεί ο ημερήσιος αριθμός της απαιτούμενης βιομάζας μικροφυκών που θα έπρεπε να προστεθεί για τις διατροφικές απαιτήσεις της καλλιέργειας των τροχοζώων.

6.2.5 Καλλιέργειες σε φιάλες όγκου 250 ml

Σε φιάλες όγκου 250 ml, περιεχομένου 100 ml διηθημένου θαλασσινού νερού αλατότητας 25 psu, μεταφέρθηκαν πληθυσμοί 50 τροχοζώων ανά ml, μετά από διήθηση (40 μ m) των μεγαλύτερων καλλιεργειών που εκτρέφονταν στις φιάλες 4 L. Προστέθηκε βιομάζα μικροφυκών τόση ώστε να αντιστοιχούν 1×10^3 κύτταρα ανά τροχόζωο, ξεχωριστά σε κάθε φιάλη (250 ml). Δημιουργήθηκαν τρεις φιάλες (250 ml) από το κάθε είδος μικροφυκών, οι οποίες τοποθετήθηκαν πάνω σε γυάλινους πάγκους, σε εργαστηριακό χώρο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία χώρου 25 °C, φωτισμό από Cool white fluorescent tubes (έντασης 1500 lux).

6.2.6 Πειραματικό στάδιο

Καθημερινά (ακριβώς κάθε 24 ώρες) λαμβάνονταν δείγμα από κάθε καλλιέργεια και μετρούταν ο κυτταρικός αριθμός των μικροφυκών και αριθμός των ατόμων των τροχοζώων. Εάν ο πληθυσμός των τροχοζώων είχε αυξητική τάση και η υπάρχουσα βιομάζα μικροφυκών δεν επαρκούσε για τις διατροφικές ανάγκες του πληθυσμού, γινόταν προσθήκη βιομάζας μικροφυκών από τις καλλιέργειες των 10 L. Οι καθημερινές μετρήσεις καταγράφονταν και συνεχίζονταν μέχρι το νερό της καλλιέργειας να φτάσει το όριο της φιάλης (δηλαδή τα 250 ml) κατά την αύξηση της βιομάζας και της προσθήκης μικροφυκών, σε περίπτωση που ο πληθυσμός της καλλιέργειας των τροχοζώων είχε αυξητική τάση. Στην περίπτωση όπου η καλλιέργεια των τροχοζώων μειωνόταν λόγω μη απόδοσης του είδους *Tetraselmis* με

το οποίο διατρεφόταν, οι μετρήσεις διεξάγονταν μέχρι η καλλιέργεια να καταρρεύσει τελείως, ή μετά από 6 ημέρες αν παρέμενε σταθερή (κυρίως σε χαμηλά επίπεδα).

Κατά την διάρκεια των δειγματοληπτικών ελέγχων πραγματοποιήθηκαν οι εξής παρατηρήσεις:

- Αριθμός ατόμων τροχοζώων
- Αριθμός ωαρίων
- Βιομάζα μικροφυκών

Για την ανάλυση της σύστασης του πληθυσμού χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω δείκτες:

Ο ρυθμός ανάπτυξης, ο οποίος δείχνει την αύξηση και την κατάσταση ενός πληθυσμού (Snell, 1978):

$$SGR = \ln N_t - \ln N_{t-1}$$

Όπου

N_t = συνολική ποσότητα τροχοζώων την ημέρα t

N_{t-1} = συνολική ποσότητα τροχοζώων την ημέρα $t-1$

t = συνολική διάρκεια των ημερών εκτροφής

Με την χρήση του λογισμικού SPSS, έγινε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) της παραγωγικότητας και ιεράρχηση των αποτελεσμάτων κατά Duncan's Multiple Range Test.

6.2.7 Αναλυτική μεθοδολογία

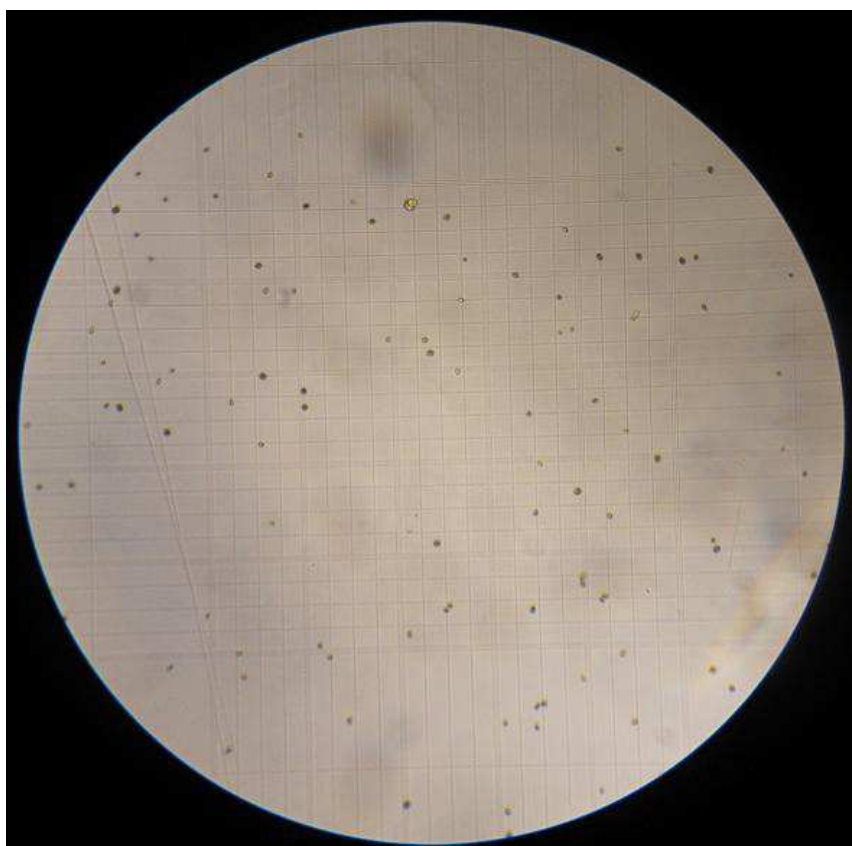
Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων της φυτοπλακτικής καλλιέργειας έγινε με την βοήθεια μικροσκοπίου ολικής μεγέθυνσης x400 και αιματοκυτταρόμετρου Neubauer.

Καθημερινά, λαμβανόταν δείγμα 1 ml από τις καλλιέργειες. Το δείγμα της καλλιέργειας τοποθετούταν σε φιαλίδιο, όπου και γινόταν η θανάτωση των κυττάρων με την προσθήκη διαλύματος Lugol, σε αναλογία 1:1 (δηλαδή 1 ml διαλύματος Lugol σε 1 ml δείγματος καλλιέργειας). Η συγκεκριμένη αναλογία ήταν η καταλληλότερη για τα συγκεκριμένα είδη, με εξαίρεση ενός, όπου η συγκέντρωση των κυττάρων

ήταν αυξημένη και το μέγεθός τους αρκετά μικρότερο των άλλων ειδών, όπου ήταν αναγκαία η μεγαλύτερη αραιώση του δείγματος. Η σύσταση του Lugol, το οποίο ήταν αποθηκευμένο σε σκούρου χρώματος μπουκάλια, είναι:

- 10 g καθαρού ιωδίου
- 20 g ιωδιούχου καλίου
- 20 g παγώμορφου οξικού οξέος
- 200 ml απιονισμένο νερό

Έπειτα τοποθετούνταν ποσότητα του αραιωμένου δείγματος, με τη χρήση μιας λεπτής πιπέτας, στο αιματοκυτταρόμετρο (Εικόνα 9.) όπου γινόταν η καταμέτρηση των κυττάρων της καλλιέργειας.



Εικόνα 9. Πανοραμική λήψη των κυττάρων του μικροφύκου *Tetraselmis suecica*, σε αιματοκυτταρόμετρο, μέσω μικροσκοπίου (πηγή: φωτογραφία από τον συγγραφέα).

Η μέτρηση κάθε δείγματος γινόταν σε όλες τις υποδιαιρεμένες περιοχές του αιματοκυτταρόμετρου. Ο αριθμός των κυττάρων της κάθε μέτρησης διαιρούνταν με τον αριθμό των περιοχών στις οποίες γινόταν η μέτρηση και πολλαπλασιαζόταν με τον αριθμό αραιώσης του δείγματος (δηλαδή με το 2). Αυτό γινόταν και για τις δύο

επιφάνειες του αιματοκυτταρόμετρου. Έπειτα υπολογιζόταν ο μέσος όρος με την πρόσθεση των δύο αποτελεσμάτων και την διαίρεσή τους με το 2, ώστε να προκύψει τελικά ο αριθμός κυττάρων ανά ml, πολλαπλασιαζόμενος $\times 10^4$.

Η μέτρηση των ατόμων των τροχοζώων κάθε εκτροφής έγινε με την χρήση στερεοσκοπίου.

Καθημερινά, λαμβανόταν δείγμα 1 ml από τις καλλιέργειες. Το δείγμα της καλλιέργειας τοποθετούταν σε γυάλινο μαϊανδρο, σε σταγόνες με την βοήθεια πιπέτας. Με αυτό τον τρόπο η κινητικότητα των ατόμων περιοριζόταν στο μέγεθος της σταγόνας, με αποτέλεσμα την ασφαλέστερη και ακριβέστερη μέτρηση. Η ποσότητα των σταγόνων (και κατ' επέκταση ο όγκος του δείγματος) που μπορούσε να δεχθεί ο μαϊανδρος ήταν 0,5 ml, λόγω της αντίστοιχης χωρητικότητας του. Επομένως, το αποτέλεσμα της μέτρησης πολλαπλασιάζονταν με τον αριθμό 2, ώστε να βρεθεί ο αριθμός των ατόμων στο 1 ml. Κατά την διάρκεια της μέτρησης των ατόμων γινόταν καταμέτρηση και καταγραφή των θηλυκών ατόμων που φέρανε ωάρια και ο αριθμός των ωαρίων του κάθε θηλυκού. Οπότε, με το πέρας της καταμέτρησης ο αριθμός των θηλυκών υπολογιζόταν με διπλασιασμό του τελικού αριθμού (όπως αναφέρθηκε παραπάνω για να βρεθεί η τιμή στο 1 ml) και υπολογιζόταν ο μέσος όρος ωαρίων (προσθέτοντας όλα τα καταμετρημένα ωάρια και διαιρώντας τον αριθμό τους δια τον αριθμό των θηλυκών που φέρανε ωάρια).

Η εκτίμηση της απόδοσης των καλλιεργειών, έγινε με σύγκριση των μετρήσεων των δειγμάτων των τροχοζώων, των καλλιεργειών σε φιάλες 250 ml. Πιο συγκεκριμένα, ο αριθμός αύξησης του πληθυσμού των τροχοζώων ανά καλλιέργεια σε βάθος χρόνου 5 ημερών.

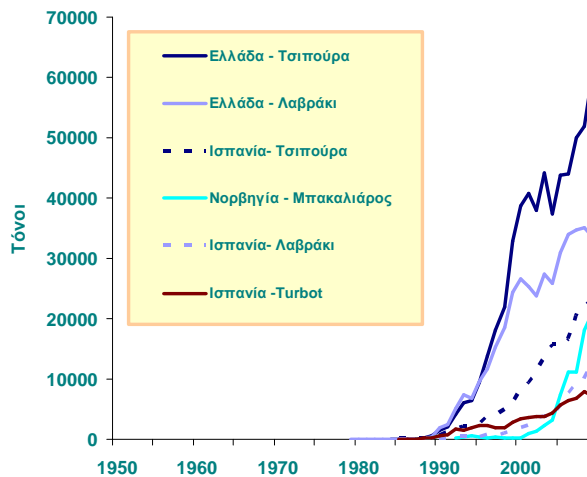
7 Αποτελέσματα και Συζήτηση

Σύμφωνα με στοιχεία, για το 2011, του Διεθνούς Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (F.A.O) η ετήσια μεταβολή της παραγωγής της υδατοκαλλιέργειας σε παγκόσμιο επίπεδο είναι ραγδαίως αυξανόμενη την τελευταία δεκαετία, με συνεχώς ανοδικές τάσης (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Ετήσια μεταβολή της παραγωγής της εμπορικής αλιείας και της υδατοκαλλιέργειας σε παγκόσμιο επίπεδο (στοιχεία από FAO, 2011).

Σχετικά με τις χώρες της Ευρώπης, η Ελλάδα κρατάει την πρωτιά στην παραγωγή θαλασσινών ειδών με κύρια εξαγόμενα είδη την τσιπούρα και το λαβράκι.



Εικόνα 11. Ετήσια μεταβολή στην παραγωγή των σημαντικότερων ειδών ανά χώρα στην Ευρωπαϊκή υδατοκαλλιέργεια (στοιχεία από FAO 2011).

Από τα παραπάνω μεγέθη οδηγείτε κανείς στο συμπέρασμα πως για την επίτευξη αυτής της παραγωγής απαιτούνται, πέραν των ιδανικών συνθηκών και των εγκαταστάσεων, τεράστιες ποσότητες ποιοτικών πρώτων υλών διατροφής των ιχθύων από το στάδιο της νύμφης μέχρι και το τελικό στάδιο της πάχυνσης.

Από την στιγμή που θα γίνει απορρόφηση του λεκιθικού σάκου και θα αρχίσει η προσαρμογή των νυμφών στην ζωντανή τροφή, κρίνεται η αναγκαιότητα της παροχής κατάλληλα εμπλουτισμένης τροφής στις νύμφες, ώστε να επιτευχθεί η βιωσιμότητα, η σωστή και απροβλημάτιστη ανάπτυξη και ευζωία των πληθυσμών των νυμφών κατά την παραγωγική διαδικασία.

Τα τροχόζωα *Brachionus plicatilis* χρησιμοποιούνται εκτενώς στην εκτροφή των λαρβών ιχθύων, γαρίδας και καβουριού. Εξαιτίας αυτής της διατροφικής αξίας που έχουν τα τροχόζωα, έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές μαζικής εκτροφής.

Έχει γίνει ιδιαίτερη προσπάθεια για την εύρεση μεθόδων αύξησης της παραγωγής των *B. plicatilis* ώστε να ενισχυθούν οι θαλασσοκαλλιέργειες. Οι περισσότερες από αυτές τις μεθόδους έχουν εστιαστεί στην ταυτοποίηση τροφής που θα αποδώσει μεγάλα αναπαραγωγικά επίπεδα (Snell et al., 1983). Πολυάριθμα είδη μικροφυκών, ζυμών και βακτηρίων έχουν ερευνηθεί, ώστε να αποδειχθεί η καταλληλότητά τους στην υποστήριξη της σωστής και ταχύρυθμης ανάπτυξης πληθυσμών του *B. plicatilis*.

Αν και έχουν δοκιμαστεί πολλές πηγές διατροφής, οι συγκρίσεις μεταξύ αυτών των μελετών είναι δύσκολες γιατί σε κάθε μελέτη έχουν εξετασθεί διαφορετικά στελέχη *B. plicatilis* και η εκτροφή τους έχει γίνει σε διαφορετικές θερμοκρασίες, αλατότητες και μέσα. Πέραν αυτών των προβλημάτων, είναι ξεκάθαρο ότι η ποσότητα των μικροφυκών που χορηγείτε στα τροχόζωα, παίζει σημαντικό ρόλο στον ρυθμό αναπαραγωγής τους. Η επίδραση του τύπου των μικροφυκών που χρησιμοποιούνται ως τροφή για τα τροχόζωα, δεν είναι ξεκάθαρη για το αν και κατά πόσο επηρεάζει την αναπαραγωγή τους. Σε μια από τις πιο εκτενείς μελέτες που διεξήγαγε ο Hirayama (1979) διαπιστώθηκε το αντίθετο, διεξάγοντας πειράματα που αποδεικνύουν ότι διαφορετικά είδη μικροφυκών μπορούν να δημιουργήσουν διαφορετικούς αναπαραγωγικούς ρυθμούς στους πληθυσμούς των τροχοζώων (Snell et al., 1983).

Τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται στην ελληνική θαλασσοκαλλιέργεια ως εμπλουτιστικά μέσα για την επίτευξη κατάλληλων συνθηκών στις δεξαμενές όπου διαβιούν και εκτρέφονται τα ιχθύδια, αλλά και στον εμπλουτισμό της ζωντανής τροφής κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξής τους, ώστε να πληρούνται οι διατροφικές τους απαιτήσεις.

Τα είδη που χρησιμοποιούνται κυρίως είναι τα μικροφύκη *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae), *Tetraselmis suecica* (Prasinophyceae), *Isochrysis aff. galbana T-ISO* (Prymnesiophyceae) και ένα Ελληνικό θαλάσσιο είδος απομονωμένο και ταυτοποιημένο ως *Chlorella sp.* (Chlorophyceae). Αυτά τα στελέχη είτε διατηρούνται σε γραμμές παραγωγής στα Ελληνικά εκκολαπτήρια, είτε ανανεώνονται τακτικά από συλλογές καλλιεργειών του εξωτερικού.

Στη χώρα μας κατά μέσο όρο η παραγωγή των μικροφυκών έχει βελτιωθεί σε ικανοποιητικές πυκνότητες ανά καλλιέργεια. Η βελτίωση αυτή σχετίζεται με την βελτίωση του κόστους παραγωγής και την καλύτερη διαχείριση, που έχουν ως αποτέλεσμα την συμπίεση των δαπανών και την ελαχιστοποίηση των απωλειών (Tzovenis και Cladas, 2009).

Η χρήση ειδών μικροφυκών τα οποία μπορούν να συλλεχθούν από το Ελληνικό υδάτινο πεδίο και η ποιότητά τους είναι αντίστοιχη των εμπορικών ειδών, θα συμβάλλει στην κατά μέρους μείωση των δαπανών αγοράς στελεχών για τις ελληνικές επιχειρήσεις, καθώς

ανοίγει και νέους οικονομικούς ορίζοντες για την σύσταση εταιριών παραγωγής βιομάζας μικροφυκών, με σκοπό την ανάθεση βιομάζας στην εγχώρια και εξωτερική αγορά.

Αυτές οι προοπτικές αποτελούν κίνητρο για ερευνητική μελέτη, όπως και της παρούσας εργασίας. Στις επόμενες σελίδες παρουσιάζονται και αναλύονται τα στοιχεία που προέκυψαν κατά την διάρκεια της έρευνας.

Από έρευνα που διεξήγαγαν οι Coutteau και Sorgeloos σε σύνολο 43 μονάδων ανά τον κόσμο, που παράγουν μικροφύκη για χρήση στην θαλασσοκαλλιέργεια εντός των εγκαταστάσεων κάθε μονάδας, προέκυψαν τα παρακάτω στοιχεία (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Είδη μικροφυκών που χρησιμοποιούνται σε παγκόσμια κλίμακα σε ιχθυογεννητικούς σταθμούς, όπως προέκυψαν από διεθνή έρευνα (Coutteau and Sorgeloos, 1992).

Είδος μικροφυκών	Συχνότητα χρήσης	Συνολική ημερήσια παραγωγή n	Όγκος m ³
<i>Isochrysis</i> sp., clone T-Iso	31	18	23.8
<i>Chaetoceros gracilis</i>	23	11	14.1
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	16	10	6.0
<i>Tetraselmis suecica</i>	15	10	39.1
<i>Thalassiosira pseudonana</i> , clone 3H	14	9	112.0
<i>Pavlova lutheri</i>	11	7	11.7
<i>Isochrysis galbana</i>	8	5	9.1
<i>Skeletonema costatum</i>	6	3	58.8
<i>Chroomonas salina</i>	5	4	0.76
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	4	2	2.2
<i>Chaetoceros simplex</i>	3	3	1.76
<i>Chaetoceros muelleri</i>	3	2	5.0
<i>Nannochloropsis</i> sp.	3	2	0.20
<i>Cyclotella</i> sp.	2	1	0.36
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	2	1	2.0
<i>Tetraselmis chui</i>	2	0	-
<i>Pavlova salina</i>			

<i>Dicruteria sp.</i>	1	1	3.18
<i>Tetraselmis levis</i>	1	1	4.07
<i>Dunaliella perva</i>	1	0	-
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	1	1	0.012
<i>Chlamydomonas sp.</i>	1	1	0.12
<i>Chlorella sp.</i>	1	1	0.52
	1	1	0.36
TOTAL	43	23	295

Τα είδη έχουν ταξινομηθεί κατά φθίνουσα σειρά συχνότητας χρήσης και χρησιμοποιούνται είτε για διατροφή τροχοζώων είτε για την τεχνική του «πράσινου νερού».

Στην βιβλιογραφία υπάρχει επίσης τεκμηρίωση σχετικά με τις συγκεντρώσεις χλωροφύλλης-α, πρωτεϊνών, υδρογονανθράκων και λιπιδίων στα στελέχη των *T.chuii* και *T.suecica* (Πίνακας 2).

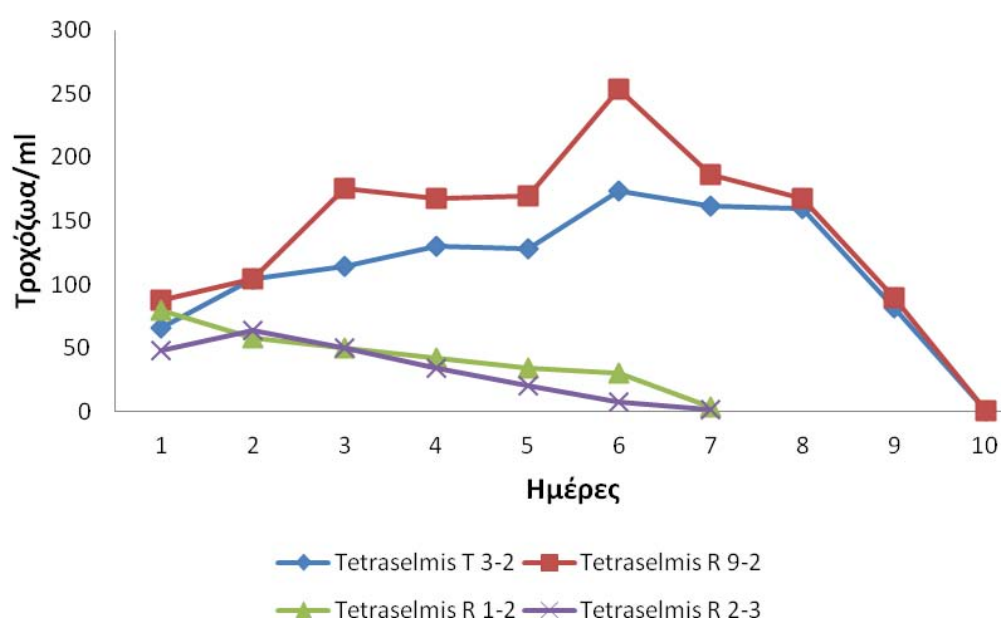
Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις χλωροφύλλης α, πρωτεϊνών, υδατανθράκων και λιπιδίων σε μικροφύκη που χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες (Τροποποίησε ο Brown, 1991).

Είδος μικροφύκου	Ξυρό βάρος (pg.cell ⁻¹)	Χλωροφύλλη α	Πρωτεΐνες	Υδατάνθρακες	Λιπίδια
<i>Tetraselmis chui</i>	269.0	1.42	31	12.1	17
<i>Tetraselmis suecica</i>	168.2	0.97	31	12.0	10
<i>Isochrysis galbana</i>	30.5	0.98	29	12.9	23
<i>Isochrysis aff. Galbana</i> (T-iso)	29.7	0.98	23	6.0	20
<i>Pavlova lutheri</i>	102.3	0.84	29	9.0	12
<i>Pavlova salina</i>	93.1	0.98	26	7.4	12

Από όλα τα παραπάνω στοιχεία της παρούσας έρευνας, καθώς και της βιβλιογραφίας, αποδεικνύεται πως το είδος *Tetraselmis chuii* αποτελεί μια εναλλακτική και εξίσου αποδοτική λύση όσο και το *Tetraselmis suecica*.

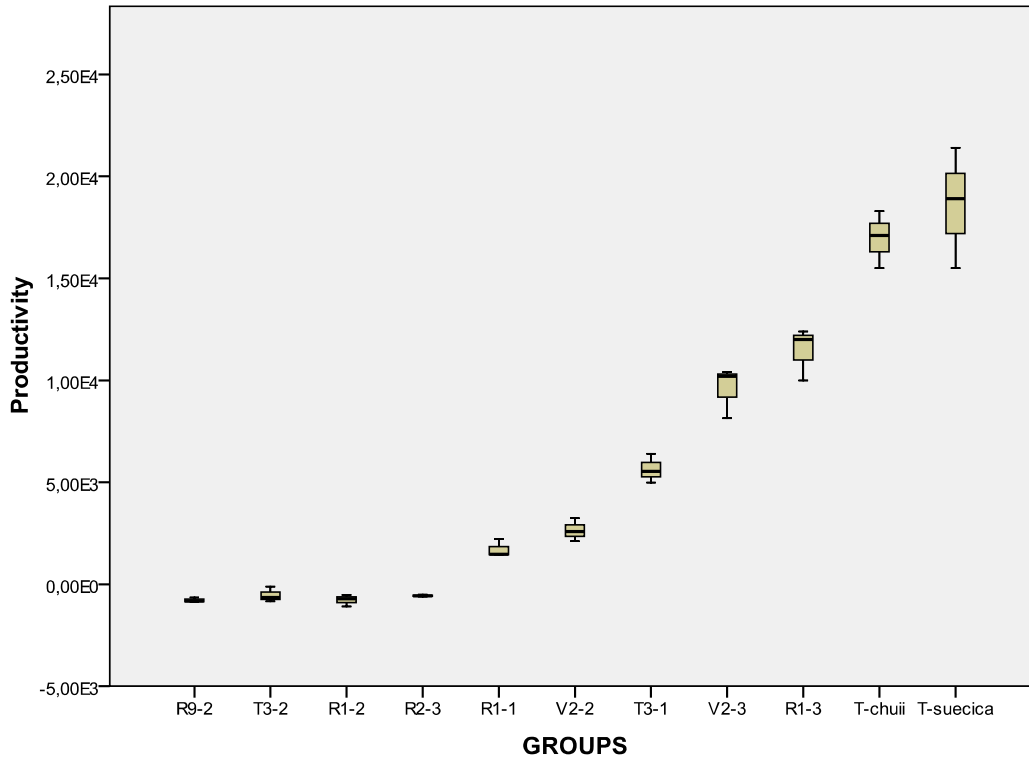
Κατά την διάρκεια των καλλιεργειών σε φιάλες Erlenmeyer (250 ml), παρατηρήθηκε πως τα είδη T 3-2, R 9-2, R 1-2 και R 2-3 (όπως έχουν ονομαστεί κατά την διαδικασία συλλογής από το πεδίο), του γένους *Tetraselmis*, δεν κάλυπταν επαρκώς τις διατροφικές απαιτήσεις των τροχοζώων. Για αυτά τα είδη δεν κρίθηκε αναγκαίος ο πειραματισμός σε εκτροφή με έλλειψη φωτός (και γενικότερα) γιατί οι πληθυσμοί των τροχοζώων παρουσίασαν εκθετική μείωση.

Κατά μέσο όρο, ο πληθυσμός των τροχοζώων εκμηδενίστηκε εντός 9 ημερών ξεκινώντας την καθοδική πορεία της μείωσης, από την 1-2 ημέρα εκτροφής, με την εφαρμογή κάθε ενός από τα παραπάνω είδη μικροφυκών ξεχωριστά, σε διαφορετικούς πληθυσμούς τροχοζώων (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Συνολικό διάγραμμα μείωσης των πληθυσμών τροχοζώων που εκτράφηκαν με τα είδη *Tetraselmis* T 3-2, R 9-2, R 1-2 και R 2-3, σε διάστημα 10 ημερών.

Στο παρακάτω διάγραμμα είναι ευκρινή η παραγωγικότητα των πληθυσμών των τροχοζώων σε σχέση με το μικροφύκος που διατρέφονταν ο κάθε πληθυσμός.



Εικόνα 13. Διάγραμμα παραγωγικότητας πληθυσμών των τροχοζώων, με την χρήση ξεχωριστών καλλιεργειών μικροφυκών ως μέσα διατροφής των τροχοζώων.

Οι πληθυσμοί των τροχοζώων που εκτραφήκαν με στελέχη των μικροφυκών V2-2 και R1-1 παρουσίασαν καθ' όλη την διάρκεια της εκτροφής τους αυξητική τάση, αλλά με χαμηλό ρυθμό αύξησης. Το αποτέλεσμα ήταν να δημιουργηθούν αυξητικά σταθερές καλλιέργειες με πολύ μικρά ποσοστά αύξησης από ημέρα σε ημέρα. Ένα αποτέλεσμα που στην παραγωγική διαδικασία μεγάλης κλίμακας θα είχε μη επιθυμητές συνέπειες.

Τα μικροφύκη V2-3 και T3-1 που χρησιμοποιήθηκαν ως μέσα διατροφής ξεχωριστών πληθυσμών τροχοζώων, είχαν το ίδιο αποτέλεσμα όσον αφορά τα επίπεδα αύξησης. Η αύξηση που σημειώθηκε στους πληθυσμούς ήταν σαφώς καλύτερη από αυτή που επετεύχθη με τα μικροφύκη V2-2, R1-1 και με καλύτερο ρυθμό αύξησης, αλλά δεν ήταν ο επιθυμητός ρυθμός αύξησης.

Πίνακας 3. Τελικός αριθμός παραγόμενων τροχοζώων σε φιάλες όγκου 250 ml.

N = Ο αριθμός των εκτροφών τροχοζώων, με κάθε είδος μικροφύκους *Tetraselmis*.

		Efficiency						
		N	Subset for alpha = 0.05					
GROUPS			1	2	3	4	5	
Duncan	R9-2	3	-7,7667E3					
	R1-2	3	-5,4100E3					
	T3-2	3	-5,3167E3					
	R2-3	3	-4,4433E3					
	R1-1	3		1,7167E4				
	V2-2	3		2,6500E4				
	T3-1	3			5,6433E4			
	V2-3	3				9,5800E4		
	R1-3	3				1,1463E5		
	T-chuii	3						1,6967E5
	T-suecica	3						1,8600E5
	Sig.		,755	,342	1,000	,063		,103

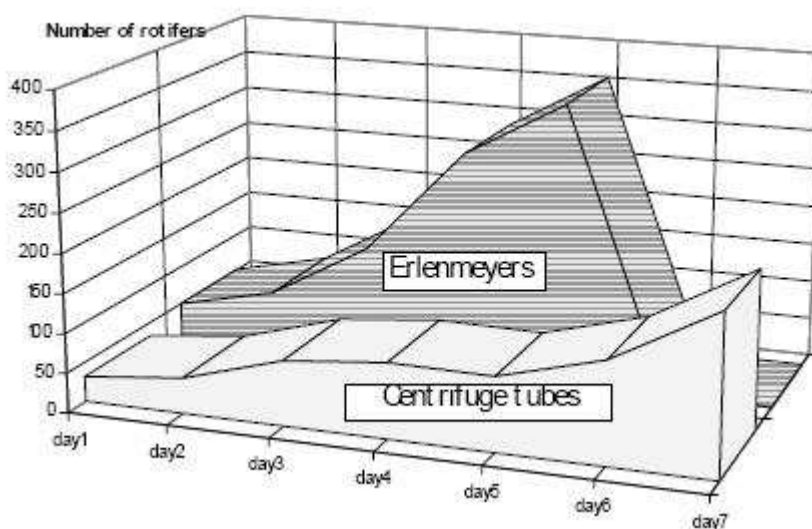
Στον Πίνακα 3. παρουσιάζονται τα στοιχεία που προέκυψαν μετά την ιεράρχηση με Duncan test, σχετικά με την τελική απόδοση των πληθυσμών. Παρατηρείται έπειτα από την παραπάνω ομαδοποίηση πως τα *T. chuii* και *T. suecica* ανήκουν στην ίδια ομάδα με πολύ κοντινές τελικές αποδόσεις καθώς και τα *Tetraselmis* V2-3 και R1-3. Το τελευταίο θα μπορούσε να αποτελούσε μέλος της τελευταίας ομάδας μιας και οι τιμές του είναι κοντά στο *T. chuii*.

Τα δύο είδη μικροφυκών, τα οποία προφανώς πληρούν τις προϋποθέσεις για την επίτευξη επιθυμητής ανάπτυξης πληθυσμού τροχοζώων, είναι το τοπικό στέλεχος R1-3 και το εμπορικό *Tetraselmis chuii*. Το δεύτερο παρότι είναι εμπορεύσιμο είδος η χρήση του στην παγκόσμια θαλασσοκαλλιέργεια είναι ελάχιστη, ειδικά σε σχέση με την εφαρμογή που έχει το είδος *Tetraselmis suecica* που είναι του ίδιου γένους. Οι επιδόσεις της ανάπτυξης στους πληθυσμούς που διατράφηκαν με το *Tetraselmis chuii* ήταν απολύτως ισάξιες με τους πληθυσμούς τροχοζώων που χρησιμοποιήθηκαν στέλεχη του *Tetraselmis suecica*.

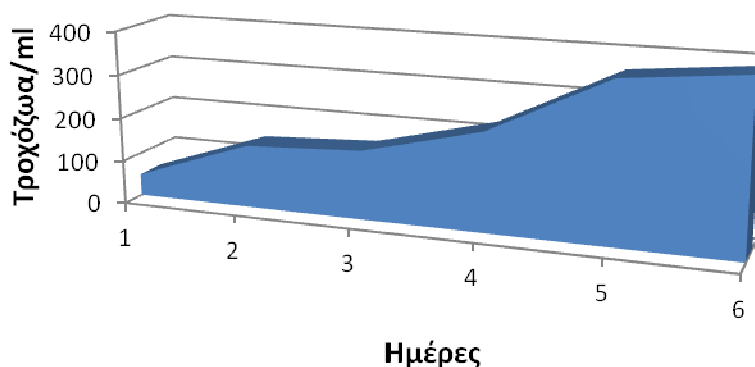
Το μικροφύκος R1-3 αποτελεί μια άριστη λύση στην παραγωγή βιομάζας μικροφυκών για την χρήση του στην παραγωγική διαδικασία σε ιχθυογεννητικούς σταθμούς όπως απεδείχθη στην παρούσα εργασία. Η ανάπτυξη που σημείωσαν οι πληθυσμοί των τροχοζώων που εκτραφήκαν με το συγκεκριμένο μικροφύκος, ήταν αντίστοιχη αυτή των εμπορικών ειδών *T-suecica* και *T-chuii*. Το εντυπωσιακό μάλιστα είναι ότι μέχρι τις 7 πρώτες μέρες ο ρυθμός ανάπτυξης των εκτροφών ήταν πολύ μεγαλύτερος με την χρήση του στελέχους *Tetraselmis* R1-3.

Η παραγωγικότητα του R1-3 ξεπέρασε την παραγωγικότητα, που τεκμηριώνεται βάση της βιβλιογραφίας, του μικροφύκου *Chlorella sp.* Όπως φαίνεται και στις επόμενες δύο εικόνες.

Σε σύγκριση μεταξύ του ρυθμού ανάπτυξης του πληθυσμού των τροχοζώων των οποίων η διατροφή αποτελούνταν από στελέχη του μικροφύκου *Chlorella sp.* (Εικόνα 14), με το μικροφύκος *Tetraselmis R 1-3* (Εικόνα 15), παρατηρείται πως το δεύτερο έδωσε καλύτερη ώθηση στην ανάπτυξη του πληθυσμού, με συνέπεια να ξεπεράσει τις αποδόσεις του πληθυσμού τροχοζώων, που απέδωσε το μικροφύκος *Chlorella sp.*.

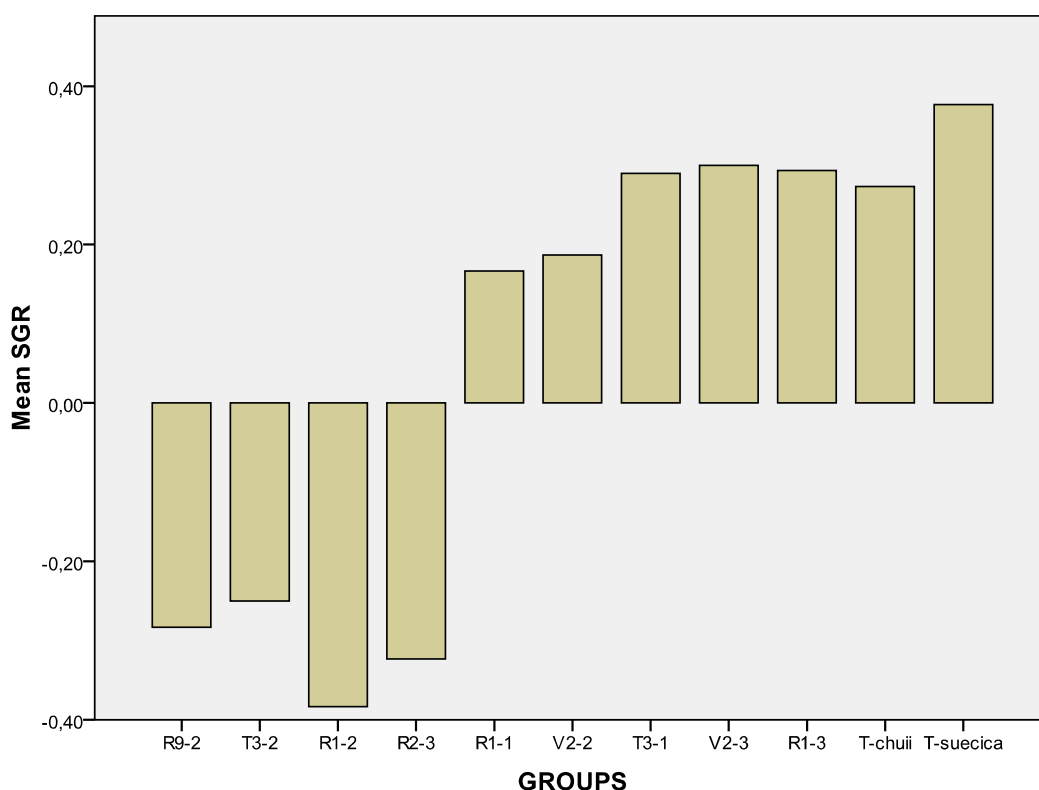


Εικόνα 14. Ρυθμός αύξησης του πληθυσμού των τροχοζώων στους δοκιμαστικούς σωλήνες και μέχρι το ανώτατο όριο σε δοχεία Erlenmeyer (Lavens και Sorgeloos, 1996).



Εικόνα 15. Μέσος όρος αύξησης πληθυσμού των τροχοζώων που εκτρέφονταν με την χρήση του μικροφύκου *Tetraselmis R1-3*, σε δοχεία Erlenmeyer.

Στο παρακάτω ιστόγραμμα διακρίνονται οι τιμές του SGR των πληθυσμών των τροχοζώων σε όλα τα στελέχη μικροφυκών που εκτράφησαν, για διάστημα 10 ημερών.



Εικόνα 16. Οι μέσες τιμές του SGR των καλλιεργειών τροζώων, σε αντιστοιχία κάθε μικροφύκους που χρησιμοποιήθηκε για διατροφή των πληθυσμών.

Με βάση τα παραπάνω στοιχεία που προκύπτουν από την βιβλιογραφία και από την πειραματική καλλιέργεια του μικροφύκους R1-3 του γένους *Tetraselmis* sp., συλλεχθέν από την λιμνοθάλασσα της Ροδιάς, προκύπτει το συμπέρασμα πως το συγκεκριμένο είδος είναι ένα πολλά υποσχόμενο είδος για την χρήση του στις υδατοκαλλιέργειες. Παρότι το SGR του V2-3 είναι καλύτερο από των R1-3 και chuii, η συνολική του απόδοση δεν υπερτερούσε των άλλων δύο. Η απόδοσή του R1-3 δεν διαφέρει της απόδοσης των εμπορικών ειδών (*Chlorella* sp. και *Tetraselmis suecica*) στην κλίμακα των πληθυσμών σε φιάλες Erlenmeyer, γι' αυτό τον λόγο είναι άξιο προσοχής και μελέτης σε μεγαλύτερης κλίμακας καλλιέργειών, ώστε να παραχθεί ουσιαστικό συγκριτικό αποτέλεσμα.

Η έρευνα για είδη μικροφυκών που διαβιούν στο υδάτινο πεδίο της Ελλάδας, είναι απαραίτητη ώστε να αναδειχθεί η θετική δυνατότητα μερικών φυσικών πληθυσμών, ώστε να καταστήσει αυτά τα είδη παραγωγικές και οικονομικές λύσεις στην εγχώρια παραγωγή. Η συνεχής εξέλιξη αυτού του είδους των ερευνών πιθανός να επιφέρει κάποια αποτελέσματα πολύ θετικά και σίγουρα ενθαρρυντικά για την μετέπειτα πορεία των θαλασσοκαλλιέργειών.

8 Βιβλιογραφία

Aka M., Pagano M., Lucien S.J., Arfi R., Bouvy M., Cecchi P., Corbin D., Thomas S., 2000, "Zooplankton variability in 49 shallow tropical reservoirs of Ivory coast (west Africa)", *International Review of Hydrobiology*, 85: 491-504.

Apt K.E., Behrens P.W., 1999, "Commercial developments in microalgal biotechnology", *J. Phycol.* 35, pages: 215-216

Chen F., Johns M.R., 1995, "A strategy for high cell density culture of in heterotrophic microalgae with inhibitory substrates", *Journal of Applied Phycology* 7, pages 43-46

Chini Zitelli G., Rodolfi L., Biondi N., Tredici M.R., 2006, "Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns, *Aquaculture* 261, pages: 932-943

Ciros-Perez J., Gomez A., Serra M. 2001. On the taxonomy of three sympatric sibling species of the *Brachionus plicatilis* (Rotifera) complex from Spain, with the description of *B. ibericus* n. sp. *Journal of Plankton Research*, 23: 1311-1328.

Coutteau P., Sorgeloos P., 1992, "The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey." *J. Shellfish Res.* 11, pages: 467-476

Deneke R. 2000. Review of rotifers and crustaceans in highly acidic environments of pH values ≤ 3 . *Hydrobiologia*, 433: 167-172.

Fontaneto D., Giordani I., Melone G., Serra M. 2007. Disentangling the morphological stasis in two rotifer species of the *Brachionus plicatilis* species complex. *Hydrobiologia*, 583: 297-307.

Garcia-Roger E.M., Carmona M.J., Serra M. 2006. Patterns in rotifer diapausing egg banks: Density and viability. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 336: 198-210.

Garcia-Varela M. & Nadler S.A. 2006. Phylogenetic relationships among Syndermata inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40: 61-72.

Gilbert J.J. 2003a. Environmental and endogenous control of sexuality in a rotifer life cycle: developmental population biology. *Evolution and Development*, 5: 19-24.

Gilbert J.J. & Waage J.K. 1967. Asplanchnca, Asplanchnca-substance and posterolateral spine length variation of the rotifer *Brachionus calyciflorus* in a natural environment. *Ecology*, 48: 1027-1031.

- Gilbert J.J. & Williamson C.E. 1983. Sexual dimorphism in zooplankton (Copepoda, Cladocera and Rotifera). *Annual Review of Ecology and Systematics*, 14: 1-33.
- Heasman M., Diemar J., O'Connor W., Sushames T., Foulkes L., 2000, "Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs - a summary", *Aquacult. Res.* 31, pages: 637-659
- Helm M.M., Laing I., 1981, "Cost effective culture marine unicellular algae", In: F. Vogt (Editor), *Energy Conservation and Use of Renewable Energies in the Bio-industries*. Pergamon Press, Oxford and New York, NY, pages: 247-259
- Hirayama K., Takagi K. and Kimura, H., 1979. "Nutritional effect of eight species of marine phytoplankton on population growth of the rotifer *Brachionus plicatilis*." *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 45: pages 11-16.
- Kitto M.R., Regunathan C., Rodrigues A., 1999, "An industrial photosynthetic system for *Skeletonema costatum* in arid regions", *Journal of Applied Phycology* 11, no 4, pages: 391-397
- Laing I., Child A.R., Janke A., 1990, "Nutritional value of dried algal diets for larvae of Manila clam (*Tapes philippinarum*)", *Journal of Marine Biological Association U.K.* 70, pages: 1-12
- Laing I., Jones E., 1983, "Large-scale turbidostat culture of marine microalgae", *Aquaculture Eng.*, 2, pages: 203-212
- Laing I, Millican P.F., 1986, "Relative growth and growth efficiency of *Ostrea edulis* L. spat fed various algal diets", *Aquaculture* 54, pages: 245-262
- Lavens P., Sorgeloos P., 1996, "Manual on the production and use of live food for aquaculture" *FAO Fisheries Technical Paper*. No. 361. Rome, FAO.
- Mark Welch D. & Meselson M. 2000. Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science*, 288: 1211-1215.
- Mills S. 2006. Investigations of the *Brachionus plicatilis* species complex, with particular reference to southwest Western Australia, PhD Thesis, University of Western Australia, Australia, 336 p.
- Molina Grima E., Belardi E-H., Acien Fernandez F.G., Robles Medina A., Christi Y., 2003, "Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics", *Biotechnol. Adv.* 20, pages: 491-515
- Ortells R., Gomez A., Serra M. 2003. Coexistence of cryptic rotifer species: ecological and genetic characterisation of *Brachionus plicatilis*. *Freshwater Biology*, 48: 2194-2202.
- Pedroni P.M., Lamenti G., Prospero G., Ritorto L., Scolla G., Capuano F., Valdiserri M., 2004, "Enitecnologie R&D project on microalgae biofixation of CO₂: outdoor

comparative test of biomass productivity using flue gas of CO₂ from a NGCC power plant”, Proceedings of Seventh International Conference on Greenhouse Gas Control Technologies, 5-9 September 2004, Vancouver, Canada

Rand G.M., Petrocelli S.R., 1985, “Fundamentals of Aquatic Toxicology”, Hemisphere Publ., New York, NY .

Ricci C. & Melone G. 1998. Dwarf males in monogonont rotifers. *Aquatic Ecology*, 32: 361-365.

Ruttner-Kolisko A. 1974. Plankton Rotifers. Biology and Taxonomy. *Binnengewasser* 26, uppl., Schweizerbarts'sche verlag., Stuttgart, 146p.

Santangelo J.M., Rocha A.M., Bozelli R.L., Carneiro L.S., Esteves F.A., 2007, “Zooplankton responses to sandbar opening in a tropical eutrophic coastal lagoon”, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 71: 657-668.

Segers H. 2002. The nomenclature of the Rotifera: annotated checklist of valid family-and genus-group names. *Journal of Natural History*, 36: 631-640.

Sharma S.P. & Saksena D.N. 1984. Form variations in the rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas from a perennial impoundment in India. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 69: 747-752.

Snell T.W., 1978, “Fecundity, developmental time and population growth rate”, *Oecologia* 32, pages: 119-125

Snell T.W., Bieberich C.J. and Fuerst R., 1983, “The effects of green and blue-green algal diets on the reproductive rate of the rotifer *Brachionus plicatilis*.” *Aquaculture*, 31: pages 21-30.

Snell T.W., Kubanek J., Carter W., Payne A.B., Kim J., Hicks M.K., Stelzer C.P. 2006. A protein signal triggers sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Marine Biology*, 149: 763-773.

Sorensen M.V. & Giribet G. 2006. A modern approach to rotiferan phylogeny: Combining morphological and molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40: 585-608.

Suatoni E., Vicario S., Rice S., Snell T., Caccone A. 2006. An analysis of species boundaries and biogeographic patterns in a cryptic species complex: The rotifer-*Brachionus plicatilis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41: 86-98.

Tadashi M, Haruko T, Hideki M, Hiroko Y, 2005, “Marine Microalge”, *Adv. Biochem Engin/Biotechnol.* 96, pages: 165-188

Tredici M.R., 2004, "Mass production of microalgae: photobioreactors" In: Richmond A. (Editor), Handbook of Microalgal; Cultures, Biotechnology and Applied Phycology, Blackwell, Oxford, pages: 178-214

Tzovenis I., Cladas Y., 2009, "Phytoplankton production in Greek Mariculture", European Aquaculture Society, Special Publication No. 38, Oostende, Belgium, pages: 448-450

Valenzuela-Epsinoza E., Millan-Nunez R., Nunez-Cebrero F., 1999, "Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis aff. galbana* (Clone T-ISO) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium", Aquaculture Engineering 20, pages: 135-147

Wen Y.W., Chen F., 2003, "Heterotrophic production of eicosapentanoic acid by microalgae", Biotechn. Advances 21, pages: 273-294

Wallace R.L., Snell T.W., Ricci C., Nogrady T. 2006. Volume 1: Biology, ecology and systematics, 2nd edition, In: H. Segers (ed.) Rotifera, Backhuys publishers, Leiden, The Netherlands, 299 p.

Wallace R.L. 2002. Rotifers: Exquisite metazoans. Integrative and Comparative Biology, 42: 660-667.

Αθανασάκη Κ., 2004, «Μελέτη της τοξικής συμπεριφοράς του diuron και του μεταβολίτη του 3,4-dichloroaniline στους φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς *Dunaliella tertiolecta* και *Navicula forcipata*», Πτυχιακή εργασία, σελ. 53-55, Πανεπιστήμιο Αιγαίου – Τμήμα Περιβάλλοντος

Καρύδης Μ., 1989, α' τόμος, «Κυτταρικοί Μηχανισμοί», Μηχανισμοί.

Παντελιδάκης Κ. 2005. «Η δυναμική του φυτοπλαγκτού και του ζωοπλαγκτού ως βάση για την εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης της λίμνης Κορώνειας», Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, 90 σ.

Παπακώστας Σ., 2008, "Καθορισμός της γενετικής σύστασης πληθυσμών ειδών του γένους *Brachionus* με χρήση μοριακών δεικτών", Διδακτορική διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης - Τμήμα Βιολογίας

Συμεωνίδης Χ., 2010, «Διερεύνηση μεθόδων εντατικής καλλιέργειας λεπιδοβραγχίων (δίθυρα μαλάκια)», σελ. 27-30, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.