



Πηγή: [gettyimages.com](https://www.gettyimages.com)

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΣ
DUNIALLELA SP. ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΕ ΑΠΟ ΤΙΣ ΑΛΥΚΕΣ ΚΑΛΛΟΝΗΣ
ΛΕΣΒΟΥ.**

Αρχοντούλα Κοσκερίδη

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επιβλέποντες: Δρ. Καλλονιάτη Χρυσάνθη -

Καθηγητής Τσιρτσής Γεώργιος

Μυτιλήνη, Ιούλιος 2023

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αποφοίτου του Τμήματος Ωκεανογραφίας και Θαλασσίων Βιοεπιστημών

<Αρχοντούλα Κοσκερίδη>

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

< ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΥΣ *DUNIALLELA SP.* ΠΟΥ
ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΕ ΑΠΟ ΤΙΣ ΑΛΥΚΕΣ ΚΑΛΛΟΝΗΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΥΨΗΛΗΣ
ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ.>

Τριμελής Επιτροπή Επίβλεψης και Κρίσης της Εργασίας

Υπογραφές

Τσιρτσής Γεώργιος
Επιβλέπων Καθηγητής

Καλλονιάτη Χρυσάνθη
Επιβλέπουσα Διδάκτορας

Μπακόπουλος Βασίλειος

Ευχαριστίες

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους τους ανθρώπους που ήταν δίπλα μου σε όλη αυτή την νέα διαδικασία για εμένα, που ήταν εκεί για να με στηρίξουν με τις γνώσεις τους, με την δύναμη τους στις δύσκολες στιγμές και με την αφιέρωση του προσωπικού τους χρόνου ώστε να διεκπεραιωθεί με επιτυχία αυτό το δύσκολο εγχείρημα. Πιο συγκεκριμένα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Καλλονίατη Χρυσάνθη για την βοήθεια της και την στήριξη της καθ' όλη την διάρκεια της προσπάθειας μου καθώς και για την συμβολή της στην αξιολόγηση και την καθοδήγηση του πειράματος. Επιπλέον ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Τσιρτσή Γεώργιο για την στήριξη και την συμβολή του στο εργαστηριακό μέρος και στην συγγραφή της παρούσας πτυχιακής. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω τους προπτυχιακούς μου φίλους Σκούρα Ευάγγελο, Ράπτη Ευαγγελία και Πέττα Ελένη που αφιέρωσαν μέρος του προσωπικού τους χρόνου στο εργαστήριο για να βοηθήσουν σε διαδικασίες του πειράματος, επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω για την συνεργασία και την συμβολή της στο εργαστήριο και την προπτυχιακή μου φίλη Πετρίδη Αθηνά. Τέλος θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους ανθρώπους που μπορεί να μην ήταν στο εργαστήριο μαζί μου με την φυσική τους παρουσία αλλά ήταν πάντα εκεί για εμένα, στους δικούς μου ανθρώπους και ειδικότερα στην μητέρα μου και στον πατέρα μου, θα ήθελα να τους εκφράσω το πόσο μεγάλη βοήθεια ήταν για εμένα, καθώς ο καθένας με στήριζε με τον δικό του μοναδικό τρόπο σε όλο αυτό το ταξίδι.

Περίληψη

Οι αλυκές είναι τεχνητές λίμνες όπου το θαλασσινό νερό εξατμίζεται για να παραχθεί αλάτι. Τα υψηλά επίπεδα αλατιού σε αυτά τα ενδιαιτήματα μπορεί να έχουν αντίκτυπο στη φυσιολογία και την ανάπτυξη των μικροοργανισμών τους. Χρησιμοποιώντας τις ειδικές προσαρμογές που έχουν δημιουργήσει, τα μικροφύκη μπορούν να επιβιώσουν σε διάφορα ενδιαιτήματα (Park, et al., 2022). Ορισμένα μικροφύκη, όπως εκείνα του γένους *Dunaliella*, μπορούν να ευδοκιμήσουν σε περιβάλλοντα με υψηλή αλατότητα. Λόγω της δυνατότητας χρήσης τους σε διάφορες βιοτεχνολογικές εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένης της παρασκευής βιοκαυσίμων, φαρμάκων και τροφίμων, τα μικροφύκη αποτελούν μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα κατηγορία. Ωστόσο, η επίδραση της καταπόνησης αλατότητας των μικροφυκών στις αλυκές δεν είναι αρκετά μελετημένη. Στο νησί της Λέσβου, στην αλυκή Καλλονής, ελήφθησαν δείγματα από δύο λίμνες των αλυκών. Ένα από τα απομονωμένα στελέχη που συλλέχθηκαν, με την χρήση μοριακών δεικτών ITS, *rbcl* και *tufA*, υποβλήθηκε σε συνθήκες καταπόνησης αλατότητας 0M NaCl, 1M NaCl και 2M NaCl. Η ανάπτυξη του στελέχους παρακολούθηθηκε κατά τη δεκαήμερη διάρκεια του πειράματος. Κατά τη διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκαν πολυάριθμες μελέτες, όπως ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των κυττάρων σε ολικές πρωτεΐνες με τη χρήση φωτομετρικών τεχνικών, η περιεκτικότητα των ολικών χλωροφύλλων και των καροτενοειδών τους. Χρησιμοποιήθηκε επίσης η τεχνική της FRAP για την ανάλυση του αντιοξειδωτικού τους δυναμικού. Τα ευρήματα παρουσιάζουν την ικανότητα του στελέχους να ευδοκιμεί σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, προσαρμόζοντας τον μεταβολισμό του και παράγοντας βιομάζα με υποσχόμενες ιδιότητες.

Abstract

Salt ponds are artificial lakes where seawater is evaporated to produce salt. High levels of salt in these habitats can have an impact on the physiology and growth of their micro-organisms. Using the special adaptations, they have created, microalgae can survive in a variety of habitats (Park, et al., 2022). Some microalgae, such as those of the genus *Dunaliella*, can thrive in high salinity environments. Due to their potential for use in various biotechnological applications, including biofuels, pharmaceuticals and food, microalgae are a particularly interesting category. However, the effect of salinity stress on microalgae in salt marshes is not well studied. On the island of Lesbos, in the Kalloni salt pond, samples were taken from two salt ponds. One of the isolates collected, using ITS, *rbcl* and *tufA* molecular markers, was subjected to salinity stress conditions of 0M NaCl, 1M NaCl and 2M NaCl. The growth of the strain was monitored during the ten-day period of the experiment. Numerous studies were carried out during the experiment, such as determination of the total protein content of the cells using photometric techniques, the content of total chlorophylls and their carotenoids. The FRAP technique was also used to analyse their antioxidant potential. The results show the ability of the strain to grow under high salinity conditions, adapting its metabolism and producing biomass with promising features.

Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες	4
Περίληψη	6
Abstract	7
Πίνακας Περιεχομένων	8
1. Εισαγωγή	11
1.1. Αλυκές.....	11
1.2. Αλυκή Καλλονής	12
1.3. Φύκη.....	13
1.4. Μικροφύκη	13
1.5. Συνθήκες ανάπτυξης μικροφυκών	14
1.5.1. Φως.....	14
1.5.2. pH.....	14
1.5.3. Αερισμός.....	15
1.5.4. Θερμοκρασία.....	15
1.5.5. Αλατότητα.....	16
1.5.6. Θρεπτικά συστατικά.....	16
1.5.7. Μέσο καλλιέργειας.....	16
1.5.8. Χρόνος παραμονής της καλλιέργειας.....	17
1.6. <i>Dunaliella sp.</i>	17
1.6.1. Γενική Περιγραφή.....	17
1.6.2. Μορφολογικό και Φυσιολογικό επίπεδο της <i>Dunaliella</i>	18
1.6.3. Καταγραφόμενες συνθήκες ανάπτυξης της <i>Dunaliella</i>	20
1.7. Αξίες και Εφαρμογές μικροφυκών	20
1.7.1. Χρήσεις στην Υγεία	21
1.7.2. Χρήσεις στην βιοαποικοδόμηση και την παραγωγή βιοκαυσίμων και βιοντίζελ	21

1.7.3.	Χρήσεις στην παραγωγή καλλυντικών και στη βιομηχανία τροφίμων.....	22
1.7.4.	Χρήσεις στις υδατοκαλλιέργειες	22
1.7.5.	Πιθανές χρήσεις σε περιβαλλοντικά προβλήματα	23
1.8.	Καταπόνηση αλατότητας	23
1.9.	Σκοπός εργασίας.....	24
2.	Υλικά και Μέθοδοι	24
2.1.	Συνθήκες ανάπτυξης της <i>Dunaliella</i> στο εργαστήριο.....	24
2.2.	Σχεδιασμός Πειράματος	24
2.3.	Προετοιμασία Πειράματος.....	26
2.4.	Παρασκευή θρεπτικού F ₂ ως τροφή των μικροφυκών.....	27
2.5.	Παρασκευή θρεπτικού F ₂ ως τροφή των μικροφυκών με τις κατάλληλες αναλογίες αλατιού (0M NaCl, 1M NaCl, 2M NaCl).....	28
2.6.	Μέτρηση κυττάρων για εμβολιασμό	32
2.7.	Διαδικασία μέτρησης βιομάζας	33
2.8.	Διαδικασία Λυοφιλίωσης	34
2.9.	Διαδικασία μέτρησης χλωροφυλλών-καροτονοειδών	34
2.10.	Διαδικασία μέτρησης πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford	35
2.11.	Διαδικασία μέτρησης αντιοξειδωτικών με την μέθοδο FRAP.....	38
3.	Αποτελέσματα	43
3.1.	Επίδραση της υψηλής αλατότητας στην βιομάζα της <i>Dunaliella sp.</i>	43
3.2.	Επίδραση της υψηλής αλατότητας στις χλωροφύλλες και τα καροτονοειδή της <i>Dunaliella sp.</i>	45
3.3.	Επίδραση της υψηλής αλατότητας στις πρωτεΐνες της <i>Dunaliella sp.</i>	46
3.4.	Επίδραση της υψηλής αλατότητας στα αντιοξειδωτικά της <i>Dunaliella sp.</i>	47
4.	Συμπεράσματα και συζήτηση.....	48
4.1.	Συμπεράσματα έρευνας.....	48
4.2.	Μελλοντική στόχοι-έρευνες.....	49
5.	Βιβλιογραφία.....	49

1. Εισαγωγή

1.1. Αλυκές

Σύμφωνα με τις Ελληνικές Αλυκές, του 2006, οι αλυκές είναι τεχνητές λεκάνες για τη συμπύκνωση θαλασσινού νερού. Αποτελούνται από ρηχές δεξαμενές που χωρίζονται σε ξεχωριστά διαμερίσματα με χώμα, συχνά αργιλώδες, το οποίο διατηρεί τη στεγανότητα του πυθμένα και συγκρατεί το νερό. Σε σύγκριση με άλλες υδάτινες μάζες, οι αλυκές έχουν πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλάτων, κυρίως NaCl, και άλλων ορυκτών, όπως CaCO₃, CaSO₄ και άλατα Mg. Σε πολλές περιπτώσεις, η αλατότητα είναι ακόμη υψηλότερη από εκείνη του θαλασσινού νερού (Γεωργούσης, 2018). Ωστόσο, σε αντίθεση με τις λιμνοθάλασσες, οι αλυκές είναι συχνά μια επίπεδη περιοχή κοντά στην ακτή που δεν βρίσκονται σε άμεση επαφή με τη θάλασσα, είναι παροδικές λίμνες με μικρό βάθος που παρουσιάζουν ένα δικό τους εσωτερικό υδρολογικό σύστημα (Williams, 1993; Τζιωρτζής, 2008).

Οι αλυκές αποτελούν μέρος των εσωτερικών υδάτινων οικοσυστημάτων του πλανήτη (Williams, 1993; Naceur, et al., 2009; Φωτίου, 2013), συνήθως δημιουργούνται σε υγροτόπους, όπου υπάρχει καθαρό θαλασσινό νερό, επικρατούν ισχυροί άνεμοι και υψηλές θερμοκρασίες. Είναι τεχνητοί υγρότοποι στους οποίους επιζούν μόνο οι οργανισμοί που έχουν προσαρμοστεί στα αυξημένα επίπεδα αλατότητας. Ο χώρος μεταξύ της ξηράς και των αμιγώς υγρών περιβαλλόντων καλύπτεται από υγροτόπους ή υγροτοπικά οικοσυστήματα, ωστόσο δεν είναι σαφές πού βρίσκονται τα όριά τους. Η αναπαραγωγή, η διαβίωση, ο ύπνος και το καταφύγιο από τις κακές καιρικές συνθήκες είναι εφικτά σε αυτά τα περιβάλλοντα.

Ως αποτέλεσμα των σημαντικών αλλαγών που προκαλούνται από την ανάμειξη γλυκού ποτάμιου νερού, με αλατότητα περίπου 0‰, και αλμυρού θαλασσινού νερού, με αλατότητα 35‰, που συμβαίνουν στις εκβολές και τα δέλτα των ποταμών, τα είδη που ζουν εκεί έχουν ευρύαλο χαρακτήρα (Κεχαγιάς, 2015). Όπως σε κάθε οικοσύστημα, οι οργανισμοί του οικοσυστήματος των αλυκών διαχωρίζονται σε υδρόβιους και χερσαίους παραγωγούς (αυτότροφοι - φυτοπλαγκτόν και φύκη) και καταναλωτές (ετερότροφοι - αλοφυτική, και ημιαλοφυτική βλάστηση), και όλα αλληλεπιδρούν και εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό το ένα από το άλλο.

Παρά τη συνεχή αύξηση του αλατιού στους θερμαντήρες, μπορεί να βρεθεί ζωή στο εσωτερικό τους. Μετά τους αρχικούς θερμαντήρες, οι πλαγκτονικοί οργανισμοί που διαμένουν στα νερά αρχίζουν σταδιακά να μειώνονται. Τα επίπεδα αλατότητας επηρεάζουν την ποικιλομορφία των ειδών των καταναλωτών. Ζωοπλαγκτόν μπορεί να παρατηρηθεί σε λεκάνες όπου η αλατότητα είναι περίπου 40‰. Μικρά κόκκινα σκουλήκια και υδρόβια έντομα που κινούνται ελεύθερα ή χτίζουν τις φωλιές τους στη λάσπη μπορούν να παρατηρηθούν όταν η αλατότητα αυξάνεται (Λαμπρόπουλος & Κούρτελη, 1995). Το *Artemia salina* είναι ένας τύπος μικροοργανισμού που είναι κατάλληλος για περιβάλλοντα υψηλής αλατότητας (Nimura, 1987). Το μονοκύταρο χλωροφύκος *Dunaliella salina* αποτελεί τη βάση της τροφικής πυραμίδας για τους πληθυσμούς της *Artemia* (Χατζηχριστοφόρου, 2008; Παναγιώτου, et al., 2006; Παναγιώτου, et al., 2008).

Οι αλυκές έχουν τόσο οικολογική σημασία όσο και ορνιθολογικό ενδιαφέρον. Πολλά πτηνά βρίσκουν τροφή στα ρηχά τμήματά τους, με αποτέλεσμα οι αλυκές να είναι ζωτικής σημασίας για τους πληθυσμούς των πτηνών. Επίσης τις χρησιμοποιούν για ξεκούραση, αναζήτηση τροφής και φαγητό (Λαμπρόπουλος & Κούρτελη, 1995). Σύμφωνα με τους Koronessis και Lekkas το 1999, οι αλυκές αποτελούν ένα ξεχωριστό είδος υγροτόπων που συνδυάζουν την παραγωγικότητα με την προστασία του περιβάλλοντος. Οι αλυκές θεωρούνται πλέον τεχνητοί υγρότοποι σύμφωνα με τη "Σύμβαση για τους υγροτόπους διεθνούς σημασίας ως ενδιαίτημα υδροβίων πτηνών", συχνά γνωστή ως Σύμβαση Ραμσάρ.

1.2. Αλυκή Καλλονής

Ο μεγαλύτερος υγροβιότοπος της Λέσβου είναι η Αλυκή Καλλονής. Περιλαμβάνεται τόσο στην απογραφή των υγροτόπων του Αιγαίου από το WWF Ελλάς (Κατσαδωράκης & Παραγκαμιάν, 2007) όσο και στην εθνική απογραφή με αριθμό GR411324000 (Ζαλίδης & Μαντζαβέλλας, 1994). Ο κόλπος της Καλλονής είναι ο μεγαλύτερος κόλπος του νησιού. Είναι ένας μεγάλος ημίκλειστος κόλπος που συνδέεται με το Αιγαίο Πέλαγος με μια υδάτινη οδό μήκους ενός χιλιομέτρου. Οι μοναδικές ιδιότητες του κόλπου, όπως η υψηλότερη αλατότητα από τη θάλασσα, η υψηλή παραγωγικότητα και ο σχετικός ευτροφισμός, είναι αποτέλεσμα των σημαντικών περιορισμών που θέτει ο στενός διάυλος στη διέλευση των υδάτινων μαζών. Ο ποταμός Τσικνιάς και ο χείμαρρος Ξυνορόδου ενώθηκαν μεταξύ τους και σχημάτισαν την αλυκή της Καλλονής. Πρόκειται για μία βιομηχανική αλυκή 2.360 στρεμμάτων, που αν συνδυαστεί με τα άλλα υγροτοπικά συστήματα αποτελεί συνολικά 4.600 στρέμματα. Ο υγροβιότοπος αυτός είναι πολύ σημαντικός λόγω του μεγέθους και της θέσης του αλλά και της σημαντικής οριζόντιας μεταβλητότητάς του και της υψηλής ποικιλομορφίας των πτηνών και των πολυάριθμων ειδών που φωλιάζουν σε αυτόν. Αποτελεί τη δεύτερη μεγαλύτερη αλυκή στην Ελλάδα στην παραγωγή αλατιού και είναι ένας από τους σημαντικότερους υγροτόπους στην Ευρώπη. Κάθε χρόνο προσελκύει ένα μεγάλο αριθμό επισκεπτών που είναι "φίλοι" της άγριας ζωής. Με την αφθονία των φυτών και των ζώων της, είναι ενδεχομένως μια από τις πιο θεαματικές περιπτώσεις ανάπτυξης του οικότουρισμού στη χώρα μας. Οι επισκέπτες που πηγαίνουν για να παρακολουθήσουν τα πουλιά συγκεντρώνονται εκεί σε μικρές ομάδες καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Τουλάχιστον 60 διαφορετικά είδη υδροβίων πουλιών έχουν εντοπιστεί, κάποια από τα είδη που ήταν καθοριστικά για την ένταξη του κόλπου Καλλονής στο δίκτυο Natura 2000 είναι το Φοινικόπτερο (*Phoenicopterus ruber*), η Καστανόπαπια (*Tadorna ferruginea*) και η Αβοκέτα (*Recurvirostra avosetta*) (Κακαλής & Γαληνού, 2009). Τα τελευταία χρόνια οι επισκέπτες της ασχολούνται συστηματικά με την παρατήρηση πουλιών με αποτέλεσμα να γίνονται κάποιες προσπάθειες για τη λογική διαχείριση του υγροτόπου. Ολόκληρος ο υγρότοπος περιλαμβάνεται στα όρια της Ειδικής Ζώνης Διατήρησης (GR4110004), της Ζώνης Ειδικής Προστασίας (GR4110007) και του Καταφυγίου Άγριας Ζωής (ΦΕΚ 387/Δ/2009).

1.3. Φύκη

Η κατηγορία των φωτοσυνθετικών, αυτότροφων οργανισμών που είναι γνωστή ως φύκη περιλαμβάνει πολλά διαφορετικά είδη. Το χαρακτηριστικό αυτό καθιστά δύσκολη την ταξινόμησή τους, ακόμη και σε επίπεδο βασιλείου, σύμφωνα με την κλαδιστική ανάλυση, και αποτελεί αντικείμενο συζήτησης μεταξύ πολλών ειδικών. Τα φύκη χωρίζονται σε επτά διαιρέσεις, σύμφωνα με μια προσέγγιση: Chlorophyta, Chrysophyta, Phaeophyta, Euglenophyta, Cryptophyta, Pyrrophyta, Rhodophyta (Dinesh , 2016; Mark, 1998).

Τα φύκη χρησιμοποιούν τη χλωροφύλλη-α ως χρωστική ουσία για φωτοσυνθετικές διεργασίες. Δεν διαθέτουν πραγματικό αγωγό ή υποστηρικτικό ιστό, καθώς προσλαμβάνουν νερό και θρεπτικά συστατικά κατευθείαν από το περιβάλλον τους. Μπορούν να ευδοκιμήσουν σε διάφορα περιβάλλοντα και να αντέξουν σκληρές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένης της υψηλής αλατότητας και των υψηλών θερμοκρασιών. Μπορούν να αναπαραχθούν τόσο αγενώς όσο και εγγενώς (υπό λιγότερο ιδανικές συνθήκες). Σύμφωνα με την εξελικτική θεωρία, εμφανίστηκαν για πρώτη φορά στη Γη πριν από 900 εκατομμύρια χρόνια, κατά τη διάρκεια του Ανώτερου Προκάμβριου (Γαλάτης, et al., 1998).

1.4. Μικροφύκη

Τα μονοκύτταρα, φωτοσυνθετικά πλάσματα με μέγεθος μερικών μικρομέτρων ονομάζονται μικροφύκη. Σε φυσικά ενδιαίτηματα, τα μικροφύκη εντοπίζονται συχνά σε ακραία περιβάλλοντα, όπως οι αλυκές, όπου εκτίθενται σε υψηλά επίπεδα αλατιού, θερμότητας και φωτός. Είναι επίσης σημαντικά συστατικά των υδάτινων τροφικών πλεγμάτων, παρέχοντας πηγή τροφής για πολλούς υδρόβιους οργανισμούς και δημιουργούν το μεγαλύτερο μέρος του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα μέσω της φωτοσύνθεσης. Ένα από τα μοναδικά χαρακτηριστικά των μικροφυκών είναι η ικανότητά τους να προσαρμόζονται σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

Μοιάζουν με τα συμβατικά ευκαρυωτικά κύτταρα όσον αφορά τη γενική κυτταρική δομή, τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και την παρουσία χλωροπλαστών, επιπλέον, ορισμένα από αυτά διαθέτουν και μαστίγια (Sirisha, et al., 2015). Χρησιμοποιούνται συνήθως ως βιοδείκτες, στην παρασκευή τροφίμων και καλλυντικών και στον καθαρισμό του νερού από ρύπους. Επίσης χρησιμοποιούνται συχνά ως οργανισμοί-μοντέλα σε εργαστηριακές μελέτες (Priyadarshani & Rath, 2012; Sirisha, et al., 2015; Nowicka, et al., 2016).

Παράγουν μεγάλη ποικιλία μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, λιπιδίων, υδατανθράκων, καρροτενοειδών - β-καρωτίνιο, ασταξανθίνη - και βιταμινών. Οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιούνται στους τομείς της υγείας, της διατροφής, της παρασκευής καλλυντικών και της παραγωγής ενέργειας. Χρησιμοποιούνται επίσης ως πρόσθετα τροφίμων και ζωοτροφών. Η τυπική θρεπτική αξία των μικροφυκών είναι: 30-40%

πρωτεΐνες, 10-20% λιπαρά, 5-15% υδατάνθρακες. Με αποτέλεσμα στις μέρες μας, τα μικροφύκη να έχουν ένα ευρύ φάσμα οικονομικών χρήσεων.

1.5. Συνθήκες ανάπτυξης μικροφυκών

Η ποσότητα και η ποιότητα των θρεπτικών συστατικών, το φως, το pH, η αλατότητα, ο αερισμός και η θερμοκρασία είναι οι βασικοί παράγοντες για τον έλεγχο της ανάπτυξης των φυκών.

1.5.1. Φως

Αν και η ένταση του φωτός είναι ζωτικής σημασίας, οι απαιτήσεις διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με το βάθος και την πυκνότητα της καλλιέργειας των μικροφυκών. Το φως πρέπει να είναι πιο έντονο προκειμένου να διεισδύσει στις καλλιέργειες σε αυξανόμενα βάθη και πυκνότητες κυττάρων. Οι λαμπτήρες φθορισμού μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παροχή τεχνητού ή φυσικού φωτός. Οι λαμπτήρες "βιομηχανικού λευκού" ή "Warm white" είναι συχνά το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο είδος. Ο φωτισμός τύπου "fluora" χρησιμοποιείται με επιτυχία και σε καλλιέργειες μικρού όγκου (0,5-50 λίτρα).

Η ένταση του φωτός, η γωνία πρόσπτωσης και το φάσμα της ακτινοβολίας αποτελούν κρίσιμα στοιχεία του φωτισμού. Η φωτοαναστολή μπορεί να προκύψει από πολύ υψηλή ένταση φωτός, όπως το άμεσο ηλιακό φως ή όταν ένα μικρό δοχείο βρίσκεται κοντά στο τεχνητό φωτισμό. Είναι καλύτερο να αποφεύγεται η υπερθέρμανση καθώς το έντονο φως και η χαμηλή θερμοκρασία προκαλούν βλάβες. Είναι ζωτικής σημασίας ο συνδυασμός με τη θερμοκρασία για την αποφυγή της φωτο-οξειδωσης. Ο ιδανικός ρυθμός ανάπτυξης κάθε είδους αντιστοιχεί σε έναν συγκεκριμένο φωτοπεριοδικό κύκλο. Ωστόσο, η φωτεινή ενέργεια παρέχεται συνεχώς κατά τη διάρκεια της μαζικής παραγωγής, προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση υπό σταθερές συνθήκες. Τις πρώτες ημέρες της καλλιέργειας το πολύ φως δεν την ευνοεί, ειδικά όταν οι θερμοκρασίες είναι χαμηλές (< 20 °C). Για το λόγο αυτό, συνιστάται να καλύπτεται αρχικά ο φωτισμός στις περιοχές όπου δημιουργούνται οι νέες καλλιέργειες με κατάλληλο παραβάν και στη συνέχεια να αφαιρείται όταν η καλλιέργεια γίνει πιο πυκνή, δηλαδή μετά την 2^η- 3^η μέρα.

1.5.2. pH

Το pH πρέπει να διατηρείται σε τιμές που αποτρέπουν την καθίζηση και την απώλεια θρεπτικών στοιχείων. Το εύρος pH για την πλειονότητα των καλλιεργούμενων ειδών είναι 7-9, με το ιδανικό εύρος να είναι 8,02 έως 8,07. Η προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα στην περίπτωση καλλιέργειας μικροφυκών υψηλής πυκνότητας επιτρέπει την αύξηση του pH, το οποίο μπορεί να προσεγγίσει τα οριακά επίπεδα του 9 κατά τη διάρκεια της

ανάπτυξης τους. Με τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων (NaOH, HCl, Tris και HEPES), το pH μπορεί να ρυθμιστεί.

1.5.3. Αερισμός

Για να εξασφαλιστεί ότι όλη η βιομάζα λαμβάνει ηλιακή ενέργεια και για να υπάρξει η κατάλληλη ανάδευση της καλλιέργειας χρησιμοποιείται αερισμός. Στην μικρή ποσότητα καλλιέργειας για να επιτευχθεί η διαδικασία του αερισμού τοποθετείτε ένας γυάλινος σωλήνας κοντά στο κέντρο του πυθμένα που συνδέεται με την αντλία αερισμού προκαλώντας την συνεχή ανακίνησή της. Επίσης τοποθετείτε και ένας μικρότερος σωλήνας για την εξαγωγή των ανεπιθύμητων εκκριμάτων. Η ανάμιξη με αερισμό εξυπηρετεί διάφορους σκοπούς, όπως η αποτροπή της καθίζησης των κυττάρων, η εξασφάλιση ότι κάθε κύτταρο του πληθυσμού έχει ίση έκθεση στα θρεπτικά συστατικά και το φως, η αποφυγή της διαστρωμάτωσης της θερμοκρασίας και η ενίσχυση της ανταλλαγής αερίων μεταξύ του μέσου καλλιέργειας και του αέρα. Η παροχή άνθρακα για τη φυσική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους υπάρχει στον αέρα με τη μορφή διοξειδίου του άνθρακα. Πρέπει να αναφερθεί ότι δεν μπορούν να αντέξουν όλα τα είδη την έντονη ανάμιξη. Συνιστάται η εγκατάσταση ενός φίλτρου φυσίγγων στην αρχή του δικτύου αέρα για τη μείωση της βακτηριακής μόλυνσης. Συνήθως για την επίτευξη μεγάλων συγκεντρώσεων προστίθεται CO₂, πάντα με την συμβολή των δεδομένων συνθηκών ανάπτυξης.

1.5.4. Θερμοκρασία

Εντός του εύρους του κάθε είδους, η επιλογή υψηλής θερμοκρασίας αυξάνει την παραγωγικότητα, αλλά μειώνει την ικανότητα της καλλιέργειας να αντέξει στο χρόνο λόγω της ταυτόχρονης ανάπτυξης βακτηρίων. Η ένταση του φωτός πρέπει να είναι λίγο υψηλότερη, σε υψηλές θερμοκρασίες και αντίστροφα. Η θερμοκρασία και το φως πρέπει να συνυπάρχουν αρμονικά. Το ιδανικό εύρος θερμοκρασίας για καλλιέργειες φυτοπλαγκτού είναι 20°C έως 24°C, ωστόσο αυτό μπορεί να αλλάξει ανάλογα με το είδος του μέσου που χρησιμοποιείται και τα στελέχη της καλλιέργειας. Τα πιο δημοφιλή είδη μικροφυκών είναι αυτά που μπορούν να αναπτυχθούν μεταξύ 16 °C και 27 °C. Θερμοκρασίες κάτω από 16 °C επιβραδύνουν την ανάπτυξη, ενώ θερμοκρασίες άνω των 35 °C μπορεί να αποβούν μοιραίες για ορισμένα είδη. Ο χώρος καλλιέργειας φυτοπλαγκτού θα πρέπει να είναι θερμικά μονωμένος για αποτελεσματική διαχείριση της θερμοκρασίας.

1.5.5. Αλατότητα

Οι αλλαγές στην αλατότητα δεν αποτελούν πρόβλημα για το θαλάσσιο φυτοπλαγκτόν. Με την αραιώση του θαλασσινού νερού είναι δυνατόν να δημιουργηθεί ένα επίπεδο αλατότητας κάπως χαμηλότερο από αυτό των οικοσυστημάτων όπου ευδοκμούν οι περισσότεροι οργανισμοί. Η βιβλιογραφία αναφέρει ότι 25 ppt είναι η ιδανική αλατότητα.

1.5.6. Θρεπτικά συστατικά

Τα μικροφύκη και τα μακροφύκη έχουν διαφορετικό μέγεθος, αλλά και τα δύο χρειάζονται περίπου τα ίδια θρεπτικά συστατικά για να αναπτυχθούν. Οποιοδήποτε φύκι πρέπει να έχει τα ακόλουθα στοιχεία κατά σειρά σπουδαιότητας για να αναπτυχθεί: C, H, O, N, P, Mg, Cu, Mn, Zn και Mo. Οι ποσότητες και οι αναλογίες των ανόργανων θρεπτικών συστατικών (N:P:S), ιδίως οι συγκεντρώσεις αζώτου, είναι υψίστης σημασίας για την ανάπτυξη των φυκών, ωστόσο η παροχή του πυριτίου είναι ζωτικής σημασίας για τα διάτομα. Τα θρεπτικά συστατικά πρέπει να έχουν απεριόριστες ποσότητες, να είναι εύκολα διαλυτά και να προσλαμβάνονται εύκολα. Ορισμένα φύκη χρειάζονται ίχνη οργανικών ουσιών, όπως οι βιταμίνες B12, B6, B1 (θειαμίνη) και βιοτίνη, για να ευδοκμήσουν. Πιο συχνά, το άζωτο παρέχεται ως NaNO_3 ή KNO_3 ωστόσο περιστασιακά χρησιμοποιούνται και άλλες πηγές αζώτου, όπως χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl), ουρία (NH_2CONH_2) και θειικό κρυσταλλικό αμμώνιο (NH_4HSO_4). Σύμφωνα με βιβλιογραφικές πηγές, οι συνιστώμενες αναλογίες ανόργανων θρεπτικών στοιχείων είναι N:P:Si 6,5 : 3,4 : 1 ή 10:10:1. Για τον εμπλουτισμό του φυσικού θαλασσινού νερού, χρησιμοποιείται μια ποικιλία θρεπτικών ουσιών καλλιέργειας. Όλα τους διακρίνονται από την υψηλή συγκέντρωση νιτρικών και φωσφορικών αλάτων, καθώς και ανόργανων συστατικών και βιταμινών. Για να καλυφθούν οι διαφορετικές απαιτήσεις των καλλιεργούμενων ειδών, έχουν δημιουργηθεί πολλά και διαφορετικά θρεπτικά συστατικά.

1.5.7. Μέσο καλλιέργειας

Στην υγρή καλλιέργεια χρησιμοποιείται ως μέσο ανάπτυξης το θαλασσινό ή το γλυκό νερό. Παρόλα αυτά στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα για τη διαχείριση του pH (HCl , NaOH), διπλά αποσταγμένο νερό -φιλτραρισμένο και αποστειρωμένο φυσικό νερό από την περιοχή δειγματοληψίας-, διαλύματα εμπλουτισμού για μακροθρεπτικά συστατικά (N, P, Si) και μικροθρεπτικά συστατικά. Ως μέσα καλλιέργειας των φυκών χρησιμοποιούνται ειδικά σχεδιασμένες δεξαμενές ή δοχεία καλλιέργειας. Για καλλιέργειες μικρότερης κλίμακας χρησιμοποιούνται επίσης, δοκιμαστικοί σωλήνες, τρυβλία, κωνικές, πλαστικές ή και γυάλινες φιάλες.

1.5.8. Χρόνος παραμονής της καλλιέργειας

Είναι μια μεταβλητή παράμετρος. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η καλλιέργεια χρειάζεται συνήθως 10 έως 15 ημέρες για να αποκτήσει την κατάλληλη πυκνότητα για τη διατροφή των οργανισμών στην υδατοκαλλιέργεια και για να φτάσει σε μία στατική φάση.

1.6. *Dunaliella* sp.

1.6.1. Γενική Περιγραφή

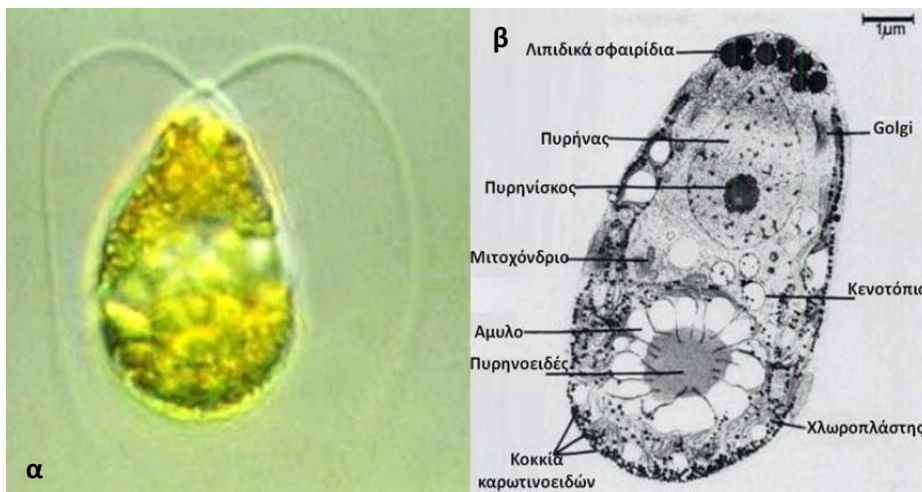
Η *Dunaliella* είναι ένα μονοκύτταρο, φωτοσυνθετικό πράσινο φύκι (Oren, 2014), το γένος της *Dunaliella* ανήκει στην οικογένεια Chlorophyceae και της ομοταξίας Chlorophyta. Σύμφωνα με τον Massjuk (1973) και των Polle, et al. (2020) η ταξινόμια του γένους είναι ακόμη ασαφής και οποιοσδήποτε γνώσεις πάνω εκεί έχουν αποκαλυφθεί με τη χρήση μοριακής φυλογενετικής ανάλυσης (Preetha, et al., 2012). Δεδομένου ότι το γένος ερευνάται για περισσότερο από έναν αιώνα (Preetha, et al., 2012), έχει εξελιχθεί σε έναν κρίσιμο οργανισμό-μοντέλο για την έρευνα των μηχανισμών που εμπλέκονται στην προσαρμογή των φυκών στο αλάτι. Τα είδη *Dunaliella* απαντώνται σε αφθονία σε θαλάσσια, αλατούχα και υπεραλατούχα ενδιαιτήματα και είναι ζωτικής σημασίας για τη βιοτεχνολογία. Επιπλέον είναι ένας κρίσιμος πρωτογενής παραγωγός στα υπεραλατούχα ενδιαιτήματα που επιτρέπει σε άλλα πλάσματα, συμπεριλαμβανομένων των διηθηματοφάγων και μιας ποικιλίας πλαγκτονικών ζώων, να επιβιώσουν. Ειδικότερα, αποτελεί βασική πηγή διατροφής για την *Artemia*, ο αριθμός του οποίου συχνά αυξάνεται σε συσχέτιση με τη μείωση των πληθυσμών της *Dunaliella* (Oren, 2014). Αν και υπάρχουν μερικά σπανιότερα είδη γλυκού νερού, πρόκειται κυρίως για θαλάσσιο είδος (Melkonian & Preisig, 1984). Πρόκειται για ένα γένος που ορισμένα είδη του μπορούν να αναπτυχθούν κάτω από εξαιρετικά δύσκολες συνθήκες, συμπεριλαμβανομένων των υψηλών εντάσεων φωτός, των υψηλών συγκεντρώσεων αλατιού και των χαμηλών επιπέδων οξυγόνου και αζώτου, παρόλα αυτά εξακολουθούν να είναι πολύ κοινά σε λίμνες και λιμνοθάλασσες σε όλο τον κόσμο. Αυτά τα είδη μπορούν να συσσωρεύουν σχετικά μεγάλες ποσότητες β-καροτενοειδών και γλυκερόλης.

Τα είδη *Dunaliella* που ευδοκούν σε υπεραλατούχα περιβάλλοντα, όπως οι αλυκές, οι αλμυρές λίμνες και οι λίμνες κρυσταλλοποίησης, είναι γνωστά ως αλοφιλικά είδη *Dunaliella*. Ορισμένα από αυτά βρίσκονται γύρω από τα επίπεδα κορεσμού του NaCl σε συγκέντρωση 5,5M, ενώ άλλα βρίσκονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις NaCl σε συγκέντρωση 0,05M (Chen & Jiang, 2009; Ben-Amotz & Avron, 1990). Η ικανότητά του να ευδοκιμεί σε ένα τόσο ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων αλατιού, του επιτρέπει να υπερτερεί από τα άλλα είδη στο οικοσύστημά του (Melkonian & Preisig, 1984).

1.6.2. Μορφολογικό και Φυσιολογικό επίπεδο της *Dunaliella*

Το είδος *Dunaliella* δεν έχει κυτταρικό τοίχωμα και διαθέτει δύο ισομετρικά μαστίγια που είναι μεγαλύτερα από το μήκος του κυττάρου 1,5 έως και 2 φορές περισσότερο. Συγκριτικά με άλλα είδη μαστιγοφόρων χλωροφυκών που έχουν ανακαλυφθεί σε υπεραλατούχα περιβάλλοντα, η *Dunaliella* έχει συχνά πολύ μικρότερα κύτταρα. Το εξαιρετικό βλεννώδες περίβλημα της αποτελείται κυρίως από γλυκοπρωτεΐνες.

Το κύτταρο της *Dunaliella* έχει ένα ευρύ φάσμα σχημάτων (Εικόνα 1α), όπως κυλινδρικό, ωοειδές, ελλειψοειδές, ατρακτοειδές και σφαιρικό, ανάλογα με το περιβάλλον, οι κυριότεροι παράμετροι που επηρεάζουν το σχήμα τους είναι οι διακυμάνσεις της αλατότητας, της θερμοκρασίας, του φωτός και των θρεπτικών συστατικών. Το τυπικό αχλαδόμορφο σχήμα του κυττάρου έχει έναν εκτεταμένο πυρήνα που είναι τοποθετημένος κεντρικά στο μπροστινό μέρος. Είναι καλυμμένος και δύσκολα ορατός από τα λιπιδικά κενά και τα σταγονίδια που τον περιβάλλουν (Melkonian & Preisig, 1984). Ο χλωροπλάστης, ο οποίος σχεδόν γεμίζει το πρωτόπλασμα, και πολλά μικρά κενοτόπια περιβάλλουν σημαντικό μέρος του πυρήνα. Στο χλωροπλάστη της *Dunaliella* υπάρχει ένα πυρηνοειδές στο κέντρο του, που περιβάλλεται από συσσωματώματα αμύλου, ένα υποπροϊόν της φωτοσύνθεσης, (Εικόνα 1β). Είναι ένα πολύ δραστήριο είδος, κινείται προς τα εμπρός με χαρακτηριστικό τρόπο, με ξαφνικές και περιστροφικές κινήσεις και με περιόδους "ανάπαυσης" με τρεμοπαίξιμο.



Εικόνα 1. Το αχλαδοειδές σχήμα του κυττάρου της *Dunaliella* με 2 μαστίγια (α) και οι επιμέρους κυτταρικές δομές του (β) (Χώτος, 2019).

Η ωσμωτική ανισορροπία μεταξύ του κυτταροπλάσματος, του κυττάρου και του υπερβολικά πυκνού σε αλάτι νερού εξισορροπείται με την παραγωγή γλυκερόλης από το κύτταρο, ως το κατάλληλο διαλυτό μόριο. Η έλλειψη κυτταρικού τοιχώματος εμποδίζει τη σταθερότητα της κυτταρικής μορφής, και επειδή είναι σχετικά εύπλαστη, επηρεάζεται γρήγορα από την

ωσμωτική κατάσταση του περιβάλλοντος νερού. Ανάλογα με το αν το νερό είναι σημαντικά πυκνότερο ή αραιότερο από το κυτταρόπλασμα, το κυτταρικό σχήμα είτε διαστέλλεται είτε συστέλλεται. Τα κύτταρα *Dunaliella* χρησιμοποιούν μια διαφορετική "στρατηγική" για την αντιμετώπιση των ωσμωτικών πιέσεων - παραγωγή και συσσώρευση γλυκερόλης- από τα άλλα φύκη στην ωσμωρύθμιση, τα οποία διαθέτουν ένα σφυγμώδες κενοτόπιο που τα βοηθάει. Η ενδοκυτταρική γλυκερόλη, η οποία δημιουργείται είτε από τη φωτοσύνθεση είτε από τη διάσπαση του αμύλου, βοηθά τα κύτταρα να προσαρμοστούν σε ένα σοβαρό

ωσμωτικό στρες εξισορροπώντας τις εξωτερικές πιέσεις και περιορίζοντας τη διόγκωση των κυττάρων (Petrovska, et al., 1999). Λόγω του εξαιρετικά αποτελεσματικού ωσμωρυθμιστικού της συστήματος, η *Dunaliella* είναι σε θέση να είναι τόσο ανθεκτική στην αλατότητα.

Οι χρωστικές της χλωροφύλλης δίνουν στα κύτταρα μια κίτρινη έως πράσινη όψη κάτω από ευνοϊκότερες συνθήκες. Η *Dunaliella* διαθέτει μία έως δύο σειρές λιπιδίων στον χλωροπλάστη της και το φωτοσυνθετικό σύστημα της βασίζεται στη χλωροφύλλη-α και τη χλωροφύλλη-β, που συμπληρώνεται με άλλα καροτενοειδή, όπως η λουτεΐνη και το β-καροτένιο (Oren, 2020).

Τα β-καροτένια μπορεί να συσσωρεύονται ως σφαιρίδια ελαίου εντός των θυλακοειδών μεμβρανών, ιδίως σε περιβάλλοντα με υψηλή αλατότητα και ένταση φωτός.

Η συσσώρευση τεράστιων ποσοτήτων της χρωστικής β-καροτένιο εντός του χλωροπλάστη, γεμίζει την περιφέρεια του χλωροπλάστη και το κύτταρο έχει ένα πορτοκαλοκόκκινο χρώμα (Εικόνα 2) και είναι ένα εντυπωσιακό χαρακτηριστικό των συγκεκριμένων ειδών. Το χρώμα του κυττάρου αλλάζει από πράσινο (όταν περιέχει λίγο β-καροτένιο) σε πορτοκαλοκόκκινο (όταν περιέχει πολύ β-καροτένιο) ως αποτέλεσμα των καροτενίων που καλύπτουν την πράσινη χλωροφύλλη. Επομένως εφόσον ο χλωροπλάστης είναι η μεγαλύτερη μάζα του κυττάρου, τα καροτένια που καλύπτουν τον χλωροπλάστη καθορίζουν το χρώμα του κυττάρου.



Εικόνα 2. Κύτταρα *Dunaliella salina* χρωματισμένα κόκκινα λόγω συσσώρευσης β-καρωτινίου σε υψηλή αλατότητα (στη φωτογρ. αριστερά σχηματίστηκαν ήδη κρύσταλλοι άλατος). Δείγματα από κρυσταλλωτήρια αλυκών Μεσολογίου (Χώτος, 2019).

Σε λεκάνες με εξαιρετικά υψηλή αλατότητα, το φαινόμενο του πορτοκαλοκόκκινου χρωματισμού ευδοκιμεί. Εκτός του ότι χρησιμεύει ως βοηθητική χρωστική ουσία για τη χλωροφύλλη, μεταφέροντας φωτόνια στη χλωροφύλλη-α του φωτοσυνθετικού κέντρου, το β-καροτένιο λειτουργεί επίσης για την προστασία της χλωροφύλλης και του κυτταρικού DNA από την υπερβολική έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία (Ben-Amotz, et al., 1982; Ben-Amotz, et al., 1988). Το β-καροτένιο χρησιμεύει επίσης και ως "αποθήκη" για τον επιπλέον άνθρακα που έχουν δεσμεύσει τα υψηλής φωτοσύνθεσης κύτταρα. Καταστάσεις στρες, όπως η υψηλή ένταση φωτός, η υψηλή συγκέντρωση αλατιού, η στέρηση νιτρικών και οι υψηλές θερμοκρασίες, προκαλούν μαζική σύνθεση β-καροτενίου στα πορτοκαλί στελέχη της *Dunaliella* (Oren, 2020). Το β-καροτένιο απορροφά περισσότερο στα 450 nm, με μια μικροσκοπική κορυφή που εμφανίζεται στα 480 nm (Oren, 2020).

Πρόσφατες έρευνες, όπως των Maadane et al. (2015), των Gangadhar et al. (2016), των Assuncao et al. (2017) και των García et al. (2017), έχουν δείξει ότι τα μικροφύκη μπορούν να δημιουργήσουν και αντιοξειδωτικές ενώσεις. Μικρά μόρια, όπως το β-καροτένιο, η ασταξανθίνη και οι φαινολικές ενώσεις, έχουν

μελετηθεί ευρέως για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα και δράση (Khanra, et al., 2018; Gangl, et al., 2015; Villarruel-López, et al., 2017).

Προς το παρόν, χρησιμοποιούνται ζωικές και μικροβιακές πηγές για την παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων (Raveendran, et al., 2018). Η ικανότητα της *Dunaliella* να αυξάνει τα επίπεδα των ενζυμικών (κυρίως καταλάση, υπεροξειδάση και υπεροξειδική δισμουτάση) και μη ενζυμικών (καροτενοειδή, φαινολικά, ασκορβικό και γλουταθειόνη) αντιοξειδωτικών της για τη μείωση του στρες που προκαλείται από εξωγενείς αβιοτικούς παράγοντες έχει καταδειχθεί σε πολλές αναφορές (Widowati, et al., 2017; Hanaa, et al., 2004; Haghjou, et al., 2009; Saha, et al., 2013; Al-Rashed, et al., 2016; Mirshekari, et al., 2019). Η *Dunaliella* θα μπορούσε να είναι μια τέλεια φυσική πηγή για την παραγωγή αντιοξειδωτικών λόγω της μεγάλης προσαρμοστικότητάς της σε εξωτερικούς στρεσογόνους παράγοντες (οξειδωτικούς και ώσμωσης) και της απουσίας άκαμπτου κυτταρικού τοιχώματος (Hosseini Tafreshi & Shariati, 2009), χωρίς να ανταγωνίζεται για καλλιεργήσιμη γη ή γλυκό νερό. Είναι σε θέση να παράγει σημαντικές ποσότητες βιομάζας με αποτελεσματικό και βιώσιμο τρόπο (Shariati & Hadi, 2011).

1.6.3. Καταγραφόμενες συνθήκες ανάπτυξης της *Dunaliella*

Η υψηλή ανθεκτικότητα στις μεταβολές της αλατότητας, του pH και της θερμοκρασίας είναι ένα καθοριστικό χαρακτηριστικό του γένους *Dunaliella*. Ωστόσο, το ιδανικό pH για την ανάπτυξή του είναι 6 για τη *D. tertiolecta* και 9 για τα *D. salina* και *D. Viridis*, η θερμοκρασία περίπου στους 25 °C και η αλατότητα περίπου στους 50-70 ppt. Αν και δεν θέτει αυστηρούς περιορισμούς, το φως αποτελεί σημαντικό παράγοντα (Χώτος, 2019). Όλες οι καλλιέργειες με εντάσεις φωτός μεταξύ 2.500 και 10.000 lux είχαν καλές επιδόσεις και αρκετές από αυτές παρέμειναν ακόμη και υγιείς και πράσινες κατά τη διάρκεια φάσεων στασιμότητας για αρκετούς μήνες χωρίς θρεπτικά στοιχεία ή αερισμό και έτοιμες να αναβιώσουν με μετάγγιση σε νέο, φρέσκο λιπασμένο νερό (Χώτος, 2019).

1.7. Αξίες και Εφαρμογές μικροφυκών

Το θεμέλιο των τροφικών αλυσίδων στους θαλάσσιους βιότοπους είναι τα μικροφύκη. Η βιοχημική σύνθεση των μικροφυκών ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με το είδος και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Για παράδειγμα, κάποια είδη μικροφυκών είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, ενώ άλλα είναι πλούσια σε λιπίδια ή υδατάνθρακες. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέροντα λόγω των πλεονεκτημάτων τους. Στα πλεονεκτήματα αυτά περιλαμβάνονται η απλότητα στο χειρισμό, η ευκολία στην καλλιέργειά τους, η απορρόφηση θρεπτικών συστατικών και η παραγωγή ποικίλων τοξινών, οι οποίες φαίνεται να χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιατρική και τη φαρμακευτική βιομηχανία.

Τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται σε διάφορους βιοτεχνολογικούς τομείς, όπως στην υγεία (εμβόλια και φάρμακα), στα καλλυντικά, στα συμπληρώματα διατροφής και ως πηγή τροφής για μια ποικιλία ζωντανών οργανισμών. Για παράδειγμα, κάποιες από τις χρήσεις τους είναι η παραγωγή βιοκαυσίμων και βιοντίζελ (Chisti , 2007; Hu, et al., 2008; Schenk, et al., 2008), ο καθαρισμός υγρών αποβλήτων υπό αυτοτροφικές ή μιξοτροφικές συνθήκες (Orús , et al., 1991; Munoz & Guieysse , 2006), η παραγωγή υγιεινών τροφίμων (Natrash , et al., 2007; Plaza , et al., 2008) και φαρμάκων και ως ζωοτροφές για τις υδατοκαλλιέργειες (Spolaore, et al., 2006) και λιπάσματα (Spolaore, et al., 2006).

1.7.1. Χρήσεις στην Υγεία

Ειδικότερα από τα μικροφύκη μπορούν να εξαχθούν ενώσεις με υψηλή προστιθέμενη αξία, όπως λιπαρά οξέα (Cardozo , et al., 2007; Valencia, et al., 2007) , χρωστικές ουσίες (καροτενοειδή και φυκοκυανίνες), βιοχημικά σταθερά ισότοπα (Chisti , 2007; Borowitzka , 1991; Furuki , et al., 2003; Olaizola , 2003) και βιταμίνες όπως η βιοτίνη (Baker , et al., 1981), η βιταμίνη C (Survase , et al., 2006) και η βιταμίνη E (Running , et al., 2002; Bremus , et al., 2006). Επίσης, εμφανίζονται και ορισμένες φαρμακολογικές δραστηριότητες, μεταξύ αυτών είναι οι αντικαρκινικές (Saide , et al., 2020), οι αντιοξειδωτικές (Giordano, et al., 2018), οι αντιφλεγμονώδεις (Lauritano , et al., 2016; Lauritano , et al., 2020), οι αντιδιαβητικές (Lauritano & Ianora , 2016) και οι ανοσοτροποποιητικές δραστηριότητες (Riccio & Lauritano , 2019; Riccio, et al., 2020). Επιπροσθέτως έχουν εντοπιστεί διάφορες κατηγορίες ενώσεων που προέρχονται από τα μικροφύκη και παράγουν ενώσεις κατά της οστεοπόρωσης (Giordano, et al., 2018), κατά της φυματίωσης (Lauritano et al.20, 2018), κατά της υπέρτασης (Giordano, et al., 2018), κατά της επιληψίας (Brillatz , et al., 2018) και κατά της αθηροσκλήρωσης (Giordano, et al., 2018).

Κάποια πιο συγκεκριμένα παραδείγματα είναι ότι, η κρυπτοφυσίνη 1 αναστέλλει τη μίτωση των ιών HIV1, ιλαράς και του απλού έρπητα. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι οι γλυκοπρωτεΐνες που παράγονται από το *Chorella vulgaris* προστατεύουν από τη μετάσταση του όγκου και την ανοσοκαταστολή που προκαλείται από τη χημειοθεραπεία, ενώ έχει αποδειχθεί ότι τα καροτενοειδή των μικροφυκών, όπως το β-καροτένιο, καθώς και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (DHA και EPA) έχουν ισχυρή αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση. Κάποιες πειραματικές μελέτες έχουν αναφέρει ότι η τετραδοτοξίνη (ΤΤΧ) περιορίζει την επιθυμία για ναρκωτικά και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικό μέσο για την απεξάρτηση από την ηρωίνη.

1.7.2. Χρήσεις στην βιοαποικοδόμηση και την παραγωγή βιοκαυσίμων και βιοντίζελ

Τα μικροφύκη παίζουν ενεργό ρόλο στην βιοαποικοδόμηση πραγματοποιούν ένα σύνολο βιοχημικών διαδικασιών, που μπορούν να μειώσουν την τοξικότητα βαρέων μετάλλων, όπως Hg και Cd. Επιπλέον, λόγω

των εσωτερικών μεταβολικών διεργασιών τους, τα μικροφύκη διαθέτουν μηχανισμούς αντίστασης στα ξενοβιοτικά (Montingelli, et al., 2015).

Το συμβατικό καύσιμο ντίζελ μπορεί να αντικατασταθεί με βιοντίζελ, το οποίο παράγεται από βιώσιμες βιολογικές πηγές, συμπεριλαμβανομένων της βιοαιθανόλης, των βιοελαίων και συχνά των φυτικών και ζωικών λιπών. Το βιοντίζελ είναι βιοδιασπώμενο, μη τοξικό και εκπέμπει ελάχιστα επιβλαβή αέρια, η κατανάλωσή του προσφέρει μια σειρά από πλεονεκτήματα. Καλλιέργειες μικροφυκών όπως *Scenedesmus obliquus*, *Botryococcus braunii*, *Cylindrotheca sp.*, *Schizochytrium sp.* κ.λπ. μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοντίζελ. Αυτά τα μικροφύκη έχουν πολύ υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης και παραγωγικότητας, η μέγιστη παραγωγή λιπών που μπορεί να περιέχει η βιομάζα των μικροφυκών φτάνει μέχρι και το 30% (w/w). Όπως έχει ήδη επισημανθεί, η ικανότητα των μικροφυκών να αναπτύσσονται γρήγορα και να επεκτείνουν τη βιομάζα τους καθώς και την υψηλή περιεκτικότητά τους σε λιπαρά οξέα (έως και 80% του ξηρού βάρους τους σε ορισμένες περιπτώσεις) τα καθιστούν ιδιαίτερα ενδιαφέροντα για την παρασκευή βιοκαυσίμων. Λόγω ορισμένων τεχνολογικών και οικονομικών προκλήσεων, η σύνθεση βιοντίζελ από μικροφύκη είναι προς το παρόν ασύμφορη, ωστόσο, τα ζητήματα αυτά μπορούν να επιλυθούν καθώς θα βελτιώνεται η βιοτεχνολογία και η παραγωγή καυσίμων (Jankowska, et al., 2017).

1.7.3. Χρήσεις στην παραγωγή καλλυντικών και στη βιομηχανία τροφίμων

Το μικροφύκος *Dunaliella salina* χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής και καλλυντικό στοιχείο λόγω των ισχυρών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του και της υψηλής συγκέντρωσης καροτενοειδών του. Επιπλέον η σπιρουλίνα που είναι ένα δημοφιλές συμπλήρωμα διατροφής που χρησιμοποιείται από τους ανθρώπους, προέρχεται από ένα γένος κυανοβακτηρίων που είναι βρώσιμα. Όλα τα μέταλλα, οι βιταμίνες και τα ιχνοστοιχεία που χρειάζεται ο οργανισμός είναι παρόντα στη σπιρουλίνα. Αποτελεί καλή πηγή οργανικού σιδήρου και είναι απολύτως ασφαλής για κατανάλωση. Το β-καροτένιο και η βιταμίνη E βρίσκονται επίσης σε αυτήν. Το β-καροτένιο δεν είναι τοξικό ακόμη και σε μεγάλα επίπεδα, σε αντίθεση με την βιομηχανοποιημένη βιταμίνη A και εκείνη που βρίσκεται στα ιχθυέλαια. Τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται επίσης και στη βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετα των τροφών σαν στερεωτικοί παράγοντες, πηκτικά και χρωστικές όπως τα καροτένια.

1.7.4. Χρήσεις στις υδατοκαλλιέργειες

Στην υδατοκαλλιέργεια αποτελεί κοινή πρακτική η παραγωγή φυτοπλαγκτού για την παραγωγή ζωοπλαγκτού, το οποίο αποτελεί τη φυσική ζωντανή τροφή για τις προνύμφες των ψαριών, για κάποια ασπόνδυλα και για είδη με παρόμοιες διατροφικές συνήθειες. Μπορεί επίσης να παρασκευαστεί και σαν ξηρή τροφή. Τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται επίσης σε καλλιέργειες "πράσινου νερού" προκειμένου να

διατηρηθεί η ποιότητα του νερού στις δεξαμενές εκτροφής των προνυμφών. Τέλος, οι υδατοκαλλιέργειες μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα μικροφύκη ως βιοφίλτρα για να απαλλαγούν από θρεπτικούς μικροοργανισμούς.

1.7.5. Πιθανές χρήσεις σε περιβαλλοντικά προβλήματα

Σύμφωνα με μια θεωρία, τα μικροφύκη θα μπορούσαν ενδεχομένως να απορροφήσουν μέρος του διοξειδίου του άνθρακα από τις βιομηχανικές εγκαταστάσεις (Sawayama , 1996; Yun , et al., 1997), καθιστώντας τα, δυνητικούς δεσμευτές CO₂ που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου (ET-Πρωτόκολλο του Κιότο). Τα μικροφύκη μπορούν επίσης να καλλιεργηθούν σε τεράστιες δεξαμενές αλατούχων υδάτων ή σε άνυδρα εδάφη ακατάλληλα για συμβατική γεωργία, όπως περιοχές ερήμου (Converti, et al., 2009).

1.8. Καταπόνηση αλατότητας

Βάση των Imran, et al., 2018 , το στρες αλατότητας είναι ένας σημαντικός περιβαλλοντικός παράγοντας, μία από τις σημαντικότερες αβιοτικές καταπονήσεις, η οποία έχει βαθύτατο αντίκτυπο σε όλες τις πτυχές της φυσιολογίας και του μεταβολισμού των φυκών. Για να κατανοηθεί ο τρόπος με τον οποίο τα φύκη αντιδρούν και προσαρμόζονται στις μεταβολές της αλατότητας, οι φυσιολογικές και βιοχημικές αντιδράσεις ερευνώνται εντατικά (Kirst , 1990). Ωστόσο, δεν έχει μελετηθεί σε βάθος η έρευνα σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο το στρες αλατότητας επηρεάζει την ικανότητα των φυκών να προκαλούν οξειδωτικό στρες (Jahnke & White , 2003; Liu , et al., 2007). Ανάλογα με το βαθμό ανοχής τους, τα φύκη χωρίζονται σε δύο ομάδες. Τα αλοφυτικά, δηλαδή τα φύκη που χρειάζονται αλάτι για την βέλτιστη ανάπτυξη τους και τα αλοανεκτικά, δηλαδή τα φύκη που διαθέτουν μηχανισμούς απόκρισης που τους επιτρέπουν να επιβιώνουν σε ένα αλατούχο μέσο (Rao , et al., 2007). Η *Dunaliella* ανταποκρίνεται στο αλατούχο στρες με την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων γλυκερόλης, την αύξηση της απομάκρυνσης ιόντων Na⁺ και την συσσώρευση ειδικών πρωτεϊνών (Pick , 2002). Η γλυκερόλη φαίνεται να δρα ως ρυθμιστής της ωσμωτικής κατάστασης στην *Dunaliella*, αν και η φυσιολογική σημασία και λειτουργία της μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το είδος (Hadi , et al., 2008). Σύμφωνα με τους Kawasaki et al. (2001) και τους Ozturk et al. (2002), το στρες αλατότητας προκαλεί μια σειρά από μεταβολές στη φωτοσύνθεση, τη φωτοαναπνοή, την ωσμωτική προσαρμογή και τον διαμερισμό, καθώς και στη σύνθεση αμινοξέων και υδατανθράκων. Αυτά μπορεί να επιφέρουν την μετάλλαξη του DNA, την μετουσίωση των πρωτεϊνών, την υπεροξειδωση των λιπιδίων, την λεύκανση της χλωροφύλλης, την μείωση της ακεραιότητας της μεμβράνης και μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στα φωτοσυστήματα των μικροφυκών (Leshem , et al., 2007).

1.9. Σκοπός εργασίας

Με τις χρήσεις των μικροφυκών σε ευρεία πεδία της καθημερινότητας και με τις ικανότητες και τις δυνατότητες που παρουσιάζουν τίθεται άμεση ανάγκη για την κατανόηση και την εξέλιξη των διαδικασιών ως προς την απόκριση τους στο στρες αλατότητας αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα να επιφέρει σημαντικές καινοτομίες τόσο στις βιοτεχνολογικές εφαρμογές όσο και στην καθημερινότητα του ανθρώπου.

Η παρούσα έρευνα έχει ως στόχο να μελετήσει τις συνθήκες καλλιέργειας και τις αλλαγές που επάγονται από την επίδραση της καταπόνησης αλατότητας στο μικροφύκος *Dunaliella sp.* καθώς και στα χαρακτηριστικά της παραγόμενης βιομάζας του. Πιο συγκεκριμένα να μελετηθεί η καμπύλη ανάπτυξης σε συνθήκες υψηλής αλατότητας με την χρήση φωτομετρικών τεχνικών και του μικροσκοπίου, να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα των ολικών χλωροφυλλών, η περιεκτικότητα καροτενοειδών και το επίπεδο των πρωτεϊνών με τη χρήση φωτομετρικών τεχνικών. Επιπλέον θα προσδιοριστεί και το ολικό αντιοξειδωτικό δυναμικό τους με την εφαρμογή της μεθόδου FRAP.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Συνθήκες ανάπτυξης της *Dunaliella* στο εργαστήριο

Το πείραμα έλαβε χώρα στο εργαστήριο Οικολογίας και Δυναμικής Συστημάτων του Τμήματος Ωκεανογραφίας και Θαλασσίων Βιοεπιστημών. Το είδος με το οποίο έχει γίνει το πείραμα είναι το *Dunaliella sp.* που έχει απομονωθεί από τις αλυκές της Καλλονής τον Οκτώβριο του 2021.

Ο φωτισμός ήταν σε κύκλο 12 ωρών φωτός/12 ωρών σκότους, η θερμοκρασία ήταν $18 \pm 2^\circ\text{C}$ και το pH $8,0 \pm 0,2$.

2.2. Σχεδιασμός Πειράματος

Με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία τα περισσότερα μικροφύκη αναπτύσσονται κανονικά σε συνθήκες αλατότητας 1M-2,5M NaCl ενώ πολλά είναι αυτά που αναπτύσσονται και σε αλατότητες με 4M NaCl, ωστόσο το εύρος της αλατότητας στο φυσικό περιβάλλον ανέρχεται στα 0,5M-5,5M NaCl. Επομένως για το συγκεκριμένο πείραμα επιλέχθηκαν οι αλατότητες 0M NaCl, που ήταν το control, 1M NaCl και 2M NaCl. Επειδή θα ελεγχόντουσαν αρκετές παράμετροι και θα πραγματοποιούνταν αρκετές αναλύσεις – βιομάζα, χλωροφύλλες, καροτενοειδή, αντιοξειδωτικά, διαδικασίες GC-MS και UPLC- επιλέχθηκαν φιάλες των 2L και τρεις για κάθε αλατότητα. Στην συγκεκριμένη πτυχιακή δεν θα αναλυθούν οι διαδικασίες των GC-MS και UPLC, καθώς τα δείγματα θα αναλυθούν μεταγενέστερα.

Αναλυτικότερα, δημιουργήθηκε μια φρέσκια καλλιέργεια -η αναλυτική διαδικασία παρουσιάζεται στο 2.3.- ώστε τα κύτταρα που θα χρησιμοποιηθούν για το εμβόλιο να είναι στην αρχή της ζωής τους. Για κάθε δίλιτρη φιάλη υπολογίστηκαν 1800mL F_2 – για το αντίστοιχο διάλυμα θρεπτικών το καθ' ένα- και 200mL από το εμβόλιο, άρα θα χρειαστούν 3 διαφορετικά θρεπτικά των 5,5L - 5,400mL για τις καλλιέργειες και 100mL για τα τυφλά- δηλαδή 5,5L για το 0M NaCl, 5,5L για το 1M NaCl και 5,5L για το 2M NaCl. Τα τρία θρεπτικά φτιάχτηκαν σε μια κωνική των 5L και σε ένα μπουκάλι του 1L το κάθε ένα και μπήκαν για αποστείρωση στους 120° C για 20 λεπτά. Όταν έχει ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία, θα χωριστούν τα διαλύματα στις 9 δίλιτρες κωνικές και θα κρατηθούν τα mL των τυφλών τους, για παράδειγμα για το 0M NaCl θα υπάρχει το 0M1, το 0M2 και το 0M3 και θα μπει σε κάθε μια φιάλη 1800mL θρεπτικό διάλυμα 0M NaCl και 200mL στην κάθε μια από το εμβόλιο. Παρόμοια θα δημιουργηθούν και οι επόμενες καλλιέργειες των 1M NaCl και των 2M NaCl.

Μόλις ξεκινήσει το πείραμα θα παρακολουθείται καθημερινά η καμπύλη κυττάρων με μετρήσεις στο μικροσκόπιο και στο φασματοφωτόμετρο ώστε να υπάρχει πλήρη εικόνα της βιομάζας και της ανάπτυξης των κυττάρων στις εκάστοτε συνθήκες. Επιπλέον ήταν ένας δείκτης για να προσδιοριστεί η κατάλληλη ημέρα που θα ξεκινούσαν και οι υπόλοιπες μετρήσεις. Εφόσον ξεκινούσε η πρώτη μέτρηση των χλωροφυλλών και των πρωτεϊνών τότε οι μετρήσεις για αυτές τις μεταβλητές θα γινόντουσαν μέρα παρά μέρα, εκτός αν υπήρχε μεγάλη αύξηση των κυττάρων, τότε θα παίρνονταν δείγμα και την μέρα εκείνη. Το δείγμα κάθε φορά για τις διαδικασίες αυτές ήταν 2mL και 2mL αντίστοιχα για κάθε κωνική. Για να παρθεί το δείγμα αποστειρωνόταν κάθε φορά πιπέτες των 10mL, σε συνδυασμό με ένα πουάρ παίρνονταν η κατάλληλη ποσότητα, η διαδικασία αυτή γινόταν για να μην μολυνθούν οι καλλιέργειες. Στην συνέχεια, μόλις οι καλλιέργειες ήταν στην κατάλληλη φάση θα ξεκινούσαν και οι δειγματοληψίες για τις διαδικασίες της FRAP, του GC-MS και του UPLC. Για αυτές τις διαδικασίες το δείγμα συνολικά από κάθε κωνική θα ήταν 450mL, αλλά επειδή έπρεπε να απλοποιηθεί η διαδικασία έμπαιναν σε εννιά δόσεις των 50mL σε καθαρά αποστειρωμένα falcon. Δηλαδή παίρνονταν τα πρώτα 50mL και ύστερα προσθέτονταν και τα υπόλοιπα σταδιακά μετά την κάθε φυγοκέντριση- η διαδικασία θα επεξηγηθεί καλύτερα και παρακάτω στο υποκεφάλαιο 2.11. Όλα τα σκεύη που χρησιμοποιούνταν για διαδικασίες που αφορούσαν την άμεση επαφή με τις καλλιέργειες έπρεπε να είναι και αποστειρωμένα, για παράδειγμα οι πιπέτες που παίρνονταν καθημερινά δείγμα, τα falcon που χρησιμοποιούνταν για τις διαδικασίες, τα tips κτλπ.

Την πρώτη μέρα – μέρα 0 – των καλλιεργείων έπρεπε να μπει ένα σημάδι ώστε να φαίνεται πόση ήταν η εξατμηση του νερού κάθε βράδυ από τις αντλίες, καθώς έτσι θα υπήρχε αλλαγή στην συγκέντρωση των διαλυμάτων, για παράδειγμα μετά από ένα διάστημα αντί για 0M NaCl θα είχε διαφορετική συγκέντρωση άλατος -πυκνότερη- καθώς τα θρεπτικά και το αλάτι δεν εξατμίζονται, επομένως δεν θα ήταν σωστή η διαδικασία του πειράματος. Σε περίπτωση μείωσης του νερού, συμπληρωνόταν η καλλιέργεια με ddH₂O. Το σημάδι άλλαζε κάθε φορά που αφαιρούνταν δείγμα από την καλλιέργεια. Ωστόσο πριν γίνουν οι δειγματοληψίες έπρεπε κάθε κωνική να αναδεύεται – περίπου για δέκα λεπτά - πριν παρθεί το δείγμα για να

υπάρχει ομοιομορφία καθώς τα κύτταρα έχουν την τάση να καθιζάνουν πολύ εύκολα. Αν συμπληρωνόταν ddH₂O στην καλλιέργεια, η δειγματοληψία γινόταν μετά την ανάδευση με το προστιθέμενο νερό. Επιπλέον όλες οι μετρήσεις καταγραφόντουσαν στο excel με όλα τα απαραίτητα στοιχεία, -όπως ημερομηνία, ημέρα εμβολιασμού, όνομα κωνικής κλπ.

2.3. Προετοιμασία Πειράματος

Για να ξεκινήσει το πείραμα έπρεπε αρχικά να υπάρχει μια φρέσκια καλλιέργεια έτσι μέσα σε δύο εβδομάδες δημιουργήθηκε η καλλιέργεια.

Υπήρχαν 2 μικρές φιάλες των 50mL από το συγκεκριμένο είδος με περίπου 40mL η κάθε μία. Από αυτές πάρθηκαν 30mL από την κάθε μια και μπήκαν σε μια κωνική φιάλη του 1L μαζί με 440mL F₂ (η παρασκευή του θα αναλυθεί παρακάτω στο 2.4.), άρα συνολικά 500mL. Στις παλιές καλλιέργειες η αφαιρούμενη ποσότητα καλλιέργειας προστέθηκε ύστερα σε F₂ και στις δύο φιάλες. Μετά από τέσσερις μέρες, σε μία φιάλη 5L μπήκαν 500mL από την καλλιέργεια του 1L, 25mL από κάθε κωνική των 50mL και 1450mL F₂, με συνολικό όγκο του διαλύματος στα 2L. Αυτή η φιάλη μπήκε σε μόνιμη ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα και σε τεχνητό φως που επικρατούσε 12 ώρες «νύχτα» και 12 ώρες «μέρα». Παράλληλα προστέθηκαν στις κωνικές των 50mL, 25mL F₂ στην κάθε μια. Το εμβόλιο για να φτάσει στην επιθυμητή φάση χρειάστηκε περίπου 10 μέρες.

Στην αναμονή των ημερών αυτών έγιναν και οι υπόλοιπες διαδικασίες. Αρχικά δημιουργήθηκαν τα διαλύματα θρεπτικών με τις κατάλληλες συγκεντρώσεις αλατιού (η διαδικασία τους θα αναλυθεί παρακάτω στο 2.5.), όπου το κάθε διάλυμα έμπαινε για αποστείρωση στους 120° C για 20 λεπτά. Έπειτα, συλλέχθηκαν εννιά φιάλες των 2L και φτιάχτηκαν κατάλληλα πώματα. Τα πώματα έπρεπε να βοηθούν στον σωστό αερισμό των καλλιεργειών, έτσι δημιουργήθηκαν δύο τρύπες που περνούσε από την μία ένας μικρός γυάλινος σωληνάκι που έφτανε κοντά στον πάτο της φιάλης και από την άλλη ένα μικρότερο σωληνάκι που ήταν για την εξαγωγή του αέρα. Ύστερα καθαρίστηκαν οι 2L φιάλες, με νερό βρύσης και απιονισμένο νερό, και σκεπάστηκε το στόμιο τους με αλουμινόχαρτο για να μπουν στην αποστείρωση. Η αποστείρωση έγινε στους 120° C για 20 λεπτά. Και μετά μπήκαν στους 60°C για να εξατμιστούν οι υδρατμοί. Την μέρα που ήταν να γίνει ο εμβολιασμός (Μέρα 0), καθαρίστηκαν τα «καπάκια» που είχαν δημιουργηθεί -τα πώματα, με νερό βρύσης και απιονισμένο νερό, τοποθετήθηκαν τα υδρόφοβα βαμβάκια στα σωληνάκια για προστασία της καλλιέργειας από τους εξωτερικούς παράγοντες και τυλίχθηκαν με αλουμινόχαρτο για να μπουν στην αποστείρωση. Η αποστείρωση έγινε στους 120° C για 20 λεπτά. Εφόσον κρύωσαν τοποθετήθηκαν στις αποστειρωμένες φιάλες και ύστερα πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της δημιουργίας των καλλιεργειών.

2.4. Παρασκευή θρεπτικού F₂ ως τροφή των μικροφυκών

Για να παρασκευαστεί το θρεπτικό διάλυμα F₂ χρειάζεται διάφορα συστατικά, όπως θρεπτικά και μέταλλα, παρακάτω παρουσιάζεται το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα πτυχιακή. Ό,τι είναι σε σκόνη διαλύεται στα αντίστοιχα mL που αναφέρονται στο πρωτόκολλο με απιονισμένο νερό. Επιπλέον οι βιταμίνες δεν μπαίνουν για αποστείρωση.

Θρεπτικά

Συστατικά:

Ουσία	Παρασκευή Stock διαλύματος	Αποστείρωση
NaNO ₃	15gr / 200ml	NAI
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.565gr / 100ml	NAI
Na ₂ SiO ₃ 5H ₂ O	4.46gr / 200ml	NAI

Τα διαλύματα διατηρούνται στην ψύξη όμως το διάλυμα των φωσφορικών παρασκευάζεται κάθε φορά που φτιάχνεται το medium f/2.

Μέταλλα

Συστατικά:

Ουσία	Παρασκευή Stock διαλύματος	Αποστείρωση
CuSO ₄ 5H ₂ O	1.96gr / 200ml	NAI
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	1.26gr / 200ml	NAI
ZnSO ₄ 7H ₂ O	4.4gr / 200ml	NAI
CoCl ₂ 6H ₂ O	2gr / 200ml	NAI
MnCl ₂ 4H ₂ O	18gr / 100ml	NAI

Τα διαλύματα διατηρούνται στην ψύξη. Για να παρασκευαστεί το stock διάλυμα όλων των μετάλλων διαλύεται 0.86gr FeEDTA σε περίπου 100ml απιονισμένου νερού και στη συνέχεια προστίθεται 0.2ml από το καθένα από τα παραπάνω. Προστίθεται απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 200ml. Το τελικό διάλυμα διατηρείται στην ψύξη.

Medium f/2 (ή f/2 stock)

Για να παρασκευαστεί το medium f/2 αναμειγνύονται 25ml από τα τρία διαλείμματα θρεπτικών και 25ml από το stock διάλυμα όλων των μετάλλων. Μπαίνει για αποστείρωση στους 120° C για 20 λεπτά και το τελικό διάλυμα διατηρείται στην ψύξη.

Διάλυμα βιταμινών

Συστατικά:

Ουσία	Παρασκευή Stock διαλύματος	Αποστείρωση
Thiamine.HCl	0.4gr / 200ml	ΟΧΙ
Biotin + B12	Από 0.02gr / 200ml	ΟΧΙ

Το stock διάλυμα βιταμινών παρασκευάζεται αναμειγνύοντας 5ml του διαλύματος Thiamine.HCl και 0.5ml του διαλύματος Biotin/B12 και συμπληρώνεται απιονισμένο νερό μέχρι όγκου 100ml. Χωρίστηκαν σε Eppendorf των 1,5mL για περισσότερη ευκολία. Όλα τα διαλύματα διατηρούνται στην κατάψυξη στους -20° C.

Για το τελικό διάλυμα θρεπτικών:

Προστίθεται 4ml medium f/2 σε 1L γηρασμένου θαλασσινού νερού, αναδεύεται και αποστειρώνεται. Αφού κρυώσει προστίθεται ασηπτικά 1ml από το τελικό διάλυμα βιταμινών.

2.5. Παρασκευή θρεπτικού F₂ ως τροφή των μικροφυκών με τις κατάλληλες αναλογίες αλατιού (0M NaCl, 1M NaCl, 2M NaCl)

Για την παρασκευή όλων των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε τεχνητό θαλασσινό νερό, δηλαδή διαλυόταν το Microalgae Seasalt, ειδικό αλάτι με τα απαραίτητα ιχνοστοιχεία για τα μικροφύκη, σε 1L απιονισμένου νερού.

Η αναλογία είναι 40g Seasalt σε 1L απιονισμένου νερού. Επιπλέον τα παρακάτω συστατικά είναι τα ίδια που αναφέρονται και στο υποκεφάλαιο 2.4.

Αρχικά θα υπολογιστούν οι ποσότητες για το 0M NaCl, το μόνο που θα διαφέρει από τις αναλογίες των υπόλοιπων επιλεγμένων ποσοτήτων αλατότητας (1M NaCl και 2M NaCl), θα είναι το αλάτι. Ωστόσο επειδή δεν υπήρχε κωνική των 6L θα πρέπει να μοιραστεί το δείγμα σε μια κωνική των 5L και σε ένα μπουκάλι του 1L για όλα τα διαλύματα επομένως και οι μετρήσεις θα προσαρμοστούν ανάλογα.

Για την παρασκευή του 0M NaCl:

Για το Microalgae Seasalt:

Στην κωνική των 5L:

$$\left. \begin{array}{l} \text{Στα 1000mL dH}_2\text{O χρειάζονται 40g Seasalt} \\ \text{Στα 5000mL dH}_2\text{O χρειάζονται X g Seasalt} \end{array} \right\} X = \frac{5000 \text{ mL} \times 40\text{g}}{1000\text{mL}} \Rightarrow X = 200\text{g}$$

Στο μπουκάλι του 1L:

$$\left. \begin{array}{l} \text{Στα 1000mL dH}_2\text{O χρειάζονται 40g Seasalt} \\ \text{Στα 500mL dH}_2\text{O χρειάζονται X' g Seasalt} \end{array} \right\} X' = \frac{500 \text{ mL} \times 40\text{g}}{1000\text{mL}} \Rightarrow X' = 20\text{g}$$

Για το F₂:

Στην κωνική των 5L:

$$\left. \begin{array}{l} \text{Στα 1000mL διαλύματος χρειάζονται 4 mL F}_2 \text{ stock} \\ \text{Στα 5000mL διαλύματος χρειάζονται ψ mL F}_2 \text{ stock} \end{array} \right\} \psi = \frac{5000 \text{ mL} \times 4\text{mL}}{1000\text{mL}} \Rightarrow \psi = 20\text{mL}$$

Στο μπουκάλι του 1L:

$$\left. \begin{array}{l} \text{Στα 1000mL διαλύματος χρειάζονται 4 mL F}_2 \text{ stock} \\ \text{Στα 500mL διαλύματος χρειάζονται ψ' mL F}_2 \text{ stock} \end{array} \right\} \psi' = \frac{500 \text{ mL} \times 4\text{mL}}{1000\text{mL}} \Rightarrow \psi' = 2\text{mL}$$

Για τις βιταμίνες:

Στην κωνική των 5L:

Στα 1000mL διαλύματος χρειάζονται 1 mL Vitamins }
 Στα 5000mL διαλύματος χρειάζονται γ mL Vitamins } $\gamma = \frac{5000 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \Rightarrow \gamma = 5 \text{ mL}$

Στο μπουκάλι του 1L:

Στα 1000mL διαλύματος χρειάζονται 1 mL Vitamins }
 Στα 500mL διαλύματος χρειάζονται γ' mL Vitamins } $\gamma' = \frac{500 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \Rightarrow \gamma' = 0,5 \text{ mL}$

Όλα διαλύονται με απιονισμένο νερό. Οι βιταμίνες μπαίνουν μετά την αποστείρωση οπότε πρέπει να υπολογιστεί ο όγκος αυτός, άρα τα παραπάνω συστατικά πρέπει να διαλυθούν στην κωνική των 5L μέχρι τα 4.995mL και στο μπουκάλι του 1L μέχρι τα 499,5mL. Όλα τα διαλύματα διαλύθηκαν με την βοήθεια ενός μαγνητικού αναδευτήρα. Τα διαλύματα μπαίνουν στην αποστείρωση στους 120° C για 20 λεπτά και ύστερα προστίθενται ασηπτικά οι βιταμίνες εφόσον κρυώσει το διάλυμα.

Για την παρασκευή των διαλυμάτων 1M και 2M NaCl χρειάστηκαν δυο τύποι:

α) $n = \frac{m}{Mr}$, όπου

n:	ο αριθμός mol της διαλυμένης ουσίας
m:	η μάζα της χημικής ουσίας
Mr:	σχετική μοριακή μάζα

β) $C = \frac{n}{V}$, όπου

C:	η συγκέντρωση του διαλύματος
n:	ο αριθμός mol της διαλυμένης ουσίας
V:	ο όγκος του διαλύματος σε L

Επομένως από τους τύπους α και β προκύπτει ότι:

$$m = C \times Mr \times V$$

Άρα για να βρεθεί η ποσότητα του NaCl που χρειάζεται η κάθε συγκέντρωση υπολογίζεται από τον παραπάνω τύπο.

*Το Mr του NaCl είναι 58,44.

❖ Για το 1M θα χρειαστεί:

Στην κωνική των 5L:

$$m = C \times Mr \times V \Rightarrow m = 1 \times 58,44 \times 5 \Rightarrow m = 292,2 \text{ g NaCl}$$

Στο μπουκάλι του 1L:

$$m = C \times Mr \times V \Rightarrow m = 1 \times 58,44 \times 0,5 \Rightarrow m = 29,22 \text{ g NaCl}$$

❖ Για το 2M θα χρειαστεί:

Στην κωνική των 5L:

$$m = C \times Mr \times V \Rightarrow m = 2 \times 58,44 \times 5 \Rightarrow m = 584,4 \text{ g NaCl}$$

Στο μπουκάλι του 1L:

$$m = C \times Mr \times V \Rightarrow m = 2 \times 58,44 \times 0,5 \Rightarrow m = 58,44 \text{ g NaCl}$$

Οι αναλογίες που υπολογίστηκαν στο 0M NaCl για το Seasalt, το F₂ και τις Vitamins είναι ίδιες και για τα 1M NaCl και για τα 2M NaCl, δηλαδή:

Για το 1M NaCl

Για το Microalgae Seasalt:

Στην κωνική των 5L: 200g Seasalt

Στο μπουκάλι του 1L: 20g Seasalt

Για το NaCl:

Στην κωνική των 5L: 292,2 g NaCl

Στο μπουκάλι του 1L: 29,22 g NaCl

Για το F₂:

Στην κωνική των 5L: 20mL F₂

Στο μπουκάλι του 1L: 2mL F₂

Για τις βιταμίνες:

Στην κωνική των 5L: 5mL Vitamins

Στο μπουκάλι του 1L: 0,5mL Vitamins

Για το 2M NaCl

Για το Microalgae Seasalt:

Στην κωνική των 5L: 200g Seasalt

Στο μπουκάλι του 1L: 20g Seasalt

Για το NaCl:

Στην κωνική των 5L: 584,4 g NaCl

Στο μπουκάλι του 1L: 58,44 g NaCl

Για το F₂:

Στην κωνική των 5L: 20mL F₂

Στο μπουκάλι του 1L: 2mL F₂

Για τις βιταμίνες:

Στην κωνική των 5L: 5mL Vitamins

Στο μπουκάλι του 1L: 0,5mL Vitamins

Τα τυφλά θα φτιαχτούν κατευθείαν στις cuvettes. Για την δημιουργία των τυφλών θα παρθεί η κατάλληλη ποσότητα από τα διαλύματα F₂, ότι δεν χρησιμοποιήθηκε κρατήθηκε σε περίπτωση που χρειαστεί να φτιαχτεί και άλλο τυφλό.

Τυφλό Α (0M NaCl): 1mL στην cuvette

Τυφλό Β (1M NaCl): 900μL του Β + 100 μL του Α στην cuvette

Τυφλό C (2M NaCl): 900μL του C + 100 μL του Α στην cuvette

2.6.Μέτρηση κυττάρων για εμβολιασμό

Για να μετρηθούν τα κύτταρα του εμβολίου που θα υπάρχουν στις αρχικές καλλιέργειες ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

1. Μετριοούνται τα κύτταρα στο μικροσκόπιο σε εννιά πεδία με τις συντεταγμένες του μικροσκοπίου.

Τα κύτταρα που μετρήθηκαν στην συγκεκριμένη περίπτωση στο εμβόλιο ήταν 524 cells/mL.

2. Όσα κύτταρα μετρηθούν από το Βήμα 1 πολλαπλασιάζονται με τον αντίστοιχο συντελεστή.

Η μέτρηση έγινε στα εννιά πεδία και ο αντίστοιχος συντελεστής του μικροσκοπίου για τα εννιά πεδία είναι 3571.

$$\text{Άρα: } C_1 = 524 \times 3571 = 1.871.204 \frac{\text{cells}}{\text{mL}}$$

$$\text{Με αραιώση } 1/10 \text{ το } C_1 \text{ γίνεται: } C_1 = 187.120 \frac{\text{cells}}{\text{mL}}$$

3. Άρα από τον τύπο:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Όπου:

- το C_1 έχει βρεθεί από το Βήμα 2.
- το C_2 είναι η άγνωστη μεταβλητή της εξίσωσης.
- το V_1 είναι ο αρχικός όγκος που έχει υπολογιστεί να μπει στις καλλιέργειες, δηλαδή 0,2L. Οι μονάδες μέτρησης του στην εξίσωση είναι το L.
- το V_2 είναι ο τελικός όγκος που θα υπάρχει στην κωνική πριν ξεκινήσουν οι μετρήσεις δηλαδή 2L. Οι μονάδες μέτρησης του στην εξίσωση είναι το L.

4. Επομένως:

$$C_2 = \frac{C_1 \times V_1}{V_2} = \frac{187.120 \times 0,2}{2} = 18.712 \text{ cells/mL}$$

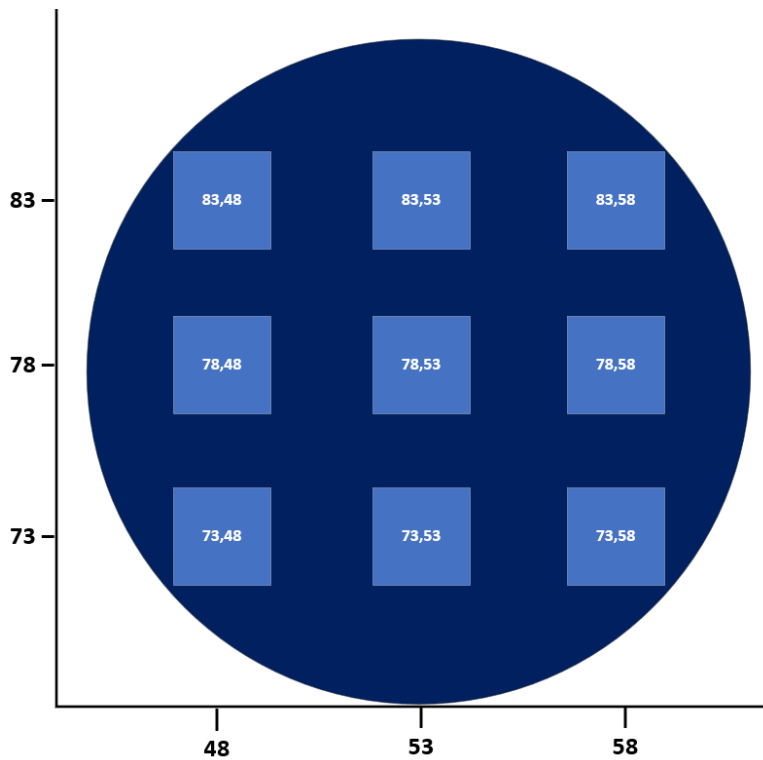
Έτσι τα κύτταρα που μπήκαν σε κάθε καλλιέργεια ήταν περίπου στα 18.712 cells/mL.

2.7. Διαδικασία μέτρησης βιομάζας

Η μέτρηση της βιομάζας για το συγκεκριμένο πείραμα έγινε με δύο τρόπους, με μετρήσεις του μικροσκοπίου και του φασματοφωτόμετρου.

Καθημερινά η ποσότητα που χρειαζόνταν και για τις δύο μετρήσεις ήταν περίπου 1,5mL. Το δείγμα παιρνόταν με σιφώνια, δηλαδή με καθαρές και αποστειρωμένες πιπέτες των 10mL με την βοήθεια του πουαρ, εφόσον

πρώτα η καλλιέργεια είχε αναδευτεί στον μαγνητικό αναδευτήρα για δέκα λεπτά. Για κάθε κωνική χρησιμοποιούνταν τρία errendorf των 1,5mL και για τις δύο διαδικασίες, στο ένα errendorf έμπαινε 1mL και λίγο παραπάνω καθώς οι cuvettes του φασματοφωτόμετρου είναι 1mL και στο δεύτερο errendorf έμπαινε το υπόλοιπο δείγμα. Το τρίτο errendorf χρειαζόταν για να προετοιμαστεί κατάλληλα το δείγμα που έμπαινε στην αντικειμενοφόρο πλάκα ώστε να μετρηθεί στο μικροσκόπιο. Όλες οι μετρήσεις των κυττάρων του



Εικόνα 3: Παρουσιάζονται οι συντεταγμένες του μικροσκοπίου που πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις για το συγκεκριμένο πείραμα. Ο κύκλος αντιπροσωπεύει την θέση του δείγματος και τα τετράγωνα την θέση των συντεταγμένων.

μικροσκοπίου έγιναν σε συγκεκριμένες συντεταγμένες και κάθε φορά μετρούνταν εννιά πεδία (Εικόνα 3).

Για τη μέτρηση των κυττάρων με την χρήση του μικροσκοπίου χρησιμοποιείται συγκεκριμένη διαδικασία:

Εφόσον έχει παρθεί το δείγμα, μεταφέρονται στο άδειο errendorf 300μL δείγματος και προστίθενται 50μL Lugol, και ανακινούνται το errendorf ώστε να γίνει ομοιόμορφο το δείγμα. Στην αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετείται πάνω η καλυπτρίδα αφήνοντας ένα μικρό κενό ώστε να τοποθετηθεί το δείγμα χωρίς την ύπαρξη αέρα. Το δείγμα που τοποθετείται στην αντικειμενοφόρο είναι 150μL. Θα πρέπει να περάσει ένα δεκάλεπτο για να ξεκινήσει η μέτρηση των

κυττάρων ώστε να προλάβουν να καθιζάνουν τα κύτταρα. Η μέτρηση γίνεται με τον φακό τον 40X, όλοι οι υπολογισμοί έχουν μετρηθεί με αυτόν τον φακό. Εφόσον μετρηθούν και τα εννιά πεδία του δείγματος τότε η τιμή αυτή εισάγεται στο excel για να δημιουργηθεί η καμπύλη κυττάρων. Όσα πιο πολλά πεδία μετριοούνται

Πίνακας 1. Απεικόνιση των πεδίων με τους αντίστοιχους συντελεστές για τις μετρήσεις των κυττάρων.

Πεδία	Συντελεστής	Πεδία	Συντελεστής
1	32.143	6	5.357
2	16.071	7	4.592
3	10.714	8	4.018
4	8.036	9	3.571
5	6.429		

τόσο λιγότερη είναι η τιμή των σφαλμάτων. Ανάλογα με τα πεδία που μετριοούνται υπάρχουν και οι κατάλληλοι συντελεστές (Πίνακας 1), οι συντελεστές πολλαπλασιάζονται με το τελικό αποτέλεσμα της μέτρησης των κυττάρων του κάθε δείγματος ώστε να προκύψουν τα κύτταρα σε ένα mL.

Για τη μέτρηση των κυττάρων με την χρήση του φασματοφωτόμετρου χρησιμοποιείται η παρακάτω διαδικασία:

Αρχικά, ρυθμίζονται το φασματοφωτόμετρο στα 680nm. Τα τυφλά έχουν ήδη φτιαχτεί στις cuvettes. Ανακινούνται τα δείγματα στα erpendorf και τα τυφλά, ώστε να είναι ομοιογενές το δείγμα, και με την πιπέτα βάζουμε στις cuvettes 1mL. Για να μετρηθούν τα δείγματα πρέπει να μηδενιστούν από το αντίστοιχο τυφλό τους δηλαδή, για τις μετρήσεις του 0M NaCl μηδενίζεται με το τυφλό του 0M, αφαιρείται η cuvette, καταγράφεται το αρνητικό νούμερο και στην συνέχεια καταγράφονται τα 0M1, 0M2 και 0M3 χωρίς να χρειαστεί να ξανά γίνει μηδενισμός. Όταν είναι να μετρηθεί το 1M NaCl θα μηδενιστεί πρώτα με το τυφλό του και μετά θα μετρηθούν οι τιμές των 1M1, 1M2 και 1M3, το ίδιο γίνεται και για την αλατότητα 2M NaCl.

2.8. Διαδικασία Λυοφιλίωσης

Η μέθοδος της λυοφιλίωσης ήταν αναγκαία ώστε να εξαχνωθεί το νερό, να αποτυπωθεί το καθαρό βάρος των δειγμάτων και να υπάρξει ένα σταθερό βιολογικό δείγμα. Λυοφιλιώθηκαν όλα τα δείγματα για όλες τις διαδικασίες, επομένως οι διαδικασίες πριν την λυοφιλίωση θα αναφέρονται στην κάθε υπό ενότητα στην περιγραφή των διαδικασιών παρακάτω. Η λυοφιλίωση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στους -59°C , υπό το κενό και για ένα 24ωρο.

2.9. Διαδικασία μέτρησης χλωροφυλλών-καροτονοειδών

Για την ανάλυση των χλωροφυλλών χρησιμοποιήθηκε μια φασματοφωτομετρική μέθοδος.

Φτιάχνεται διάλυμα ακετόνης 90% με αναλογία 9:1 – με ddH₂O. Για τις 9 κωνικές δείγματος χρειάστηκαν 18 erpendorf των 2mL καθώς οι δειγματοληψία γινόταν μαζί με εκείνη των πρωτεϊνών. Ζυγίζονται και 9 άδεια erpendorf των 1,5mL και καταγράφεται το πόσο είναι το κάθε ένα και σε τι δείγμα θα αντιστοιχεί. Με τα σιφώνια, που χρησιμοποιούνται για να παρθεί το δείγμα για το μικροσκόπιο και το φασματοφωτόμετρο, παίρνονται 4ml (2mL των χλωροφυλλών-2mL των πρωτεϊνών) από το εκάστοτε δείγμα, αφού πρώτα έχει ανακατευθεί στον μαγνητικό αναδευτήρα, και μοιράζονται στα 2 erpendorf των 2mL. Γίνεται φυγοκέντριση στις 13.000 rpm -στροφές- για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο πετάγεται και προστίθενται 1mL Ammonium Sulfate, είτε το 0M NaCl είτε το 1M NaCl είτε το 2M NaCl, ανάλογα την αλατότητα του δείγματος, στο δεύτερο erpendorf του αντίστοιχου δείγματος. Επαναδιαλύεται το pellet και μεταφέρεται το δείγμα στο πρώτο erpendorf του δείγματος όπου γίνεται ξανά επαναδιάλυση του pellet του πρώτου erpendorf και μετά

μεταφέρεται στο προζυγισμένο errendorf του 1,5mL. Γίνεται ξανά φυγοκέντριση στις 13.000 grm -στροφές- στους 4°C για 5 λεπτά και το υπερκείμενο πετάγεται. Έπειτα τα δείγματα μπήκαν στους -80°C για να πάνε για λυοφιλίωση. Στην λυοφιλίωση ανοίχτηκαν τα πώματα από τα errendorf και μετά από 24ώρες τα δείγματα ήταν έτοιμα. Η λυοφιλίωση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στους -59° C, υπό το κενό. Τα δείγματα ζυγίστηκαν, καταγράφηκαν τα βάρη τους και μπήκαν ξανά στους -80° C για να γίνουν σταδιακά οι αναλύσεις.

Επειδή οι χλωροφύλλες είναι πάρα πολύ ευαίσθητες όλη η διαδικασία γινόταν στον πάγο. Χρειάζονταν 1mL από το διάλυμα 90% acetate για να επαναδιαλυθεί το pellet, ύστερα το δείγμα μεταφέρεται σε ένα falcon των 15mL που δεν είχε ξανά χρησιμοποιηθεί. Από το ίδιο διάλυμα, 90% acetate, προστίθεται ακόμα 1mL στο errendorf για να ληφθεί ό,τι περισσευούμενο δείγμα υπήρχε, τέλος μεταφέρεται ξανά στο falcon των 15mL. Μέσα σε ένα beaker τοποθετείται πάγος για το sonication. Στο κάθε δείγμα γίνεται 5 φορές η παρακάτω διαδικασία, το δείγμα μπαίνει για 10'' στο sonication και 30'' στον πάγο, με amplitude 40%. Όταν ένα δείγμα τελειώσει με την συγκεκριμένη διαδικασία τότε από το falcon μεταφέρεται ξανά σε errendorf των 2mL και τοποθετείται σε ένα stand μέσα στην κατάψυξη στους -20° C μέχρι να τελειώσει το set ώστε να είναι σε κρύο μέρος και χωρίς φως. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία του sonication τα δείγματα πάνε για φυγοκέντριση στις 13.000 grm -στροφές- για 5 λεπτά στους 4° C.

Για τις χλωροφύλλες χρησιμοποιήθηκαν γυάλινες cuvettes των 2mL και για blank χρησιμοποιήθηκαν 2mL από το 90% acetate. Μετά την φυγοκέντριση, το υπερκείμενο των δειγμάτων τοποθετείτε με μια πιπέτα στις cuvettes. Τα μήκη κύματος που μετρήθηκαν οι χλωροφύλλες είναι τα:

- 470nm
- 647nm
- 662nm
- 630nm
- 664nm
- 750nm
- 510nm
- 480nm
- 645nm

Ο μηδενισμός γινόταν πάντα με το blank της ακετόνης και υπήρχε μηδενισμός κάθε φορά που άλλαζε το μήκος κύματος.

- Στα 750nm γινόταν έλεγχος για το αν η απορρόφηση είναι μηδενική.
- Τα 470, 662, 664, 647 και 630nm είναι τα μήκη κύματος που απορροφούν οι χλωροφύλλες στο μπλε και στο κόκκινο φάσμα.
- Τα 510nm και 480nm είναι τα μήκη κύματος που απορροφούν τα καροτενοειδή.

2.10. Διαδικασία μέτρησης πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford

Για την ανάλυση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος Bradford.

Τα διαλύματα που πρέπει να υπάρχουν έτοιμα πριν την έναρξη της μεθόδου είναι:

- 1) *Bradford stock-solution* (**ΠΡΟΣΟΧΗ:** Είναι οξύ)
- 2) *BSA stock-solution*
- 3) *Lysis-buffer*
- 4) *Bradford working solution*

Παρασκευή των παραπάνω διαλυμάτων:

1) Bradford stock-solution

Σε ένα ποτήρι ζέσεως θα μπουν:

- 100mg χρωστικής (Coomasie Brilliant Blue G250)
- 100ml πυκνού φωσφορικού οξέος (85% w/v) (phosphoric acid)
- 100ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης (50% v/v)

Το διάλυμα αναδεύεται σε έναν μεταλλικό αναδευτήρα, μοιράζεται σε falcon των 50ml και τυλίγεται με αλουμινόχαρτο επειδή πρέπει να βρίσκεται σε σκοτεινό μέρος. Κατόπιν τοποθετείται στην ψύξη στους 4°C.

2) BSA stock-solution

Για 50ml διαλύματος:

Ζυγίζονται 10mg (ή 0.01 g) BSA ,τα οποία διαλύονται σε ddH₂O έως τα 50ml σε ένα beaker στον μεταλλικό αναδευτήρα και τοποθετείται σε ένα falcon των 50ml. Αποθηκεύεται στους -20°C.

3) Lysis-buffer

Το αρχικό πρωτόκολλο αναφέρει τα παρακάτω συστατικά:

- 50nM potassium phosphate με pH=7,4
- 150nM NaCl
- 0.1% SDS
- 1mM EDTA

Ωστόσο χρησιμοποιήθηκε Lysis-buffer χωρίς SDS.

Δοσολογία παρασκευής των παρακάτω τριών διαλυμάτων:

- 3M NaCl (Σε 50ml ddH₂O χρειάζονται 8,766gr NaCl)
- 1M K₂HPO₄ (Σε 50ml ddH₂O χρειάζονται 8,709gr K₂HPO₄)
- 1M KH₂PO₄ (Σε 50ml ddH₂O χρειάζονται 6,8045gr KH₂PO₄)

Οπότε για να φτιαχτεί ένα δείγμα σε falcon των 50ml θα χρειαστεί:

- 7,5ml από το 3M NaCl
- 0,1ml από το 0,5M EDTA
- 2,005ml από το 1M K_2HPO_4
- 0,495ml από το 1M KH_2PO_4
- Και ddH₂O μέχρι τα 50ml του falcon.

4) Παρασκευή του Bradford working solution

Η αναλογία είναι 1:4 δηλαδή, χρειάζονται 1mL stock Bradford και 3mL ddH₂O. Διατηρείται σε σκοτεινό δοχείο και μόνο για 24ώρες, άρα φτιάχνεται κάθε φορά που χρησιμοποιείται η μέθοδος.

Μέτρηση πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford

Για τις 9 κωνικές δειγματοσφαιρές χρειάστηκαν 18 erpendorf των 2mL καθώς οι δειγματοληψία γινόταν μαζί με εκείνη των χλωροφυλλών. Ζυγίζονται και 9 άδεια erpendorf των 1,5mL και καταγράφεται το πόσο είναι το κάθε ένα και σε τι δείγμα θα αντιστοιχεί. Με τα σιφώνια, που χρησιμοποιούνται για να παρθεί το δείγμα για το μικροσκόπιο και το φασματοφωτόμετρο, παίρνονται 4ml (2mL των χλωροφυλλών-2mL των πρωτεϊνών) από το εκάστοτε δείγμα, αφού πρώτα έχει ανακατευθεί στον μαγνητικό αναδευτήρα, και μοιράζονται στα 2 erpendorf των 2mL. Το υπερκείμενο πετάγεται και προστίθεται 1mL Ammonium Sulfate, είτε το 0M NaCl είτε το 1M NaCl είτε το 2M NaCl, ανάλογα την αλατότητα του δείγματος, στο δεύτερο erpendorf του αντίστοιχου δείγματος. Επαναδιαλύεται το pellet και μεταφέρεται το δείγμα στο πρώτο erpendorf του δείγματος όπου γίνεται ξανά επαναδιάλυση του pellet του πρώτου erpendorf και μετά μεταφέρεται στο προζυγισμένο erpendorf του 1,5mL. Γίνεται ξανά φυγοκέντριση στις 13.000 rpm -στροφές- για 5 λεπτά και το υπερκείμενο πετάγεται. Έπειτα τα δείγματα μπήκαν στους -80° C για να πάνε για λυοφιλίωση. Στην λυοφιλίωση ανοίχτηκαν τα πώματα από τα erpendorf και μετά από 24ώρες τα δείγματα ήταν έτοιμα. Η λυοφιλίωση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στους -59° C, υπό το κενό. Τα δείγματα ζυγίστηκαν, καταγράφηκαν τα βάρη τους και μπήκαν ξανά στους -80° C για να γίνουν σταδιακά οι αναλύσεις.

Επειδή οι πρωτεΐνες είναι πάρα πολύ ευαίσθητες όλη η διαδικασία γινόταν στον πάγο. Από το Lysis-buffer προστίθενται 200μL-400μL (200μL στο πρώτο set και 400μL στα υπόλοιπα set) για να επαναδιαλυθεί το pellet. Μέσα σε ένα beaker τοποθετείται πάγος για το sonication. Στο κάθε δείγμα γίνεται 5 φορές η παρακάτω διαδικασία, το δείγμα μπαίνει για 10'' στο sonication και 30'' στον πάγο, με amplitude 40%. Όταν ένα δείγμα τελειώσει με την συγκεκριμένη διαδικασία τότε τοποθετείται σε ένα stand μέσα στην κατάψυξη στους -20° C μέχρι να τελειώσει το set ώστε να είναι σε κρύο περιβάλλον. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία του sonication τα δείγματα πάνε για φυγοκέντριση στις 13.000 rpm -στροφές- για 5 λεπτά στους 4° C.

Ετοιμάζεται το Bradford working solution για να μετρηθεί πρώτα η πρότυπη καμπύλη και μετά να ξεκινήσουν να μετρούνται οι πρωτεΐνες των δειγμάτων. Κάθε φορά που φτιάχνεται καινούριο Bradford Working solution πρέπει να ξανά μετρηθεί η πρότυπη καμπύλη, π.χ. εάν τελειώσει στη μέση της διαδικασίας ξανά γίνεται το Bradford Working solution και ξανά γίνεται η πρότυπη καμπύλη.

Τα erpendorf για την πρότυπη καμπύλη είναι από το 1 μέχρι το 5 και το blank/control (0), παρακάτω αναφέρονται οι αναλογίες:

Cuvettes	ddH₂O	BSA stock	Bradford working solution
Blank/control/ 0	50μl	-	950μl
Cuvette 1	40μl	10μl	950μl
Cuvette 2	30μl	20μl	950μl
Cuvette 3	20μl	30μl	950μl
Cuvette 4	10μl	40μl	950μl
Cuvette 5	-	50μl	950μl

Για το κάθε δείγμα γίνονται τρεις επαναλήψεις, π.χ. 0M1α, 0M1β και 0M1γ, άρα θα έχουμε 27 erpendorf για κάθε set και άλλο ένα για το blank που θα είναι το Lysis-buffer. Επομένως προσθέτουμε σε κάθε erpendorf 950μL Bradford working και 50μL του αντίστοιχου δείγματος ή blank. Ανακινούνται όλα μαζί τα erpendorf και τα αφήνουμε στο σκοτάδι για 20 λεπτά για να γίνει η επώαση. Ρυθμίζεται το φασματοφωτόμετρο στα 595nm. Όταν περάσει ο χρόνος μεταγγίζονται τα δείγματα από τα erpendorf στις cuvettes. Πρώτα μετριέται η πρότυπη καμπύλη και μετά τα δείγματα.

Σε περίπτωση που χρειαστούν τα δείγματα αραιώση, δηλαδή οι απορροφήσεις βγουν παραπάνω από το εύρος της πρότυπης καμπύλης, θα χρειαστεί να ξανά γίνει η διαδικασία με την κατάλληλη αραιώση σε κάθε δείγμα.

2.11. Διαδικασία μέτρησης αντιοξειδωτικών με την μέθοδο FRAP

Για την μέτρηση των αντιοξειδωτικών χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος FRAP.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην FRAP, είναι:

A: 300mM Acetate buffer

B: 10mM TPTZ σε 40mM HCl

Γ: 20mM FeCl₃6H₂O

Σε αναλογία 10:1:1 αντίστοιχα και διατηρείται για λίγες ώρες σε falcon με αλουμινόχαρτο στους 4° C.

Η πρότυπη καμπύλη της μεθόδου είναι με ascorbic acid.

Υπολογισμοί των ποσοτήτων:**Αντιδραστήριο α)**

Για τον υπολογισμό του χρειάστηκαν δυο τύποι:

- α) $n = \frac{m}{Mr}$
- β) $C = \frac{n}{V}$

Επομένως από τους τύπους α και β προκύπτει ότι:

$$m = C \times Mr \times V$$

Επίσης το 1mM είναι ίσο με 0,001 M. Άρα τα 300 mM είναι ίσα με 0,3M

Άρα από τον παραπάνω τύπο:

$$m = C \times Mr \times V \Rightarrow m = 0,3 \times 82,03 \times 0,25 \Rightarrow m = 6,15225 \text{ g Acetate buffer}$$

Αντιδραστήριο β)

Για το TPTZ

Τα 10 mM είναι ίσα με 0,01M

Το TPTZ πρέπει να βρεθεί για τα 10mL

Από τον παραπάνω τύπο:

$$m = C \times Mr \times V \Rightarrow m = 0,01 \times 312,34 \times 0,01 \Rightarrow m = 0,031234 \text{ g TPTZ άρα } 31,23\text{mg TPTZ}$$

Για το HCL

Τα 40 mM είναι ίσα με 0,04M

Το HCl έχει αρχική συγκέντρωση 12M

Από τον τύπο:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$V_1 = \frac{0,04 \times 0,04}{12} = 3,333 \times 10^{-5} \text{ L άρα } 0,0333 \text{ mL HCl}$$

Αντιδραστήριο γ)

Για το $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Τα 20mM είναι ίσα με 0,02M

Το $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ πρέπει να βρεθεί για τα 10mL

Από τον παραπάνω τύπο:

$$m = C \times Mr \times V \Rightarrow m = 0,02 \times 270,29 \times 0,01 \Rightarrow m = 0,054058 \text{ g } FeCl_3 \cdot 6H_2O \text{ \acute{a}ρα } 54mg \text{ } FeCl_3 \cdot 6H_2O$$

Παρασκευή των αντιδραστηρίων:

Γενικά για την παρασκευή των αντιδραστηρίων χρησιμοποιούνται τα ίδια σκεύη καθώς είναι μια ευαίσθητη μέθοδος.

Αντιδραστήριο α)

Σε ένα beaker των 250mL βρίσκονται 100mL ddH₂O μαζί με 6,15g από το Acetate buffer όπου αναδεύονται σε έναν μαγνητικό αναδευτήρα, μόλις ομογενοποιηθεί το διάλυμα θα γίνει ρΗμέτρηση.

ρΗμέτρηση:

Τοποθετείται σε ένα μικρό beaker μια ποσότητα περίπου 40mL acetic acid, το οποίο τυλίγεται με μια μεμβράνη. Ξεβιδώνεται το probe του ρΗμέτρου και ξεπλένεται πολύ καλά με απιονισμένο νερό. Με την πιπέτα σταδιακά και αργά ρίχνεται λίγη ποσότητα acetic acid ενώ ταυτόχρονα το διάλυμα αναδεύεται σε έναν μαγνητικό αναδευτήρα, η ποσότητα acetic acid που πιθανόν να χρειαστεί για να φτάσει το ρΗ του διαλύματος στο 3,6 είναι περίπου στα 32mL. Εφόσον φτάσει στο επιθυμητό ρΗ το διάλυμα, πρέπει να ξεπλένεται πολύ καλά το μηχάνημα και να βιδωθεί το probe.

Το Acetate buffer είναι έτοιμο για χρήση.

Αντιδραστήριο β)

Θα χρησιμοποιηθεί το έτοιμο HCl με συγκέντρωση 0,1M

$$V_{HCl} = \frac{0,04 \times 0,01}{0,1} = 0,004 \text{ L } \acute{a}ρα \text{ } 4 \text{ mL HCl}$$

Αφού ζυγιστούν τα 31,2mg TPTZ , διαλύονται μέσα σε ένα falcon των 15mL με 6mL ddH₂O και 4mL HCl. Το falcon ανακινείται και τυλίγεται με αλουμινόχαρτο. Το διάλυμα μπαίνει στους 4° C.

Μέτρηση αντιοξειδωτικών με την μέθοδο FRAP

Για τις 9 κωνικές δειγματος χρειάζονται 9 falcon των 15mL. Η συνολική ποσότητα που θα παρθεί από κάθε δείγμα θα είναι 450mL επομένως θα μπου εννιά φυγοκεντρήσεις για κάθε δείγμα. Αφού πρώτα έχουν ανακατευθεί οι καλλιέργειες στον μαγνητικό αναδευτήρα μπαίνουν 50mL από κάθε καλλιέργεια στα falcon, έπειτα ζυγίζονται για να έχουν όλα το ίδιο βάρος στην φυγόκεντρο. Η φυγόκεντρος ρυθμίζεται στις 7.000 rpm-στροφές για 10' στους 4° C. Το υπερκείμενο πετάγεται και αφού ξανά ανακατευτούν οι καλλιέργειες

προστίθενται άλλα 50mL και στην συνέχεια ζυγίζονται για να έχουν όλα το ίδιο βάρος στην φυγόκεντρο. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να γίνει συνολικά εννιά φορές. Εφόσον συγκεντρωθεί η βιομάζα των 450mL προστίθενται στα falcon 10mL Ammonium Sulfate, είτε το 0M NaCl είτε το 1M NaCl είτε το 2M NaCl, ανάλογα την συγκέντρωση αλατότητας του δείγματος. Εφόσον γίνει ένα πιπετάρισμα προστίθενται και άλλα 40mL του αντίστοιχου Ammonium Sulfate και φυγοκεντρώνονται ξανά. Η φυγόκεντρος ρυθμίζεται στις 7.000 rpm-στροφές για 10' στους 4° C. Το υπερκείμενο πετάγεται και προστίθενται 3mL ddH₂O ώστε να επαναδιαλυθεί το pellet. Έχουν προζυγιστεί 27 άδεια erpendorf των 1,5mL (3 erpendorf για κάθε δείγμα), και καταγράφεται το πόσο είναι το κάθε ένα, σε τι δείγμα θα αντιστοιχεί και για ποια διαδικασία αναφέρεται, δηλαδή ή για την FRAP ή για το GC-MS ή για την UPLC. Το κάθε δείγμα μοιράζεται ισόποσα στα 3 erpendorf που του αντιστοιχεί, και φυγοκεντρείται στις 3.000 στροφές- rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο πετάγεται και τα δείγματα μπαίνουν στους -80° C για να πάνε για λυοφιλίωση. Στην λυοφιλίωση ανοίχτηκαν τα πώματα από τα erpendorf και μετά από 24ώρες τα δείγματα ήταν έτοιμα. Η λυοφιλίωση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στους -59° C, υπό το κενό. Ύστερα τα δείγματα ζυγίστηκαν, καταγράφηκαν τα βάρη τους και μπήκαν ξανά στους -80° C για να γίνουν σταδιακά οι αναλύσεις.

Όλες οι διαδικασίες έγιναν σε πάγο. Η πρότυπη καμπύλη της διαδικασίας είναι με ascorbic acid, το συγκεκριμένο έχει συγκέντρωση 10mg/mL οπότε πρέπει να αραιωθεί και να φτάσει τα 100μg/mL.

Τα 100μg/mL είναι 0,0001 g/mL.

Άρα η αναλογία είναι 0,0001g στο 1mL

Θα χρειαστούν:

- 27 cuvettes για τα δείγματα + 1 cuvette για το τυφλό = (950μL FRAP + 50μL δείγμα)/ cuvette
- 10 cuvettes για την πρότυπη + 1 cuvette για το τυφλό = (950μL FRAP + 50μL δείγμα)/ cuvette

Άρα θα χρειαστούν 37,05mL διάλυμα FRAP , άρα συνολικά θα φτιαχτούν 40mL διαλύματος FRAP για κάθε set.

Άρα στα 40mL διαλύματος FRAP θα μπουν 0,0004g ascorbic acid.

Η πρότυπη καμπύλη έχει τις παρακάτω συγκεντρώσεις:

5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 και 100μg/mL

Το ascorbic acid είναι σε σκόνη οπότε θα φτιαχτεί το πρώτο διάλυμα που είναι 10mg/mL.

Ζυγίζεται ένα erpendorf των 1,5mL ,μηδενίζεται η ζυγαριά και προστίθενται μέσα στο erpendorf το ascorbic acid. Ιδανικά θα πρέπει να είναι 10mg, αλλά επιτρεπτές είναι και οι τιμές από 9mg μέχρι 12mg.

Επομένως για να υπολογιστεί πόσο ddH₂O θα χρειαστεί θα γίνει η μέθοδος των τριών:

10mg ascorbic σε 1000μL ddH₂O

(Ζυγισμένη ποσότητα) ascorbic X μL ddH₂O.

Για να την τελική συγκέντρωση 100μg/mL, που χρειάζεται θα πρέπει να γίνει 1/100 αραιώση.

Επομένως:

Από τα 10mg/mL που δημιουργήθηκαν θα χρειαστούν 100μL ascorbic acid και 900μL ddH₂O, τα οποία προστίθενται σε ένα άλλο erpendorf δημιουργώντας την αραιώση του 1mg/mL.

Θα χρειαστούν 800μL από το erpendorf με το 1mg/mL ascorbic και 7,2mL ddH₂O, για την δημιουργία των 100μg/mL. Όλα μαζί προστίθενται σε ένα falcon δημιουργώντας την αραιώση των 100μg/mL. **Από την πρότυπη καμπύλη αυτή είναι η συγκέντρωση 100.**

Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις θα φτιαχτούν από το παραπάνω falcon εκτός από την συγκέντρωση των 5μg/mL.

Άρα οι αναλογίες είναι οι εξής:

Συγκεντρώσεις (μg/mL)	Ascorbic 100μg/mL	ddH ₂ O
90	900μL	100μL
80	800μL	200μL
70	700μL	300μL
60	600μL	400μL
50	500μL	500μL
40	400μL	600μL
30	300μL	700μL
20	200μL	800μL
10	100μL	900μL

Η συγκέντρωση 5μg/mL θα προκύψει από την αραιώση της συγκέντρωσης 10μg/mL με 500μL και από 500μL ddH₂O.

Όλη η διαδικασία γίνεται στον πάγο. Μόλις γίνουν οι αραιώσεις ξεκινάει η διαδικασία για το sonication. Από τη methanol προστίθενται 300μL-600μL (300μL στο πρώτο set και 600μL στα υπόλοιπα set) για να επαναδιαλυθεί το pellet. Μέσα σε ένα beaker τοποθετείται πάγος για το sonication. Στο κάθε δείγμα γίνεται 5 φορές η παρακάτω διαδικασία, το δείγμα μπαίνει για 10'' στο sonication και 30'' στον πάγο, με amplitude 40%. Όταν ένα δείγμα τελειώσει με την συγκεκριμένη διαδικασία τότε τοποθετείται σε ένα stand μέσα στην

κατάψυξη στους -20°C μέχρι να τελειώσει το set ώστε να είναι σε κρύο περιβάλλον. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία του sonication τα δείγματα πάνε για φυγοκέντριση στις 13.000 rpm -στροφές- για 5 λεπτά στους 4°C . Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούρια erpendorf των 1,5mL.

Τα δείγματα φτιάχνονται:

- Για την πρότυπη θα χρειαστούν:

11 erpendorf των 1,5mL όπου θα αντιστοιχούν το κάθε ένα σε 950μL FRAP και 50μL το ascorbic acid της αντίστοιχης συγκέντρωσης. Για παράδειγμα, για να μετρηθεί η συγκέντρωση 100 θα μπει στο erpendorf 950μL FRAP και 50μL από το falcon των 100μg/mL. Το τυφλό της πρότυπης θα είναι το ddH₂O.

- Για τα δείγματα θα χρειαστούν:

28 erpendorf των 1,5mL όπου θα αντιστοιχούν το κάθε ένα σε 950μL FRAP και 50μL από το αντίστοιχο δείγμα. Το τυφλό των δειγμάτων θα είναι η μεθανόλη.

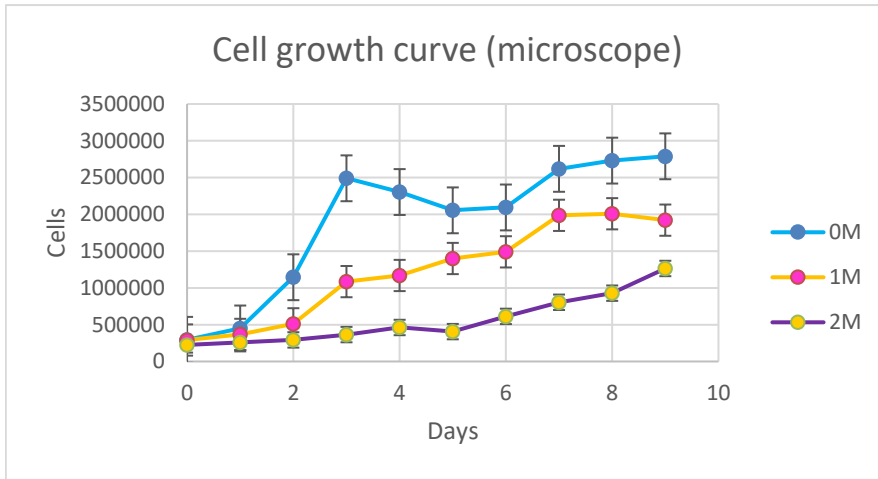
Τα δείγματα ανακατεύονται ταυτόχρονα και επωάζονται για 30' στο υδατόλουτρο στους 37°C . Κάθε φορά που φτιάχνεται καινούριο διάλυμα FRAP πρέπει να ξανά μετρηθεί η πρότυπη καμπύλη. Ρυθμίζεται το φασματοφωτόμετρο στα 593nm. Όταν περάσουν τα 30' μεταγγίζονται τα δείγματα από τα erpendorf στις cuvettes. Πρώτα μετριέται η πρότυπη καμπύλη και μετά τα δείγματα.

Σε περίπτωση που χρειαστούν τα δείγματα αραιώση, δηλαδή αν οι απορροφήσεις βγουν παραπάνω από το εύρος της πρότυπης καμπύλης, θα χρειαστεί να ξανά γίνει η διαδικασία με την κατάλληλη αραιώση σε κάθε δείγμα.

3. Αποτελέσματα

3.1. Επίδραση της υψηλής αλατότητας στην βιομάζα της *Dunaliella sp.*

Η πρώτη ένδειξη της επιρροής του αλατιού θα ήταν στην ανάπτυξη του είδους, επομένως μελετήθηκε η ανάπτυξη της καλλιέργειας με δύο τρόπους, με την μέθοδο του μικροσκοπίου και με του φασματοφωτόμετρου.

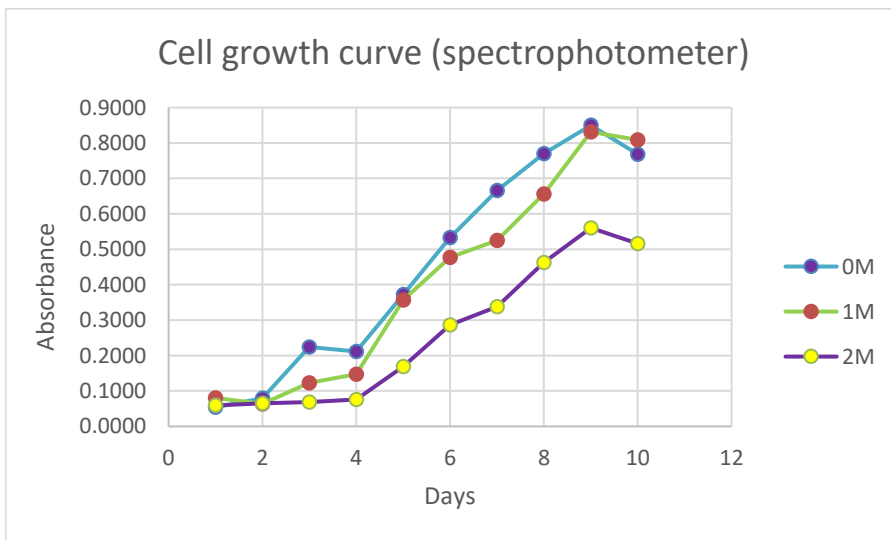


Εικόνα 4: Γράφημα απεικόνισης της ανάπτυξης των κυττάρων των καλλιεργειών σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας. Οι συγκεντρώσεις επιλεγμένες συγκεντρώσεις αλατότητας είναι η 0M NaCl, η 1M NaCl και η 2M NaCl, με τρεις επαναλήψεις η κάθε μία. Σε ένα πείραμα διάρκειας δέκα ημερών. Το γράφημα συνοψολογίζει τα δεδομένα των 3 επαναλήψεων της κάθε υποκατηγορίας αλατότητας, φτιάχνοντας το γράφημα από τους μέσους όρους και τα standard errors από κάθε μέτρηση της κάθε μέρας. Οι τιμές του γραφήματος προέρχονται από τις μετρήσεις του μικροσκοπίου. Οι μετρήσεις όλων των δειγμάτων των 10 ημερών και κάθε υποκατηγορίας αλατότητας, αντιστοιχούν στα αποτελέσματα των μετρήσεων των εννιά πεδίων.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της βιομάζας ήταν πολύ ικανοποιητικά καθώς απεικονίζεται και στις δύο μεθόδους η ικανότητα ανάπτυξης των μικροφυκών σε όλες τις επιλεγμένες αλατότητες. Με τα αποτελέσματα να ακολουθούν σταθερή ανοδική τάση και στις τρεις αλατότητες (0M NaCl, 1M NaCl και 2M NaCl). Ωστόσο παρατηρείται μειωμένη ανάπτυξης στην συγκέντρωση 1M NaCl και ακόμα πιο μειωμένη ανάπτυξη στην συγκέντρωση 2M NaCl. Επιπλέον παρατηρείται ότι οι καμπύλες που

αντιστοιχούν στην ίδια ομάδα των δύο μεθόδων παρουσιάζουν κάποιες διαφοροποιήσεις αλλά σε γενικές γραμμές δεν απεικονίζουν μεγάλες αποκλίσεις στις φάσεις των καλλιεργειών. Ωστόσο και τα δύο γραφήματα απεικονίζουν και συνοψολογίζουν τα δεδομένα των 3 υποομάδων που υπήρχαν για την κάθε επιλεγμένη αλατότητα, δημιουργώντας ένα γράφημα με τους μέσους όρους και τα standard errors.

Από τις δύο μεθόδους, αυτή που ήταν η κατευθυντήρια γραμμή του πειράματος ήταν η μέθοδος του



Εικόνα 5: Γράφημα απεικόνισης της ανάπτυξης των κυττάρων των καλλιεργειών σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας. Οι συγκεντρώσεις επιλεγμένες συγκεντρώσεις αλατότητας είναι η 0M NaCl, η 1M NaCl και η 2M NaCl, με τρεις επαναλήψεις η κάθε μία. Σε ένα πείραμα διάρκειας δέκα ημερών. Το γράφημα συνοψολογίζει τα δεδομένα των 3 επαναλήψεων της κάθε υποκατηγορίας αλατότητας, φτιάχνοντας το γράφημα από τους μέσους όρους και τα standard errors από κάθε μέτρηση της κάθε μέρας. Οι τιμές του γραφήματος προέρχονται από τις μετρήσεις του φασματοφωτόμετρου. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο μήκος κύματος των 680nm.

μικροσκοπίου, δηλαδή το πείραμα βασίστηκε στα εξαγόμενα δεδομένα από την καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων του μικροσκοπίου.

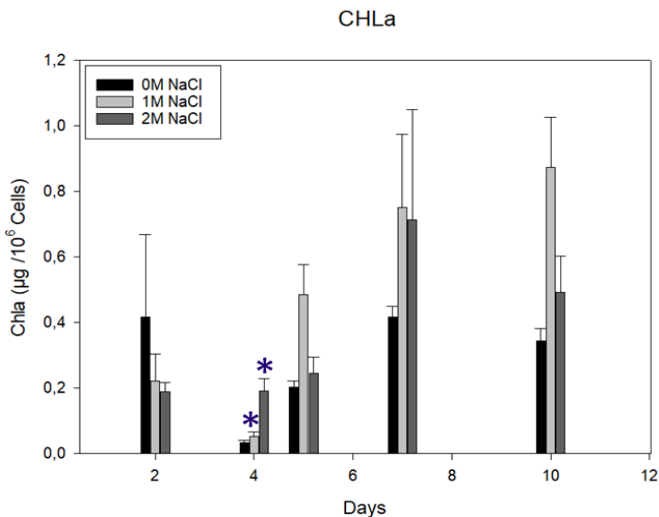
3.2.Επίδραση της υψηλής αλατότητας στις χλωροφύλλες και τα καροτονοειδή της *Dunaliella sp.*

Στο δεκαήμερο πείραμα που πραγματοποιήθηκε πάρθηκαν δείγματα των 2mL από κάθε φιάλη για την μέτρηση των παραμέτρων CHLa, CHLb και Carotenoids. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο του φασματοφωτόμετρου με 90% acetone.

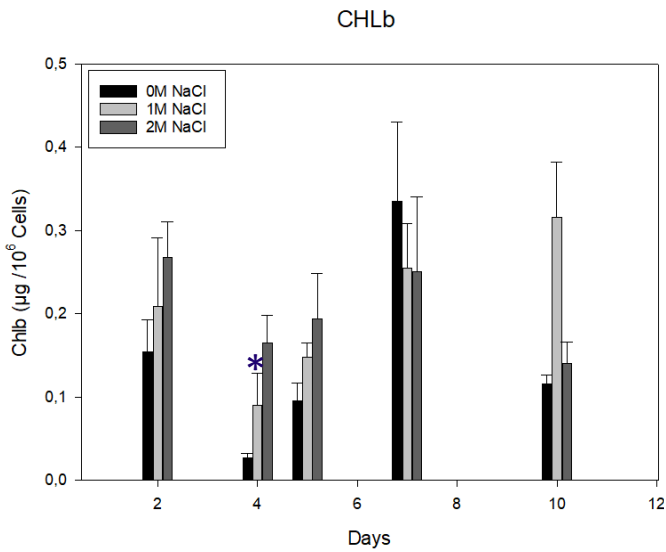
Τα αποτελέσματα των χλωροφυλλών και των καροτενοειδών έχουν πολύ ενδιαφέρον. Από τα αποτελέσματα παρουσιάζεται ότι οι συγκεντρώσεις των CHLa και των καροτενοειδών παρουσιάζουν παρόμοιο πρότυπο

ειδικά στην 5^η, 7^η και 10^η μέρα. Επιπλέον παρατηρώντας τα τρία γραφήματα παρατηρείται ότι τα κύτταρα που αναπτύσσονται στο 1M NaCl εμφανίζουν υψηλότερη συγκέντρωση CHLa, CHLb και καροτενοειδών και κυρίως κατά την 10^η μέρα της καλλιέργειας σε σχέση με τον control.

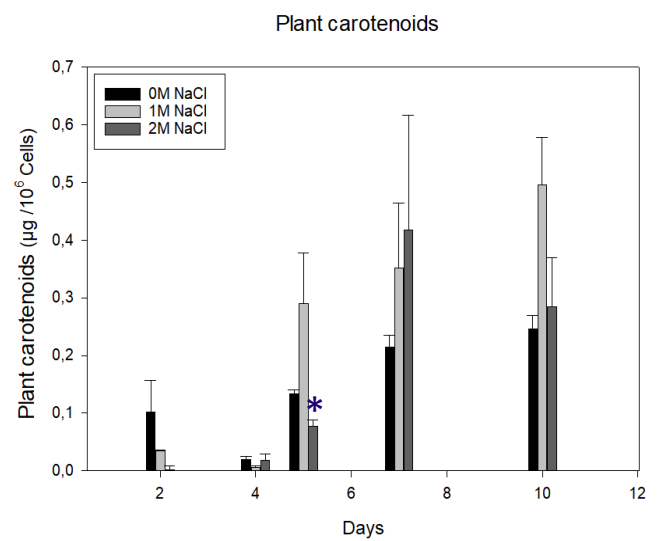
Επιπλέον πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση για την συγκεκριμένη παράμετρο. Πιο συγκεκριμένα, έγιναν αναλύσεις t-test ώστε να συγκριθεί η συγκέντρωση αλατότητας 1M NaCl και 2M NaCl με την 0M NaCl, όπου συγκρίνονται όλες οι τιμές των υπό ομάδων όλων των μετρήσεων. Στα γραφήματα, επιπλέον, παρουσιάζονται και οι απεικονίσεις των στατιστικών αναλύσεων από τα t-test. Συγκρίθηκαν τα p-value των ομάδων, όταν, το p-value είναι >0.05 , τότε δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Όταν, το p-value είναι ≤ 0.05 , τότε υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Η απεικόνιση των στατιστικών αναλύσεων των χλωροφυλλών-α από τα t-test απεικονίζονται με την μορφή αστερίσκων.



Εικόνα 6: Γράφημα απεικόνισης των χλωροφυλλών-α σε συνθήκες υψηλής αλατότητας συγκεντρώσεων 0M NaCl, 1M NaCl και 2M NaCl, με τρεις επαναλήψεις η κάθε μία, σε διάρκεια δέκα ημερών. Οι τιμές του γραφήματος προέρχονται από μετρήσεις φασματοφωτόμετρου. Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση για την συγκεκριμένη παράμετρο. Συγκρίνεται η συγκέντρωση αλατότητας 1M NaCl και 2M NaCl με την 0M NaCl, συγκρίνονται όλες οι τιμές των υπό ομάδων όλων των μετρήσεων. Στο γράφημα, επιπλέον, παρουσιάζονται και οι απεικονίσεις των στατιστικών αναλύσεων των χλωροφυλλών-α από τα t-test. Συγκρίθηκαν τα p-value των ομάδων, όταν, το p-value είναι >0.05 , τότε δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Όταν, το p-value είναι ≤ 0.05 , τότε υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Η απεικόνιση των στατιστικών αναλύσεων των χλωροφυλλών-α από τα t-test απεικονίζονται με την μορφή αστερίσκων.



Εικόνα 7: Γράφημα απεικόνισης των χλωροφυλλών-β σε συνθήκες υψηλής αλατότητας συγκεντρώσεων 0M NaCl, 1M NaCl και 2M NaCl, με τρεις επαναλήψεις η κάθε μία, σε διάρκεια δέκα ημερών. Οι τιμές του γραφήματος προέρχονται από μετρήσεις φασματοφωτόμετρου. Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση για την συγκεκριμένη παράμετρο, όπου συγκρίνεται η συγκέντρωση αλατότητας 1M NaCl και 2M NaCl με την 0M NaCl και συγκρίνονται όλες οι τιμές των υπό ομάδων τους συμπεριλαμβάνοντας όλες τις τιμές των μετρήσεων της κάθε μέρας. Στο γράφημα, παρουσιάζονται οι απεικονίσεις των στατιστικών αναλύσεων των χλωροφυλλών-β από τα t-test, όπου συγκρίθηκαν τα p-value των ομάδων. Όταν, το p-value είναι >0.05, τότε δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Όταν, το p-value είναι =<0.05, τότε υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Η απεικόνιση των στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των ομάδων των πρωτεϊνών από τα t-test απεικονίζονται στο γράφημα με την μορφή αστερίσκων.



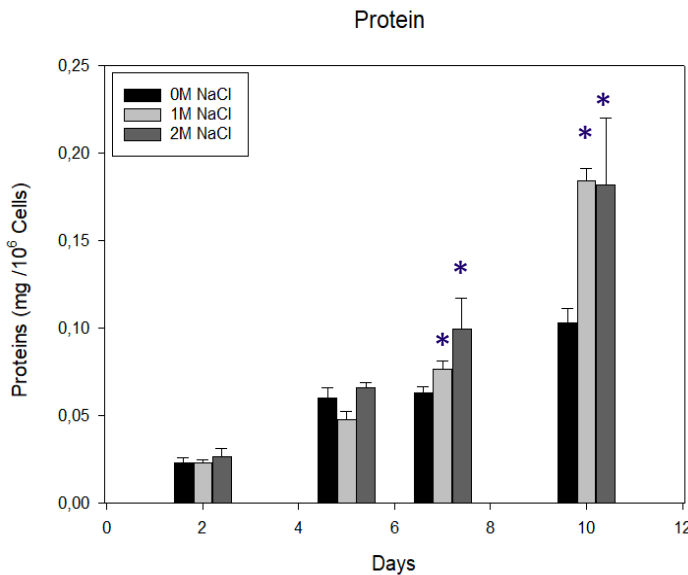
Εικόνα 8: Γράφημα απεικόνισης των καροτενοειδών σε συνθήκες υψηλής αλατότητας συγκεντρώσεων 0M NaCl, 1M NaCl και 2M NaCl, με τρεις επαναλήψεις η κάθε μία, σε διάρκεια δέκα ημερών. Οι τιμές του γραφήματος προέρχονται από μετρήσεις φασματοφωτόμετρου. Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση για την συγκεκριμένη παράμετρο, όπου συγκρίνεται η συγκέντρωση αλατότητας 1M NaCl και 2M NaCl με την 0M NaCl και συγκρίνονται όλες οι τιμές των υπό ομάδων τους συμπεριλαμβάνοντας όλες τις τιμές των μετρήσεων της κάθε μέρας. Στο γράφημα, παρουσιάζονται οι απεικονίσεις των στατιστικών αναλύσεων των καροτενοειδών από τα t-test, όπου συγκρίθηκαν τα p-value των ομάδων. Όταν, το p-value είναι >0.05, τότε δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Όταν, το p-value είναι =<0.05, τότε υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Η απεικόνιση των στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των ομάδων των πρωτεϊνών από τα t-test απεικονίζονται στο γράφημα με την μορφή αστερίσκων.

3.3. Επίδραση της υψηλής αλατότητας στις πρωτεΐνες της *Dunaliella sp.*

Στο δεκαήμερο πείραμα που πραγματοποιήθηκε πάρθηκαν δείγματα των 2mL από κάθε φιάλη για την μέτρηση των πρωτεϊνών. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Bradford μια φασματοφωτομετρική μέθοδο μέτρησης πρωτεϊνών με Lysis-buffer.

Στο σχεδιάγραμμα των πρωτεϊνών απεικονίζονται αυξημένα επίπεδα συγκέντρωσης πρωτεϊνών στα κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες υψηλής αλατότητας κυρίως κατά την 7^η μέρα της καλλιέργειας σε σχέση με το control. Ωστόσο κατά την 10^η μέρα της καλλιέργειας η διαφορά στην συγκέντρωση των πρωτεϊνών ήταν ακόμη μεγαλύτερη φτάνοντας σχεδόν στα διπλάσια επίπεδα σε σχέση με το control. Γενικά στις υψηλότερες

συγκεντρώσεις αλατιών μετά από κάποιες μέρες προσαρμογής, τα κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένες μετρήσεις στις πρωτεΐνες από το 0M NaCl.



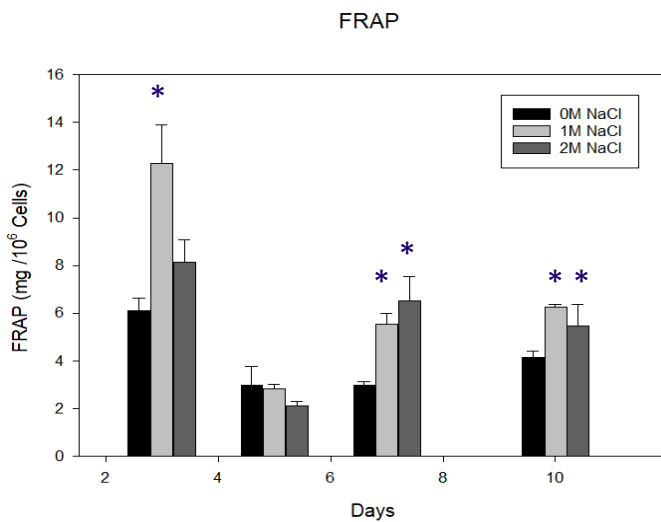
Εικόνα 9: Γράφημα απεικόνισης των πρωτεϊνών σε συνθήκες υψηλής αλατότητας συγκεντρώσεων 0M NaCl, 1M NaCl και 2M NaCl, με τρεις επαναλήψεις η κάθε μία, σε διάρκεια δέκα ημερών. Οι τιμές του γραφήματος προέρχονται από μετρήσεις φασματοφωτόμετρου. Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση για την συγκεκριμένη παράμετρο, όπου συγκρίνεται η συγκέντρωση αλατότητας 1M NaCl και 2M NaCl με την 0M NaCl και συγκρίνονται όλες οι τιμές των υπό ομάδων τους συμπεριλαμβάνοντας όλες τις τιμές των μετρήσεων της κάθε μέρας. Στο γράφημα, παρουσιάζονται οι απεικονίσεις των στατιστικών αναλύσεων των πρωτεϊνών από τα t-test, όπου συγκρίθηκαν τα p-value των ομάδων. Όταν, το p-value είναι >0.05, τότε δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Όταν, το p-value είναι =<0.05, τότε υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Η απεικόνιση των στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των ομάδων των πρωτεϊνών από τα t-test απεικονίζονται στο γράφημα με την μορφή αστερίσκων.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση για την συγκεκριμένη παράμετρο, όπου συγκρίνεται η συγκέντρωση αλατότητας 1M NaCl και 2M NaCl με την 0M NaCl και συγκρίνονται όλες οι τιμές των υπό ομάδων τους συμπεριλαμβάνοντας όλες τις τιμές των μετρήσεων της κάθε μέρας. Στο γράφημα, παρουσιάζονται οι απεικονίσεις των στατιστικών αναλύσεων των αντιοξειδωτικών από τα t-test, όπου συγκρίθηκαν τα p-value των ομάδων. Όταν, το p-value είναι >0.05, τότε δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Όταν, το p-value είναι =<0.05, τότε υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Η απεικόνιση των στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των ομάδων των πρωτεϊνών από τα t-test απεικονίζονται στο γράφημα με την μορφή αστερίσκων.

3.4. Επίδραση της υψηλής αλατότητας στα αντιοξειδωτικά της *Dunaliella sp.*

Στο δεκαήμερο πείραμα που πραγματοποιήθηκε αναλύθηκε δείγμα των 50mL από κάθε φιάλη για την μέτρηση των αντιοξειδωτικών. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο FRAP μια φασματοφωτομετρική μέθοδο μέτρησης αντιοξειδωτικών με methanol.

Στο σχεδιάγραμμα των αντιοξειδωτικών η ανάλυση των αποτελεσμάτων απεικονίζει ότι τα μικροφύκη προσπαθούν να ανταπεξέλθουν με θετικό πρόσημο στις συνθήκες καταπόνησης της υψηλής αλατότητας. Πιο συγκεκριμένα τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε συνθήκες υψηλής αλατότητας παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερο αντιοξειδωτικό δυναμικό σε σχέση με το control.



Εικόνα 10: Γράφημα απεικόνισης των αντιοξειδωτικών σε συνθήκες υψηλής αλατότητας συγκεντρώσεων 0M NaCl, 1M NaCl και 2M NaCl, με τρεις επαναλήψεις η κάθε μία, σε διάρκεια δέκα ημερών. Οι τιμές του γραφήματος προέρχονται από μετρήσεις φασματοφωτόμετρου. Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση για την συγκεκριμένη παράμετρο, όπου συγκρίνεται η συγκέντρωση αλατότητας 1M NaCl και 2M NaCl με την 0M NaCl και συγκρίνονται όλες οι τιμές των υπό ομάδων τους συμπεριλαμβάνοντας όλες τις τιμές των μετρήσεων της κάθε μέρας. Στο γράφημα, παρουσιάζονται οι απεικονίσεις των στατιστικών αναλύσεων των αντιοξειδωτικών από τα t-test, όπου συγκρίθηκαν τα p-value των ομάδων. Όταν, το p-value είναι >0.05, τότε δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Όταν, το p-value είναι =<0.05, τότε υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Η απεικόνιση των στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των ομάδων των αντιοξειδωτικών από τα t-test απεικονίζονται στο γράφημα με την μορφή αστερίσκων.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση για την συγκεκριμένη παράμετρο, όπου συγκρίνεται η συγκέντρωση αλατότητας 1M NaCl και 2M NaCl με την 0M NaCl και συγκρίνονται όλες οι τιμές των ομάδων τους συμπεριλαμβάνοντας όλες τις τιμές των μετρήσεων της κάθε μέρας. Στο γράφημα, παρουσιάζονται οι απεικονίσεις των στατιστικών αναλύσεων των αντιοξειδωτικών από τα t-test, όπου συγκρίθηκαν τα p-value των ομάδων. Όταν, το p-value είναι >0.05, τότε δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Όταν, το p-value είναι =<0.05, τότε υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Η απεικόνιση των στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των ομάδων των πρωτεϊνών από τα t-test απεικονίζονται στο γράφημα με την μορφή αστερίσκων.

4. Συμπεράσματα και συζήτηση

Στην παρούσα εργασία έγινε η μελέτη του μικροφύκου *Dunaliella sp.* σε συνθήκες υψηλής αλατότητας. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε συνθήκες υψηλής αλατότητας συγκεντρώσεων 0M NaCl, 1M NaCl και 2M NaCl. Επιπλέον μελετήθηκε η παραγωγή των χλωροφυλλών και των καροτονοειδών του. Στη συνέχεια της ανάλυσης του μικροφύκου σε αυτές τις συνθήκες, καταγράφηκε και η πορεία και η ανάπτυξη των πρωτεϊνών του και της αντιοξειδωτικής του ικανότητας.

4.1. Συμπεράσματα έρευνας

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων από την βιομάζα της *Dunaliella sp.* έδειξε την ικανότητα του μικροοργανισμού να αναπτυχθεί σε όλες τις επιλεγμένες αλατότητες. Ωστόσο πολύ σημαντική διαφορά ως προς την βιομάζα του είναι η παρουσία μειωμένης ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε σχέση με την

συγκέντρωση 0M NaCl, δηλαδή στην συγκέντρωση 1M NaCl η *Dunaliella sp.* παρουσίασε μειωμένη ανάπτυξη αλλά και ακόμα πιο μειωμένη ανάπτυξη παρουσίασε στην συγκέντρωση 2M NaCl. Επιπλέον από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι η υψηλότερη συγκέντρωση χλωροφυλλών και καροτονοειδών παρουσιάζεται στην συγκέντρωση 1M NaCl και κυρίως κατά την 10^η μέρα καλλιέργειας σε σχέση με το control. Η επεξεργασία των αναλύσεων των πρωτεϊνών έδειξε ότι το πρωτεϊνικό επίπεδο του μικροοργανισμού σε συνθήκες υψηλής αλατότητας αυξάνεται, πιο συγκεκριμένα τα επίπεδα της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα κύτταρα κατά την 7^η και την 10^η μέρα της καλλιέργειας παρουσιάστηκαν αυξημένα σε σχέση με το control. Τέλος, η επίδραση της υψηλής αλατότητας στις καλλιέργειες του μικροοργανισμού παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερο αντιοξειδωτικό δυναμικό σε σχέση με το control.

Η γενική εικόνα της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων ανέδειξε ότι η βιομάζα που παράγεται στο 1M NaCl κατά την 10^η μέρα της καλλιέργειας παρουσιάζει τα πιο ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά, καθώς είναι πλούσια σε φυτοχρωστικές και σε πρωτεΐνες και χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα υψηλό αντιοξειδωτικό δυναμικό. Επομένως θέτει μια βάση για πιθανές αξιοποιήσεις του μικροφύκου *Dunaliella sp.* σε βιοτεχνολογικά προϊόντα, όπως την κοσμετολογία, τα συμπληρώματα διατροφής και τις ζωοτροφές.

4.2.Μελλοντική στόχοι-έρευνες

Για την επιβεβαίωση των συμπερασμάτων θα μπορούσαν να γίνουν και αναλύσεις σε μεγαλύτερες αλατότητες καθώς και σε μικρότερες, διότι παρατηρήθηκαν πολλά και αξιόλογα συμπεράσματα ανάλογα με την εκάστοτε ομάδα που μελετάται -χλωροφύλλες, πρωτεΐνες και αντιοξειδωτικά- με αποτέλεσμα τόσο να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας όσο και να δοθεί η δυνατότητα να δημιουργηθούν και επιπλέον, που θα μπορούσαν να αποφέρουν διάφορες καινοτομίες και να συμβάλουν στην δημιουργία πιο περιβαλλοντικών λύσεων. Σε αυτό θα μπορούσε να συμβάλει και μια μελέτη σύγκρισης με άλλα μικροφύκη που βρίσκονται στις αλυκές, ώστε να βρεθούν ομοιότητες και διαφορές ως προς την συμπεριφορά τους και την αποδοτικότητάς τους.

5. Βιβλιογραφία

1. Al-Rashed, S.A.; Ibrahim, M.M.; El-Gaaly, G.A.; Al-Shehri, S.; Mostafa, A. (2016). Evaluation of radical scavenging system in two microalgae in response to interactive stresses of UV-B radiation and nitrogen starvation. *Saudi J. Biol. Sci.*
2. Assuncao, M.F.G.; Amaral, R.; Martins, C.B.; Ferreira, J.D.; Ressurreicao, S.; Santos, S.D.; Varejão, J.M.T.B.; Santos, L.M.A. (2017). Screening microalgae as potential sources of antioxidants. *J. Appl. Phycol.*, 29, 865–877.
3. Baker, H., Frank, O., Deangelis, B., Feingold, S., & Kaminetzky, H. A. (1981). Role of placenta in maternal-fetal vitamin transfer in humans. *American journal of obstetrics and gynecology*, 141(7), 792-796.

4. Ben-Amotz, A.; Avron, M. (1990). The biotechnology of cultivating the halotolerant algae *Dunaliella*. *Trends Biotechnol.* 8, 121–125.
5. Ben-Amotz, A.; Katz, A.; Avron, M. (1982). Accumulation of β -carotene in halotolerant alga: purification and characterization of β -carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae) 1. *Journal of Phycology*, 18(4), 529-537.
6. Ben-Amotz, A.; Lers, A.; Avron, M. (1988). Stereoisomers of β -carotene and phytoene in the alga *Dunaliella bardawil*. *Plant physiology*, 86(4), 1286-1291.
7. Borowitzka, L. J. (1991). Development of western biotechnology's algal β -carotene plant. *Bioresource technology*, 38(2-3), 251-252.
8. Bremus, C.; Herrmann, U.; Bringer-Meyer, S.; & Sahm, H. (2006). The use of microorganisms in L-ascorbic acid production. *Journal of biotechnology*, 124(1), 196-205.
9. Brillatz, T.; Lauritano, C.; Jacmin, M.; Khamma, S.; Marcourt, L.; Righi, D.; Romano G.; Esposito F.; Ianora A.; Queiroz E.F.; Wolfender J.L.; Crawford, A. D. (2018). Zebrafish-based identification of the antiseizure nucleoside inosine from the marine diatom *Skeletonema marinoi*. *PLoS One*, 13(4), e0196195.
10. Cardozo, K.H.; Guaratini, T.; Barros, M.P.; Falcão, V.R.; Tonon, A.P.; Lopes, N.P.; Campos, S.; Torres M.A.; Souza A.O.; Colepicolo, P.; Pinto, E. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(1-2), 60-78.
11. Chen, H.; Jiang, J.G. (2009). Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *J. Cell. Physiol.* 219, 251–258.
12. Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3), 294-306.
13. Converti, A.; Casazza, A. A.; Ortiz, E. Y.; Perego, P.; Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(6), 1146-1151.
14. Dinesh Sharma (2016), Top 6 Types of Classification of Algae, BiologyDiscussion.com
15. Furuki, T.; Maeda, S.; Imajo, S.; Hiroi, T.; Amaya, T.; Hirokawa, T.; Ito K.; Nozawa, H. (2003). Rapid and selective extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis* with ultrasonic cell disruption. *Journal of Applied Phycology* 15, 319–324 <https://doi.org/10.1023/A:1025118516888>
16. Gangadhar, K.N.; Pereira, H.; Rodrigues, M.J.; Custódio, L.; Barreira, L.; Malcata, F.X.; Varela, J. (2016). Microalgae-based unsaponifiable matter as source of natural antioxidants and metal chelators to enhance the value of wet *Tetraselmis chuii* biomass. *Open Chem.*, 14, 299–307.
17. Gangl, D.; Zedler, J.A.Z.; Rajakumar, P.D.; Martinez, E.M.R.; Riseley, A.; Włodarczyk, A.; Purton, S.; Sakuragi, Y.; Howe, C.J.; Jensen, P.E.; et al. (2015). Biotechnological exploitation of microalgae. *J. Exp. Bot.*, 66, 6975–6990.
18. García, J.L.; de Vicente, M.; Galán, B. (2017) Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. *Microb. Biotechnol.*, 10, 1017–1024.
19. Giordano, D.; Costantini, M.; Coppola, D.; Lauritano, C.; Pons, L.N.; Ruocco, N.; di Prisco, G.; Ianora, A.; Verde, C. (2018) Biotechnological Applications of Bioactive Peptides from Marine Sources. *Adv. Microb. Physiol.*, 51.
20. Hadi, M.R.; Shariati, M.; Afsharzadeh, A. (2008). Microalgal biotechnology: carotenoid and glycerol production by the green algae *Dunaliella* isolated from the Gave-Khooni salt marsh, Iran. *Biotechnol. and Bioprocess Engin.* 13:540-544.
21. Haghjou, M.M.; Shariati, M.; Smirnov, N. (2009). The effect of acute high light and low temperature stresses on the ascorbate-glutathione cycle and superoxide dismutase activity in two *Dunaliella salina* strains. *Physiol. Plant.*, 135, 272–280.
22. Hanaa, H.; El Baz, F.K.; El-Baroty, G.S. (2004) Production of Antioxidant by the Green Alga *Dunaliella salina*. *Int. J. Agric. Biol.*, 6, 49–57.
23. Hosseini Tafreshi, A.; Shariati, M. (2009) *Dunaliella* biotechnology: Methods and applications. *J. Appl. Microbiol.*, 107, 14–35.

24. Hu, Q.; Sommerfeld, M.; Jarvis, E.; Ghirardi, M.; Posewitz, M.; Seibert, M.; Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The plant journal*, 54(4), 621-639.
25. Imran, M.; Caligiuri, V.; Wang, M.; Goldoni, L.; Prato, M.; Krahne, R.; De Trizio L.; Manna, L. (2018). Benzoyl halides as alternative precursors for the colloidal synthesis of lead-based halide perovskite nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society*, 140(7), 2656-2664. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b13477>
26. Jahnke, L.S.; White, A. (2003). Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *J Plant Physiol.* 160:1193–1202.
27. Jankowska, E.; Sahu, A. and Oleskowicz-Popiel, P. (2017), «Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion», *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 75: pp.692-709.
28. Kawasaki, S; Borchert, C; Deyholos, M; Wang, H; Brazille, S; Kawai, K; Galbraith, D; Bohnert, H.J. (2001). Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* 13:889–905
29. Khanra, S.; Mondal, M.; Halder, G.; Tiwari, O.N.; Gayen, K.; Bhowmick, T.K. (2018) Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. *Food Bioprod. Process.*, 110, 60–84.
30. Kirst, G.O. (1990). Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40:21–53
31. Korovessis, N. & Lekkas, T. (1999). Solar Saltworks Production Process Evolution - Wetland Function. Proceedings of the 6th Conference on Environmental Science and Technology, August 30th to September 2nd, 1999 (pp. 11-31). Samos Island.
32. Lauritano, C. & Ianora, A. (2016). Marine organisms with anti-diabetes properties. *Marine drugs*, 14(12), 220.
33. Lauritano, C.; Andersen, J.H.; Hansen, E.; Albrigtsen, M.; Escalera, L; Esposito, F.; Helland, K.; Hanssen, K.Ø.; Romano, G. and Ianora, A. (2016) Bioactivity Screening of Microalgae for Antioxidant, Anti-Inflammatory, Anticancer, Anti-Diabetes, and Antibacterial Activities. *Front. Mar. Sci.* 3:68. doi: 10.3389/fmars.2016.00068
34. Lauritano, C.; Helland, K.; Riccio, G.; Andersen, J. H.; Ianora, A.; & Hansen, E. H. (2020). Lysophosphatidylcholines and chlorophyll-derived molecules from the diatom *Cylindrotheca closterium* with anti-inflammatory activity. *Marine drugs*, 18(3), 166.
35. Lauritano, C.; Martín, J.; de la Cruz, M.; Reyes, F.; Romano, G. & Ianora, A. (2018). First identification of marine diatoms with anti-tuberculosis activity. *Scientific reports*, 8(1), 2284.
36. Leshem, Y.; Seri, L. & Levine, A. (2007). Induction of phosphatidylinositol 3- kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *The Plant J.* 51:185–197
37. Liu, W.; Au, D.W.T.; Anderson, D.M.; Lam, P.K.S. & Wu, R.S.S. (2007). Effects of nutrients, salinity, pH and light: dark cycle on the production of reactive oxygen species in the alga *Chattonella marina*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 346:76–86.
38. Maadane, A.; Merghoub, N.; Ainane, T.; El Arroussi, H.; Benhima, R.; Amzazi, S.; Bakri, Y. & Wahby, I. (2015). Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. *J. Biotechnol.*, 215, 13–19.
39. Mark A. Ragan (1998). On the delineation and higher-level classification of algae, *Eur. J. Phycol.*, 33,1-15.
40. Massjuk N.P., (1973). Morphology, systematics, ecology, geographic distribution of genus *Dunaliella* Teod. and perspectives of its practical use, Nauk. Dumka Press, Kiev.
41. Melkonian, M. & Preisig, H.R. (1984). An ultrastructural comparison between *Spermatozopsis* and *Dunaliella* (*Chlorophyceae*). *Pl Syst Evol.* 146, 31–46 <https://doi.org/10.1007/BF00984052>
42. Mirshekari, M.; Einali, A. & Valizadeh, J. (2019). Metabolic changes and activity pattern of antioxidant enzymes induced by salicylic acid treatment in green microalga *Dunaliella salina* under nitrogen deficiency. *J. Appl. Phycol.*, 31, 1709–1719.

43. Montingelli, M.; Tedesco, S. & Olabi, A. (2015), «Biogas production from algal biomass: A review», *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 43: pp. 961-972.
44. Muñoz, R. & Guieysse, B. (2006). Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water research*, 40(15), 2799-2815.
45. Naceur, H. B.; Jenhanive, A. B. R. & Romdhane, M. S. (2009). New distribution record of the brine shrimp *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca) in Tunisia. *Check List*, 5(2), 281-288.
46. Natrah, F. M. I.; Yusoff, F. M.; Shariff, M.; Abas, F. & Mariana, N. S. (2007). Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value. *Journal of Applied Phycology*, 19, 711-718.
47. Nimura, Y. (1987). A probable reason why *Artemia* is confined to isolated saline waters. In *Artemia Research and Application* (V.3, 73-98). Wetteren: Universa Press.
48. Nowicka, B.; Pluciński, B.; Kuczyńska, P.; Kruk, J. (2016) Physiological characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* acclimated to chronic stress induced by Ag, Cd, Cr, Cu and Hg ions, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 130, 133–145
49. Olaizola, M. (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular engineering*, 20(4-6), 459-466.
50. Oren, A. (2014). The ecology of *Dunaliella* in high-salt environments. *Journal of Biological Research*, 21:23.
51. Oren, A. (2020). The microbiology of red brines. *Advances in Applied Microbiology*, 113, 57-110.
52. Orús, M. I.; Marco, E. & Martínez, F. (1991). Suitability of *Chlorella vulgaris* UAM 101 for heterotrophic biomass production. *Bioresource Technology*, 38(2-3), 179-184.
53. Ozturk, Z.N.; Talame, V.; Deyholos, M.; Michalowski, C.B.; Galbraith, D.W.; Gozukirmizi, N.; Tuberosa, R. & Bohnert, H.J. (2002). Monitoring largescale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Mol. Biol.* 48:551–573.
54. Petrovska, B.; Winkelhausen, E. & Kuzmanova, S. (1999). "Glycerol production by yeasts under osmotic and sulfite stress". *Canadian Journal of Microbiology*. 45 (8): 695–699. doi:10.1139/w99-054.
55. Pick, U. (2002). Adaptation of the halotolerant alga *Dunaliella* to high salinity. In A Lauchli, Luthge, (eds), *Salinity: Environment, Plants, Molecules*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp 97–112.
56. Plaza, M.; Cifuentes, A. & Ibáñez, E. (2008). In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology*, 19(1), 31-39.
57. Polle, J. E.; Jin, E. & Ben-Amotz, A. (2020). The alga *Dunaliella* revisited: Looking back and moving forward with model and production organisms. *Algal Research*, 49, 101948.
58. Preetha, K.; Lijo, J.; Cherampilli, S. & Koyadan, K.K. (2012). Phenotypic and genetic characterization of *Dunaliella* (Chlorophyta) from Indian salinas and their diversity. *Aquatic Biosystems*, 8:27.
59. Priyadarshani, I. & Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae—A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3(4), 89-100.
60. Rao, A.R.; Dayananda, C.; Sarada, R.; Shamala, T.R. & Ravishankar, G.A. (2007). Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Biores. Technol.* 98:560–564.
61. Raveendran, S.; Kuruvilla, A. & Rebello, S. (2018). Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. *Food Technol. Biotechnol.*, 56, 16–30.
62. Riccio, G., & Lauritano, C. (2019). Microalgae with immunomodulatory activities. *Marine drugs*, 18(1), 2.
63. Riccio, G.; De Luca, D. & Lauritano, C. (2020). Monogalactosyldiacylglycerol and sulfolipid synthesis in microalgae. *Marine Drugs*, 18(5), 237.
64. Running, J.A.; Severson, D.K. & Schneider, K.J. (2002). Extracellular production of L-ascorbic acid by *Chlorella* protothecoides, *Prototheca* species, and mutants of *P. moriformis* during aerobic culturing at low pH. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29, 93-98.
65. Saha, S.K.; Moane, S.; Murray, P. (2013). Effect of macro- and micro-nutrient limitation on superoxide dismutase activities and carotenoid levels in microalga *Dunaliella salina* CCAP 19/18. *Bioresour. Technol.*, 147, 23–28.

66. Saide, A.; Lauritano, C. & Ianora, A. (2020). Pheophorbide a: State of the Art. *Marine Drugs*, 18(5), 257.
67. Sawayama, S.; Inoue, S.; Tsukahara, K. & Ogi, T. (1996). Thermochemical liquidization of anaerobically digested and dewatered sludge and anaerobic retreatment. *Bioresource Technology*, 55(2), 141-144.
68. Schenk, P.M.; Thomas-Hall, S.R.; Stephens, E.; Marx, U.C.; Mussgnug J.H.; Posten C.; Kruse, O. & Hankamer, B. (2008). Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *Bioenerg. Res.* 1, 20–43. <https://doi.org/10.1007/s12155-008-9008-8>
69. Shariati, M. & Hadi, M.R. (2011) Microalgal Biotechnology and Bioenergy in Dunaliella. In *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering—From Analysis and Modeling to Technology Applications*; Carpi, A., Ed.; Intechopen: Rijeka, Croatia; Available online: <https://www.intechopen.com/books/progress-in-molecular-and-environmental-bioengineering-from-analysis-and-modeling-to-technology-applications/microalgal-biotechnology-and-bioenergy-in-dunaliella> (accessed on 26 April 2021)
70. Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E.; & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), 87-96.
71. Survase, S.A.; Bajaj, I.B., & Singhal, R.S. (2006). Biotechnological Production of Vitamins. *Food Technology & Biotechnology*, 44(3).
72. Valencia, I.; Ansorena, D. & Astiasarán, I. (2007). Development of dry fermented sausages rich in docosahexaenoic acid with oil from the microalgae *Schizochytrium* sp.: Influence on nutritional properties, sensorial quality and oxidation stability. *Food Chemistry*, 104(3), 1087-1096.
73. Vavilala, S.L.; Gawde, K.K.; Sinha, M. & D'Souza, J.S., 2015. Programmed cell death is induced by hydrogen peroxide but not by excessive ionic stress of sodium chloride in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Phycology*, 50(4), pp.422-438.
74. Villarruel-López, A.; Ascencio, F. & Nuño, K. (2017). Microalgae, a Potential Natural Functional Food Source—A Review. *Polish J. Food Nutr. Sci.*, 67, 251–263.
75. Widowati, I.; Zainuri, M.; Kusumaningrum, H.P.; Susilowati, R.; Hardivillier, Y.; Leignel, V.; Bourgougnon, N. & Mouget, J.L. (2017). Antioxidant activity of three microalgae *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* and *Isochrysis galbana* clone Tahiti. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*; IOP Publishing: Bali, Indonesia, Volume 55, p. 012067.
76. Williams, W.D. (1993). Conservation of salt lakes. *Hydrobiologia* 267: 291-306.
77. Yun, Y. S.; Lee, S. B.; Park, J. M.; Lee, C. I. & Yang, J. W. (1997). Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental and Clean Technology*, 69(4), 451-455.
78. Γαλάτης, Β.; Αποστολάκος, Π. & Κατσαρός, Χ. (1998) Εισαγωγή στη Βοτανική, εκδ. Αθ. Σταμούλης.
79. Γεωργούσης, Ε.(2018). Το αλάτι και οι αλυκές ως αντικείμενο Περιβαλλοντικής Εκπαίδευσης. Μεταπτυχιακή Διατριβή Ειδίκευσης [Online]. Αθήνα: Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο. Διαθέσιμο στο: <https://pergamos.lib.uoa.gr/uoa/dl/object/2775009/file.pdf> [Πρόσβαση: Ιούνιος 2023]
80. Ελληνικές Αλυκές (2006). Περιβαλλοντική Δήλωση Κοινοτικού Συστήματος Οικολογικής Διαχείρισης και Οικονομικού Ελέγχου (EMAS).
81. Ζαλίδης Γ. & Α. Μαντζαβέλας (συντονιστές εκδόσεως)(1994). Απογραφή ελληνικών υγροτόπων ως φυσικών πόρων (Πρώτη προσέγγιση). Μουσείο Γουλανδρή Φυσικής Ιστορίας, Ελληνικό Κέντρο Βιοτόπων-Υγροτόπων. xviii + 587 σελ
82. Κακαλής, Ε. & Ε. Γαληνού. 2009. Έκθεση Ορνιθολογικής αξιολόγησης περιοχής «GR137 Κόλπος Καλλονής». Στο Δημαλέξης, Α., Δ. Μπούσμπουρας, Θ. Κασρίτης, Α. Μανωλόπουλος και V. Saravia. (Συν. Έκδοση). Τελική αναφορά προγράμματος επαναξιολόγησης 69 σημαντικών περιοχών για τα πουλιά για τον χαρακτηρισμό τους ως Ζωνών Ειδικής Προστασίας της Ορνιθοπανίδας. ΥΠΕΧΩΔΕ, Αθήνα.
83. Κατσαδωράκης, Γ. & Παραγκαμιάν, Κ. (2007). Απογραφή των Υγροτόπων των Νησιών του Αιγαίου: Ταυτότητα, Οικολογική Κατάσταση και Απειλές. Αθήνα: WWF Ελλάς

84. Κεχαγιάς, Γ. (2015). Λιμνολογία - Σημειώσεις μαθήματος. Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Πατρών.
85. Λαμπρόπουλος, Ν. & Κούρτελη, Χ. (1995). Οι αλυκές της Ελλάδας ως μονάδες παραγωγής αλατιού και ως υγράτοποι ειδικής σημασίας. Ελληνικό Κέντρο Βιοτόπων - Υγροτόπων (ΕΚΒΥ).
86. Παναγιώτου, Χ.; Καρή, Κ. & Basil, E. (2006). Μελέτη εκτίμησης των επιπτώσεων στο περιβάλλον από τις εργασίες διαχείρισης και αποκατάστασης στις Αλυκές Λάρνακας, CY 6000002, Δράση C12. Ατλάντις Συμβουλευτική Κύπρου.
87. Παναγιώτου, Χ.; Κουτσουμπάς, Κ.; Τσιάτταλου, Γ.; Ανδρέου, Κ.; Καρτακούλης, Χ.; Μιλτιάδους, Μ.; και συν. (2008). Μελέτη Εκτίμησης των Επιπτώσεων στο Περιβάλλον από κατασκευή Κέντρου Περιβαλλοντικής Ενημέρωσης στις Αλυκές Λάρνακας. Λευκωσία: Ατλάντις Συμβουλευτική Κύπρου. Υπουργείο Γεωργίας Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος, Υπηρεσία Περιβάλλοντος.
88. Τζιωρτζιής, Ι. (2008). Παρακολούθηση της οικολογικής ποιότητας παράκτιων οικοσυστημάτων Ελλάδας και Κύπρου στα πλαίσια εφαρμογής της Οδηγίας 2000/60/ΕΕ για τα ύδατα: Λιμνοθάλασσες Κοτύχι-Πρόκοπος, Αλυκές Λάρνακας- Ακρωτηρίου. Μεταπτυχιακή εργασία, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών.
89. Φωτίου, Θ. (2013). Χαρακτηρισμός και δυναμική Ανοστράκων στις Αλυκές Λάρνακας. Μεταπτυχιακή εργασία, Τμήμα Βιολογίας, ΑΠΘ.
90. Χατζηχριστοφόρου, Μ. (2008). Case Study: Σκάγια Μολύβδου στην Αλυκή της Λάρνακας. Εκτίμηση και Αποκατάσταση. Λευκωσία: Τμήμα Αλιείας και Θαλάσσιων Ερευνών.
91. Χώτος, Γ.(2019). *Dunaliella*, το θαυμαστό φύκος των αλυκών. Technical report. Τμήμα Ζωϊκής παραγωγής, Αλιείας & Υδατοκαλλιεργειών, Πανεπιστήμιο Πατρών.