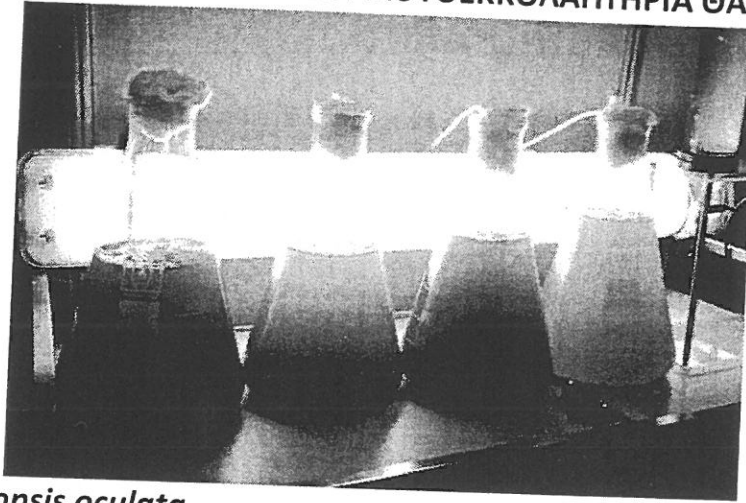


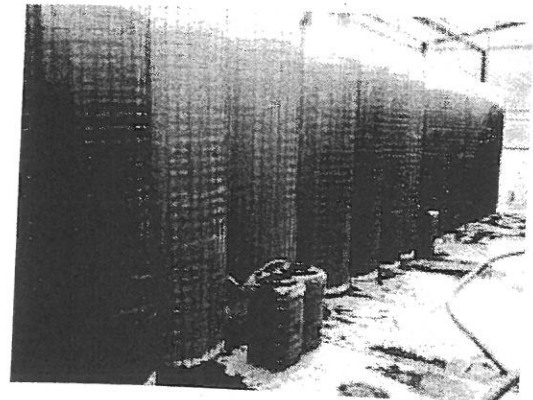
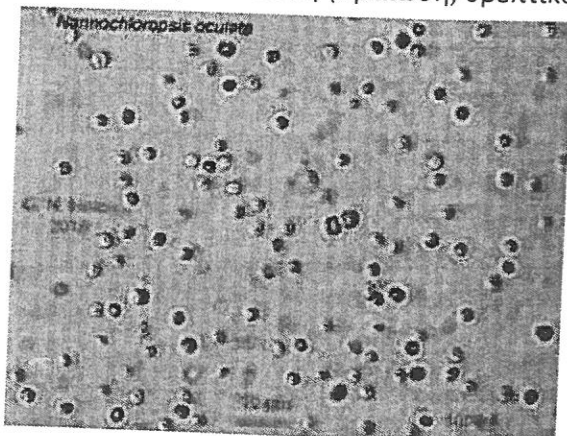
## ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΦΥΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΑ ΩΣ ΤΡΟΦΗ ΖΩΝΤΑΝΩΝ ΘΗΡΑΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΛΑΡΒΩΝ ΣΤΑ ΙΧΘΥΟΕΚΚΟΛΑΠΗΤΗΡΙΑ ΘΑΛΑΣΣΗΣ



### *Nannochloropsis oculata*

Συστηματική κατάταξη:  
 Υπερβασίλειο: Ευκαρυωτικά  
 Βασίλειο: Πρώτιστα  
 Φύλο: Chlorophyta  
 Ομοταξία: Chrysophyceae  
 Τάξη: Eustigmatales  
 Οικογένεια: Monodopsidaceae  
 Γένος: *Nannochloropsis*  
 Είδος: *Nannochloropsis oculata*  
 Μέγεθος: 2-4 μm, πράσινου χρώματος, χωρίς μαστίγια.

Χρησιμοποιείται ευρέως στις υδατοκαλλιέργειες λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα – PUFA. Μη κινητικό είδος με κύτταρα ελεύθερα, σφαιρικού σχήματος. Παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε μεγάλο εύρος αλατοτήτων και θερμοκρασιών και αυξάνεται γρήγορα σε καλλιέργειες με επαρκή θρεπτικά. Σε συνθήκες με επαρκή φωτισμό (> 5000 lux) φθάνει πυκνότητες και άνω των 80.000.000 κυτ./ml. Μοιάζει πολύ τόσο μορφολογικά όσο και στα χαρακτηριστικά της καλλιέργειας με την *Chlorella*. Μετά την εκρηκτική αύξηση του πληθυσμού του η οποία συμβαίνει και κορυφώνεται σε 3-4 ημέρες, η καλλιέργεια αν αφεθεί χωρίς ανανέωση (αραίωση, θρεπτικά), καταρρέει πολύ γρήγορα.



### *Tetraselmis suecica*

Συστηματική κατάταξη:

Υπερβασιλείο: Ευκαρυωτικά

Βασίλειο: Πρώτιστα

Φύλο: Chlorophyta

Ομοταξία: Chlorophyceae

Τάξη: Volvocales

Οικογένεια: Chlamydomonadaceae

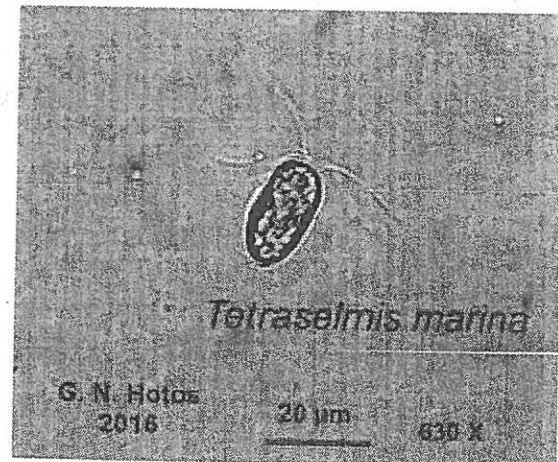
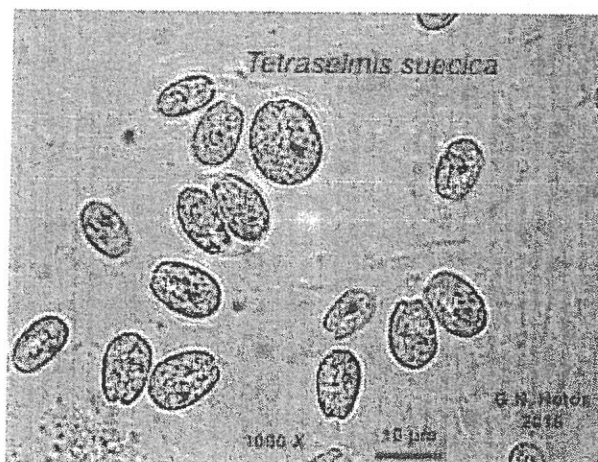
Γένος: *Tetraselmis*

Είδος: *Tetraselmis suecica*

Μονοκύτταρο πράσινο θαλάσσιο είδος φύκους, χωρίς κυτταρικό τοίχωμα, με 4 ισομεγέθη μαστίγια τα οποία του προσδίδουν γρήγορη κίνηση. Μέγεθος 7 – 10 μm με κύτταρα ωοειδο-κυλινδρικά με χαρακτηριστικό βαθούλωμα στο εμπρόσθιο μέρος όπου εκφύονται τα μαστίγια. Η καλλιέργειά του είναι εύκολη και μπορεί να φτάσει σε πυκνότητες 1.500.000 κύτ./ml ή και μεγαλύτερες μέσα σε 4 ημέρες σε βέλτιστη αλατότητα 25 ppt, pH 7 - 8, θερμοκρασία 18 – 22 °C και φωτισμό 5000 – 10.000 lux.

Είναι εξαιρετική τροφή για τα τροχόζωα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια και βιταμίνη C. Επίσης αποτελεί εξαιρετική τροφή για τις προνύμφες και τα ενήλικα άτομα των μαλακίων καθώς και για τα καρκινοειδή (*Artemia*, κωπήποδα, γαρίδες) και τα κοράλλια.

Σε κακές συνθήκες καλλιέργειας (έλλειψη θρεπτικών, υπερβολική αλατότητα κ.ά.) τα κύτταρά του χάνοντας τα μαστίγια περιβάλλονται από μια διάφανη κύστη και παραμένουν σε διάπαυση για πολύ καιρό μέχρι οι συνθήκες να καλυτερέψουν. Το στάδιο αυτό λέγεται παλμελλοειδές (palmella stage) και ενίοτε μέσα στην κύστη αυτή παρατηρούνται κυτταρικές διαιρέσεις. Το συγγενές του είδος *Tetraselmis marina* είναι πολύ μεγαλύτερου μεγέθους (~23 μm), απαντάται σε πολύ αλμυρά νερά (80 – 150 ppt) και παρουσιάζει έντονη παλμελλοποίηση.

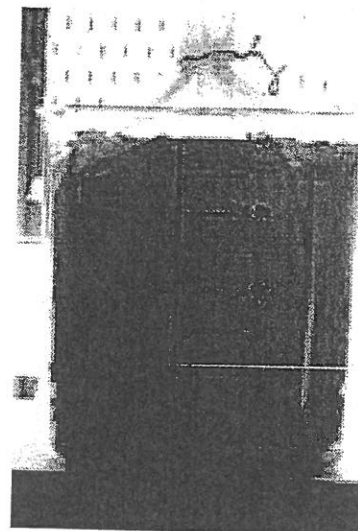
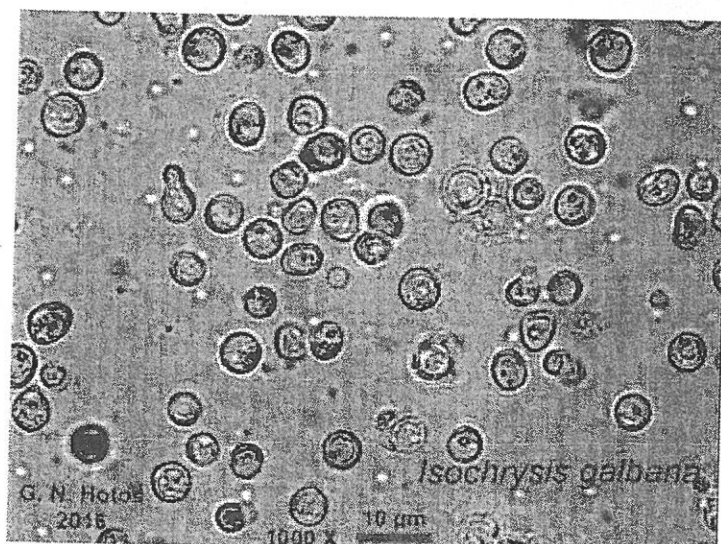
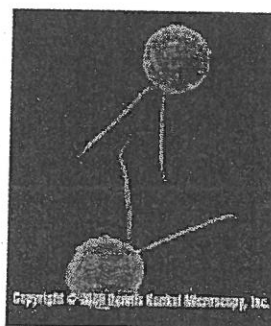


### *Isochrysis galbana*

Μέγεθος: κυττάρου, 5-7 μm. Ελεύθερα κύτταρα (δεν σχηματίζουν αποικίες), με δύο ισομεγέθη μαστίγια. Πολύ συχνά και ιδιαίτερα όταν τα θρεπτικά στοιχεία στο νερό εξαντλούνται, τα κύτταρα παρουσιάζονται σφαιρικά. Αυτό το χρυσοκαφετί φύκος χρησιμοποιείται ευρέως στις υδατοκαλλιέργειες λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα – PUFA και ιδιαίτερα σε εικοσιδυοεξαενοϊκό οξύ 22:6ω-3 (DHA). Τα πολυακόρεστα και ιδιαίτερα το DHA είναι απαραίτητα για την επιβίωση, την αντοχή στο στρες και την καλή ανάπτυξη του εγκεφάλου και των ματιών των εκτρεφόμενων νυμφών των ψαριών στα ιχθυοεκκολαπτήρια. Οι νύμφες τρέφονται με τροχόζωα και τα τροχόζωα τρεφόμενα με *Isochrysis* εμπλουτίζονται με DHA.

Συστηματική κατάταξη:

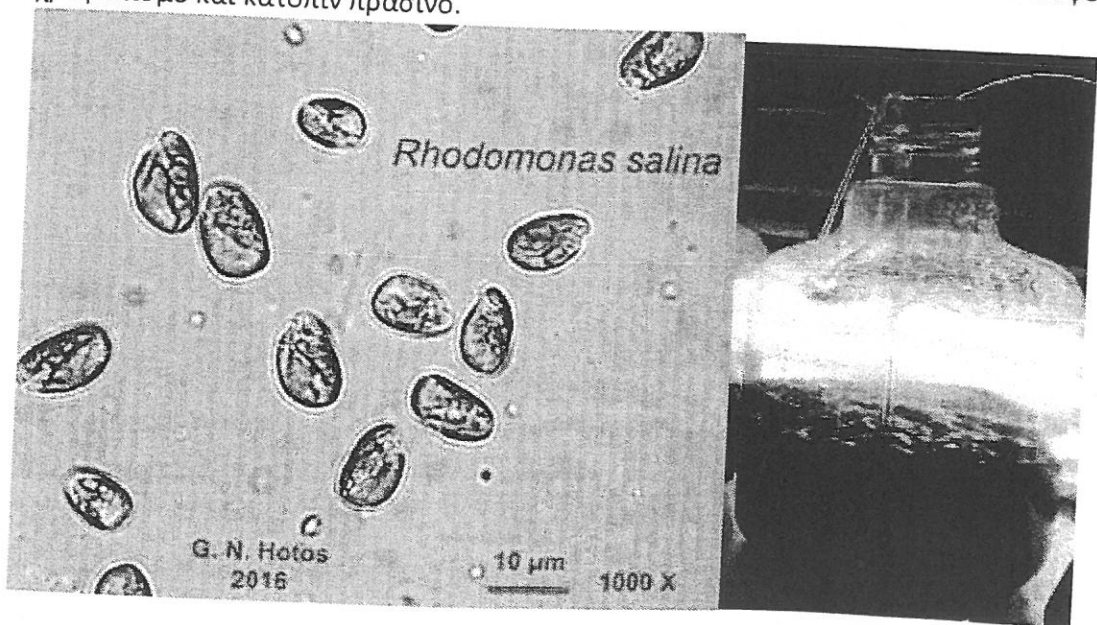
Υπερβασιλείο: Ευκαρυωτικά  
 Βασίλειο: Πρώτιστα  
 Φύλο: Chrysophyta  
 Ομοταξία: Haptophyceae  
 Τάξη: Isochrysidales  
 Οικογένεια: Isochrysidaceae  
 Γένος: *Isochrysis*  
 Είδος: *Isochrysis galbana*



### *Rhodomonas salina*

Συστηματική κατάταξη:  
 Υπερβασιλείο: Ευκαρυωτικά  
 Βασιλείο: Πρώτιστα  
 Φύλο: Cryptophyta  
 Ομοταξία: Cryptophyceae  
 Τάξη: Pyrenomonadales  
 Οικογένεια: Pyrenomonadaceae  
 Γένος: *Rhodomonas*  
 Είδος: *Rhodomonas salina*

Ελεύθερα ωοειδή κύτταρα μεγέθους 5 – 13 μm και πάχους 6 – 8 μm, πεπλατυσμένα με μία πρόσθια αύλακα με δύο ελαφρώς άνισα μαστίγια. Τα μαστίγια του προσφέρουν κινητική ικανότητα. Το χρώμα τους ποικίλλει από σκούρο κόκκινο έως κοκκινο-καφέ. Υπάρχουν εξειδικευμένα κενοτόπια τα οποία αδειάζοντας απότομα το περιεχόμενό τους, αν το κύτταρο διαταραχθεί από μηχανικό ή χημικό στρες, προωθούν το κύτταρο μακριά από τη διαταραχή. Άλλα είδη του γένους *Rhodomonas* απαντώνται και σε γλυκά νερά. Το *Rhodomonas salina* επιβιώνει σε υφάλμυρα και αλμυρά νερά με βέλτιστο αλατότητα περί τα 20 ppt, θερμοκρασίας 20 °C, pH 8 – 8,2 και φωτισμό συνεχή, έντασης 1000-7500 lux (άλλες μονάδες και σχέσεις μετατροπής:  $1 \text{Wm}^{-2} = 5 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1} = 250 \text{lux}$ ). Για την επιτυχή του μαζική καλλιέργεια η οποία μπορεί να φτάσει και τα 1.500.000 κύτ./ml σε 4 ημέρες (ξεκινώντας με 50.000 κύτ./ml), πιο κρίσιμοι παράγοντες είναι η θερμοκρασία και η αλατότητα οι οποίοι πρέπει να είναι βέλτιστοι (20 °C, 20 ppt) ενώ το φως μπορεί να κυμαίνεται σε μεγάλο εύρος έντασης. Εξυπακούεται ότι θα υπάρχει επάρκεια θρεπτικών. Οι καλλιέργειες σε φάση εκθετικής αύξησης έχουν λαμπερό κόκκινο χρώμα ενώ η φθίνουσα καλλιέργεια αποκτά σκούρο κοκκινο-καφέ χρωματισμό και κατόπιν πράσινο.



***Tetraselmis suecica***

Συστηματική κατάταξη:

Υπερβασιλείο: Ευκαρυωτικά

Βασίλειο: Πρώτιστα

Φύλο: Chlorophyta

Ομοταξία: Chlorophyceae

Τάξη: Volvocales

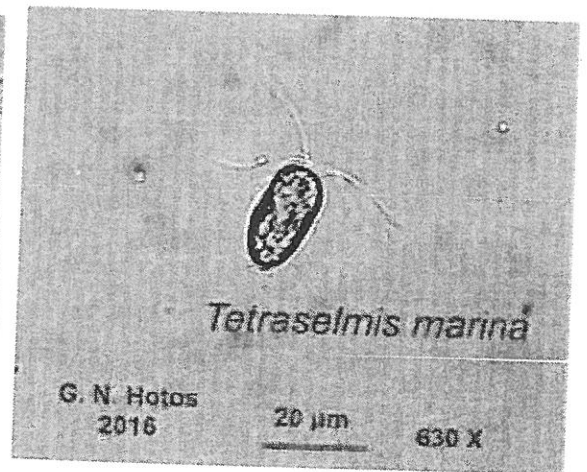
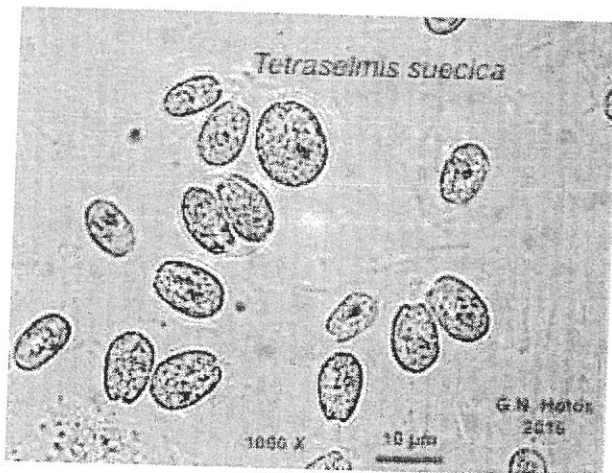
Οικογένεια: Chlamydomonadaceae

Γένος: *Tetraselmis*Είδος: *Tetraselmis suecica*

Μονοκύτταρο πράσινο θαλάσσιο είδος φύκους, χωρίς κυτταρικό τοίχωμα, με 4 ισομεγέθη μαστίγια τα οποία του προσδίδουν γρήγορη κίνηση. Μέγεθος 7 – 10 μm με κύτταρα ωοειδο-κυλινδρικά με χαρακτηριστικό βαθούλωμα στο εμπρόσθιο μέρος όπου εκφύονται τα μαστίγια. Η καλλιέργειά του είναι εύκολη και μπορεί να φτάσει σε πυκνότητες 1.500.000 κύτ./ml ή και μεγαλύτερες μέσα σε 4 ημέρες σε βέλτιστη αλατότητα 25 ppt, pH 7 - 8, θερμοκρασία 18 – 22 °C και φωτισμό 5000 – 10.000 lux.

Είναι εξαιρετική τροφή για τα τροχόζωα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια και βιταμίνη C. Επίσης αποτελεί εξαιρετική τροφή για τις προνύμφες και τα ενήλικα άτομα των μαλακίων καθώς και για τα καρκινοειδή (*Artemia*, κωπήποδα, γαρίδες) και τα κοράλλια.

Σε κακές συνθήκες καλλιέργειας (έλλειψη θρεπτικών, υπερβολική αλατότητα κ.ά.) τα κύτταρά του χάνοντας τα μαστίγια περιβάλλονται από μια διάφανη κύστη και παραμένουν σε διάπαυση για πολύ καιρό μέχρι οι συνθήκες να καλυτερέψουν. Το στάδιο αυτό λέγεται παλμελλοειδές (palmella stage) και ενίοτε μέσα στην κύστη αυτή παρατηρούνται κυτταρικές διαιρέσεις. Το συγγενές του είδος *Tetraselmis marina* είναι πολύ μεγαλύτερου μεγέθους (~23 μm), απαντάται σε πολύ αλμυρά νερά (80 – 150 ppt) και παρουσιάζει έντονη παλμελλοποίηση.



## *Dunaliella salina*

Συστηματική κατάταξη:

Υπερβασιλείο: Ευκαρυωτικά

Βασιλείο: Πρώτιστα

Φύλο: Chlorophyta

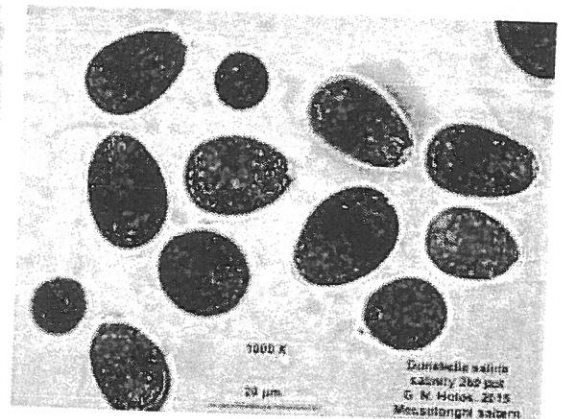
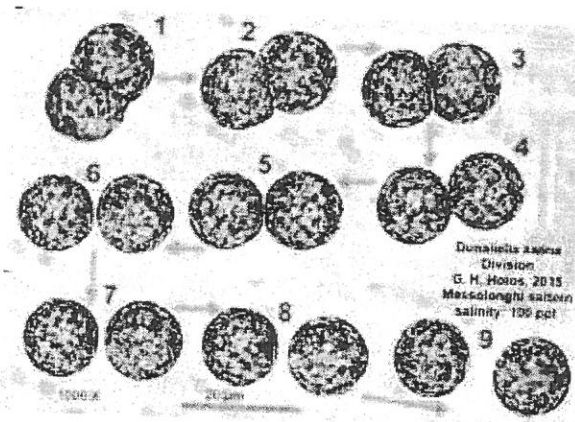
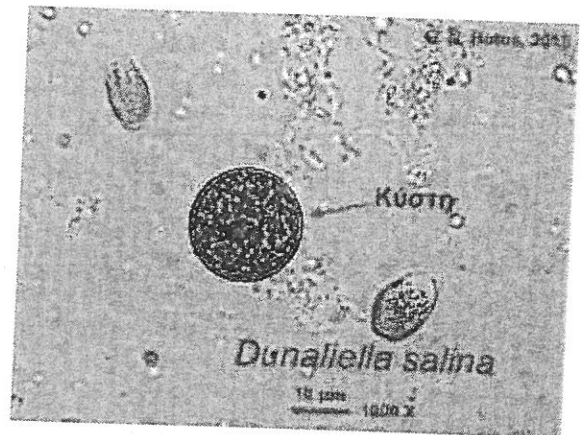
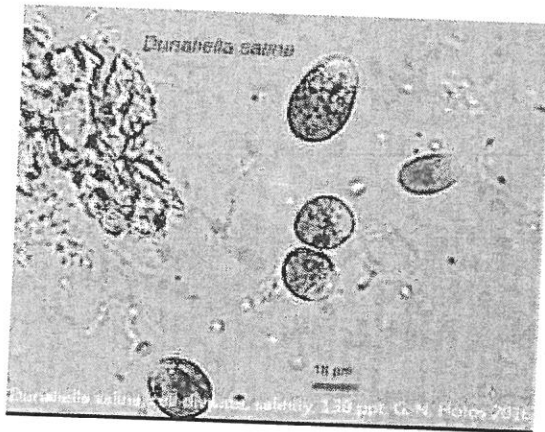
Ομοταξία: Chlorophyceae

Τάξη: Chlamydomonadales

Οικογένεια: Dunaliellaceae

Γένος: *Dunaliella*

Είδος: *Dunaliella salina*



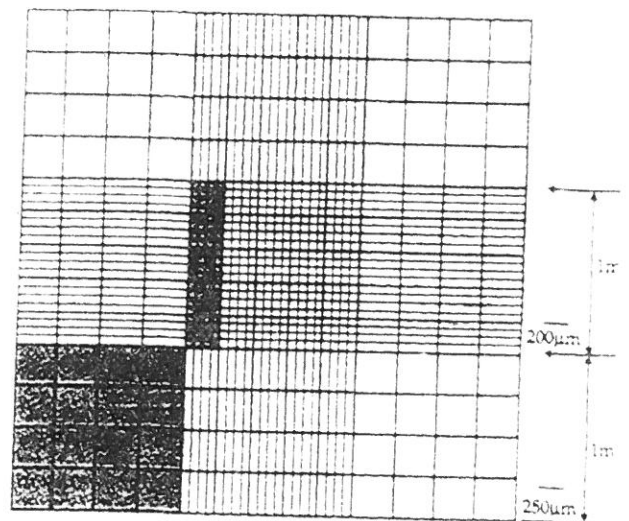
Στις παραπάνω εικόνες (Φωτογρ.: Γ. Χώτος): *Dunaliella salina* σε διάφορα στάδια και μορφές. Επάνω αριστερά: πράσινα κύτταρα με ποικιλία μεγεθών και σε κυτταρική διαίρεση. Επάνω δεξιά: πράσινα κύτταρα και μία κύστη έχοντας αποκτήσει πορτοκαλί απόχρωση λόγω συσσώρευσης καροτινοειδών χρωστικών. Κάτω αριστερά: κυτταρική διαίρεση σε στάδια (κολάζ). Κάτω δεξιά: *D. salina* σε πολύ υψηλή αλατότητα με κύτταρα γεμάτα με β-καροτίνη.

Είναι μονοκύτταρο είδος με δύο ισομεγέθη μεγάλα μαστίγια. Δεν διαθέτει κυτταρικό τοίχωμα. Το γένος *Dunaliella* περιλαμβάνει 29 είδη και επιπροσθέτως πολλές ποικιλίες (τοπικές ή μη, υπό διερεύνηση) και πολλές μορφές κυττάρων (υπό διφορούμενο πολλές φορές καθεστώς ταυτοποίησης). Το είδος *Dunaliella salina* όπως και πολλά από τα συγγενικά του, είναι θαλάσσιο και ειδικά αυτό αντέχει σε εξαιρετικά μεγάλες αλατότητες μέχρι επιπέδου άλμης ~ 310 ppt, διαθέτοντας μια

Γεώργιος Ν. Χώτος, καθηγητής – Καλλιέργειες Πλαγκτού, 2016

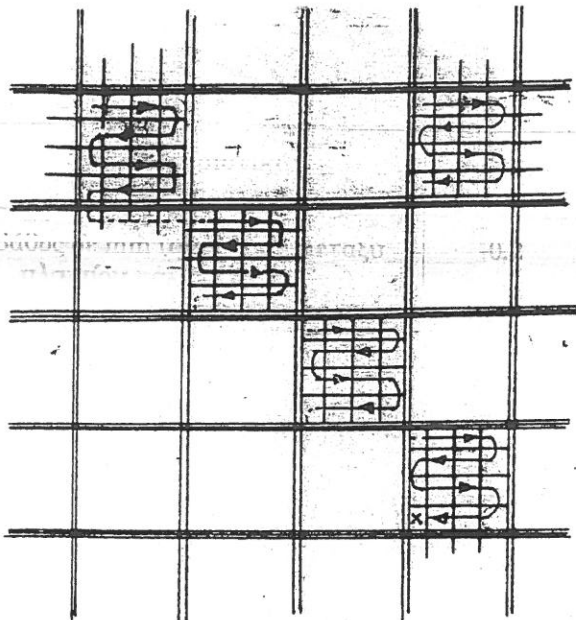
## Neubauer, πρόχειρο μέτρημα

- Εάν στο κεντρικό τετράγωνο ο αριθμός των κυττάρων είναι  $n < 150$ , μετράμε και τα 9 μεγάλα τετράγωνα.
- Εάν στο κεντρικό τετράγωνο  $n = 150$  έως 250, μετράμε τρία διαγώνια τετράγωνα.
- Εάν στο κεντρικό τετράγωνο  $n = 250$  έως 300 δεν μετράμε άλλο.
- Εάν στο κεντρικό τετράγωνο  $n > 300$  αραιώνουμε\* το δείγμα.



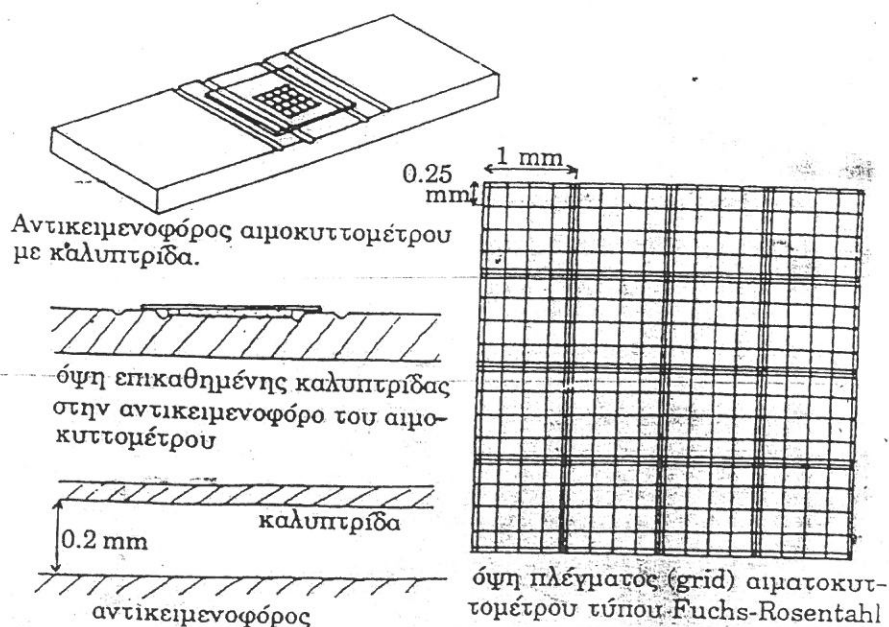
Η μέση τιμή του  $\underline{n}$  πολλαπλασιάζεται επί 10.000 για να έχουμε τη συγκέντρωση της καλλιέργειας σε κύτταρα/ml

« **Fuchs - Rosentahl**. Το πλαίσιο ( *grid* ) του αιμοκυττομέτρου *Fuchs - Rosentahl* διαιρείται σε 16 μικρότερα τετράγωνα το καθένα από τα οποία διαιρείται σε 16 ελάχιστα τετραγωνάκια . Τα 16 " μικρότερα " τετράγωνα είναι 1mm σε μήκος το καθένα . Το όλο πλαίσιο είναι εμβαδού 16 mm<sup>2</sup> . Επειδή το βάθος του *Fuchs - Rosentahl* είναι 0.2 mm ο όγκος του δείγματος που καλύπτει το όλο πλαίσιο (και τα 16 τετράγωνα) είναι 0.0032 ml .



Χαρακτηριστικά	Fuchs - Rosentahl
Βάθος σε mm (απόσταση μεταξύ πλαισίου και καλυπτρίδας)	0.2
Εμβαδό του πλέον μικρού τετραγώνου (σε mm <sup>2</sup> )	0.0625
Ελαχίστη δυνατότητα καταμέτρησης (σε κύτταρα/ml)	10 <sup>3</sup>

Σχήμα 4.4. Πορεία καταμέτρησης στο αιμοκυττόμετρο *Fuchs-Rosentahl*.





## 2 Εκτίμηση βιομάζας σε καλλιέργεια για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς

Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας και αντιστοίχισή της με ξηρό βάρος. Ενδεικτικό πρωτόκολλο

Στάδια	Βήματα	Παρατηρήσεις
1	Στέγνωμα φίλτρων 24 ωρο στέγνωμα φίλτρων σε φούρνο στους 60° C. Αποθέρμανσή του μέσα στο φούρνο ολονυχτίς.	Για να μην ζυγίσεις την υγρασία που θα μαζέψει στη διαδρομή του έως την ζυγαριά. Το στάδιο αυτό δεν ισχύει αν πρόκειται για φίλτρο κλεισμένο σε ειδική ατομική συσκευασία
2	Ζύγισμα απόβαρων φίλτρων Μεταφορά φίλτρων με λαβίδα σε ατομικά τρυβλία με κατάλληλη διάμετρο	Προσοχή να μην σκιστούν ή φθαρούν στις άκρες. Δεν ακουμπάμε με τα δάκτυλα γιατί έχουν λίπος και αφήνουν δαχτυλιές. Δεν γράφουμε τίποτε πάνω στο φίλτρο αλλά στο πλαστικό τρυβλίο για να μην το τραυματίσουμε και γιατί έτσι κι αλλιώς το βάρος από το μελάνι ή τον γραφίτη από το μολύβι αλλοιώνονται κατά την ξήρανση
3	Εκτίμηση ξηρού βάρους ώριμης καλλιέργειας Μέγεθος δείγματος 20 - 100 ml (3-4 δείγματα από την ίδια καλλιέργεια κατά την χρονική στιγμή t)	Το μέγεθος εξαρτάται από την πυκνότητα της καλλιέργειας. Μεγάλη ποσότητα να έχει δυσκολία στο φιλτράρισμα, ενώ η μικρή έχει υψηλή πιθανότητα λάθους από την παραμονή αλάτων. Η ποσότητα του δείγματος διοχετεύεται αργά προσέχοντας να μην καλυφθεί πλήρως το φίλτρο διότι όταν πια καλυφθεί η ταχύτητα της διήθησης θα γίνει απελπιστικά αργή.
	Ξέπλυμα δείγματος με μυρμηγκικό αμμώνιο 4%. Εναλλακτικά με απιονισμένο νερό (30 ml) πάνω στο φίλτρο.	Απομάκρυνση αλάτων (το κάνουμε για τις καλλιέργειες φυτοπλαγκτού)
	Απομάκρυνση ηθμού από την συσκευή διήθησης και τοποθέτησή του στο τρυβλίο	Διακόπτουμε την λειτουργία της αντλίας κενού και με μία βελόνη προσπαθούμε να ανασηκώσουμε το φίλτρο ώστε να αναιρέσουμε ήπια το κενό και με την λαβίδα να πάρουμε το φίλτρο χωρίς να σκιστεί ή να τραυματιστεί. Σε περίπτωση που αποκοπεί κομμάτι το προσθέτουμε στην επιφάνεια του φίλτρου για να μην επηρεαστεί από την απώλεια βάρους η μέτρηση
	Ξήρανση 24 ωρών σε 60 °C ολονυχτίς	Κρύωμα στον φούρνο για να μην πάρουν υγρασία, ή μεταφορά σε ξηραντήριο
	Ζύγισμα	Ανασηκώνουμε με προσοχή το κάλυμμα του τρυβλίου έχοντας σε ετοιμότητα την λαβίδα ώστε

Στοιχείο	Μορφή διαθέσιμη για τα φύκη	% συμμετοχή του στην ξηρή κυτταρική μάζα	Κύρια λειτουργία
<b>ΚΥΡΙΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ (MACRONUTRIENTS)</b>			
Ανθρακας	CO <sub>2</sub>	45 %	Κύριο στοιχείο των οργανικών ενώσεων του φύκου (υδατάνθρακες, λίπη κ.ά.)
Οξυγόνο	O <sub>2</sub>	45 %	Κύριο στοιχείο των οργανικών ενώσεων του φύκου
Υδρογόνο	H <sub>2</sub> O	6 %	Κύριο στοιχείο των οργανικών ενώσεων του φύκου
Αζωτο	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1,5 %	Συστατικό των νουκλεϊκών οξέων, πρωτεϊνών, ορμονών, χλωροφύλλης, σπινθηρίων
Κάλιο	K <sup>+</sup>	1,0 %	Συμπαράγοντας (cofactor) στην πρωτεϊνική σύνθεση, φωσφορύθμιση
Ασβέστιο	Ca <sup>++</sup>	0,5 %	Σχηματισμός και σταθερότητα κυτταρικού τοιχώματος, διατήρηση μειβρωσοειδών δομών και διαπερατότητας των, ενεργούνται ένζυμα, ρυθμιστής κυτταρικών αντιδράσεων σε ερεθίσματα
Μαγνήσιο	Mg <sup>++</sup>	0,2 %	Συστατικό χλωροφύλλης, ενεργοποιητής πολλών ενζύμων
Φόσφορος	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,2 %	Συστατικό νουκλεϊκών οξέων, φωσφολιπιδίων, ATP, σπινθηρίων
Θείο	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,1 %	Συστατικό πρωτεϊνών, σπινθηρίων
<b>ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ (MICRONUTRIENTS)</b>			
Χλώριο	Cl <sup>-</sup>	0,01 %	Απαιτείται για τη φωτοσυνθετική διάσπαση του νερού, υδατικό ισοζύγιο
Σίδηρος	Fe <sup>+++</sup> , Fe <sup>++</sup>	0,01 %	Συστατικό κυτοχρωμάτων, ενεργοποιεί ένζυμα
Μαγγάνιο	Mn <sup>++</sup>	0,005 %	Ενεργό στην αμινοξική σύνθεση, ενεργοποιεί ένζυμα αιματούμενα στην φωτοσυνθετική διάσπαση του νερού
Βόριο	H <sub>2</sub> BO <sup>3-</sup>	0,002 %	Συμπαράγοντας στη σύνθεση χλωροφύλλης, πιθανώς εμπλέκεται στη μεταφορά υδατανθράκων και στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων, λειτουργία του κυτταρικού τοιχώματος
Ψευδάργυρος	Zn <sup>++</sup>	0,002 %	Ανάση στο σχηματισμό της χλωροφύλλης, ενεργοποιεί ένζυμα
Χαλκός	Cu <sup>+</sup> , Cu <sup>++</sup>	0,001 %	Στοιχείο οξειδοαναγωγικών και βιοσυνθετικών της λυγγίνης (στα φυτά) ενζύμων
Νικέλιο	Ni <sup>++</sup>	0,001 %	Συμπαράγοντας ενζύμων στο μεταβολισμό του αζώτου
Μολυβδαίνιο	MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,0001 %	Συμπαράγοντας στην αναγωγή των νιτρικών, απαιτείται στη συμβιωτική λειτουργία με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια

### 2.6.1 Μέσο Conway(Walne)

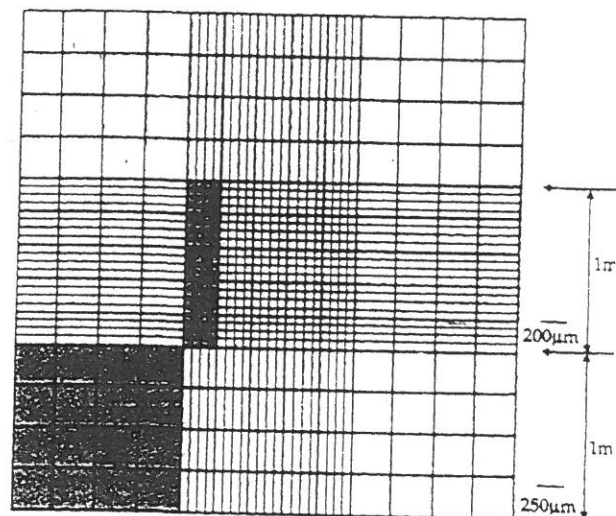
Είναι κατάλληλο για το σύνολο των ειδών των καλλιεργούμενων φυκών, ιδιαίτερα για τα είδη *Platymonas (Tetraselmis) suecica*, *Isochrysis galbana*, *Rhodomonas baltica* κ.λ.π.

Συστατικά	Ποσότητα	Δόση ανά λίτρο φυτοπλαγκτικής καλλιέργειας
<b>A. ΚΥΡΙΟ ΔΙΑΛΥΜΑ (παρασκευή 1l)</b>		
Na <sub>2</sub> EDTA	45,00 g	1ml
NaNO <sub>3</sub>	116,00 g	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	33,60 g	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20,00 g	
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,36 g	
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,30g	
διάλυμα μετάλλων (B)	1,0 ml	
<b>B. ΔΙΑΛΥΜΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ (παρασκευή 100 ml)</b>		
ZnCl <sub>2</sub>	2,1g	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	2g	
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2g	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo7O <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,9g	
HCl (ώς την επίτευξη διαυγούς διαλύματος)	0,3ml	
<b>Γ. ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ (παρασκευή 100 ml)</b>		
Biotine (Βιταμίνη Η)	100mg	0,1ml
Cyanocobalamine (βιταμίνη B <sub>12</sub> )	10mg	
Thiamine HCl (βιταμίνη B1)	200mg	
<b>ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ για την καλλιέργεια διατόμων (παρασκευή 100 ml)</b>		
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	4mg	2,5ml

πυριτω

## Neubauer, πρόχειρό μέτρημα

- Εάν στο κεντρικό τετράγωνο ο αριθμός των κυττάρων είναι  $n < 150$ , μετράμε και τα 9 μεγάλα τετράγωνα.
- Εάν στο κεντρικό τετράγωνο  $n = 150$  έως 250, μετράμε τρία διαγώνια τετράγωνα.
- Εάν στο κεντρικό τετράγωνο  $n = 250$  έως 300 δεν μετράμε άλλο.
- Εάν στο κεντρικό τετράγωνο  $n > 300$  αραιώνουμε\* το δείγμα.



Η μέση τιμή του  $\underline{n}$  πολλαπλασιάζεται επί 10.000 για να έχουμε τη συγκέντρωση της καλλιέργειας σε κύτταρα/ml

# Χημικές μέθοδοι αποστείρωσης του θαλασσινού νερού (καλλιέργειες φυκών, τροχόζωων, *Artemia*)

- Η συγκέντρωση ελεύθερου χλωρίου για την απολύμανση του θαλασσινού νερού που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για καλλιέργεια είναι 10 ppm. Η αντίστοιχη ασφαλής συγκέντρωση θειοθειικού νατρίου για την απενεργοποίηση του υπολειμματικού χλωρίου είναι 12 ppm.
- Παράδειγμα: Έστω η περιεκτικότητα της χλωρίνης σε ελεύθερο χλώριο είναι 6,5%.
- Διάλυμα 10 ppm ελεύθερου χλωρίου σημαίνει 10 ml ελεύθερου χλωρίου σε 1 000 000 ml (ή 0,01 ml σε 1 λίτρο).
- 0,01 ml ελεύθερου χλωρίου βρίσκονται σε 0,15 ml χλωρίνης 6,5% (0.01/0.065).
- Για την απολύμανση κάθε λίτρου νερού καλλιέργειας προσθέστε 0,15 ml χλωρίνης 6,5% (τελική συγκέντρωση χλωρίου: 0,01 ml / l).
- Εφαρμόστε ήπιο αερισμό για 30 λεπτά, ώστε να γίνει καλή ανάμιξη και αφήστε το όλο το βράδυ.
- Προσθέστε 12 mg θειοθειικού νατρίου ανά λίτρο θαλασσινού νερού (12 ppm) και εφαρμόστε έντονο αερισμό έντονα για μία ώρα.
- Ελέγξτε για τυχόν υπόλειμμα χλωρίου.
- Για πρακτικούς λόγους, έχουμε πάντα προετοιμάσει και έχουμε στη διάθεσή μας ένα σχετικά μεγάλο απόθεμα αποστειρωμένου θαλασσινού νερού, λ.χ. 100 l, για να χρησιμοποιηθεί, εάν παραστεί ανάγκη, σε μικρούς όγκους.

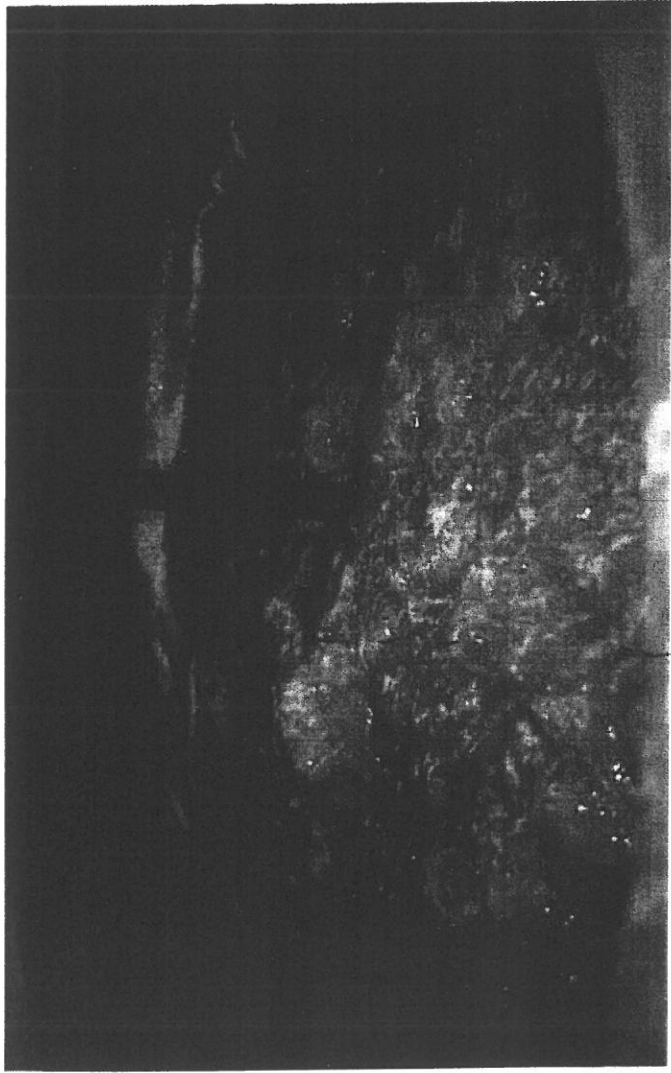
# Παραγωγή της γαρίδας της άλμης *Artemia*

Στελέχη κύστεων *Artemia*  
Απολύμανση και αποκελύφωση  
κύστεων  
Επώαση  
Συγκομιδή ναυπλίων  
Μέτρηση και εκτίμηση πληθυσμών  
ναυπλίων *Artemia*  
Εμπλουτισμός και διαχείριση  
παραγωγής



# Γρήγορος έλεγχος για ανίχνευση υπολείμματος ενεργού χλωρίου

- Σε δείγμα ενός ml θαλασσινού νερού (που έχει υποστεί επεξεργασία απολύμανσης με ενεργό χλώριο και στη συνέχεια εξουδετέρωσή του), προσθέστε:
  - 1 ml διαλύματος KI,
  - 1 ml διαλύματος 0.1 N θειοθειικού νατρίου
  - (και 1 ml διαλύματος δείκτη αμύλου.
- Εάν αναπτυχθεί μπλε χρώμα είναι απόδειξη της παρουσίας καταλοίπων ενεργού χλωρίου.



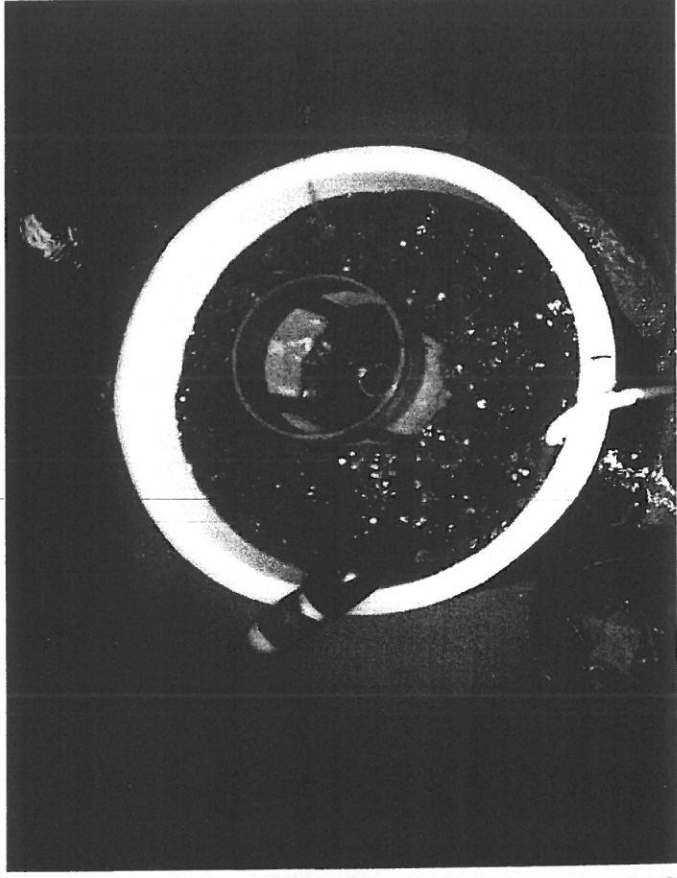
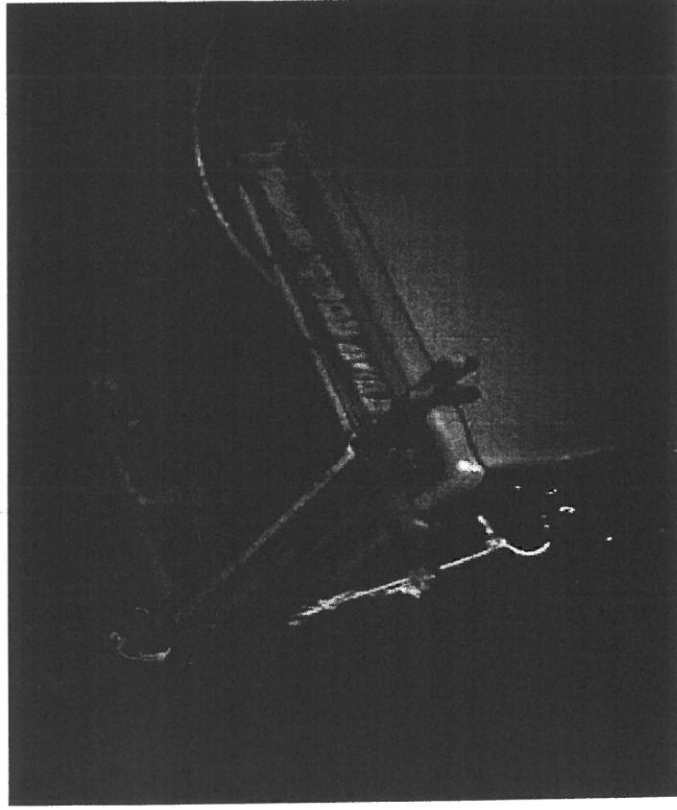
Σε χώρους με έντονο φωτισμό  
μπορούν να χρησιμοποιηθούν  
και δεξαμενές με διαφανή  
τοιχώματα.



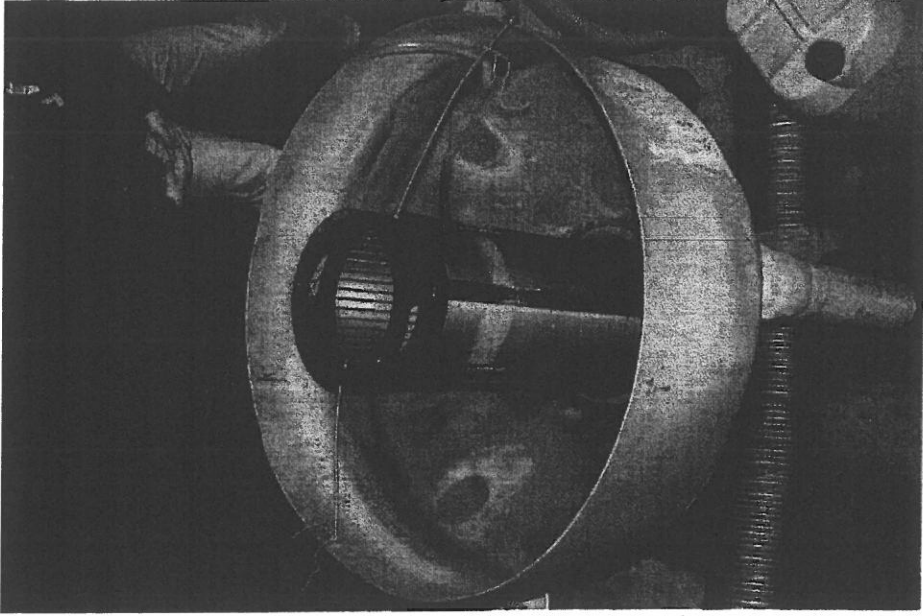
Ο έντονος αερισμός βοηθά, εκτός από την  
οξυγόνωση, στην ομογενοποίηση των  
συνθηκών φωτισμού σε όλο τον πληθυσμό,  
καθώς με την έντονη ανάδευση όλα τα ζώα  
υφίστανται την ίδια μέση ένταση και διάρκεια  
φωτισμού.



# Συγκομιδή, καθαρισμός και ξέπλυμα *Artemia*



Συγκομιδή της *Artemia* από την δεξαμενή καλλιέργειας (χονδρός σπειρωτός σωλήνας) και ταυτόχρονο ξέβγαλμα με φιλτραρισμένο θαλασσινό νερό (λεπτός σωλήνας) σε δύο διαφορετικά φίλτρα από πλαγκτικό δίχτυ 110μm .  
Αριστερά: τετράγωνο φίλτρο από το οποίο το βρώμικο νερό αποχετεύεται με υπερχειλίση από την περιφέρεια του δοχείου. Δεξιά: κυλινδρικό φίλτρο στο κέντρο κυλινδρικού δοχείου.



“Concentrator Rinser”:  
Το φίλτρο είναι από  
ανοξείδωτο χάλυβα με  
παράλληλες εγκοπές  
ίσης απόστασης 110 μm.

- Έντονος αερισμός γύρω από το φίλτρο για πρόληψη απόφραξης από ναυπλίους, μεμβράνες και άλλες ακαθαρσίες.
- Standby («καλόγηρος εφαρμόζεται εσωτερικά της συσκευής φιλτραρίσματος, στην αποχέτευση του δόχείου») , για ρύθμιση της στάθμη του νερού.
- Μετά το άδειασμα της δεξαμενής με τους ναυπλίους στο φίλτρο, το καθαρό θαλασσινό νερό συνεχίζει να ξεπλένει τα ζώα, μέχρι που η καθαρότητά του διαπιστωθεί με απλό οπτικό έλεγχο σε δείγμα από το νερο αποχέτευσης
- Τότε ο εσωτερικός σωλήνας αφαιρείται και η στάθμη του νερού ελαττώνεται έως τα 20 cm περίπου επιτυγχάνοντας συμπίκνωση των ναυπλίων.

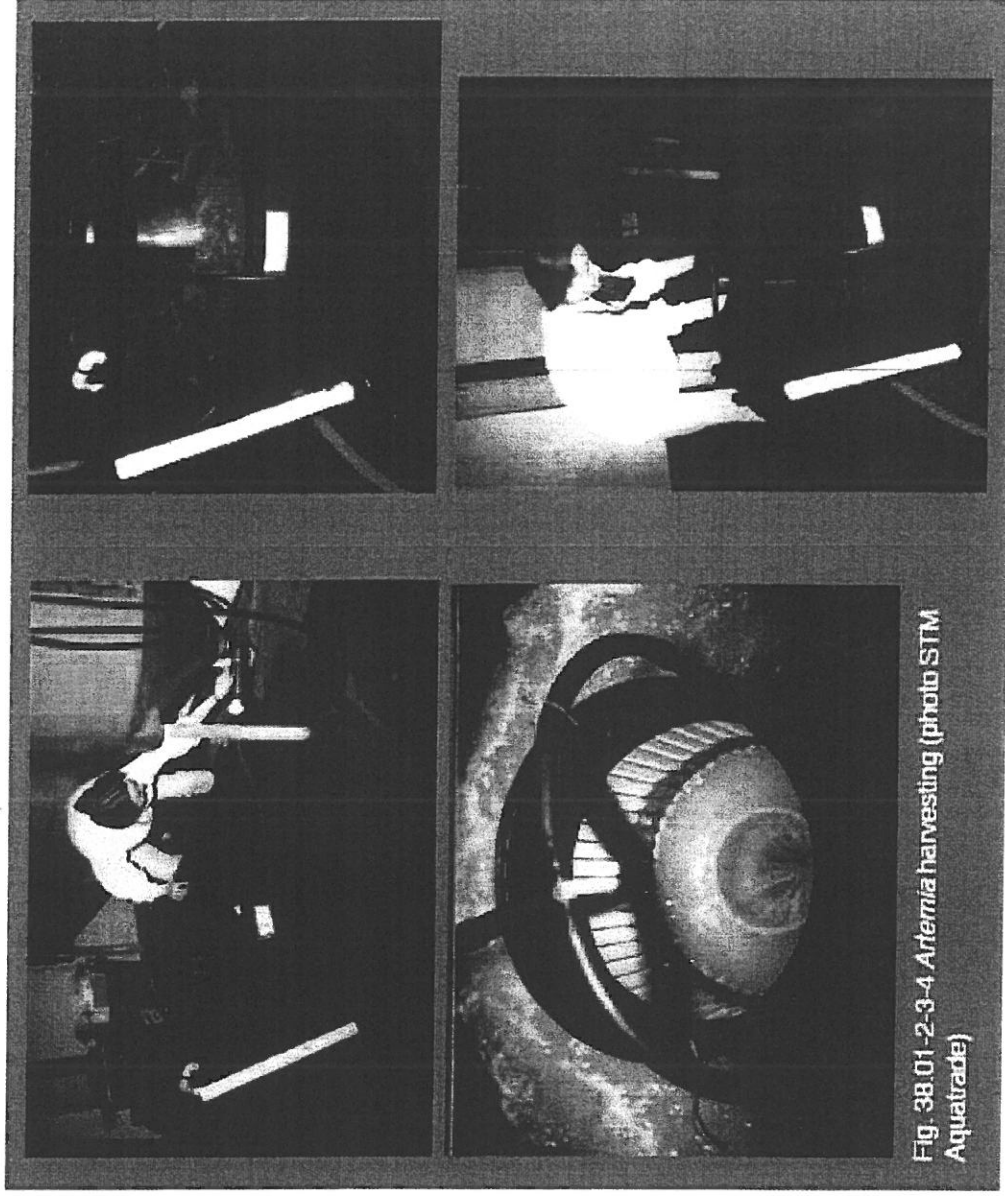


Fig. 38.01-2-3-4 Artemia harvesting (photo STM Aquatrade)

# Κρύο στοκάρισμα *Artemia*

Παγοκύστες για  
διατήρηση 4-10 °C,  
ψυκτικό σπείρωμα  
(φρέον, ή κρύο  
νερό), ή  
παγολεκάνες

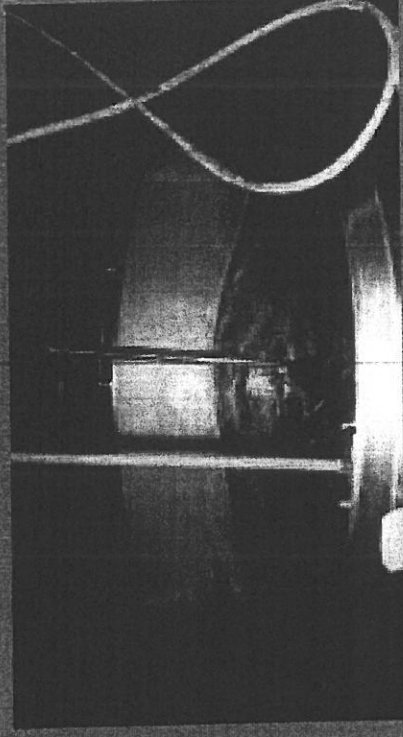
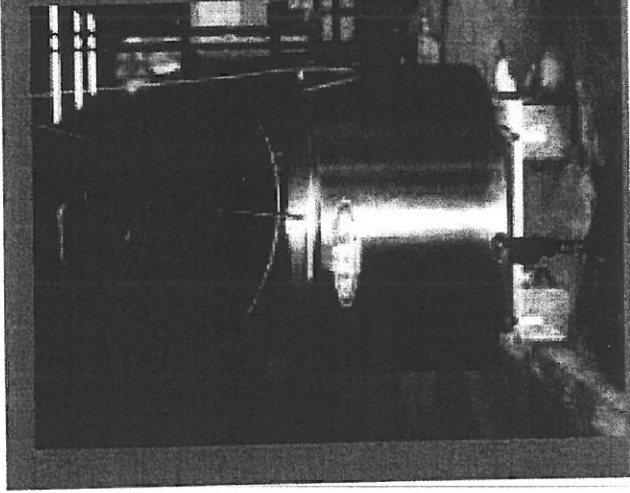
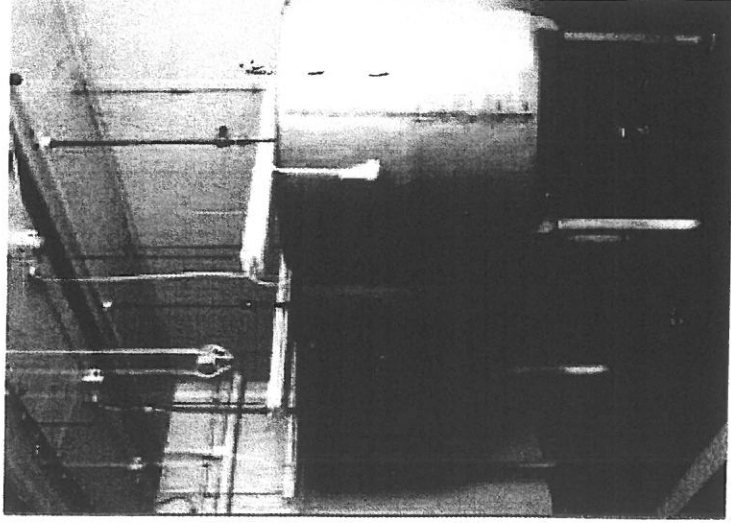


Fig.40.01-2 *Artemia* cold storage tank (photo  
STM Aquatrade)

# Συμπληρωματικός εξοπλισμός

- Ηλεκτρικές πρίζες ασφαλείας και ασφάλειες για υδροπιεστικό (για τον καθαρισμό των δαπέδων και των μεγάλων όγκων) και άλλες μικρές ηλεκτρικές συσκευές,
- Ηλεκτρικό μίξερ,
- Ηλεκτρικούς προβολείς 24 volt, κατάλληλα προσαρμοσμένους σε βάσεις,
- Παροχές νερών, θαλασσινού (κρύου και ζεστού) και γλυκού, καθώς και αέρα σε επιλεγμένο σημείο της αίθουσας,
- Νεροχύτη ενεργοποιούμενο με πετάλι στην είσοδο της αίθουσας,
- Λεκάνη για τη χλωρίωση μικροαντικειμένων μετά τον καθαρισμό τους, στην οποία ανά 24 ώρες ανανεώνεται διάλυμα απολυμαντικού (π.χ. χλωρίνη),
- «Ποδόλουτρο» σε ειδικά διαμορφωμένη λεκάνη στο δάπεδο της εισόδου, στην οποία ανά 24 ώρες ανανεώνεται διάλυμα απολυμαντικού (π.χ. χλωρίνη ή ιώδιο ή παράγωγα τεταρτογενούς αμμωνίου).

# Επώαση

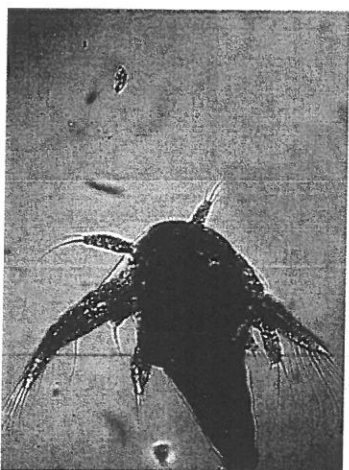
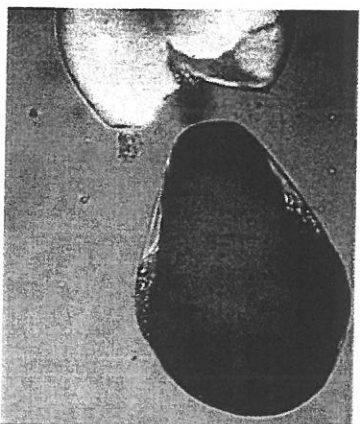
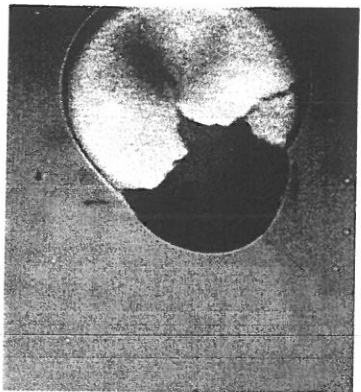
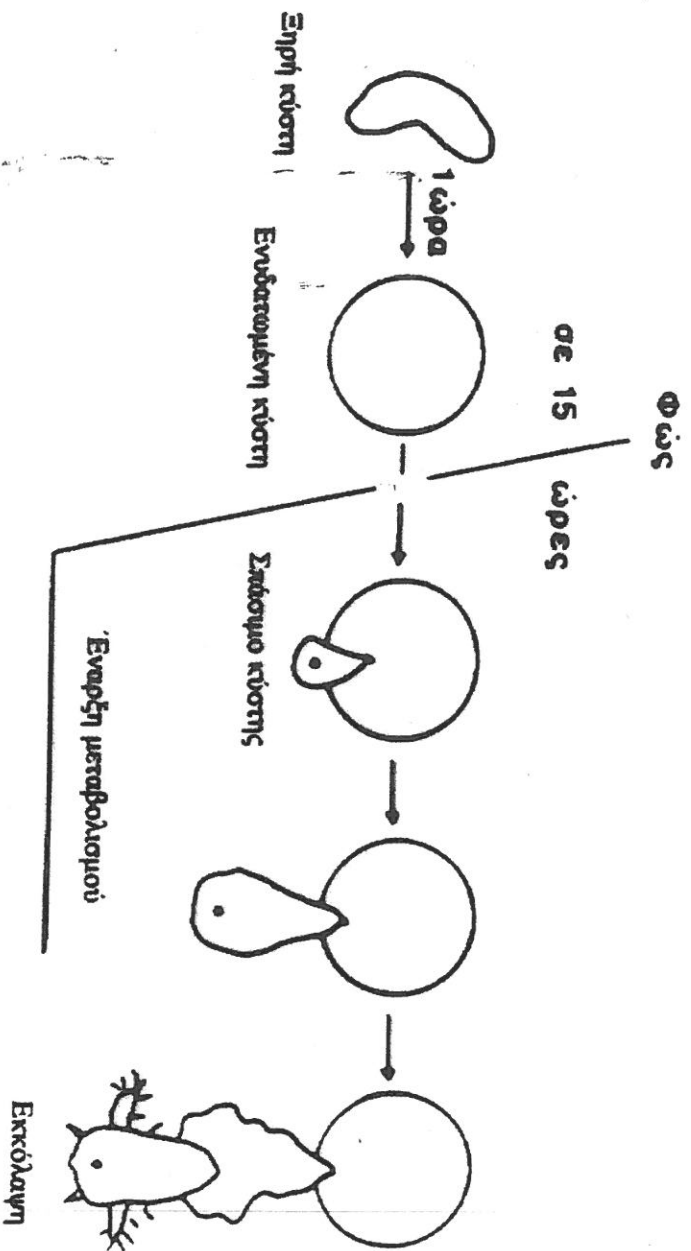


- Μόλις οι κύστεις μπουν στο θαλασσινό νερό για ενυδάτωση, το έμβριο αρχίζει τη μεταβολική του δραστηριότητα.
- Εκκόλαψη (στάδιο Instar I), μετά από 20 - 24 h
- Βέλτιστες συνθήκες επώασης:
  - δεξαμενή: κυλινδρική, ημιδιαφανές παράθυρο κοντά στον κώνο (συγκομιδή) βαλβίδα αποχέτευσης.
  - Φιλτραρισμένο και αποστειρωμένο θαλασσινό νερό 35 ppt
  - Θερμοκρασία 28-30°C.
  - Έντονος αερισμός ( κύστεις σε εναιώρηση, ομοιογενές μέσο καλλιέργειας, ομοιογενής φωτισμός των κύστεων). Παροχή με ανοικτό σωλήνα τοποθετημένο στον πυθμένα.
  - Διαλυμένο οξυγόνο > 4 ppm.
  - pH > 8. Εάν χρειάζεται, προσθέτουμε διττανθρακική σόδα σε δόση (NaHCO<sub>3</sub>), σε δόση 1g/l (διαλυμένο προηγουμένως)
  - Δυνατός φωτισμός 2 000 lux πάνω από την επιφάνεια του νερού στην αρχή της επώασης
  - Πυκνότητα κύστεων 2.5 g/l

# pH

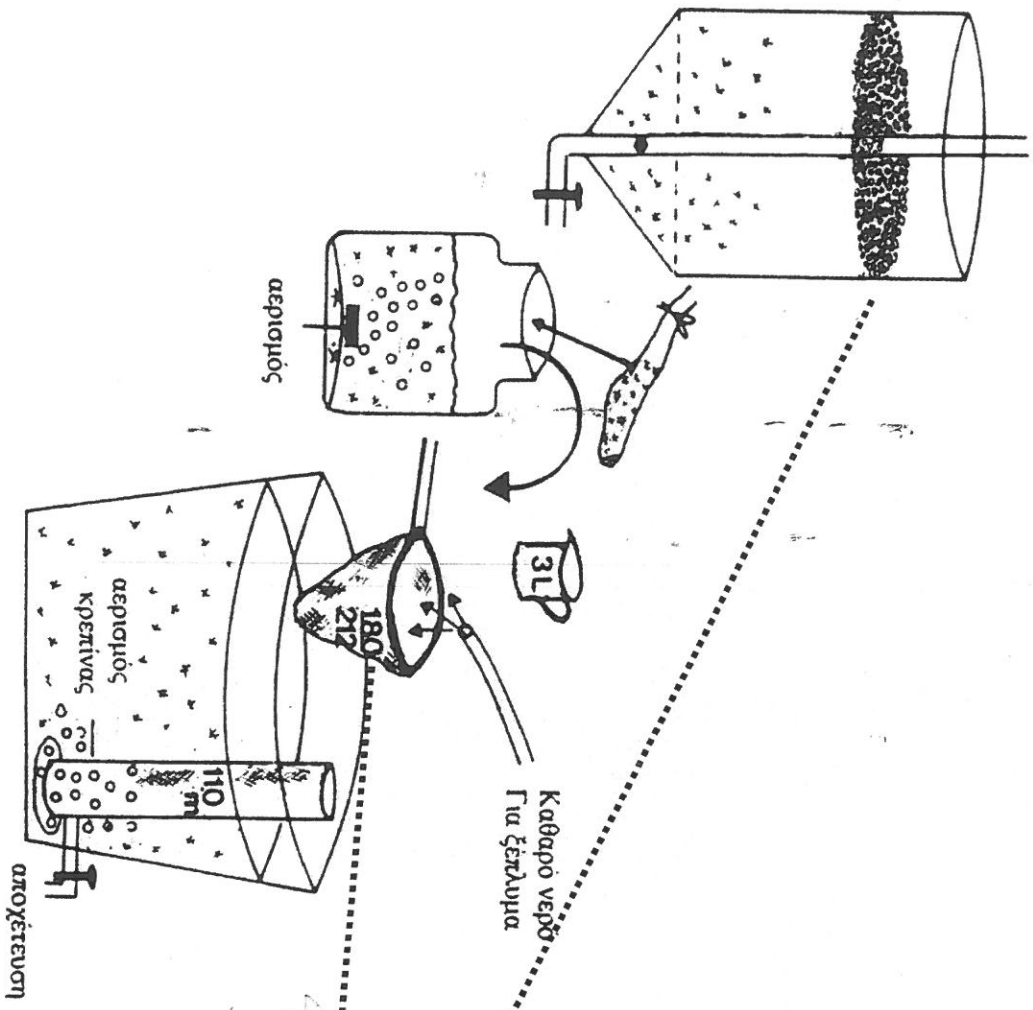
- Στάσιμο περιβάλλον, υψηλή βιοφόρτιση συνεπάγονται συσσώρευση του CO<sub>2</sub> και μείωση του pH του μέσου καλλιέργειας.
- Οι βέλτιστες αποδόσεις της εκκόλαψης πραγματοποιούνται σε περιοχή pH της τάξης του 8

- Το pH πρέπει να διατηρείται πάνω από 8 και αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη όξινης ανθρακικής σόδας (NaHCO<sub>3</sub>) σε ποσότητα 1 έως 3 g/l.
- Η τεχνική αυτή επιτρέπει καλές αποδόσεις εκκόλαψης και σε πολύ υψηλές πυκνότητες ωαρίων ανά λίτρο καλλιέργειας. Π.χ. σε μικρούς όγκους (έως και 600 l) επιτυγχάνονται εύκολα καλές εκκόλαψεις ακόμα και σε πυκνότητες 6 έως 8 g ξηρών κύστεων ανά λίτρο





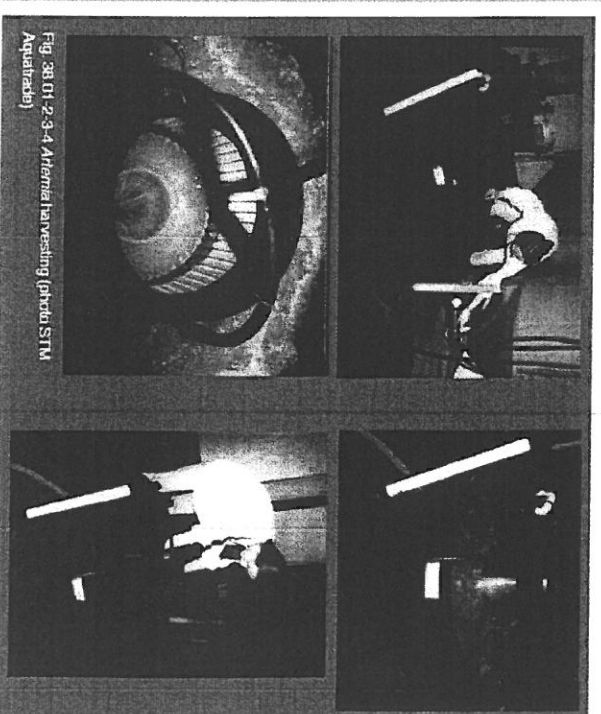
# Συγκομιδή ναυτλίων & καθαρισμός κύστεων



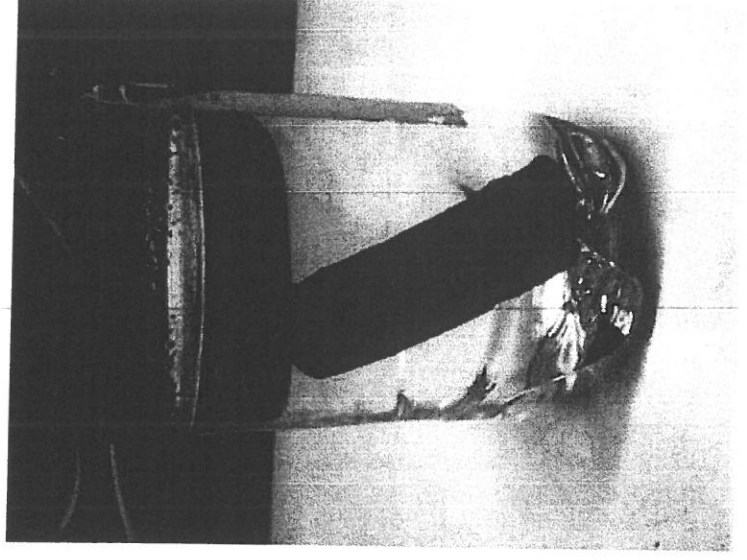
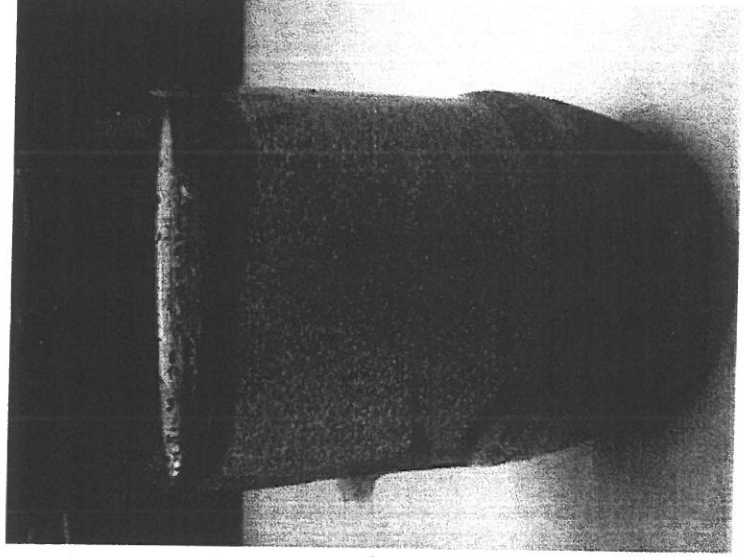
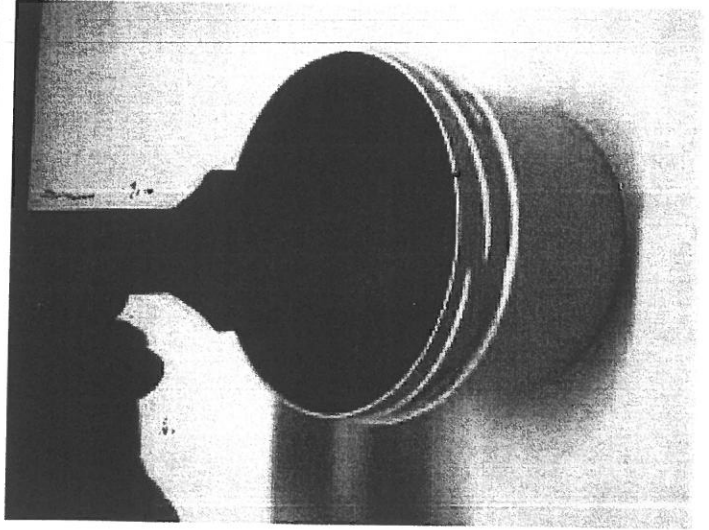
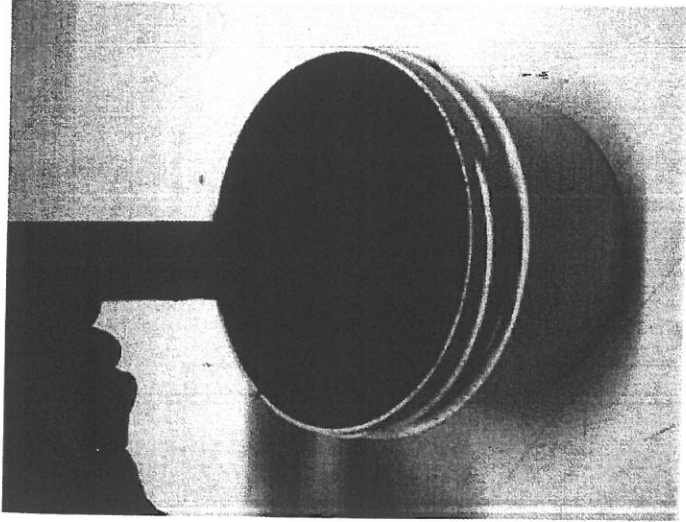
Τώρα, χρήση μαγνητών

# Συγκομιδή ναυτλίων

- **Συγκομιδή, καθαρισμός και ξέτλαγμα των ναυτλίων** πριν από τη διανομή τους στις νύμφες σε κυλινδρική δεξαμενή 0,5 έως 1 m<sup>3</sup> στο κέντρο κυλινδρικό φίλτρο  $\varnothing$ 40 cm από πλαγκτικό δίχτυ 110 $\mu$ m (ή "Concentrator Rinser").
- Δυνατή η απολύμανση των ζώων με φορμόλη (σε δόση 50 ppm προϊόντος 37% για 10' και ξέτλαγμα με άφθονο γλυκό νερό (για περαιτέρω απολύμανση) για 15 λεπτά. Αμέσως μετά ξέτλαγμα με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό για 5 πέριπτου λεπτά.
- Καταμέτρηση των ναυτλίων σε δείγμα ενός ml, **εκτίμηση του ολικού πληθυσμού**
- **Μεταφορά στην δεξαμενή στοκαρισματος** με αντλία ή μέσα σε δοχεία με αερισμό.



# Τώρα πάλι, "polarised brineshrimp cysts"



# Μέτρηση και εκτίμηση πληθυσμών ναυπλίων *Artemia*

- ΣΚΟΠΟΣ:

- Εκτίμηση εκκολαψιμότητας
- Τάισμα ιχθυονυμφών (πυκνότητες θηραμάτων)

- Τρεις περιπτώσεις μετρήσεων:

- Μεγάλες πυκνότητες ναυπλίων (συγκομιδή, στοκάρισμα στο κρύο νερό)
- Σε δεξαμενή επώασης
- Μικρές πυκνότητες (δεξαμενές ιχθυονυμφών)

- Κριτήρια αξιολόγησης της εκκόλαψης:

- Ύψος εκκόλαψης: αριθμός εκκολαφθέντων ναυπλίων ανά 100 κύστεις (οι καλές παρτίδες 90-95%)

- Απόδοση εκκόλαψης:

- αριθμός παραγόμενων ναυπλίων ανά γραμμάριο κύστεων (οι καλύτερες παρτίδες κύστεων παράγουν περίπου 300 000 ναύπλιους/g).

Μέτρηση δειγμάτων υψηλών πυκνοτήτων ναυπλίων:

1. Δείγμα 10-ml από τον πληθυσμό
2. Αραίωση με προσθήκη 90 ml θαλασσινού νερού (τελικός όγκος δείγματος 100 ml)
3. Τρία υπο-δείγματα με πιπέττα 1-ml, μεταφορά τους σε τρυβλίο πετρί
4. Προσθήκη λίγων σταγόνων Lugol, αναμονή (ακινητοποίηση και βάψιμο)
5. Προσθήκη νερού για διασπορά των ναυπλίων σε όλο το πετρί
6. Πλέγμα γραμμών κάτω από το πετρί για διευκόλυνση της μέτρησης
7. Υπολογισμός μέσου αριθμού ναυπλίων/ml από τα τρία πετρί
8. Συνολική πυκνότητα ναυπλίων ανά λίτρο = μέσος αριθμός ναυπλίων/ml X 10 (συντελεστής αραιώσης) X 1000 ml

# Εμπλουτισμός(bioencapsulation, βιοεγκλεισμός)

- Μικρή η θρεπτική αξία των μεταναυπλίων (Instar II )
- Κατάλληλες δίαιτες πλούσιες σε σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα 20:5ω-3 και 22:6ω-3, βιταμίνη C , πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) και φωσφολιπίδια.
- Instar II συνήθως μετά τις 18 ώρες (εμφάνιση πεπτικού σωλήνα)
- Με βιοεγκλεισμό μπορούμε να χορηγήσουμε στις νύμφες και άλλα συστατικά, όπως βιταμίνες και χημειοθεραπευτικά.

- Διάρκεια εμπλουτισμού σύμφωνα με τις οδηγίες του προϊόντος
- Μακρύς εμπλουτισμός (full enrichment) 24 h, δύο δόσεις, μία στην αρχή και μία μετά από 12 h .
- Βραχύς εμπλουτισμός (short-term enrichment) 12 h, μία αρχική δόση.

Ο εμπλουτισμός των μεταναυπλίων διαπιστώνεται από τη πληρότητα του πεπτικού τους σωλήνα σε παρατήρηση στο στερεοσκοπικό μικροσκόπιο

