

## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΘΑΛΑΣΣΙΟΥ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΥΣ *TETRASELMIS STRIATA* ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΗΣ

Β. Πατρινού<sup>1,\*</sup>, Α. Δασκαλάκη<sup>2</sup>, Σ. Παπανικόλας<sup>1,5</sup>, Δ. Καμπάνταης<sup>3</sup>, Χ. Ν. Οικονόμου<sup>4</sup>, Δ. Μπόκας<sup>5</sup>, Ι. Κοτζαμάνης<sup>3</sup>, Δ. Β. Βαγενάς<sup>4</sup>, Γ. Αγγελής<sup>2</sup>, Α. Γ. Τεκερλεκοπούλου<sup>1</sup>

<sup>1</sup> [patrinou.v@hotmail.com](mailto:patrinou.v@hotmail.com), [spanicolos@gmail.com](mailto:spanicolos@gmail.com), [atekerle@upatras.gr](mailto:atekerle@upatras.gr), Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Πατρών, Γ. Σεφέρη 2, 30100, Αγρίνιο, Ελλάδα

<sup>2</sup> [alexaskalaki1@gmail.com](mailto:alexaskalaki1@gmail.com), [George.Aggelis@upatras.gr](mailto:George.Aggelis@upatras.gr), Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα 26500, Ελλάδα

<sup>3</sup> [dim.kampantais@hcmr.gr](mailto:dim.kampantais@hcmr.gr), [jokotz@hcmr.gr](mailto:jokotz@hcmr.gr), Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών/ Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, Ιερά οδός 75, Αθήνα 11855, Ελλάδα

<sup>4</sup> [economch@gmail.com](mailto:economch@gmail.com), [dvagenas@upatras.gr](mailto:dvagenas@upatras.gr), Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα 26500, Ελλάδα

<sup>5</sup> [dimitris\\_bokas@yahoo.com](mailto:dimitris_bokas@yahoo.com), PLAGTON S. A., Θέση Κονάκι Σκεντού, Δήμος Ξηρομέρου, Αιτωλοακαρνανία, Ελλάδα

\* [patrinou.v@hotmail.com](mailto:patrinou.v@hotmail.com)

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ανάπτυξη του *Tetraselmis striata* σε νερά γεώτρησης αλατότητας 29 ‰, τα οποία προέρχονταν από τις εγκαταστάσεις της ιχθυοκαλλιέργειας PLAGTON S.A.. Στοχεύοντας στην αύξηση της παραγωγής και στη βελτίωση της ποιότητας της παραγόμενης βιομάζας μελετήθηκε κατά την ακόλουθη σειρά η επίδραση του υποστρώματος, του pH, της θερμοκρασίας, της φωτοπεριόδου και της παροχής CO<sub>2</sub>. Από τα εξεταζόμενα υποστρώματα (τροποποιημένο F/2, εμπορικό λίπασμα Nutri-Leef (30%-TN, 10%-P, 10%-K)), το Nutri Leef παρουσία NaHCO<sub>3</sub> παρουσίασε υψηλές τιμές παραγωγικότητας βιομάζας (84,2 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). Στη συνέχεια, εξετάστηκε η επίδραση του pH (7 και 8) με την τιμή του 8 να χαρακτηρίζεται ως βέλτιστη (παρουσιάζοντας όχι μόνο υψηλή παραγωγικότητα βιομάζας αλλά και υψηλές συγκεντρώσεις λιπιδίων, πολυσακχαριτών και χρωστικών) και να χρησιμοποιείται για όλα τα επόμενα πειράματα. Πειράματα έλαβαν χώρα και σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες, 19 ± 1, 25 ± 1 και 28 ± 1 °C υπό συνεχή φωτισμό (24:0, L (Φως): D (Σκοτάδι)). Η θερμοκρασία των 25°C, η οποία κρίθηκε ως βέλτιστη παρουσίασε την υψηλότερη παραγωγικότητα βιομάζας (93,7 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), αλλά και την υψηλότερη περιεκτικότητα σε βιοενεργά συστατικά. Στην συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της φωτοπεριόδου στους 25°C εξετάζοντας τις περιόδους των 20:4, 18:6, 12:12 L:D. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η αύξηση των σκοτεινών περιόδων επέφερε μείωση της παραγωγικότητας της βιομάζας. Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση του καθαρού CO<sub>2</sub> στην ανάπτυξη του μικροφύκου εξετάζοντας τους ρυθμούς παροχής 10, 20 και 90 mL min<sup>-1</sup>, με την υψηλότερη τιμή παραγωγικότητας βιομάζας (87,5 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) να παρουσιάζεται στην παροχή των 10 mL min<sup>-1</sup>. Ανάλυση του προφίλ των αμινοξέων και των λιπαρών οξέων έδειξε ικανοποιητικό αμινοξικό προφίλ και σημαντικό ποσοστό πολυακόρεστων λιπαρών οξέων αντίστοιχα, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η παραγόμενη βιομάζα είναι κατάλληλη για ενσωμάτωση σε ιχθυοτροφές.

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** *Tetraselmis striata*; Υπόστρωμα; pH; θερμοκρασία; φωτοπερίοδος; CO<sub>2</sub>

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η υδατοκαλλιέργεια είναι μια αναπτυσσόμενη βιομηχανία που παρέχει σημαντικές ποσότητες πρωτεΐνης και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων για κατανάλωση από τον άνθρωπο παγκοσμίως [1]. Λόγω της αύξησης του ανθρώπινου πληθυσμού, η εκτροφή υδρόβιων οργανισμών αναμένεται να ξεπεράσει την παραγωγή της ελεύθερης αλιείας έως το 2025, ενώ, σύμφωνα με τον FAO, 109 εκατομμύρια τόνοι ψαριών θα παραχθούν από τις υδατοκαλλιέργειες έως το 2030 [2]. Κατά συνέπεια, έχουν προκύψει σημαντικές προκλήσεις που σχετίζονται με το υψηλό κόστος και τη μειωμένη διαθεσιμότητα ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίων στη διατροφή των ψαριών.

Τα μικροφύκη αναγνωρίζονται ως μια φυσική και εναλλακτική θρεπτική πηγή βιοδραστικών συστατικών [3]. Η κύρια εφαρμογή τους στην υδατοκαλλιέργεια είναι στη διατροφή εφόσον μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστατικό των ιχθυοτροφών [4]. Ανάλογα με τον τύπο και την περιεκτικότητά τους σε χρωστικές ουσίες, τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται επίσης για να προσδώσουν χρώμα στο δέρμα και στη σάρκα των ψαριών ή να συμβάλλουν σε άλλες βιολογικές λειτουργίες μέσω των θρεπτικών συστατικών τους. Η χρήση της βιομάζας μικροφυκών στις τροφές των ψαριών θεωρείται ότι είναι ευεργετική, καθώς οδηγεί σε αυξημένη εναπόθεση πρωτεϊνών στον μυϊκό ιστό, βελτιωμένη αντίσταση στις ασθένειες και αυξημένη περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα [5].

Τα στελέχη των μικροφυκών για να χρησιμοποιηθούν στην υδατοκαλλιέργεια θα πρέπει να στερούνται τοξικότητας, να έχουν υψηλή θρεπτική αξία, κατάλληλο μέγεθος και σχήμα κυττάρου και να διαθέτουν ένα εύπεπτο κυτταρικό τοίχωμα, ώστε τα θρεπτικά συστατικά να είναι πιο βιοδιαθέσιμα [6,7]. Η θρεπτική αξία της βιομάζας μικροφυκών καθορίζεται από την περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες, βιταμίνες και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Το εικοσαπεντανοϊκό (EPA), το εικοσιδυοεξανοϊκό (DHA) και το αραχιδονικό (AA) είναι τα πιο σημαντικά λιπαρά οξέα για τους σκοπούς της υδατοκαλλιέργειας. Διαφορετικές στρατηγικές εφαρμόζονται για τη βελτίωση της παραγωγής βιομάζας και τον εμπλουτισμό της βιομάζας με αυτά τα συγκεκριμένα θρεπτικά συστατικά. Έτσι, η βελτιστοποίηση των σημαντικών λειτουργικών παραμέτρων ανάπτυξης, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης του υποστρώματος, της έντασης και διάρκειας φωτός, της θερμοκρασίας, του pH και της παροχής CO<sub>2</sub>, είναι απαραίτητη [4].

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάπτυξης του θαλάσσιου μικροφύκου *Tetraselmis striata*. Πειράματα έλαβαν χώρα σε αντιδραστήρες εργαστηριακής κλίμακας, εξετάζοντας αρχικά την επίδραση της σύστασης του θρεπτικού μέσου και στη συνέχεια, την επίδραση του pH, της θερμοκρασίας, της φωτοπεριόδου και του ρυθμού παροχής CO<sub>2</sub> στον ειδικό ρυθμό αύξησης. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της ποιότητας της παραγόμενης βιομάζας για κάθε εξεταζόμενη λειτουργική παράμετρο με σκοπό να αξιολογηθεί η καταλληλότητα της για ενσωμάτωση σε πρακτικές ιχθυοτροφές.

## 2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η καθαρή καλλιέργεια του μικροφύκου *T. striata* που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία αγοράστηκε από την συλλογή μικροφυκών του Πανεπιστημίου Göttingen της Γερμανίας (SAG). Το στέλεχος καλλιεργήθηκε σε νερό γεώτρησης αλατότητας 29‰ που παραχωρήθηκε από την εμπορική ιχθυοπαραγωγική μονάδα Plagton S.A.. Οι βιοαντιδραστήρες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν γυάλινα ενυδρεία λειτουργικού όγκου 4 L και η ανάδευση στο εσωτερικό τους παρέχονταν από μια αντλία ανακυκλοφορίας με ρυθμό παροχής 380 L h<sup>-1</sup>. Το νερό γεώτρησης που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια του μικροφύκου δεν περιείχε αρκετά θρεπτικά συστατικά και επομένως η προσθήκη εξωτερικών θρεπτικών ήταν απαραίτητη για την ανάπτυξή του. Μελετήθηκαν δυο διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα: α) τροποποιημένο F/2 μέσο και β) εμπορικό λίπασμα Nutri-Leef. Το εμπορικό λίπασμα δοκιμάστηκε στην προτεινόμενη δοσολογία

για υγρή λίπανση ( $0,05 \text{ g L}^{-1}$ ), ενώ επιπλέον εξετάσθηκε στην ίδια ποσότητα και με την προσθήκη ανόργανης πηγής άνθρακα ( $0,18 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ). Το Nutri-Leef επιλέχθηκε ως το βέλτιστο υπόστρωμα ανάπτυξης, καθώς τόσο χωρίς όσο και με προσθήκη  $\text{NaHCO}_3$  οδήγησε σε μεγαλύτερη παραγωγικότητα βιομάζας σε σύγκριση με το τροποποιημένο F/2 υπόστρωμα. Στη συνέχεια πειράματα έλαβαν χώρα με σκοπό την βελτιστοποίηση της ποσότητας του λιπάσματος που εμπλουτίζονταν το νερό γεώτρησης (παρουσία  $\text{NaHCO}_3$ ). Οι ποσότητες που εξετάσθηκαν ήταν εκείνες των  $0,1$ ,  $0,2$ ,  $0,4$ ,  $0,6$ ,  $0,8$  και  $1 \text{ g L}^{-1}$  λιπάσματος, με εκείνη των  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  να οδηγεί στη βέλτιστη ανάπτυξη του μικροφύκου. Για την διεξαγωγή όλων των πειραμάτων εργαστηριακής κλίμακας το νερό γεώτρησης μετά την προσθήκη των θρεπτικών συστατικών αποστειρώνονταν σε αυτόκαυστο, ενώ στη συνέχεια οι συνθήκες καλλιέργειας του μικροφύκου ήταν μη ασηπτικές. Το pH ρυθμιζονταν μεταξύ των τιμών  $8,0$  και  $8,3$  χρησιμοποιώντας  $\text{NaOH}$  ή  $\text{HCl}$ , ενώ για τον φωτισμό χρησιμοποιήθηκαν δύο λαμπτήρες φθορισμού (με χρονοδιακόπτη) έντασης φωτός  $56 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Για τα πειράματα μελέτης της επίδρασης της θερμοκρασίας στους φωτοβιοαντιδραστήρες χρησιμοποιήθηκαν θερμοστάτες Diversa Heater Thermo Plus 25 W. Τέλος, στα πειράματα βελτιστοποίησης της παροχής καθαρού  $\text{CO}_2$ , χρησιμοποιήθηκαν ροόμετρα αερίων προκειμένου να εξασφαλιστεί σταθερή παροχή του  $\text{CO}_2$ .

Δείγματα από τους βιοαντιδραστήρες λαμβάνονταν κάθε δύο ημέρες για τον προσδιορισμό της ανάπτυξης του μικροφύκου και τον ποιοτικό χαρακτηρισμό της βιομάζας του. Η βιομάζα ξεπλένονταν με συνεχείς φυγοκεντρήσεις και επαναϊώρηση αυτής σε απεσταγμένο νερό, ώστε να απομακρύνονται τα άλατα. Στη συνέχεια, ξηραίνονταν σε φούρνο στους  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  μέχρι σταθερού βάρους. Η ξηρή βιομάζα προσδιορίζονταν σταθμικά σε  $\text{mg L}^{-1}$  ως ολικά αιωρούμενα στερεά (TSS), σύμφωνα με το Standard Methods [8]. Η παραγωγικότητα βιομάζας εκφρασμένη σε  $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Goncalves et al. [9], ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ( $d^{-1}$ ) υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Tzolcha et al. [10]. Οι ενδοκυτταρικοί υδατάνθρακες προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Dubois [11], το  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την τροποποιημένη μέθοδο Indophenol Blue [12] ενώ, τα υπόλοιπα θρεπτικά συστατικά προσδιορίστηκαν σύμφωνα με το Standard Methods [13]. Η περιεκτικότητα σε λιπίδια της ξηρής βιομάζας υπολογίστηκε σταθμικά σύμφωνα με τη μέθοδο Folch [14]. Η σύσταση των ολικών λιπιδίων σε λιπαρά οξέα προσδιορίστηκε με τη βοήθεια αέριας χρωματογραφίας, αφού προηγουμένως τα δείγματα είχαν υποστεί μεθυλεστεροποίηση σύμφωνα με τη μέθοδο AFNOR [15]. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Kjeldahl ακολουθώντας τη μέθοδο AOAC [16], ενώ η αμινοξική σύσταση της λυοφιλιωμένης βιομάζας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Kotzamanis et al. [17]. Τέλος, η συγκέντρωση των ολικών χλωροφυλλών και καροτενοειδών στην υγρή βιομάζα, υπολογίστηκε με τις εξισώσεις των Lichtenthaler και Buschmann [18] χρησιμοποιώντας την ακετόνη ως διαλύτη με  $20\%$  (v/v) νερό.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος στην ανάπτυξη του *T. striata*, εξετάζοντας τροποποιημένο F/2 υπόστρωμα και το εμπορικό λίπασμα Nutri-Leef (30%-TN, 10%-P, 10%-K), το οποίο εξετάστηκε χωρίς και με την προσθήκη  $\text{NaHCO}_3$ . Τα εν λόγω υποστρώματα κατέγραψαν μέγιστη παραγωγικότητα βιομάζας  $58,2$ ,  $62,0$  και  $70,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  με ειδικό ρυθμό αύξησης  $0,227$ ,  $0,200$ ,  $0,240 \text{ d}^{-1}$ , αντιστοίχως. Το περιεχόμενο της βιομάζας σε λιπίδια που καταγράφηκε κυμάνθηκε από  $16.5$  έως  $24.2\%$ , με το μέγιστο ποσοστό να σημειώνεται με το F/2. Ωστόσο, δεδομένου ότι το εμπορικό λίπασμα (με προσθήκη  $\text{NaHCO}_3$ ) οδήγησε στην υψηλότερη παραγωγικότητα βιομάζας και το γεγονός ότι θα μπορούσε να αποτελέσει υπόστρωμα χαμηλού κόστους που θα επέτρεπε την παραγωγή του μικροφύκου σε μεγάλη κλίμακα, επιλέχθηκε ως το βέλτιστο θρεπτικό υπόστρωμα. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της ποσότητας του λιπάσματος που εμπλουτίζονταν ανά λίτρο καλλιέργειας, διατηρώντας σταθερή την ποσότητα

του  $\text{NaHCO}_3$  ( $0,18 \text{ g L}^{-1}$ ). Τα συγκεκριμένα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με συνεχή φωτισμό, pH και θερμοκρασία μη ελεγχόμενα, τα οποία όμως κυμαίνονταν μεταξύ των τιμών 7,8-8,5 και 24 - 27°C, αντίστοιχα. Υψηλές παραγωγικότητες βιομάζας ( $81,8$  και  $84,2 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) και ειδικοί ρυθμοί αύξησης ( $0,236$  και  $0,240 \text{ d}^{-1}$ ) σημειώθηκαν με τη χρήση λιπάσματος συγκέντρωσης  $0,1$  και  $0,2 \text{ g L}^{-1}$ , με την καλύτερη ωστόσο να σημειώνεται στα  $0,2 \text{ g L}^{-1}$ . Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η σταδιακή αύξηση του λιπάσματος από τα  $0,4$  έως και το  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ , μείωσε την παραγωγικότητα βιομάζας και τον ειδικό ρυθμό αύξησης από την τιμή των  $62,8$  σε εκείνη των  $59,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  και από  $0,212$  στην τιμή του  $0,127 \text{ d}^{-1}$ , αντίστοιχα. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για τις απομακρύνσεις του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ , με το ποσοστό απομάκρυνσης να μειώνεται από την τιμή του 90% στην τιμή του 41%, για την ίδια αύξηση ποσότητας λιπάσματος από τα  $0,4$  έως και  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ . Οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις των θρεπτικών συστατικών του λιπάσματος και ιδιαίτερα του ολικού αζώτου (TN), που κυμαίνονταν μεταξύ  $120$  και  $300 \text{ mg L}^{-1}$ , επέδρασαν ανασταλτικά για την περαιτέρω αφομοίωσή τους και επηρέασαν αρνητικά την παραγωγή βιομάζας. Μέγιστο ποσοστό λιπιδίων (16.3%) επιτεύχθηκε επίσης με  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  λιπάσματος, συγκέντρωση για την οποία η ανάπτυξη ήταν μέγιστη.

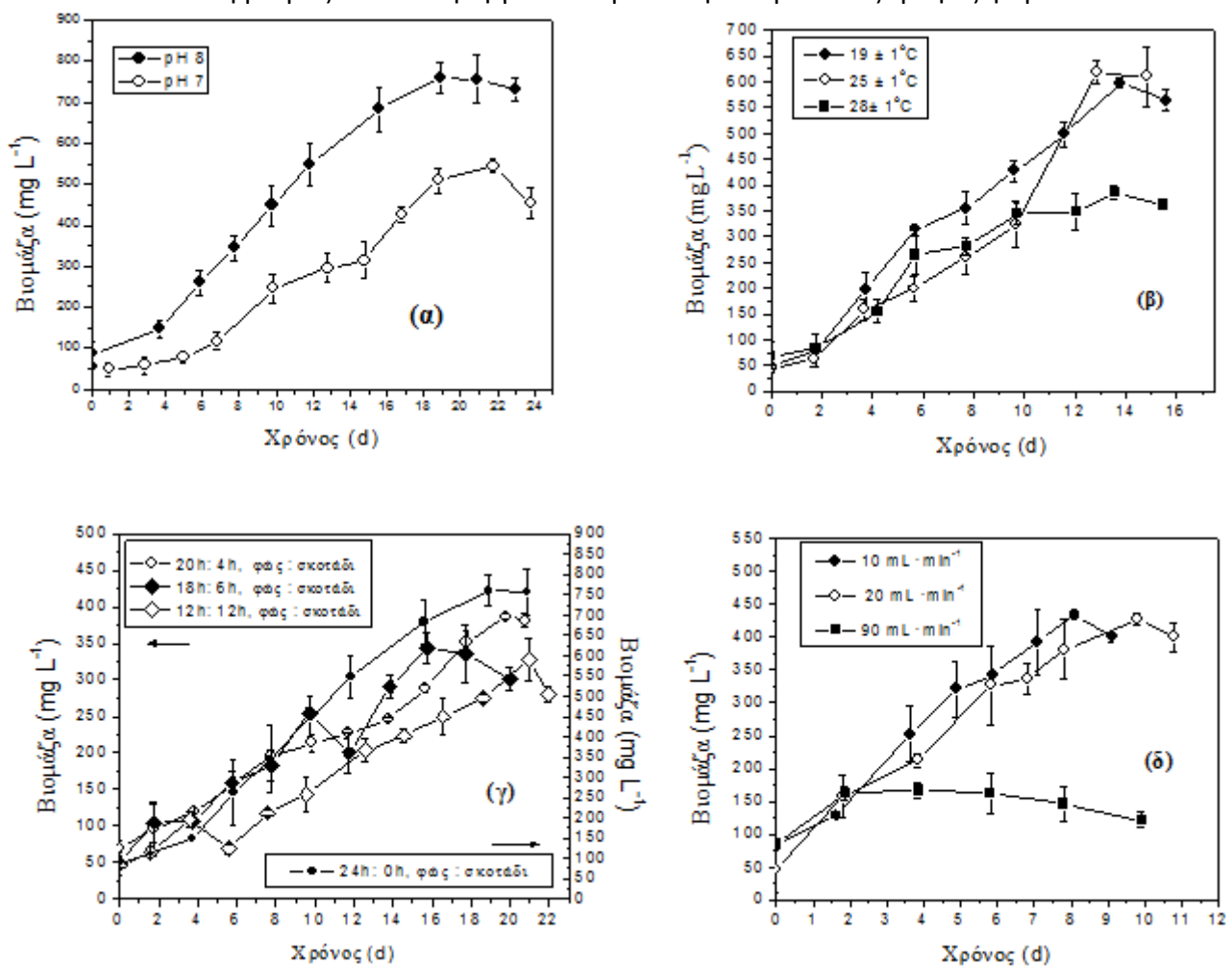
Στη συνέχεια μελετήθηκε η βέλτιστη τιμή pH του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης, εξετάζοντας δυο διαφορετικές τιμές, 7 και 8. Τα πειράματα του pH διεξήχθησαν υπό συνεχή φωτισμό και θερμοκρασία μη ελεγχόμενη κυμαινόμενη μεταξύ 24 και 27°C. Το στέλεχος αναπτύχθηκε ικανοποιητικά και στις δυο τιμές pH, καταγράφοντας όμως μεγαλύτερη παραγωγικότητα βιομάζας και ειδικό ρυθμό αύξησης στην τιμή pH 8 ( $79,8 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  και  $0,266 \text{ d}^{-1}$ , αντίστοιχα), έναντι της τιμή pH 7 ( $60,12 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  και  $0,248 \text{ d}^{-1}$ , αντίστοιχα) (Πίνακας 1, Εικόνα 1α). Σε pH 8 το ποσοστό των συσσωρευμένων λιπιδίων και υδατανθράκων επί της ξηρής βιομάζας έφτασε την τιμή 27.8% και 14.6%, αντίστοιχα, ενώ σε pH 7 τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 26,4 και 14,7%. Υψηλότερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο επί της ξηρής βιομάζας (51,3%) και ποσοστό ολικών χλωροφυλλών (5,1%) σημειώθηκε σε τιμή pH 8. Συνεπώς, η τιμή pH 8 κρίθηκε ως βέλτιστη για την περαιτέρω βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας. Οι θερμοκρασίες που εξετάστηκαν υπό συνθήκες συνεχούς φωτισμού ήταν εκείνες των  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  και  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ . Η υψηλότερη παραγωγικότητα βιομάζας  $93,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  που αντιστοιχεί σε ειδικό ρυθμό αύξησης  $0,283 \text{ d}^{-1}$ , επιτεύχθηκε στους  $25^\circ\text{C}$  (Πίνακας 1). Υψηλή παραγωγικότητα βιομάζας περίπου  $70,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  επιτεύχθηκε επίσης στους  $19^\circ\text{C}$ , ενώ όταν η θερμοκρασία αυξήθηκε στους  $28^\circ\text{C}$  η παραγωγικότητα μειώθηκε σημαντικά στη τιμή των  $61,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (Εικόνα 1β). Οι θερμοκρασίες των  $19^\circ\text{C}$  και  $25^\circ\text{C}$  όχι μόνο ήταν ευνοϊκές για την παραγωγή βιομάζας, αλλά οδήγησαν και σε υψηλότερους ρυθμούς κατανάλωσης των θρεπτικών συστατικών. Η ανάλυση της σύστασης της βιομάζας από τα πειράματα της θερμοκρασίας (Πίνακας 1) έδειξε ότι στους  $25^\circ\text{C}$  η παραγόμενη βιομάζα ήταν πλούσια σε λιπίδια (30,2%), πρωτεΐνες (38,7%), υδατάνθρακες (20,4%) και χρωστικές (5,1%). Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα η θερμοκρασία των  $25^\circ\text{C}$  επιλέχθηκε ως η βέλτιστη.

Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση της φωτοπεριόδου στην ανάπτυξη του *T. striata*, εξετάζοντας τις 20:4, 18:6, 12:12h L:D (Εικόνα 1γ). Παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή βιομάζας επηρεάστηκε σημαντικά από την απουσία φωτός. Οι υψηλότερες παραγωγικότητες βιομάζας καταγράφηκαν στις 24:0 και 20:4 L:D αγγίζοντας τις τιμές των  $93,7$  και  $46,3 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , αντίστοιχα. Αυξημένη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη παρατηρήθηκε σε όλες τις φωτοπεριόδους με τα ποσοστά τους να βρίσκονται μεταξύ των τιμών 50,4 και 54,0%. Η ολική χλωροφύλλη, τα λιπίδια και οι υδατάνθρακες μειώθηκαν επίσης καθώς αυξάνονταν η σκοτεινή περίοδος (Πίνακας 1). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω ο συνεχής φωτισμός (24:0, L:D) επιλέχθηκε ως η βέλτιστη φωτοπερίοδος.

Η επίδραση της προσθήκης καθαρού  $\text{CO}_2$  στην ανάπτυξη μελετήθηκε με παροχές  $10$ ,  $20$  και  $90 \text{ mL min}^{-1}$  (Εικόνα 1δ). Τα πειράματα έδειξαν ότι το *T. striata* δεν μπορούσε να εγκλιματισθεί στην υψηλή παροχή των  $90 \text{ mL min}^{-1}$ , παροχή η οποία επηρέασε σημαντικά το pH του υποστρώματος το οποίο έλαβε χαμηλές τιμές pH μεταξύ 5,8 και 6,5. Σε χαμηλότερους ρυθμούς ροής  $\text{CO}_2$   $10$  και  $20 \text{ mL min}^{-1}$  παρατηρούνταν βαθμιαία οξίνιση του υποστρώματος ανάπτυξης, ωστόσο το pH παρέμεινε τελικά πάνω από την τιμή 7,5. Η υψηλότερη παραγωγικότητα βιομάζας καταγράφηκε

στην παροχή  $10 \text{ mL min}^{-1}$  αγγίζοντας την τιμή των  $87,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Οι ολικές χλωροφύλλες (5,2%) και τα λιπίδια (27,3%) κατέγραψαν υψηλότερα ποσοστά συσσώρευσης στην κυτταρική βιομάζα με την παροχή των  $10 \text{ mL min}^{-1}$ . Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες μειώθηκε όσο αυξανόταν η παροχή  $\text{CO}_2$ , ενώ η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες δεν επηρεάστηκε σημαντικά καθώς αυτή κυμαινόταν μεταξύ 10.3-11.5%.

Εν κατακλείδι, υπό βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης, το μικροφύκος *Tetraselmis striata* παρήγαγε υψηλής ποιότητας βιομάζα που ήταν πλούσια σε θρεπτικά συστατικά, τα οποία είναι σημαντικά για την ανάπτυξη των ψαριών. Η ανάλυση της βιομάζας έδειξε ότι τα παραγόμενα λιπίδια περιείχαν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το EPA σε υψηλές ποσότητες (έως 27.6% επί των ολικών λιπιδίων). Επιπλέον, η βιομάζα συσσώρευσε σημαντικές ποσότητες πρωτεΐνης με ικανοποιητική περιεκτικότητα σε αμινοξέα. Αναλυτικότερα, στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης βρέθηκε υψηλό περιεχόμενο σημαντικών αμινοξέων (18,44-23,06%) και υψηλή αναλογία σημαντικών/ μη σημαντικών αμινοξέων με εύρος τιμών μεταξύ του 1 και 1.02. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν τη βιομάζα κατάλληλη για ενσωμάτωση σε πρακτικές τροφές ψαριών.



Εικόνα 1: Μεταβολή της συγκέντρωσης της βιομάζας του *T. striata* υπό τις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης, εξετάζοντας: (α) την τιμή pH, (β) τη θερμοκρασία, (γ) τη φωτοπερίοδο και (δ) την παροχή  $\text{CO}_2$  σε συνάρτηση με το χρόνο.

Πίνακας 1: Επίδραση του pH, της θερμοκρασίας, της φωτοπεριόδου και της παροχής  $\text{CO}_2$  στην ανάπτυξη και στην σύσταση της βιομάζας του *T. Striata*.

Πειραματική Συνθήκη	Μέγιστη Παραγωγικότητα Βιομάζας ( $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )	Μέγιστος Ειδικός Ρυθμός	Λιπίδια % ξ.β.	Υδατάνθρακες % ξ.β.	Ολικές Χλωροφύλλες % ξ.β	Πρωτεΐνες % ξ.β
---------------------	---	-------------------------	----------------	---------------------	--------------------------	-----------------

		Ανάπτυξης (d <sup>-1</sup> )				
pH 8	79,8	0,266	27,8 ± 1,0	14,6 ± 1,5	5,1 ± 0,1	51,2 ± 2,0
pH 7	60,1	0,248	26,4 ± 0,4	14,7 ± 0,8	4,6 ± 0,08	47,7 ± 0,5
T= 19±1 °C	69,3	0,237	26,7 ± 1,7	16,3 ± 1,3	3,4 ± 0,1	34,8 ± 1,0
T= 25±1 °C	93,7	0,283	30,2 ± 1,5	20,4 ± 2,2	5,1 ± 1,2	38,7 ± 1,2
T= 28±1 °C	61,5	0,223	26,2 ± 1,3	13,5 ± 0,4	2,7 ± 0,05	41,6 ± 2,1
20:4 L:D	46,3	0,136	28,5 ± 3,8	15,6 ± 1,4	4,2 ± 0,1	53,2 ± 0,5
18:6 L:D	36,3	0,208	25,8 ± 1,1	14,4 ± 1,6	2,8 ± 0,6	50,4 ± 1,2
12:12 L:D	30,0	0,118	24,7 ± 2,5	13,8 ± 0,5	3,8 ± 0,4	54,0 ± 1,8
10 mL min <sup>-1</sup>	87,5	0,262	27,3 ± 1,5	10,3 ± 2,6	5,2 ± 0,25	44,6 ± 0,8
20 mL min <sup>-1</sup>	45,0	0,216	22,5 ± 1,5	11,5 ± 1,0	3,5 ± 0,4	44,5 ± 0,7
90 mL min <sup>-1</sup>	20,3	0,050	19,0 ± 2,6	11,5 ± 0,7	1,4 ± 0,07	25,4 ± 0,2

## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] Ahmad, A., Sheikh Abdullah, S. R., Hasan, H. A., Othman, A. R., Ismail, N. I. (2021). *J. Environ. Manage.* 287: 112271.
- [2] Tacon A.J. (2003). *FAO Fish Circ.* 886: 5-29.
- [3] Zhang, F., Man, Y. B., Mo, W. Y., Wong, M. H. (2020). *Rev. Aquac.* 12 (2): 582-599.
- [4] Hemaiswarya, S., Raja, R., Kumar, R. R., Ganesan, V., Anbazhagan, C. (2011). *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 1737-1746.
- [5] Shah, M. R., Lutz, G. A., Alam, A., Sarker, P., Chowdhury, M. A. K., Parsaeimehr, A., Liang, Y. (2018). *J. Appl. Phycol.* 30: 197-213.
- [6] Kaparapu, J. (2018). *Phykos.* 48 (1): 21-26.
- [7] Raja, R, C. Anbazhagan, D. Lakshmi, R. Rengasamy (2004). *Seaweed Res. Utili.* 26 (1 & 2): 127-146.
- [8] APHA. (1998). 20st ed.; American Public Health Association: Washington D.C., USA, 1998.
- [9] Gonçalves, A. L., Pires, J. C. M., Simões, M. (2016). *J. Clean. Prod.* 24 (Part B): 403-415.
- [10] Tsolcha, O. N., Tekerlekopoulou, A. G., Akrotos, C. S., Aggelis, G., Genitsaris, S., Moustaka-Gouni, M., Vayenas, D. V. (2017). *J. Clean. Prod.* 148 : 185-193.
- [11] DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956). *Anal. Chem.* 28 (3) : 350–356.
- [12] Pai, S. C., Tsau, Y. J., Yang, T. I. (2001). *Anal. Chim. Acta.* 434 : 209–216.
- [13] APHA. (2005). 21st ed.; American Public Health Association: Washington D.C., USA, 2005.
- [14] Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. A. (1951). *J. Biol. Chem.* 226 (1) : 497–509.
- [15] AFNOR, (1984). 3rd ed.; AFNOR: Paris, France: 95.
- [16] AOAC, (1995). 16th ed.; AOAC International, Arlington, VA.
- [17] Kotzamanis, Y., Kouroupakis, E., Ili, V., Haralabous, J., Papaioannou, N., Papanna, K., Richards, R., Gisbert, E. (2018). *Aquac. Nutr.* 24 (6) : 1738-1751.
- [18] Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C. (2005). *Handbook of Food Anal. Chem.* 2 (1) : 171–178.



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

