

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΟΝΤΟΣ**

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Σύγκριση της εντερικής βακτηριακής ποικιλότητας σε άτομα  
*Nephrops norvegicus* από τη Μεσόγειο και τη Βόρειο Θάλασσα»**

**ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΜΠΟΥΜΠΑΡΗΣ**

**ΒΟΛΟΣ 2010**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :**

- 1) **Κωνσταντίνος Κορμάς, Αναπληρωτής Καθηγητής, Οικολογία Υδάτινης Στήλης με έμφαση στα Μικροβιακά και Τροφικά Είδη, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων,***
- 2) **Ελένη Μεντέ, Μόνιμη Επίκουρη Καθηγήτρια, Φυσιολογία Θρέψης Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος,***
- 3) **Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης, Λέκτορας, Διατροφή Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος.***

*Στην οικογένειά μου*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, τον κύριο Κωνσταντίνο Κορμά για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από την κυρία Ελένη Μεντέ και τον κύριο Ιωάννη Καραπαναγιωτίδη, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους σε όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Αλεξάνδρα Μεζίτη για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της κατά τη διάρκεια του πειράματος. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Μαρία Παχιαδάκη για την αμέριστη συμπαράστασή της. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση, οικονομική βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

## Περίληψη

Στην παρούσα προπτυχιακή διπλωματική εργασία έγινε σύγκριση της εντερικής βακτηριακής ποικιλότητας της καραβίδας *Nephrops norvegicus* σε άτομο του είδους προερχόμενο από τη Βόρειο Θάλασσα (Arbroath, Scotland) με άτομα του Παγασητικού Κόλπου (Ελλάδα) τα αποτελέσματα των οποίων ήταν καταχωρημένα στη βάση δεδομένων GENBANK. Και τα δύο δείγματα που αναλύθηκαν συλλέχθηκαν το μήνα Φεβρουάριο. Σκοπός της εργασίας ήταν η διερεύνηση ύπαρξης κοινών βακτηριακών ομάδων που απαντώνται στο έντερο καραβίδων από απομακρυσμένα ενδιαιτήματα.

Το δείγμα *N. norvegicus* που αναλύθηκε συλλέχθηκε από την περιοχή Arbroath της Σκωτίας. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση του εντέρου και έπειτα του γενετικού υλικού. Στη συνέχεια με την χρήση της τεχνικής της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction) και ειδικών εκκινήτων για βακτήρια ενισχύθηκαν τα βακτηριακά 16S rRNA γονίδια. Κατόπιν έγινε κλωνοποίηση των γονιδίων και δημιουργία γονιδιακής βιβλιοθήκης. Ακολούθησε ανάλυση των αλληλουχιών που προέκυψαν από αλληλούχιση των γονιδίων και σύγκριση με την βοήθεια του προγράμματος BLAST με όλες τις γνωστές αλληλουχίες της βάσης δεδομένων της GENBANK με σκοπό να βρεθούν όλοι οι συγγενείς φυλότυποι. Οι φυλότυποι που βρέθηκαν ομαδοποιήθηκαν στα υποφύλα δ-και γ-Proteobacteria αλλά και στο φύλο Bacteroidetes. Στη συνέχεια έγινε κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου με τη χρήση του προγράμματος MEGA\_4. Οι αντιπρόσωποι των δ-Proteobacteria εντοπίστηκαν σε συχνότητα εμφάνισης 92%, ενώ τα γ-Proteobacteria και τα Bacteroidetes έφτασαν στο 4% του συνολικού αριθμού των κλώνων αντίστοιχα.

Η επικρατέστερη ταξινομική ομάδα για το δείγμα του Arbroath ήταν τα δ-Proteobacteria, ενώ του Παγασητικού Κόλπου τα γ-Proteobacteria. Η επανεμφάνιση

(87,5% αφθονία) του κλώνου (AbFe 2.2) στο δείγμα (AbFe2) του Arbroath και η στενή του ομοιότητα (99%) με τον κλώνο (Se3-206) στο έντερο του ίδιου είδους προερχόμενο από τον Παγασητικό Κόλπο, υποδεικνύει την πιθανή προσφορά τους στην πέψη της τροφής, με λειτουργίες που είναι όμως ακόμα αδιευκρίνιστες.

*Λέξεις κλειδιά:* έντερο, *N. norvegicus*, PCR, βακτήρια, Μεσόγειος, Βόρειος Θάλασσα.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>9</b>
1.1 Συμβιωτικές σχέσεις.....	9
1.2 Γενικές πληροφορίες για το είδος <i>Nephrops norvegicus</i> .....	12
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>16</b>
2.1 Δειγματοληψία και απομόνωση ιστών .....	16
2.2 Απομόνωση DNA.....	17
2.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και Ηλεκτροφόρηση .....	17
2.4 Καθαρισμός PCR προϊόντος και απομόνωση από πήκτωμα αγαρόζης .....	19
2.5 Κλωνοποίηση .....	20
2.6 Επεξεργασία αποικιών μετά την κλωνοποίηση.....	21
2.7 Υγρές καλλιέργειες.....	21
2.8 Απομόνωση πλασμιδίου .....	22
2.9 Αλληλούχιση .....	22
2.10 Συγκριτική ανάλυση με τη βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου καραβίδων του Παγασητικού Κολπου με χρήση βάσεων δεδομένων.....	22
2.11 Φυλογενετική ανάλυση και κατασκευή φυλογενετικού δένδρου.....	23
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>25</b>
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>33</b>
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>41</b>

**ABSTRACT ..... 48**



## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Συμβιωτικές σχέσεις

Η μελέτη της οικολογίας των μικροοργανισμών και των αλληλεπιδράσεών τους με άλλους οργανισμούς έχει απασχολήσει ιδιαίτερα την επιστημονική κοινότητα τον τελευταίο αιώνα. Η τεχνολογική πρόοδος έχει συμβάλει σημαντικά στη μελέτη της ποικιλότητας των μικροοργανισμών μέσω μοριακών και μικροσκοπικών τεχνικών (Smalla 2004: Allen & Banfield 2005: Amann & Fuchs 2008). Η χρήση των αλληλουχιών των γονιδίων του rRNA, αλλά και οι μεταγονιδιωματικές αναλύσεις, έχουν δώσει τη δυνατότητα στους επιστήμονες να μελετήσουν πιο αναλυτικά τη μικροβιακή ποικιλότητα, αλλά και τις πιθανές μεταβολικές διεργασίες που επιτελούνται από τους μικροοργανισμούς (Velicer *et al.* 2006: Handelsman *et al.* 2007).

Η συνεχής εξέλιξη της επιστήμης έχει συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση της σπουδαιότητας των μικροοργανισμών για το περιβάλλον και έχει δώσει μία διαφορετική αντίληψη για τις συμβιωτικές σχέσεις που αναπτύσσονται μέσα σε αυτό.

Ως όρος, η συμβίωση επινοήθηκε από τον Heinrich Anton de Bary, Γερμανό μυκητολόγο το 1879, ο οποίος όρισε ως συμβίωση: "όταν διαφορετικοί οργανισμοί ζουν μαζί". Σε αυτήν την ευρεία έννοια συμβίωσης περιλαμβάνονται όλα τα είδη βιολογικών σχέσεων, από αμοιβαία έως παρασιτική (Douglas 1994 και αναφορές του).

Έτσι λοιπόν μία σχέση μεταξύ δύο οργανισμών λειτουργικά μπορεί να πάρει μία από τις τρεις διαστάσεις:

- α) Αμοιβαία: όταν επωφελούνται και οι δύο εμπλεκόμενοι οργανισμοί,
- β) Μη επιβλαβής παρασιτισμός: όταν ο ένας από τους δύο οργανισμούς επωφελείται και ο άλλος δεν επηρεάζεται και

γ) Παρασιτική: όταν ο ένας από τους δύο οργανισμούς βλάπτεται από τη συμβίωση. Στην τελευταία περίπτωση ανήκουν οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που προσβάλλουν τον οργανισμό μετά την είσοδο και εγκατάστασή τους σε αυτόν ή αποτελούν φορείς μεταδοτικής νόσου.

Στις συμβιωτικές σχέσεις οι μικροοργανισμοί εντοπίζονται, σε σχέση με τον ξενιστή, ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά, σε εξωτερικές ή σε εσωτερικές επιφάνειες επωφελώντας, βλάπτοντας ή μη προξενώντας κάποιου είδους επίδραση στους ξενιστές (Smith and Douglas 1987). Οι ευεργετικής σημασίας συμβιώσεις αντιπροσωπεύουν μια υψηλής απόδοσης προσαρμοστική στρατηγική βασιζόμενη στις γενετικά ελεγχόμενες μεταβολικές ανταλλαγές μεταξύ των αλληλεπιδρώντων οργανισμών (Douglas 1994).

Πολλοί οργανισμοί, όπως τα φυτά, εξαρτώνται από μικροοργανισμούς. Παράδειγμα τέτοιου είδους σχέσεων αποτελούν τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια στις ρίζες των ψυχανθών φυτών. Τα βακτήρια αυτού του είδους δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο και το μετατρέπουν σε νιτρικά ιόντα, τα οποία απορροφούνται από τα ψυχανθή (Madigan *et al.* 2008). Επίσης, σε πολλά έντομα απαντώνται συμβιωτικοί μικροοργανισμοί. Εκτιμάται ότι το 10% των εντόμων φέρουν συμβιωτικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι συμβάλλουν στη διατροφή των εντόμων (Buchner 1965). Οι μικροοργανισμοί αυτοί εγκαθίστανται σε συγκεκριμένα κύτταρα του σώματος των εντόμων που ονομάζονται mycetocytes ή bacteriocytes ενισχύοντας, μέσω συγκεκριμένων μεταβολικών διεργασιών, την ανάπτυξη και την αύξηση του βάρους των εντόμων (Douglas 1989). Τα θαλάσσια μύδια (οικ. Mytilidae), επίσης, φέρουν συμβιώτες μικροοργανισμούς. Πιθανολογείται πως η ύπαρξη μεθανιότροφων βακτηρίων στα βράγχια των μυδιών συμβάλλει στην αποτελεσματική ανταλλαγή αερίων με το θαλασσινό νερό (Madigan *et al.* 2008). Πολλοί οργανισμοί, λοιπόν,

οφείλουν την επιβίωσή τους στην παρουσία τέτοιου είδους μικροοργανισμών, αφού πολλές από τις βιολογικές τους λειτουργίες δεν θα μπορούσαν να επιτελεστούν απουσία αυτών.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα επωφελούς συμβίωσης αποτελεί η μικροβιακή κοινότητα που αναπτύσσεται στο έντερο των οργανισμών. Η παρουσία μικροοργανισμών στο έντερο και γενικότερα στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών έχει παρατηρηθεί ότι συμβάλλει στην ομαλή λειτουργία του πεπτικού συστήματος και στην παραγωγή θρεπτικών συστατικών. Συγκεκριμένες διεργασίες των μικροοργανισμών, μέσα στους ιστούς των ζώων, συμβάλλουν στην παραγωγή απαραίτητων θρεπτικών συστατικών, τα οποία οι ξενιστές δεν είναι σε θέση να τα συνθέσουν από μόνοι τους ή τα συνθέτουν σε μη επαρκείς ποσότητες. Με αυτόν τον τρόπο, οι μικροοργανισμοί συμβάλλουν αποτελεσματικά στην επιβίωση και την ισορροπημένη διατροφή των ξενιστών τους (Harris 1993).

Η βασική λειτουργία των ευεργετικών συμβιωτών που απαντώνται στο πεπτικό σύστημα και πιο συγκεκριμένα στο έντερο των καρκινοειδών και, πιθανώς και στο *Nephrops norvegicus*, αφορά την αποικοδόμηση των φυσικών πολυμερών, τα οποία ο ξενιστής δεν μπορεί να αφομοιώσει (Pond *et al.* 1997) και την παροχή συστατικών απαραίτητων για την ανάπτυξη του οργανισμού π.χ. βιταμινών και αμινοξέων, τα οποία πιθανόν να βρίσκονται σε έλλειψη ή σε χαμηλές συγκεντρώσεις στις δίαιτες των οργανισμών (Polz *et al.* 1998).

Όλοι οι οργανισμοί δεν φέρουν τους ίδιους συμβιώτες και όλοι οι συμβιώτες δεν επιτελούν τις ίδιες λειτουργίες στους διάφορους οργανισμούς. Μελέτες έχουν δείξει ότι η απαντώμενη μικροοργανισμική κοινότητα στο έντερο των οργανισμών και γενικότερα στο πεπτικό τους σύστημα έχει άμεση συσχέτιση με το ενδιαίτημα, την

εποχή και τη διατροφή του ξενιστή. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι πολλές φορές οι οργανισμοί, μέσω της εξελικτικής πορείας στο χρόνο, έχουν διαμορφώσει το πεπτικό τους σύστημα έτσι ώστε να επιτρέπουν τη συμβίωση των μικροοργανισμών ανεξάρτητα του ενδιαφέροντος ή της διατροφής τους. Με άλλα λόγια, το πεπτικό σύστημα και, ειδικότερα, το έντερο ορισμένων οργανισμών είναι δομημένα με τέτοιο τρόπο που να προδιαθέτουν τους οργανισμούς προς τη συμβίωση με τους μικροοργανισμούς (Harris 1993).

## 1.2 Γενικές πληροφορίες για το είδος *Nephrops norvegicus*

Η καραβίδα *Nephrops norvegicus*, είναι ένα δεκάποδο καρκινοειδές της οικογένειας των Nephropidae με μεγάλη εμπορική και οικονομική σημασία. Το 2005, οι συνολικές ευρωπαϊκές αλιευτικές εκφορτώσεις του είδους άγγιζαν τους 60.500 τόνους, με τη Βρετανία να καταλαμβάνει το 50% των συνολικών εκφορτώσεων στην Ευρωπαϊκή Ένωση και την Ιταλία το 80% των συνολικών μεσογειακών εκφορτώσεων (Smith & Papadopoulou 2008). Λόγω της σπουδαιότητας του ως ένα από τα κυριότερα εμπορικά αλιεύματα της Ευρώπης έχει προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον ενός πλήθους επιστημονικών ομάδων (International Council for the Exploration of the Sea (ICES), 1999: 2000).

Το είδος *N. norvegicus* έχει ευρεία γεωγραφική εξάπλωση, από τις Βορειοδυτικές ακτές του Ατλαντικού ωκεανού μέχρι την Ανατολική Μεσόγειο θάλασσα (Relini *et al.* 1999). Η βαθυμετρική του εξάπλωση στη Μεσόγειο θάλασσα εκτείνεται από την υφαλοκρηπίδα της βαθύαλης ζώνης, φθάνοντας μέχρι τα βάθη των 871 m στη Δυτική Μεσόγειο, με μέγιστη αφθονία στα 400-450 m στα βορειοδυτικά ύδατα (Abelló *et al.* 1988; Maynou & Sarda 1997). Η μέγιστη πυκνότητα του είδους έχει διαπιστωθεί στα βορειοδυτικά ύδατα της Μεσογείου θάλασσας μεταξύ των 245 και 485 m βάθος (Cartes

*et al.* 1994). Στον Ατλαντικό ωκεανό, η βαθυμετρική εξάπλωση εκτείνεται από τα 10 m έως τα 720 m, αλλά στη νότια ακτή της Πορτογαλίας, μέγιστες πυκνότητες απαντώνται μεταξύ 300 και 600 m (Figueiredo 1988). Στο ανατολικό μέρος της Μεσογείου Θάλασσας, δηλαδή σε περιοχές όπως η Ελλάδα και πιο συγκεκριμένα στον Παγασητικό Κόλπο, το είδος κατανέμεται μεταξύ 65 και 95 m βάθος (Smith & Papadopoulou 2003). Σε άλλες περιοχές του ελλαδικού χώρου, όπως ο Ευβοϊκός κόλπος, έχει αναφερθεί ότι καταλαμβάνει βάθη μεγαλύτερα των 60 m με το μέγιστο της πυκνότητας του πληθυσμού μεταξύ των 100 με 200 m βάθος (Mytilineou *et al.* 1990). Στις Σποράδες, έχει βρεθεί ότι άτομα του είδους *N. norvegicus* απαντώνται σε ύδατα τα οποία κυμαίνονται σε βάθος μεταξύ των 200 και 500 m (Kallianiotis *et al.* 2004).

Το είδος *N. norvegicus* είναι ένας υδρόβιος ζωικός οργανισμός που διαβιεί σε ιζήματα αργιλώδους φύσεως. Το είδος *N. norvegicus* δε μεταναστεύει κατά τη διάρκεια του έτους, ενώ τα ενήλικα και τα νεαρά άτομα του είδους προτιμάνε να ζούνε μέσα σε φωλιές-λαγούμια που κατασκευάζουν τα ίδια κατά τη διάρκεια της ημέρας (Smith & Papadopoulou 2003). Τα λαγούμια (Εικόνα 1) έχουν βάθος 20-30 cm, όπου και συλλέγει τις περισσότερες φορές την τροφή του, αποτελούμενη κυρίως από πολύχαιτους, καρκινοειδή, μαλάκια, ψάρια και εχινόδερμα (Baden *et al.* 1990; Cristo & Cartes 1998). Η караβίδα *N. norvegicus* είναι ένας ευρυφάγος οργανισμός, που καταναλώνει μεγάλη ποικιλία τροφών είτε ως ενεργός θηρευτής είτε ως σαπροφάγος (Cristo & Cartes 1998).



**Εικόνα 1:** Καταφύγιο-λαγούμι της καραβίδας (*Nephrops norvegicus*) (Πηγή: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Langoustine\\_dans\\_son\\_terrier.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Langoustine_dans_son_terrier.jpg))

Η τροφή, από τη σύλληψη της μέχρι την απέκκρισή της, διέρχεται κατά σειρά και υφίσταται επεξεργασία στα εξής: στο στόμα, στον οισοφάγο, στην καρδιακή μοίρα του στομάχου, στην πυλωρική μοίρα του στομάχου, στο ηπατοπάγκρεας ή πεπτικό αδέν (όπως συνηθίζεται να ονομάζεται στα καρκινοειδή), στο μεσέντερο, στο οπισθέντερο και στην έδρα (Yonge 1924). Το στόμα και ο οισοφάγος είναι υπεύθυνα για τη φυσική πέψη (τεμαχισμός) της τροφής. Στον στόμαχο συνεχίζεται η φυσική πέψη της τροφής, αλλά το όργανο αυτό είναι κυρίως υπεύθυνο για τη χημική πέψη και εν μέρει για την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών της τροφής. Η χημική πέψη και η απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών συνεχίζεται σε κάποιο βαθμό στον πεπτικό αδέν των καρκινοειδών, ενώ η κύρια απορρόφηση συμβαίνει στο έντερο και ιδιαίτερα στο μεσέντερο (Yonge 1924). Η μετέπειτα απέκκριση των παραπροϊόντων της πέψης και του μεταβολισμού γίνεται μέσω της έδρας (Yonge 1924).

Το μεσέντερο αποτελεί σημαντικό όργανο του πεπτικού συστήματος των καρκινοειδών, συμπεριλαμβανομένου του *N. norvegicus*, διότι ορισμένοι από τους

μικροοργανισμούς που απαντώνται στο μεσέντερο παράγουν, μέσω συγκεκριμένων διεργασιών, τις απαραίτητες για τη διατροφή των καρκινοειδών θρεπτικές ουσίες (Polz *et al.* 1998). Τα παραγόμενα προϊόντα της πέψης, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, απορροφώνται από το μεσέντερο συμβάλλοντας στη διατροφή και επιβίωση του ξενιστή. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο στην παρούσα εργασία ερευνήθηκε η βακτηριακή κοινότητα στο μεσέντερο του *N. norvegicus*. Σκοπός της εργασίας ήταν να εξεταστεί αν υπάρχουν κάποια συγκεκριμένα βακτήρια, τα οποία ίσως να επιτελούν βασικές διεργασίες για την ομαλή λειτουργία του πεπτικού συστήματος του *N. norvegicus*, ακόμα και αν τα άτομα του είδους απαντώνται σε απομακρυσμένα ενδιαιτήματα.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Δειγματοληψία και απομόνωση ιστών

Η συλλογή των καραβίδων έγινε στο Arbroath της Σκωτίας με τη βοήθεια αλιέα το Φεβρουάριο του 2009 (Εικόνα 2). Το μήνα αυτό στην περιοχή δειγματοληψίας η άνθιση του φυτοπλαγκτού δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμα (Moll 1998). Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο τα ποσοστά της πρωτογενούς παραγωγής είναι χαμηλά (Moll 1998).

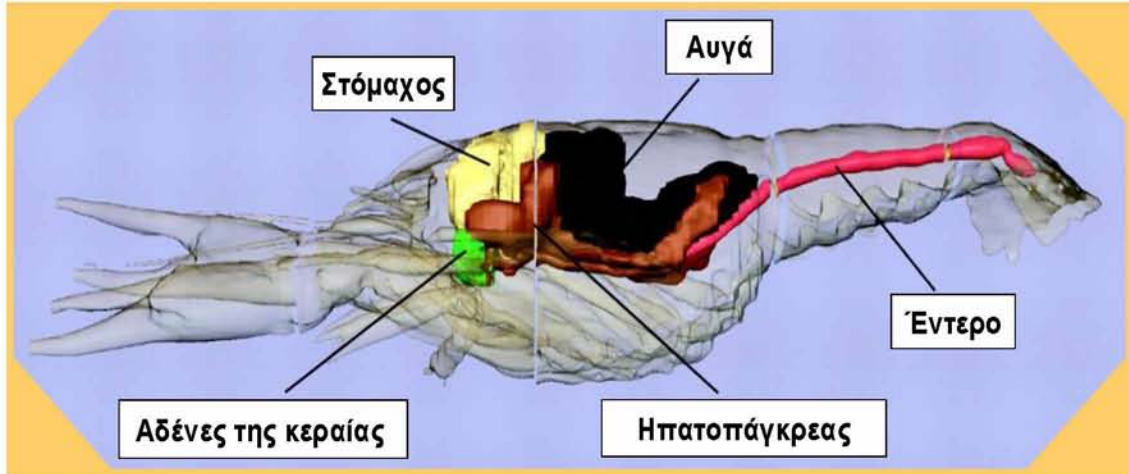
Στο άτομο-δείγμα που εξετάστηκε ( $AbFe_2$ ) απομονώθηκε ο πεπτικός του σωλήνας (Εικόνα 3) και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  για περαιτέρω ανάλυση.



**Εικόνα 2:** Περιοχή δειγματοληψίας (Πηγή:

[http://www.bbc.co.uk/london/content/image\\_galleries/satellite\\_photos1\\_gallery.shtml](http://www.bbc.co.uk/london/content/image_galleries/satellite_photos1_gallery.shtml)).





Εικόνα 3: Τρισδιάστατη απεικόνιση των εσωτερικών οργάνων και του πεπτικού σωλήνα ενός θηλυκού ατόμου *Nephrops norvegicus* (Herberholz *et al.* 2004).

## 2.2 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκε το AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen USA). Μετά την ομογενοποίηση του εντέρου ακολουθήθηκε η απομόνωση του γενετικού υλικού. Στο τελικό βήμα, το DNA διαλύθηκε σε 100 μl Elution Buffer. Με τη χρήση του οργάνου «Nanodrop» μετρήθηκε η συγκέντρωση του γενετικού υλικού, η οποία ήταν 5,4 ng/μl. Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης, το DNA αποθηκεύτηκε στους -20 °C.

## 2.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και Ηλεκτροφόρηση

Το κύριο μίγμα της αντίδρασης PCR που χρησιμοποιήθηκε είχε την αναλογία αντιδραστηρίων όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, για κάθε δείγμα.

**Πίνακας 1:** Συγκέντρωση σε (μl) του κάθε αντιδραστηρίου που χρησιμοποιείται σε αντίδραση PCR ενός δείγματος.

Αντιδραστήρια στην PCR ενός δείγματος	Ποσότητα σε (μl)
Buffer 4X	4
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2
dNTPs (2,5 mM)	2
Εκκινητής 5'-3' (100 μM)	0,1
Εκκινητής 3'-5' (100 μM)	0,1
Ταq DNA πολυμεράση (5 u/μl)	0,2
Δείγμα DNA	0,5
Νερό PCR	11,1
Σύνολο	20

Πραγματοποιήθηκε PCR του δείγματος AbFe2 σε διαφορετικούς κύκλους (22x, 24x, 26x, 28x, 30x) ώστε να διαπιστωθεί σε ποιους κύκλους γίνεται η έκφραση του 16S rRNA γονιδίου (ικανοποιητική ένταση ζώνης και έλλειψη μη ειδικών ζωνών). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι για το δείγμα AbFe2 το βακτηριακό γενετικό υλικό εμφανίζεται πιο καθαρά στους 26 κύκλους. Στις PCR που έγιναν ακολουθήθηκε το πρόγραμμα που φαίνεται στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 2:** Πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τις PCR που πραγματοποιήθηκαν.

<b>Προ- PCR</b>	96 °C / 3:00 λεπτά (Αποδιάταξη των αλυσίδων)
<b>26 Κύκλοι</b>	96 °C / 1:00 λεπτό (Αποδιάταξη)
	44 °C / 1:00 λεπτό (Σύνδεση εκκινητών)
	72 °C / 2:00 λεπτά (Επιμήκυνση)
<b>Μετά- PCR</b>	72 °C / 10:00 λεπτά (Τελική Επιμήκυνση)

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR ήταν οι:

GM3 (5'-AGAGTTTGATCCTGGC -3') (Muyzer *et al.* 1995).

GM4 (3'-TACCTTGTACGACTT -5') (Kane *et al.* 1993).

Οι GM3, GM4 χρησιμοποιήθηκαν διότι ενισχύουν αποκλειστικά το 16S rRNA γονίδιο των Bacteria.

Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1% σε διάλυμα TAE 1X Buffer σε συνθήκες 95 V, 30 min. Για την χρώση χρησιμοποιήθηκε EtBr (βρωμιούχο αιθίδιο).

#### **2.4 Καθαρισμός PCR προϊόντος και απομόνωση από πήκτωμα αγαρόζης**

Για τον καθαρισμό του προϊόντος της PCR από τα αντιδραστήρια της PCR (π.χ. εκκινητές, μη ειδικά κομμάτια) χρησιμοποιήθηκε το Kit Montage PCR (Milipore U.S.A). Ο ηλεκτροφορητικός έλεγχος μετά τον καθαρισμό έδειξε την παραμονή των αντιδραστηρίων και ακολουθήθηκε περεταίρω καθαρισμός της επιθυμητής ζώνης από πήκτωμα αγαρόζης.

Έγινε ηλεκτροφόρηση στα προϊόντα της PCR σε 1% πήκτωμα αγαρόζης στα 75 V για 45 λεπτά. Στο κελί του πηκτώματος φορτώθηκαν 50 µl δείγματος, 4 µl χρωστική και

κατόπιν με αποστειρωμένο νυστέρι απομονώθηκε η ζώνη στην οποία υπήρχε το επιθυμητό κομμάτι DNA προς κλωνοποίηση. Η ζώνη που κόπηκε τοποθετήθηκε σε προζυγισμένο σωληνάκι και στην συνέχεια ακολουθήθηκαν ακριβώς οι οδηγίες του Wizard SV kit, (PROMEGA U.S.A). Το τελικό προϊόν διαλύθηκε σε 25 μl PCR νερού.

## 2.5 Κλωνοποίηση

Μόλις ολοκληρώθηκε η διαδικασία καθαρισμού του PCR προϊόντος από το πήκτωμα αγαρόζης, έγινε κλωνοποίηση του επιθυμητού γονιδίου. Για την κλωνοποίηση χρησιμοποιήθηκε το TOPO TA Cloning kit for Sequencing (Invitrogen, U.S.A). Κατά τη διαδικασία της κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτροδεκτικά κύτταρα *Escherichia coli* και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή με τη μόνη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν οι μισές από τις αναγραφόμενες αναλογίες. Δηλαδή PCR δείγμα 2 μl, αραιωμένο άλας 0,5 μl, πλασμίδιο 0,5 μl και τελικός όγκος μίγματος 3 μl.

Το μίγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά ώστε να γίνει η ενσωμάτωση του γονιδίου στο πλασμίδιο και στην συνέχεια αναμίχθηκε με TOP10 ηλεκτροδεκτικά κύτταρα *E.coli*. Κατόπιν τα κύτταρα διεγέρθηκαν στα 1800 V για 3,6 ms και προστέθηκε 250 μl S.O.C θρεπτικό μέσο. Μόλις ολοκληρώθηκε η διαδικασία μεταφέρθηκε το μετασχηματισμένο προϊόν στους 37 °C για 1 ώρα.

Η επίστρωση έγινε σε ασηπτικές συνθήκες. Σε τρία τρυβλία επιστρώθηκαν 30-60-90 μl κυττάρων και επώαστηκαν στους 37°C για μια νύχτα (18 ώρες).

Στα τρυβλία αναπτύσσονται μόνο κύτταρα τα οποία περιέχουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια και αυτό γιατί στην περιοχή του πολυσύνδεσμου βρίσκεται το θνησιγόνο γονίδιο *ccdB* το οποίο μένει αδρανές όταν ενσωματώνεται το γονίδιο εξαιτίας αλλαγής στο πλαίσιο ανάγνωσης (Bernard et al. 1994).

## 2.6 Επεξεργασία αποικιών μετά την κλωνοποίηση

Μόλις αναπτύχθηκαν τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli* στα τρυβλία το επόμενο βήμα ήταν η τυχαία επιλογή των κλώνων για έλεγχο. Οι κλώνοι αυτοί μεταφέρθηκαν σε άλλο τρυβλίο, το οποίο είχε αριθμηθεί κατάλληλα και αφέθηκαν για περίπου μια νύχτα (18 ώρες) να αναπτυχθούν στο νέο τρυβλίο.

Μόλις αναπτύχθηκαν οι θετικοί κλώνοι έγινε δοκιμαστική PCR με εκκινητές τους:

M13F (5'-GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA-3') και

M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3').

Οι εκκινητές αυτοί είναι ειδικοί μόνο για το συγκεκριμένο πλασμίδιο. Το πρόγραμμα της PCR που πραγματοποιήθηκε φαίνεται στον Πίνακα 3:

**Πίνακας 3:** Πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την PCR των κλώνων.

<b>Προ- PCR</b>	94 °C/ 2:00 λεπτά (Αποδιάταξη των αλυσίδων)
<b>25 κύκλοι</b>	94 °C /0:45 δευτερόλεπτα (Αποδιάταξη)
	52,5 °C /1:00 δευτερόλεπτα (Σύνδεση εκκινητών)
	72 °C /2:00 λεπτά (Επιμήκυνση)
<b>Μετά- PCR</b>	72 °C /10:00 λεπτά (Τελική Επιμήκυνση)

## 2.7 Υγρές καλλιέργειες

Για τις υγρές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα Luria-Bertani (LB). Στη συνέχεια προστέθηκε καναμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 5 µg/µl, ώστε να επιτραπεί η ανάπτυξη μόνο των μικροοργανισμών με ανασυνδυασμένο DNA.

Οι κλώνοι με το επιθυμητό ένθεμα εμβολιάστηκαν σε 1900μl LB και επώαστηκαν στους 37°C για 16 ώρες σε αναδευτήρα (200 rpm). Από τις υγρές καλλιέργειες αποθηκεύτηκαν 100 μl από κάθε κλώνο σε διάλυμα γλυκερόλης (25%) τελικής συγκέντρωσης, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για μελλοντικές αναλύσεις.

## **2.8 Απομόνωση πλασμιδίου**

Για την απομόνωση του πλασμιδίου χρησιμοποιήθηκε το Plasmid DNA Purification, Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel, Germany). Ακολουθήθηκαν πιστά οι οδηγίες του κατασκευαστή.

## **2.9 Αλληλούχιση**

Η αλληλούχιση έγινε με ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς κατά Sanger (Beckman, U.K.) με συσκευή Sequencer ABI 3700. Για την αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές του πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκαν προηγουμένως (M13F, M13R) οι οποίοι βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης εισαγωγής του γονιδίου στο πλασμίδιο.

## **2.10 Συγκριτική ανάλυση με τη βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου καραβίδων του Παγασητικού Κολπου με χρήση βάσεων δεδομένων**

Στη συνέχεια οι αλληλουχίες του δείγματος του Arbroath συγκρίθηκαν με τη βοήθεια της χρήσης του προγράμματος BLAST με τις αλληλουχίες της Μεσογείου για τον μήνα Φεβρουάριο (Meziti *et al.*, in press). Το πρόγραμμα BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), είναι ένας αλγόριθμος για τη σύγκριση των πρωτογενών πληροφοριών βιολογικής προελεύσεως, όπως αλληλουχίες αμινοξέων ή αλληλουχίες νουκλεοτιδίων. Μια αναζήτηση στο BLAST επιτρέπει σε έναν ερευνητή να συγκρίνει

μια αλληλουχία σε βάσεις δεδομένων αλληλουχιών, και να εντοπίσει αλληλουχίες που μοιάζουν με την αλληλουχία που αυτός εισήγαγε (Altschul *et al.* 1990).

### **2.11 Φυλογενετική ανάλυση και κατασκευή φυλογενετικού δένδρου**

Οι αλληλουχίες, των φυλότυπων που εντοπίστηκαν συγκρίθηκαν με ήδη γνωστές αλληλουχίες της GENBANK μέσω της χρήσης του προγράμματος BLAST. Σκοπός της χρήσης του προγράμματος ήταν να βρεθούν οι πλησιέστεροι συγγενείς των φυλότυπων του δείγματος που εξετάστηκε.

Στη συνέχεια, οι αλληλουχίες τοποθετήθηκαν στο πρόγραμμα MEGA\_4x1\_Beta3 (Tamura *et al.* 2007) όπου ακολούθησε ευθυγράμμιση των αλληλουχιών με τους ήδη γνωστούς συγγενείς, επεξεργασία με τη μέθοδο αποστάσεων Neighbour-Joining και διόρθωση με τη μέθοδο Jukes Cantor και στη συνέχεια τοποθέτηση των αλληλουχιών σε φυλογενετικό δέντρο.

Η μέθοδος Neighbour Joining αποτελεί μία μέθοδο αποστάσεων. Σε αυτήν τη μέθοδο, οι αποστάσεις εκφράζονται ως το ποσοστό των περιοχών που διαφέρουν ανάμεσα σε δύο αλληλουχίες σε μία πολλαπλή ευθυγράμμιση. Αποτελεί μία αλγοριθμική μέθοδο στην οποία χρησιμοποιούνται υπολογισμοί που περιλαμβάνουν τον χειρισμό μίας μήτρας αποστάσεων που προκύπτει από τις πολλαπλές ευθυγραμμίσεις. Κάθε φορά που ξεκινάει μία ευθυγράμμιση, υπολογίζεται για κάθε ζεύγος αλληλουχιών η απόσταση ή το ποσοστό των διαφορών και καταγράφονται τα στοιχεία στη μήτρα των αποστάσεων (Hall 2001).

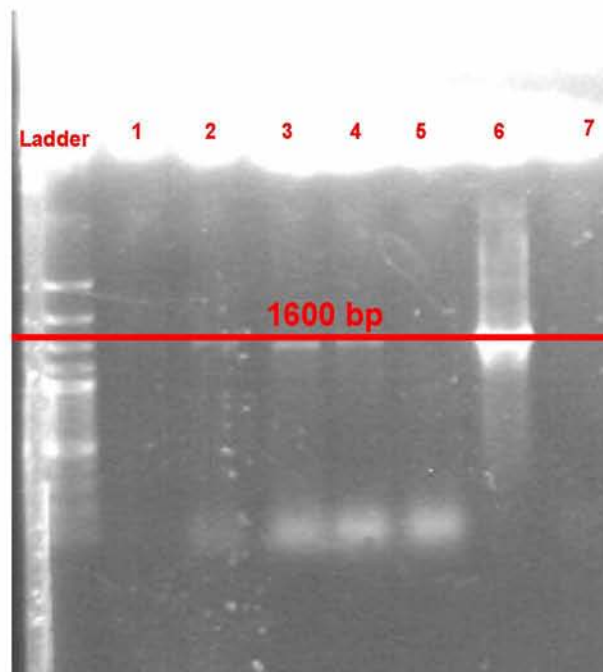
Το φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε έχει τη μορφή φυλλογράμματος. Σε ένα φυλλόγραμμα, όλοι οι απόγονοι ενός κοινού προγόνου, που απεικονίζεται με έναν κόμβο, ανήκουν στον ίδιο κλάδο ή στην ίδια μονοφυλετική ομάδα. Το φυλόγραμμα

δίνει πληροφορίες και για την σειρά των κλάδων, αλλά και για τις γενετικές αποστάσεις μεταξύ των διαφόρων ομάδων.



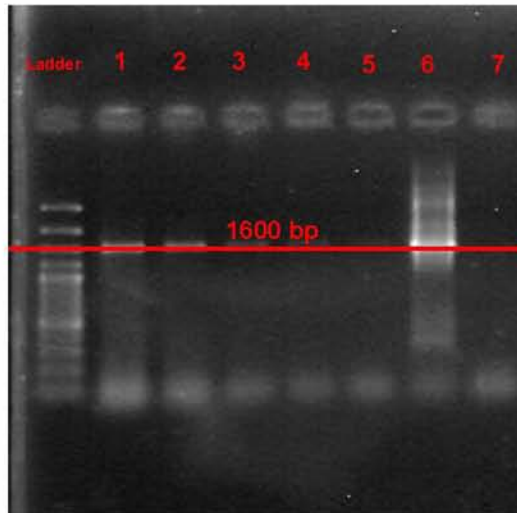
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ενίσχυση των 16S rRNA γονιδίων στο δείγμα AbFe2 με τους εκκινητές GM3-GM4 ήταν επιτυχής. Τα αποτελέσματα της PCR δείχνονται στην Εικόνα 4.



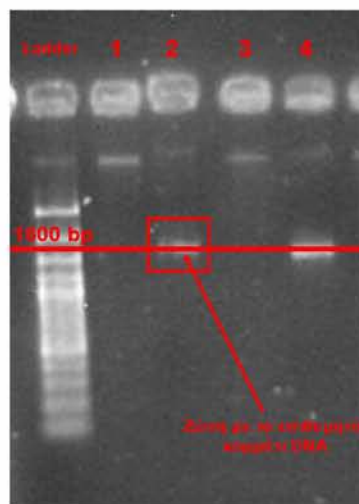
**Εικόνα 4:** Αποτελέσματα Ηλεκτροφόρησης της PCR σε διαφορετικούς κύκλους του δείγματος. Διάδρομος 1: 22 κύκλοι, Διάδρομος 2: 24 κύκλοι, Διάδρομος 3: 25 κύκλοι, Διάδρομος 4: 28 κύκλοι, Διάδρομος 5: 30 κύκλοι, Διάδρομος 6: 24 κύκλοι (θετικό), Διάδρομος 7: 30 κύκλοι (αρνητικό).

Επίσης έγινε ακόμη μία δοκιμαστική PCR μόνο στους 26 κύκλους για το δείγμα AbFe2, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.



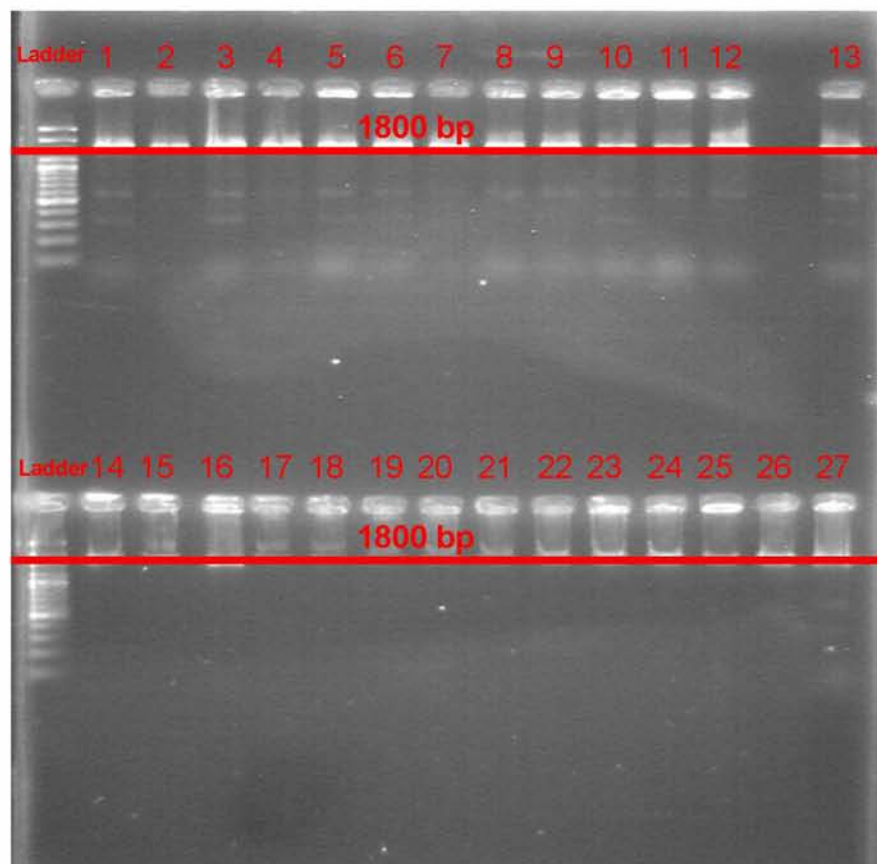
**Εικόνα 5:** Αποτελέσματα Ηλεκτροφόρησης της PCR με τους εκκινητές GM3-GM4 στους 26 κύκλους. Διάδρομος 1: AbFe2 , Διάδρομος 2: δείγμα AbFe2, Διάδρομος 3: δείγμα AbFe2, Διάδρομος 4: δείγμα AbFe2, Διάδρομος 5: AbFe2, Διάδρομος 6: (θετικό). Διάδρομος 7: (αρνητικό).

Στην Εικόνα 6 δείχνεται η καθαρισμένη ζώνη που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση.



**Εικόνα 6:** Αποτελέσματα Ηλεκτροφόρησης της PCR από καθαρισμό πηκτώματος αγαρόζης. Διάδρομος 1: κενός, Διάδρομος 2: δείγμα AbFe2, Διάδρομος 3: (αρνητικό), Διάδρομος 4: (θετικό).

Στην Εικόνα 7 δείχνονται οι κλώνοι που ενσωμάτωσαν σωστά το γονίδιο, και είναι αυτοί που εμφανίζουν φωτεινή ζώνη κοντά στις 1800 βάσεις. Με τη βοήθεια της Εικόνας 7 έγινε η επιλογή των κλώνων που είχαν ενσωματώσει το επιθυμητό γονίδιο για τη μετέπειτα ανάπτυξή τους σε υγρές καλλιέργειες.



**Εικόνα 7:** Ηλεκτροφόρηση της PCR για την επιλογή των κλώνων. Συνολικά 27 κλώνοι, από τον διάδρομο 1 έως τον 27.

Η βακτηριακή ποικιλότητα (Πίνακας 4) του εντέρου καραβίδων της Μεσογείου είχε μελετηθεί παλαιότερα σε δείγματα του Παγασητικού κόλπου (Meziti *et al.*, in press), τα

αποτελέσματα των οποίων χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία για τη συγκριτική μελέτη με το δείγμα της Βορείου Θάλασσας. Χρησιμοποιήθηκαν οι φυλότυποι του ίδιου μήνα δειγματοληψίας με αυτόν του Arbroath (Φεβρουάριος).

**Πίνακας 4:** Οι κοντινότεροι συγγενείς των φυλοτύπων στο δείγμα της Μεσογείου.

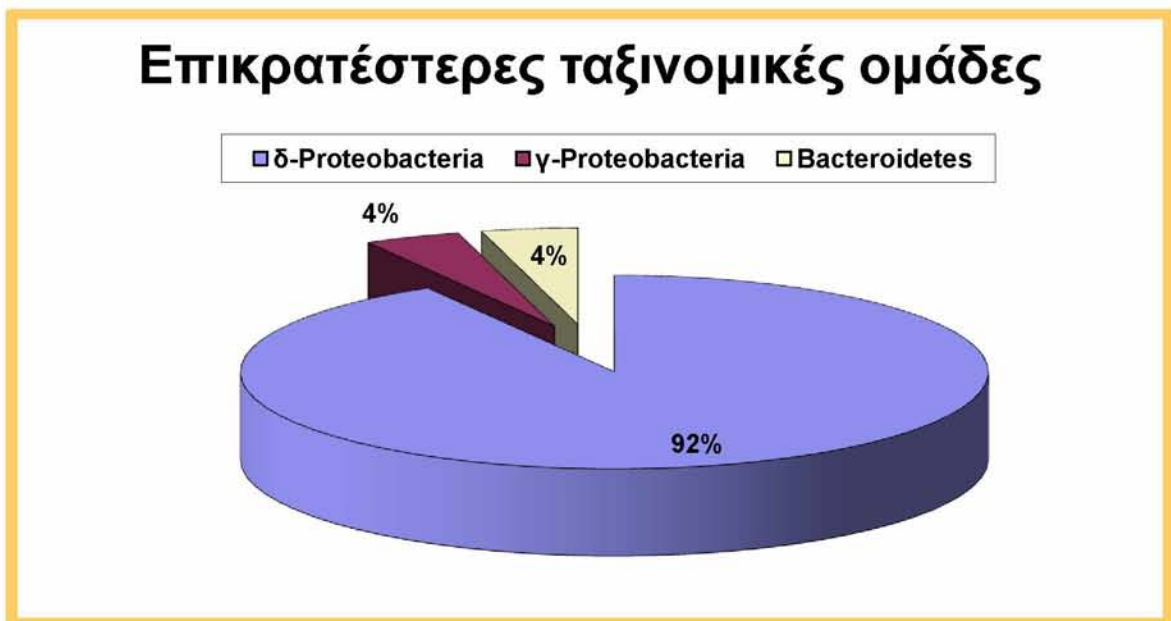
Φυλότυποι	Πλησιέστερος συγγενής φυλότυπος (Αριθμός GenBank)	Περιγραφή/ Ενδιαίτημα	%Ομοιότητα	Συστηματική κατάταξη
Κλώνος F1-28 (GQ866099)	Κλώνος CI35 I6S <i>Pseudoalteromonas sp.</i> (FJ695595)	Στη βλέννα του κοραλλιού <i>Acropora digitifera</i>	98%	γ-Proteobacteria
Κλώνος F1-26 (GQ866098)	Κλώνος HCM3MC80_12C_FL (EU374093)	Ίζημα σε υποθαλάσσιο φαράγγι	99%	Actinobacteria
Κλώνος F1-20 (GQ866097)	Κλώνος B8H (FJ205244)	Σε ανενεργή υδροθερμική πηγή, βάθος: 2.350 m	98%	Actinobacteria
Κλώνος F1-19 (GQ866096)	Κλώνος GoC_Bac_125_D2_C0_M0 (FJ813532)	Θαλάσσιο ίζημα	99%	Acidobacteria
Κλώνος F1-18 (GQ866095)	Κλώνος MSB-4G12 (DQ811871)	Μαγκρόβιο έδαφος	98%	Chloroflexi
Κλώνος F1-6 (GQ866094)	Κλώνος S2-55 (FJ545576)	Ίζημα βόρειας Κίτρινης Θάλασσας	96%	Acidobacteria
Κλώνος F1-2 (GQ866093)	Κλώνος livecontrolB16 (FJ264750)	Ίζημα ανάβλυσης μεθανίου	97%	γ-Proteobacteria
Κλώνος F1-7 (GQ866092)	Κλώνος F1-26 (GQ866098)	Έντερο <i>Nephrops norvegicus</i>	97%	Actinobacteria
Κλώνος F1-4 (GQ866091)	Κλώνος KOPRI24929 (EF101547)	Στο φύκος <i>Undaria pinnatifida</i>	99%	γ-Proteobacteria
Κλώνος F1-5 (GQ866090)	Κλώνος <i>Pseudoalteromonas sp.</i> SUR560 (AB038036)	-	99%	γ-Proteobacteria

Μετά την αλληλούχιση των 16S rRNA γονιδίων και τη σύγκριση με τις αλληλουχίες της GENBANK εντοπίστηκαν οι κοντινότεροι συγγενείς φυλότυποι που βρέθηκαν στο δείγμα AbFe2 (Πίνακας 5).

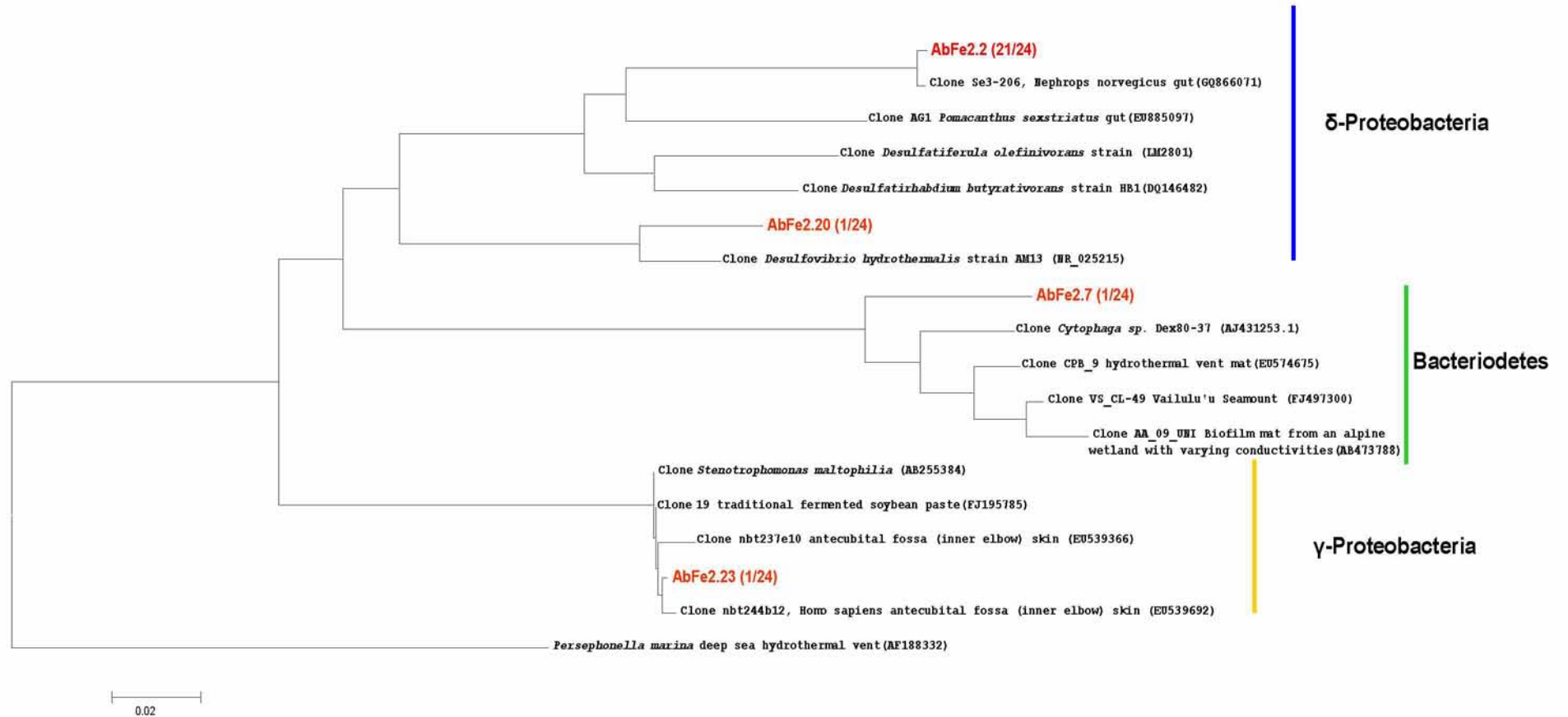
**Πίνακας 5:** Οι κοντινότεροι συγγενείς των φυλοτύπων στο δείγμα AbFe2.

Πλασμίδιο	Πλησιέστεροι συγγενείς φυλότυποι (Αριθμός GenBank)	%Ομοιότητα	Περιγραφή/ Ενδιαίτημα	Πλησιέστερος καλλιεργημένος συγγενής φυλότυπος (Αριθμός GenBank)	%Ομοιότητα	Αφθονία	Συστηματική κατάταξη
AbFe 2.2	Κλώνος Se3-206 (GQ866071)	99%	Έντερο <i>Nephrops norvegicus</i> από Παγασητικό κόλπο	<i>Desulfatiferula olefinivorans</i> στέλεχος LM2801 (DQ826724)	87%	21	δ-Proteobacteria
AbFe 2.7	Κλώνος CPB_9 (EU574675)	93%	Τάπητας υδροθερμικού πεδίου	<i>Cytophaga sp.</i> στέλεχος Dex80-37 (AJ431253)	92%	1	Bacteroidetes
AbFe 2.20	<i>Desulfovibrio hydrothermalis</i> AM13 (NR025215)	96%	Υδροθερμικά πεδία	Θειϊκοαναγωγικά βακτήρια στέλεχος Aspo3 (X95231)	96%	1	δ-Proteobacteria
AbFe 2.23	Κλώνος nbt244b12 (EU539692)	98%	Στο ανθρώπινο δέρμα	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> στέλεχος K279a (AM743169)	97%	1	γ-Proteobacteria

Παράλληλα, κατασκευάστηκε και το αντίστοιχο γράφημα σε μορφή πίτας (Σχήμα 1) για την αναπαράσταση του συνολικού αριθμού (%) των επικρατέστερων ταξινομικών ομάδων από όλο το δείγμα που ερευνήθηκε, ενώ κατασκευάστηκε και το αντίστοιχο φυλογενετικό δένδρο (Εικόνα 8).



**Σχήμα 1:** Ποσοστά (%) των επικρατέστερων ταξινομικών ομάδων βακτηρίων που βρέθηκαν στο μεσέντερο του δείγματος AbFe2.



**Εικόνα 8:** Δέντρο φυλοτύπων του δείγματος AbFe2. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι κλώνοι που βρέθηκαν στο έντερο. Η ενδεικτική γραμμή στο τέλος της εικόνας υποδεικνύει ότι στο συγκεκριμένο μήκος κλαδιού αντιστοιχούν 0,02 αλλαγές ανά νουκλεοτίδιο.



Τα αποτελέσματα του Blast έδειξαν ότι η κυρίαρχη φυλογενετική ομάδα στα δείγματα του Παγασητικού κόλπου ήταν τα  $\gamma$ -Proteobacteria (Meziti *et al.*, in press) εν αντιθέσει με το δείγμα της Βορείου Θάλασσας που ήταν τα  $\delta$ -Proteobacteria.

Στο δείγμα από τον Παγασητικό Κόλπο εντοπίστηκαν αντιπρόσωποι από τις ομάδες των  $\gamma$ -Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria και των Chloroflexi. Κυρίαρχη ταξινομική ομάδα για το δείγμα του Φεβρουαρίου του Παγασητικού Κόλπου ήταν τα  $\gamma$ -Proteobacteria (Meziti *et al.*, in press), όπου ήταν και η μόνη κοινή ομάδα με το δείγμα της Βορείου Θάλασσας για το μήνα Φεβρουάριο.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου της караβίδας *N. norvegicus* σε δείγμα ενός ατόμου που συλλέχθηκε από τη θαλάσσια περιοχή του Arbroath. Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 5, οι συγγενείς φυλότυποι των βακτηριακών κλώνων που εντοπίστηκαν ομαδοποιούνται σε διαφορετικές ταξινομικές ομάδες. Συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν αντιπρόσωποι μόνο από τα φύλα των Proteobacteria και Bacteroidetes. Βρέθηκαν αντιπρόσωποι των υποφύλων των γ- και δ-Proteobacteria, αλλά και ένας αντιπρόσωπος του γένους των Cytophaga.

Σκοπός της έρευνας αυτής είναι να συγκριθούν οι αλληλουχίες των φυλότυπων που εντοπίστηκαν στο έντερο του ατόμου που εξετάστηκε με ήδη γνωστές αλληλουχίες της GENBANK προερχόμενες από το έντερο του ίδιου είδους αλλά από διαφορετικό ενδιαίτημα, τη Μεσόγειο θάλασσα. Μέσω αυτής της συγκρίσεως, διερευνήθηκε εάν η βακτηριακή κοινότητα στο έντερο του *N. norvegicus* μεταβάλλεται ανάλογα με το ενδιαίτημα του, καθώς έχει βρεθεί ότι η βακτηριακή κοινότητα του εντέρου της караβίδας από την ίδια περιοχή εμφανίζει κοινούς φυλότυπους (Meziti *et al.*, in press). Να σημειωθεί πως κατά το χρονικό διάστημα δειγματοληψίας των караβίδων, δηλαδή προς τα τέλη του χειμώνα (Φεβρουάριος), το ποσοστό της πρωτογενούς παραγωγικότητας στη Σκωτία είναι ιδιαίτερα χαμηλό σε σχέση με τις υπόλοιπες εποχές του έτους (Moll 1998) καθώς υπάρχουν φυσικοχημικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες που αναστέλλουν την αύξηση της πρωτογενούς παραγωγής (Moll 1998). Η χαμηλή πρωτογενής παραγωγικότητα το μήνα Φεβρουάριο στη θαλάσσια περιοχή του Arbroath, πιθανώς να επηρεάζει τη διαθεσιμότητα της τροφής της караβίδας και ως εκ τούτου την ποικιλότητα και την αφθονία των οργανισμών στο έντερο του οργανισμού, όπως έχει βρεθεί για τον ίδιο οργανισμό στον Παγασητικό Κόλπο (Meziti *et al.*, in press).

Ωστόσο, με την παρούσα εργασία δεν είναι δυνατό να αποδειχθεί πλήρως εάν όλοι οι φυλότυποι που βρέθηκαν στο έντερο της καραβίδας προέρχονται από την τροφή της, το ενδιαίτημα της ή αποτελούν μόνιμους συμβιώτες του πεπτικού της συστήματος.

Για τους φυλότυπους που βρέθηκαν στο δείγμα της Σκωτίας θεωρήθηκε ότι ένας φυλότυπος ανήκει στο ίδιο είδος βακτηρίων με κάποιον άλλο, μόνον εάν το ποσοστό ομοιότητας των αλληλουχιών τους ήταν άνω του 97% και στο ίδιο γένος μόνον εάν το ποσοστό ομοιότητας τους ήταν άνω του 90%, όπως ορίζουν οι Stackenbrandt & Goebel (1994). Σύμφωνα λοιπόν με τα στοιχεία του Πίνακα 5 και του Σχήματος 1, ο επικρατέστερος φυλότυπος συγκριτικά με τους υπόλοιπους ήταν του κλώνου AbFe 2.2 με αφθονία 21 κλώνων (συχνότητα εμφάνισης 87,5%). Ο συγκεκριμένος φυλότυπος είχε ομοιότητα 99% με το φυλότυπο Se3-206 (GQ866071) που έχει εντοπιστεί στο έντερο του *N. norvegicus* από τον Παγασητικό Κόλπο (Meziti *et al.*, in press). Το ποσοστό ομοιότητας (87%) με τον κοντινότερο καλλιεργημένο συγγενή το *Desulfatiferula olefinivorans* LM2801 (DQ826724) είναι κατώτερο αυτού που μπορεί να χαρακτηρίσει ότι ανήκουν στο ίδιο γένος, και μάλλον πρόκειται για νέο, ακαλλιέργητο βακτηριακό είδος.

Ο φυλότυπος AbFe 2.7 απαντήθηκε σε αφθονία ενός κλώνου, σε ποσοστό μόλις 4%, όπως και οι υπόλοιποι φυλότυποι. Η ομοιότητά του είχε ποσοστό 93% με τον πλησιέστερο συγγενή CPB\_9 (EU574675) που απαντάται σε τάπητα υδροθερμικών πηγών. Το ποσοστό ομοιότητας δείχνει ότι ο συγκεκριμένος κλώνος πιθανώς να ανήκει στο ίδιο γένος με τον πλησιέστερο συγγενή. Οι δύο αυτοί φυλότυποι μάλλον ανήκουν στο γένος *Cytophaga*, καθώς το ποσοστό ομοιότητας του φυλότυπου AbFe 2.7 αγγίζει το 92% με το στέλεχος *Cytophaga sp.* Dex80-37 (AJ431253).

Ο κλώνος AbFe 2.20 έχει το ίδιο ποσοστό ομοιότητας (96%) τόσο με τον πρώτο πλησιέστερο γνωστό συγγενή, το *Desulfovibrio hydrothermalis* (NR025215) που απαντάται σε υδροθερμικές πηγές, ο οποίος ανήκει στα θειϊκοαναγωγικά βακτήρια. Η πληροφορία αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα πως πιθανόν ο κλώνος αυτός να βρίσκεται στο ίδιο γένος με τους προαναφερθέντες πλησιέστερους συγγενείς. Το *Desulfovibrio hydrothermalis* (Alazard *et al.* 2003) ανήκει στα Gram αρνητικά βακτήρια. Το συγκεκριμένο βακτήριο έχει απαντηθεί σε μεγάλα ωκεάνια βάθη ( $\approx 2600$  m) και συγκεκριμένα σε σημεία εκβολής υδροθερμικών πηγών. Αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 20-40 °C, με μέγιστη ανάπτυξη στους 35 °C και σε τιμές pH από 7-8. Βάσει αυτών των χαρακτηριστικών αύξησης, και της χαμηλότερης θερμοκρασίας που επικρατεί στην περιοχή ανάπτυξης της караβίδας, είναι πιθανόν ο φυλότυπος αυτός να εκπροσωπεί ένα μεταβολικώς ανενεργό είδος στο έντερο του οργανισμού αυτού. Ο επόμενος πλησιέστερος συγγενής (μέλος της ομάδας Asp03) είναι κι αυτός θειϊκοαναγωγικός μικροοργανισμός αλλά ακαλλιέργητος. Τα βακτήρια της ομάδας αυτής έχουν απομονωθεί από υπόγεια θαλάσσια ύδατα (Pedersen *et al.* 1996).

Τέλος, ο φυλότυπος του βακτηριακού κλώνου AbFe 2.23 παρουσίασε 98% ομοιότητα με τον πλησιέστερο συγγενή του, ο οποίος ήταν ένα ακαλλιέργητο βακτήριο (κλώνος nbt244b12, EU539692) προερχόμενο από τον άνθρωπο. Το ποσοστό αυτό ομοιότητας φανερώνει ότι ο κλώνος AbFe 2.23 ανήκει πιθανότατα στο ίδιο είδος με το μη καλλιεργημένο βακτήριο, αφού το ποσοστό ομοιότητας ξεπερνάει το 97%. Το ίδιο ισχύει και με τον πλησιέστερο καλλιεργημένο συγγενή το *Stenotrophomonas maltophilia* (AM743169), αφού το ποσοστό ομοιότητας άγγιζε ακριβώς το όριο 97%. Το *Stenotrophomonas maltophilia* είναι Gram αρνητικό βακτήριο. Έχουν απομονωθεί στελέχη του είδους αυτού από ποικίλα περιβάλλοντα, όπως έδαφος, ρυπασμένα ύδατα

ιλυώδεις περιοχές. Η οικοσυστημική τους λειτουργία επικεντρώνεται κυρίως στη βιοδιάσπαση πολύπλοκων οργανικών ενώσεων (Hu *et al.* 2006) και είναι πιθανό αυτός να είναι και ο ρόλος τους στο έντερο της καραβίδας.

Το συμπέρασμα που προκύπτει από τα παραπάνω είναι ότι η πλειοψηφία των κλώνων εμφάνισαν ως πλησιέστερο συγγενή φυλότυπο ακαλλιέργητα βακτήρια, ενώ οι πλησιέστεροι καλλιεργημένοι συγγενείς φυλότυποι παρουσίασαν χαμηλά ποσοστά ομοιότητας.

Τα δ-Proteobacteria που αποτέλεσαν και την επικρατέστερη ταξινομική ομάδα στο δείγμα που ερευνήθηκε ( $\approx 92\%$ ) ανήκουν στο φύλο Proteobacteria και πιθανότατα συμβάλλουν στην αποικοδόμηση και στην παραγωγή ουσιών με μεγάλη ενεργειακή αξία μέσω του χημειοετερότροφου μεταβολισμού τους. Απαντώνται συνήθως σε αναερόβια περιβάλλοντα συμβάλλοντας στην αναγωγή των θειικών ενώσεων (π.χ. θειικοαναγωγικά βακτήρια *Asp03*). Παρόμοιες λειτουργίες αυτής της βακτηριακής ομάδας στο πεπτικό σύστημα άλλων ασπονδύλων, όπως των πολύχαιτων, έχουν καταγραφεί και στο παρελθόν (Li *et al.* 2009).

Οι εκπρόσωποι του υποφύλου γ-Proteobacteria που απαντώνται στο πεπτικό σύστημα των καρκινοειδών χαρακτηρίζονται κυρίως από την παραγωγή ενζυμικών συστημάτων, τα οποία συνδέονται με την αποδόμηση των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και της χιτίνης (δομικός πολυσακχαρίτης του εξωσκελετού των καρκινοειδών) (Harris *et al.* 1991). Πιθανότατα, τα γ-Proteobacteria να βοηθούν στην πέψη και το μεταβολισμό της τροφής μέσω της έκκρισης συγκεκριμένων ενζύμων (Harris *et al.* 1991).

Παρόμοιος ρόλος στην πέψη και το μεταβολισμό των τροφών έχει παρατηρηθεί και για την ταξινομική ομάδα των Cytophaga. Σύμφωνα με επιστημονικές αναφορές εκπρόσωποι της παρούσας ταξινομικής ομάδας συμβάλλουν στη βελτίωση της

πεπτικότητας της τροφής μέσα από την παραγωγή συγκεκριμένων ενζύμων σε συγκεκριμένους ιστούς του πεπτικού συστήματος, όπως το έντερο (Harris *et al.* 1991).

Σχετικά με το *N. norvegicus* του Παγασητικού Κόλπου, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πλειοψηφία των βακτηριακών κοινοτήτων στο έντερο του ήταν εκπρόσωποι του υποφύλου  $\gamma$ -Proteobacteria για το μήνα Φεβρουάριο, εν αντιθέσει με αυτά του *N. norvegicus* του Arbroath, όπου η επικρατέστερη ταξινομική ομάδα ήταν τα  $\delta$ -Proteobacteria. Αυτή η διαφοροποίηση πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι το μήνα Φεβρουάριο που έγιναν οι δειγματοληψίες υπάρχουν διαφορετικά επίπεδα πρωτογενούς παραγωγής στις περιοχές δειγματοληψίας. Στον Παγασητικό Κόλπο, το μήνα Φεβρουάριο, η άνθιση του φυτοπλαγκτού μόλις έχει ολοκληρωθεί και με τα ποσοστά της πρωτογενούς παραγωγής έπειτα να φθίνουν (Petihakis *et al.* 2005). Ίσως για το λόγο αυτό, οι κυρίαρχες ταξινομικές ομάδες βακτηρίων στο δείγμα του Παγασητικού Κόλπου ( $\gamma$ -Proteobacteria) να διέφεραν από εκείνες του δείγματος του Arbroath ( $\delta$ -Proteobacteria). Στο Arbroath, την περίοδο του Φεβρουαρίου, δεν έχει ξεκινήσει η άνθιση του φυτοπλαγκτού (Moll 1998). Μέσω της τροφικής αλυσίδας τα επίπεδα της πρωτογενούς παραγωγής επηρεάζουν άμεσα τους οργανισμούς και πιθανώς και την βακτηριακή ποικιλότητα στο έντερο της караβίδας μέσω της διατροφής. Επίσης η διαφορετική ποικιλότητα των βακτηρίων θα μπορούσε να οφείλεται στα διαφορετικά ενδιαιτήματα και τις διαφορετικές φυσικοχημικές παραμέτρους των δύο περιοχών ακόμη και στη διαφορετική φύση των ιζημάτων τους και γενικότερα του βενθικού υποστρώματός τους.

Οι περισσότεροι φυλότυποι βακτηρίων που εντοπίστηκαν στο έντερο της караβίδας από το δείγμα του Παγασητικού Κόλπου παρουσίασαν κοντινότερους συγγενείς με βακτήρια που έχουν απαντηθεί σε ιζήματα. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο

λαμβάνοντας υπόψη ότι το *N. norvegicus* είναι ένας βενθικός οργανισμός που διατρέφεται με άλλους βενθικούς και επιβενθικούς οργανισμούς που διαβιούν μέσα ή πάνω στο ίζημα, αντίστοιχα, όπως π.χ. μαλάκια, καρκινοειδή, πολύχαιτοι, εχινόδερμα κ.λπ. Επίσης, το *N. norvegicus* εκτός από ενεργός θηρευτής είναι ταυτόχρονα και σαπροφάγος. Έτσι, η παρουσία βακτηριακών φυλότυπων στο έντερο του *N. norvegicus* παρόμοιων με αυτών που έχουν απαντηθεί σε ιζήματα, όπως των HCM3MC80\_12C\_FL, GoC\_Bac\_125\_D2\_C0\_M0, S2-55 και livecontrolB16 του Πίνακα 4, θα μπορούσε να εξηγηθεί και από τη σαπροφαγική διατροφική συμπεριφορά του. Συγκεκριμένα, η διατροφή του *N. norvegicus* με νεκρή οργανική ύλη που κείτεται στο ίζημα μπορεί να οδήγησε στην παρουσία των τελευταίων στο έντερο του *N. norvegicus*.

Η επανεμφάνιση του επικρατέστερου φυλότυπου AbFe2.2 περισσότερες από μια φορές (21/24) στο έντερο του *N. norvegicus* της Βορείου Θάλασσας και η στενή του ομοιότητα 99% με τον κλώνο Se3-206 από το έντερο του ίδιου είδους στον Παγασητικό Κόλπο πιθανώς να υποδεικνύει τη συνεισφορά του συγκεκριμένου βακτηρίου στις πεπτικές λειτουργίες του είδους ανεξαρτήτως ενδιαιτήματος. Επίσης η ύπαρξη κοινής ταξινομικής ομάδας  $\gamma$ -Proteobacteria στο έντερο ατόμων που προέρχονταν από απομακρυσμένα ενδιαιτήματα οδηγεί πιθανώς προς το ίδιο συμπέρασμα. Η εμφάνιση φυλοτύπων, όπως του υποφύλου των  $\delta$ -Proteobacteria, με κοντινότερους συγγενείς που έχουν εντοπιστεί στο έντερο άλλων υδρόβιων οργανισμών όπως το AG1 (EU885097) στο είδος *Pomacanthus sexstriatus* (Εικόνα 8) ενισχύει την άποψη αυτή. Συμπερασματικά, τέτοιους είδους συσχετίσεις δείχνουν την πιθανή συνεισφορά συγκεκριμένων βακτηριακών ομάδων στη διαδικασία της πέψης των υδρόβιων

οργανισμών και κατ' επέκταση και του *N. Norvegicus*, με λειτουργίες που όμως παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστες.



## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ξενογλώσση βιβλιογραφία

- **Abelló, P., Valladares Castellón F.J.A. (1988).** Analysis of the structure of decapod crustacean assemblages off Catalan coast (North-West Mediterranean). *Marine Biology* 98: 39-49.
- **Alazard, D., Dukan S., Urios A., Verhe F., Bouabida N., Morel F., Thomas P., Garcia J.L., Ollivier B. (2003).** *Desulfovibrio hydrothermalis* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from hydrothermal vents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:173-178.
- **Allen, E.E., Banfield J.F. (2005).** Community genomics in microbial ecology and evolution. *Nature Reviews Microbiology* 3:489-498.
- **Altschul, S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990).** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3):403-410.
- **Amann, R., Fuchs B.M. (2008).** Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature Reviews Microbiology* 6:339-348.
- **Baden, S.P., Pihl L., Rosenberg R. (1990).** Effects of oxygen depletion on the ecology, blood physiology and fishery of the Norway lobster *Nephrops norvegicus*. *Marine Ecology Progress Series* 67:141-155.
- **Bernard, P., Gabant P., Bahassi E.M., Couturier M. (1994).** Positive selection vectors using the F-Plasmid *ccdB* killer gene. *Gene* 148(1):71-4.
- **Buchner, P. (1965).** Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. John Wiley and Sons, New York.

- **Cartes, J.E., Company J.B., Maynou F. (1994).** Deep-water decapod crustacean communities in the Northwestern Mediterranean: influence of submarine canyons and season. *Marine Biology* 120: 221-230.
- **Cristo, M. & Cartes J.E. (1998).** A comparative study of the feeding ecology of *Nephrops norvegicus* (L.), (Decapoda: Nephropidae) in the bathyal Mediterranean and the adjacent Atlantic. *Scientia Marina* 62(1): 81-90.
- **Douglas, A.E. (1989).** Mycetocyte symbiosis in insects. *Biological Reviews* 69, 409-434.
- **Douglas, E.A. (1994).** *Symbiotic Interactions*. Oxford University Press.
- **Duperron, S., Lorion J., Samadi S., Gros O., Gaill F. (2009).** Symbioses between deep-sea mussels (Mytilidae: Bathymodiolinae) and chemosynthetic bacteria: diversity, function and evolution. *Comptes Rendus Biologies* 332:298-310.
- **Figueiredo, M.J. (1988).** Some decapod crustaceans captured by trawl in *Nephrops* grounds off the Portuguese South and Southwest Coasts. International Council for the Exploration of the Sea. CM 1988/k:2.
- **Hall, B.G. (2001).** *Phylogenetic trees made easy* 1<sup>st</sup> edition, release, Sinauer associates, Inc-Publishers Sunderland, Massachusetts, USA.
- **Handelsman, J., Tiedje J.M., Alvarez-Cohen L., Ashburner M., Cann I.K.O., Delong E.F., Doolittle W.F., Fraser-Liggett C.M., Godzik A., Gordon J., Riley M., Schmid M.B. (2007).** *The new science of metagenomics: revealing the secrets of our microbial planet*. The National Academic Press, Washington, DC.

- **Harris, J.M. (1993).** The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: A synthesis. *Microbiol Ecology* 25:195-231.
- **Harris, J.M., Seiderer L.J., Lucas M.I. (1991).** Gut microflora of two saltmarsh detritivore thalassinid prawns, *Upogebia africana* and *Callinassa kraussi*. *Microbiology Ecology* 21:277-296.
- **Herberholz, J., Mims C.J., Zhang X., Hu X. and Edwards D.H. (2004).** Anatomy of a live invertebrate revealed by manganese-enhanced Magnetic Resonance Imaging. *Journal of Experimental Biology* 207:4543-4550.
- **Hu, X., Fukutani A., Liu X., Kimbara K., Kawai F. (2007).** Isolation of bacteria able to grow on both polyethylene glycol (PEG) and polypropylene glycol (PPG) and their PEG/PPG dehydrogenases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73:1407-1413.
- **International Council for the Exploration of the Sea (ICES), (1999).** Report of the working group on *Nephrops* stocks. Copenhagen, Denmark. pp.504. In: <http://www.vliz.be/imis/imis.php?module=ref&refid=74711>.
- **International Council for the Exploration of the Sea (ICES), (2000).** Report of the working group on *Nephrops* stocks. Copenhagen, Denmark. pp.480. In: <http://www.ices.dk/products/AnnualRep/2000AnnualReport.pdf>
- **Kallianiotis, A., Vidoris P., Sylaios G. (2004).** Fish species assemblages and geographical sub-areas in the North Aegean Sea, Greece. *Fisheries Research* 68:171-187.
- **Kane, M., Poulsen L., Stahl D. (1993).** Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization

probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. Applied Environmental Microbiology 59:682-686.

- **Li, M., Yang H., Gu J.D. (2009).** Phylogenetic diversity and axial distribution of microbes in the intestinal tract of the polychaete *Neanthes glandicincta*. Microbiology Ecology 58:892-902.
- **Maynou, F. & Sarda F. (1997).** *Nephrops norvegicus* population and morphometrical characteristics in relation to substrate heterogeneity. Fisheries Research 30:139-149.
- **Meziti, A., Ramette A., Mente E., Kormas K.A. (in press)** Temporal changes of the gut bacterial communities of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*). FEMS Microbiology Ecology DOI 10.1111/j.1574-6941.2010.00964.x.
- **Moll, A. (1998).** Regional distribution of primary production in the North Sea simulated by a three-dimensional model. Journal of Marine Systems 16:151-170.
- **Muyzer, G., Teske A., Wirsen C.O., Jannasch H.W. (1995).** Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. Archives of Microbiology 164:165-172.
- **Mytilineou, C., Papaconstantinou C., Fourtouni A. (1990).** Some aspects of the biology of Norway lobster *Nephrops norvegicus* in the N. Euboikos Gulf (Greece), Rapports et Proces Verbaux des Reunions du Conseil international pour l' Exploration de la Mer Mediterranee 32(1):34.

- **Pedersen, K., Arlinger J., Ekendahl S., Hallbeck L. (1996).** 16S rRNA gene diversity of attached and unattached bacteria in boreholes along the access tunnel to the xspij hard rock laboratory, Sweden. *FEMS Microbiology Ecology* 19:249-262.
- **Petihakis, G., Triantafyllou G., Pollani A., Koliou A., Theodorou A. (2005).** Field data analysis and application of a complex water column biogeochemical model in different areas of a semi-enclosed basin: towards the development of an ecosystem management tool. *Marine Environmental Research* 59:493-518.
- **Polz, M., Robinson, J., Cavanaugh, C., Van Dover, C. (1998).** Trophic ecology of massive shrimp aggregations at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Limnology and Oceanography* 43:1631-1638.
- **Pond, D., Dixon, D., Bell, M., Fallick, A., Sargent, J. (1997).** Occurrence of 16(n-4) and 18:2(n-4) fatty acids in the lipids of the hydrothermal vent shrimps *Rimicaris exoculata* and *Alvinocaris markensis*: nutritional and trophic implications. *Marine Ecology Progress Series* 156(2):167-174.
- **Relini, G., Bertrand, J., Zamboni, A. (eds.) (1999).** Synthesis of the knowledge on bottom fishery resources in Central Mediterranean (Italy and Corsica). *Biology Marine Mediterranean.*, 6 (suppl. 1).
- **Smalla, K. (2004).** Culture-independent microbiology. In: Bull, A.T. (Ed), *Microbial Diversity and Bioprospecting*. ASM, Washington DC, pp. 88-99.

- **Smith, C.J. & 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.
- **Smith, C.J., & Papadopoulou K.N. (2008).** The crustacean *Nephrops norvegicus*: growth and reproductive behaviour. *In*: Reproductive biology of crustaceans: case studies of decapod crustaceans. Mente E. (ed.). Science Publishers, Enfield. New Hampshire, USA, pp. 491-506.
- **Smith, D.C. & Douglas, A.E. (1987).** The Biology of Symbiosis. Edward Arnold, London, pp.302.
- **Stackenbrandt, E. & Goebel B.M. (1994).** Taxonomic note: a place for DNd-Dna reassociation an 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. International Journal of Systematic Bacteriology 44:846-849.
- **Tamura, K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007).** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24(8):1596-1599.
- **Velicer, G.J., Raddatz G., Keller H., Deiss S., Lanz C., Dinkelacker I., Schuster S.C. (2006).** Comprehensive mutation identification in an evolved bacterial cooperators and its cheating ancestor. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 103, 8107-8112.
- **Yonge, C.M. (1924).** The mechanism of feeding, digestion, and assimilation in *Nephrops norvegicus*. 1<sup>st</sup> ed., Department of Zoology, Edinburgh 2:343-388.

### Ελληνική βιβλιογραφία

- **Madigan, M.T., Martinko J.M., Parker J. (2008).** Προκαρυωτική Ποικιλότητα: Βακτήρια “12”, 1<sup>ος</sup> Τόμος., *Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης* 12:409-512.

### Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

- GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (05/01/2010)
- [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Langoustine\\_dans\\_son\\_terrier.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Langoustine_dans_son_terrier.jpg) (16/05/2010).
- [http://www.bbc.co.uk/london/content/image\\_galleries/satellite\\_photos1\\_gallery.shtml](http://www.bbc.co.uk/london/content/image_galleries/satellite_photos1_gallery.shtml) (21/05/2010).
- <http://www.megasoftware.net/mega41.html> (30/05/2010)

## ABSTRACT

In this study *Nephrops norvegicus*' gut bacterial diversity from samples collected in the North Sea (Arbroath, Scotland) was compared with existing data from the GENBANK database for the gut bacterial communities of *N. norvegicus* samples collected in the Pagasitikos Gulf (Greece). Both samples were collected on February. The aim of the study was to investigate common bacterial groups in the gut of Norway lobsters from remote habitats. The gut was extracted by DNA extraction. DNA was amplified with Polymerase Chain Reaction, (PCR) using specific primers for the bacterial 16S rRNA genes. 16S rRNA bacterial genes were cloned to create a 16S rRNA library. Genes were sequenced and the sequences were analyzed using BLAST in order to be compared with known sequences from the GENBANK database and to find their closest relatives. The found phylotypes clustered in the  $\delta$ - and  $\gamma$ -Proteobacteria subphyla and the Bacteroidetes phylum. A phylogenetic tree was constructed using the MEGA\_4 program. Representatives of  $\delta$ -Proteobacteria reached 92% of the total clones, while  $\gamma$ -Proteobacteria and Bacteroidetes reached only 4% each. The prevalent taxon in the Arbroath sample was a  $\delta$ -Proteobacteria, while in Pagasitikos Gulf<sup>o</sup> was a  $\gamma$ -Proteobacteria. The dominant (87,5%) of (AbFe 2.2) phylotype from Arbroath sample (AbFe2) was closely (99%) related with clone (Se3-206) which has been found in the gut of *N. norvegicus* in previous studies. This may indicate its possible role in the digestion of food with functions that are still unclear.