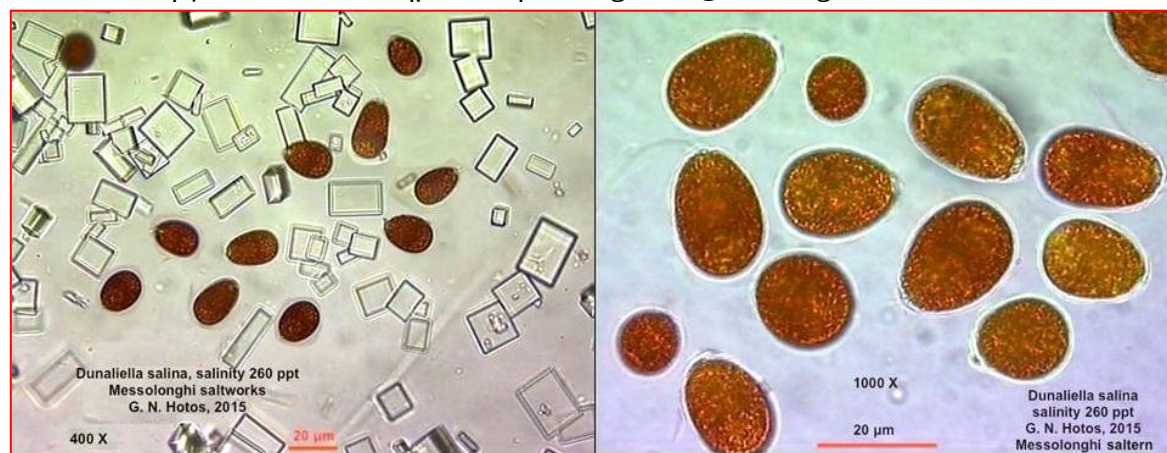


Dunaliella, το θαυμαστό φύκος των αλυκών

Γεώργιος Ν. Χώτος, καθηγητής

Εργαστήριο καλλιέργειας πλαγκτού, Τμ. Ζωϊκής παραγωγής, Αλιείας &
Υδατοκαλλιεργειών, Πανεπιστήμιο Πατρών ghotos@teimes.gr

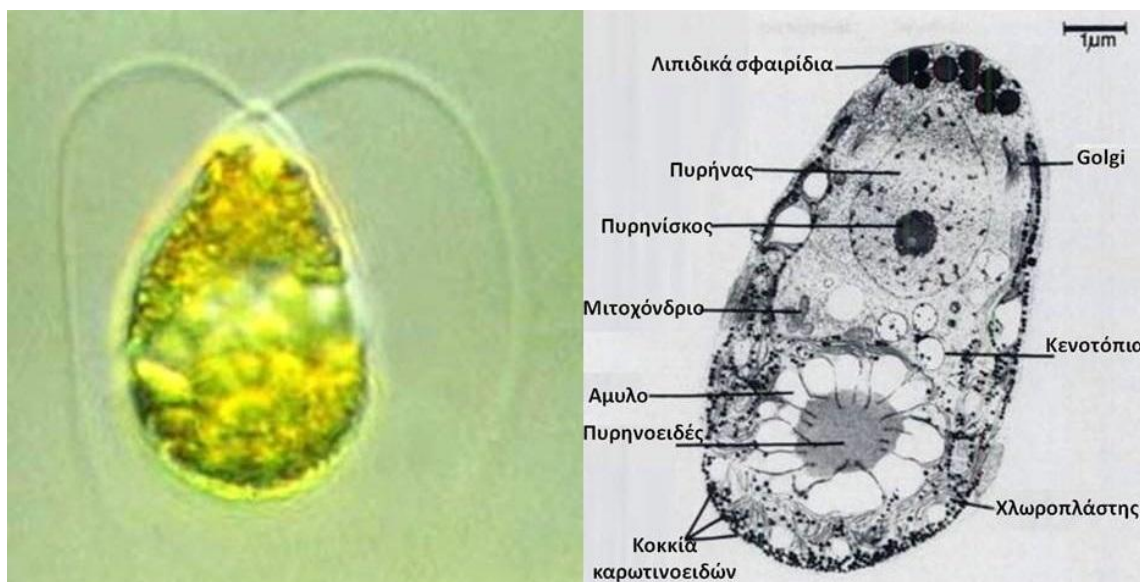


Σχήμα 1. Κύτταρα *Dunaliella salina* χρωματισμένα κόκκινα λόγω συσσώρευσης β-καρωτίνιου σε υψηλή αλατότητα (στη φωτογρ. αριστερά σχηματίστηκαν ήδη κρύσταλλοι άλατος). Δείγματα από κρυσταλλωτήρια αλυκών Μεσολογγίου (Γ. Χώτος, 2015).

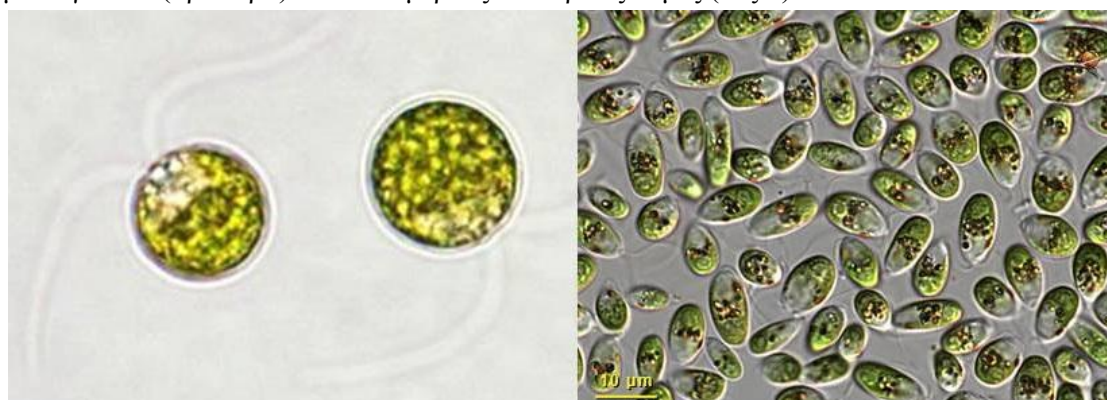
Μετά από αρκετά χρόνια ενασχόλησης με το φυτοπλαγκτονικό "είδος" *Dunaliella* (μεταξύ άλλων) που διατηρώ και καλλιεργώ στο εργαστήριο καλλιέργειας πλαγκτού, κυρίως ως τροφή για ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς, νιώθω αρκετά ώριμος για να επιχειρήσω μια εγκυκλοπαιδικού τύπου σύνοψη επί των βιολογικών του χαρακτηριστικών, με σκοπό αυτή να βοηθήσει όσους ασχοληθούν με αυτό. Το από 25ετίας είδος της *Dunaliella* που διατηρώ στο εργαστήριο προέρχεται από την αλυκή της Ασπρης στο Μεσολόγγι και, αν και δεν το έχω ταυτοποιήσει μοριακά, είμαι πεπεισμένος ότι πρόκειται για τη *Dunaliella salina* (την ονοματίζω βαφτίζοντάς τη "θηλυκού" γένους χάριν ευφωνίας). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν χιλιάδες επιστημονικά άρθρα για τη *Dunaliella* γενικώς αλλά αυτό που πραγματικά μου λείπει είναι ένα συνοψιστικό φιλικό και κατανοητό άρθρο βασισμένο στην πείρα κάποιου που το καλλιεργεί χρόνια. Και για να γίνω απόλυτα συγκεκριμένος να πω ότι στη βιβλιογραφία δεν πρόκειται κάποιος να βγάλει άκρη σχετικά με φωτογραφικό υλικό για τα διάφορα είδη *Dunaliella*. Είναι όλα τόσο αόριστα και η *Dunaliella* τόσο ευμετάβλητη μορφολογικά που μόνο οι ειδικοί μπορούν να αποφανθούν ύστερα από μοριακή ανάλυση, ή (το πιο εύκολο) λαμβάνοντας κατόπιν παραγγελίας (με το ανάλογο κόστος) μια καθαρή καλλιέργεια από ειδικευμένα εργαστήρια. Ομως το πρόβλημα παραμένει για τον φυσιοδίφη που θα συλλέξει κάποια *Dunaliella* από τη φύση και ευτυχώς, τουλάχιστον το είδος που ευδοκιμεί στις αλυκές είναι 99% το *Dunaliella salina*. Εχοντας λοιπόν "αγανακτήσει" από την έλλειψη επαρκών πληροφοριών, φρόντισα στο παρόν πόνημα να ενσωματώσω αρκετές χαρακτηριστικές φωτογραφίες από τη συμβίωσή μου με αυτό το θαυμαστό μικροφύκος. Το κείμενο είναι βασισμένο στις καλύτερες εργασίες που υπάρχουν και σε προσωπικές μου παρατηρήσεις. Αφησα εκτός ιδιαίτερες εξειδικευμένες πληροφορίες και επικεντρώθηκα στα βασικά τόσο της βιολογίας

της όσο και της καλλιέργειάς της. Ας κατανοήσει πρώτα αυτά ο όποιος φοιτητής και κατόπιν ας ανοίξει τα φτερά της μάθησης για ειδικότερες και βαθύτερες γνώσεις.

Το γένος *Dunaliella* της οικογένειας Chlorophyceae της ομοταξίας Chlorophyta έλκει την ονομασία του από το είδος *Dunaliella salina* που περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Ρουμάνο βοτανολόγο Emanoil C. Teodoresco το 1905 (και του έδωσε το όνομα αυτό προς τιμήν του Michel Felix Dunal που ανέφερε για πρώτη φορά αυτό το "κόκκινο πλάσμα" το 1838 σε αλυκές της Γαλλίας) και από τότε μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 29 είδη *Dunaliella* στα οποία διακρίνονται και ένας αριθμός ποικιλιών (κατά ορισμένους ερευνητές). Για να είμαστε όμως ιστορικά δίκαιοι πρέπει να αναφέρουμε ότι την ίδια εποχή που ο Teodoresco μελετούσε τη *Dunaliella* στη Ρουμανία το ίδιο έπραττε και η Γερμανίδα βιολόγος Clara Hamburger μελετώντας το (και μάλιστα εμβριθέστερα και περιγραφικότερα) από δείγματα που έφερε από το Κάλιαρι της Σαρδηνίας (Σχήμα 18). Δυστυχώς όμως για αυτήν ο Teodoresco ετοίμασε και δημοσίευσε πρώτος τη σχετική εργασία οπότε πιστώθηκε την πατρότητα της ονομασίας του είδους αυτού. Από το 1905 και μετά εκδόθηκαν πλήθος άλλων δημοσιεύσεων για το γένος *Dunaliella* από όλα σχεδόν τα μέρη της Γης.



Σχήμα 2. Τυπικό αχλαδοειδές σχήμα του κυττάρου της *Dunaliella* με τα 2 μεγάλα και ισομεγέθη μαστίγιά του (αριστερά) και οι επιμέρους κυτταρικές δομές (δεξιά).



Σχήμα 3. Εκτός από το σύνηθες επίμηκες αχλαδοειδές σχήμα (δεξιά) η *Dunaliella* ανάλογα με τις συνθήκες απαντάται και σε σφαιρική μορφή κινητικών κυττάρων (αριστερά).

Όλα τα είδη της *Dunaliella* (Σχήματα 1, 2 & 3) είναι μονοκύτταρα, χωρίς κυτταρικό τοίχωμα (γυμνά) και διαθέτουν 2 ισομεγέθη μαστίγια μήκους μεγαλύτερου (1,5-2 φορές) από αυτό του θαλλού (κυττάρου) τους. Ο πυρήνας είναι ευμεγέθους βρίσκεται σε κεντρική θέση στο εμπρόσθιο μέρος (το μέρος όπου εκφύονται τα μαστίγια) του αχλαδοειδούς τυπικού σχήματος κυττάρου και ως εμπρόσθιο ονομάζουμε το στενό τμήμα ενώ ως οπίσθιο το αποστρογγυλεμένο στην απέναντι άκρη. Ο πυρήνας περιβάλλεται κατά το μεγαλύτερο μέρος του από τον μεγάλο χλωροπλάστη που γεμίζει σχεδόν το πρωτόπλασμα και από διάφορα μικρά κενοτόπια. Η ανυπαρξία κυτταρικού τοιχώματος δεν επιτρέπει την ακαμψότητα (σταθερότητα) του κυτταρικού σχήματος το οποίο λόγω του ότι είναι πολύ εύπλαστο εύκολα επηρεάζεται από την ωσμωτική κατάσταση του περιβάλλοντος νερού και ανάλογα διογκώνεται ή συρρικνώνεται (μέχρι εκεί που πρέπει βέβαια διότι το κύτταρο έχει μηχανισμό ωσμωρύθμισης), ανάλογα με το αν το νερό είναι πολύ αραιότερο ή πυκνότερο σε σχέση με το κυτταρόπλασμα. Το μέγεθος του κυττάρου ποικίλλει πάρα πολύ τόσο ανάμεσα στα διάφορα είδη όσο και στο ίδιο το είδος ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν. Ένα τυπικό μέγεθος είναι αυτό των 7-12 μm κατά τον επιμήκη άξονά του αλλά πολύ συχνά απαντάται και σε μεγέθη 16-24 μm . Είναι πολύ κινητικό είδος και τα πολύ γρήγορα χτυπήματα των μαστιγίων του το προωθούν προς τα εμπρός σε μια χαρακτηριστική πορεία με απότομες και στριφογυριστές κινήσεις κατά τον οριζόντιο άξονα του κυττάρου. Το μέσου (τυπικού) μεγέθους κύτταρο της *Dunaliella* πάντως είναι αρκετά μικρότερο συγκριτικά με άλλα είδη μαστιγοφόρων χλωροφυκών που απαντώνται στην υπεραλατότητα όπως αυτό της *Asteromonas gracilis* (18 -25 μm) ή της *Tetraselmis marina* (20 - 30 μm) ή σε κανονική αλατότητα της *Rhodomonas salina*, (10-15 μm) (Σχήματα 4 & 19).



Σχήμα 4. Δύο φωτογραφίες δειγμάτων μικτής καλλιέργειας αλοανθηκτικών χλωροφυκών σε αλατότητα 110 ppt (αριστερά) και κανονική αλατότητα 40 ppt (δεξιά) όπου εμφανώς αποτυπώνεται πόσο μικρότερο είναι το κύτταρο της *Dunaliella* συγκριτικά με το μεγάλο της *Asteromonas gracilis* το μεσαίο της *Rhodomonas salina* και το "γιγαντιαίο" της *Tetraselmis marina* (δείγματα από αλυκές Μεσολογίου, Γ. Χώτος, 2015).

Στην κίνηση και στην κυτταρική εμφάνιση η *Dunaliella* αναφέρεται συχνά σε επιστημονικά κείμενα ότι μοιάζει με το πολυερευνημένο χλωρο-μικροφύκος *Chlamydomonas* όμως πέραν του ό,τι η *Chlamydomonas* διαθέτει κυτταρικό τοίχωμα, το σχήμα των κυττάρων τους διαφέρει δεδομένου ότι το μεν *Chlamydomonas* είναι σχεδόν σφαιρικού σχήματος ενώ το *Dunaliella* αχλαδοειδές. Αντί για άκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα

η *Dunaliella* διαθέτει ένα αξιοπρόσεκτο βλεννώδες κάλυμμα αποτελούμενο κυρίων από γλυκοπρωτεΐνες. Δεν διαθέτει σφυγμώδες κενोटόπιο (συνήθως στο εμπρόσθιο μέρος του κυττάρου) που βοηθά άλλα φύκη στην ωσμωρύθμιση διότι όπως θα αναφερθεί παρακάτω η *Dunaliella* έχει άλλη "στρατηγική" αντιμετώπισης των ωσμωτικών πιέσεων (παράγει και συσσωρεύει γλυκερόλη). Μοιάζει όμως με τη *Chlamydomonas* στο ό,τι διαθέτουν και τα δύο ένα μεγάλο κυπελλοειδή χλωροπλάστη και διαφέρουν συνάμα στο ότι η *Dunaliella* που απαντάται στα αλμυρά και υπεράλμυρα νερά διαθέτει σε κεντρική θέση του χλωροπλάστη της και ένα πυρηνοειδές το οποίο περιβάλλεται από συσσωματώματα αμύλου (προϊόντα της φωτοσύνθεσης). Στο εμπρόσθιο άκρο του κυττάρου και ανάλογα με τη φυσιολογική κατάσταση διακρίνεται ποικίλος αριθμός κοκκίων (σταγονιδίων) ελαίου (λιπιδίων). Το αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των πολύ αλοανθεκτικών ειδών *Dunaliella salina* και *D. parva* είναι η συσσώρευση εντός του χλωροπλάστη τους μεγάλων ποσοτήτων της χρωστικής β-καρωτίνιο η οποία υπό μορφή σταγονιδίων καταλαμβάνει την περιφέρεια του χλωροπλάστη και χρωματίζει το κύτταρο πορτοκαλο-κόκκινο. Η αλλαγή του χρωματισμού του κυττάρου από πράσινο (όταν έχει λίγο β-καρωτίνιο) σε πορτοκαλο-κόκκινο (πολύ β-καρωτίνιο) οφείλεται στο ότι τα καρωτίνια σκεπάζουν την πράσινη χλωροφύλλη και επειδή ο χλωροπλάστης αποτελεί τη μεγαλύτερη μάζα του κυττάρου το χρώμα του κυττάρου καθορίζεται από τα καρωτίνια που καλύπτουν το χλωροπλάστη.

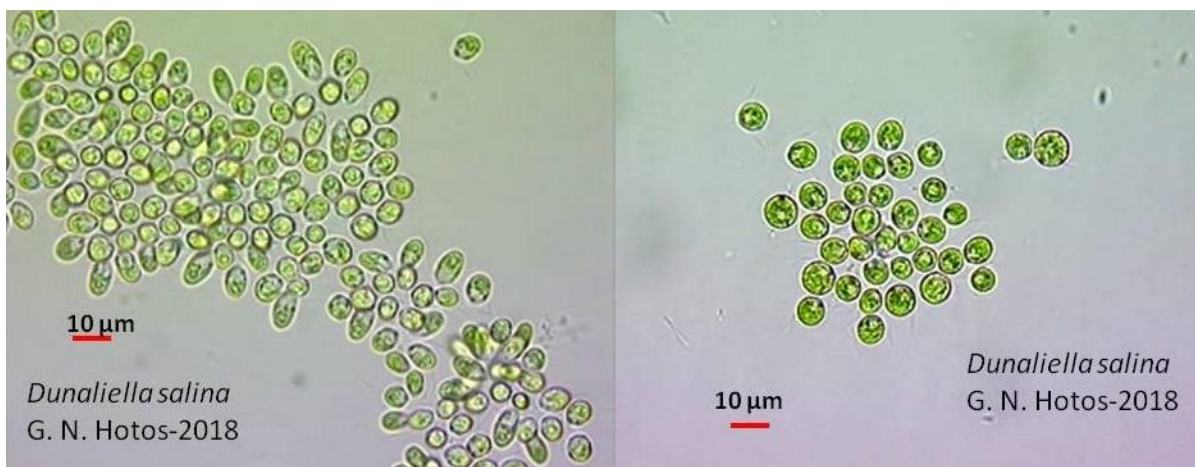
Dunaliella στην αλυκή Μεσολογίου
Γ. Χώτος, 2016



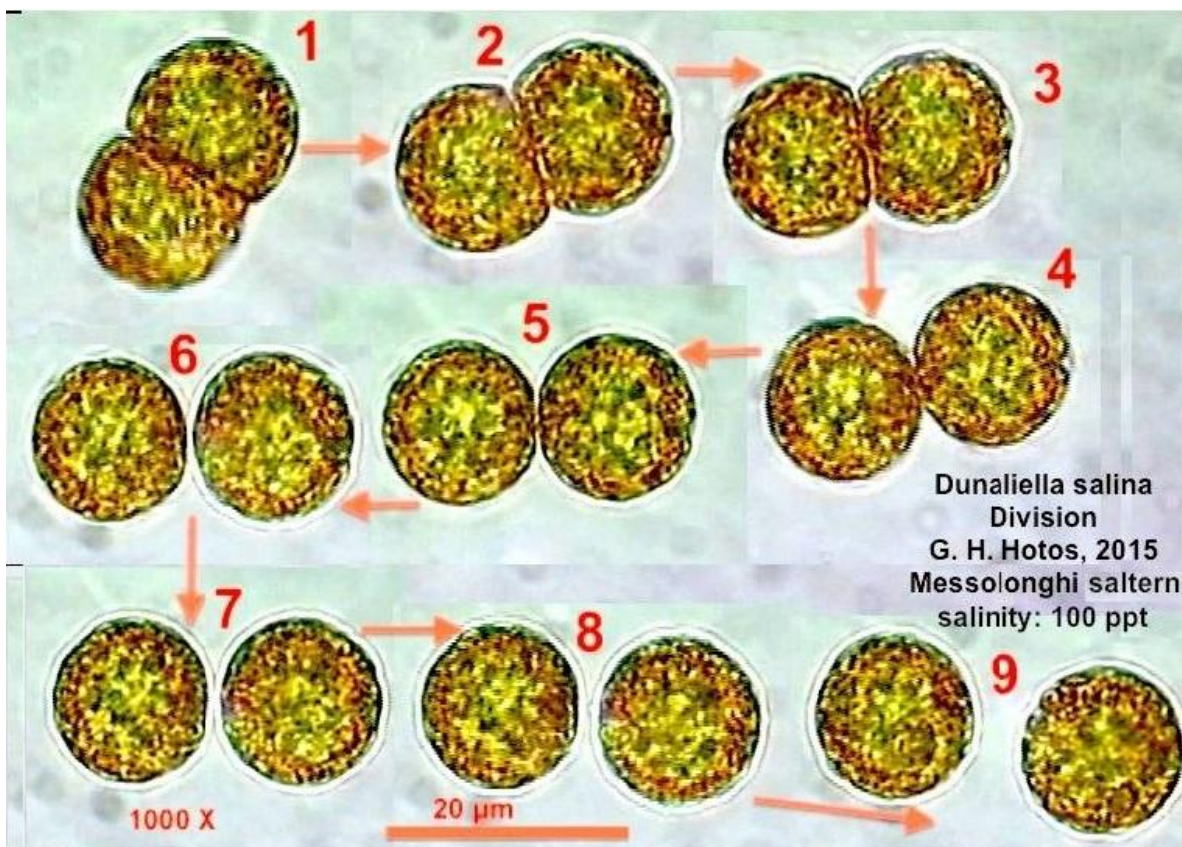
Σχήμα 5. Οπου υπάρχει έντονη ανάπτυξη πληθυσμού *Dunaliella* (αριστερά σε αλυκή, δεξιά σε δεξαμενές καλλιέργειας), σε συνδυασμό με την υψηλότερη αλατότητα (άνω των 150 ppt) το νερό αποκτά πορτοκαλο-κόκκινο χρωματισμό από τη συσσώρευση της χρωστικής β-καρωτίνιο στο κύτταρο.

Το φαινόμενο του πορτοκαλο-κόκκινου χρωματισμού βρίσκει την κλασσική του και πλέον έντονη έκφραση στο είδος *D. salina* που ακμάζει στις λεκάνες με την πολύ υψηλή αλατότητα (αντέχει και 300 ppt), συνήθως στις αλυκές όπου επικρατεί βαθμιαία (με την ύψωση της αλατότητας) ως το μοναδικό μικροφύκος εκεί (Σχήμα 5). Ο ρόλος του β-καρωτίνιου πέραν του ότι δρα ως επικουρική χρωστική για τη χλωροφύλλη (μεταφέρει στη χλωροφύλλη-α του φωτοσυνθετικού κέντρου φωτόνια), είναι και η προστασία της χλωροφύλλης καθώς και του κυτταρικού DNA από την υπερβολική έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία (και από το μέρος του φάσματος της UV) στις συνθήκες που επικρατούν στις λουσμένες στον ήλιο αβαθείς υπεράλμυρες λεκάνες. Δρα με άλλα λόγια ως μια ασπίδα ηλιοπροστασίας. Επιπλέον τα πολλά β-καρωτίνια δρουν και ως "αποθήκη" του πλεονάζοντος άνθρακα που δεσμεύεται από τα εντόνως φωτοσυνθέτοντα κύτταρα τα οποία όμως σε αυτές τις συνθήκες δεν πολλαπλασιάζονται έντονα. Δηλαδή με άλλα λόγια ο

υπάρχον πληθυσμός της *Dunaliella salina* σε υπεραλατότητα και έντονο φως δεν αυξάνεται αλλά τα κύτταρά του φωτοσυνθέτουν και "παχαίνουν".

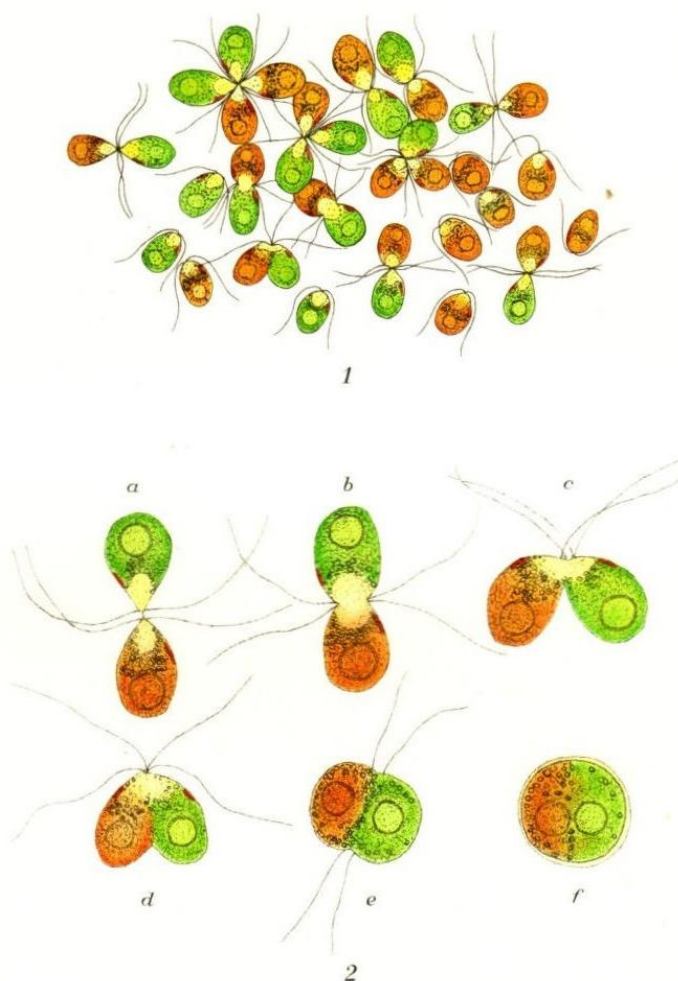


Σχήμα 6. Κινητικά βλαστητικά κύτταρα *Dunaliella salina* σε αχλαδοειδή (αριστερά) και σφαιρική (δεξιά) μορφή που σχηματίζουν συσσωματώματα.



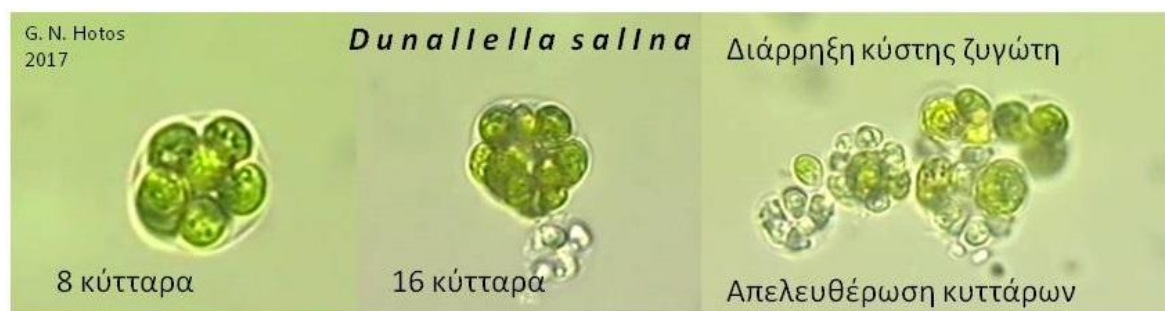
Σχήμα 7. Κολάζ με απεικονίσεις διαφόρων χρονικών φάσεων κατά το διαχωρισμό των θυγατρικών κυττάρων που προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό της *Dunaliella salina* με απλή κυτταρική διαίρεση. Το συγκεκριμένο επεισόδιο αποδεικνύει ότι ακόμα και κατά τη φάση της έντονης καρωτινογένεσης (μαρτυράται από τον πορτοκαλοκόκκινο χρωματισμό των κυττάρων) σε υψηλή αλατότητα ακόμα και στη σφαιρική μορφή της χωρίς μαστίγια (που μπορεί λανθασμένα να εκληφθεί ως ζυγωτικό κύτταρο) η *Dunaliella* εξακολουθεί να αναπαράγεται με τον απλό τρόπο της κυτταρικής σχάσης. Η διάρκεια της όλης διεργασίας μέχρι τον αποχωρισμό των κυττάρων διαρκεί αρκετές ώρες.

Η *Dunaliella* πολλαπλασιάζεται με κυτταρική κατά το μακρύ άξονα διαίρεση όταν ιδίως βρίσκεται στην κινητική της φάση (υπάρχει και φάση που στρογγυλεύει και δεν κινείται) (Σχήμα 7). Όταν η καλλιέργεια παρατηρείται μικροσκοπικώς και βρίσκεται σε ακμαία φάση τα κύτταρα είναι πολύ κινητικά, τα μαστίγια πάλλονται και η κίνηση είναι γρήγορη με κινήσεις μάλλον ακανόνιστες και διαστήματα "ανάπαυσης" με τρεμούλιασμα. Ενίοτε τα κύτταρα συγκεντρώνονται κατά μεγάλους αριθμούς σε συσσωματώματα που μοιάζουν με "τσαμπιά" σταφυλιού τα οποία είναι ακανονίστου σχήματος και μεγέθους (Σχήμα 6). Αλλά αποτελούνται από λίγα κύτταρα και άλλα από εκατοντάδες. Στα τσαμπιά αυτά τα κύτταρα είναι διατεταγμένα με κάποιο τρόπο που φαίνεται να εξυπηρετεί κάποιο σκοπό. Οι οξύληκτες μεριές των κυττάρων εκεί δηλαδή όπου εκφύονται τα μαστίγια βρίσκονται προς το εσωτερικό του τσαμπιού ενώ η αντίθετη πλευρά τους (η διογκωμένη, μην ξεχνάμε ότι το κύτταρο είναι αχλαδοειδές) βλέπει προς τα έξω. Τα μαστίγια σε αυτά τα συσσωματώματα όσο και αν είναι πυκνά στριμωγμένα φαίνεται να διατηρούν κάποια κινητικότητα. Με προσεκτική παρατήρηση βλέπουμε ότι περιοδικώς νέα κύτταρα έρχονται να προστεθούν στο εκάστοτε τσαμπί, ενώ άλλες φορές κάποια κύτταρα αποσπώνται από αυτό απομακρύνονται και αποκτούν τη συνήθη μεγάλη κινητικότητά τους. Ενίοτε πάλι η απομάκρυνση πολλών κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα διαλύει το συσσωμάτωμα. Η σημασία αυτού του φαινομένου για την επιβίωση του είδους παραμένει ανεξήγητη στη βιβλιογραφία (δεν έχει αναφερθεί καν εξ' όσων μελέτησα), αλλά αυτό που παρατήρησα είναι ότι συμβαίνει σε σφριγηλές καλλιέργειες.



Σχήμα 8. Αμφογονική (τρόπος του λέγειν διότι τα ενούμενα κύτταρα δεν είναι γαμέτες προερχόμενοι από αρσενικά και θηλυκά άτομα) αναπαραγωγή της *Dunaliella* με σύζευξη δύο βλαστητικών κυττάρων. Μετά τη σύμπτυξη των 2 απλοειδών πυρήνων τους ο 2πλοειδής ζυγώτης θα περάσει σε μια ληθαργική φάση και κατόπιν με μειωτική διαίρεση στην αρχή θα δώσει 4 απλοειδή κύτταρα τα οποία με μιτωτικές διαιρέσεις στη συνέχεια μπορεί να δώσουν μέχρι και 32 κύτταρα τα οποία απελευθερούμενα συνεχίζουν τη ζωή τους ως βλαστητικά μαστιγοφόρα κύτταρα. Η συγκεκριμένη απεικόνιση της σύζευξης μεταξύ κυττάρων με κανονική ποσότητα κωρυτοειδών (πράσινα) και κυττάρων πλούσιων σε κωρυτίνη (κόκκινα) είναι διάσημη στη βιβλιογραφία και δημιουργήθηκε από τον Lerche, 1937.

Ανέφερα το φαινόμενο της συσσωμάτωσης για να περιγράψω και τις ενώσεις των κυττάρων και πιο συγκεκριμένα αυτή που παρατηρείται κατά τη σύζευξη γαμετών (ισογαμία), δηλαδή της ένωσης δύο κυττάρων με το εμπρόσθιο οξύληκτο μέρος τους με σκοπό τη σύντηξη των απλοειδών πυρήνων τους και τη δημιουργία του διπλοειδούς ζυγώτη (Σχήμα 8). Πρόκειται για τον άλλο τρόπο αναπαραγωγής τον αμφιγονικό όπου το κάθε συζευγνόμενο κύτταρο παίζει το ρόλο του "θηλυκού" ή "αρσενικού" γαμέτη. Κατά τη σύζευξη εκτός από τους πυρήνες δημιουργείται και κοινό μεγαλύτερο κυτταρόπλασμα και ο ζυγώτης που σχηματίζεται είναι στρογγυλός, έχει χάσει τα μαστίγια, είναι πράσινος ή κόκκινος και περιβάλλεται από ένα λείο και παχύ κυτταρικό τοίχωμα με κυρίαρχο συστατικό τη σποροπολενίνη. Ο ζυγώτης περιπίπτει αρχικά σε φάση αδράνειας (άγνωστη η ακριβής διάρκειά του) και κατόπιν αρχικώς με μία μειωτική διαίρεση και στη συνέχεια με μιτωτικές σχηματίζει μέχρι 32 απλοειδή μικροσκοπικά κύτταρα τα οποία απελευθερώνονται μετά από διάρρηξη του μητρικού τοιχώματος και ελεύθερα πλέον κινούνται με τα μαστίγιά τους και αυξάνονται μέχρι το κανονικό μέγεθος του είδους (Σχήμα 9).

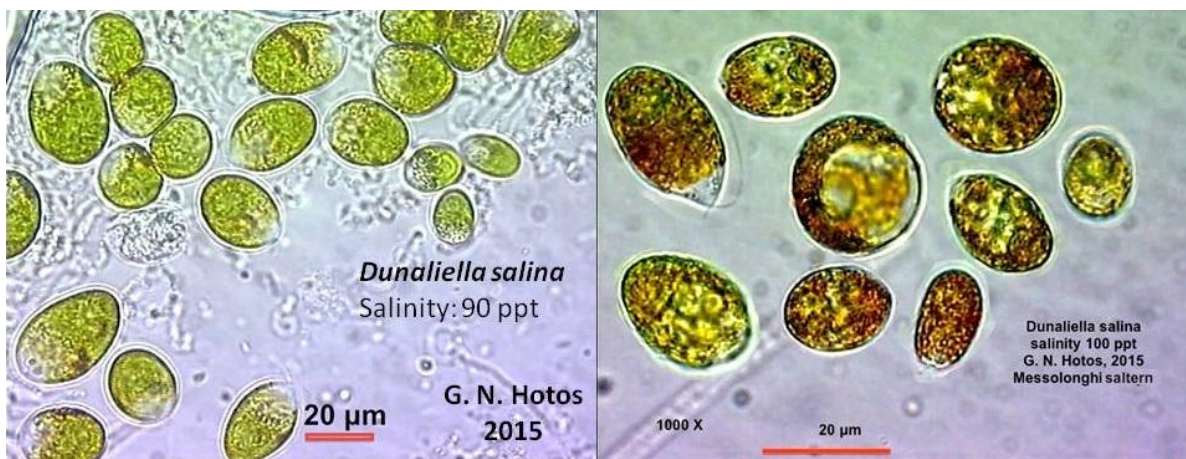


Σχήμα 9. Διάφορες καταστάσεις δημιουργίας θυγατρικών κυττάρων μέσα σε ένα ζυγωτικό κύτταρο της *Dunaliella salina*. Δεξιά αποτυπώνεται η διάρρηξη του τοιχώματος του ζυγώτη και η απελευθέρωση των θυγατρικών κυττάρων (στη συγκεκριμένη φωτ. μάλλον 32). Δείγματα από αλυκές Μεσολογίου, Γ. Χώτος, 2017.



Σχήμα 10. Κύστεις *Dunaliella salina* μεταξύ βλαστητικών κυττάρων ποικίλου μεγέθους. Οι κύστεις χαρακτηρίζονται από μεγάλη περιεκτικότητα σε καρωτίνη, έχουν παχυμένο τοίχωμα και φυσικά στερούνται μαστιγίων. Κύστεις σχηματίζονται μόνο σε μεγάλες αλατότητες και στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν 150 ppt. Δείγματα από αλυκές Μεσολογίου, Γ. Χώτος, 2015-17.

Ενας άλλος τρόπος αναπαραγωγής που παρατηρείται ενίοτε (ιδιαίτερα όταν τα θρεπτικά υλικά του νερού εξαντλούνται), είναι και η ακινητοποίηση των κυττάρων με χάσιμο των μαστιγίων και ο εγκλεισμός τους σε ένα παχύ στρώμα βλέννας (στάδιο παλμέλλας) όπου παραμένουν για αρκετό διάστημα και όταν οι συνθήκες με την επάρκεια θρεπτικών επανέλθουν ξαναδημιουργούνται τα κινητικά κύτταρα (Σχήματα 15 & 16). Ενίοτε το κανονικό βλαστητικό αποβάλλει τα μαστίγιά του και μεταπίπτει σε σφαιρικού σχήματος κύστη-απλανοσπόριο το οποίο αρχικώς έχει τραχύ και παχύ κυτταρικό τοίχωμα (Σχήμα 10). Τα απλανοσπόρια σε καλές συνθήκες περιβάλλοντος διαλύουν το τοίχωμά τους και μεταμορφώνονται ξανά στα συνήθη κινητικά (βλαστητικά) κύτταρα.



Σχήμα 11. Ποικιλομορφία στα κύτταρα της *Dunaliella salina*. Αριστερά αποτυπώνονται αρκετά μεγάλα κύτταρα χωρίς μεγάλο περιεχόμενο σε καρωτίνη και γι' αυτό φαίνονται πράσινα. Ακόμα όμως και σε αυτό το δείγμα παρουσιάζεται μεγάλη ποικιλία μεγεθών. Δεξιά το δείγμα είναι από υψηλότερη αλατότητα και τα κύτταρα αρχίζουν να συσσωρεύουν καρωτίνη και κοκκινίζουν. Δείγματα από αλυκές Μεσολογγίου, Γ. Χώτος, 2015.

Το σχήμα του κυττάρου της *Dunaliella* παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία και ενώ η τυπική του μορφή είναι αχλαδοειδής μπορεί να γίνεται κυλινδρική, οβάλ, ελλειψοειδής, ατρακτοειδής ή σφαιρική ανάλογα με τις μεταβολές των συνθηκών, δηλαδή θερμοκρασία, φως, θρεπτικά και πάνω απ' όλα αλατότητα (Σχήμα 11). Ως γενικό κανόνα πάντως μπορούμε να πούμε ότι σε δυσμενείς συνθήκες (κυρίως εξάντληση των θρεπτικών) μεταπίπτει στη σφαιρική μορφή. Το μέγεθος του κυττάρου ποικίλλει επίσης πάρα πολύ και σε μια ακμάζουσα καλλιέργεια με κύτταρα στην εκθετική φάση αύξησης του πληθυσμού, παρατηρούνται ποικίλα μεγέθη με την πλειονότητα σε ένα τυπικό μέγεθος 8-10 µm (κατά τον επιμήκη άξονα) και 4-5 µm (κατά πλάτος), και ένα μικρότερο ποσοστό μικρότερων κυττάρων της τάξεως των 5-8 µm προφανώς προερχομένων από πρόσφατο πολλαπλασιασμό μέσω ζυγώτη ή απλανοσπορίων. Σε συνθήκες πολύ υψηλής αλατότητας όπου ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μειώνεται δραματικά τα κύτταρα μεγαλώνουν σε μέγεθος και μπορούν να φθάσουν και 15 µm ενώ συνάμα αρχίζουν να αποκτούν πορτοκαλί χροιά λόγω συσσώρευσης καρωτινοειδών.

Υπάρχουν πολλές αναφορές ότι η *Dunaliella* σχηματίζει κύστες είτε σε παλμελλοειδή μορφή (εγκλεισμός σε βλεννώδη κάψα) είτε από μεταμόρφωση του βλαστητικού κυττάρου, είτε από το σχηματισμό ζυγώτη. Εκτός από την περίπτωση του

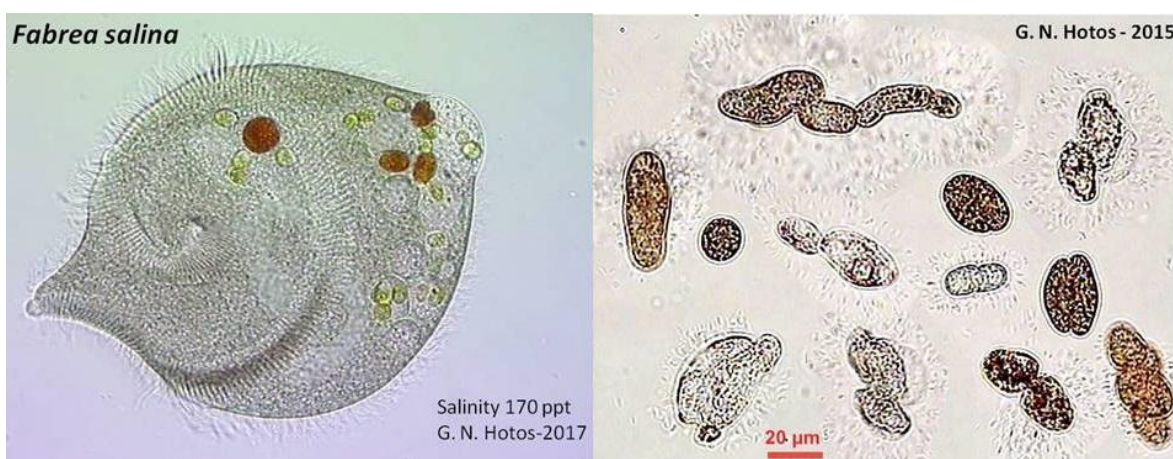
ζυγώτη οι άλλες δύο περιπτώσεις ενκύστωσης φαίνεται ότι προκαλούνται από έντονες αλλαγές στα χαρακτηριστικά του νερού και μάλιστα ως προς τα δύο άκρα της αλατότητας δηλαδή είτε έντονη πτώση της αλατότητας είτε δραματική αύξησή της που ενίοτε καταλήγει στην πλήρη εξάτμιση της υδάτινης μάζας. Ομως και η παγωνιά μπορεί να προκαλέσει ενκύστωση όπως επίσης και η έλλειψη θρεπτικών. Οι κύστες αυτές βυθίζονται και εναποτίθενται στον πυθμένα όπου μπορούν να παραμείνουν για πολύ καιρό (άγνωστο πόσο) σε αδράνεια και να μεταμορφωθούν σε κινητικά (με μαστίγια) βλαστητικά κύτταρα όταν οι συνθήκες καλυτερέψουν.

Επικρατεί μεγάλη σύγχυση στην ταξονομία του γένους *Dunaliella* και ενώ από τα μορφολογικώς ταξινομημένα 29 είδη τα 14 κατατάσσονται στα αλόφιλα με προτίμηση αλατότητας 60-120 ppt υπάρχει αμφιβολία για το αν και τα υπόλοιπα δεν είναι τουλάχιστον αλοανθεκτικά. Από τα πιο συχνά αναφερόμενα είδη στις διάφορες μελέτες ξεχωρίζουν τα αλόφιλα *Dunaliella salina*, *D. parva*, *D. pseudosalina*, *D. gracilis*, *D. bioculata*, *D. carpatica*, *D. granulata*, *D. minuta*, *D. media*, *D. minutissima*, *D. viridis*. Το συχνά αναφερόμενο κατά το παρελθόν *D. bardawil* κατατάσσεται πλέον ως *D. salina*. Τα δύο πλέον κοινά και πολλαπλώς αναφερόμενα είδη σε αλμυρές λίμνες είναι τα *D. salina* και *D. viridis*. Και τα δύο έχουν ευρεία αντοχή σε αλατότητες 9-200 ppt μέχρι ακόμα και κορεσμένη άλμη με το *D. salina* να αυξάνεται στο βέλτιστο σε 100-150 ppt και το *D. viridis* σε 60-90 ppt. Δυστυχώς για τον μη ειδικό σε βάθος στο γένος *Dunaliella*, δεν υπάρχουν επαρκή φωτογραφικά βοηθήματα με υψηλής ποιότητας απεικονίσεις όπου θα μπορούσε να ανατρέξει για να αναγνωρίσει το είδος που συνέλεξε σε δειγματοληψίες του. Ο,τι φωτογραφικό υλικό υπάρχει δημοσιευμένο (Σχήμα 17) μοιάζει το ένα δείγμα με το άλλο και οι ερευνητές φαίνονται ικανοποιημένοι με το να έχουν ταυτοποιήσει το δείγμα τους με πολύπλοκες μοριακές αναλύσεις που μόνο αυτοί γνωρίζουν πως να αξιοποιήσουν. Ομως πρέπει να παραδεχτούμε ότι έχει γίνει αρκετή δουλειά στις τελευταίες δεκαετίες με την αλληλούχιση γονιδίων ιδίως για το 18S rRNA. Με τη μέθοδο αυτή έχουν δημιουργηθεί βάσεις δεδομένων στις οποίες μπορεί να καταφύγει όποιος επιχειρήσει (σε ειδικά εργαστήρια βεβαίως) ταυτοποίηση του όποιου δείγματος κατέχει.

Η *Dunaliella* έχει γίνει ευρέως γνωστή από την έντονη παρουσία της (μέχρι και επικράτησης ως το μοναδικό μικροφύκος) στις υπεράλμυρες λεκάνες των αλυκών και αξίζει να εστιαστούμε στο βιολογικό περιβάλλον των αλυκών για να γνωρίσουμε το ρόλο της *Dunaliella* εκεί. Ομως πρώτα αξίζει να αναφερθεί ως ένδειξη του δυναμισμού της *Dunaliella* να αποικίζει διάφορα περιβάλλοντα και η παρουσία της όχι μόνο στο υδάτινο περιβάλλον αλλά και στο έδαφος (εδαφοφυτικό) ακόμα και στον αέρα (αεροφυτικό). Έχει βρεθεί *Dunaliella viridis* στις μεγάλες αλμυρές πεδιάδες της Οκλαχόμα των Η.Π.Α. και το είδος *Dunaliella atacamensis* σε ιστούς αραχνών σε σπήλαια με μέτωπο στον Ειρηνικό ωκεανό στην έρημο Ατακάμα της Χιλής. Προφανώς η υγρασία από τον ωκεανό δημιουργεί το κατάλληλο περιβάλλον με τη συμπύκνωση των σταγονιδίων της θάλασσας επάνω στον ιστό της αράχνης. Δείγμα της εκπληκτικής προσαρμογής του γένους *Dunaliella* αντιπροσωπεύεται από το ακραίως οξύφιλο είδος *D. acidophila* το οποίο προτιμά αποκλειστικώς νερά στο ανώτατο της οξύτητας δηλαδή pH=1 με όριο το pH 3. Είναι επίσης αλόφιλο αλλά δεν ευδοκιμεί σε υψηλές θερμοκρασίες. Βρίσκεται σε ειδικά

περιβάλλοντα όπως θειούχες αλατούχες πηγές στην Τσεχία. Όπως και τα άλλα είδη του γένους *Dunaliella* δεν διαθέτει κυτταρικό τοίχωμα αλλά η ειδικής κατασκευής του πλασματική μεμβράνη αποτελείται από ένα βλεννώδες γλυκοπρωτεϊνικό κάλυμμα που είναι θετικώς φορτισμένο. Αυτή η ιδιότητα απωθεί τα σε μεγάλες ποσότητες θετικώς φορτισμένα πρωτόνια (H^+) που υπάρχουν λόγω του χαμηλού pH παντού τριγύρω και διευκολύνει τη διατήρηση του pH του κυτταροπλάσματος κοντά στο ουδέτερο.

Στις αλυκές είναι που η *Dunaliella* πρωτοπεριγράφηκε και έκτοτε σε αυτά τα περιβάλλοντα πραγματοποιήθηκαν οι πιο εντυπωσιακές της μελέτες. Στις λεκάνες εξάτμισης των αλυκών ανά τον κόσμο η παρουσία της *Dunaliella* ποικίλλει ανάλογα με το αν το περιβάλλον είναι ολιγοτροφικό (150 - 3000 κύτταρα/ml) ή ευτροφικό (ακόμα και 100.000 κύτ./ml). Τα κύτταρα της *Dunaliella* αποτελούν τροφή για την αλμυρογαρίδα *Artemia* που επίσης ευδοκμεί εκεί καθώς και για ποικίλα πρωτόζωα με χαρακτηριστικότερο από αυτά το βλεφαριδοφόρο *Fabrea salina* (Σχήμα 12).

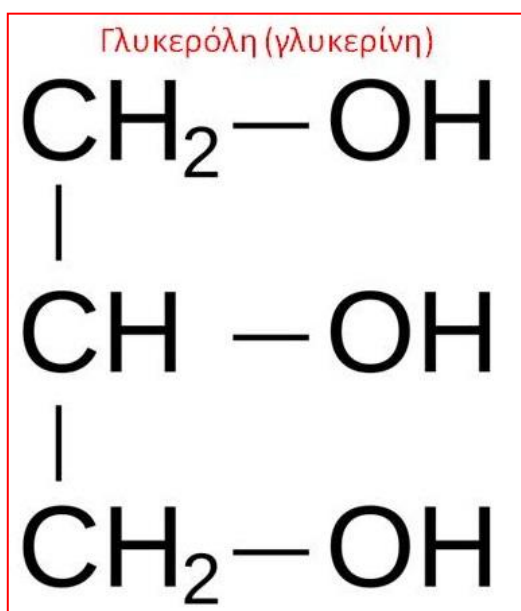


Σχήμα 12. Το μεγάλου μεγέθους (150 - 300 μm) βλεφαριδοφόρο πρωτόζωο *Fabrea salina* (αριστερά) είναι από τους πιο αλοανθεκτικούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Βρίθεται στις λεκάνες υψηλής αλατότητας των αλυκών και τρέφεται με ηθμοφαγία. Όταν στο νερό υπάρχει πολύ *Dunaliella* η *F. salina* καταναλώνει αφειδώς τα κύτταρα της *Dunaliella* και μπορεί μερικές φορές να "καθαρίσει" ολόκληρη δεξαμενή. Στη φωτογραφία αριστερά αποτυπώνεται μια *Fabrea* που βρίσκεται σε διαδικασία πέψης 4 κυττάρων *Dunaliella* πλούσιων σε καρωτίνη (κόκκινα) καθώς και άλλων που είναι ακόμα πράσινα. Η αλατότητα είναι πολύ μεγάλη (170 ppt) δείγμα της εκπληκτικής αντοχής αυτών των ειδών. Δεξιά πάλι από τις αλυκές δείγμα κοκκοειδών κυανοβακτηρίων αγνώστου είδους (ίσως γένους *Synechococcus*) το οποίο είναι πολύ ενδιαφέρον διότι εμφανίζει τις εκκρίσεις υπό μορφή βλέννας περίξ των κυττάρων, κάτι που είναι γνωστό ότι κάνουν τα κυανοβακτήρια (αλλά πολύ σπάνια αποτυπώνεται σε φωτογραφίες). Δείγματα από αλυκές Μεσολογίου, Γ. Χώτος, 2015-17.

Στις λεκάνες υψηλής αλατότητας των αλυκών παρατηρείται συχνά χρωματισμός των νερών με πορτοκαλοκόκκινο χρώμα και το φαινόμενο αυτό συνδυάζεται πάντοτε με την παρουσία της *Dunaliella*. Και πράγματι η *Dunaliella* συμβάλλει στον χρωματισμό αυτό λόγω της έντονης συσσώρευσης στο κύτταρό της της χρωστικής β-καρωτίνιο. Όμως στον χρωματισμό αυτό συμβάλλει και η ανάπτυξη προκαρυωτικών οργανισμών όπως το αλόφιλο Αρχαιοβακτήριο της οικογένειας των Halobacteriaceae που παράγει τη ροζ-κόκκινη χρωστική α-βακτηριοροδοψίνη καθώς και το βακτήριο του γένους *Salinibacter* που παράγει σαλινιξανθίνη. Σε όλα τα συστήματα αλυκών που παρουσιάζουν αυτά τα

χρωματισμένα νερά πάντως η χρωστική με τη μεγαλύτερη αναλογία ήταν το β-καρωτίνη. Δυστυχώς δεν έχει υπάρξει μια ξεκάθαρη μελέτη που να καταγράφει επακριβώς τη συμβολή ενός εκάστου από τους παραπάνω οργανισμούς που εμπλέκονται στη δημιουργία του πορτοκαλοκόκκινου χρώματος. Θα ήταν ενδιαφέρον να καταλήγαμε σε συμπέρασμα για το αν υπάρχουν περιπτώσεις όπου μόνο *Dunaliella* ανιχνεύεται.

Στις επιχειρήσεις των αλυκών όπου επιδίωξη είναι η παραγωγή υψηλής ποιότητας άλατος η παρουσία της *Dunaliella* θεωρείται ενοχλητική επειδή τα κύτταρά τους παράγουν και εκκρίνουν βλεννώδεις πολυσακχαρίτες και γλυκερόλη, ουσίες που επηρεάζουν την καλή κρυστάλλωση και την παραγωγή υψηλής καθαρότητας άλατος. Τη γλυκερόλη την παράγει το κύτταρο της *Dunaliella* (όπως και το άλλο αλοανθεκτικό χλωρομικροφύκος *Asteromonas gracilis*) ως συμβατό διαλυτό μόριο προκειμένου να εξισορροπήσει την ωσμωτική διαφορά μεταξύ του κυτταροπλάσματός του και του εξαιρετικά πυκνού (με αλάτι) νερού. Όσο υψηλότερη η αλατότητα τόσο περισσότερη γλυκερόλη (γλυκερίνη) παράγουν τα κύτταρα της *Dunaliella* (αλλά και της *Asteromonas*),



Το μικρό σχετικά μόριο της γλυκερόλης (μόνο 3 άτομα άνθρακα στο μοριακό σκελετό της) μπορεί εύκολα να διαχυθεί έξω από το κύτταρο διαπερνώντας την κυτταρική μεμβράνη και να χαθεί εις μάτην της ενέργειας που δαπάνησε το κύτταρο για να τη συνθέσει. Η *Dunaliella* όμως έχει ιδιαίτερη δομή κυτταρικής μεμβράνης που αποτρέπει την απώλεια της γλυκερόλης της ιδιαίτερα στις υψηλές αλατότητες. Όμως ένα μέρος της πλεονάζουσας ενδοκυτταρικής γλυκερόλης αποβάλλεται (διαρρέει) κάποια στιγμή από το κύτταρο και αυτό γίνεται ορατό σε ώριμες καλλιέργειες στο εργαστήριο όπου στην επιφάνεια της καλλιέργειας η οποία

"αναβράζει" από την παροχή του αέρα, συσσωρεύεται μια μάζα λευκού αφρού. Επίσης διαρροή γλυκερόλης συμβαίνει όταν η αλατότητα μειώνεται από θαλασσινό νερό (~35 ppt) σε σχεδόν γλυκό (~0 ppt). Αν η αλατότητα πάλι μειωθεί τώρα από περίπου 90 ppt σε ~25 ppt μειώνεται μεν το ενδοκυτταρικό περιεχόμενο της γλυκερόλης χωρίς όμως αξιοσημείωτη διαρροή. Αν η αλατότητα αντίθετα αυξηθεί τότε παράγεται πολλή γλυκερόλη ενδοκυτταρικώς. Η εξισορρόπηση της παραγωγής γλυκερόλης στο κύτταρο που έχει υποστεί αλλαγές ως προς την αλατότητα επέρχεται γρήγορα, το πολύ μέσα σε 90 min. Μόνο σε πολύ ώριμες καλλιέργειες σε υψηλή αλατότητα θα παρουσιαστεί το φαινόμενο της συσώρευσης του "αφρού γλυκερόλης" (στην πραγματικότητα πρόκειται για μείγμα γλυκερόλης και άλλων κυτταρικών εκκρίσεων) (Σχήμα 13). Όταν με αυτό τον αφρό ενίοτε υγραίνω το χέρι μου ή το υγραίνω με μια ποσότητα από την ίδια την καλλιέργεια έχω την αίσθηση αφής της γλιστερής γλυκερόλης.



Σχήμα 13. Διάφορες φωτογραφίες δοχείων με καλλιέργειες *Dunaliella salina* στο εργαστήριο καλλιέργειας πλαγκτού. Χαρακτηριστικό το πορτοκαλο-κόκκινο χρώμα των καλλιεργειών που βρίσκονται σε πολύ υψηλή αλατότητα (>150 ppt). Τόσο στις καλλιέργειες με κόκκινο χρώμα (συσσώρευση καρωτίνων) όσο και στις πράσινες σε χαμηλότερες αλατότητες (δεν έχουν ακόμα συσσωρεύσει πολλά καρωτίνη) ο αερισμός του δοχείου δημιουργεί αφρό γλυκερόλης στην επιφάνεια.

Εκτός όμως από την *Dunaliella* υπάρχουν και κοκκοειδή (μονοκύτταρα) κυανοβακτήρια του γένους *Aphanothece* (ίσως και *Synechococcus* σύμφωνα με αδημοσίευτα στοιχεία μου) τα οποία παράγουν μεγάλες ποσότητες βλεννωδών πολυσακχαριτών (Σχήμα 12) που επηρεάζουν αρνητικά την καλή ποιότητα του αλατιού. Ενδεχομένως ο αρνητικός ρόλος των κυανοβακτηρίων να είναι εντονότερος απ' ότι της *Dunaliella* κάτι όμως που δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Ο ρόλος της *Dunaliella* (όπως άλλωστε και των υπόλοιπων πρωτίστων) στη βιολογική ισορροπία των αλυκών όπως αυτή εκφράζεται από την πρωτογενή παραγωγικότητα, το τροφικό πλέγμα και την ιζηματοποίηση πολύ απέχει από το να παρουσιαστεί με ένα ξεκάθαρο τρόπο-πρότυπο. Είναι τόσο ποικίλα και αντιφατικά τα δεδομένα στη βιβλιογραφία που καταφεύγουμε απλώς στην ανακεφαλαίωσή τους (review) κατά τακτά διαστήματα με την συσσώρευση νέων δημοσιεύσεων. Κατά τη γνώμη μου μια εκτεταμένη μελέτη πρέπει να επικεντρωθεί στην αλληλεπίδραση των οργανισμών *Dunaliella*, *Fabrea salina*, *Artemia* και των κυανοβακτηρίων στις λεκάνες αυτές προκειμένου να ανευρεθεί κάποιο πρότυπο.

Το γένος *Dunaliella* χαρακτηρίζεται από μεγάλη αντοχή ως προς τις διακυμάνσεις της αλατότητας (3-310 ppt), pH (1-11) και θερμοκρασίας (0-40 °C). Παρά το ότι απαντάται σε όλη τη Γη από πολικές έως και τροπικές περιοχές, στη θάλασσα δεν είναι τόσο εμφανές όσο στις απομονωμένες κατά τόπους υπεράλμυρες λεκάνες. Το βέλτιστο πάντως για την

ανάπτυξή της pH είναι 6 για τη *D. tertiolecta* και 9 για τα *D. salina* και *D. viridis*, η θερμοκρασία ~25 °C και η αλατότητα ~50-70 ppt. Το φως είναι σημαντικός παράγοντας βέβαια αλλά κατά τις παρατηρήσεις μου δεν θέτει κάποιους αυστηρούς περιορισμούς. Όλες οι καλλιέργειες που επιχείρησα με εντάσεις 2500 - 10.000 lux πήγαν καλά και μάλιστα αρκετές από αυτές ακόμα και σε φάση στασιμότητας (μετά το μέγιστο της πυκνότητας) παρέμειναν πράσινες και υγιείς για πολλούς μήνες (χωρίς αερισμό ή θρεπτικά και με λίγο φως) χωρίς να καταρρέουν έτοιμες να αναζωογονηθούν μεταγγιζόμενες σε φρέσκο λιπασμένο νερό (συνταγή λίπανσης Walne). Το γιατί συμβαίνει αυτή η μακροβιότητα των καλλιεργειών ενίοτε είναι άγνωστο αλλά παρ' όλα αυτά καλοδεχούμενη μια και διατηρούνται έτσι για πάνω από χρόνο "παραμελημένες" σε μια άκρη κάποιου εργαστηρίου.

Απαιτήσεις σε θρεπτικά στοιχεία

Ανθρακας. Όλα τα είδη *Dunaliella* είναι αποκλειστικώς αυτότροφα (φωτοσυνθετικά) και ικανά να προσλάβουν διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) και διττανθρακικά ιόντα (HCO_3^-). Η πρόσληψη του ανόργανου άνθρακα (διοξείδιο ή διττανθρακικά) στις ιδιαίτερα υψηλές αλατότητες όπου αυτός ο οργανισμός συνήθως καλλιεργείται ή υπάρχει στις υπεράλμυρες λίμνες θέτει ένα εμπόδιο στη φυσιολογία του. Το εμπόδιο συνίσταται στο ό,τι όσο αυξάνεται η αλατότητα τόσο μειώνεται η διαλυτότητα του ανόργανου άνθρακα στο νερό. Για παράδειγμα νερό αλατότητας 250 ppt περιέχει μόνο το 50 % του συνολικού ποσού ανόργανου άνθρακα που μπορεί να διαλυθεί στο νερό συγκριτικά με την κανονική αλατότητα της θάλασσας (~35 ppt). Περαιτέρω η κατάσταση δυσκολεύει ακόμα περισσότερο καθώς σε υψηλά pH και θερμοκρασίες που κατά κανόνα επικρατούν στις υπεράλμυρες λεκάνες, η μορφή του ανόργανου άνθρακα που επικρατεί είναι αυτή των ανθρακικών ιόντων (CO_3^{2-}) τα οποία δεν μπορούν να προσληφθούν από τα φύκη. Έτσι λοιπόν η *Dunaliella* (μεταξύ άλλων φυκών) έχει αναπτύξει προσαρμογές που συνίστανται στην παρουσία του ενζύμου ανθρακική ανυδράση έξω από το κύτταρό της προκειμένου να μετατρέπει το διττανθρακικό ιόν (HCO_3^-) σε διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) το οποίο κατόπιν μπορεί να διαχυθεί μέσω της κυτταρικής μεμβράνης ("ευτυχώς" δεν υπάρχει το εμπόδιο του κυτταρικού τοιχώματος) στο εσωτερικό για να συμμετάσχει στον κύκλο της φωτοσύνθεσης. Για να κατανοηθεί η σημασία της ανθρακικής ανυδράσης πρέπει να κατανοήσει ο αναγνώστης το σύστημα του διοξειδίου του άνθρακα στο νερό και το πως η εκάστοτε συνολικώς διαλυμένη ποσότητα ανόργανου άνθρακα κατανέμεται σε διαφορετικές αναλογίες διοξειδίου, διττανθρακικών και ανθρακικών σε ισοροπία (αμφίδρομες αντιδράσεις) που επηρεάζεται πρωτίστως από το pH και δευτερευόντως από τη θερμοκρασία και την αλατότητα. Στις καλλιέργειές μου στο εργαστήριο, όταν χρησιμοποιώ υπεράλμυρο νερό, για να ξεπεράσω τη συνήθη ανεπάρκεια διοξειδίου του άνθρακα που παρέχεται με τον απλό αερισμό του δοχείου που περιέχει *Dunaliella* ή *Asteromonas*, προσθέτω (μέσω ειδικής διακλάδωσης στη σωλήνωση παροχής αέρα) και καθαρό διοξείδιο από φιάλη (~1 %). Τότε τα αποτελέσματα στην αύξηση των φυκών είναι θεαματικά.

Αζώτο. Η κατάσταση για το ποιά πηγή ανόργανου αζώτου δίνει τα καλλίτερα αποτελέσματα στην αύξηση της καλλιεργούμενης μάζας των κυττάρων της *Dunaliella* δεν είναι πολύ ξεκάθαρη. Φαίνεται πάντως ότι η παροχή αζώτου υπό μορφή νιτρικών (NO_3^-)

υπερέχει αυτής της αμμωνίας (οξικής αμμωνίας- $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$, νιτρικού αμμωνίου- NH_4NO_3 ή χλωριούχου αμμωνίου- NH_4Cl) τα οποία σε υψηλές συγκεντρώσεις όταν επικρατούν υψηλές θερμοκρασίες μπορούν να προκαλέσουν θάνατο των κυττάρων. Επιπλέον η παροχή αμμωνιακών αλάτων αποτρέπει το σχηματισμό β-καρωτινίου και επιπροσθέτως σε καλλιέργειες στην εκθετική φάση αύξησης προκαλούν υπερβολική οξίνιση του νερού που μπορεί να τις καταστρέψει. Μια φθηνή πηγή αζώτου όπως η ουρία [$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$] μπορεί να χρησιμοποιηθεί με προσοχή εφόσον όμως η μάζα του νερού έχει προσεκτικά δεχτεί εξουδετεροποιητικά πρόσθετα (buffers) προκειμένου να αντισταθμιστεί η οξινοποιητική δράση του αμμωνίου, κάτι που μπορεί να γίνει μόνο σε μικρής κλίμακας καλλιέργειες και όχι σε μεγάλες υπαίθριες δεξαμενές.

Φώσφορος. Η καλλίτερη πηγή ανόργανου φωσφόρου είναι τα φωσφορικά ιόντα και η βέλτιστη συγκέντρωσή τους επιτυγχάνεται με 0,02 - 0,025 g/L KH_2PO_4 (φωσφορικό κάλιο).

Σίδηρος (Fe). Ο σίδηρος χρειάζεται σε ελάχιστες πλην όμως άκρως απαραίτητες συγκεντρώσεις και η βέλτιστη συγκέντρωσή του για τις καλλιέργειες των ειδών *D. salina* (πολύ καρωτινοφόρο) και *D. viridis* (ελάχιστα καρωτινοφόρο) είναι 1,25 - 3,75 mg/L υπό τη χηλική μορφή σιδήρου (για να μην κατακρημνίζεται αλλά να παραμένει διαλυτός) αυτήν του FeEDTA.

Ιχνοστοιχεία και βιταμίνες. Τα ιχνοστοιχεία ψευδάργυρος-Zn, κοβάλτιο-Co, χαλκός-Cu, μολυβδαίνιο-Mo και μαγγάνιο-Mn αν και δεν έχουν ταυτοποιηθεί οι ακριβείς απαιτούμενες ποσότητές τους είναι απαραίτητα να προστίθενται στο μέσον καλλιέργειας. Για τις βιταμίνες (θειαμίνη, βιοτίνη, κοβαλαμίνη) που συνήθως προστίθενται σε καλλιέργειες άλλων φυκών, φαίνεται ότι δεν υπάρχει ανάγκη να χρησιμοποιούνται σε καλλιέργειες της *Dunaliella*.

Στο εργαστήριο καλλιέργειας πλαγκτού επί πολλά χρόνια χρησιμοποιούμε την παρακάτω σύνθεση και μεθοδολογία παροχής θρεπτικών μέσων κατά Walne η οποία δίδει πολύ καλά αποτελέσματα όχι μόνο στην καλλιέργεια της *Dunaliella* αλλά και όλων των άλλων φυκών που καλλιεργούμε (*Isochrysis*, *Asteromonas*, *Tetraselmis*, *Rhodomonas*, *Nannochloropsis*, *Chlorella*).

ΜΕΤΑΛΛΙΚΑ ΑΛΑΤΑ

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

Το δοχείο του 1 L τοποθετείται για 30 λεπτά σε αυτόκαυστο στους 120 °C.

Διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, αποτελεί το **τελικό διάλυμα μεταλλικών αλάτων**.

ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ

Βασικά διαλύματα:

Διάλυμα Α

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

$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 30 g

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 20 g

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

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

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

Τοποθετούνται για 30 λεπτά σε αυτόκαυστο στους 120 °C.

Διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Τελικό διάλυμα ιχνοστοιχείων

Διάλυμα Δ : 100 ml από το βασικό διάλυμα

Διάλυμα Α : 10 ml " " " "

Διάλυμα Β : 10 ml " " " "

Διάλυμα Γ : 10 ml " " " "

Προσθήκη 800 ml αποσταγμένου νερού.

Τοποθετούνται σε αυτόκαυστο για 30 λεπτά στους 120 °C.

Διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, αποτελεί το **τελικό διάλυμα ιχνοστοιχείων**.

Για τη λίπανση του θαλασσινού νερού προσθέτουμε 1 ml από κάθε ένα από τα δύο τελικά διαλύματα (μεταλλικά άλατα και ιχνοστοιχεία) για κάθε 1 L θαλασσινού νερού.

Το ενδιαφέρον εστιάζεται κυρίως στο είδος *Dunaliella salina* το οποίο αποτελεί το αντικείμενο καλλιέργειας παγκοσμίως για την παραγωγή του φυσικού αντιοξειδωτικού β-καρωτίνιο (στον οργανισμό μετατρέπεται σε βιταμίνη Α). Η *Dunaliella* είναι ο πλουσιότερος οργανισμός ως προς την περιεκτικότητα σε β-καρωτίνιο και παρ' όλο που αυτή η ουσία μπορεί να εξαχθεί και από καρότα και άλλα φυτά, η απόδοση είναι μικρότερη συγκριτικώς με την *Dunaliella*. Εκτός όμως από την πολύτιμη αυτή ουσία παραβλέπεται συχνά το άλλο όφελος που αποκομίζουμε από την *Dunaliella* και το οποίο αφορά τη χρησιμότητά της ως τροφή για τους ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς που αποτελούν την απαραίτητη ζωντανή τροφή για τις λάρβες των θαλασσινών ψαριών στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς. Προσωπικά πειραματιζόμενος με 2 από τους κοινούς ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς, το τροχόζωο *Brachionus plicatilis* και την αλμυρογαρίδα *Artemia* αλλά και με το πολλά υποσχόμενο ως ζωντανή τροφή σε ιχθυογεννητικούς σταθμούς, βλεφαριδωτό πρωτόζωο *Fabrea salina*, διαπίστωσα πέραν πάσης αμφιβολίας ότι η *Dunaliella* αποτελεί την καλύτερη τροφή για αυτά. Ποτέ δεν μου απέτυχε καλλιέργεια όταν χρησιμοποίησα *Dunaliella* για να τα θρέψω. Ο πληθυσμός τους αναπτύσσεται γρήγορα, η κινητικότητά τους είναι ζωηρή και το νερό δεν ρυπαίνεται εύκολα. Τι άλλο να ζητήσει κάποιος που θέλει να έχει διαθέσιμο πάντοτε ένα εύκολα καλλιεργούμενο μικροφύκος και μάλιστα πρακτικώς σε οποιαδήποτε αλατότητα;

Το παγκόσμιο όμως ενδιαφέρον για την καρωτινογένεση στην *Dunaliella* έχει καλύψει κάθε άλλη προοπτική για την εκμετάλλευσή της και δεν μπορούμε παρά να δεχτούμε ότι υπάρχει καλός και βάσιμος λόγος γι' αυτό. Η *Dunaliella salina* μπορεί να συγκεντρώσει τόσο πολύ β-καρωτίνιο στο κύτταρό της που να φθάνει το 14 % του ξηρού του βάρους. Το αμέσως επόμενο σε καρωτινογένεση είδος *D. parva* φθάνει μέχρι 4 % και τα υπόλοιπα είδη της *Dunaliella* πολύ λιγότερο. Κατά όλα τα επιστημονικά ευρήματα η

καρωτινογένεση προκαλείται (απαραιτήτως) από υψηλή αλατότητα, υψηλή θερμοκρασία και έντονο φως ταυτόχρονα. Παρόλο όμως αυτό το αδιαμφισβήτητο γεγονός, οι πληροφορίες στη βιβλιογραφία πολύ απέχουν από το να δίνουν μια ξεκάθαρη συνταγή (οδηγίες) για το πως ο εκάστοτε καλλιεργητής της *Dunaliella* θα ακολουθήσει κάποιο σίγουρο πρωτόκολλο καλλιέργειας τέτοιο που τελικά θα κάνει την καλλιέργειά του να "κοκκινίσει". Γενικώς όμως η καρωτινογένεση προκαλείται σε συνθήκες καλλιέργειας που επιφέρουν κάποιου είδους στρες στα κύτταρα και το πιο γνωστό και δοκιμασμένο από αυτά είναι η έλλειψη αζώτου. Δηλαδή όταν οι συνθήκες καλλιέργειας είναι μη βέλτιστες κάτι που υπονοεί ότι ο μεν ρυθμός αύξησης της καλλιέργειας δεν θα είναι καλός από τη μια μεριά ενώ από την άλλη τα υπάρχοντα και στρεσαρισμένα κύτταρα θα παράγουν πολύ β-καρωτίνη.

Το πρόβλημα βέβαια από την άποψη της επαρκούς παραγωγής β-καρωτινίου είναι το πως να συμβιβάσουμε τις στρεσογόνες για την *Dunaliella* συνθήκες καλλιέργειας (έλλειψη αζώτου) που προκαλούν την καρωτινογένεση με το σχεδόν σταμάτημα της αύξησης των κυττάρων που επιφέρει το στρεσάρισμα. Διότι μόνο μια μεγάλη μάζα κυττάρων μπορεί να δώσει αρκετό β-καρωτίνη. Στη βιβλιογραφία δεν ξεκαθαρίζεται το σημείο αυτό και οι περιγραφές αρκούνται μόνο στη γενική αναφορά. Προφανώς όταν η καλλιέργεια έχει φθάσει στο μέγιστο της αύξησης με κάποιο τρόπο το νερό ανανεώνεται (εξακολουθεί βεβαίως να είναι υπεράλμυρο, έντονα φωτισμένο και θερμό) και τα προστιθέμενα θρεπτικά είναι ελλειμματικά σε άζωτο. Σε κλίμακα εργαστηρίου όπου οι μικρές σχετικά μάζες νερού είναι εύκολα διαχειρίσιμες, μια λογική μέθοδος είναι μια αρχικώς αυξανόμενη μάζα *Dunaliella* σε καλές συνθήκες καλλιέργειας να φθάνει ένα μέγιστο (γύρω στα 2.000.000 κύτ./ml) και κατόπιν να γίνεται φυγοκέντριση της μάζας του νερού, να συγκεντρώνεται το ίζημα που περιέχει μόνο το φύκος, να απορρίπτεται το υπερκείμενο νερό και η συγκεντρωθείσα μάζα κυττάρων να διαλύεται σε φρέσκο λιπασμένο χωρίς άζωτο νερό, η αλατότητα να αυξάνει πάνω από 150 ppt (μέχρι 250 ppt), το φως έντονο και η θερμοκρασία πάνω από 25 °C με σκοπό τα υπάρχοντα κύτταρα να "αφοσιωθούν" μόνο στην παραγωγή β-καρωτινίου.

Σε κάθε περίπτωση που επιχειρείται η καρωτινογένεση η μεγάλη ύψωση της αλατότητας είναι ο σπουδαιότερος και απαραίτητος παράγοντας πρόκλησης αυτής της βιοχημικής διαδικασίας (Πίνακας 1). Ευτυχώς άπαξ και τα κύτταρα συσσωρεύσουν πολύ β-καρωτίνη (και γίνουν πορτοκαλο-κόκκινα) κάποιο χαμήλωμα της αλατότητας (π.χ. από 250 ppt σε 150 ppt) δεν προκαλεί παρά ελάχιστη απώλεια β-καρωτινίου για περίοδο της τάξεως των εβδομάδων και αυτό όχι λόγω αποδόμησης του καρωτινίου αλλά μάλλον λόγω διαμοίρασής του σε νέα κύτταρα που παράγονται λόγω επαναφοράς της πολλαπλασιαστικής ικανότητας του φύκους. Ιδιαίτερα στις καλλιέργειες *Dunaliella* που γίνονται σε μεγάλες υπαίθριες δεξαμενές και οι οποίες υφίστανται περιοδικώς μεγάλη πτώση της αλατότητας λόγω βροχής, η διατήρηση του καρωτινίου μέχρι να ξαναμεγαλώσει η αλατότητα μόνο ως πλεονέκτημα μπορεί να εκληφθεί.

Πίνακας 1. Ανακεφαλαίωση της επίδρασης διάφορων περιβαλλοντικών συνθηκών στην παραγωγή βιομάζας και β-καρωτίνιου σε καλλιέργειες της *Dunaliella salina*. + = ενισχυτική επίδραση, - = ανασταλτική επίδραση, 0 = καμία επίδραση, (-) = πολύ αργή ανασταλτική επίδραση.

Παράγοντας	Βιομάζα	β-καρωτίνιο
Αύξηση αλατότητας	--	++++
Μείωση αλατότητας	+	(-)
Ελλειψη αζώτου (N)	--	+++
Ελλειψη φωσφόρου (P)	--	+
Αύξηση ανόργανου άνθρακα (CO ₂)	+++	0
Αύξηση έντασης φωτισμού	+	++++
Μείωση έντασης φωτισμού	-	---
Αύξηση θερμοκρασίας	-	++
Μείωση θερμοκρασίας	-	-
Αύξηση διαλυμένου οξυγόνου (O ₂)	-	-

Από όλα τα παραπάνω έχοντας υπόψη πρωτίστως το ό,τι η καρωτινογένεση είναι έντονη όταν η αύξηση βρίσκεται στο ελάχιστο, αντιμετωπίζουμε το δίλημμα του πως θα εγκαταστήσουμε ένα αποδοτικό εμπορικό σύστημα καλλιέργειας για να παράγουμε β-καρωτίνιο (ή και γλυκερόλη, μην την ξεχνάμε μια και αποτελεί το 20-30% της ξηρής μάζας) από *Dunaliella*. Ένα τέτοιο σχέδιο πρέπει να επιδιώκει να ικανοποιήσει ή ξεπεράσει τα παρακάτω:

1. Βελτιστοποίηση της παραγωγής βιομάζας και της απόδοσης σε β-καρωτίνιο.
2. Ανάπτυξη ενός αξιόπιστου συστήματος αύξησης των κυττάρων που να μπορεί να αντιμετωπίσει τις απρόβλεπτες αρνητικές επιπτώσεις των καιρικών συνθηκών, διάφορων ανταγωνιστικών οργανισμών και θηρευτών.
3. Ανάπτυξη ενός κατάλληλου χαμηλού κόστους συστήματος συλλογής των κυττάρων.
4. Ανάπτυξη ενός κατάλληλου συστήματος επεξεργασίας της φυκικής βιομάζας και εκχύλισης του προϊόντος.

Η παραγωγή μάζας *Dunaliella* σε εξωτερικές δεξαμενές ποικίλλει και κυμαίνεται σε 30 - 40 g ξηρού βάρους /m²/ημέρα τιμές που θεωρούνται ικανοποιητικές καθώς η ευμεταβλητότητα των εξωτερικών συνθηκών συχνά μειώνει την απόδοση. Εκτός όμως από τις περιβαλλοντικές συνθήκες η επιθυμητή μονοκαλλιέργεια της *D. salina* (το πλέον καρωτινογενές είδος) διακυβεύεται και από τη συχνή παρουσία θηρευτών της όπως τα πρωτόζωα *Fabrea salina* και η αμοιβάδα *Heteroamoeba* sp. Ειδικά το βλεφαριδωτό *Fabrea salina* μπορεί να καταναλώνει με βουλιμία *Dunaliella* και να αυξάνεται τόσο γρήγορα που στο τέλος εξαντλεί εντελώς τις δεξαμενές από φύκη. Η κατάσταση βελτιώνεται όμως θεαματικά όταν η αλατότητα ξεπεράσει τα 200 ppt καθώς εκεί περίπου βρίσκεται το όριο της καλής ανάπτυξης της *Fabrea*. Ένας άλλος αρνητικός παράγοντας είναι και η ανάπτυξη μαζί με τη *D. salina* και των *D. viridis* *D. minuta* τα οποία είναι μη καρωτινογενετικά και συχνά (ιδιαίτερα στις χαμηλότερες αλατότητες) μπορεί να επικρατήσουν στη δεξαμενή.

Συστήματα καλλιέργειας

Η πλέον διαδεδομένη μέθοδος καλλιέργειας της *Dunaliella* είναι αυτή που χρησιμοποιεί μεγάλες υπαίθριες δεξαμενές είτε πολύ μεγάλες χωμάτινες (συνήθως επενδυμένες με πλαστικό) χωρίς ανάδευση του νερού, είτε συμπαγείς τύπου λεμβοδρομίου (raceways) αναδευόμενες με περιστρεφόμενα κουπιά (paddlewheel). Οι δεξαμενές είναι πολύ ρηχές (~20 cm) και έκτασης αρκετών στρεμμάτων η κάθε μία (τα λεμβοδρόμια σπάνια ξεπερνούν το στρέμμα το καθένα). Φυσικά το καλύτερο μέρος για την κατασκευή τους είναι εδάφη πεδινά κοντά σε θάλασσα ή λιμνοθάλασσα και ακόμα καλύτερα σε αλατούχα εδάφη ή ως προέκταση των δεξαμενών των ίδιων των αλυκών. Οι αλυκές προσφέρουν το μεγάλο πλεονέκτημα της άφθονης τροφοδοσίας με άλμη με την οποία μπορούν να επιτευχθούν οι επιθυμητές υψηλές αλατότητες στις δεξαμενές καλλιέργειας. Διαφορετικά οι καλλιεργητές πρέπει να διαλύουν πολύ μεγάλες ποσότητες άλατος το οποίο όμως κοστίζει το ελάχιστο περί τα 20-25 USD (στοιχεία Αμερικής). Επιπροσθέτως η υπαίθρια καλλιέργεια της *Dunaliella* μπορεί να είναι οικονομικά βιώσιμη μόνο σε περιοχές όπου οι κλιματολογικές συνθήκες επιτρέπουν αρκετά μεγάλες θερμές περιόδους με έντονη ηλιοφάνεια και γι' αυτό το λόγο δεν προκαλεί έκπληξη που αυτού του τύπου η καλλιέργεια ακμάζει μόνο σε ορισμένες κατάλληλες περιοχές της Αυστραλίας (πολύ μεγάλες ρηχές χωμάτινες δεξαμενές) και στο Ισραήλ και στις νότιες Η.Π.Α. (λεμβοδρόμια με ανάμιξη νερού). Τα λεμβοδρόμια (raceways) είναι ακριβότερα στην κατασκευή από τις υπαίθριες χωμάτινες δεξαμενές αλλά δίδουν μεγαλύτερες αποδόσεις σε φυκική βιομάζα.

Ενα άλλο σύστημα καλλιέργειας είναι αυτό που χρησιμοποιεί φωτοβιοαντιδραστήρες (PBR) δηλαδή σύστημα κλειστό και απόλυτα ελεγχόμενο ως προς τις παραμέτρους καλλιέργειας. Με το κλειστό σύστημα αποφεύγεται η εισβολή ανταγωνιστικών και θηρευτικών ειδών και οι βασικές παράμετροι της αλατότητας, θερμοκρασίας, pH και θρεπτικών ρυθμίζονται στο βέλτιστο καθώς ο όγκος νερού που χρησιμοποιείται είναι ασυγκρίτως μικρότερος από τον αντίστοιχο στις υπαίθριες εγκαταστάσεις. Έτσι η παραγωγή σε κύτταρα και η καρωτινογένεση φθάνουν στο μέγιστο και η συλλογή τους διευκολύνεται ομοίως. Όμως το σύστημα αυτό απαιτεί αρκετή ενέργεια κυρίως υπό μορφή συνεχούς άντλησης και κυκλοφορίας του νερού κάτι που εκτός από ηλεκτρικό κόστος καταπονεί κατά κάποιο τρόπο και τα ντελικάτα κύτταρα της *Dunaliella*. Η παγκόσμια τάση για την καλλιέργεια φυκών γέρνει κατά πως φαίνεται προς την πλευρά των φωτοβιοαντιδραστήρων, οι τεχνικές διαρκώς βελτιώνονται, το κόστος κατασκευής των γίνεται μικρότερο και το μεγάλο πρόβλημα της κατανάλωσης ενέργειας μπορεί να ξεπεραστεί με χρήση φωτοβολταϊκών και ανεμογεννητριών.

Στην Ελλάδα κατά τη γνώμη μου μπορεί να καλλιεργηθεί η *Dunaliella* διότι οι κλιματολογικές συνθήκες είναι προς την ευνοϊκή μεριά της κλίμακας και επιπλέον μπορεί να επιχειρηθεί πρώτα μια καλλιέργεια μικρού ρίσκου στις ήδη υπάρχουσες λεκάνες των αλυκών του Μεσολογίου. Κάθε χρόνο οι λεκάνες χρωματίζονται από την έντονη ανάπτυξη της *Dunaliella* και θα μπορούσε να επιχειρηθεί η εκμετάλλευσή της σε υπαίθριες χωμάτινες δεξαμενές με την κατάλληλη διευθέτηση των υπαρχόντων για την αλατοπαραγωγή. Ακόμα και αν δεν κατασκευάζονταν καινούργιες και ειδικώς προς τούτο δεξαμενές καλλιέργειας *Dunaliella*, η μεγάλη συσσωρευόμενη μάζα κυττάρων στις λεκάνες κρυστάλλωσης του άλατος θα μπορούσε με κάποιο τρόπο να αφαιρείται και η άλμη να επιστρέφει στο κρυσταλλωτήριο. Βέβαια όσο απλό αυτό ακούγεται άλλο τόσο

δύσκολο είναι διότι ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα στην καλλιέργεια της *Dunaliella* είναι η συγκομιδή των κυττάρων. Και είναι πρόβλημα επειδή η φυγοκέντρωση του νερού που σε άλλα μικροφύκη σε γλυκό ή κανονικής αλατότητας νερό μπορεί εύκολα να συσσωρεύσει τα κύτταρα στο ίζημα του νερού στο δοχείο που φυγοκεντρήθηκε, όμως στο υπεράλμυρο νερό της *Dunaliella* η κατάσταση διαφέρει ολοκληρωτικά. Και διαφέρει επειδή στις αλατότητες άνω των 150 ppt τα κύτταρα λόγω του μεγάλου ιξώδους του νερού όντας πολύ λιγότερο πυκνά από αυτό δεν καθιζάνουν σε όσα g και αν ρυθμιστεί να λειτουργήσει η φυγόκεντρος. Το μόνο που θα παρουσιαστεί στο δοχείο μετά τη φυγοκέντρωση θα είναι η συγκέντρωση των κυττάρων όχι στον πυθμένα αλλά στην επιφάνεια ως μια ζώνη κοκκινισμένη από τη συγκέντρωση των κυττάρων *Dunaliella*. Αυτή η μάζα βέβαια μπορεί να συλλεχθεί αλλά η διαδικασία είναι τόσο επίπονη και χρονοβόρα που από εμπορική άποψη καθίσταται ασύμφορη. Και είναι ασύμφορη επειδή το μέγιστο της μάζας κυττάρων που μπορεί να παραχθεί σε αποδοτικές καλλιέργειες δεν ξεπερνά το 1g/L. Για να γίνει αυτό καλύτερα κατανοητό πρέπει να αναφερθεί ότι στις φυγοκεντρήσεις άλλων καλλιεργειών φυτοπλαγκτού με σκοπό τη συγκέντρωση της φυκικής βιομάζας, χρησιμοποιούνται ειδικές συσκευές φυγοκέντρωσης συνεχούς συλλογής του ιζήματος ως μια πηχτή υδαρή πάστα. Δηλαδή αυτές οι συσκευές τροφοδοτούνται συνεχώς με νερό και αποβάλλουν συνεχώς το ίζημα που δημιουργείται. Αυτό δεν μπορεί να γίνει με υπεράλμυρο νερό για τους λόγους που προαναφέρθηκαν επειδή η *Dunaliella* σε αυτές τις αλατότητες δεν καθιζάνει αλλά επιπλέει (Σχήμα 14). Ένα άλλο πρόβλημα που αναφέρει η βιβλιογραφία αυτό της ευαίσθητης φύσης των κυττάρων της *Dunaliella* το οποίο μπορεί με τη φυγοκέντρωση να καταστρέψει τα στερούμενα κυτταρικού τοιχώματος κύτταρά της, κατά τη γνώμη μου είναι υπερβολικό. Αυτό τουλάχιστον έχει αποδειχθεί στο εργαστήριο όπου στις καλλιέργειες της *Dunaliella* που πραγματοποιώ σε κανονικές αλατότητες, η μάζα που λαμβάνω μετά από φυγοκέντρωση δεν δείχνει σημάδια καταπόνησης. Δεν παρουσιάζονται διαλυμένα κύτταρα και αν η πηχτή πάστα κυττάρων επαναδιαλυθεί σε νερό ανακτά τα κινητικά της χαρακτηριστικά. Δηλαδή τα κύτταρα παραμένουν ζωντανά.



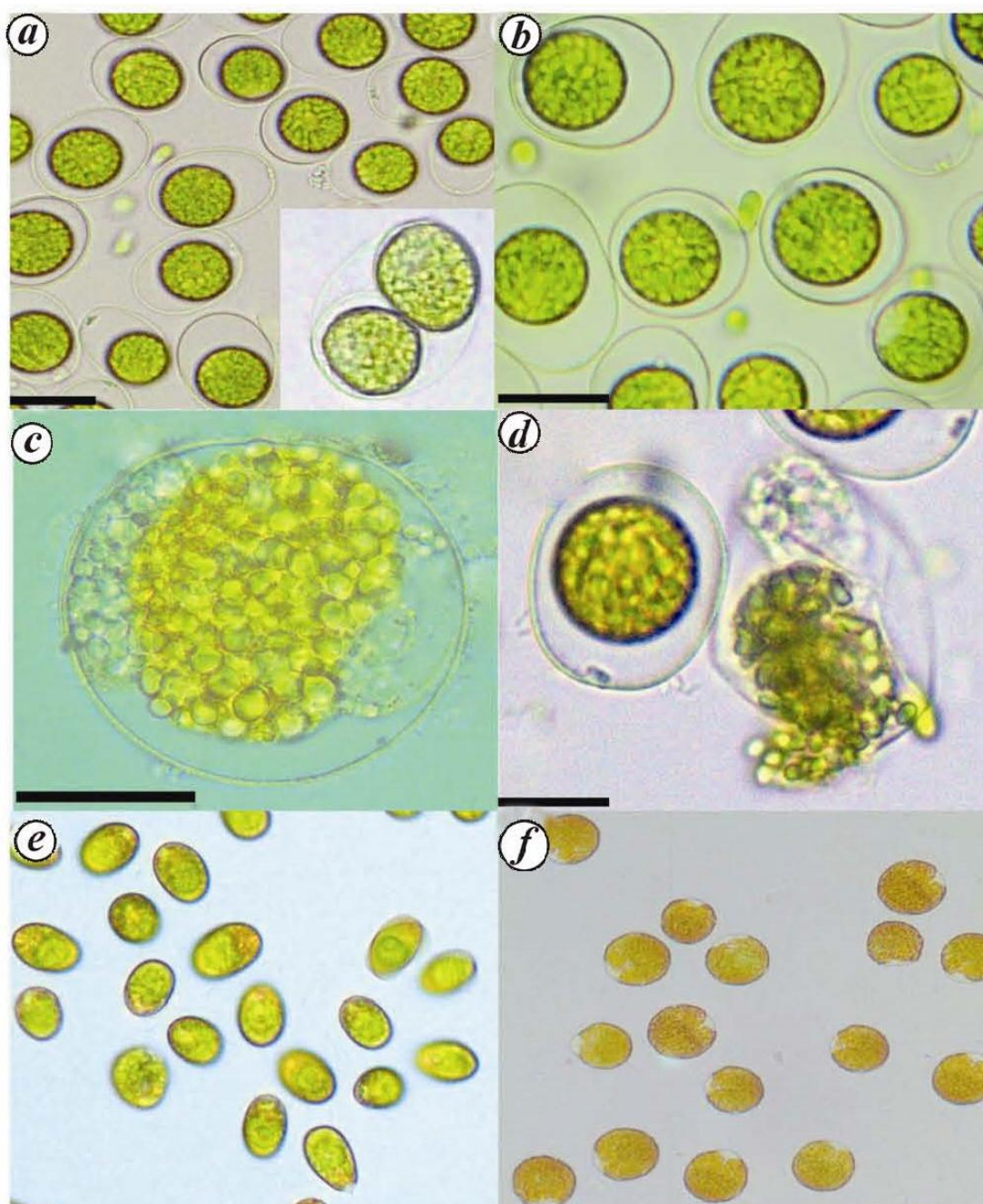
Σχήμα 14. Μετά από φυγοκέντρωση πολύ υπεράλμυρου νερού στο οποίο είχε αναπτυχθεί καλλιέργεια *Dunaliella salina* με κύτταρα πλούσια σε καρωτίνη, η μάζα των κυττάρων δεν συσσωρεύεται ως ίζημα αλλά αντιθέτως μαζεύεται στην επιφάνεια επειδή το πολύ μεγάλο ιξώδες του νερού (αλατότητα > 150 ppt) δεν επιτρέπει την καθίζηση. Φωτ. Γ. Χώτος, 2016.

Η καλύτερη λύση για τη συλλογή των κυττάρων της *Dunaliella* μετά από την καλλιέργειά της σε υπεραλατότητα φαίνεται να είναι η διήθηση υπό πίεση με σκοπό να παραμείνει στο πλέγμα του φίλτρου η μάζα των κυττάρων και το νερό να περάσει. Όμως χρειάζονται ειδικές μηχανές φίλτρων κατάλληλα διαμορφωμένες και αρκετής αντοχής μια και το πλέγμα του φίλτρου πρέπει να έχει μικρά ανοίγματα (λιγότερο από 8 μm) προκειμένου να συγκρατήσει τα όχι τόσο ογκώδη κύτταρα της *Dunaliella* (~18 x 10 μm) τα οποία λόγω απουσίας κυτταρικού τοιχώματος είναι μαλακά-εύπλαστα και εύκολα ξεγλιστρούν μέσα από πόρους. Με ένα τέτοιο μέσο διήθησης (φιλτραρίσματος) με τόσο μικρούς πόρους απαιτείται πίεση του νερού για να το αναγκάζει να περνά με ικανοποιητικό ρυθμό μέσα από τη σίτα. Περιοδικώς η πυκνή μάζα κυττάρων που μαζεύεται στο τύμπανο φιλτραρίσματος πρέπει να αποξένεται για να απομακρύνεται και να πηγαίνει για ξήρανση-εκχύλιση. Το β-καρωτίνη εκχυλίζεται με οργανικούς διαλύτες αλλά οι καταναλωτές που προτιμούν ένα ανόθευτο προϊόν εκτιμούν περισσότερο την αποξηραμένη μάζα *Dunaliella* (κατά το παράδειγμα της εμπορεύσιμης *Spirulina*) ως συμπλήρωμα διατροφής πλούσιο στο πολύτιμο αντιοξειδωτικό β-καρωτίνη. Αυτό κατά τη γνώμη μου είναι το μέλλον για τη *Dunaliella* ως υγιεινής τροφής και σε αυτό θα μπορούσαν να επενδύσουν οι αλυσκές Μεσολογίου.

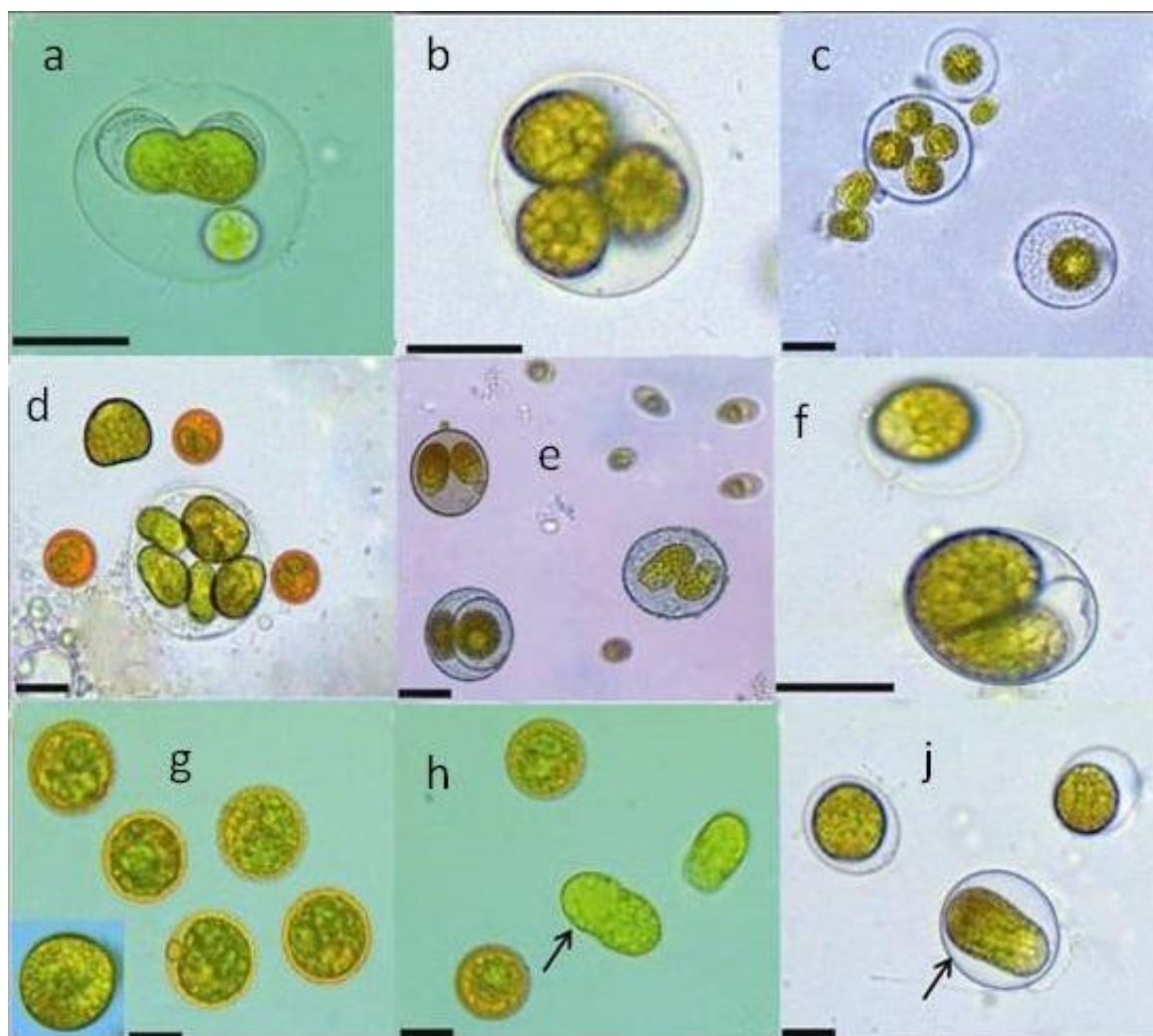
Ανακεφαλαιώνοντας και σύμφωνα με τη διεθνή πείρα που αποκτήθηκε, μια εγκατάσταση καλλιέργειας *Dunaliella salina* σε υπαίθριες δεξαμενές μπορεί να δημιουργηθεί εκεί όπου:

1. Υπάρχει διαθέσιμη άφθονη επίπεδη Γη.
2. Υπάρχει κάποια φθηνή πηγή προμήθειας άλμης καθώς και θαλασσινού νερού το οποίο απαιτείται για τη ρύθμιση της αλατότητας στο εκάστοτε επιθυμητό επίπεδο και επιπλέον για να αντικαθιστά το νερό που χάνεται λόγω εξάτμισης (θεωρείται δεδομένο ότι θα υπάρχει και πρόσβαση σε γλυκό νερό). Οι απαιτήσεις αντικατάστασης του εξατμιζόμενου νερού δεν είναι αμελητέες. Για παράδειγμα μια συνολική έκταση δεξαμενών 50 στρεμμάτων (50.000 m^2) με βάθος 20 cm περιέχει 10.000.000 λίτρα (L) νερού. Με μέση τιμή απώλειας λόγω εξάτμισης της τάξεως του 1 cm/ημέρα σημαίνει ότι πρέπει να αναπληρώνονται με 500.000 L φρέσκου νερού.
3. Υπάρχουν λίγες νεφοσκεπείς ημέρες στο έτος και η μέση ημερήσια θερμοκρασία κυμαίνεται σε 25-30 °C για το μεγαλύτερο δυνατόν διάστημα.
4. Η βροχόπτωση είναι όσο το δυνατόν λιγότερη και πέφτει κατά ένα μικρό διάστημα του έτους.
5. Ο χώρος της εγκατάστασης βρίσκεται μακριά από πηγές ρύπανσης (βιομηχανικά απόβλητα, αγροτικά λιπάσματα και φυτοφάρμακα) προκειμένου να αποφευχθεί η απορρόφηση από τα φύκη τοξικών ουσιών (βαρέα μέταλλα, κ.λπ.).

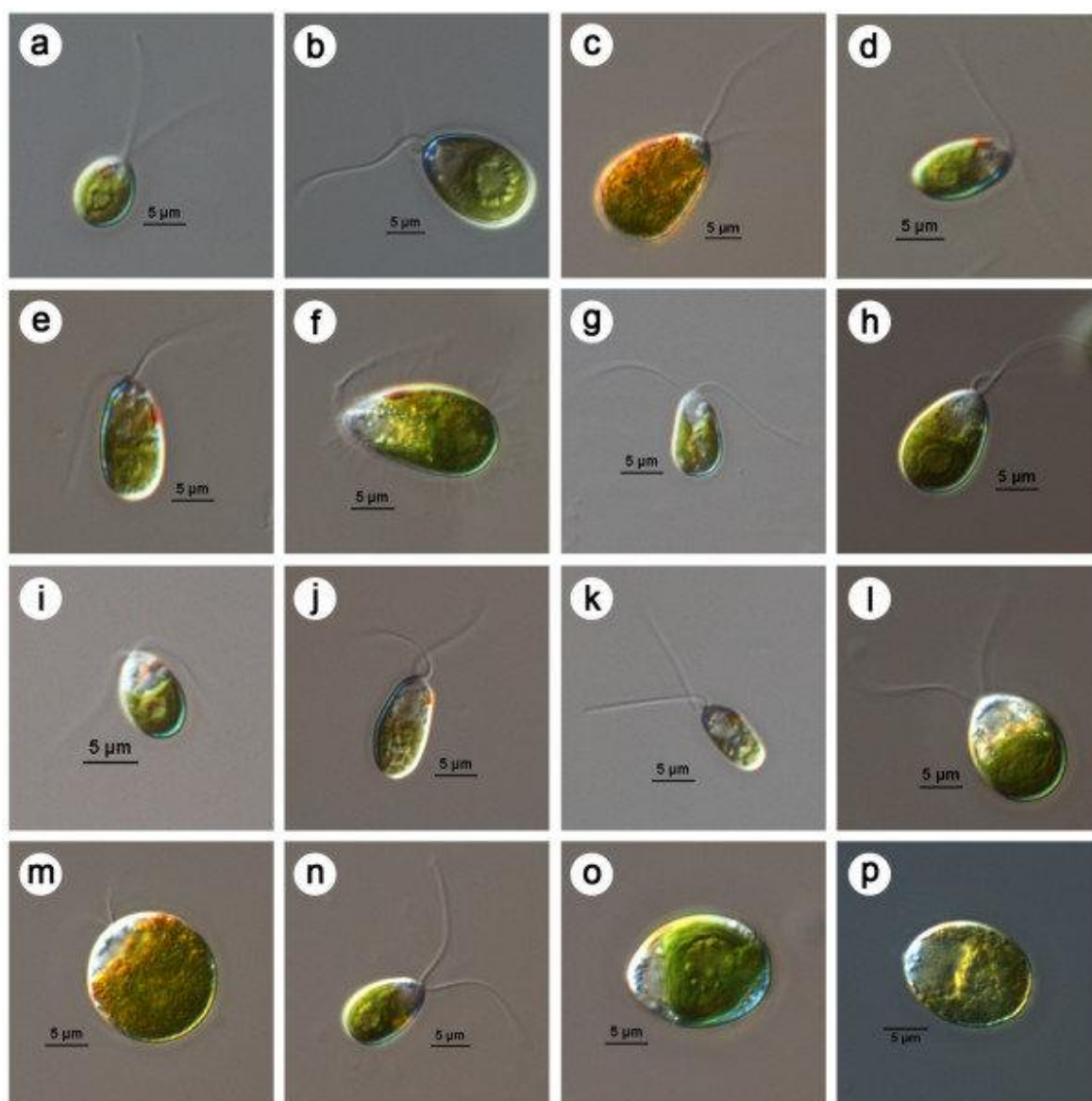
Από τα παραπάνω συνάγεται ότι στις κλιματολογικές συνθήκες της Ελλάδας οι παραπάνω 3 και 4 απαιτήσεις δεν ικανοποιούνται πλήρως οπότε μόνο οι βιοαντιδραστήρες μπορούν να έχουν μέλλον για τη δημιουργία εξ' αρχής μιας τέτοιας μονάδας. Βεβαίως όπως προαναφέρθηκε μπορεί να γίνει η εποχιακή συγκομιδή της φυσικώς αναπτυσσόμενης *Dunaliella* στις υπάρχουσες λειτουργούσες αλυσκές Μεσολογίου. Σε μια τέτοια επιχείρηση η καινούργια εγκατάσταση θα αφορά κυρίως το σύστημα συλλογής των κυττάρων *Dunaliella* από την άλμη και το σύστημα κατεργασίας των.



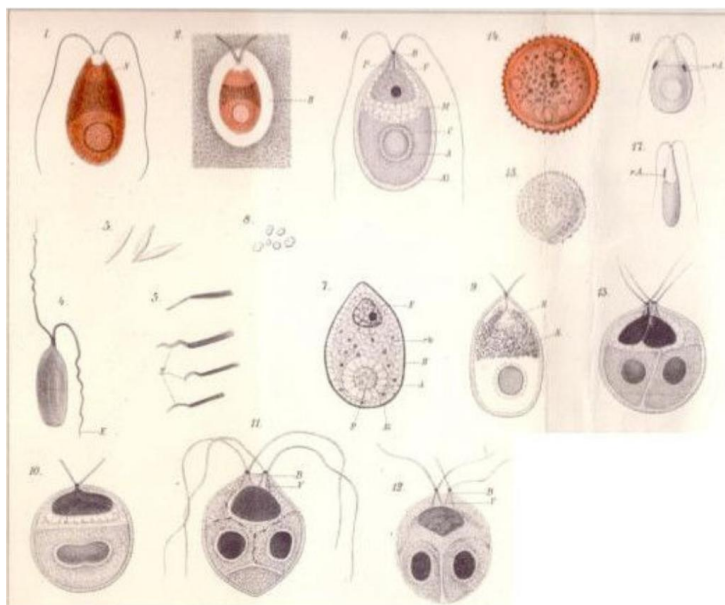
Σχήμα 15. Ανάπτυξη παλμελλοειδών κύστεων της *Dunaliella salina* σε εργαστηριακές καλλιέργειες που άρχισαν με κύτταρα ληφθέντα από λεκάνες αλυκών αρχικώς μικρής αλατότητας (60 ppt). **a.** Παλμελλοειδή κύτταρα σε καλλιέργεια 5 ημερών σε αλατότητα 125 ppt. **b & c,** Ωριμες κύστες σε καλλιέργεια 8 ημερών με μεγέθυνση 400 και 1000 φορές αντίστοιχα. **d,** Ελευθέρωση κυττάρων από παλμέλλα. **e & f,** Πράσινα και πορτοκαλί κύτταρα *Dunaliella salina* από καλλιέργειες 14 και 35 ημερών αντίστοιχα, οι οποίες αναπτύχθηκαν από κύτταρα που ελευθερώθηκαν από παλμελλοειδή κύτταρα. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν κλίμακα 10 μm. Φωτογραφία από Suman Keerth, Uma Devi Koduru, Subba Rao Durvasula Venkata & Nittala Subrahmanya Sarma, 2016.



Σχήμα 16. Κύστεις σε καλλιέργεια *Dunaliella salina* προερχόμενη από νερό αλυκών χαμηλής αλατότητας (60 ppt) και αφημένη να ωριμάσει επί πολλές ημέρες σε νερό εξαντλημένο σε θρεπτικές ουσίες. **a.** Παλμελλοειδές μόρφωμα περικλείον μάζα πράσινων κυττάρων στη διαδικασία του διαχωρισμού. **b - d.** Παλμελλοειδείς κύστεις με πολλαπλά πράσινα κύτταρα. **e & f.** Παλμελλοειδείς κύστεις με 2 κύτταρα εντός των. **g.** Κύστεις - απλανοσπόρια με ρυτιδωμένο τοίχωμα. **h.** Κύστεις - απλανοσπόρια και ένα γιγαντιαίο κύτταρο ζυγώτης που διατηρεί ακόμα τα 4 μαστίγια (βέλος). **j.** Παλμελλοειδείς κύστεις - ζυγοσπόρια. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν κλίμακα 10 μm . Φωτογραφία από Suman Keerth, Uma Devi Koduru, Subba Rao Durvasula Venkata & Nittala Subrahmanya Sarma, 2016.



Σχήμα 17. Φωτογραφίες μορφών κυττάρων *Dunaliella* από τους Preetha, K., Lijo, J., Cherampilli S. & Koyadan, K. K., 2012. Βάσει της μορφολογικής εμφάνισης των κυττάρων αυτών οι συγγραφείς της εργασίας αυτής δεν ξεκαθαρίζουν σε ποιο είδος ανήκει το καθένα. Η εικόνα όμως αυτή είναι χρήσιμη για να δείξει τη δυσκολία και τη σύγχυση στην ταυτοποίηση ενός δείγματος *Dunaliella* με μόνο τα μορφολογικά χαρακτηριστικά.



Σχήμα 18. Ιστορικά πολύτιμη ζωγραφική αποτύπωση από την Hamburger (1905) των δειγμάτων της *Dunaliella salina* που μελέτησε.



Σχήμα 19. Χαρακτηριστική εικόνα μικτής καλλιέργειας μαστιγοφόρων κυττάρων των ειδών *Dunaliella salina*, *Tetraselmis suecica*, *Rhodomonas salina*, *Isochrysis galbana*, *Asteromonas gracilis*, για να δεχθούν τα χαρακτηριστικά και τα μεγέθη των κυττάρων. Φωτογραφία Γ. Χώτος, 2015.

ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Avron, M. & Ben-Amotz, A., 1992. Ed: *Dunaliella*: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology Boca Raton: CRC Press.

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

Dunal, F., 1838. Extrait d'un mmoire sur les algues qui colorent en rouge certains eaux des marais salants mditerranens. *Ann Sc Nat Bot 2 Srr*, 9:172.

Hamburger, C., 1905. Zur Kenntnis der *Dunaliella salina* und einer Amøbe aus Salinenwasser von Cagliari. *Arch f Protistenkd*, 6:111-131.

Lerche, W., 1937. Untersuchungen über Entwicklung und Fortpflanzung in der Gattung *Dunaliella*. *Arch f Protistenkd*, 88:236-268.

Oren, A., 2005. A hundrent years of *Dunaliella* research: 1905-2005. *Saline Systems*, 1:2.

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

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.

Suman Keerth, Uma Devi Koduru, Subba Rao Durvasula Venkata & Nittala Subrahmanya Sarma, 2016. Cysted forms of halophilic microalga *Dunaliella salina* under different stress conditions. *Current Science* 111 (2).

Teodoresco, E.C., 1905. Organisation et developpement du *Dunaliella*, nouveau genre de Volvocacie-Polyblepharidiæ. *Beih z Bot Centralbl*, Bd. XVIII:215-232.

ΒΙΝΤΕΟΣ ΜΕ DUNALIELLA ΤΟΥ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ

https://www.youtube.com/watch?v=a7X_0walwRQ

<https://www.youtube.com/watch?v=HqWxnhv-Ka0>

<https://www.youtube.com/watch?v=zbMe-bGWtX4>

<https://www.youtube.com/watch?v=kQJOdTnFLcc>

<https://www.youtube.com/watch?v=ky85Piwy6EQ>

<https://www.youtube.com/watch?v=acGUObR2ibQ>