



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ  
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΤΑΜΕΙΟ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ



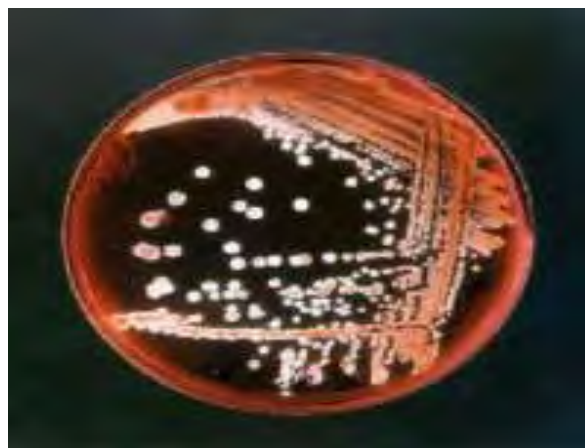
  
**Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ**  
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα  
Εκπαίδευσης και Αρχικής  
Επαγγελματικής Κατάρτισης

## ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΥΔΡΟΒΙΩΝ ΖΩΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

### ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΟΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΥΠΩΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΟ ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΤΟΜΩΝ ΚΑΡΑΒΙΔΑΣ *Nephrops norvegicus*



ΑΝΘΟΥΛΑ ΤΣΟΥΚΑΛΑ  
ΒΟΛΟΣ 2008

ΜΟΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΥΠΩΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΟ  
ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΤΟΜΩΝ ΚΑΡΑΒΙΔΑΣ *Nephrops norvegicus*

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

**Κωνσταντίνος Κορμάς**, Επίκουρος Καθηγητής, Οικολογία υδάτινης στήλης με έμφαση στα μικροβιακά και τροφικά είδη, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**.

**Έλενα Μεντέ**, Επίκουρη Καθηγήτρια, Φυσιολογία και Θρέψη Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

**Αθανάσιος Εξαδάκτυλος**, Επίκουρος Καθηγητής, Γενετική Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

## Περίληψη

Στην εργασία αυτή, μελετήθηκε η μοριακή ποικιλότητα των βακτηρίων που απαντώνται στο πεπτικό σύστημα της караβίδας *Nephrops norvegicus*, με σκοπό την διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης, του υπό μελέτη είδους με τους ενδοσυμβιώτες του αλλά και με το περιβάλλον στο οποίο συνυπάρχουν.

Πέντε δείγματα του είδους *N. norvegicus* συλλέχθηκαν από ένα φυσικό πληθυσμό που διαβίωνε στον Παγασητικό κόλπο του Ν. Μαγνησίας. Πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες βακτηρίων του πεπτικού συστήματος των δειγμάτων που συλλέχθηκαν και στην συνέχεια απομονώθηκε το DNA. Ακολούθησε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) με ενίσχυση ειδικών εκκινήτων για βακτήρια του 16s rRNA γονιδίου. Έγινε κλωνοποίηση των γονιδίων και δημιουργία γονιδιακής βιβλιοθήκης. Ακολούθησε ανάλυση των αλληλουχιών που προέκυψαν από αλληλούχιση των γονιδίων και σύγκριση τους με όλες τις γνωστές αλληλουχίες της βάσης δεδομένων της GENBANK ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) με την βοήθεια του προγράμματος BLAST, ώστε να βρεθούν οι συγγενείς φυλότυποι. Από τον έλεγχο που έγινε με την βοήθεια του CHIMERA-CHECK του Ribosomal Database Project (<https://rdp.cme.msu.edu/>) στις αλληλουχίες, δεν διαπιστώθηκε ύπαρξη χιμαιρικών αλληλουχιών. Οι φυλότυποι που αναγνωρίστηκαν ήταν συγγενείς φυλογενετικά με αντιπροσώπους του υπό-φύλου γ-Proteobacteria και συγκεκριμένα της οικογένειας *Vibrionaceae*.

Πολλούς αντιπροσώπους αυτής της βακτηριακής ομάδας τους συναντάμε σε ενδιαιτήματα όπως είναι η θαλάσσια υδάτινη στήλη, αλλά και σαν

συμβιώτες σε θαλάσσια ασπόνδυλα. Η κυριαρχία και η αφθονία αυτής της ταξινομικής ομάδας στα υπό διερεύνηση δείγματα θα μπορούσε να χαρακτηρίσει την σχέση τους συμβιωτική με το είδος της караβίδας *N. norvegicus*. Η παρουσία αυτών των ετερότροφων βακτηρίων στο πεπτικό σύστημα της караβίδας, σε συνδυασμό με τις μεταβολικές τους διεργασίες θα μπορούσε να σημαίνει ίσως, μια σημαντική επίδραση στην θρέψη και την επιβίωσή της.

Λέξεις κλειδιά: *Nephrops norvegicus*, πεπτικό σύστημα, βακτήρια, συμβίωση

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή είναι αφιερωμένη στον γιό μου Ευάγγελο.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργαστηριακή μελέτη της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών, στο Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Πρώτα θα ήθελα, ξεχωριστά να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου και επιβλέπων της διατριβής μου, τον επίκουρο καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Κορμά για την ουσιαστική και διαρκή βοήθεια που μου παρείχε κατά την διάρκεια αυτού του χρόνου. Τον ευχαριστώ για τις πολύτιμες συμβουλές του και για την ευκαιρία που μου έδωσε να μοιραστώ μαζί του όλες αυτές τις πολύτιμες εργαστηριακές εμπειρίες.

Επίσης, ευχαριστώ τους επίκουρους καθηγητές κα. Έλενα Μέντε και κ. Αθανάσιο Εξαδάκτυλο για την επιστημονική τους σφραγίδα στην τριμελή επιτροπή της εργασίας μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στα παιδιά του εργαστηρίου, στον φίλο μου και συνάδερφο Γιάννη Γούγα, στην Αλεξάνδρα Μεζίτη και την Μαρία Παχιαδάκη που ήταν δίπλα μου από την αρχή μέχρι και το τέλος αυτής της εργαστηριακής μου προσπάθειας. Μοιράστηκαν μαζί μου τις εργαστηριακές και πνευματικές τους γνώσεις και με βοήθησαν ουσιαστικά.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Λουκία Γιαννακοπούλου που όποτε την χρειάστηκα ήταν δίπλα μου και τις φίλες μου Έλενη, Γιάννα και Νίκη για την ψυχολογική υποστήριξη στις δυσκολίες αυτού του χρόνου.

## Περιεχόμενα

<b>1. Εισαγωγή.....</b>	<b>9</b>
1.1 Μικροοργανισμοί και υδάτινα οικοσυστήματα.....	9
1.2 Συμβίωση.....	10
1.3 Συμβίωση βακτηρίων με θαλάσσια ασπόνδυλα.....	12
1.4 Παραδείγματα συμβιωτικών σχέσεων.....	15
1.5 Προσεγγίσεις και τεχνικές για την αναγνώριση των φυλοτύπων.....	18
<b>2. Υλικά και μέθοδοι.....</b>	<b>22</b>
2.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά και βιολογία για το είδος που μελετήθηκε ( <i>Nephrops norvegicus</i> ).....	22
2.1.2 Γεωγραφική κατανομή της караβίδας.....	25
2.1.3 Στάδια ανάπτυξης του είδους <i>Nephrops norvegicus</i> .....	26
2.1.4 Αναπαραγωγική περίοδος της <i>Nephrops norvegicus</i> .....	29
2.1.5 Αλιεία και εμπορική αξία της караβίδας <i>Nephrops norvegicus</i> .....	32
2.2 Δειγματοληψία και βακτηριακές καλλιέργειες.....	36
2.3 Απομόνωση γενετικού υλικού (DNA).....	37
2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και ηλεκτροφόρηση.....	37
2.5 Καθαρισμός.....	40
2.6 Κλωνοποίηση.....	41
2.7 Επεξεργασία και έλεγχος των αποικιών μετά την κλωνοποίηση.....	43
2.8 Υγρές καλλιέργειες.....	45



2.9 Απομόνωση πλασμιδίου.....	45
2.10 Αλληλούχιση.....	46
<b>3. Αποτελέσματα .....</b>	<b>47</b>
<b>4. Συζήτηση.....</b>	<b>56</b>
<b>5. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>65</b>
<b>6.Abstract.....</b>	<b>77</b>

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των σχέσεων μεταξύ των μικροοργανισμών και των θαλάσσιων ασπονδύλων.

### 1.1 Μικροοργανισμοί και υδάτινα οικοσυστήματα

Στα υδάτινα οικοσυστήματα εντοπίζεται μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών. Οι περισσότεροι αποτελούν μέρος της φυσικής χλωρίδας του νερού, άλλοι καταλήγουν στο νερό μέσω των φυσικών φαινομένων (βροχές, κατολισθήσεις, κ.τ.λ) και άλλοι μέσω των ανθρώπινων δραστηριοτήτων (απόβλητα, αστικά λύματα κ.τ.λ).

Αν θέλουμε να κατατάξουμε τους μικροοργανισμούς των υδάτινων οικοσυστημάτων σε σχέση με την επίδρασή τους, στους οργανισμούς που ζουν σε αυτά, θα τα χωρίσουμε σε 2 κατηγορίες:

- Στους συμβιωτικούς μικροοργανισμούς που έχουν θετική επίδραση στον μεταβολισμό των ξενιστών. Οι μικροοργανισμοί αυτοί αποικίζουν τους ξενιστές και αποτελούν μέρος της φυσικής χλωρίδας του σώματος στο οποίο απαντώνται.

- Στους παθογόνους μικροοργανισμούς, που αν βρουν οδούς εισόδου και μηχανισμούς εγκατάστασης στο σώμα προκαλούν νόσο.

Σε ορισμένες περιπτώσεις οι παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να εγκατασταθούν στον οργανισμό, χωρίς να προκαλούν νόσο. Απλώς αποτελούν φορείς για μεταδοτική νόσο.

Για να κατανοήσουμε πως επιτυγχάνεται αυτή η αλληλοεξάρτηση, πρέπει να γνωρίζουμε τι είναι αυτό που την δημιουργεί.

## 1.2 Συμβίωση

Τόσο τα χερσαία όσο και τα υδάτινα οικοσυστήματα βρίθουν από συμβιωτικές σχέσεις μεταξύ διαφορετικών οργανισμών. Ο όρος συμβίωση κάνει αναφορά στην αλληλεξάρτηση μεταξύ δύο διαφορετικών ειδών, η οποία μπορεί γενικά να ποικίλει από καταστάσεις ομοσιτισμού, αμοιβαιότητα μέχρι και παρασιτισμού, χωρίς εδώ να συμπεριλαμβάνονται οι σχέσεις θηρευτή-θηράματος ή φυτοφάγου-φυτού, όπου το ένα είδος καταναλώνει το άλλο (Nybakken, 2005).

Όταν μελετάμε συμβιωτικές σχέσεις, έννοιες όπως παρασιτισμός ή ομοσιτισμός δεν αποτελούν μονόδρομους και ίσως δεν εκφράζουν πάγιες αμετάβλητες καταστάσεις. Έτσι, πολλοί επιστήμονες προκειμένου να δώσουν τον όρο συμβίωση καταλήγουν στο παρακάτω: συμβίωση σημαίνει απλά η συνύπαρξη δύο διαφορετικών οργανισμών (Blazejak, 2005).

Συμβίωση είναι μια στενή σχέση ανάμεσα σε δύο οργανισμούς διαφορετικού είδους, από την οποία απορρέει ένα μακροπρόθεσμο πλεονέκτημα επιλογής και για τους δύο εμπλεκόμενους οργανισμούς. Αυτοί οι οργανισμοί ή είναι πολύ κοντά ο ένας στον άλλο, ή ο ένας ζει πάνω στον άλλο και έχουν μια στενή εξάρτηση. Ο ένας από τους δύο οργανισμούς (συνήθως ο μεγαλύτερος) που φιλοξενεί τον άλλο λέγεται ξενιστής και ο άλλος (συνήθως ο μικρότερος) λέγεται συμβιών ή συμβιώτης.

Περιπτώσεις (τύποι) συμβιώσεως αναφέρονται οι ακόλουθοι:

1. Αμοιβαία (Mutualism): είναι η περίπτωση συμβιώσεως κατά την οποία επωφελούνται και οι δύο εμπλεκόμενοι οργανισμοί. (π.χ οι λειχήνες).

2. Μη επιβλαβής παρασιτισμός (Commensalism): ωφελείται ο ένας από τους δύο οργανισμούς. Ωφελείται ο συμβιώτης, ενώ ο ξενιστής ούτε ωφελείται ούτε βλάπτεται. (π.χ ορισμένα είδη στρειδιών κολλάνε στο δέρμα των φαλαινών και έτσι εξασφαλίζουν την διασπορά τους και καλύτερη τροφή).

3. Παρασιτισμός: Είναι η περίπτωση εκείνη της συμβιώσεως, όπου ο ένας οργανισμός (παράσιτο) τρέφεται από το σώμα του άλλου (ξενιστή) και τον ζημιώνει. Τα παράσιτα περνούν ένα μεγάλο μέρος της ζωής τους πάνω ή μέσα στον ξενιστή (π.χ παθογόνοι).

Οι συμβιώτες ζουν μέσα στα κύτταρα του ξενιστή ή ανάμεσα σε αυτά. Σε άλλες περιπτώσεις οι συμβιώτες ζουν σε μέσα σε όργανα του ξενιστή ή σε επιφάνειες τους. Οι συμβιωτικές σχέσεις υπάρχουν παντού και φαίνεται να αποτελούν την πεμπτουσία της Βιολογίας (Dimijian, 2000).

Οι συμβιωτικές σχέσεις θεωρούνται υπεύθυνες και για τη δημιουργία των ευκαρυωτικών κυττάρων. Η θεωρία της ενδοσυμβίωσης της L.Margulis διατυπώθηκε για να εξηγήσει την προκαρυωτική προέλευση των μιτοχονδρίων, ενώ σύμφωνα με την θεωρία αυτή, εξηγείται και η εμφάνιση του πυρήνα που αναφέρει ο Gupta (1998), ότι ήταν αποτέλεσμα συμβιωτικής σχέσης μεταξύ δύο προκαρυωτικών οργανισμών. Μάλιστα έχει ανακαλυφθεί ότι το πρώτο ευκαρυωτικό κύτταρο προέκυψε από τη συμβίωση ενός αναερόβιου αρχαιοβακτήριου και ενός ευβακτήριου (Esteve & Gaju, 1999).

Τελικά ως συμβίωση ορίζεται η συνύπαρξη δύο ή περισσότερων οργανισμών με αποτέλεσμα την αποκόμιση αμοιβαίου οφέλους. Η διαφορά της συμβίωσης από τον παρασιτισμό μπορεί να είναι πολύ λεπτή. Οι συμβιωτικές σχέσεις μπορούν να συνοψιστούν σε ένα μοντέλο τύπου «κόστος-όφελος» όπου το φιλοξενούμενο είδος θα πρέπει να είναι σε θέση να

μετριάζει το βαθμό εκμετάλλευσης του ξενιστή του, εφόσον έτσι μπορεί να παραταθεί η ζωή του ξενιστή του και επομένως και του φιλοξενούμενου (Roughgarden 1975, 1983).

Η συμβίωση προκαρυωτικών οργανισμών με ευκαρυωτικούς είναι ένα ευρέως διαδεδομένο φαινόμενο που έχει έντονη επιρροή στην φυσιολογία, οικολογία και την εξέλιξη των ξενιστών. Αυτή η συμβίωση μπορεί να ποικίλει από σχετικά χαλαρή συνύπαρξη μέχρι πολύ στενές ενδοκυτταρικές αλληλεπιδράσεις (Felbeck & Distel, 2004).

### **1.3 Συμβίωση βακτηρίων με θαλάσσια ασπόνδυλα**

Οι υδρόβιοι μικροοργανισμοί συμμετέχουν στα τροφικά πλέγματα είτε ως ελεύθερα κύτταρα είτε ως συμβιώτες άλλων οργανισμών ή προσκολλημένοι σε νεκρά θρύμματα. Οι συμβιωτικές σχέσεις μπορεί να είναι είτε παθογόνες ή μη παθογόνες για τον ξενιστή, οι δε ξενιστές είτε είναι άλλοι μονοκύτταροι οργανισμοί, είτε θαλάσσια ασπόνδυλα ή σπονδυλόζωα (Hunter-Cevera et al., 2005).

Ένας μεγάλος αριθμός θαλάσσιων ασπονδύλων, συμπεριλαμβανομένων και ειδών κοραλλιών, σπόγγων, μαλακίων, κ.ά., σχετίζονται με συμβιωτικά είδη των βακτηρίων ή αρχαίων (Felbeck & Distel, 2004). Τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να μελετώνται εκτενώς αυτές οι συμβιωτικές σχέσεις.

Η συμβίωση ενός μικροοργανισμού και ενός θαλάσσιου ασπόνδυλου παρέχει στον μικροοργανισμό ενδιαίτημα, θρεπτικά συστατικά για τροφή και ίσως και ένα κατάλληλο περιβάλλον για αναπαραγωγή και διασπορά. Αυτή όμως η συμβίωση προσφέρει και αρκετά ωφέλη και στο θαλάσσιο ασπόνδυλο (Felbeck & Distel, 2004).

Σε μερικές περιπτώσεις, ένα είδος ασπόνδυλου μπορεί να είναι ξενιστής για πολλά, μοναδικά μικροβιακά είδη. Αυτή η διαπίστωση έχει πολλές σημαντικές επιπτώσεις στην μικροβιακή ποικιλομορφία, αν σημειωθεί ότι η ποικιλότητα των θαλάσσιων συμβιωτών είναι ακόμα σε αρχικά στάδια έρευνας και μελέτης.

Η προσφορά των συμβιωτών στον ξενιστή μπορεί να ποικίλη, αλλά κυρίως είναι προσφορά τροφική αλλά και αμυντική. Από την τροφική προσφορά οι συμβιώτες των θαλάσσιων ασπονδύλων χωρίζονται κυρίως σε θειότροφα, μεθυλότροφα και σε κυτταρινολυτικά βακτήρια.

Τα θειότροφα βακτήρια είναι χημειοαυτότροφοι οργανισμοί που έχουν την δυνατότητα να παράγουν οργανική ύλη χρησιμοποιώντας ενέργεια από την οξείδωση ανηγμένων μορίων θείου ( $S^{2-}$ ). Τα μεθυλότροφα βακτήρια χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας ανηγμένες μεθυλικές ομάδες, ενώ τα κυτταρινολυτικά έχουν την δυνατότητα διάσπασης της κυτταρίνης (Felbeck & Distel, 2004).

Βασική προσφορά αυτών των μικροοργανισμών συμβιωτών, είναι η δυνατότητα που δίνουν στον ξενιστή να χρησιμοποιήσει εναλλακτικές πηγές άνθρακα και ενέργειας και σε πολλές περιπτώσεις με την υδρόλυση των συνθετικών οργανικών ενώσεων και την παραγωγή μικροβιακής βιομάζας, μπορεί ο ξενιστής να έχει τις πρωτεΐνες που του χρειάζονται. Η υδρόλυση σύνθετων οργανικών ενώσεων είναι πολύ σημαντική, κυρίως στα θαλάσσια ασπόνδυλα που τρέφονται με σωματίδια οργανικής ύλης.

Στα βενθικά ασπόνδυλα η διαδικασία της πέψης είναι αρκετά σύνθετη και είναι κοινό φαινόμενο η χρήση πολυμερικής τροφής που συγκεντρώνεται σε

διαμερίσματα του πεπτικού συστήματος και στην συνέχεια αποικοδομείται από κοινωνίες μικροοργανισμών (Mayer et al., 2001).

Το αντάλλαγμα για τον συμβιώτη είναι ένα ασφαλές και σταθερό περιβάλλον διαβίωσης. Εκτός από αυτές τις τρεις κατηγορίες υπάρχουν και πολλές άλλες που βοηθούν τον ξενιστή από τροφική άποψη αλλά δεν είναι και τόσο διαδεδομένες (Felbeck & Distel, 2004).

Όσον αναφορά αμυντικούς μηχανισμούς, τα διάφορα συμβιωτικά βακτήρια μπορούν να παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες που είναι τοξικοί για τους πιθανούς θηρευτές και ανταγωνιστές των ξενιστών. Πολλοί συμβιώτες με αξιόλογη παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών έχουν βρεθεί στους σπόγγους οι οποίοι δεν διαθέτουν ανοσοποιητικό σύστημα και για αυτό στηρίζουν την άμυνά τους στην παραγωγή ουσιών από τους συμβιώτες τους. Οι προκαρυωτικοί αυτοί συμβιώτες παράγουν ένα μεγάλο εύρος δευτερογενών μεταβολιτών, όπως σε βρυόζωα και σπόγγους (Kobayashi & Ishibashi 1993; Faulkner, 2000). Σε αυτούς τους δευτερογενείς μεταβολίτες έχει εστιαστεί το ενδιαφέρον της βιοτεχνολογίας για την παραγωγή αντιβιοτικών και αντικαρκινικών φαρμάκων.

Η ποικιλότητα αυτών των οργανισμών και ο ρόλος των συμβιωτικών σχέσεων τους μπορεί να προσδιοριστούν μέσω του τρόπου μεταφοράς τους από τα ασπόνδυλα – ξενιστές. Η μεταφορά του συμβιώτη στον οργανισμό που είναι ο ξενιστής γίνεται με:

- Εξωτερική μεταφορά: Ο συμβιώτης εισέρχεται στον ξενιστή από το εξωτερικό περιβάλλον.
- Κάθετη μεταφορά: Ο συμβιώτης προέρχεται κληρονομικά από τους γονείς.

- Οριζόντια μεταφορά: Ο συμβιώτης μεταβιβάζεται μεταξύ ενηλίκων ατόμων.

#### 1.4. Παραδείγματα συμβιωτικών σχέσεων

Έχει ήδη αρχίσει η γονιδιωματική μελέτη τόσο των οριζοντίως όσο και των καθέτως μεταφερόμενων θαλάσσιων προκαρυωτικών συμβιωτών με στόχο την αποσαφήνιση της ποικιλότητας τους αλλά και του τρόπου απόκτησής τους από τα ασπόνδυλα. Παραδείγματα σχέσεων συμβίωσης μεταξύ βακτηρίων και ευκαρυωτικών οργανισμών έχουν παρατηρηθεί και μάλιστα με έμφαση στα θαλάσσια οικοσυστήματα

Οι πρώτοι χημειοαυτότροφοι προκαρυωτικοί συμβιώτες βρέθηκαν στα θαλάσσια πωγωνοφόρα του είδους *Riftia pachyptila* που ζουν στις υδροθερμικές πηγές της βαθιάς θάλασσας. Η ανακάλυψη της συμβίωσης μεταξύ χημειοαυτότροφων βακτηρίων και θαλάσσιων ασπονδύλων, έγινε από κοινού με την ανακάλυψη των βαθύβιων υδροθερμικών πηγών (Cavanaugh et al, 1981: Felbeck, 1981).

Οι υδροθερμικές πηγές είναι υποβρύχιοι καυτοί πίδακες που εμφανίζονται κοντά στις ζώνες του θαλάσσιου πυθμένα (Jannasch & Mottl, 1985).

Οι περιοχές αυτές σε αντίθεση με τις φαινομενικά αντίξοες συνθήκες που επικρατούν, σφύζουν από Δίθυρα όπως τα *Calyrtogena magnifica*, Πωγωνοφόρα, Γαστερόποδα και Ενδυματοφόρα όπως τα *Riftia pachyptila* (Nybaken, 2005: Felbeck & Distel, 2004). Η μελέτη της *R. pachyptila* στις υδροθερμικές πηγές ξεκίνησε με την έκπληξη που προκάλεσε στους επιστήμονες η ανάπτυξη μιας τόσο μεγάλης βιοκοινωνίας σε ένα τόσο ακραίο και ιδιαίτερο περιβάλλον. Σε αυτά τα περιβάλλοντα τα σωληνοειδή



πωγωνωφόρα συμβιώνουν με χημειοαυτότροφα βακτήρια. Τα συγκεκριμένα βακτήρια είναι θειοαυτότροφα και όπως αναφέρθηκε παραπάνω συνθέτουν οργανικές ενώσεις από ανόργανες πηγές άνθρακα χρησιμοποιώντας την ενέργεια που παράγεται από την οξειδωση του υδρόθειου που είναι άφθονο στις υδροθερμικές πηγές. Με αυτόν τον τρόπο παρέχουν οργανικές ενώσεις, απαραίτητες για την επιβίωση, στα πωγωνοφόρα στις οποίες αλλιώς δε θα είχαν πρόσβαση. Η κυκλοφορία των υδροθερμικών υγρών στη βαθιά θάλασσα παράγει επιπλέουσες υδάτινες μάζες οι οποίες περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις ανηγμένων χημικών ενώσεων (Felbeck & Distel, 2004).

Για παράδειγμα, οι βακτηριακές συναθροίσεις μέσα σε μια τέτοια υδάτινη μάζα στο θαλάσσιο ηφαίστειο Sulgo, στον Ειρηνικό Ωκεανό, αποτελούνται σχεδόν αποκλειστικά από δύο φυλογενετικώς διακριτούς πληθυσμούς οι οποίοι σχετίζονται με θειο-οξειδωτικούς συμβιώτες ασπρονδύλων που ζουν σε θαλάσσιες υδροθερμικές πηγές (Sunamura et al., 2004). Έτσι, το ηφαίστειο αυτό μπορεί να θεωρηθεί ως ένα τεράστιο φυσικό σύστημα συνεχούς καλλιέργειας αυτών των μικροοργανισμών.

Ένας άλλος θαλάσσιος οργανισμός που ζει σε παράκτια ιζήματα είναι ο ολιγόχαιτος *Olavius algarvensis* ο οποίος στερείται στόματος, πεπτικού σωλήνα και ενός τυπικού απεκκριτικού συστήματος (Giere et al., 1979, 1981).

Στην θέση αυτών συμβιώνει με μια στοιβάδα βακτηρίων κάτω από την επιδερμίδα του. Κάποια από αυτά τα βακτήρια είναι θειϊκοαναγωγικά και οξειδώνουν οργανικές ενώσεις απαραίτητες για τη διατροφή του *O. algarvensis*. Από την αναγωγή των θειϊκών παράγεται υδρόθειο το οποίο είναι τοξικό, αποτοξικοποιείται όμως από την δράση άλλων συμβιωτικών βακτηρίων που έχουν τη δυνατότητα να το οξειδώσουν σε θειικά που

επαναχρησιμοποιούνται. Η περίπτωση του *O. algarvensis* είναι ένα παράδειγμα πραγματοποίησης πλήρους κύκλου του θείου μέσα σε έναν οργανισμό που επιτελείται αποκλειστικά από συμβιωτικά βακτήρια (Dubilier et al 1995., Woyke et al 2006). Την διαδικασία της μετατροπής του μοριακού αζώτου σε μορφή εύχρηστη για τους οργανισμούς, την πραγματοποιούν τα ελεύθερα και τα συμβιωτικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια του εδάφους, ενώ στην θάλασσα αντίστοιχα τα κυανοβακτήρια τα οποία συμβιώνουν με την φτέρη *Azolla* (Dimijian, 2000). Συμβιώσεις βασισμένες στην χημειοσύνθεση παρατηρούνται σε επιφανειακά ύδατα με παράδειγμα τα εκτοσυμβιωτικά, θειοξειδωτικά βακτήρια σε νηματώδης σκώληκες που ζουν σε αμμώδεις ακτές (Dimijian, 2000), αλλά και όπου αλλού προσφέρονται ανηγμένες θειϊκές ενώσεις σε συνδυασμό με πηγή οξυγόνου (Felbeck & Distel, 2004).

Σε μερικές περιπτώσεις, η υποχρεωτική συμβίωση με μικροοργανισμούς μπορεί να περιορίσει την ικανότητα ενός ασπόνδυλου να εγκατασταθεί σε νέο περιβάλλον. Μια περίπτωση είναι το βακτήριο *Symbiodinium*, το οποίο έχει περιορισμένα θερμοκρασιακά εύρη επιβίωσης και έτσι περιορίζει και την εξάπλωση και σε άλλα ενδιαίτηματα του ξενιστή του κοραλιού (Felbeck & Distel, 2004).

Οι συμβιώτες συνήθως εντοπίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές στο σώμα του ξενιστή και μάλιστα υπάρχουν και ειδικές δομές για την διατήρησή τους. Η ύπαρξη μικροβιακής χλωρίδας στην γαστρεντερική οδό πρόκειται για μια από τις αρχαιότερες και τις πιο διαδεδομένες συμβιωτικές σχέσεις, οι οποίες προσφέρουν στους ξενιστές θεαματικές εξελικτικές διεξόδους βασισμένες σε διατροφικές εξειδικεύσεις (Dimijian, 2000).

Στο ιδιαίτερο οικοσύστημα της γαστρεντερικής οδού ο ξενιστής παρέχει σταθερό περιβάλλον και τροφή και ο προκαρυώτης τις μεταβολικές του ικανότητες. Έτσι παρατηρείται σύνθεση αμινοξέων και πρωτεϊνών, δημιουργία και διατήρηση γαστρικής βλέννας, προστασία από παθογόνα και αποικοδόμηση μορίων από τους ευκαρυώτες, όπως η κυτταρίνη (Dimijian, 2000).

### **1.5 Προσεγγίσεις και τεχνικές για την αναγνώριση των φυλοτύπων**

Αρχικά τα συμβιωτικά βακτήρια χαρακτηριζόταν μέσω της σχέσης της συνύπαρξης με τον συμβιώτη τους, ενώ σήμερα γίνεται προσπάθεια να προσδιορίζονται και να μελετώνται αυτόνομα. Το πρώτο βήμα για να πετύχει αυτό είναι ο διαχωρισμός του συμβιωτικού κυττάρου από αυτό του ξενιστή, κάτι που προκύπτει είτε από καθαρή καλλιέργεια *in vitro*, είτε με καθαρισμό με μηχανικά μέσα (Felbeck & Distel, 2004). Όπως έχει αποδειχθεί σήμερα η τεχνική των καλλιεργειών με τις δυνατότητες που υπάρχουν είναι μια επίπονη και συχνά ανεπαρκής διαδικασία για την εύρεση ενός μεγάλου ποσοστού των μικροοργανισμών που υπάρχουν σε περιβαλλοντικό δείγμα. Αυτό οφείλεται σε αρκετούς λόγους εκ των οποίων δύο είναι οι βασικότεροι:

- Η μη καταλληλότητα των μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενων συνθηκών καλλιέργειας για κάποιους μικροοργανισμούς, αλλά και η πιθανότητα αυτοί να βρίσκονται στην στατική φάση ανάπτυξης τους και
- Ο μεγάλος αριθμός ακαλλιέργητων μικροοργανισμών που υπάρχει ακόμα και σήμερα εξαιτίας της μεγάλης ιδιαιτερότητας συνθηκών που απαιτούνται για την ανάπτυξη τους (Amann et al ., 1995).

Πιο συγκεκριμένα για την καλλιέργεια των συμβιωτών το πρόβλημα γίνεται εντονότερο, αφού συνήθως υπάρχει ελλιπής γνώση για τις συνθήκες που επικρατούν στους ιστούς που ζουν οι συμβιώτες. Μάλιστα παρατηρείται συχνά το φαινόμενο της εξελικτικής απώλειας γονιδίων που θα επέτρεπαν στους συμβιώτες να αναπτυχθούν μόνοι τους χωρίς την παρουσία των κυττάρων του ξενιστή (Felbeck & Distel, 2004).

Μια αποτελεσματικότερη και ολοκληρωμένη λύση που δόθηκε για την αντιμετώπιση των προβλημάτων από τις καλλιέργειες, είναι η ανάπτυξη της «rRNA προσέγγισης».

Στην προσέγγιση αυτή η ανίχνευση των μικροοργανισμών στηρίζεται στην εύρεση της αλληλουχίας του 16s rRNA γονιδίου τους και τη σύγκριση με τις ίδιες γνωστές αντίστοιχες αλληλουχίες. Το μόριο αυτό είναι εξελικτικά συντηρητικό σε μεγάλα τμήματά του ανάμεσα στις διάφορες ομάδες. Κάποιες περιοχές του όμως δεν είναι ιδιαίτερα συντηρητικές και διαθέτουν την κατάλληλη πληροφορία για αξιόπιστη φυλογενετική ανάλυση.

Εκτός από το 16s rRNA και το 5s αλλά και το 23s rRNA έχουν ανάλογες ιδιότητες, αλλά έχει αποδειχθεί ότι και το 16s rRNA δίνει τα πιο αξιόπιστα αποτελέσματα με πιο εύκολο και σύντομο τρόπο (Olsen et al., 1986).

Η προσέγγιση αυτή αποτελείται από μια σειρά τεχνικών οι οποίες δίνουν η καθεμιά ξεχωριστά ικανοποιητικά αποτελέσματα για την παρουσία συγκεκριμένων ομάδων μικροοργανισμών σε περιβαλλοντικά δείγματα.

Κάποιες τεχνικές δίνουν μόνο ποιοτικά αποτελέσματα, ενώ άλλες μπορούν να δίνουν και ποσοτικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι η πραγματοποίηση μόνο κάποιων βημάτων της rRNA προσέγγισης μπορεί να δώσει

ικανοποιητικά αποτελέσματα, αλλά μόνο με την πραγματοποίηση όλων των βημάτων μπορούμε να έχουμε μία πραγματικά αντιπροσωπευτική εικόνα ποιοτική αλλά και ποσοτική του περιβαλλοντικού δείγματος (Amann et al., 1995).

Παρά τα πλεονεκτήματα της rRNA προσέγγισης, υπάρχουν και κάποια μειονεκτήματα. Ως προς την εύρεση των αλληλουχιών είναι κοινό το πρόβλημα σχηματισμού χιμαιρικών αλληλουχιών κατά την PCR.

Αυτό το πρόβλημα μπορεί να αντιμετωπιστεί με την ανάλυση των αλληλουχιών από ειδικά προγράμματα σε υπολογιστές. Επίσης πρόβλημα αποτελεί και η δυσκολία ανίχνευσης αλληλουχιών που δεν βρίσκονται σε περίσσεια στο δείγμα (Amann et al., 1995).

Στην παρούσα εργασία έγινε συνδυασμός καλλιεργητικής και rRNA προσέγγισης με στόχο την μοριακή ποικιλότητα καλλιεργήσιμων βακτηρίων από έντερο караβίδας φυσικού πληθυσμού.

Το υπό μελέτη είδος ήταν η караβίδα *Nephrops norvegicus*, στην οποία μελετήθηκε και ερευνήθηκε η βακτηριακή μοριακή ποικιλότητα στο πεπτικό της σύστημα. Αφού πρώτα καλλιεργήθηκε μέρος των μικροοργανισμών του εντέρου, στην συνέχεια έγινε η μοριακή αλληλούχισή τους με την προσέγγιση της αλληλούχισης του 16s rRNA γονιδίου τους.

Λαμβάνοντας υπόψη και τα πλεονεκτήματα άλλα και τα μειονεκτήματα και των δύο προσεγγίσεων προχωρήσαμε στον καθορισμό των φυλογενετικών σχέσεων των μικροοργανισμών που απαντήθηκαν.

Στην διαδικασία της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας, στα καλλιεργηθέντα βακτήρια, απομονώθηκε το DNA έγινε χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και ειδικών για βακτήρια εκκινητών και αφού

έγινε ο λεπτομερής έλεγχος και καθαρισμός των προϊόντα της PCR κλωνοποιήθηκαν και έγινε ο προσδιορισμός και αλληλούχηση αρκετών κλώνων οι οποίοι αναλύθηκαν και προέκυψε στην συνέχεια η φυλογενετική τους θέση.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά και βιολογία για το είδος που μελετήθηκε (*Nephrops norvegicus*)

Συστηματική κατάταξη της караβίδας *Nephrops norvegicus*:

Βασίλειο:	Animalia
Φύλο:	Crustacea
Κλάση:	Eumalacostraca
Υφομοταξία:	Eucarida
Τάξη:	Decapoda
Υπόταξη:	Pleocyemata
Οικογένεια:	Nephropidae
Γένος:	Nephrops
Είδος:	<i>Nephrops norvegicus</i>

Το είδος *Nephrops norvegicus* σκάβει τις φωλιές του στον λασπώδη πυθμένα των υφαλοκρηπίδων και ανώτερων πλαγιών του νοτιοδυτικού Ατλαντικού και της Μεσογείου θάλασσας (Farmer, 1975).

Είναι ευρέως διαδεδομένη στον Β.Α Ατλαντικό ωκεανό, βρίσκεται κατά μήκος των ακτών της δυτικής Ευρώπης και φτάνει μέχρι την Μεσόγειο θάλασσα ( Bjornosson & Dombaxe, 2004).

Η караβίδα ή νορβηγικός αστακός *Nephrops norvegicus* (εικόνα 1) είναι ένα είδος μεγάλης εμπορικής και οικονομικής σημασίας.

Χαρακτηριστικό του γνώρισμα είναι η αργή ανάπτυξή του σε συνδυασμό με τον μικρό ρυθμό θνησιμότητάς του (Abello et al., 2002).



**Εικόνα 1.** *Nephrops norvegicus* ([www.habitas.org.uk](http://www.habitas.org.uk))

Το είδος αυτό της караβίδας είναι μακρόβιο, γονοχωριστικό, με κανιβαλικές τάσεις και το συναντάμε σε θάλασσες όπου τα επίπεδα αλατότητας είναι σχετικά μεγάλα (Harris & Ulmestrand, 2004).

Το μέγεθός της είναι γύρω στα 18-20cm αν και μπορεί να φτάσει και μέχρι τα 25 cm. Έχει 5 ζεύγη άκρων, από αυτά τα 3 πρώτα ζεύγη στις άκρες τους έχουν δαγκάνες. Το πρώτο ζεύγος των δαγκάνων είναι αρκετά μεγάλο και μάλιστα έχει επιμήκεις ακανθώδεις κορυφές. Εκτός αυτού έχει και δύο ζεύγη κεραιών, από τα οποία το δεύτερο ζεύγος είναι πιο μακρύ και πιο λεπτό από το άλλο. Οι οφθαλμοί της караβίδας είναι μεγάλοι, μαύρου χρώματος και έχουν την δυνατότητα να μετακινούνται (Farmer, 1975).



Ο εξωσκελετός της караβίδας αποτελείται από περίπου 70% άλατα ασβεστίου, 21% χιτίνη και 9% πρωτεΐνες και το περιεχόμενο σε λίπος είναι 1,3% (Welinder, 1974). Το είδος της караβίδας *Nerhrops norvegicus* το συναντάμε σε πυθμένες που η σύστασή τους αποτελείται από λάσπη, ιλύ ή άμμο και είναι πλούσια σε μαγγάνιο (Mn). Σε τέτοια ενδιαίτηματα σκάβει συνέχεια φωλιές (Rice & Champman, 1971).

Το βάθος αυτών των φωλιών είναι περίπου 20-30cm, το μήκος τους πάνω από ένα μέτρο, ενώ η διάμετρος των κυλίνδρων των φωλιών φτάνει τα 10cm (Hughes, 1998). Οι φωλιές που έχουν βρεθεί ποικίλουν από απλές οπές με ένα άνοιγμα, σε πιο περίπλοκες οπές με περισσότερα του ενός ανοίγματα (Howard, 1989).

Το είδος αυτό περνάει εκτεταμένες περιόδους μέσα στις φωλιές του, από τις οποίες αναδύεται περιοδικά και κάνει τότε ημερήσιες και πότε εποχιακές αυξομειώσεις στις αλιεύσεις του (Charman & Howard, 1979).

Είναι είδος που τρέφεται κυρίως με άλλα καρκινοειδή, με μαλάκια και σε λιγότερα ποσοστά με πολύχαιτους και εχινόδερμα. Επίσης τρέφεται και με διάφορα είδη ασπονδύλων ( Parslow- Willians et al., 2002).

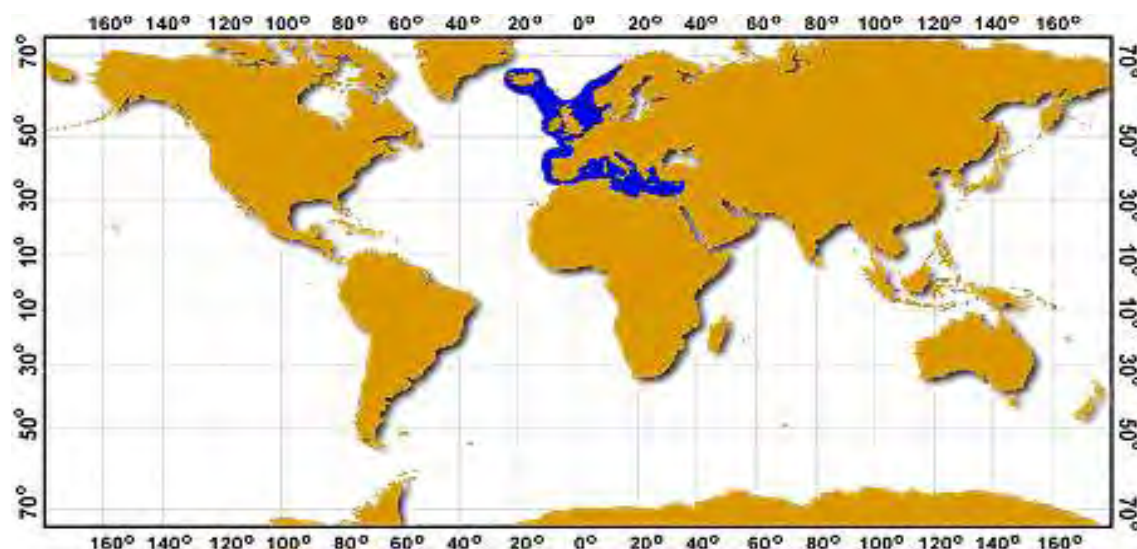
Ο κύριος θηρευτής του αποθέματος της караβίδας που βρίσκεται στα βόρεια του English Channel πιστεύεται ότι είναι ο μπακαλιάρος (*Gadus morhua*) (Bjornsson & Dombaxe, 2004).

Άλλοι σημαντικοί θηρευτές της караβίδας είναι το σαλάχι (*Raja clavata*) (Thomas, 1965) και το σκυλόψαρο (*Scyliorhinus canicula*) (Gordon & De Silva, 1980).

### 2.1.2 Γεωγραφική κατανομή της караβίδας

Η караβίδα είναι είδος που δεν κινείται πολύ, δεν πραγματοποιεί μεγάλες μεταναστεύσεις και χρειάζεται λασπώδη υποστρώματα όπου εκεί μπορεί να σχηματίσει τις φωλιές του (Farmer, 1975).

Βρίσκεται σε ολόκληρη την ηπειρωτική υφαλοκρηπίδα και στο επάνω μέρος της ηπειρωτικής κατωφέρειας του Β.Α. Ατλαντικού και της Μεσογείου (Farmer, 1975: Chapman, 1980).



**Εικόνα 2.** Παγκόσμια γεωγραφική εξάπλωση του είδους *Nephrops norvegicus* (www.oceansatlas.Org)

Η γεωγραφική εξάπλωση του είδους (εικόνα 2) εκτείνεται βόρεια από την Ισλανδία και τη νοτιοδυτική Νορβηγία (νησιά Lofoten), νότια μέχρι τις ακτές Ατλαντικού του Μαρόκου, την δυτική και κεντρική λεκάνη της Μεσογείου, ενώ απουσιάζει από την ανατολική Μεσόγειο δυτικά των 25°E ενώ επίσης, απουσιάζει και από τη Βαλτική, το Βόσπορο και τη Μαύρη Θάλασσα.

Τα βάθη στα οποία συναντάται, εκτείνονται από τα 15 μέχρι και τα 800 μέτρα, ενώ οι πληθυσμοί του βορειοανατολικού Ατλαντικού συναντώνται κυρίως στις περιοχές της υφαλοκρηπίδας. Στη νοτιοδυτική Μεσόγειο έχει αναφερθεί σε βάθη μεταξύ 200 και 800 μέτρων, με μέγιστη αφθονία μεταξύ των 400 και 450 μέτρων. Σε μερικές περιοχές που χαρακτηρίζονται από μεγάλης έκτασης ηπειρωτική υφαλοκρηπίδα, όπως η Αδριατική Θάλασσα, πληθυσμοί της караβίδας βρίσκονται συχνά πολύ ρηχότερα σε σύγκριση με άλλες περιοχές που έχουν γίνει το επίκεντρο πολλών βιολογικών και οικολογικών ερευνών (Abello et al., 1988, 2000: Maynou & Sarda, 1997)

Στην Ελλάδα και συγκεκριμένα στον Παγασητικό κόλπο ο πληθυσμός της караβίδας κατανέμεται μεταξύ 65-95 m, βάθος το οποίο αποτελεί και το ρηχότερο όριο στα ελληνικά νερά για τους πληθυσμούς των караβίδων (Smith & Papadopoulou, 2003).

### **2.1.3 Στάδια ανάπτυξης του είδους *Nephrops norvegicus***

#### **Αυγά**

Η εμβρυική ανάπτυξη, βάσει των ανατομικών κριτηρίων, χωρίζεται σε πέντε στάδια (Fernandez et al., 2005). Κατά την εμβρυική ανάπτυξη παρατηρείται σημαντική μείωση της περιεκτικότητας των λιπιδίων των αυγών τους τελευταίους τρεις μήνες της επώασης. Επιπλέον, τους τελευταίους μήνες της επώασης παρατηρείται και μια σημαντική αύξηση του επιπέδου των νουκλεϊκών οξέων (Fernandez et al., 2005). Εκτός των παραπάνω κατά την διάρκεια επώασης έχουμε αύξηση του όγκου των αυγών, με αύξηση της περιεκτικότητας του σε νερό και μείωση του ξηρού βάρους τους ( Fernandez et al., 2005: Rosa et al., 2003).

## Λάρβες

Οι νεοεκκολαφθείσες λάρβες δεν είναι ικανές να κολυμπήσουν, αλλά μέσα σε λίγα λεπτά από την εκκόλαψή τους, εκδύονται δημιουργώντας έτσι το πρώτο λαρβικό στάδιο (εικόνα 3) ικανό για κολυμβητική δραστηριότητα (Farmer 1974a, Dickey-Collas et al., 2005).



**Εικόνα 3.** Λαρβικό στάδιο του είδους *Nephrops norvegicus* (FRS MARINE LABORATORY, 2006)

Τα στάδια που προκύπτουν είναι τρία λαρβικά στάδια και ένα στάδιο μεταπρονύμφης. Οι λάρβες του είδους είναι σαρκοφάγες και σε περιόδους αυξημένης πυκνότητάς τους, μπορεί ανάμεσά τους να προκύψει κανιβαλισμός (Farmer, 1975). Οι λάρβες τρέφονται με κωπήποδα και λάρβες άλλων δεκάποδων (Farmer, 1975).

Έχει βρεθεί ότι μπορεί να υπάρχει διαφοροποίηση όσον αφορά την χημική σύσταση και τη βιομάζα μεταξύ νεοεκκολαφθέντων λαρβών που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές. Το γεγονός αυτό πιθανώς οφείλεται στις διαφορετικές κλιματικές συνθήκες και στα διαφορετικά πρότυπα αναπαραγωγής ανάμεσα στις περιοχές (Rotlant et al., 2004).

### **Νεαρά άτομα**

Η εκτίμηση της ανάπτυξης στους ιχθύες, γίνεται με τη ανάγνωση των ετήσιων δακτυλίων μόνιμων σκληρών υλικών, όπως οι ωτόλιθοι ή λέπια και έτσι μπορούμε να έχουμε την καταγραφή της ηλικίας του νεαρού ατόμου .

Στην περίπτωση των καρκινοειδών έχουμε δυσκολίες στην εκτίμηση της ηλικίας, γιατί έχουμε απουσία των σκληρών κατασκευών (π.χ ωτόλιθοι). Η ηλικία των караβίδων δεν μπορεί να μετρηθεί διότι αποβάλλουν τον εξωσκελετό τους κατά την έκδυση, με αυτό τον τρόπο χάνονται όλοι οι ιστοί οι οποίοι φέρουν ετήσια σημάδια ανάπτυξης, για αυτό το λόγο για να υπολογιστεί η ηλικία αναλύονται οι ετήσιες συνθέσεις μηκών ή και γίνονται εκτιμήσεις πεδίου των παραμέτρων ανάπτυξης (Hillis, 1987).

Η αύξηση του είδους *Nephrops norvegicus* που μελετάμε, δεν είναι συνεχής και επιτυγχάνεται με την έκδυση του εξωσκελετού του είδους. Αυτή γίνεται σε συγκεκριμένες χρονικές περιόδους και ολοκληρώνεται με την έκδυση και ρίψη του εξωσκελετού και την αντικατάστασή του από άλλον μεγαλύτερο σε μέγεθος (Verdoit et al., 1999).

Παρατήρηση από πειραματικά στάδια, επιβεβαίωσαν το γεγονός ότι τα αρσενικά άτομα είχαν μια μέση ανάπτυξη της τάξεως του 5,7% και τα θηλυκά μια μέση ανάπτυξη της τάξεως του 6,2%, αποτελέσματα που συνέβησαν σε

ενυδρείο και ολοκληρώθηκαν με το πέρας 8 εκδύσεων των ατόμων που μελετήθηκαν (Thomas, 1965). Στο ίδιο πειραματικό μοντέλο αναφέρθηκε αύξηση στο μήκος των αρσενικών ατόμων καθώς αυξανόταν η ηλικία τους, ενώ στα θηλυκά άτομα δεν παρατηρήθηκε κάτι ανάλογο. Επίσης παρατηρήθηκε και μια μέση αύξηση στο μέγεθος του κεφαλοθώρακα της τάξεως του 7,1% (Thomas, 1965).

Σε άλλο πειραματικό μοντέλο είχαμε την παρατήρηση της μείωσης της αύξησης του μεγέθους μετά την έκδυση και για τα δύο φύλα (Gonzalez-Guarran et al., 1987).

Στο φυσικό περιβάλλον διαπιστώθηκε ότι οι αστακοκαραβίδες εκδύονται τουλάχιστον μια φορά το χρόνο και σε πολλές των περιπτώσεων παρατηρήθηκαν και περίοδοι έκδυσης περισσότερες από μία φορά το χρόνο (Bailey & Chapman, 1983).

#### **2.1.4 Αναπαραγωγική περίοδος της *Nephrops norvegicus***

Τα θηλυκά άτομα του είδους έχουν μελετηθεί από πολλούς ερευνητές και μάλιστα σε ολόκληρη την γεωγραφική της κατανομή. Έχουν αναφερθεί μεγάλες αυξομειώσεις στην γονιμότητα, μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών, αλλά παρατηρήθηκαν και αυξομειώσεις και μεταξύ διαφορετικών τμημάτων του ίδιου πληθυσμού (Thomas, 1964: Farmer, 1975: Chapman & Ballantyne, 1980: Bailey et.al., 1986: Smith, 1987).

Η απώλεια των αυγών κατά τη διάρκεια της επώασης είναι ένας σημαντικός παράγοντας της μείωσης της γονιμότητας στην αστακοκαραβίδα (Chapman & Ballantyne, 1980: Morizur, 1981: Smith, 1987).

Ένας συνδυασμός της ανάπτυξης του μεγέθους του είδους κατά την αναπαραγωγική ωριμότητα, τα οποία σχετίζονται άμεσα με περιβαλλοντικούς παράγοντες είναι η αιτία των αυξομειώσεων που παρατηρήθηκαν στην γονιμότητα του (Bailey et al, 1986: Champman and Bailey, 1987: Chapman and Howard, 1988).

Σύμφωνα με άλλους ερευνητές, οι αυξομειώσεις στην γονιμότητα του είδους είναι πιθανότερο να οφείλονται στις διαφορετικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται, καθώς και στην απώλεια των αυγών (Sarda, 1998).

Στην περιοχή της θάλασσας του Clyde, η ωριμότητα εμφανίζεται μεταξύ της ηλικίας των 3-3,5 ετών για τα θηλυκά και μεταξύ της ηλικίας των 4-4,5 ετών για τα αρσενικά άτομα (Tuck et al., 2000).

Παλαιότερες έρευνες είχαν δείξει ότι η ηλικία κατά το ξεκίνημα της αναπαραγωγικής ωρίμανσης είναι μεταξύ των 2,5-3 ετών για τα θηλυκά άτομα της караβίδας (Morizur, 1981: Bailey, 1984).

Η γεωγραφική μεταβλητότητα του μεγέθους κατά το ξεκίνημα της αναπαραγωγικής ωριμότητας μπορεί να σχετίζεται με διαφορές στην ανάπτυξη (Bailey & Chapman, 1983). Η έναρξη της αναπαραγωγικής ωριμότητας περιστασιακά επιβραδύνεται σε χρονιές που χαρακτηρίζονταν από μικρότερους ρυθμούς αύξησης (Morizur, 1981).

Ίσως να υπάρχει ένα ελάχιστο μέγεθος ως όριο για την αναπαραγωγική ωριμότητα, κάτω από το οποίο οι караβίδες είναι πολύ μικρές για να αναπαραχθούν (Tuck et al., 2000). Οι караβίδες έχουν συχνά διαφορετικής μορφής δαγκάνες. Η μια δαγκάνα είναι κοντύτερη “stouter” και πιο χοντροκομμένη με χοντροκομμένα και λιγότερο κοφτερά δόντια “crusher” ενώ

η άλλη δαγκάνα είναι μακρύτερη και λεπτότερη και έχει μόνο λεπτά δόντια “cutter” (Farmer 1974a, 1974b).

Η αναπαραγωγή της караβίδας λαμβάνει χώρα το Σεπτέμβρη ή Οκτώβρη στην περιοχή της θάλασσας του Clyde και οι εκτιμήσεις του μεγέθους κατά το ξεκίνημα της αναπαραγωγικής ωριμότητας, που βασίζονται στην ωρίμανση των ωοθηκών, είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν χρονική μεταβλητότητα σε σχέση με το παραπάνω (Tuck et al., 2000). Η γονιμότητα των θηλυκών ατόμων της караβίδας είναι εξαιρετικά μεταβλητή, ακόμα και μέσα στον ίδιο πληθυσμό (Tuck et al., 2000).

Αλλαγές στην γονιμότητα μπορεί να οφείλονται σε χρονικές διακυμάνσεις της ποσότητας τροφής ή και του ρυθμού ανάπτυξης (Beyers and Goosen, 1987). Οι караβίδες δεν πετυχαίνουν την πλήρη γονιμότητα τους, κυρίως διότι χάνουν πολλά αυγά από τα πλεοπόδια κατά τη χρονική περίοδο από τη γέννηση μέχρι την εκκόλαψη των αυγών (Tuck et al. 2000).

Οι απώλειες αυγών είναι γενικά περισσότερες κατά τη διάρκεια της εκκόλαψης τους (onirposition), κατά την ανάπτυξη του εμβρύου. Επίσης, η αποτυχία των αυγών να προσκολληθούν στα πλεοπόδια ίσως να είναι σημαντική αιτία απώλειας αυγών (Talbot, 1991).

Σε εργαστηριακά πειράματα έχει περιγραφεί ότι η εκκόλαψη λαμβάνει χώρα καθ' όλο το 24ωρο με τις μέγιστες τιμές εκκόλαψης το βράδυ (Briggs et al., 2002), συμπέρασμα το οποίο έρχεται σε αντίθεση με τον Farmer (1974d) που αναφέρει ότι η εκκόλαψη γίνεται μόνο το βράδυ.

Έρευνες στην караβίδα έδειξαν γεωγραφική μεταβλητότητα σε διάφορες βιολογικές παραμέτρους, συμπεριλαμβανομένων της πυκνότητας του



πληθυσμού, των συνθέσεων των μεγεθών και της ανάπτυξης (Bailey and Chapman, 1983: Bailey et al., 1986: Chapman and Bailey, 1987: Chapman and Howard, 1988: Tully and Hills, 1995).

Έχει προταθεί ότι αυτή η μεταβλητότητα των βιολογικών παραμέτρων, μπορεί να σχετίζεται με την ετερογένεια των βενθικών χαρακτηριστικών αλλά και με τις μεταβολές της αλιευτικής προσπάθειας (Chapman and Bailey, 1987: Tully and Hills, 1995: Μαγνου et al., 1996).

Ο ρυθμός της αλίευσής της, επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από περιβαλλοντικές παραμέτρους που επηρεάζουν το πρότυπο της ανάδυσης των αστακοκαραβίδων από τις φωλιές τους (Chapman and Rice, 1971).

Χαρακτηριστικές αλλαγές στη συμπεριφορά των παράκτιων δεκαπόδων κατά την αρχή της αναπαραγωγικής τους ωρίμανσης έχουν συχνά αναφερθεί (Hines et.al., 1995).

### **2.1.5 Αλιεία και εμπορική αξία της караβίδας *Nephrops norvegicus***

Η караβίδα αλιεύεται κυρίως την άνοιξη και το καλοκαίρι. Το 2000 (εικόνα 4) η παγκόσμια παραγωγή από την αλιεία της караβίδας ήταν 50.000 τόνοι. Τα αλιευτικά εργαλεία, τα αλιευτικά σκάφη και οι τεχνικές της αλίευσης της караβίδας, διαφέρουν από χώρα σε χώρα στην περιοχή της Μεσογείου (Sarda, 1998).

Αποτελεί, ένα σημαντικό είδος στόχο της βενθικής αλιείας του Β.Α. Ατλαντικού και το σημαντικότερο αλιευόμενο καρκινοειδές στο Ηνωμένο Βασίλειο (Bergamm et al., 2001).

Το έτος 2002 οι εκφορτώσεις στη Σκωτία έφτασαν τους 21.400 τόνους (Adey et al., 2003). Το είδος αυτό αποτελεί σημαντικό κομμάτι της αλιείας και στην νότια ακτή της Πορτογαλίας.

Στην Ιρλανδία η караβίδα αποτελεί είδος-στόχο μεγάλης σημασίας για την αλιεία, με ετήσιες εκφορτώσεις πάνω από 8000 τόννους (Briggs, 1997).

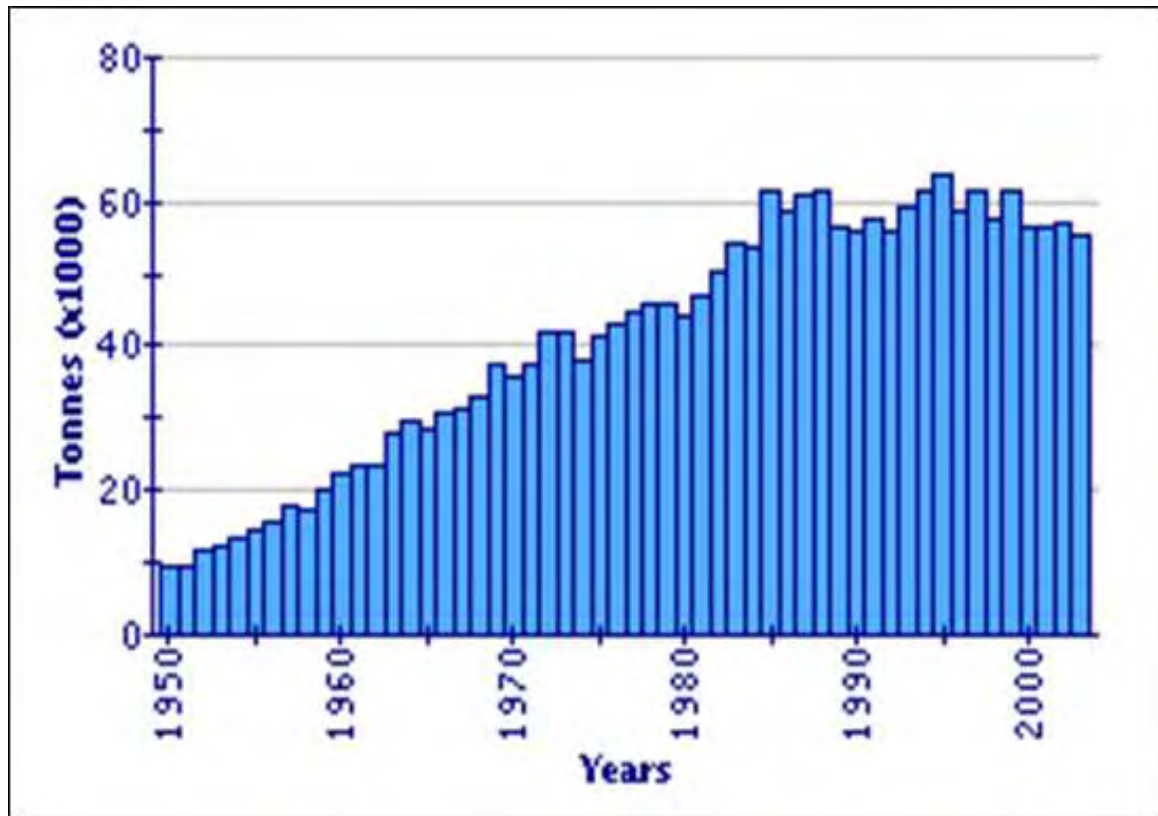
Επίσης και για την Ελλάδα η συγκεκριμένη αλιεία είναι σημαντική, αφού για την περίοδο 1994-2000 οι ελληνικές εκφορτώσεις της караβιδας αποτέλεσαν το 9,7 % των ολικών εκφορτώσεων της Μεσογείου (FAO FISHSTAT data).

Για παράδειγμα το 1997 οι ελληνικές εκφορτώσεις της караβιδας έφτασαν τους 410 τόνους (ETANAL, 1998).

Στην Αδριατική Θάλασσα το είδος της караβιδας αλιεύεται κυρίως με δύο τύπους εργαλείων. Το μεγαλύτερο μέρος του αλιεύματος προέρχεται από τα δίχτυα τράτας του βυθού και το υπόλοιπο με παγίδες.

Η αλιεία της караβιδας παράγει μεγάλες ποσότητες απορρίψεων (Bergamm et al., 2001). Για αυτό το λόγο έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες για την δημιουργία μιας πιο επιλεκτικής αλιείας (Madsen et al., 1999: Campos et al., 2004).

Επίσης έχει πραγματοποιηθεί έρευνα η οποία έδειξε ότι η απελευθέρωση των μη επιθυμητών μεγεθών της караβιδας πίσω στη θάλασσα μπορεί να αποτελέσει σημαντικό διαχειριστικό μέτρο (Castro et al., 2003).



**Εικόνα 4.** Παγκόσμιες αλιεύσεις (τόννοι) караβίδας (www. FAO. org)

Έχουν διεξαχθεί πειράματα για την εξακρίβωση της συμπεριφοράς του είδους αυτού κατά την διάρκεια της αλίευσης με τράτα (Main and Sangster, 1985) που έδειξαν ότι οι караβίδες δύναται να αποφύγουν την αλίευση είτε υποχωρώντας μέσα στις φωλιές τους είτε πραγματοποιώντας γρήγορες κολυμβητικές κινήσεις με τη ουρά τους (tail flick). Στον ελληνικό χώρο για την περίοδο 1996-2000, η караβίδα αλιευόταν σε όλο το Αιγαίο Πέλαγος, στο Κρητικό καθώς και στο Ιόνιο Πέλαγος κυρίως με την χρήση τράτας εκτός από την περιοχή του Κρητικού Πελάγους.

Αναλύσεις δεδομένων που προέρχονται από την εμπορική αλιεία, δείχνουν μια αύξηση στις εκφορτώσεις της περιόδου άνοιξης-θέρους στην

περιοχή της Καταλονίας καταδεικνύοντας ότι η ένταση του φωτός επηρεάζει την αλιεία αυτού του είδους ακόμα και σε πυθμένες κατωφερειών που βρίσκονται σε μεγάλο βάθος όπου η φωτεινότητα είναι αρκετές τάξεις μεγέθους μικρότερη από ότι στις ρηχότερες ηπειρωτικές υφαλοκρηπίδες (Aguzza et al., 2004).

Οι αλιεύσεις της караβίδας μπορούν να θεωρηθούν απευθείας ανάλογες του αριθμού των ατόμων που αναδύονται από τις φωλιές τους σε μια συγκεκριμένη στιγμή της ημέρας (Newland et al., 1992).

Το υπό μελέτη είδος έχει μεγάλη εμπορική αξία και πρακτικά η εξαλίευσή του γίνεται σε όλες τις περιοχές εξάπλωσης του.

## 2.2 Δειγματοληψία και βακτηριακές καλλιέργειες

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε στον Παγασητικό κόλπο (εικόνα 5), στην Μαγνησία, τον Φεβρουάριο του 2007. Συνολικά συλλέχτηκαν πέντε άτομα *N. norvegicus* τα οποία μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο όπου έγινε απομόνωση του πεπτικού σωλήνα χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα εργαλεία.



Εικόνα 5. Παγασητικός κόλπος (χάρτης, [www.greeklandscapes.com](http://www.greeklandscapes.com))

Το κατώτερο μέρος του πεπτικού συστήματος, ξεπλύθηκε με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και στη συνέχεια, έγινε η ομογενοποίηση των δειγμάτων σε αποστειρωμένο θαλασσινό νερό.

Επόμενη διαδικασία ήταν φυγοκέντρηση των δειγμάτων στους 4<sup>0</sup>C, για 3 λεπτά στα x1000g. Μετά την φυγοκέντρηση το υπερκείμενο υγρό αφαιρέθηκε και ένα μέρος του αραιώθηκε 1/10 σε αποστειρωμένο θαλασσινό νερό.

Τα δείγματα στη συνέχεια εμβολιάστηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο Marine Agar 2216 (MA) (Difco, USA). Χρησιμοποιήθηκαν 5 τρύβλια. Σε 3 από αυτά (MA) εμβολιάστηκαν 90 μl από το μη αραιωμένο προϊόν και σε 2 από αυτά (MA 1/10) 90 μl από την 1/10 αραιώση.

Τα τρυβλία στην συνέχεια επώαστηκαν στους 10<sup>0</sup>C για 16-18 ώρες. Μετά το τέλος του χρόνου επώασης η επιφάνεια του τρυβλίου ξεπλύθηκε με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και αφού συλλέχθηκε το δείγμα, έγινε φυγοκέντρηση στους 4<sup>0</sup>C, για 5 λεπτά στα x1000g για να γίνει καθίζηση των κυττάρων. Το υπερκείμενο υγρό αφαιρέθηκε και τα κύτταρα αποξηράνθηκαν και φυλάχθηκαν στους 4<sup>0</sup>C στο ψυγείο μέχρι να γίνει η απομόνωση του DNA.

### **2.3 Απομόνωση γενετικού υλικού (DNA)**

Για την απομόνωση DNA χρησιμοποιήθηκε το Ultra Soil DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Inc, USA) και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή. Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν τα συσσωματώματα των κυττάρων που προέκυψαν από τις καλλιέργειες (παρ.2.2) τα οποία διαλύθηκαν σε PCR νερό. Μετά το τέλος της απομόνωσης το DNA συλλέχθηκε σε αποστειρωμένο σωλήνα και φυλάχθηκε στους -80<sup>0</sup>C μέχρι την συνέχιση της ανάλυσής του.

### **2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και ηλεκτροφόρηση**

Το μίγμα που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση της PCR είχε την παρακάτω αναλογία αντιδραστηρίων που αναφέρονται στον πίνακα 1, για κάθε δείγμα.

**Πίνακας 1.** Αναλογία αντιδραστηρίων στο διάλυμα της PCR.

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Όγκος (μl)</b>
Buffer 5X	10
DNTPs (2mM)	5
Εκκινητής 8f BAC (100 pmol/μl)	0,5
Εκκινητής 907r BAC (100 pmol/μl)	0,5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	3
PCR -νερό	29,8
Taq πολυμεράση (5u/μl)	0,2
Δείγμα DNA	1
Σύνολο	50

Στις PCR που πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών 8fBAC – 907r BAC. Οι αλληλουχίες των συγκεκριμένων εκκινητών είναι:

8fBAC (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')

907rBAC ( 5'-CCC GTC AAT TCC TTT GAG TTT-3')

Ο 8f BAC προσδέεται στην αρχή του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων (συγκεκριμένα στη θέση 8) και ο 907r BAC περίπου στη μέση του γονιδίου.

Το μήκος του προϊόντος της PCR που προκύπτει (περίπου 900 βάσεις) και οι περαιτέρω ανάλυση του δίνουν αρκετές πληροφορίες για την φυλογενετική ανάλυση των δειγμάτων.

Το πρόγραμμα για τις PCR που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρεται παρακάτω:

**Πίνακας 2.** Πρόγραμμα της PCR

Προ-PCR	94 <sup>0</sup> C/1:00	
28 Κύκλοι	94 <sup>0</sup> C/0:45	Αποδιάταξη
	52,5 <sup>0</sup> C/0:45	Ισχυροποίηση
	72 <sup>0</sup> C/2:00	Επιμήκυνση
Τελική επιμήκυνση	72 <sup>0</sup> C/10:00	
Μετά-PCR	10 <sup>0</sup> C/∞	

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% σε διάλυμα TAE 1X σε συνθήκες 67V, 45 λεπτά. Για την χρώση, μετά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr).

Το πρωτόκολλο στην παρούσα διατριβή ολοκληρώθηκε στους 24 κύκλους. Σκοπός του πρωτοκόλλου ήταν να ανιχνεύσουμε με την βοήθεια της ηλεκτροφόρησης την παρουσία του επιθυμητού προϊόντος σε όσο το δυνατόν λιγότερους κύκλους για την αποφυγή δημιουργίας χιμαιρών. Αυτό έγινε με την



διαδικασία βελτιστοποίησης των κύκλων κατά την οποία, το ίδιο πρωτόκολλο επαναλήφθηκε στους 28, 26, 24 και 22 κύκλους.

Με τους λιγότερους κύκλους, έγινε προσπάθεια να μειωθούν τα προβλήματα των μειονεκτημάτων της PCR που αναφέρθηκαν παραπάνω, αλλά και την ενίσχυση των γονιδίων 16S rRNA που μπορεί να απαντώνται σε χαμηλές συχνότητες στο δείγμα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την διαδικασία της PCR έχουμε αρκετούς τεχνικούς περιορισμούς. Μεγάλος αριθμός κύκλων στην διαδικασία της PCR μπορεί να προκαλέσει προβληματική προσκόλληση των εκκινητών (Suzuki & Giannopoli, 1996) και κατά συνέπεια δημιουργία χιμαιρών. Μικρός αριθμός κύκλων μπορεί να μη δώσει ικανοποιητική ποσότητα δείγματος που θα χρειαστεί για τα επόμενα βήματα.

Παρόμοια προβλήματα δημιουργούνται και από εκκινητές με μεγάλες διαφορές στην ενέργεια προσκόλλησης (Polz & Cavanaugh, 1998). Ωστόσο, μερικοί από τους περιορισμούς μπορούν να παρακαμφθούν με κάποιες προσαρμογές του πειραματικού πρωτοκόλλου.

## 2.5 Καθαρισμός

Προκειμένου να έχουμε καθαρό προϊόν PCR απαλλαγμένο από πρόσθετα στοιχεία, αλλά και την αύξηση των πιθανοτήτων της απόδοσης της κλωνοποίησης ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων της PCR.

Ο καθαρισμός του DNA πραγματοποιήθηκε με το kit Montage (Millipore, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Χρησιμοποιήθηκαν 120μl μίξη των προϊόντων της PCR, έτσι ώστε να υπάρχει πιο συμπυκνωμένο προϊόν, από τα δείγματα που πάρθηκαν από τους 24 κύκλους και 280μl νερό-

PCR. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στους 24<sup>o</sup>C στα x1000g για 15 λεπτά. Μετά πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% σε διάλυμα TAE 1X σε συνθήκες 72V, για 20 λεπτά.

## 2.6 Κλωνοποίηση

Για την κλωνοποίηση των γονιδίων που προέκυψαν από την PCR χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του kit TOPO XL PCR cloning της (Invitrogen, USA). Για την πραγματοποίησή της ακολουθήθηκαν πιστά οι οδηγίες του κατασκευαστή.

Χρησιμοποιήθηκαν 4μl από το προϊόν που προέκυψε μετά και τον καθαρισμό, στα οποία έγινε προσθήκη 1μl πλασμίδιο (vector). Ακολούθησε επώαση του μίγματος 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου.

Σε αυτό το στάδιο είναι πολύ σημαντικό, ο χρόνος επώασης να μην ξεπεράσει τα 5 λεπτά, γιατί στο διάστημα αυτό πραγματοποιείται η ενσωμάτωση του γονιδίου στο πλασμίδιο. Η υπέρβαση αυτού του χρονικού ορίου των 5 λεπτών μειώνει την απόδοση της ενσωμάτωσης του.

Στην συνέχεια τερματίστηκε η αντίδραση με την προσθήκη 1μl άλατος (salt). Ακολούθησε μετά την ενσωμάτωση του γονιδίου, ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων του είδους *Escherichia coli*. Χρησιμοποιήθηκαν 2μl από το διάλυμα της ενσωμάτωσης τα οποία προστέθηκαν προσεκτικά σε κύτταρα *E. coli* και στην συνέχεια αφού αναδεύτηκαν προσεκτικά, 60μl από αυτά τοποθετήθηκαν σε ειδική αποστειρωμένη κυψελίδα και υπεβλήθηκαν σε ηλεκτρεκκένωση μέσα σε ειδική συσκευή (electroporator 2510, erpendorf, USA), έτσι στο στάδιο αυτό τα πλασμίδια εισέρχονται στα κύτταρα της *E. coli* με τάση 1800 Volt.

Μετά αφού βγήκε η κυψελίδα από την συσκευή προστέθηκαν 450 μl θρεπτικό υπόστρωμα S.O.C medium το οποίο είναι υγρό θρεπτικό υπόστρωμα και στην συνέχεια μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένο σωλήνα και τοποθετήθηκαν για 1 ώρα στους 37<sup>0</sup>C οριζόντια, για επώαση.

Στο στάδιο αυτό της επώασης γίνεται η προσαρμογή των κυττάρων στις νέες συνθήκες και το σημαντικότερο σε αυτή την φάση τα πλασμίδια που έχουν το γονίδιο να εκφράσουν την ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη, η οποία υπάρχει στην συνέχεια στα τρυβλία που θα γίνει η επίστρωση.

Η επίστρωση μετά έγινε σε τρυβλία με LB agar 25gm/1lt dH<sub>2</sub>O (SIGMA-ALDRICH, Inc, USA) ως θρεπτικό μέσο. Το θρεπτικό μέσο περιείχε καναμυκίνη (50μg/ml) για την ανάπτυξη μόνο των μετασχηματισμένων κύτταρων, αφού τα πλασμίδια περιέχουν ειδικό γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη.

Επίσης στα τρυβλία αναπτύσσονται μόνο κύτταρα που περιέχουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Αυτό συμβαίνει επειδή στην περιοχή του πολυσύνδεσμου βρίσκεται το θνησιγόνο γονίδιο *ccdB* (Bernard et al.,1994) το οποίο δεν λειτουργεί όταν ενσωματώνεται το γονίδιο εξαιτίας αλλαγής στο πλαίσιο ανάγνωσης.

Η μόνη περίπτωση να αντέξει πλασμίδιο στην καναμυκίνη στο οποίο δεν έχει γίνει εισαγωγή, είναι να έχει υποστεί μεταλλαξογένεση που θα το κάνει ανθεκτικό στην καναμυκίνη. Η πιθανότητα να συμβεί αυτό με την χρήση του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου είναι μικρή. Στην διαδικασία επίστρωσης σε τρυβλία στην παρούσα διατριβή έγινε σε τρυβλίο α)50μl, β)90μl και γ)120μl σε ασηπτικές συνθήκες. Στην συνέχεια ακολούθησε επώαση στους 37<sup>0</sup>C για 18 ώρες.

## 2.7 Επεξεργασία και έλεγχος των αποικιών μετά την κλωνοποίηση

Σε αυτό το σημείο, από τα τρυβλία της ανάπτυξης των μετασχηματισμένων κυττάρων *E.coli* έγινε η επιλογή και ο έλεγχος των κλώνων. Οι κλώνοι μεταφέρθηκαν σε αριθμημένα τρυβλία ώστε να μπορέσουν ξανά να αναπτυχθούν και πάλι στους 37<sup>0</sup>C για 18 περίπου ώρες.

Η διαδικασία αυτή έγινε για να απομονωθούν τα πλασμίδια που φέρουν το γονίδιο 16s rRNA , να αναπτυχθούν και να χρησιμοποιηθούν ως εμβόλιο σε υγρές καλλιέργειες.

Από τα αριθμημένα τρυβλία επιλέχθηκαν δείγματα από τους κλώνους και έγινε PCR με το ζεύγος των εκκινήτων :

M13f (5'-GTA AAA CGA CGG CC AG-3')

M13r (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3')

Οι οποίοι είναι ειδικόί μόνο για το συγκεκριμένο πλασμίδιο. Το μίγμα που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση της PCR είχε την παρακάτω αναλογία αντιδραστηρίων που αναφέρονται στον πίνακα 3, για κάθε δείγμα.

**Πίνακας 3.** Αναλογία αντιδραστηρίων στο διάλυμα της PCR.

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
Buffer 5X	4
DNTPs (2mM)	2
Εκκινητής M13f (100 pmol/μl)	0,2
Εκκινητής M13r (100 pmol/μl)	0,2
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,2
PCR -νερό	11,92
Taq πολυμεράση (5u/μl)	0,08
Δείγμα κλώνου	1
Σύνολο	20

Το πρόγραμμα για τις PCR που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρεται παρακάτω:

**Πίνακας4.** Πρόγραμμα PCR μετά την κλωνοποίηση

Προ-PCR	94 <sup>0</sup> C/5:00	
28 Κύκλοι	94 <sup>0</sup> C/0:45	Αποδιάταξη
	52,5 <sup>0</sup> C/0:45	Ισχυροποίηση
	72 <sup>0</sup> C/1:00	Επιμήκυνση
Τελική επιμήκυνση	72 <sup>0</sup> C/10:00	
Μετά-PCR	10 <sup>0</sup> C/∞	

Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% σε διάλυμα TAE 1X σε συνθήκες 72V για 30 λεπτά. Η χρώση πραγματοποιήθηκε μετά την ηλεκτροφόρηση σε βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr).

## 2.8 Υγρές καλλιέργειες

Για τις υγρές καλλιέργειες αρχικά παρασκευάστηκε θρεπτικό μέσο LB Broth (Mebio, Laborotories, Inc, USA) με συγκέντρωση 25gm/1lt dH<sub>2</sub>O. Έγινε αποστείρωση του θρεπτικού μέσου σε αυτόκαυστο. Αφού έπεσε η θερμοκρασία του θρεπτικού υλικού, προστέθηκε καναμυκίνη, στην ίδια συγκέντρωση όπως και στο στερεό θρεπτικό υλικό. Στο αυτόκαυστο αποστειρώθηκαν και οι δοκιμαστικοί σωλήνες των 20 ml περίπου στους οποίους στην συνέχεια διαμοιράστηκαν 8-10ml, θρεπτικό μέσο που ετοιμάστηκε για τις υγρές καλλιέργειες.

Ο κάθε δοκιμαστικός σωλήνας εμβολιάστηκε με τις αποικίες, σε ασηπτικές συνθήκες. Σε κάθε σωλήνα αναγράφεται ο αριθμός της αποικίας από την οποία περιείχε τα κύτταρα. Τα εμβολιασμένα σωληνάκια επωάστηκαν στους 37<sup>0</sup>C για 20 περίπου ώρες σε συσκευή με ελαφριά ανάδευση.

## 2.9 Απομόνωση πλασμιδίου

Για την απομόνωση του πλασμιδίου χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο Plasmid DNA Purification, Nucleospin Plasmid QuickPure kit(MACHEREY-NAGEL, Germany), ώστε να ληφθούν τελικά καθαρά πλασμίδια. Ακολουθήθηκαν πιστά οι οδηγίες του πρωτοκόλλου. Η αρχή της μεθόδου περιλαμβάνει την καθίζηση των βακτηρίων από τις υγρές καλλιέργειες με φυγοκέντρηση και την επαναιώρησή τους με ειδικό διάλυμα. Στην συνέχεια

επιτυγχάνεται η απελευθέρωση του πλασμιδιακού DNA από την *E.coli* με λύση από αλκαλικό διάλυμα SDS. Μετά επιτυγχάνεται η ουδετεροποίηση του pH και η επίτευξη κατάλληλων συνθηκών ώστε το πλασμίδιο DNA να προσδεθεί στη μεμβράνη από το διοξείδιο του πυριτίου που διαθέτουν οι κολώνες του kit. Το υπόλειμμα των κυττάρων απομακρύνεται με φυγοκέντρηση και το υπερκείμενο τοποθετείται στις ειδικά σχεδιασμένες κολώνες του kit. Με απλό πλύσιμο με το ρυθμιστικό διάλυμα AQ του πρωτοκόλλου απομακρύνονται ουσίες που δεν πρέπει να υπάρχουν όπως άλατα, μεταβολίτες, νουκλεάσες και άλλα μακρομοριακά κυτταρικά συστατικά.

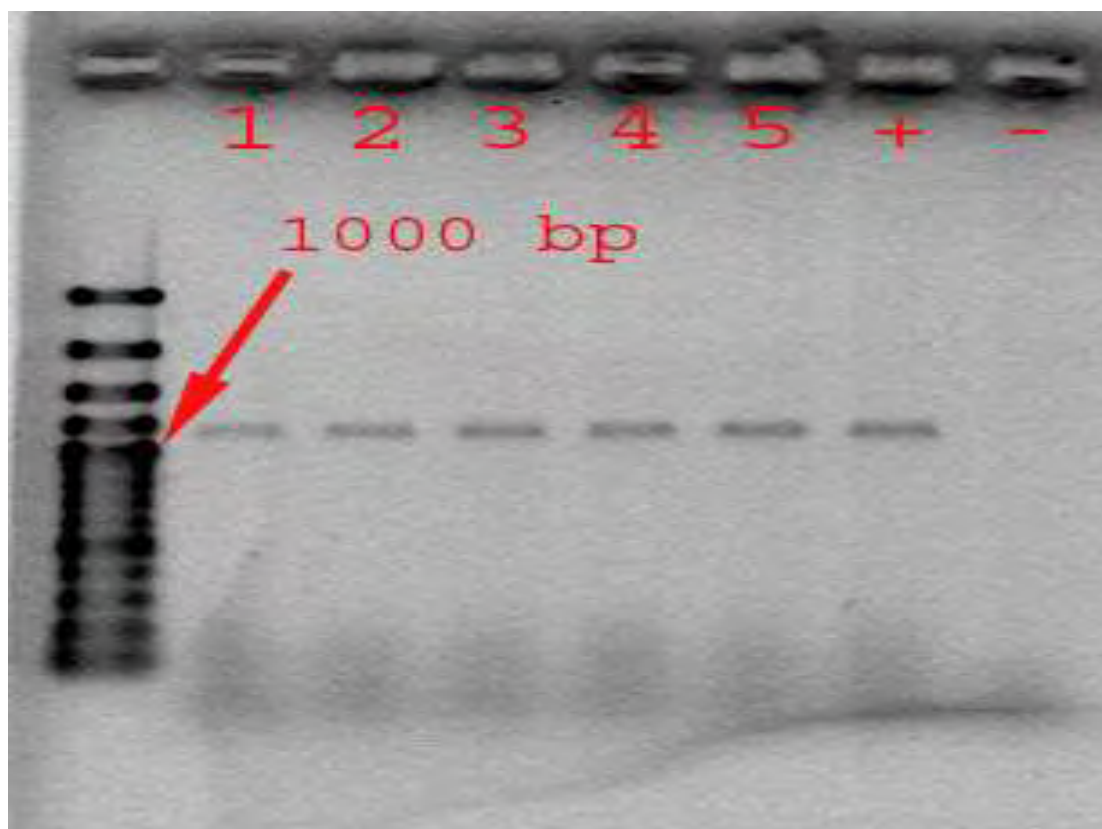
Με το AE (5mM TrisCl, pH 8,5) το ελαφρώς αλκαλικό διάλυμα σε 50μl παραλήφθηκε το καθαρό πλασμιδιακό DNA.

## 2.10 Αλληλούχιση

Η αλληλούχιση των γονιδίων έγινε με ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς αγγείου σε συσκευή αλληλούχισης ABI 3700 (Applied Biosystems Inc., USA) στην εταιρεία Macrogen, (Korea). Για την αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές (M13f, M13r) του πλασμιδίου οι οποίοι βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης εισαγωγής του γονιδίου στο πλασμίδιο. Για κάθε γονίδιο προέκυψαν δύο αλληλουχίες οι οποίες με συγκόλληση και επικάλυψη πάνω από 100 βάσεις έδωσαν την τελική αλληλουχία του γονιδίου που είχε εισαχθεί.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εδώ παρατίθενται τα αποτελέσματα των PCR που έγιναν σε όλη την διάρκεια της παρούσας εργασίας, καθώς και ο πίνακας των αποτελεσμάτων που κατασκευάστηκε μετά την επεξεργασία των αλληλουχιών που προέκυψαν, από την ανάλυση των δειγμάτων. Για την αρχική ανίχνευση βακτηριακού DNA στο δείγμα K10, χρησιμοποιήθηκαν στην PCR ως εκκινητές το ζεύγος 8f BAC και 907r BAC, στους 28 κύκλους.



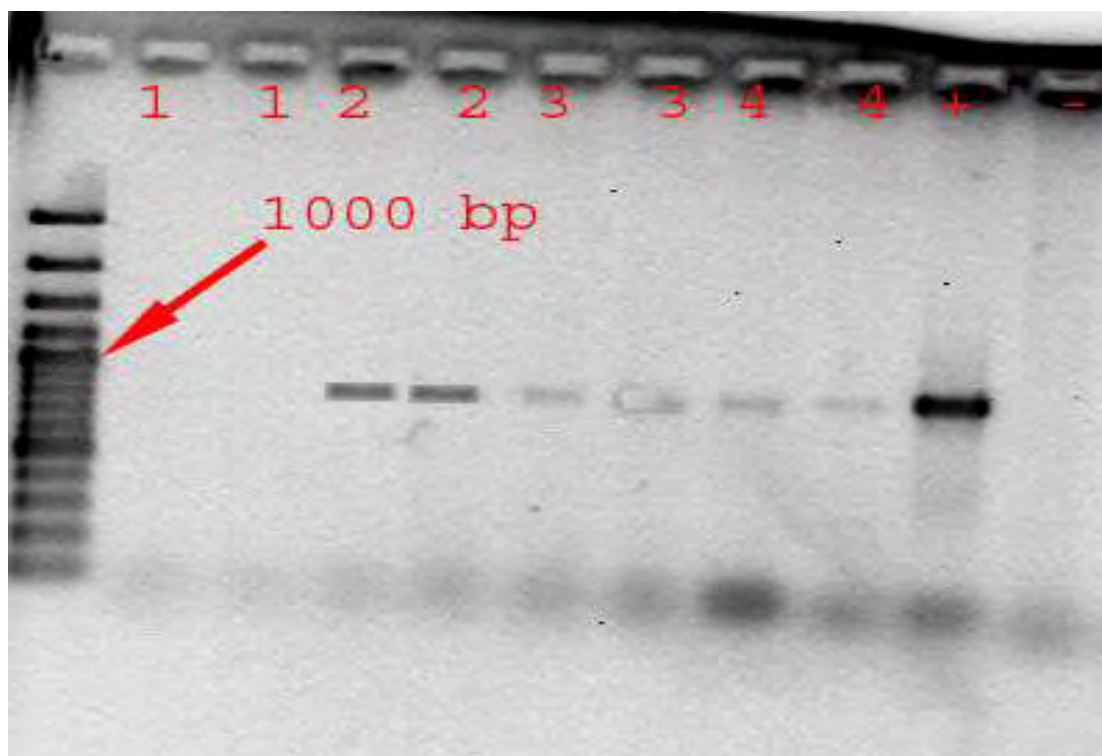
**Εικόνα 6.** Τα αποτελέσματα της PCR, μετά την ηλεκτροφόρηση, σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2% υπό συνθήκες UV, στους 28 κύκλους

Στην εικόνα 6, βρίσκεται στον πρώτο διάδρομο βρίσκεται ο μοριακός δείκτης μεγέθους GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus. Στους επόμενους πέντε



διαδρόμους είναι τοποθετημένα τα δείγματά μας από την απομόνωση του DNA και στους έβδομο και όγδοο διάδρομο αντίστοιχα βρίσκονται τοποθετημένοι, ο μάρτυρας με το (+) DNA από *E.Coli* και ο μάρτυρας με το (-) DNA.

Το συμπέρασμα που προέκυψε ήταν, ότι είχαμε εμφάνιση βακτηριακού DNA σε όλα τα δείγματά μας και μάλιστα σε επαρκή ποσότητα. Επίσης το ότι δεν έδωσε ζώνη το (-) DNA ήταν ένδειξη ότι δεν υπήρξαν μολύνσεις της PCR. Ταυτόχρονα το ότι είχαμε ζώνη στο (+) DNA ήταν δείκτης ότι είχαμε μια επιτυχημένη PCR. Στην παρούσα ερευνητική μας προσπάθεια, στόχος μας ήταν να ανιχνεύσουμε με την βοήθεια της PCR και της ηλεκτροφόρησης την παρουσία του επιθυμητού προϊόντος σε όσο το δυνατόν λιγότερους κύκλους. Γι' αυτό το λόγο με το ίδιο πρωτόκολλο έγινε PCR (εικόνα 7) στους 28,26,24 και 22 κύκλους.



**Εικόνα 7.** Τα αποτελέσματα της PCR, μετά την ηλεκτροφόρηση, σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2%, υπό συνθήκες UV, μετά από την βελτιστοποίηση.

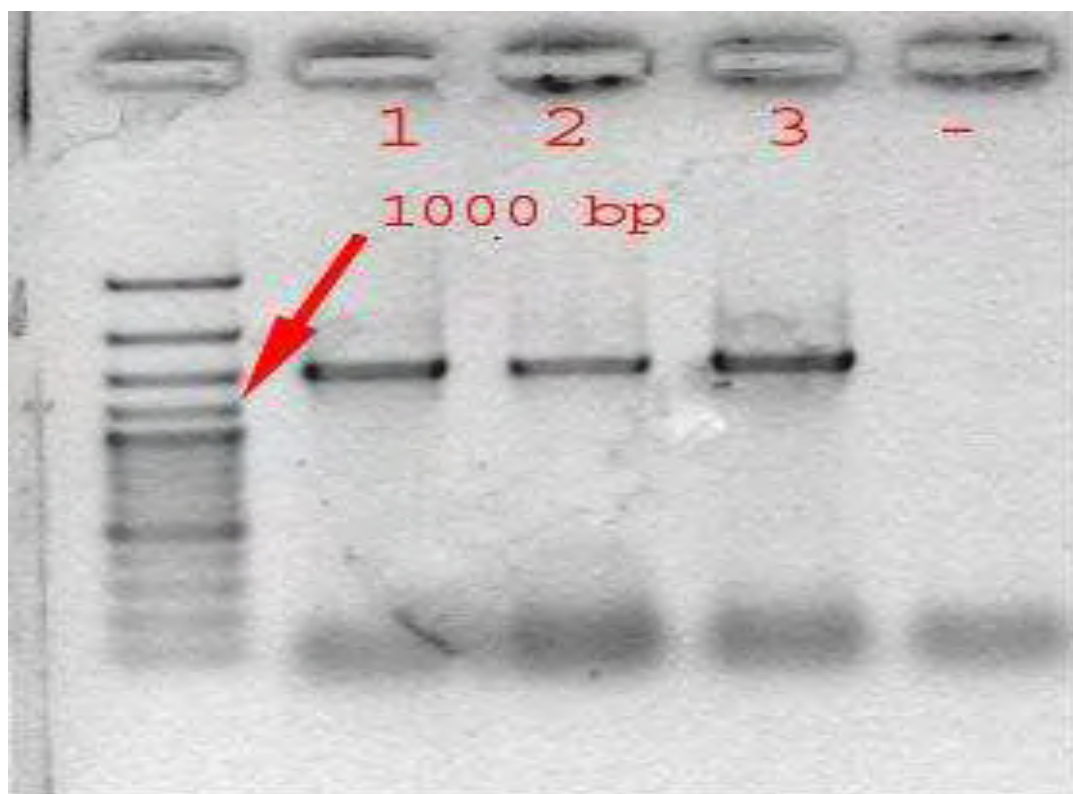
Στην εικόνα 7, στον πρώτο διάδρομο βρίσκεται ο μοριακός δείκτης, στους επόμενους δύο διαδρόμους βρίσκονται τα δείγματα που η PCR ολοκληρώθηκε στους 22 κύκλους, στους επόμενους δύο διαδρόμους βρίσκονται τα δείγματα που ολοκληρώθηκε η PCR στους 24 κύκλους, στα άλλα δύο στους 26 κύκλους ενώ στα επόμενους δύο διαδρόμους η ολοκλήρωση της διαδικασίας έγινε στους 28 κύκλους. Στους δύο τελευταίους διαδρόμους αντίστοιχα είναι οι μάρτυρες με το (+) και το (-) DNA που προέκυψαν από την ολοκλήρωση της διαδικασίας της PCR στους 28 κύκλους.

Το συμπέρασμα που προέκυψε από την διαδικασία βελτιστοποίησης κύκλων από 28 σε 22 είναι ότι είχαμε βακτηριακό DNA στους 28,26 και 24 κύκλους, ενώ στους 22 κύκλους δεν είχαμε εντοπισμό βακτηριακού DNA και στα δύο δείγματα που χρησιμοποιήσαμε. Πιθανόν να μην ήταν επαρκής η ποσότητα του, ώστε να εντοπιστεί από αυτή την PCR στους 22 κύκλους.

Μάλιστα τις καλύτερες ζώνες της είχαμε στα δύο δείγματα που η ολοκλήρωση της PCR έγινε στους 24 κύκλους. Το ότι ο (+) μάρτυρας έδωσε ζώνη και ο (-) δεν έδωσε ζώνη ήταν δείκτες επιτυχίας της PCR. Το ζεύγος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο 8f BAC – 907r BAC.

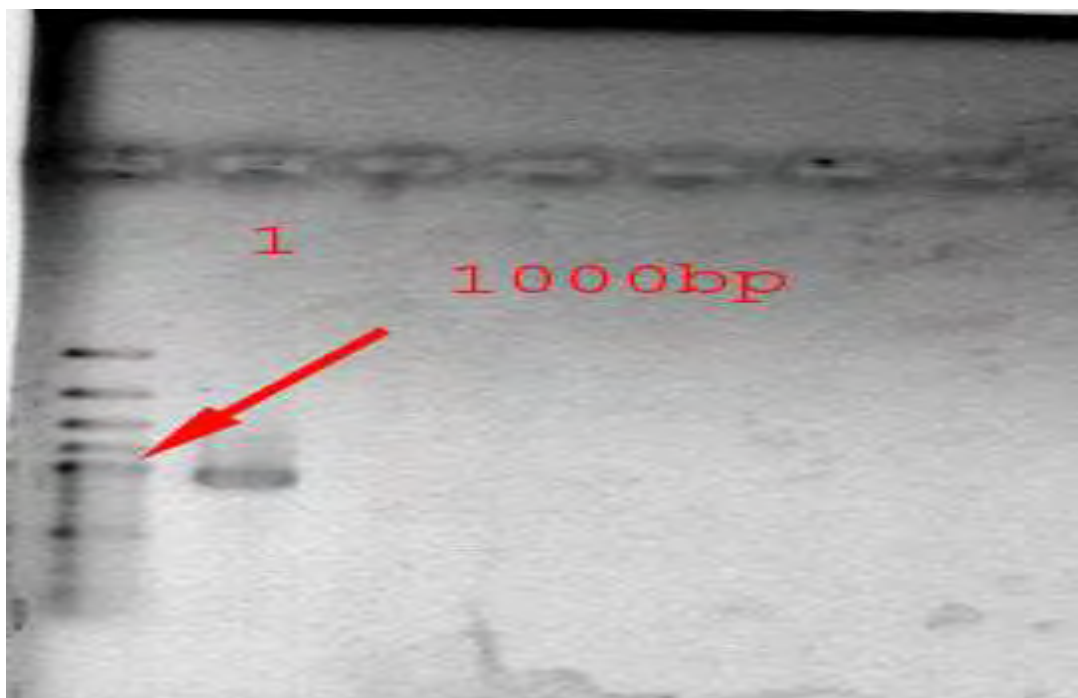
Από όλα τα στοιχεία που προέκυψαν ήταν εμφανές ότι η PCR που χρησιμοποιήθηκε για να την διαδικασία της κλωνοποίησης ήταν το συγκεκριμένο πρωτόκολλο που αναφέρεται και στην μεθοδολογία στους 24 κύκλους και με αυτό το ζεύγος εκκινητών (8f BAC – 907r BAC ).

Έτσι στην συνέχεια ετοιμάστηκε καινούργια PCR με φρέσκα δείγματα (εικόνα 8) και ακολούθησε η κλωνοποίηση.



**Εικόνα 8.** Τα αποτελέσματα της PCR, μετά την ηλεκτροφόρηση, σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2%, υπό συνθήκες UV, που χρησιμοποιήθηκε στην κλωνοποίηση.

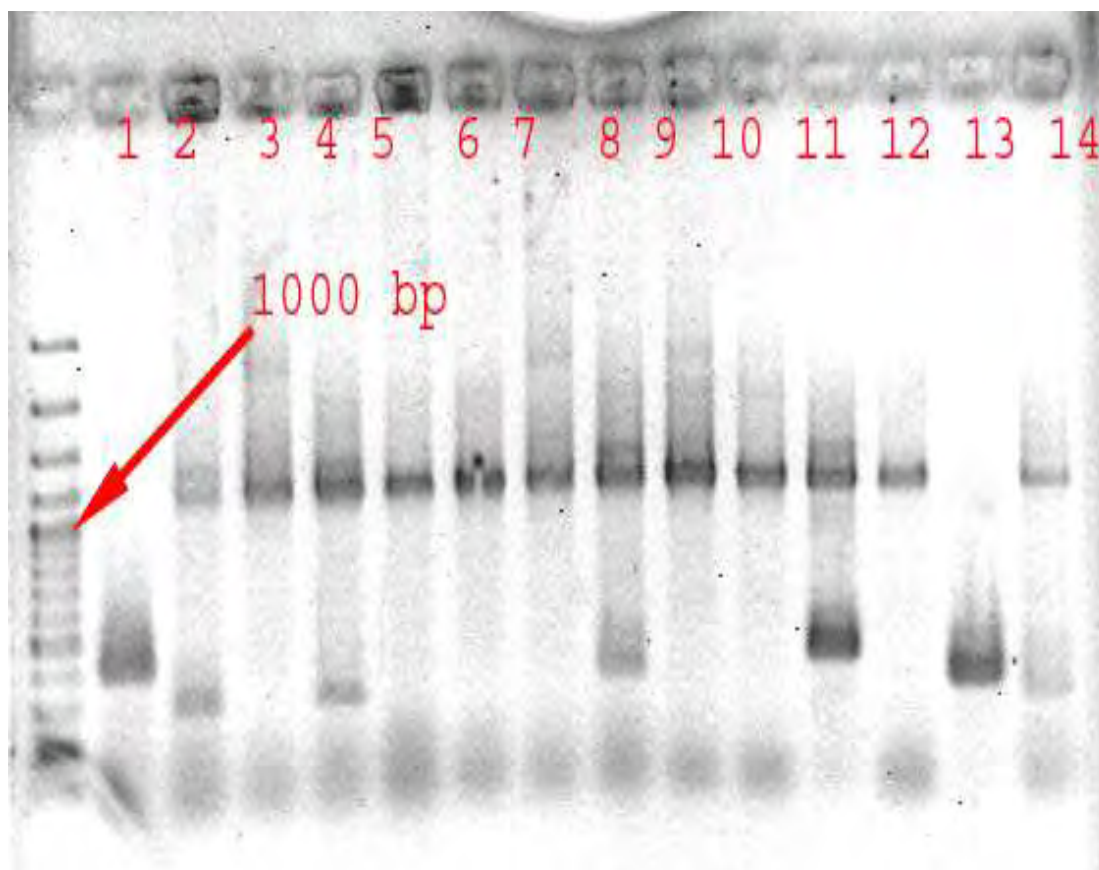
Στην εικόνα 8, στον πρώτο διάδρομο βρίσκεται ο μοριακός δείκτης, στους επόμενους τρεις διαδρόμους βρίσκονται τα δείγματα από την απομόνωση του DNA. Στον πέμπτο διάδρομο είναι ο (-) μάρτυρας ο οποίος δεν έχει δώσει ζώνη και άρα είναι δείκτης πετυχημένης PCR. Συμπερασματικά από τα παραπάνω υπήρξε PCR επιτυχής με φρέσκο προϊόν και ακολούθησε ο καθαρισμός πριν την κλωνοποίηση.



**Εικόνα 9.** Τα αποτελέσματα του καθαρισμού μετά την ηλεκτροφόρηση υπό συνθήκες UV.

Στην εικόνα 9, στον πρώτο διάδρομο είναι ο μοριακός δείκτης, ενώ στον δεύτερο διάδρομο είναι συμπυκνωμένα τα προϊόντα της PCR μετά την διαδικασία του καθαρισμού.

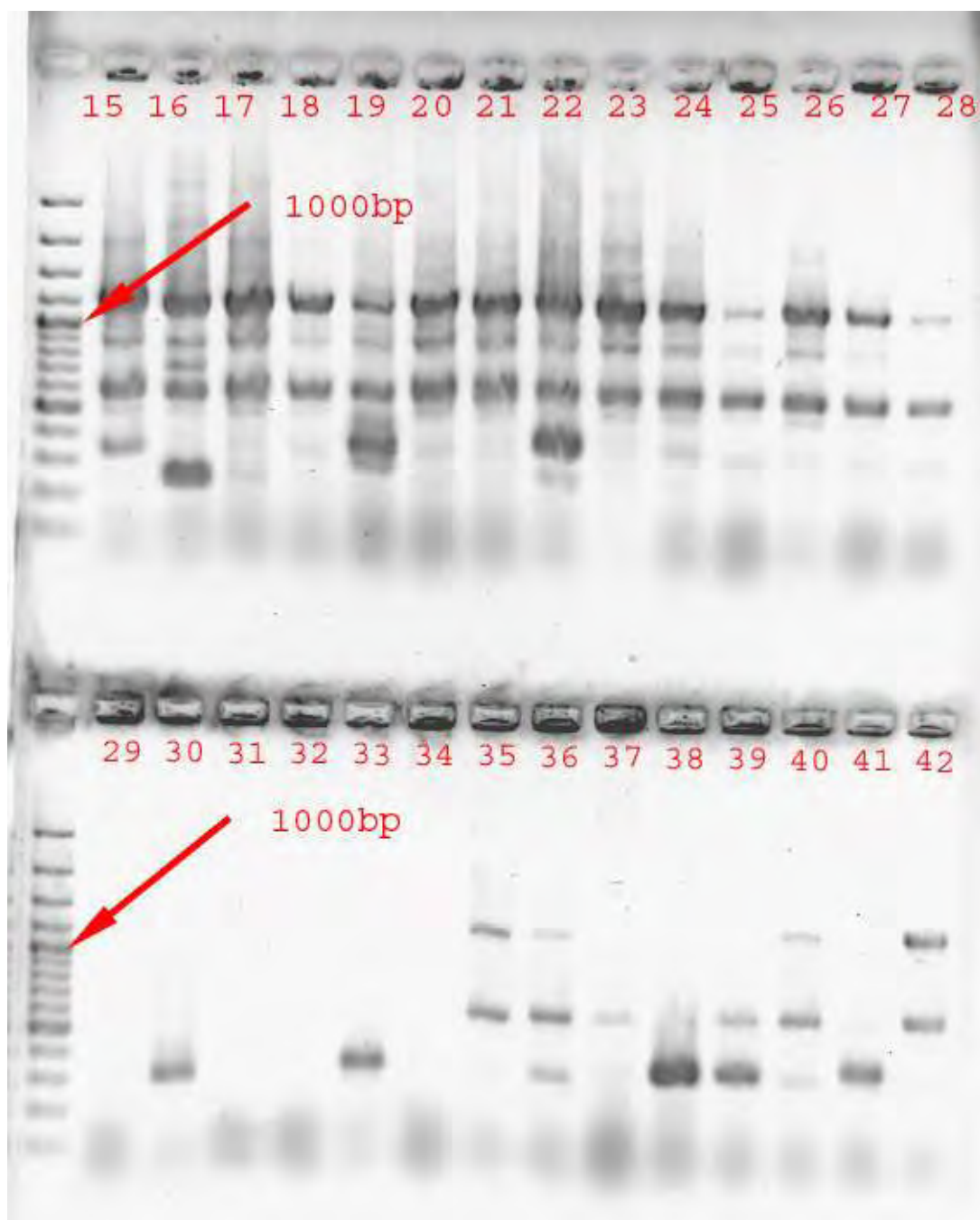
Συμπερασματικά υπήρξε αρκετό και καθαρό προϊόν και έτσι ακολούθησε η κλωνοποίηση, η διαδικασία της οποίας αναφέρεται στο κεφάλαιο της μεθοδολογίας. Αφού επωάστηκαν τα τρυβλία, έγιναν καινούργιες PCR για να γίνει ο έλεγχος των αποικιών των κλώνων. Γι' αυτές τις PCR χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των εκκινήτων M13f- M13r οι οποίοι είναι ειδικοί για την σωστή ενσωμάτωση του γονιδίου (εικόνες 10 και 11).



**Εικόνα10.** Αποτελέσματα PCR μετά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα Αγαρόζης 1,2%, υπό συνθήκες UV. Στον πρώτο διάδρομο είναι ο μοριακό δείκτης και στους άλλους 14 δείγματα από τους κλώνους που ήταν για έλεγχο.

Το συμπέρασμα που προέκυψε από τις εικόνες 10 και 11 οι οποίες ήταν και οι πιο αντιπροσωπευτικές, ήταν ότι οι κλώνοι που ενσωμάτωσαν σωστά το γονίδιο είναι αυτοί που εμφανίζουν φωτεινή ζώνη λίγο πάνω από τις 1000 bp.

Αφού έγινε και η ίδια διαδικασία και σε άλλους κλώνους επιλέχθηκαν οι πιο αντιπροσωπευτικοί, όπου και ακολούθησε η ανάπτυξή τους σε υγρές καλλιέργειες.



**Εικόνα 11.** Αποτελέσματα PCR μετά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2%, υπό συνθήκες UV. Στον πρώτο διάδρομο είναι ο μοριακός δείκτης και στους άλλους 28 ακόμα δείγματα από τους κλώνους που ήταν για έλεγχο.

Όταν έγινε η αναγνώριση των αλληλουχιών οι φυλότυποι των βακτηρίων που προέκυψαν ταξινομήθηκαν σε ένα συγκεντρωτικό πίνακα. Ο πίνακας 5 προέκυψε μετά την σύγκριση των αλληλουχιών για κάθε γονίδιο, με ήδη γνωστές αλληλουχίες της GENBANK με την χρήση του προγράμματος BLAST.

Αυτή η μέθοδος και το πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκαν για να βρεθούν οι πλησιέστεροι συγγενείς με βάση την πρωτοταγή δομή των γονιδίων.

Συγκεντρωτικά σε όλα τα δείγματα που ερευνήσαμε απαντήθηκαν οι παρακάτω ταξινομικές ομάδες ( πίνακας 5).

**Πίνακας 5.** Απεικόνιση των ταξινομικών ομάδων που παρατηρήθηκαν μετά την χρήση του προγράμματος BLAST.

Κλώνος	Αφθονία %κλώνων	Ταξινομική ομάδα	Πλησιέστερος συγγενής	Περιγραφή/ Ενδιαίτημα	Πλησιέστερος καλλιεργη- μένος συγγενής
AT1	93,8%	γ- Proteobacteria	Ακαλλιέργητο Θαλάσσιο βακτήριο, κλώνος A33 (99.57%) [EU010130]	Θαλάσσιο βακτηριο- πλαγτόν και θαλάσσια ζώα	<i>Vibrio splendidus</i> Στέλεχος 630 (99,57%) [AY620974]
AT9	3%	γ- Proteobacteria	<i>Vibrio</i> sp. V004 (99.68%) [DQ146970]	Θαλάσσια ζώα	<i>Vibrio splendidus</i> Στέλεχος 03/012 (99,14%) [AJ874367]
AT6	1,6%	γ- Proteobacteria	<i>Vibrio logei</i> Στέλεχος SR181 (97.30%) [AY292934]	-	-
AT25	1,6%	γ- Proteobacteria	Ακαλλιέργητο Θαλάσσιο βακτήριο, κλώνος A33 (95,14%) [EU010130]	Θαλάσσιο βακτηριο- πλαγτόν και θαλάσσια ζώα	<i>Vibrio splendidus</i> Στέλεχος 630 (95,14%) [AY620972]



#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η καλλιεργήσιμη βακτηριακή ποικιλότητα στο πεπτικό σύστημα της караβίδας *Nephrops norvegicus*. Όπως ήδη φαίνεται και από τον πίνακα 5, όλοι οι συγγενείς φυλότυποι είναι αντιπρόσωποι του υποφύλου των γ- Proteobacteria και της οικογένειας *Vibrionaceae*. Από την εύρεση των συγγενών φυλοτύπων και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά τους έγινε προσπάθεια να βρεθούν οι πιθανές αλληλεπιδράσεις αυτών των μικροβιακών κοινοτήτων με την караβίδα.

Πρέπει να επισημανθεί ότι τα αποτελέσματα αυτά προέκυψαν, μόνο από τη μελέτη των καλλιεργήσιμων μικροοργανισμών που μεγάλωσαν σε Marine Agar. Αυτοί οι μικροοργανισμοί πιθανότατα να αποτελούν ένα πολύ μικρό ποσοστό της συνολικής ποικιλότητας του δείγματος (Amann et al., 1995).

Θεωρούμε ότι ένας φυλότυπος ανήκει στο ίδιο είδος με κάποιον άλλο, όταν το ποσοστό της ομοιότητας των αλληλουχιών τους είναι πάνω από 97% και ανήκουν στο ίδιο γένος όταν το ποσοστό ομοιότητας ξεπερνά το 90% (Stackenbrandt & Goebel, 1994). Εάν η ομολογία των αλληλουχιών των 16s rRNA γονιδίων μεταξύ δύο στελεχών είναι μικρότερη του 97% μπορούν να θεωρηθούν ως διαφορετικά είδη, βάσει του ορισμού του βακτηριακού είδους από την επανένωση των αλυσίδων DNA/DNA (Stackenbrandt & Goebel, 1994).

Ο φυλότυπος του βακτηριακού κλώνου AT1 ήταν αυτός που επικράτησε σε αφθονία 60 κλώνων (93,8%). Ο συγκεκριμένος φυλότυπος είχε ομοιότητα 99,57% με το ακαλλιέργητο θαλάσσιο βακτηριακό φυλότυπο A33 (Genbank No EU010130) που έχει προέλθει από το θαλάσσιο βακτηριοπλαγκτόν. Επίσης είχε και το ίδιο ποσοστό ομοιότητας 99,57% με το καλλιεργημένο

βακτήριο *Vibrio splendidus* (Genbank No AY620974). Εφόσον το ποσοστό ομοιότητας είναι μεγαλύτερο του 97% ο κλώνος AT1 είναι πιθανό να προέρχεται από στέλεχος που ανήκει στο είδος *Vibrio splendidus*. Άλλοι συγγενείς φυλότυποι του κλώνου AT1 έχουν απομονωθεί από θαλάσσια ασπόνδυλα, κυρίως δίθυρα. Οι μελέτες αυτές είναι αδημοσίευτες και αναφέρονται στην Genbank μόνο, οπότε δεν διαθέτουμε περισσότερα στοιχεία για το ρόλο των βακτηρίων και την αλληλεπίδραση τους με τα ζώα.

Ο φυλότυπος του βακτηριακού κλώνου AT9 απαντήθηκε σε αφθονία δύο κλώνων (3%) και η ομοιότητά του είχε ποσοστό 99,68% με το *Vibrio* sp. V004 (Genbank No DQ146970), που έχει εντοπιστεί σε υδρόβια ζώα, ενώ το ποσοστό ομοιότητάς του με το καλλιεργημένο βακτήριο *Vibrio splendidus* (Στέλεχος 03/012) είναι 99,14%. Το *V.splendidus* 03/012 έχει απομονωθεί από το δίθυρο *Crassostrea gigas* (Garnier et al., 2007).

Ο φυλότυπος του βακτηριακού κλώνου AT6 απαντήθηκε μία φορά (1,3%) και το ποσοστό ομοιότητας του με το καλλιεργημένο βακτήριο *Vibrio logei* είναι 97,30%.

Τέλος ο φυλότυπος του βακτηριακού κλώνου AT25 απαντήθηκε μία φορά (1,35). Το ποσοστό ομοιότητας του συγκεκριμένου φυλότυπου είναι 95,14% με τον βακτηριακό κλώνο A33 που απαντάται στο θαλάσσιο βακτηριοπλαγκτόν και το ποσοστό ομοιότητας με το καλλιεργημένο βακτήριο *Vibrio splendidus* είναι και αυτό 95,14%.

Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι πιθανότατα και οι 64 βακτηριακοί κλώνοι που διερευνήθηκαν ανήκουν όλοι στο γένος *Vibrio* της οικογένειας *Vibrionaceae*, των  $\gamma$ - Proteobacteria. Οι φυλότυποι αυτοί αν και συγγενικοί με το *V. splendidus* δεν είναι πανομοιότυποι αφού τα ποσοστά

ομοιότητας είναι διαφορετικά για το καθένα. Τα περιβάλλοντα που έχουν συναντηθεί οι κοντινότεροι συγγενείς των φυλοτύπων μας, είναι τα υδρόβια ζώα και το θαλάσσιο βακτηριοπλαγκτόν.

Αυτό όμως δεν μπορεί να επιβεβαιώσει ότι οι συγκεκριμένοι φυλότυποι αποτελούν συμβιώτες της караβίδας, αφού μπορεί και να αποτελούν απλώς μέρος της διατροφής της. Η ολική επικράτηση πάντως των *Vibrionaceae* στους καλλιεργούμενους μικροοργανισμούς δείχνει πιθανή έντονη παρουσία των συγκεκριμένων μικροοργανισμών στο πεπτικό σύστημα της караβίδας.

Σκοπός μας είναι, από τις ιδιότητες αυτών των φυλοτύπων αλλά και από τα στοιχεία που υπάρχουν μέχρι τώρα για την οικολογία τους να διακρίνουμε τους φυλότυπους των συμβιωτικών μικροοργανισμών από τους φυλότυπους των μικροοργανισμών που αποτελούν μέρος της τροφής.

Το γένος *Vibrio* το συναντάμε σε μεγάλη αφθονία στα υδάτινα οικοσυστήματα με σημαντικό και κυρίαρχο ρόλο στον κύκλο των θρεπτικών. Υπάρχουν στις εκβολές των ποταμών, στα παράκτια νερά και τα ιζήματα και συμβιώνουν ή επιβιώνουν με θαλάσσιους οργανισμούς όπως τα κοράλια, τα μαλάκια, τα φύκη, οι σπόγγοι, οι γαρίδες και το ζωοπλαγκτόν (Thompson et al., 2004 : Farmer , 2004).

Υπάρχουν ενδείξεις ότι αντιπρόσωποι του γένους *Vibrio* παίζουν σημαντικό ρόλο στον κύκλο των θρεπτικών στα υδάτινα οικοσυστήματα κυρίως με τη χρησιμοποίηση διαλυμένου οργανικού υλικού (Dissolved Organic Matter DOM) (Sherr and Sherr, 2000, 2002). Επίσης παρέχουν βασικά πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που πολλοί θαλάσσιοι οργανισμοί δεν μπορούν να παράγουν από μόνοι τους (Thompson et al., 2004).

Έχει προταθεί ότι η μικροβιακή δραστηριότητα στο πεπτικό σύστημα και κυρίως τα προϊόντα των ζυμώσεων, όπως η παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων αλλά και μικροβιακής πρωτεΐνης είναι πολύ σημαντικά για την διατροφή των αχινών (Meziti et al., 2007).

Έχουν ακόμη την ικανότητα να διασπούν την χιτίνη η οποία αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες πηγές αμινοσακχάρων στον ωκεανό (Thompson et al., 2004). Άλλα είδη *Vibrio* μπορούν να διασπούν αρωματικούς υδρογονάνθρακες των μολυσμένων οικοσυστημάτων και εδώ πρέπει να αναφερθεί και η σημασία κάποιων από αυτά για την χρησιμοποίησή τους σαν παραγωγοί αντιβιοτικών (Thompson et al., 2004).

Έχοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα για τον μεταβολισμό του γένους *Vibrio*, η παρουσία συμβιωτών στο πεπτικό σύστημα της караβίδας *Nephrops norvegicus*, είναι πιθανό να βοηθάει στην διάσπαση σύνθετων οργανικών μορίων της τροφής της και ταυτόχρονα να μπορεί να της προσφέρει και επιπλέον θρεπτικά, όπως τα αμινοσάκχαρα που μόνο του το ζώο δεν μπορεί να συνθέσει. Επίσης η πιθανή διάσπαση της χιτίνης από αντιπροσώπους του γένους *Vibrio* θα μπορούσε να αποδειχτεί ιδιαίτερα ωφέλιμη για την караβίδα που τρέφεται με οργανισμούς καλυμμένους από χιτίνη (π.χ. άλλα καρκινοειδή).

Εδώ αξίζει να τονισθεί ότι η παρουσία του είδους *Vibrio* μέσα στο πεπτικό σύστημα της караβίδας μπορεί να δικαιολογηθεί εν μέρει και ως τροφή. Ένα παράδειγμα που αξίζει να αναφερθεί είναι ότι το είδος *Vibrio* δημιουργεί βιοϋμένια (biofilms) στην επιφάνεια καρκινοειδών και άλλων ζώων του ζωοπλαγκτού, με μια αμοιβαία εξάρτηση προσφοράς και αποκόμισης οφελών (Thompson et al., 2004). Με την κατανάλωση του ζωοπλαγκτού από

την καραβίδα τα συμβιωτικά βακτήρια εισέρχονται στο δικό της πεπτικό σύστημα.

Όσο για το ενδεχόμενο της παθογένειας μάλλον πρόκειται για μη επιζήμια συμβίωση, αφού προκύπτει ότι το γένος *Vibrio* είναι μάλλον περιστασιακά παθογόνο, καθώς έρευνες έδειξαν αμοιβαίες σχέσεις ή τουλάχιστον μη επιζήμιες με γαρίδες (Thompson et al., 2004).

Σε έρευνες που διεξήχθησαν, κατά τις οποίες ερευνήθηκαν υγιείς γαρίδες στο φυσικό τους περιβάλλον αλλά και σε καλλιέργειες, βρέθηκε πληθώρα από το γένος *Vibrio* στο πεπτικό τους σύστημα και επιπλέον προέκυψε ότι οι γαρίδες μπορούν να επηρεάσουν ή ακόμα και να επιλέξουν την σύσταση της εντερικής χλωρίδας (Oxley et al., 2002).

Σε ημι-εντατικές καλλιέργειες με γαρίδες, σε μονάδα υδατοκαλλιεργειών στην Ινδία, μετά από την διεξαγωγή πειράματος υπήρξε η απομόνωση φωτοβόλων βακτηρίων του γένους *Vibrio* από τις λαρβικές δεξαμενές εκτροφής και μάλιστα σε σημαντικά ποσοστά. Εξετάστηκε το ενδεχόμενο μολυσματικών συνεπειών σε αυτό το στάδιο εκτροφής αλλά και ο τρόπος απόκτησης των βακτηρίων αυτών. Δεν προέκυψε ενδεχόμενο μόλυνσεων από το συγκεκριμένο γένος (Jawahar-Abraham & Palaniappan, 2004).

Το γένος *Vibrio* διαθέτει αντιπροσώπους που αποτελούν και θαλάσσιους συμβιώτες αλλά και παράσιτα άλλων οργανισμών.

Το είδος *Vibrio splendidus* είναι συμβιώτης διθύρων (*Grassostrea gigas*) και ο μεταβολισμός του είναι ιδανικός για την διαβίωση και επικράτηση του είδους τόσο στο πεπτικό σύστημα του ξενιστή, όσο και στο υδάτινο περιβάλλον (Garnier et al., 2007).

Το *Vibrio splendidus* είναι αλόφιλος, δυνητικώς αναερόβιος μικροοργανισμός. Έχει την δυνατότητα ζυμωτικού μεταβολισμού των υδατανθράκων και συνδυαστικά μπορεί να ακολουθήσει τον οξειδωτικό μεταβολισμό απουσία οξυγόνου χρησιμοποιώντας νιτρικά ως εναλλακτικούς δέκτες ηλεκτρονίων.

Γι' αυτό το λόγο μπορεί και αναπτύσσεται με υψηλούς ρυθμούς αύξησης στις αναερόβιες συνθήκες που επικρατούν σε μικροοικοθέσεις στο πεπτικό σύστημα (Pujalte et al., 1999). Τα συμβιωτικά στελέχη διαθέτουν μεγάλη ποικιλία υδρολυτικών εξωενζύμων που δίνουν στον ξενιστή την δυνατότητα διάσπασης πολύπλοκων ουσιών που περιέχονται στην τροφή του.

Υπάρχει όμως μια λεπτή ισορροπία μεταξύ συμβίωσης και παρασιτισμού.

Σε καταστάσεις πίεσης ή εμφάνιση παθογόνου στελέχους, η συμβιωτική σχέση μετατρέπεται σε παρασιτική και ο αριθμός των βακτηρίων μπορεί να αυξηθεί υπέρμετρα.

Πολλές έρευνες έχουν γίνει στα Καρκινοειδή προκειμένου να αποσαφηνισθεί ο ρόλος της γαστρεντερικής χλωρίδας τους (Harris, 1993). Ποιά είδη των μικροοργανισμών την αποτελούν και απαντώνται σε αυτή και ποιοί από αυτούς τους μικροοργανισμούς είναι περιστασιακοί και ποιοί μόνιμοι στο πεπτικό τους σύστημα. Η σχέση που έχει διαπιστωθεί μεταξύ εντερικών βακτηρίων και θαλάσσιων ασπρονδύλων συνοπτικά παρατίθεται παρακάτω.

Τα βακτήρια τα οποία εισέρχονται στον οργανισμό μέσω της τροφής, μπορούν να υποστούν λύση με συνέπεια ή να αφομοιωθούν ή να συνεισφέρουν στην πέψη του ζώου τα ένζυμά τους (Harris, 1993).

Όταν συμβεί αυτό το ενδεχόμενο, δεν αποκλείεται να είναι παθογόνα, αλλά μπορεί και απλά να επιζούν με τις συνθήκες που επικρατούν εκεί. Αυτά τα βακτήρια είτε απεκκρίνονται, είτε λύνονται στο πίσω μέρος του εντέρου, είτε επωάζονται σε κάποιες κοιλότητες αυτού, ενώ κάποια μπορεί να επικολλούνται στα εντερικά τοιχώματα. Στην περίπτωση των συμβιωτικών ή ομόσιτων βακτηρίων, αυτά μπορούν να βρίσκονται σε κοιλότητες του εντέρου και να επικοινωνούν στα περιεχόμενά του ή να επικολλούνται στα τοιχώματα του, ενώ μερικά από αυτά μπορεί να απεκκρίνονται με την αφόδευση (Harris, 1993).

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που καθορίζουν την παρουσία και τον αριθμό των μικροοργανισμών αυτών, όπως η φύση του εντέρου, η διατροφή, η φυσιολογία η ηλικία και η υγεία του ξενιστή, καθώς και η εποχικότητα και οι περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν την στιγμή της έρευνας (Harris, 1993).

Ερευνητές, εξετάζοντας με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης την εντερική χλωρίδα δύο ειδών γαρίδας, βρήκαν ότι τα κυρίαρχα συμβιωτικά γένη ήταν τα αρνητικά Gram *Vibrio* (Harris et al., 1991).

Σε έρευνα που έγινε από επιστήμονες σε τρεις ιχθυογεννητικές μονάδες του είδους *Hippoglossus hippoglossus*, σε όλα τα στάδια εκτροφής του απομονώθηκαν στελέχη του γένους *Vibrio*. Απομονώθηκαν βακτήρια στην εντερική χλωρίδα και πριν την σίτηση του *H. Hippoglossus* (σε όλα τα στάδια ανάπτυξης) και μετά την εκτροφή του. Μάλιστα δύο από τα κυρίαρχα είδη βακτηρίων κατά την διάρκεια της εκτροφής των δεξαμενών ήταν *Vibrio splendidus* και *Vibrio alginolyticus* (Verner-Jeffreys et al., 2003). Αυτές οι μελέτες και τώρα και στο μέλλον είναι σημαντικές προσπάθειες, που

στοχεύουν στον έλεγχο της βακτηριακής χλωρίδας κατά τη διάρκεια της λαρβικής ανάπτυξης ενός καλλιεργήσιμου είδους, με στόχο την αυξανόμενη λαρβική επιβίωση κατά τη διάρκεια αυτού του κρίσιμου σταδίου της εκτροφής.

Από όλους τους φυλότυπους που βρέθηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία τα επικρατέστερα βακτήρια στο πεπτικό σύστημα της караβίδας *Nephrops norvegicus* είναι του είδους *Vibrio splendidus* και σύμφωνα με τα παραπάνω που παρατέθηκαν για το γένος *Vibrio* πολύ πιθανόν να αποτελούν συμβιώτη του πεπτικού συστήματος της караβίδας.

Σαν συμβιώτες μπορεί να παρέχουν στην караβίδα τροφή και πολλές θρεπτικές ουσίες αλλά και άμυνα του ζώου σε άλλα παθογόνα βακτήρια που μπορεί να υπάρχουν.

Παρατήρηση πολλών ερευνητών είναι ότι δεν είναι πάντα εύκολο να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα για τον ακριβή ρόλο των εντερικών βακτηρίων του ζώου του οποίου μελετάμε. Για να το κάνουμε αυτό χρειάζονται πολλά στοιχεία πριν χαρακτηρίσουμε έναν οργανισμό μόνιμο μέλος της εντερικής χλωρίδας του ξενιστή.

Πρέπει να ξέρουμε εάν είναι περιστασιακό ή τμήμα της τροφής του, εάν προήλθε από το περιβάλλον, προκειμένου να διαπιστώσουμε αν το κάθε συμβιωτικό και μη, επιδρά στην θρέψη του ξενιστή άμεσα ή έμμεσα και με πιο τρόπο.

Στην παρούσα εργασία δόθηκε μια πρώτη προσέγγιση της καλλιεργούμενης μικροβιακής ποικιλότητας στο πεπτικό σύστημα της караβίδας *Nephrops norvegicus*. Χρειάζονται πολλές ερευνητικές προσπάθειες και τώρα και στο μέλλον ώστε να διερευνηθούν και να γίνουν κατανοητές σε όλα τα επίπεδα οι συμβιωτικές σχέσεις και ως προς το



περιβάλλον που απαντώνται αλλά και ως προς την αποκλειστική επίδραση των εμπλεκόμενων οργανισμών. Η κατανόηση αυτών των σχέσεων μεταξύ των θαλάσσιων ασπονδύλων και των βακτηρίων θα πρέπει να παρέχει ουσιαστικές γνώσεις για τα χαρακτηριστικά της συμβίωσης, που ίσως είναι μοναδικά σε αυτή την ειδική αλληλεπίδραση.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Abello P., Valladares F.J., and Castellón A.** (1988). Analysis of the structure of decapod crustacean assemblages off the Catalan coast (North-West Mediterranean). *Marine Biology* 98: 39–49

**Abello P., Carbonell A., Torres P., and Gil-de-Sola L.** (2000). Bathymetric and geographical variability in the characteristics of a population of *Nephrops norvegicus* off the Iberian Peninsula (western Mediterranean). *Actes de Colloques INFREMER* 26: 186-195

**Aguzza J., Sarda F., and Allue R.** (2004). Seasonal dynamics in *Nephrops norvegicus* (Decapoda: Nephropidae) catches off the Catalan coasts (Western Mediterranean). *Fisheries Research* 69: 293–300

**Amann R.I., Ludvig W., and Schleifer K.H.** (1995). Phylogenetic Identification and in situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation *Micribiol. Rev.* 143-169

**Bailey N., and Chapman C.J.** (1983). A comparison of density, length composition and growth of two *Nephrops* populations off the West coast of Scotland. *ICES (Shellfish and Benthos Committee) K*: 42: 1-10

**Bailey N.** (1984). Some aspects of reproduction in *Nephrops*. *ICES (Shellfish and Benthos Committee)* 33: 1-15

**Bailey N., Howard F.G., and Chapman C.J.** (1986). Clyde *Nephrops*: biology and fisheries. *Proc R Soc Edinb (Sect B)* 90: 501-518

**Bergmann M., and Moore P.G.** (2001). Survival of decapod crustaceans discarded in the *Nephrops* fishery of the Clyde Sea area, Scotland. *ICES Journal of Marine Science* 58: 163–171

**Bjornsson B., and Dombaxe M.A.D.** (2004). Quality of Nephrops as food for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) with possible implications for fisheries management. ICES Journal of Marine Science 61: 983-991

**Blazejak A.** (2005). Phylogenetic and functional characterization of symbiotic bacteria in gutless marine worms (Annelida, Oligochaeta). Dissertation. Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen angefertigt.

**Briggs R. P.,** (1997). "Exploited species: The Dublin Bay Prawn". J. Inst. Biologist, 44(1): 246-248

**Briggs R.P., Armstrong M.J., Dickey-Collas M., Allen M., McQuaid N., and Whitmore J.** (2002). The application of fecundity estimates to determine the spawning stock biomass of Irish Sea *Nephrops norvegicus* (L.) using the annual larval production method. ICES Journal of Marine Science 59: 109–119

**Campos A., Fonseca P., and Erzini K.** (2002). Size selectivity of diamond and square mesh cod ends for rose shrimp (*Parapenaeus longirostris*) and Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) off the Portuguese south coast. Fisheries Research 58: 281–301

**Castro M., Araújo A., Monteiro P., Madeira A. M., and Silvert W.** (2003). The efficacy of releasing caught *Nephrops* as a management measure. Fisheries Research 65: 475–484

**Chapman C.J., and Rice A.L.** (1971). Observations on the burrows and burrowing behaviour of two mud-dwelling decapod crustaceans, *Nephrops norvegicus* and *Gonoplex rhomboides*. Marine Biology 10: 330-342

**Chapman C.J., and Howard F.G.** (1979). Field observations on the emergence rhythm of the Norway lobster *Nephrops norvegicus*, using different methods. *Marine Biology* 51: 157-165

**Chapman C.J., and Ballantyne K.A.** (1980). Some observations on the fecundity of Norway lobsters in Scottish waters. *International Council for the Exploration of the Sea, C. M. Papers and Reports*, 1980/K: 25 1-4, (mimeo)

**Chapman C.J.** (1980). Ecology of juvenile and adult *Nephrops*. In: Cobb SJ, Phillips BF (eds) *The biology and management of lobsters*. Vol. 2. Academic Press, Inc. (London) Ltd, pp 143-178

**Chapman C.J., and Bailey N.** (1987). Biological research on fish and shellfish stocks. Recent progress in Norway lobster research. In Bailey, R. S. & B. B. Parrish, 14 (eds), *Development in Fisheries Research in Scotland*. Fishing News Books, Farnham, England: 99-111

**Chapman C.J., and Howard F.G.** (1988). Environmental influences on Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) populations and their implications for fishery management. In Fincham, A. A. & P. S. Rainbow (eds), *Aspects of decapod crustacean biology*. Symp. Zool. Soc. London, 59: 343-353

**Dickey-Colas M., McQuaid N., Armstrong M.J., Allen M., and Briggs R.P.** (2000). Temperature- dependent stage durations of Irish Sea *Nephrops* larvae. *Journal of Plankton Research* 22: 749-760

**Dimijian G. M.D.** (2000). Evolving together: the biology of symbiosis, Part 1. Distribution of bacteria and associated minerals in the gill chamber of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* and related biogeochemical processes. *Mar Ecol Prog Ser* Vol. 284: 237–251

- Dubilier N., Giere O., Distel D.L., and Cavamaugh C.M.** (1995). Characterization of chemoautotrophic bacterial symbionts in a gutless marine worm (Oligochaeta, Annelida) by phylogenetic 16S rRNA sequence analysis and in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2346-2350
- Dubilier N.** (2006). Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. *Nature* 443:950-955
- Esteve I., and Gaju N.** (1999). Bacterial symbiosis. Predation and mutually beneficial associations. *International Microbiol* 2:81-86
- Farmer A.S.** (1974a). Relative growth in *Nephrops norvegicus* (L.) (Decapoda: Nephropidae). *Journal of natural History* 8: 605-620
- Farmer A.S.** (1974b). The functional morphology of the mouthparts and pereopods of *Nephrops norvegicus* (L.) (Decapoda: Nephropidae). *Journal of natural History* 8: 121-142
- Farmer A.S.** (1974d). Reproduction in *Nephrops norvegicus* (Decapoda: Nephropidae). *J Zool Proc Zool Soc Lond* 174:161–183
- Farmer A.S.** (1975). Synopsis of biological data on the Norway lobster *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). *FAO Fisheries Synopses* (112), 1-9
- Faulkner D.J.** (2000). Marine pharmacology. *Antonie van Leeuwenhoek* 77:135-145
- Felbeck H.** (1981). Chemoautotrophic potential of the hydrothermal vent tube worm, *Riftia pachyptila* Jones (Vestimentifera). *Science*, vol. 213, pp 336-338
- Felbeck H., and Distel L.D.** (2004). Prokaryotic symbionts of marine invertebrates. In: M. Dworkin et al., eds., *The Prokaryotes: An evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3<sup>rd</sup> edition, release Springer-Verlag, New York

- Fernandez I. Rotland G., Company J.B., Saborowski R., and Fernadez L.** (2005). Biochemical characterization of eggs of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus*, during the embryonic development. Sixth International Crustacean Congress, 18-22 July 2005, Glasgow, U.K.
- Garnier M., Labreuche Y., Garcia C., Robert M., and Nicolas J. L.** (2007). Evidence for the Involvement of Pathogenic Bacteria in Summer Mortalities of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial Ecology* Volume 53, 187–196
- Gavanaugh C.M., Gardiner S.L., Jones M.L., Jannasch H.W., and Waterbury J.B.** (1981). Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tube worm. *Science*, vol. 213, pp. 340-342
- Giere O.** (1979). Studies on marine oligochaeta from Bermuda, with emphasis on new *Phalodrilus*- species (Tubificidae). *Cah. Biol. Mar.* 20: 301-314
- Giere O.** (1981). The gutless marine oligochaete *Phalodrilus leukodermatus*, structural studies on an aberrant tubificid associated with bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 5:353-357
- Gonzalez-Gurriaran E., and Olaso I.** (1987). Spatial and temporal changes of the decapod crustaceans from the continental shelf of Galicia (NW Spain). *Invest. Pesq. (Barc.)* 51 (1)
- Gordon J.D., and De Silva S.S.** (1980). The fish populations of the west of Scotland shelf. Part I. *Oceanography and Marine Biology. An Annual Review* 18, 317–366
- Gupta R.S.** (1998). Protein phylogenies and signature sequences: A reappraisal of evolutionary relationships among Archaeobacteria, Eubacteria, Eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1435-1491

- Harris M.J., Seiderer J.L., and Lucas I.M.** (1991). Gut microflora of two saltmarsh detritivore Thalassinid Prawns, *Ubogebia africana* and *Callinassa kraussi*. *Microb Ecol* 21:277-296
- Harris M.J.** (1993). The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: A Synthesis. *Microb Ecol* 25:195-231
- Harris R.R., and Ulmestrand M.** (2004). Discarding Norway lobster (*Nephrops norvegicus* L.) through low salinity layers e mortality and damage seen in simulation experiments. *ICES Journal of Marine Science* 61: 127-139
- Hillis J.P.** (1987). A study of catch composition in the Irish *Nephrops* fishery with special attention to growth and maturity. *ICES, CM K22*: pp 1-10
- Hines A.H., Wolcott T.G., González-Gurriarán E., González-Escalante J.L., and Freire F.** (1995). Movement patterns and migrations in crabs: telemetry of juvenile and adult behaviour in *Callinectes sapidus* and *Maja squinado*. *Journal of marine biology association. U.K.* 75: 27–42
- Howard F. G.** (1989). The Norway Lobster. Scottish Fisheries Information Pamphlet, Edinburgh, 7. 15 pp.
- Hughes D.J.** (1998). Sea pens and burrowing megafauna. An overview of dynamics and sensitivity characteristics for conservation management of marine SACs Centre for Coastal and Marine Sciences Dunstaffnage Marine Laboratory, Oban
- Hunter-Cevera J., Karl D., and Buckey M.** (2005). Marine microbial diversity: the key to Earth's habitability. American Society for Microbiology Press, Washington DC
- Jannasch H.W., and Mottl M.J.** (1985). Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. *Science*, vol. 229, pp. 717-725

**Jawahar- Abraham T., and Palaniappan R.** (2004). Distribution of luminous bacteria in semi-intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India. *Aquaculture j* 232: 81-90

**Kobayashi J., and Ishibashi M.** (1993). Bioactive metabolites of symbiotic marine organisms. *Chem. Rev.* 93:1753-1770

**Madsen N., Moth-Poulsen T., Holstb R., and Wileman D.** (1999). Selectivity experiments with escape windows in the North Sea Nephrops (*Nephrops norvegicus*) trawl fishery. *Fisheries Research* 42: 167-181

**Main J., Sangster, G. I.** (1985). The behaviour of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.) during trawling. *Scottish Fisheries Research Repository* 34:1-23

**Mayer L.M., Jumars P.A., Bock M.J., Vetter Y.A., and Schmidt J.L.** (2001). Two roads to sparagmos: Extracellular digestion of sedimentary food by bacterial inoculation versus deposit -feeding.-In : Aller JY, Woodin SA & Aller RC (eds): *Organism-Sediment Interactions*. The Belle W. Baruch Library in Marine Science 21:335-347

**Maynou F., Conan G.Y., Cartes J.E., Company J.B., and Sarda F.**(1996). Spatial Structure and Seasonality of Decapod Crustacean Populations on the Northwestern Mediterranean Slope. *Limnology and Oceanography* 41 (1): 113-125

**Maynou F., and Sarda F.** (1997). *Nephrops norvegicus* population and morphometrical characteristics in relation to substrate heterogeneity. *Fisheries Research* 30: 39-49

**Meziti A., Kormas K.A., Pancucci-Papadopoulou M. A., Thessalou-Legaki M.** (2007). Bacterial Phylotypes Associated with the Digestive Tract of a sea



Urchin *Paracentrotus lividus* and the Ascidian *Microcosmus* sp. Russian journal of Marine Biology 33:84-91

**Morizur Y.** (1981). Evaluation de la perte d'oeufs lots de l'incubation chez *Nephrops norvegicus* (L.) dans la region Sud-Bretagne, France. *Crustaceana* 41 (3): 301-306

**Newland P. L., Neil D. M., and Chapman C. J.** (1992). Escape Swimming in the Norway Lobster *Journal of Crustacean Biology* 12 (3): 342-353

**Nybaken W.J.** (2005). Θαλάσσια βιολογία. Μια οικολογική προσέγγιση. Έκδοση, Εκδόσεις Ίων, Αθήνα.

**Rice A.L., and Chapman C.J.** (1971). Observations on the burrows and burrowing behaviour of two mud-dwelling decapod crustaceans, *Nephrops norvegicus* and *Gonoplex rhomboides*. *Marine Biology* 10: 330-342

**Rosa R., and Nunes M.L.** (2003). Nutritional quality of red shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso), pink shrimp, *Parapenaeus longirostris* (Lucas), and Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (Linnaeus). *Journal of the Science of Food and Agriculture J Sci Food Agric* 84:89–94

**Rotlant G., Anger K., Durfort M., Sarda F.** (2004) Elemental and biochemical composition of *Nephrops norvegicus* (Linnaeus 1758) larvae from the Mediterranean and Irish Seas. *Helgol Marine Research* 58:206–210

**Roughgarden J.** (1975). Evolution of marine symbioses-a simple cost-benefit model. *Ecology* 56: 1201-1208

**Roughgarden J.** (1983). The theory of coevolution. In D.J Futuyama and M. Slatkin (eds). *Coevolution*, pp.33-64. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts

- Olsen G.J., Lane D.J., Giovannoni S.J., Pace N.R., and Stahl D.A.** (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* 40:337-365
- Oxley A.P., Shipton W., Owens L., and McKay D.** (2002). Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*. *J Appl Microbiol* 93:214-223
- Parslow-Williams P.J., Atkinson R.J.A., and Taylor A.C.** (2001). Nucleic acids as indicators of nutritional condition in the Norway lobster *Nephrops norvegicus*. *Mar Ecol Prog Ser* 211: 235–243
- Polz M. F., Cavanaugh C. M.** (1998). Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 :3724-3730
- Pujalte M.J., Ortigosa M., Macian M. C., Caray E.** (1999). Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater, *International Microbiology* 2:259-266
- Sarda F.** (1998). *Nephrops norvegicus* (L.): comparative biology and fishery in the Mediterranean Sea. Introduction, conclusions and recommendations. *Scientia Marina* 62: 5–15
- Sherr, E., and Sherr B.** (2000). Marine microbes: an overview, p. 13–46. *In* D. L. Kirchman (ed.), *Microbial ecology of the oceans*. Wiley-Liss, London, United Kingdom. 353
- Sherr, E. B., and Sherr B. F.** (2002). Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie Leeuwenhoek* 81:293–308
- Smith R.S.M.** (1987). The biology and larval and juvenile *Nephrops norvegicus* (L.) in the Firth of Clyde Ph.D. Thesis University of Glasgow. Glasgow, Scotland

- Smith C.J., and Papadopoulou K.N.** (2003). Burrow density and stock size fluctuations of *Nephrops norvegicus* in a semi-enclosed bay. ICES Journal of Marine Science 60: 798–805
- Stackebrandt E., Goebel B. M.** (1994). Taxonomic note : A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. System. Bacteriol.44 :846-849
- Sunamura M., Higashi Y., Miyako C., Ishibashi J., and Maruyama A.** (2004). Two bacteria phlotypes are predominant in the Sulyo Seamount hydrothermal plume. Appl Environ Microbiol 70:1190-1198
- Suzuki M. T., and Giovannoni S. J.** (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 62 :625-630
- Talbot P.** (1991). Ovulation, attachment and retention of lobster eggs, in A. Wenner and A. Kuris (eds), *Crustacean egg production* (Rotterdam: A. A. Balkema), pp. 9-18
- Thomas H.J.** (1964). The spawning and fecundity of the Norway Lobsters (*Nephrops norvegicus* L.) around the Scottish coast, Journal du Conseil, 29: 221-229
- Thomas H.J.** (1965). The growth of Norway lobsters in aquaria, Rapp. P.-v. Reun. Cons. perm int. Explor. Mer 156: 209-216
- Thompson F.L., Iida T., and Swings J.** (2004). Biodiversity of Vibrios. Microbiol Mol Biol Rev 68:403-431
- Tuck I.D., Atkinson R.J., and Chapman C.J.** (2000). Population biology of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.) in the Firth of Clyde, Scotland

II: fecundity and size at onset of sexual maturity. ICES Journal of Marine Science 57: 1227–1239

**Tully O., and Hillis J.P.** (1995). Causes and spatial scales of variability in population structure of *Nephrops norvegicus* (L.) in the Irish Sea. Fisheries Research 21: 329-347

**Verdoit M., Pelletier D., and Talidec C.** (1999). A growth model that incorporates individual variability for the Norway lobster population (*Nephrops norvegicus*, L. 1758) from the Bay of Biscay. ICES Journal of Marine Science, 56: 734–745

**Verner-Jeffereys D. W., Shields R. J., Bricknell I. R., and Birkbeck T. H.** (2003). Changes in the gut-associated microflora during the development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae in three British hatcheries. *Aquaculture j.* 219: 21-42

**Welinder B. S.** (1974). The crustacean cuticle. I. Studies on the composition of the cuticle. *Comp. Biochem. Physiol.* 47A: 779-78

**Woyke T., Teeling H., Ivanova N.N., Huntzman M., Richter M., Gloeckner F.O., Bofelli D. Anderson I.J., Barry K.W., Shapiro H.J., Szeto E., Kyripides N.C., Mussmann M., Amann R., Bergin C., Ruehland C., Rubin E.M., and Abello P., Abella A., Adamidou A., Jukic-Peladic S., Maiorano P., and Spedicato M.T.** (2002). Geographical patterns in abundance and population structure of *Nephrops norvegicus* and *Parapenaeus longirostris* (Crustacea: Decapoda) along the European Mediterranean coasts. *Scientia Marina* 66(Supp. 2): 125-141

**Ηλεκτρονική βιβλιογραφία**

**Adey J., Taylor A., Atkinson J., Smith P., and Tuck I. (2003).** Norway lobster creel fisheries. [www.gla.ac.uk/centres/marinstation/research](http://www.gla.ac.uk/centres/marinstation/research).

**CHIMERA-CHECK** [https:// rdp.cme.msn.edn](https://rdp.cme.msn.edn).

**ΕΤΑΝΑΛ Εταιρεία Ανάπτυξης Αλιείας 1998.** [www.Vres.gr](http://www.Vres.gr)

**FAO FISHSTAT.** [www.fao.org](http://www.fao.org)

**FRS marine laboratory 2006.** Scottish Nephrops stocks-Biology and Assessement. [www.FRS-Scotland.gov.uk](http://www.FRS-Scotland.gov.uk)

**GenBank** [http// www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

**Pagositikos Gulf** [http// www.greeklandscapes.com](http://www.greeklandscapes.com)

## 6. ABSTRACT

In this study, the cultureable bacterial community of the digestive tract of *Nephrops norvegicus* individuals was analyzed from a natural population in Pagasitikos Gulf.

The bacterial community, which part the digestive tract from five individuals was cultivated in a Marine Agar 2216 (MA). DNA was extracted and was used for PCR amplification of the 16S rRNA gene with the primers BAC8f and BAC907r. The amplified genes were cloned and sequenced following the rRNA approach. After excluding false positive clones and chimeric sequences, a total of 64 clones were analysed for 16S rRNA gene diversity. Phylogenetic analysis was performed by the Neighboring-Joining method as supported by 1000 bootstrap replications. All the bacterial phylotypes of the *N.norvegicus* digestive tract belonged to the phylum of  $\gamma$ -Proteobacteria and to the family *Vibrionaceae*, which contains some of the most common genera in marine bacterioplankton but also several symbionts of marine invertebrates.

Although it is difficult to certify the found phylotypes as true symbionts of *N. norvegicus* gut due to its high abundance and diversity in the water column, it is suggested from the inferred physiological traits of the found phylotypes and their massive dominance in the MA cultureable fraction, that they could be involved in food assimilation of the animal, and in particular assisting the degradation of complex organic substrates to simpler organic molecules.

**Keywords:** *Nephrops norvegicus*, bacteria, symbiont, digestive tract