

«Μοριακή ποικιλότητα και αφθονία προκαρυωτικών οργανισμών του πεπτικού συστήματος της καραβίδας (*Nephrops norvegicus*) σε φυσικούς και εκτρεφόμενους πληθυσμούς»

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

- 1) Κωνσταντίνος Αρ. Κορμάς, Αναπληρωτής καθηγητής, Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, επιβλέπων
- 2) Χρήστος, Νεοφύτου, Καθηγητής, Ιχθυολογία-Υδροβιολογία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, μέλος
- 3) Ελένη Μεντέ, Μόνιμη επίκουρη καθηγήτρια, Φυσιολογία θρέψης υδρόβιων ζωικών οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, μέλος

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

- 1) Κωνσταντίνος Αρ. Κορμάς, Αναπληρωτής καθηγητής, Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2) Χρήστος, Νεοφύτου, Καθηγητής, Ιχθυολογία-Υδροβιολογία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3) Ελένη Μεντέ, Μόνιμη επίκουρη καθηγήτρια, Φυσιολογία θρέψης υδρόβιων ζωικών οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 4) Μπεζιρτζόγλου Ευγενία, Καθηγήτρια, Μικροβιολογία, Τμήμα Αγροτικής Ανάπτυξης, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης
- 5) Μποζιάρης Ιωάννης, Μόνιμος Επίκουρος καθηγητής, Υγιεινή και συντήρηση ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6) Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος καθηγητής, Περιβαλλοντική μικροβιολογία και βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7) Pancucci-Παπαδοπούλου Maria-Antonietta, Κύρια Ερευνήτρια, Βιολογία-Ωκεανογραφία, Ινστιτούτο ωκεανογραφίας, Ελληνικό κέντρο Θαλασσίων Ερευνών.

Μεζίτη Αλεξάνδρα

Μοριακή Ποικιλότητα και αφθονία προκαρυωτικών οργανισμών του πεπτικού συστήματος της καραβίδας (*Nephrops norvegicus*) σε φυσικούς και εκτρεφόμενους πληθυσμούς.

Μεζίτη Αλεξάνδρα, 2012, «Μοριακή Ποικιλότητα και αφθονία προκαρυωτικών οργανισμών του πεπτικού συστήματος της καραβίδας (*Nephrops norvegicus*) σε φυσικούς και εκτρεφόμενους πληθυσμούς»

Αριθμός προκαταρκτικών Σελίδων: 18

Συνολικός Αριθμός Σελίδων: 190

Αριθμός Πινάκων: 12

Αριθμός Σχημάτων: 29

Αριθμός Εικόνων: 6

Αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών: 195

Στη Λούσυ και στο Μάικ...

*Και να αδελφέ μου
που μάθαμε να κουβεντιάζουμε
ήσυχα, ήσυχα κι απλά.
Καταλαβαινόμαστε τώρα
δε χρειάζονται περισσότερα....
(Γιάννης Ρίτσος)*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η Διδακτορική αυτή διατριβή ολοκληρώθηκε με τη βοήθεια πολλών ανθρώπων οι οποίοι εν γνώσει τους ή όχι συνέβαλαν στην πραγματοποίησή της.

Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω:

Τον επιβλέποντα Αναπλ. Καθ. Κ. Αρ. Κορμά για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω μαζί του για αυτά τα χρόνια.

Τα άλλα δύο μέλη της Τ.Σ.Ε, τον Καθ. Χρ. Νεοφύτου και την Επικ. Καθ. Ε. Μεντέ η οποία με την αγάπη στο επιστημονικό αντικείμενό της με έκανε να εκτιμήσω μία πλευρά της επιστήμης που είχα παρεξηγήσει.

Τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, την Καθ. Ε. Μπεζιρτζόγλου, τον Επικ. Καθ. Ι. Μποζιάρη, τον Επικ. Καθ. Δ. Καρπούζα και την Κύρια Ερευνήτρια Α. Pancucci-Παπαδοπούλου για την ανάγνωση και τα σχόλιά τους σχετικά με τη διατριβή.

Όλα τα άτομα που βοήθησαν στην πραγματοποίηση της εργασίας στη Βρέμη, τον καθ. Rudi Amann και τον Dr. Alban Ramette οι οποίοι με φιλοξένησαν στα εργαστήρια τους και ήταν πάντα διαθέσιμοι για συμβουλές και εποικοδομητικές συζητήσεις.

Το Λεκτ Ι. Καραπαναγιωτίδη και όλη την υπόλοιπη ομάδα, Βάσω Κεφεκέ, Κώστα Κρούπη, Ζήση Πετμεζά και Μαρία Σακκομήτρου για τη βοήθεια στην πραγματοποίηση των εκτροφών.

Τον κ. Θεόδωρο Γάκη και τον Αποστόλη, που μας βοήθησαν στη συλλογή των δειγμάτων με τα αλιευτικά τους σκάφη.

Τους συναδέλφους, συνεργάτες και φίλους που σε όλη αυτή την περίοδο βοήθησαν στην εξιχνίαση μυστηρίων, φυσικών και μεταφυσικών φαινομένων, μέσα και έξω από το εργαστήριο. Τη Μαρία Παχιαδάκη, τη Λουκία

Γιαννακοπούλου, την Ανθούλα Τσουκαλά, τη Φαίη Παρλαπάνη, το Δημήτρη Μπουμπάρη, την Εύη Πετρίδου, τη Λία Κουφοστάθη και την κ. Κατερίνα που μας πρόσεχε σαν παιδιά της.

Την Ήρα Καραγιάννη, το Θανάση Τσίκληρα, το Μιχάλη Βελούδιο, τη Ματίνα Κατσιάπη και το Σάββα Γενίτσαρη, για πλήθος συζητήσεων επιστημονικών και όχι μόνο αλλά και για τα ταξίδια στο τρίγωνο των Βερμούδων.

Τους φίλους και συναδέλφους από τη Βρέμη με τους οποίους πέρασα μερικές από τις πιο μοναδικές στιγμές σε αυτά τα 4 χρόνια. Ευχαριστώ Paola, Angela-Ευαγγελία, Melissa, Lucianna, Joanna, Ilaria, Angelique for all the great moments!!!

Τους φίλους που καμία σχέση δεν είχαν με το Διδακτορικό αλλά ήταν πάντα εκεί για συμπαράσταση και συμβουλές στις δύσκολες στιγμές, αλλά και για πάρτυ στις καλές. Ευχαριστώ Δημητρούλα, Αγγελική, Βάγια-Βάγια και Μάρκο γιατί ακόμα και αν δεν το καταλάβατε προσφέρατε σε αυτή την προσπάθεια.

Το Γιώργο Πίνα για την εικαστική παρέμβαση.

Τον Αν. Καθ. Κ. Σφάγγο γιατί ξέρει να πιστεύει και να βοηθάει ανθρώπους και όχι χαρτιά και φωτογραφίες.

Τον Κώστα γιατί με έμαθε να δουλεύω σωστά, μου έβαζε (λίγο; πολύ;) τις φωνές, και γιατί ήταν πάντα εκεί ως πρότυπο συνδυασμού της επιστήμης με τη ζωή.

Δύο φανταστικούς ανθρώπους την Ελεούσα και το Μιχάλη που όταν έπρεπε να με σταματήσουν δεν το έκαναν, κόντρα στις ανησυχίες τους, και ήταν πάντα δίπλα μου σε όλες μου τις επιλογές.

Τον Αντρέα που κάνει την κάθε μέρα μου να είναι μία καινούρια χαρούμενη μέρα (π.π)!!!

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η καραβίδα *Nephrops norvegicus* ή Νορβηγικός αστακός αποτελεί ένα μέλος της οικογένειας Nephropidae των καρκινοειδών και είναι ένα είδος ευρέως κατανεμημένο σε ιλυώδεις περιοχές της ηπειρωτικής κρηπίδας και της ανώτερης ηπειρωτικής κατωφέρειας του Βορειοανατολικού Ατλαντικού και της Μεσογείου. Το *N. norvegicus* αποτελεί ένα ιδιαίτερα εμπορικό είδος στις περιοχές όπου εντοπίζεται. Για αυτό το λόγο πραγματοποιούνται προσπάθειες για την εμπορική καλλιέργειά του οι οποίες δεν έχουν επιτευχθεί ακόμα εξαιτίας της ελλιπούς γνώσης σχετικά με τις διατροφικές συνήθειές του σε συνθήκες εργαστηρίου αλλά και σχετικά με τις ακριβείς διατροφικές του απαιτήσεις.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε για πρώτη φορά η βακτηριακή ποικιλότητα και αφθονία του πεπτικού συστήματος του *N. norvegicus* σε φυσικούς και εκτρεφόμενους πληθυσμούς υπό την παροχή διαφορετικών σιτηρεσίων. Σκοπός ήταν η μελέτη της βακτηριακής ποικιλότητας του μεσέντερου, η εύρεση των παραγόντων που την επηρεάζουν, η ανίχνευση των επικρατών φυλότυπων σε φυσικούς και εκτρεφόμενους πληθυσμούς, καθώς και ο εντοπισμός συμβιωτικών, μη τοξικών και μη παθογόνων βακτηριακών ειδών με πιθανή προσφορά στις πεπτικές λειτουργίες, που θα μπορούσαν στο μέλλον να χρησιμοποιηθούν ως προβιοτικά σε προσπάθειες εμπορικής εκτροφής.

Για τη μελέτη των φυσικών πληθυσμών συλλέχθηκαν 49 άτομα από τον Παγασητικό Κόλπο σε σχεδόν μηνιαία βάση κατά τη διάρκεια του 2007. Απομονώθηκε DNA από τον πεπτικό σωλήνα των δειγμάτων, το οποίο αναλύθηκε με τη χρήση μοριακών τεχνικών μελέτης του 16S rRNA και του

διαγονιδιακού ριβοσωμικού χώρου (Intergenic Transcribed Spacer, ITS). Η μελέτη του ITS με την τεχνική της αυτοματοποιημένης ανάλυσης του διαγονιδιακού ριβοσωμικού χώρου (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, ARISA) έδειξε ότι η εποχή συλλογής των δειγμάτων επηρέαζε τη βακτηριακή ποικιλότητα του πεπτικού σωλήνα σε αντίθεση με άλλους παράγοντες, όπως το φύλο ή το βάρος που δεν είχαν καμία επίδραση. Στον Παγασητικό κόλπο και στα σημεία που ζει το *N. norvegicus* οι εποχικές αλλαγές εντοπίζονται κυρίως σε αλλαγές στη διαθεσιμότητα της τροφής και όχι στις φυσικοχημικές συνθήκες, δείχνοντας ότι οι εποχικές αλλαγές της βακτηριακής ποικιλότητας του μεσέντερου πιθανότατα οφείλονταν σε αλλαγές στην κατανάλωση τροφής.

Η περαιτέρω ανάλυση επιλεγμένων δειγμάτων από κάθε μήνα συλλογής με 16S-ITS βιβλιοθήκες έδειξε την ύπαρξη επικρατών φυλότυπων (>58%) σε κάθε μία από αυτές. Στα δείγματα του Φεβρουαρίου/Μαρτίου, Μαΐου, Ιουλίου, Αυγούστου και Οκτωβρίου εντοπίστηκαν φυλότυποι με κοντινότερους συγγενείς από τα γένη *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter* και *Photobacterium* ενώ στα δείγματα του Σεπτεμβρίου και του Δεκεμβρίου εντοπίστηκαν φυλότυποι από μία ακαλλιέργητη ομάδα των Mollicutes και από το ακαλλιέργητο υποψήφιο φύλο CK-1C4-19, αντίστοιχα. Η παρουσία των ακαλλιέργητων Mollicutes στα δείγματα του Σεπτεμβρίου και των γ-Proteobacteria στα δείγματα του Αυγούστου επιβεβαιώθηκε και με την τεχνική του επιτόπιου φθορίζοντος υβριδισμού (Fluorescence in Situ Hybridization, FISH). Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων της ARISA με τις αλληλουχίες των ITS από τις βιβλιοθήκες έδειξε για άλλη μία φορά την έντονη παρουσία αντιπροσώπων των γενών *Photobacterium* και *Psychrobacter* στα περισσότερα από τα δείγματα που μελετήθηκαν.

Για την εξακρίβωση της επίδρασης της τροφής στη βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου πραγματοποιήθηκαν πειράματα εκτροφής στο εργαστήριο. Συνολικά οχτώ άτομα *N. norvegicus* χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες και παρέμειναν για έξι μήνες σε ειδικές ατομικές δεξαμενές, όπου ελέγχθηκαν τρία είδη διατροφής (S: ασιτία, M: μύδια και P: σύμψηκτα), με ελεγχόμενη παροχή τροφής τρεις φορές την εβδομάδα. Για τη μελέτη της βακτηριακής ποικιλότητας του μεσέντερου πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες στην αρχή του πειράματος (t0), στους τρεις μήνες (t1) και στους έξι μήνες (t2). Παράλληλα αναλύθηκαν και δείγματα νερού από τα ενυδρεία, αλλά και από τις τροφές που παρασχέθηκαν. Τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν με 16S rRNA βιβλιοθήκες. Τα αρχικά δείγματα (t0) παρουσίασαν αντίστοιχα αποτελέσματα με τους φυσικούς πληθυσμούς, με χαμηλή βακτηριακή ποικιλότητα και με επικρατείς φυλότυπους με πλησιέστερους συγγενείς από τα γένη *Psychrobacter* και *Photobacterium*.

Τα δείγματα από τις εκτροφές με σύμψηκτα και μύδια, για χρονική περίοδο έξι μηνών, παρουσίασαν υψηλότερη ποικιλότητα από τα δείγματα των φυσικών πληθυσμών αλλά σε όλα εντοπίστηκαν σε υψηλές αφθονίες (22%-73,5%) αντιπρόσωποι του είδους *Photobacterium leiognathi* παρόμοιοι (> 98%) με τους φυλότυπους των φυσικών πληθυσμών. Μικροβιολογικές και γονιδιωματικές μελέτες από προηγούμενες έρευνες έχουν ανιχνεύσει τις λιπολυτικές, χιτινολυτικές και πρωτεϊνολυτικές ιδιότητες του *P. leiognathi*, δείχνοντας τις πιθανές ευεργετικές δράσεις αυτού του είδους στην πεπτική λειτουργία του *N. norvegicus*.

Τα δείγματα της ασιτίας, καθώς και αυτό από την τρίμηνη εκτροφή με μύδια, παρουσίασαν υψηλότερη ποικιλότητα από όλα τα υπόλοιπα και η ποικιλότητά τους, όπως αποδείχθηκε από τη στατιστική ανάλυση των

αποτελεσμάτων, φάνηκε να επηρεάζεται κυρίως από τη βακτηριακή ποικιλότητα του νερού των δεξαμενών. Η βακτηριακή ποικιλότητα των τροφών δε φάνηκε να επηρεάζει τη βακτηριακή ποικιλότητα του μεσέντερου. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για όλα τα δείγματα έδειξε την ύπαρξη δύο ομάδων, εξαρτώμενων κυρίως από το αν είχε καταναλωθεί τροφή ανεξαρτήτως του είδους της. Βασικό διακριτικό χαρακτηριστικό των δύο ομάδων αποδείχθηκε η παρουσία αντιπροσώπων του είδους *P. leiognathi*.

Συνεπώς φάνηκε ότι η παροχή τροφής αποτελεί έναν καθοριστικό παράγοντα για τη διαμόρφωση της βακτηριακής ποικιλότητας του πεπτικού συστήματος του *N. norvegicus*. Για πρώτη φορά βρέθηκε ότι συγκεκριμένα βακτηριακά είδη όπως το *P. leiognathi*, με πιθανές λιπολυτικές, πρωτεϊνολυτικές και χιτινολυτικές ιδιότητες, έχουν έντονη παρουσία στο πεπτικό σύστημα της καραβίδας και θα μπορούσαν στο μέλλον να χρησιμοποιηθούν ως προβιοτικά σε προσπάθειες εκτροφής του *N. norvegicus*.

Συνολικά αυτή η μελέτη έδωσε σημαντικά στοιχεία για τη βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου του *N. norvegicus* και για τους παράγοντες που την καθορίζουν και έθεσε τις βάσεις για τις μελλοντικές προσπάθειες στη χρήση προβιοτικών για την εκτροφή του είδους.

Λέξεις κλειδιά: *Nephrops norvegicus*, μεσέντερο, βακτήρια, 16S rRNA, εκτροφές, *Photobacterium*, προβιοτικά

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. Βιολογία του είδους <i>Nephrops norvegicus</i>	1
1.2. Διατροφή του είδους <i>Nephrops norvegicus</i>	3
1.3. Κατανομή, οικολογία και γενετική ποικιλότητα του <i>Nephrops norvegicus</i>	4
1.4. Αλιεία, διαχείριση και υδατοκαλλιέργειες του <i>Nephrops norvegicus</i>	5
1.5. Βακτήρια του πεπτικού συστήματος και διατροφή.....	8
1.6. Βακτήρια του πεπτικού συστήματος και καρκινοειδή.....	12
1.7. Υδατοκαλλιέργειες και Προβιοτικά.....	16
1.8. Σκοπός της Διδακτορικής διατριβής.....	19
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
2.1. Συλλογή δειγμάτων και μορφομετρική ανάλυση (φυσικοί πληθυσμοί).....	21
2.2. Απομονωση πεπτικού σωλήνα.....	22
2.3. Απομόνωση DNA και μονιμοποίηση ιστών.....	23
2.4. Ανάλυση της μικροποικιλότητας για όλα τα βακτήρια.....	25
2.5. Ανάλυση της μικροποικιλότητας αντιπροσώπων των Mollicutes και του CK_1C4-19.....	28
2.6. Ανάλυση της βακτηριακής ποικιλότητας. Κλωνοποίηση και αλληλούχιση των 16S rRNA γονιδίων και του ITS.....	30
2.7. Αντιστοίχιση των ζωνών από την ARISA και των μηκών του ITS με συγκεκριμένους φυλότυπους.....	33
2.8. Επιτόπιος φθορίζων υβριδισμός.....	33
2.9. Ανάλυση ομοιοτήτων και ποικιλότητας.....	37

2.10. Εκτρεφόμενοι πληθυσμοί.....	38
2.10.1. Πειραματική διάταξη.....	38
2.10.2. Συλλογή δειγμάτων.....	40
2.10.3. Νερό και τροφές.....	43
2.10.4. Αναλύσεις.....	44
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	48
3.1. Φυσικοί πληθυσμοί.....	48
3.1.1. Ανάλυση της Μικροποικιλότητας.....	48
3.1.2. Φυλογενετική ανάλυση.....	52
3.1.3. Φυλογενετική ταυτοποίηση ζωνών από την ARISA.....	60
3.1.4. FISH.....	65
3.1.5. Ανάλυση ομαδοποίησης και ποικιλότητας.....	67
3.2. Εκτρεφόμενοι πληθυσμοί.....	68
3.2.1. Φυλογενετική ανάλυση.....	68
3.2.2. Στατιστική ανάλυση.....	76
3.3. Παρεχόμενες τροφές.....	80
3.3.1. Μύδια.....	80
3.3.2. Σύμψηκτα.....	82
3.4. Νερό ενυδρείων.....	83
3.4.1. Μετρήσεις ολικών προκαρυωτικών κυττάρων.....	83
3.4.2. Φυλογενετική ανάλυση.....	83
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	89
4.1. Φυσικοί πληθυσμοί.....	89
4.2. Εκτρεφόμενοι πληθυσμοί.....	102
4.3. Παρεχόμενες τροφές.....	112
4.4. Νερό δεξαμενών.....	113
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	118
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	120
7. ABSTRACT.....	133
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1: Δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση DNA και FISH (μονιμοποιημένα δείγματα).....	24
Πίνακας 2.2: Ιχνηθέτες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη. (FA: συγκέντρωση φορμαμίδιου, W=A/T).....	36
Πίνακας 2.3: Μορφομετρικά στοιχεία των ατόμων <i>Nephrops norvegicus</i> που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις.....	41
Πίνακας 2.4: Κωδικοί δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τις εκτροφές.	42
Πίνακας 2.5: Δείγματα νερού που συλλέχτηκαν από τα ενυδρεία.	44
Πίνακας 3.1: Αποτελέσματα ANOSIM για τις a priori καθορισμένες εποχικές ομάδες.	50
Πίνακας 3.2: Πίνακας φυλότυπων για τους επικρατείς (συχνότητα> 10%) φυλότυπους των δειγμάτων των φυσικών πληθυσμών.....	54
Πίνακας 3.3: Συγκρίσεις ανά ζεύγη των ομοιοτήτων των 16S rRNA αλληλουχιών που ομαδοποιούνται στο <i>Photobacterium</i> sp. και των κοντινότερων συγγενών τους	57
Πίνακας 3.4: <i>In silico</i> ανάλυση των λάθος ταιριασμάτων (υπογραμμισμένα) των 16S αλληλουχιών των Se3-204 και D1-695 με εκκινητές και ιχνηθέτες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη.....	60
Πίνακας 3.5: Πίνακας κλώνων για τους επικρατείς φυλότυπους του πεπτικού συστήματος του <i>Nephrops norvegicus</i> για τα δείγματα των εκτροφών.....	70
Πίνακας 3.6: Πίνακας φυλότυπων για τους επικρατείς φυλότυπους των τροφών (μύδια και σύμπηκτα που χρησιμοποιήθηκαν στις εκτροφές).....	82
Πίνακας 3.7: Πίνακας φυλότυπων για τους επικρατείς φυλότυπους των δειγμάτων από το νερό των ενυδρείων.....	86

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Παγκόσμιες αλιεύσεις του <i>Nephrops norvegicus</i> . Από FAO, 2011.....	6
--	---

Σχήμα 2.1: Σχέδιο απεικόνισης του συστήματος των ενυδρείων που χρησιμοποιήθηκε για την εκτροφή του <i>Nephrops norvegicus</i>	39
Σχήμα 3.1: Τρισδιάστατη NMDS απεικόνιση (Μήτρα αποστάσεων κατά Bray-Curtis) των αποτελεσμάτων της ARISA για τα δείγματα εντέρου του <i>Nephrops norvegicus</i> (stress=0,17).	49
Σχήμα 3.2: Τρισδιάστατη απεικόνιση της NMDS ανάλυσης των αποτελεσμάτων της ARISA με την χρήση του εκκινητή ITSFmol (πράσινο) και ITSFun (κόκκινο). Μήτρα αποστάσεων Bray-curtis, stress=0,10.....	50
Σχήμα 3.3: Δέντρο Neighbor-Joining για τα αποτελέσματα της χρήσης διαφορετικών εκκινητών σε επιλεγμένα δείγματα (μάυρο: παγκόσμιοι εκκινητές, κόκκινο: εκκινητές για Mollicutes).....	51
Σχήμα 3.4: α) Απεικόνιση της NMDS ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε μετά από τη μίξη των αποτελεσμάτων των δύο ζευγών εκκινητών. Μήτρα αποστάσεων Bray-Curtis, Stress=0,06 β) Απεικόνιση της NMDS ανάλυσης για τα αποτελέσματα με τον εκκινητή ITSFmol. Μήτρα αποστάσεων Bray-curtis, Stress=0,05.....	52
Σχήμα 3.5: Επικρατείς φυλότυποι στα δείγματα μεσέντερου των φυσικών πληθυσμών του <i>Nephrops norvegicus</i>	55
Σχήμα 3.6: Neighbor-Joining φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις 16S rRNA αλληλουχίες από το μεσέντερο φυσικών πληθυσμών του <i>Nephrops norvegicus</i> . Το <i>Persephonella marina</i> (Aquificae) έχει χρησιμοποιηθεί ως ρίζα.....	56
Σχήμα 3.7: Neighbor-Joining φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις 16S rRNA αλληλουχίες από το μεσέντερο του <i>Nephrops norvegicus</i> για τους αντιπροσώπους των ακαλλιέργητων Mollicutes και της ομάδας CK_1C4-19. Το <i>Planococcus donghaensis</i> (Actinobacteria) έχει χρησιμοποιηθεί ως ρίζα.....	58
Σχήμα 3.8: Αντιστοίχιση των ζωνών από την ARISA με το μήκος των ITS επικρατών φυλότυπων στις βιβλιοθήκες.....	61
Σχήμα 3.9: Διάγραμμα ανάλυσης αντιστοίχισης για τα αποτελέσματα της ARISA. Φαίνονται τα δείγματα από τους διαφορετικούς μήνες και τα ITS από επικρατείς φυλότυπους των βιβλιοθηκών που ανήκουν φυλογενετικά στις αντίστοιχες ομάδες.....	63
Σχήμα 3.10: Διάγραμμα ανάλυσης αντιστοίχισης για τα αποτελέσματα της ARISA με τα δύο ζεύγη εκκινητών. Φαίνονται τα δείγματα από τους διαφορετικούς μήνες, τους διαφορετικούς εκκινητές (u: παγκόσμιοι εκκινητές, m: ITSFmol) και	

τα ITS από επικρατείς φυλότυπους των βιβλιοθηκών που ανήκουν φυλογενετικά στις αντίστοιχες ομάδες.....	64
Σχήμα 3.11: Δείκτες ποικιλότητας για τα δείγματα των φυσικών πληθυσμών της καραβίδας <i>Nephrops norvegicus</i>	67
Σχήμα 3.12: Ανάλυση ομαδοποίησης των δεικτών ομοιότητας Morisita για τις βακτηριακές κοινότητες του εντέρου των φυσικών πληθυσμών του <i>Nephrops norvegicus</i>	68
Σχήμα 3.13: Επικρατείς φυλότυποι στα δείγματα μεσέντερου των εκτρεφόμενων πληθυσμών του <i>N. norvegicus</i> . Με διαφορετικά χρώματα φαίνονται οι φυλογενετικές ομάδες ομαδοποίησης των φυλότυπων σε επίπεδο γένους ή είδους. Η ομαδοποίηση έχει στηριχτεί σε επίπεδο ομοιότητας 98%.....	71
Σχήμα 3.14: Neighbor-Joining φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις 16S rRNA αλληλουχίες από το μεσέντερο (φυλότυποι με έντονα γράμματα) του <i>Nephrops norvegicus</i> . Το <i>Aquifex pyrophilus</i> έχει χρησιμοποιηθεί ως ρίζα.	72
Σχήμα 3.15: Μεγέθυνση τμήματος των γ-Proteobacteria από το σχήμα 3.14.....	73
Σχήμα 3.16: Neighbor-Joining φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις 16S rRNA αλληλουχίες από το μεσέντερο (φυλότυποι με έντονα γράμματα) του <i>Nephrops norvegicus</i> . Παρουσιάζονται οι αντιπρόσωποι των α-Proteobacteria και Bacteroidetes που δεν φαινόταν στο δέντρο του σχήματος 3.14. Το <i>Arcobacter nitrofigilis</i> (ε-Proteobacteria) έχει χρησιμοποιηθεί ως ρίζα.	75
Σχήμα 3.17: Δείκτες ποικιλότητας για τις βακτηριακές κοινότητες του εντέρου εκτρεφόμενων πληθυσμών του <i>Nephrops norvegicus</i>	76
Σχήμα 3.18: α) Neighbor-Joining ανάλυση των σχετικών αφθονιών των φυλότυπων στα δείγματα του εντέρου της καραβίδας <i>N. norvegicus</i> . β) ανάλυση ομαδοποίησης των ομοιοτήτων κατά Morisita στα δείγματα από τις εκτροφές..	77
Σχήμα 3.19: Ανάλυση αντιστίχισης των σχετικών αφθονιών των φυλότυπων με τα δείγματα των εκτρεφόμενων πληθυσμών του <i>Nephrops norvegicus</i> . Φαίνονται τα δείγματα (έντονα γράμματα σε τετράγωνα) και οι φυλότυποι με τα ονόματα των κοντινότερων συγγενών τους.....	78
Σχήμα 3.20: Τρισδιάστατη NMDS απεικόνιση (Μήτρα αποστάσεων κατά Bray-Curtis) των αποτελεσμάτων της ARISA για τα δείγματα εντέρου των εκτρεφόμενων <i>Nephrops norvegicus</i> μαζί με τα δείγματα του νερού (stress=0,17).....	79

Σχήμα 3.21: Neighbor-Joining φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις 16S rRNA αλληλουχίες από τις τροφές που παρασχέθηκαν (φυλότυποι με έντονα γράμματα). Το <i>Persephonella guaymasensis</i> έχει χρησιμοποιηθεί ως ρίζα.....	81
Σχήμα 3.22: Επικρατείς φυλότυποι στα δείγματα νερού των ενυδρείων εκτροφής. Με διαφορετικά χρώματα φαίνονται οι φυλογενετικές ομάδες ομαδοποίησης των φυλότυπων σε επίπεδο γένους η είδους. Η ομαδοποίηση έχει στηριχτεί σε επίπεδο ομοιότητας 98%.	84
Σχήμα 3.23: Neighbor-Joining φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις 16S rRNA αλληλουχίες από το νερό των ενυδρείων και σε επιλεγμένες από το μεσέντερο του <i>Nephrops norvegicus</i> (φυλότυποι με έντονα γράμματα). Το <i>Aquifex pyrophilus</i> έχει χρησιμοποιηθεί ως ρίζα.	85
Σχήμα 3.24: Διάγραμμα Venn για τους φυλότυπους που βρέθηκαν στα δείγματα του νερού.....	87
Σχήμα 3.25: Τιμές των δεικτών ποικιλότητας για τα δείγματα του νερού των ενυδρείων.....	88
Σχήμα 4.1. Ανάλυση δικτύων για τους κοινούς φυλότυπους (◇) μεταξύ των δειγμάτων που αναλύθηκαν. Msf: <i>Marinosulfomonas</i> , Sph: <i>Sphingobacter</i> , Pha: <i>Phaeobacter</i> , Mrv: <i>Marivita</i> , Psrp: <i>Psychroserpens</i> , Prop: <i>Propionibacterium</i> , She: <i>Shewanella</i> , Vib: <i>Vibrio</i> , Ple: <i>Photobacterium leiognathi</i> , CK: CK_1C4_19, Hep: candidatus <i>Hepatoplasma</i> , Arc: <i>Arcobacter</i> , Psy: <i>Psychrobacter</i> sp. Τα ποσοστά του κάθε φυλότυπου απεικονίζονται με διαφορετικές συνδέσεις.....	90
Σχήμα 4.2: Σχετικές αφθονίες των κοινών βακτηριακών λειτουργικών Ταξινομικών Μονάδων από το μεσέντερο της καραβίδας <i>Nephrops norvegicus</i> μεταξύ δειγμάτων διαδοχικών μηνών, όπως υπολογίστηκε από τα αποτελέσματα της ARISA.	93
Σχήμα 4.3: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των δεικτών ποικιλότητας για τους φυσικούς και τους εκτρεφόμενους πληθυσμούς.....	104

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Σχηματική απεικόνιση της καραβίδας <i>Nephrops norvegicus</i> (από Bell et al. 2006).....	1
--	---

Εικόνα 1.2: Διαδοχή βακτηριακών ομάδων στο παχύ έντερο νηπίου από τη στιγμή της γέννησης μέχρι το 15ο μήνα. Από Zimmer (2011).....	11
Εικόνα 1.3: Εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο από το μεσέντερο των α) <i>Calocaris mesandreae</i> , β) <i>Calianassa subterranean</i> και γ) <i>Upogebia stellata</i> . Η κλίμακα μεγέθους είναι αντίστοιχα, 1, 5 και 5 μm . (από Pinn <i>et al.</i> 1999).....	13
Εικόνα 2.1: Χάρτης του Παγασητικού κόλπου. Η περιοχή δειγματοληψίας ορίζεται μέσα στο σχήμα.....	21
Εικόνα 2.2: Απεικόνιση του πεπτικού σωλήνα του <i>Nephrops norvegicus</i>	23
Εικόνα 3.1: α-γ) Τομή (5 μm) δείγματος εντέρου του <i>Nephrops norvegicus</i> (FN2) υβριδισμένου με HRP σημασμένο EUB338(I-III) (α) και GAM42a (β,γ) ιχνηθέτη και βαμμένου με Alexa488 σημασμένης τυραμίδης. δ-στ) Τομές (4 μm) δείγματος εντέρου του <i>N. norvegicus</i> (FSE3) υβριδισμένες με Cy3 σημασμένους EUB (I-III) (δ) και UncMol89 (ε,στ) ιχνηθέτες. Τα μπλε σήματα αντιστοιχούν στα DAPI σήματα των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου και τα πράσινα (α-γ) και κόκκινα (δ-στ) στα υβριδισμένα βακτήρια.....	66

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

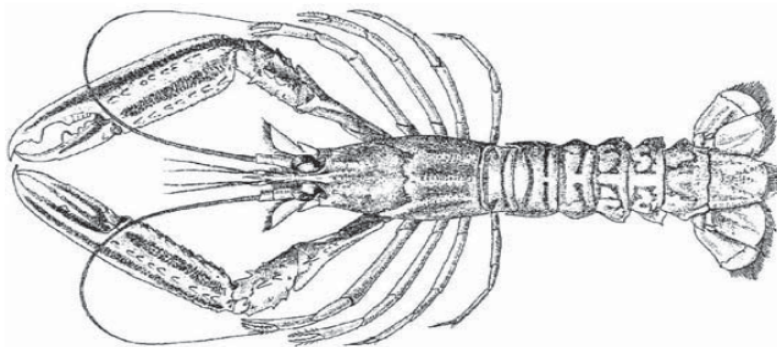
ANOSIM: Analysis Of Similarities/ Ανάλυση Ομοιοτήτων
ARISA: Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis/ Αυτοματοποιημένη Ανάλυση του Διαγονιδιακού Ριβοσωμικού Χώρου
CA: Correspondence Analysis/ Ανάλυση Αντιστοίχισης
CARD-FISH: Catalyzed reporter deposition-FISH/ FISH με απόθεση καταλύτη
CL: Carapace Length/ Μήκος Κεφαλοθώρακα
DAPI: Diaminidophenylindole/ Διαμινοφενυλινδόλη
DCA: Detrended Correspondence Analysis/ Αποστασιοποιημένη Ανάλυση Αντιστίχισης
FISH: Fluorescence in situ Hybridization/ Επιτόπιος Φθορίζων Υβριδισμός
HRP: Horseradish peroxidase/ Υπεροξειδάση του ραπανιού
ITS: Intergenic Transcribed Spacer/ Διαγονιδιακός Ριβοσωμικός Χώρος
NMDS: nonMetric Multidimensional Scaling/ μη μετρική Πολυδιάστατη Κατάταξη
OTU: Operational Taxonomic Unit/ Λειτουργική Ταξινομική Μονάδα
PBS: Phosphate Buffered saline/ Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών
PCA: Principal Components Analysis/ Ανάλυση κυρίων συνιστωσών
PCR: Polymerase Chain Reaction/ Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
PFSW: Particle Free SeaWater/ Θαλασσινό νερό χωρίς συσσωματώματα
RDA: Redundancy Analysis/ Ανάλυση πλεονασμού
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate/ Δωδεκυλοθειικό Νάτριο

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το είδος της караβίδας *Nephrops norvegicus* (L., 1758), που ονομάζεται και Νορβηγικός αστακός (Norway lobster) καθώς και Dublin bay prawn, αποτελεί ένα μέλος της οικογένειας Nephropidae των Decapoda (Υπόφυλο Crustacea). Με συνολική αλίευση 70.000 τόνων τον χρόνο, είναι ένα από τα πιο εμπορικά καρκινοειδή στην Ευρώπη. Η βιολογία και η διαχείριση του είδους έχουν αποτελέσει το αντικείμενο πολλών μελετών για πάνω από 80 χρόνια (Yonge 1924, Farmer 1974, Farmer 1975, Chapman 1980, Sarda 1995, Graham & Ferro 2004).

1.1. Βιολογία του είδους *Nephrops norvegicus*

Μορφολογικά το *Nephrops norvegicus* μοιάζει με τους αστακούς. Διαθέτει πέντε ζεύγη ποδιών εκ των οποίων τα τρία πρώτα καταλήγουν σε χηλές (χηληπόδια)(Εικ. 1.1), με το πρώτο ζεύγος να είναι μεγαλύτερο από τα υπόλοιπα. Άλλα διακριτικά χαρακτηριστικά από τα άλλα αστακοειδή είναι το λεπτό σώμα, το



Εικόνα 1.1: Σχηματική απεικόνιση της караβίδας *Nephrops norvegicus* (Bell et al. 2006)

λεπτό και αιχμηρό ρόστρο, τα μεγάλα σε σχήμα νεφρών μάτια και το χαρακτηριστικό κόκκινο-πορτοκαλί χρώμα (Hayward & Ryland 1990).

Ο πιο κοινός δείκτης για το μέγεθος του *N. norvegicus* είναι το μήκος του κεφαλοθώρακα (Carapace length, CL). Έχει βρεθεί ότι το μήκος του κεφαλοθώρακα για τα θηλυκά κυμαίνεται από 21 έως 34 mm, ενώ για τα αρσενικά από 29 έως 46 mm (Tuck et al. 2000). Οι βιομετρικές σχέσεις που χρησιμοποιούνται πιο συχνά, κυρίως για τον υπολογισμό των αποθεμάτων, είναι οι σχέσεις μήκους-βάρους και οι σχέσεις μεταξύ του πλάτους της κοιλιακής περιοχής (μετρώντας στο δεύτερο από τα πέντε κοιλιακά μεταμερή) και του μήκους του κεφαλοθώρακα.

Όπως και για όλα τα Decapoda η διαδικασία της έκδυσης είναι σημαντική για την αύξηση του μεγέθους, έτσι και στο *N. norvegicus* (Chapman 1980). Αν και δεν υπάρχει κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο και παρατηρούνται αλλαγές ανάμεσα σε πληθυσμούς, έχει παρατηρηθεί ότι στον πρώτο βενθικό χρόνο ζωής οι εκδύσεις πραγματοποιούνται κάθε μήνα (Bell et al. 2006), τα επόμενα δύο χρόνια μειώνονται σε τρεις με τέσσερις το χρόνο και μετά την έναρξη της σεξουαλικής ωριμότητας παρατηρούνται μόνο μία με δύο εκδύσεις κάθε χρόνο (Farmer 1973, Sarda 1991). Η έκδυση αποτελεί μία επίπονη διαδικασία που διαρκεί 20-30 min κατά τη διάρκεια της οποίας το *N. norvegicus* είναι ευάλωτο σε φαινόμενα θήρευσης και κανιβαλισμού (Sarda 1983). Κάθε κύκλος έκδυσης χωρίζεται σε τέσσερα στάδια: μεταέκδυση (postmolt), μεσοέκδυση (intermolt), προέκδυση (promolt) και έκδυση (molt) (Drach 1939) τα οποία διακρίνονται από διαφορές που παρατηρούνται στα πλεοπόδια (Sarda 1983). Η διάρκεια των σταδίων καθορίζεται από την ηλικία του ζώου.

Ο αναπαραγωγικός κύκλος παρουσιάζει διαφορές ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή. Η συχνότητα των γεννήσεων ποικίλει από ετήσια μέχρι κάθε δύο έτη ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος με τις υψηλότερες συχνότητες να παρατηρούνται σε μικρά γεωγραφικά πλάτη. Το ζευγάριωμα παρατηρείται στο τέλος του χειμώνα και μέχρι το καλοκαίρι οι ωοθήκες ωριμάζουν. Η δημιουργία των αυγών παρατηρείται στο τέλος του καλοκαιριού με αρχές του φθινοπώρου. Μετά από αυτό το στάδιο τα αυγωμένα θηλυκά κρύβονται στις στοές/κρύπτες όπου και παραμένουν μέχρι την εκκόλαψη των αυγών. Η διάρκεια της επώασης ποικίλει ανάλογα με τη θερμοκρασία διαρκώντας από 5,5 μήνες στους 15°C (μικρά γεωγραφικά πλάτη, Μεσόγειος) μέχρι 10 μήνες στους 8°C (μεγάλα γεωγραφικά πλάτη). Αυτό επηρεάζει και τους αναπαραγωγικούς κύκλους εφόσον, σε ψυχρές περιοχές, η περίοδος της επώασης μπορεί να κρατήσει αρκετά και να συμπίσει με την περίοδο της ωρίμανσης των ωοθηκών, έχοντας ως αποτέλεσμα λιγότερες γεννήσεις (Bell *et al.* 2006).

1.2. Διατροφή του *Nephrops norvegicus*

Το πεπτικό σύστημα του *Nephrops norvegicus* αποτελείται από το πρόσθιο, το μεσαίο και το οπίσθιο τμήμα (Yonge 1924). Η ανατομία του πεπτικού του συστήματος είναι ανάλογη με αυτή των περισσότερων καρκινοειδών, όπως παρουσιάζεται από τον Ceccaldi (1989).

Στο *N. norvegicus* το πρόσθιο τμήμα του πεπτικού συστήματος αποτελείται από τα στοματικά τμήματα, τον οισοφάγο και το πυλωρικό και καρδιακό στομάχι. Στο καρδιακό στομάχι με τη συμβολή του γαστρικού μύλου επιτελείται το

μεγαλύτερο μέρος του θρυμματισμού της τροφής (Yonge 1924). Στη συνέχεια, στην αρχή του μεσαίου τμήματος βρίσκεται το ηπατοπάγκρεας όπου με την παραγωγή ενζύμων επιτελείται το μεγαλύτερο μέρος της χημικής διάσπασης των τροφών. Τα άπεπτα τμήματα της τροφής συνεχίζουν στο μεσέντερο. Εκεί υπάρχει η δυνατότητα απορρόφησης θρεπτικών συστατικών από τα τοιχώματα του εντέρου, οπότε η παρουσία βακτηρίων συνδράμει στον περαιτέρω μεταβολισμό ουσιών που δεν μπορούν να διασπαστούν από τα ένζυμα του ηπατοπαγκρέατος. Τέλος, στο οπισθέντερο επιτελείται η συμπύκνωση των άπεπτων συστατικών και η αποβολή τους στο περιβάλλον (Yonge 1924).

Το *Nephrops norvegicus* τρέφεται ως ευκαιριακός θηρευτής και πτωματοφάγος κάνοντας σύντομες εξορμήσεις συλλογής τροφής κοντά στην στοά του (Bell *et al.* 2006). Συνήθως τρέφεται με άλλα μικρότερα καρκινοειδή, εχινόδερμα, μαλάκια, πολύχαιτους, αλλά και άλλες ομάδες ανάλογα με την περιοχή που ζει. Έχει βρεθεί ότι τρέφεται μη επιλεκτικά και η τροφή εξαρτάται κυρίως από την αφθονία της παρά από το είδος της.

1.3. Κατανομή, οικολογία και γενετική ποικιλότητα του *Nephrops norvegicus*

Το *Nephrops norvegicus* είναι ευρέως κατανεμημένο σε περιοχές της ηπειρωτικής κρηπίδας και της ανώτερης ηπειρωτικής κατωφέρειας του Βορειοανατολικού Ατλαντικού και της Μεσογείου. Εντοπίζεται από τη Νορβηγία και την Ισλανδία στο Βορρά, μέχρι την Ελλάδα και το Μαρόκο στο Νότο σε βάθη από 20 μέχρι 800 m (Abello *et al.* 2002, Bell *et al.* 2006). Στις περιοχές αυτές σχηματίζει στοές όπου και περνά μεγάλο μέρος της ημέρας. Οι στοές μπορεί να

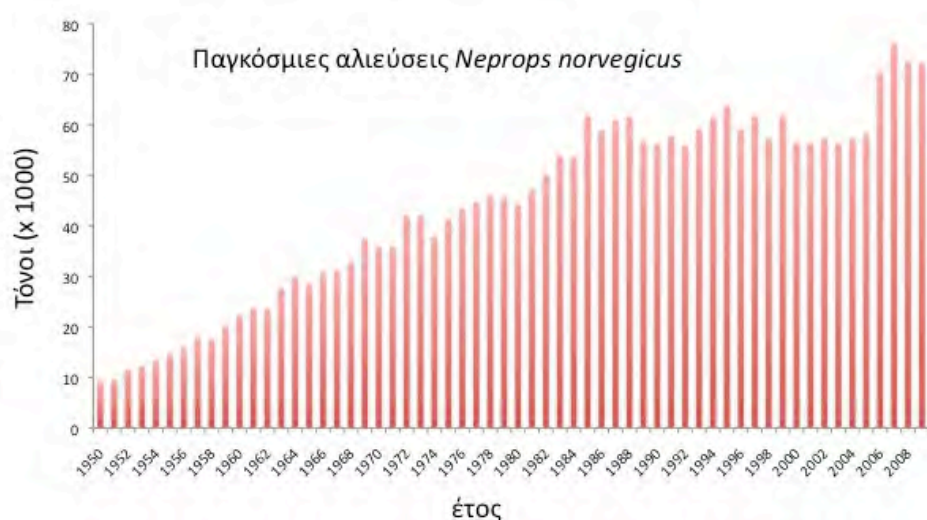
έχουν διάμετρο 10 cm και μήκος 1 m και να διεισδύουν στο ίζημα σε βάθος 20-30 cm (Rice & Chapman 1971). Η έξοδος από τις στοές παρατηρείται συγκεκριμένες ώρες, ανάλογα με την περιοχή αλλά πάντα όταν οι συνθήκες φωτισμού είναι χαμηλές. Οι περιοχές που ζει το *N. norvegicus* είναι περιορισμένες αφού προτιμά συγκεκριμένους τύπους ιλυωδών ιζημάτων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό των πληθυσμών στις περιοχές κατανομής του είδους λόγω ακαταλληλότητας του περιβάλλοντος (περιοχές με βράχους κλπ.).

Εφόσον τα άτομα δεν μπορούν να μεταναστεύσουν περισσότερο από μερικές εκατοντάδες μέτρα και η διασπορά του είδους εξαρτάται αποκλειστικά και μόνο από αυτή των προνυμφών, θα ήταν αναμενόμενο να υπήρχε σαφής γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών. Κάτι τέτοιο δεν έχει παρατηρηθεί αφού οι πληθυσμοί δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις (Passamonti *et al.* 1997, Maltagliati *et al.* 1998). Ακόμα και μέσα σε ενιαίους πληθυσμούς φαίνεται να υπάρχει μεγάλος πολυμορφισμός και έχει θεωρηθεί ότι ακολουθείται το μοντέλο νησίδων (island model) (Passamonti *et al.* 1997, Stamatis *et al.* 2004). Αυτές οι παρατηρήσεις είναι σημαντικές για τη διαχείριση των αποθεμάτων εφόσον εξηγούν τις αρνητικές συνέπειες των αλιευτικών πιέσεων σε περιοχές που εμφανίζονται υποπληθυσμοί.

1.4. Αλιεία, διαχείριση και υδατοκαλλιέργειες του *Nephrops norvegicus*

Το *Nephrops norvegicus* αποτελεί ένα από τα πιο εμπορικά είδη στις περιοχές στις οποίες αλιεύεται. Οι παγκόσμιες αλιεύσεις του *N. norvegicus* τα τελευταία 60 χρόνια (FAO 2011) έδειχναν ανοδική τάση μέχρι το 1985. Στη

συνέχεια παρέμειναν σταθερές κοντά στους 60.000 τόνους μέχρι το 2005 δείχνοντας ότι οι σημαντικές αλιευτικές πιέσεις έχουν αρχίσει να οδηγούν σε μείωση των αποθεμάτων. Παρολαυτά τα έτη 2006-2009 παρουσιάστηκε αύξηση και οι παγκόσμιες αλιεύσεις έφτασαν στους 70.000 τόνους (Σχ.1.1). Στην Ελλάδα οι αλιεύσεις παρουσίαζαν συνεχή αύξηση φθάνοντας από τους 242 τόνους το



Σχήμα 1.1: Παγκόσμιες αλιεύσεις του *Nephrops norvegicus* (FAO, 2011).

2001 στους 555 τόνους το 2007. Αντίστοιχα, στον Παγασητικό κόλπο οι αλιεύσεις αυξήθηκαν από 34,9 τόνους το 2001 σε 55,5 τόνους το 2007 (Α. Τσίκληρας, προσωπική επικοινωνία). Οι αυξήσεις αυτές δεν πρέπει να οδηγήσουν σε λανθασμένα συμπεράσματα για την επάρκεια των αποθεμάτων του *N. norvegicus*. Πρόσφατες μελέτες (Danovaro *et al.* 2010) έχουν δείξει ότι οι επιδράσεις της κλιματικής αλλαγής στην επιφάνεια της θάλασσας θα επηρεάσουν σε βάθος χρόνου τη μεταφορά ενέργειας στα βαθύτερα στρώματα και κατά συνέπεια τους

βιογεωχημικούς κύκλους στο βένθος και την ποικιλότητα και σύνθεση των βενθικών κοινωνιών.

Αντίστοιχοι προβληματισμοί για τη μείωση των αποθεμάτων άλλων Decapoda οδήγησαν σε προσπάθειες εμπορικής εκτροφής των ειδών. Πειράματα σχετικά με τον αστακό *Homarus americanus* κατά τις δεκαετίες του 1970 και 1980 βοήθησαν στην επιτυχή εκτροφή του είδους, όπως περιγράφεται αναλυτικά σε ανασκόπηση από τους Aiken & Waddy (1995). Παρόλαυτα η μείωση των τιμών πώλησης των άγριων προϊόντων κατέστησε την εκτροφή των ενήλικων αστακών οικονομικά ασύμφορη. Άλλες προσπάθειες στράφηκαν στην αύξηση των αποθεμάτων μέσω της αύξησης των προνυμφών που απελευθερώνονται στο περιβάλλον και για αυτό το λόγο δημιουργήθηκαν μονάδες εκκόλαψης όπου ωρίμαζαν οι προνύμφες μέχρι το τέταρτο προνυμφικό στάδιο (Nicosia & Lavalli 1999). Αντίστοιχες προσπάθειες έχουν πραγματοποιηθεί με επιτυχία και για άλλα είδη αστακοειδών όπως για τα γένη *Panulirus*, *Jasus* και *Sagmariasus* (Booth 2006, Phillips & Melville-Smith 2006).

Σχετικά με το *N. norvegicus*, έχουν πραγματοποιηθεί κατά καιρούς προσπάθειες εκτροφής είτε ενήλικων ατόμων (Μεντέ και συν. 2007, Mente 2010) ή ατόμων σε προνυμφικά στάδια (Figureiedo & Vilela 1972, Rotllant *et al.* 2001, Rosa *et al.* 2003). Παρολαυτά η εμπορική εκτροφή του είδους δεν έχει πετύχει μέχρι τώρα κυρίως εξαιτίας της έλλειψης γνώσης για την εκτροφή του είδους σε συνθήκες εργαστηρίου και για τις ακριβείς διατροφικές του απαιτήσεις (Μεντέ και συν. 2007). Πρόσφατες μελέτες (Mente 2010) έχουν προσφέρει πολύτιμα στοιχεία για την επιβίωση, την αύξηση και τη διατροφική συμπεριφορά του *N.*

norvegicus σε συνθήκες εργαστηρίου, όπου μεταξύ άλλων έγινε εμφανής η ανάγκη για ξηρή τροφή υψηλής ποιότητας.

Παρότι δεν έχει γίνει στοχευμένη έρευνα σύγκρισης της βιολογίας, της φυσιολογίας και της οικολογίας του *N. norvegicus* στις περιοχές εξάπλωσής του, οι παραπάνω μελέτες σε συνδυασμό με αυτές που έχουν πραγματοποιηθεί για τη γενετική ποικιλότητα δείχνουν ότι τα χαρακτηριστικά των πληθυσμών είναι κοινά και δε φαίνεται να υπάρχουν γενετικά ευδιάκριτοι πληθυσμοί. Συνεπώς η επίτευξη της εκτροφής του είδους θα είχε παγκόσμια σημασία με θετικές οικονομικές επιπτώσεις σε όλες τις περιοχές εξάπλωσής του.

1.5. Βακτήρια του πεπτικού συστήματος και διατροφή

Οι διατροφικές αλληλεπιδράσεις μικροοργανισμών με ασπόνδυλα και σπονδυλόζωα είναι διαδεδομένες στη φύση με παραδείγματα από τους χωρίς πεπτικό σύστημα ολιγόχαιτους *Olavius algarvensis* και τους πολύχαιτους *Riftia pachyptila* και *Lamellibrachia sp.* μέχρι τα ανώτερα ζώα όπως ο άνθρωπος. Αντίστοιχες σχέσεις εντοπίζονται ευρέως στο θαλάσσιο και στο χερσαίο περιβάλλον ανάλογα με τις διατροφικές ανάγκες των ξενιστών αλλά και τις ενεργειακές ανάγκες των μικροοργανισμών. Αυτού του είδους οι αλληλεπιδράσεις ποικίλουν από επιβλαβείς μέχρι ωφέλιμες και από ευκαιριακές μέχρι αναγκαστικές, ενώ μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τους βιοχημικούς κύκλους στο σώμα του ξενιστή.

Η πιο γνωστή διατροφική σχέση βακτηρίων με ασπόνδυλα είναι αυτή των κυτταρινολυτικών βακτηρίων με τερμίτες, όπου οι συμβιώτες προσδίδουν στον

ξενιστή τους την ικανότητα να διατρέφεται με ξύλο (Beckwith & Rose 1929). Αντίστοιχες διατροφικές σχέσεις έχουν από καιρό αναγνωριστεί ως σημαντικές και αναγκαίες στο πεπτικό σύστημα των χορτοφάγων ζώων όπου οι μικροοργανισμοί καταλαμβάνουν περίπου το 70% του πεπτικού συστήματος. Εκεί με διεργασίες ζύμωσης αποσυνθέτουν τους σύνθετους πολυσακχαρίτες των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών που καταναλώνουν οι ξενιστές τους (Flint *et al.* 2008).

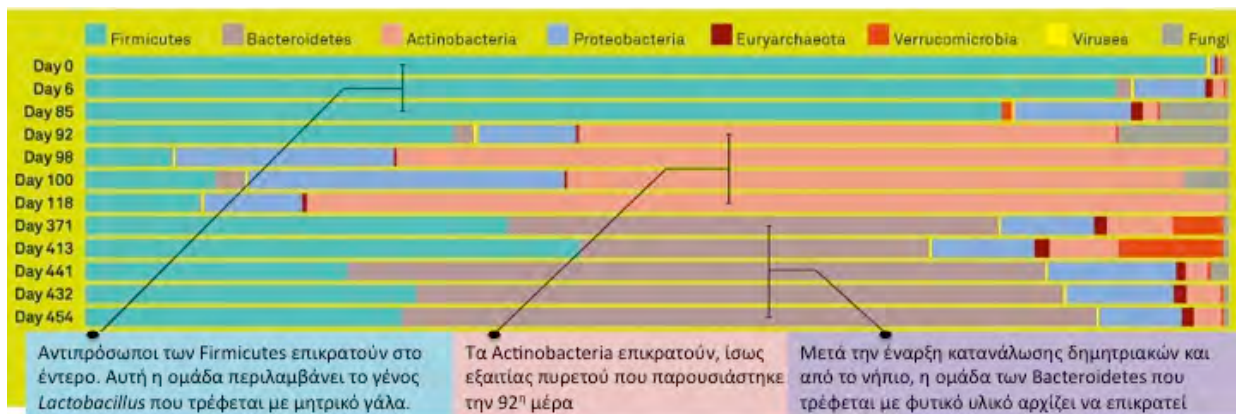
Στη μελέτη των διατροφικών σχέσεων βακτηρίων με θαλάσσια ασπόνδυλα χωρίς πεπτικό η πιο καλομελετημένη περίπτωση είναι ο ολιγόχαιτος *Olavius algarvensis* που εντοπίζεται σε ρηχά ιζήματα και στον οποίο κυριαρχούν δύο είδη μικροοργανισμών. Βακτήρια που έχουν την ικανότητα οξειδωσης του υδρόθειου που είναι άφθονο στο οικοσύστημα που ζει ο ολιγόχαιτος, χρησιμοποιούν το ανηγμένο θείο (S^{-2}) ως πηγή ενέργειας για τη χημειοσύνθεση οργανικών ενώσεων που παρέχουν και στον ξενιστή τους. Παράλληλα παράγονται θειικά (SO_4^{-2}) που προσφέρονται στη δεύτερη βακτηριακή κοινότητα που έχει την ικανότητα αναγωγής τους σε υδρόθειο κλείνοντας έτσι έναν πλήρη κύκλο του θείου μέσα στον ξενιστή (Dubilier *et al.* 2001). Στον πολύχαιτο *Riftia pachyptila* βακτήρια που ζουν σε ειδικούς σχηματισμούς του πολύχαιτου (τροφόσωμα) οξειδώνουν το υδρόθειο που παράγεται από τις υδροθερμικές πηγές βαθιάς θάλασσας (deep-sea hydrothermal vents) και με την ενέργεια αυτή παράγουν οργανική ύλη που προσφέρουν στον ξενιστή (Cavanaugh *et al.* 1981). Αντίστοιχα για τους πολύχαιτους *Lamelibrachia* sp. των ψυχρών πηγών (cold-seeps), συμβιωτικοί μικροοργανισμοί οξειδώνουν το υδρόθειο του ιζήματος και παράγουν οργανική ύλη για τον ξενιστή (Dubilier *et al.* 2008).

Στο θαλάσσιο περιβάλλον εκτεταμένες μελέτες σχετικά με τη βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου έχουν πραγματοποιηθεί σε αρκετά είδη ψαριών όπως τα γένη *Salmo*, *Oncorhynchus*, *Gadus* και *Hippoglossus*. Μοριακές αλλά και συμβατικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της μικροοργανισμικής ποικιλότητας έδειξαν την επικράτηση γενών όπως τα *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Corynebacterium*, *Alteromonas*, *Photobacterium*, *Psychrobacter*, *Mycoplasma*, *Stenotrophomonas* και *Micrococcus* αλλά και το ρόλο των μικροοργανισμών του πεπτικού συστήματος στη διατροφή των ψαριών αλλά και στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού τους συστήματος (Nayak 2010 και αναφορές στο κείμενο).

Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με τη βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου στον άνθρωπο και σε άλλα θηλαστικά (Turnbaugh *et al.* 2006, Ley *et al.* 2008). Οι Ley *et al.* (2008) έδειξαν την επίδραση της τροφής στη βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου των θηλαστικών η οποία αυξάνεται από τη σαρκοφαγία, στη χορτοφαγία, με τα παμφάγα άτομα να εμφανίζουν ενδιάμεσες τιμές.

Η σημασία των μικροοργανισμών στο ανθρώπινο σώμα συνοψίστηκε από τον Zimmer στον άτλαντα του ανθρώπινου οικοσυστήματος (Zimmer 2011) όπου συνοψίζονται τα βασικότερα ευρήματα από τις μελέτες της μικροοργανισμικής ποικιλότητας που έχουν πραγματοποιηθεί σε διαφορετικά όργανα του ανθρώπινου σώματος, όπως ο εγκέφαλος, το δέρμα, ο λαιμός, τα χέρια κ.λ.π. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στο έντερο όπου αναφέρεται η παρουσία περίπου 200 επικρατών μικροοργανισμικών ειδών και 1000 άλλων με χαμηλότερες συχνότητες, ενώ ταυτόχρονα τονίζεται η αρνητική επίδραση των αντιβιοτικών στη βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου. Τέλος, μέσω της παρακολούθησης της

βακτηριακής ποικιλότητας στο έντερο νηπίου από τη γέννηση μέχρι το 15^ο μήνα παρουσιάζεται η σταδιακή εγκατάσταση βακτηριακών ομάδων στο έντερο του νηπίου αλλά και η διαδοχή τους ανάλογα με τις τροφές που καταναλώνονται κάθε φορά (Εικ. 1.2).



Εικόνα 1.2. Διαδοχή βακτηριακών ομάδων στο παχύ έντερο νηπίου από τη στιγμή της γέννησης μέχρι το 15ο μήνα. Από Zimmer (2011)

Άλλες μελέτες σχετικές με τη μικροοργανισμική ποικιλότητα του πεπτικού συστήματος του ανθρώπου έχουν δείξει την πιθανή σχέση συγκεκριμένων ομάδων με την εμφάνιση της παχυσαρκίας (Ley *et al.*, 2006). Επίσης έχει εντοπιστεί ο προστατευτικός ρόλος της παραγωγής λιπαρών οξέων, όπως το βουτυρικό οξύ, στην εμφάνιση του καρκίνου του ορθού (Pryde *et al.* 2002). Γενικά η βακτηριακή ποικιλότητα του πεπτικού συστήματος έχει πλέον συνδεθεί με την καλή κατάσταση του ανθρώπινου οργανισμού λόγω της σχέσης της με το ανοσοποιητικό σύστημα (Flint *et al.* 2008).

Ένα από τα πιο εντυπωσιακά παραδείγματα παρουσίας βακτηριακών κοινοτήτων στο πεπτικό σύστημα, που σχετίζονται με ιδιαίτερες διατροφικές

συνήθειες, είναι η παρουσία βακτηρίων που διαθέτουν την ικανότητα διάσπασης του θαλάσσιου φύκου *Porphyra* (Hehemann *et al.* 2010). Το συγκεκριμένο φύκος αποτελεί βασικό κομμάτι της διατροφής των Γιαπωνέζων και βασικό συστατικό της προετοιμασίας του σούσι. Τα βακτήρια με την ικανότητα για την πέψη του *Porphyra* εντοπίστηκαν μόνο στις μικροοργανισμικές κοινότητες των Γιαπωνέζων που διατρέφονται με *Porphyra* παραδοσιακά από μικρή ηλικία και όχι σε άλλες ομάδες (π.χ. Βόρεια Αμερική) όπου αυτό το είδος τροφής δεν είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο.

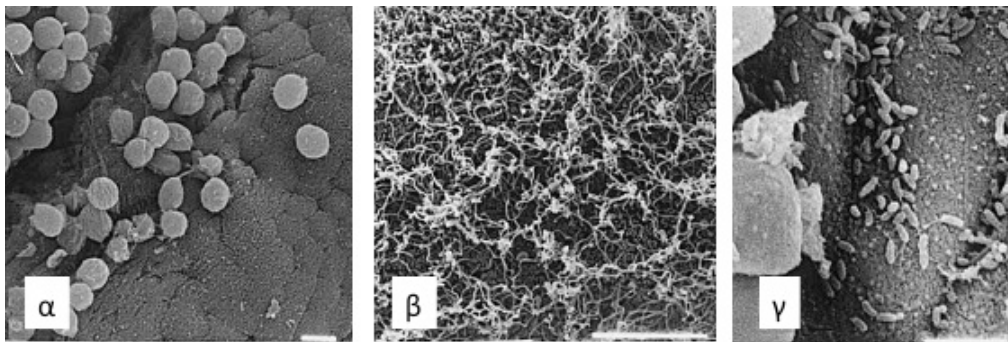
1.6. Βακτήρια του πεπτικού συστήματος και καρκινοειδή

Σε μερικές από τις πρώτες μελέτες που είχαν πραγματοποιηθεί για το πεπτικό σύστημα των καρκινοειδών είχε προταθεί η έλλειψη μικροοργανισμών από τον πεπτικό σωλήνα (Boyle & Mitchell 1978, Bignell 1984). Σχεδόν ταυτόχρονα όμως, οι μελέτες των Deming & Colwell (1981) και Colorni (1985) απέδειξαν την παρουσία βακτηρίων στο πεπτικό σύστημα των καρκινοειδών.

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο οπισθέντερο μελών των Brachyura και Thalassinidea με την χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου έδειξαν την παρουσία πλήθους προσκολλημένων και ελεύθερων βακτηρίων. Αντίστοιχες εικόνες παρουσιάστηκαν ανεξαρτήτως του διατροφικού τύπου του ξενιστή, του οικοσυστήματος αλλά και της βιογεωγραφίας του (Harris 1993). Επίσης παρατηρήθηκε ότι οι πιο κοινοί τύποι βακτηρίων που εντοπίζονται είναι προσκολλημένοι βάκιλοι ή κόκκοι. Οι διαφορές ανάμεσα στα διαφορετικά μέλη των Decapoda συνδέθηκαν κυρίως με τους διαφορετικούς διατροφικούς τύπους

αφού στα σαρκοφάγα ζώα εντοπίστηκαν λιγότεροι μικροοργανισμοί απ' ό τι στα θρυμματοφάγα.

Αντίστοιχες μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στο πεπτικό σύστημα αντιπροσώπων των *Thalassinidea* έδειξαν την παρουσία βακτηριακών κοινοτήτων διαφορετικής μορφολογίας στο μεσέντερο διαφορετικών ειδών (Pinn *et al.* 1999). Συγκεκριμένα εντοπίστηκαν κόκκοι, βάκιλοι αλλά και σπειρύλλια (Εικ. 1.3).



Εικόνα 1.3: Εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο από το μεσέντερο των α) *Calocaris mesandreae*, β) *Calianassa subterranean* και γ) *Upogebia stellata*. Η κλίμακα μεγέθους είναι αντίστοιχα, 1, 5 και 5 μm . (Από Pinn *et al.* 1999)

Η μικροοργανισμική ποικιλότητα του πεπτικού σωλήνα των καρκινοειδών μπορεί να διαφέρει και ανάμεσα σε άτομα του ίδιου πληθυσμού που συλλέχθηκαν από την ίδια περιοχή (Lau *et al.* 2002). Οι παράγοντες που καθορίζουν τις διαφορές στην μικροοργανισμική ποικιλότητα παραμένουν άγνωστοι, αλλά η πιο επικρατής άποψη παραμένει η διαφορά σε διατροφικές συνήθειες. Μία άλλη άποψη που είχε προταθεί παλαιότερα ήταν ότι οι διαφορές στην ποικιλότητα μπορεί να οφείλονται στα διαφορετικά στάδια εκδύσεων (Dempsey *et al.* 1989),

εξαιτίας της ανανέωσης του στρώματος χιτίνης του οπισθέντερου κατά την έκδυση και κατά συνέπεια και των μικροοργανισμών.

Μέχρι το 1990 οι διαθέσιμες τεχνικές για τη μελέτη της μικροοργανισμικής ποικιλότητας περιοριζόντουσαν στην χρήση τεχνικών απομονώσεων, ενζυμικών ελέγχων και μικροσκοπίου. Μετά το 1990 με την πρώτη χρήση της rRNA προσέγγισης (Giovannoni *et al.* 1990) για τη μελέτη της μικροοργανισμικής ποικιλότητας, οι μοριακές τεχνικές άρχισαν να χρησιμοποιούνται και για την εύρεση της φυλογένεσης των μικροοργανισμών στο πεπτικό σύστημα.

Σε μελέτες που είχαν προηγηθεί της χρήσης των μοριακών τεχνικών και αφορούσαν τη βακτηριακή ποικιλότητα του πεπτικού συστήματος των καρκινοειδών και πιο συγκεκριμένα αντιπροσώπων των Brachyura, των Copepoda, των Decapoda και των Amphipoda, είχαν απομονωθεί συνολικά 20 βακτηριακά γένη. Πιο συγκεκριμένα είχαν απομονωθεί αντιπρόσωποι των γενών *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Moraxella*, *Enterobacterium*, *Acinetobacter*, *Oceanospirillum*, *Alteromonas*, *Xanthomonas* (γ-Proteobacteria) *Flavobacterium*, *Cytophaga*, (Bacteroidetes), *Micrococcus*, *Corynebacterium* (Actinobacteria), *Staphylococcus*, *Bacillus*, (Firmicutes), *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Achromobacter* (β-Proteobacteria) (Harris 1993). Αντιπρόσωποι των γενών *Vibrio* και *Pseudomonas* ήταν οι πιο κοινά εμφανιζόμενοι στα δείγματα των καρκινοειδών, ενώ και τα γένη *Flavobacterium*, *Micrococcus* και *Aeromonas* εντοπίστηκαν αρκετές φορές.

Σε μελέτες σχετικές με τους ενζυμικούς ελέγχους στο πεπτικό σύστημα των Decapoda τα πιο κοινώς εμφανιζόμενα ένζυμα μικροοργανισμικής προέλευσης ήταν οι πρωτεάσες, οι χιτινάσες και οι λιπάσες (Hood *et al.* 1971, Dempsey &

Kitting 1987, Harris *et al.* 1991). Από τα παραπάνω ένζυμα, τα χιτινολυτικά παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τα καρκινοειδή, εφόσον εμπλέκονται στην έκδυση των καρκινοειδών, στην αποβολή του καλυμμένου με χιτίνη οπισθέντερου, αλλά και στην πέψη τροφών που διαθέτουν δύσπεπτους εξωσκελετούς.

Σε άλλη μελέτη (Donachie & Zdanowski 1998) ανιχνεύθηκαν βακτήρια με πρωτεϊνολυτικές ικανότητες στο στομάχι της γαρίδας (krill) *Euphausia superba* (Euphausiacea). Από εκεί απομονώθηκε ένα είδος (*Psychrobacter proteolyticus*) που ανήκει στο υπόφυλο των γ-Proteobacteria . Το *P. proteolyticus* βρέθηκε να παράγει μία μεταλλοπρωτεάση προσαρμοσμένη σε χαμηλές θερμοκρασίες (Denner *et al.* 2001). Η *E. superba* έχει χαρακτηριστεί ως ένα παμφάγο είδος (Price *et al.* 1988), αλλά η παρουσία βακτηρίων με πρωτεϊνολυτικές ικανότητες στο πεπτικό της σύστημα συνδέθηκε με τις περιόδους που συμπεριφέρεται ως σαρκοφάγο.

Σε μία σχετικά πρόσφατη μελέτη ελέγχθηκε η βακτηριακή ποικιλότητα του οπισθέντερου της *Neotrypaea californiensis* (Decapoda: Thalassinidae) παρέχοντας διαφορετική τροφή (Lau *et al.* 2002). Ελέγχθηκαν άτομα από το φυσικό περιβάλλον σε σύγκριση με άτομα που παρέμειναν στο εργαστήριο υπό συνθήκες ασιτίας και άλλα που διατράφηκαν με τροφή πλούσια σε πρωτεΐνες για πέντε ημέρες. Η ανίχνευση της βακτηριακής ποικιλότητας έγινε με την χρήση της 16S rRNA προσέγγισης (Olsen *et al.* 1986, Amann *et al.* 1995). Τα αποτελέσματα έδειξαν τη μεγάλη διακύμανση στη βακτηριακή ποικιλότητα μεταξύ διαφορετικών ατόμων καθώς και την έλλειψη κάποιου προτύπου που να εξαρτάται από τη διαφορετική διατροφή. Ανιχνεύθηκαν αντιπρόσωποι από τρεις βακτηριακές

ομάδες, Proteobacteria (α-, γ- και ε-), CFB (Cytophaga-Flavobacteria-Bacterioidetes) και Gram-θετικά. Οι περισσότεροι φυλότυποι που ανιχνεύτηκαν είχαν πολύ χαμηλά ποσοστά ομοιότητας (<95%) με τους πλησιέστερους συγγενείς τους, που επίσης δεν είχαν καλλιεργηθεί. Μόνο ένας φυλότυπος παρουσίασε 99,1% ομοιότητα με το είδος *Pseudoalteromonas denitrificans*.

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο μεσέντερο της γαρίδας *Pestarella tyrrhenna* με τη χρήση της 16S rRNA προσέγγισης έδειξαν την επικράτηση φυλότυπων που ανήκαν στο γένος *Vibrio* των γ-Proteobacteria, αλλά και στο γένος *Sulfurimonas* των ε-Proteobacteria (Demiri *et al.* 2009). Επίσης εντοπίστηκαν φυλότυποι από τις ομάδες των Spirochaetes και Bacteroidetes αλλά και αντιπρόσωποι από την ακαλλιέργητη ομάδα των Entomoplasmatales.

Αντίστοιχες μελέτες στο μεσέντερο της γαρίδας των υδροθερμικών πηγών *Rimicaris exoculata* έδειξαν την επικράτηση φυλότυπων που ανήκαν στις ομάδες των ε-Proteobacteria, Defferibacteres και Entomoplasmatales (Zbinden & Cambon-Bonavita 2003, Durand *et al.* 2010). Και στις δύο παραπάνω μελέτες η βακτηριακή ποικιλότητα του πεπτικού συστήματος συνδέθηκε με την πιθανή προσφορά των μικροοργανισμών στη διατροφή των γαρίδων και στην αποτοξικοποίηση ουσιών μέσω της εμπλοκής τους στους κύκλους του σιδήρου (Fe) και του θείου (S).

1.7. Υδατοκαλλιέργειες και προβιοτικά

Προβιοτικοί ονομάζονται οι μικροοργανισμοί του πεπτικού συστήματος των οποίων η μεταβολική δράση ωφελεί τον ξενιστή βελτιώνοντας τη λειτουργική

ισορροπία της μικροοργανισμικής του κοινότητας. Ένας μικροοργανισμός μπορεί να χαρακτηριστεί ως προβιοτικός όταν μετά την κατανάλωση του σε μεγάλες ποσότητες προσδίδει σημαντικά οφέλη στην υγεία του ξενιστή βελτιώνοντας την ενδογενή βασική θρέψη του (Guarner & Schaafsma 1998). Για τον άνθρωπο, τα συνηθέστερα προβιοτικά είδη μικροοργανισμών ανήκουν στα γένη *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* και *Enterococcus* (Fuller 1991).

Πέρα από τη διατροφή του ανθρώπου, αντίστοιχη προσφορά των προβιοτικών στην εκτροφή ζώων σε φάρμες είχε διαπιστωθεί από τη δεκαετία του 1970 όπου χρησιμοποιούνταν ως πρόσθετα σε τροφές, παρέχοντας τη δυνατότητα της καλύτερης ανάπτυξης των ζώων. Αργότερα βρέθηκε ότι βακτήρια της ομάδας *Lactobacilli* είχαν τη δυνατότητα ενίσχυσης του ανοσοποιητικού συστήματος των εκτρεφόμενων ζώων (Fuller 1992). Παρόλαυτα η χρήση των προβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες άρχισε να μελετάται και να αναπτύσσεται μετά το τέλος της δεκαετίας του 1980, με πολλές μελέτες να πραγματοποιούνται κατά τη δεκαετία του 1990 (Ali 2000, Verschueren *et al.* 2000).

Βασικά χαρακτηριστικά για να χαρακτηριστεί ένας μικροοργανισμός ως προβιοτικός είναι:

- 1) η έλλειψη παθογένειας ως προς τον ξενιστή, αλλά και ο ανταγωνισμός με παθογόνα βακτήρια. Τα προβιοτικά πρέπει να έχουν την ικανότητα ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή αλλά και της παραγωγής αντιμικροοργανισμικών ουσιών, όπως οργανικά οξέα, υπεροξείδιο του υδρογόνου και λυσοζύμη (Ali 2000, Irianto & Austin 2002, Irianto & Austin 2003)

- 2) να μπορεί να ωφελήσει τον ξενιστή σε κάποιο τομέα όπως για παράδειγμα με την παραγωγή βιταμινών ή άλλων ωφέλιμων ουσιών (Fuller 1992, Ali 2000, Irianto & Austin 2002)
- 3) η ικανότητα επιβίωσης, προσκόλλησης και εποίκησης του πεπτικού σωλήνα του ξενιστή (Fuller 1992, Ali 2000)
- 4) να είναι σταθερός για μεγάλες περιόδους σε συνθήκες αποθήκευσης αλλά και υδατοκαλλιέργειών (Fuller 1992)
- 5) να είναι μη τοξικός και μη παθογόνος (Fuller 1992)
- 6) να είναι ζωικής προέλευσης, για να είναι πιο εύκολο να εγκατασταθεί στο πεπτικό σύστημα του προς εκτροφή ζώου (Rengpipat *et al.* 2003, Alvandi *et al.* 2004)

Οι υδατοκαλλιέργειες των καρκινοειδών αναπτύχθηκαν ταχύτατα τα τελευταία χρόνια με τις καλλιέργειες των γαρίδων να παρουσιάζουν ετήσιο ρυθμό αύξησης της τάξης του 16,8 %. Ταυτόχρονα όμως, οι ζημιές από τις ασθένειες των γαρίδων έφτασαν στα τρία δισεκατομμύρια δολάρια (Farzanfar 2006). Οι αρνητικές επιπτώσεις της χρήσης αντιβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες, για τη δημόσια υγεία και για την αύξηση της ανθεκτικότητας των παθογόνων βακτηρίων στα αντιβιοτικά, υπέδειξαν τη χρήση των προβιοτικών για την καταπολέμηση των ασθενειών στις υδατοκαλλιέργειες (Vaseeharan & Ramasamy 2003).

Ένα από τα πρώτα παραδείγματα της επιτυχημένης χρήσης προβιοτικών σε υδατοκαλλιέργειες ήταν η χρήση του στελέχους *Bacillus* S11 μαζί με την τροφή σε καλλιέργειες της γαρίδας *Penaeus monodon*. Τα αποτελέσματα έδειξαν την αποτελεσματική καταπολέμηση του παθογόνου *Vibrio harveyi* και την καλύτερη επιβίωση των γαρίδων (Vaseeharan & Ramasamy 2003). Αντίστοιχα

αποτελέσματα έδωσε και η μελέτη των Rengpipat *et al.* (2003) με τη χρήση του ίδιου μικροοργανισμού.

Οι περισσότερες πληροφορίες για τα προβιοτικά και τις υδατοκαλλιέργειες αφορούν κυρίως είδη γαρίδων όπως το *Litopenaeus vannamei* (Lin *et al.* 2004, Balcázar *et al.* 2007, Chiu *et al.* 2007) και το *Penaeus monodon* (Dalmin *et al.* 2001, Rengpipat *et al.* 2003, Vaseeharan & Ramasamy 2003). Άλλα είδη στις καλλιέργειες των οποίων χρησιμοποιούνται προβιοτικά είναι το *Artemia franciscana* (Branchiopoda)(Orozco-Medina *et al.* 2002), το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται ως τροφή σε υδατοκαλλιέργειες. Τα πιο κοινά είδη που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα σε καλλιέργειες καρκινοειδών ανήκουν στα γένη *Bacillus* και *Vibrio*.

Τέλος, πέρα από τη θετική τους επίδραση στην επιβίωση και την αύξηση των εκτρεφόμενων ειδών οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί συνεισφέρουν και στη μείωση της επιβάρυνσης του περιβάλλοντος μέσω της μείωσης του εξερχόμενου οργανικού άνθρακα από τη λειτουργία των υδατοκαλλιεργειών, της αύξησης της διαύγειας του νερού και της νιτροποίησης (Dalmin *et al.* 2001, Kim *et al.* 2006, Li *et al.* 2006).

1.8. Σκοπός της Διδακτορικής διατριβής

Γενικός στόχος της Διδακτορικής διατριβής ήταν η ανίχνευση της βακτηριακής ποικιλότητας και αφθονίας στο πεπτικό σύστημα φυσικών και εκτρεφόμενων πληθυσμών του *Nephrops norvegicus* με τη χρήση μοριακών τεχνικών.

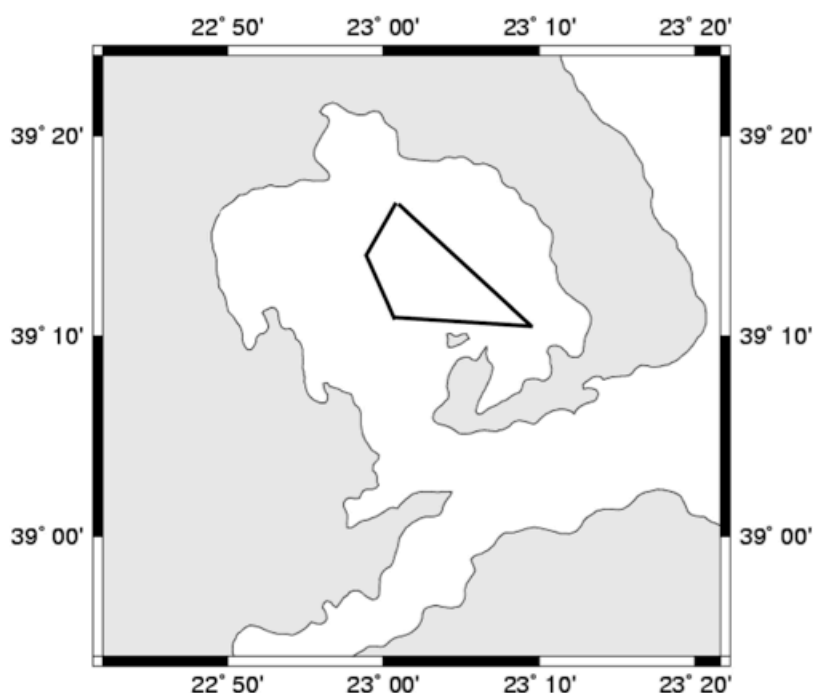
Επιμέρους στόχοι της διατριβής ήταν

1. Η μελέτη της βακτηριακής ποικιλότητας του πεπτικού συστήματος του *N. norvegicus* σε εποχικό επίπεδο με τη χρήση μοριακών μεθόδων και η εύρεση των παραγόντων που την καθορίζουν.
2. Η εύρεση των επικρατών φυλότυπων και των σχετικών αφθονιών τους σε διαφορετικά χρονικά σημεία, στη διάρκεια ενός έτους.
3. Η μελέτη της βακτηριακής ποικιλότητας του πεπτικού συστήματος του *N. norvegicus* σε συνθήκες εκτροφής υπό την παροχή διαφορετικών σιτηρεσίων, η εύρεση των επικρατών φυλότυπων ανάλογα με το είδος της διατροφής και η ανίχνευση των παραγόντων που καθορίζουν τη βακτηριακή ποικιλότητα.
4. Η ανίχνευση κοινών φυλότυπων μεταξύ φυσικών και εκτρεφόμενων πληθυσμών.
5. Η ανίχνευση βακτηριακών φυλότυπων με πιθανές μελλοντικές χρήσεις ως προβιοτικά.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Συλλογή δειγμάτων και μορφομετρική ανάλυση (φυσικοί πληθυσμοί)

Η συλλογή των δειγμάτων του *Nephrops norvegicus* πραγματοποιήθηκε στον Παγασητικό κόλπο σε μία περιοχή καθορισμένη από τέσσερα σημεία: Βόρειο ($39^{\circ} 17.34' \text{ N}$, $23^{\circ} 02.27' \text{ E}$), Δυτικό ($39^{\circ} 15.55' \text{ N}$, $22^{\circ} 56.45' \text{ E}$), Νότιο ($39^{\circ} 10.33' \text{ N}$, $23^{\circ} 00.59' \text{ E}$) και Ανατολικό ($39^{\circ} 09.14' \text{ N}$, $23^{\circ} 08.52' \text{ E}$) και σε βάθη 60-88 m (Εικ. 2.1). Ο Παγασητικός επιλέχθηκε ως ένα από τα βασικότερα και πιο προσβάσιμα



Εικόνα 2.1: Χάρτης του Παγασητικού κόλπου. Η περιοχή δειγματοληψίας ορίζεται μέσα στο σχήμα.

(μικρά βάθη) αλιευτικά πεδία του *N. Norvegicus* στην Ελλάδα (Smith & Papadopoulou 2003).

Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε μηνιαία βάση το 2007 εκτός από τον Ιανουάριο, τον Απρίλιο και το Νοέμβριο, λόγω κακών καιρικών συνθηκών και τον Ιούνιο λόγω απαγορεύσεων αλίευσης (Mente *et al.* 2009). Για τη συλλογή χρησιμοποιήθηκαν ατομικές παγίδες (60 cm x 45 cm x 30 cm), κατασκευασμένες από μεταλλικό σκελετό και πλαστικό δίχτυ, ώστε να αποφευχθεί η καταπόνηση των ατόμων κατά τη συλλογή. Οι παγίδες παρέμειναν στο βυθό της θάλασσας από οχτώ έως δώδεκα ώρες πριν τη συλλογή τους και τα ζωντανά άτομα που συλλέχθηκαν μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο όπου προσδιορίστηκε το φύλο και μετρήθηκαν το βάρος, το μέγεθος του κεφαλοθώρακα και το πλάτος της κοιλιακής περιοχής (Πίν. Π1). Στο σύνολο, 49 δείγματα συλλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση.

2.2. Απομονωση πεπτικού σωλήνα

Η απομόνωση του πεπτικού σωλήνα πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες αποστείρωσης. Για την απομάκρυνση όσο το δυνατόν περισσότερων ευκαιριακών βακτηρίων (αυτών που δεν ήταν προσκολλημένα στον ιστό του εντέρου) οι πεπτικοί σωλήνες ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό χωρίς συσσωματώματα, περασμένο από φίλτρα με μέγεθος πόρων 0,2 μm (Particle Free Sea Water, PFSW) και εκκενώθηκαν πλήρως με την άσκηση ελαφράς μηχανικής πίεσης. Όλα τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν (νυστέρι και λαβίδα) είχαν αποστειρωθεί με τη χρήση αιθανόλης σε φλόγα.

2.3. Απομόνωση DNA και μονιμοποίηση ιστών

Για τις αναλύσεις της βακτηριακής ποικιλότητας στον πεπτικό σωλήνα χρησιμοποιήθηκε το κομμάτι του μεσέντερου (Εικ. 2.2). Η επιλογή αυτή έγινε γιατί το μεσέντερο θεωρείται το τμήμα του πεπτικού σωλήνα όπου παρατηρείται εναλλακτική απορρόφηση θρεπτικών ουσιών, κάτι που δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί στο οπισθέντερο (Yonge 1924).

Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε στο μεσέντερο 45 δειγμάτων από όλους τους μήνες συλλογής με την χρήση του QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc. USA) ακολουθώντας την προτεινόμενη από τον κατασκευαστή διαδικασία. Δύο έως τρεις ιστοί από το Φεβρουάριο, το Μάρτιο, τον Ιούλιο και τον Αύγουστο



Εικόνα 2.2: Απεικόνιση του πεπτικού σωλήνα του *Nephrops norvegicus*

και από άτομα του ίδιου φύλου ομογενοποιήθηκαν πριν την απομόνωση του

γενετικού υλικού εξαιτίας της χαμηλής ποσότητας διαθέσιμου ιστού. (Πίν. 2.1). Στο τελικό στάδιο το DNA διαλύθηκε σε 100 µl ρυθμιστικού διαλύματος (από τον κατασκευαστή του kit) και φυλάχθηκε στους -20⁰ C. Συνολικά 39 δείγματα απομονωμένου DNA χρησιμοποιήθηκαν για αναλύσεις (Πίν. 2.1).

Για τη μονιμοποίηση των ιστών οι πεπτικοί σωλήνες διαλύθηκαν για τρεις h στους 4⁰ C σε διάλυμα 4% φορμαλδεΰδης σε 1X Phosphate Buffered-Saline (PBS) (137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄). Στη συνέχεια τα δείγματα ξεπλύθηκαν τρεις φορές σε διάλυμα 1X PBS για δέκα min με ενδιάμεσα πλυσίματα σε δις-απιονισμένο νερό. Στο τελικό στάδιο τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20⁰ C σε 1,5 ml διαλύματος 1X PBS: Αιθανόλης (1:1). Συνολικά μονιμοποιήθηκαν τέσσερα δείγματα ιστών και αναλύθηκαν περαιτέρω με την τεχνική του Επιτόπιου Φθορίζοντος Υβριδισμού (Fluorescence in Situ Hybridization, FISH) (Πίν. 2.1.).

Πίνακας 2.1: Δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση DNA και FISH (μονιμοποιημένα δείγματα). Όλα τα δείγματα του DNA χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση της μικροποικιλότητας. Με υπογράμμιση φαίνονται τα δείγματα των οποίων η μικροποικιλότητα αναλύθηκε με δύο ζεύγη εκκινητών. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των βιβλιοθηκών φαίνονται με έντονα γράμματα. F: Φεβρουάριος, Mr: Μάρτιος, My: Μάιος, Jl: Ιούλιος, Ag: Αύγουστος, Se: Σεπτέμβριος, O: Οκτώβριος, D: Δεκέμβριος.

Μήνας	Κωδικός δείγματος	Αναμεμιγμένα δείγματα	Μονιμοποιημένα δείγματα
Φεβρουάριος	-	<u>F1</u> (F40/F44)	
Μάρτιος	Mr26	Mr1 (Mr4/Mr10)	
Μάιος	My27/My44/My45/ My46 /My4		

Μήνας	Κωδικός δείγματος	Αναμεμιγμένα δείγματα	Μονιμοποιημένα δείγματα
Ιούλιος	Jl1/Jl3	Jl4 (Jl14/Jl17/Jl19)	
Αύγουστος	Ag2.1/Ag8/Ag16/Ag23/Ag31	Ag1 (Ag4/Ag6/Ag9)	FN2/FN3
Σεπτέμβριος	Se1/Se2/Se3/Se4/Se5/Se6/Se7 /Se9/Se11/Se12		FSe3/FSe1
Οκτώβριος	O1/O2/O3/O4/O5/O6		
Δεκέμβριος	D1/D2/D3/D4/D6/D7		

2.4. Ανάλυση της μικροποικιλότητας για όλα τα βακτήρια

Η βακτηριακή μικροποικιλότητα του πεπτικού σωλήνα μελετήθηκε με την χρήση της αυτοματοποιημένης ανάλυσης του διαγονιδιακού ριβοσωμικού χώρου (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, ARISA) (Fischer & Triplett 1999). Ο διαγονιδιακός ριβοσωμικός χώρος (Intergenic Transcribed Spacer, ITS) αποτελεί το μεταγραφόμενο χώρο μεταξύ των 16S και 23S ριβοσωμικών γονιδίων. Το μήκος του ITS και η αλληλουχία του είναι ενδεικτικά του βακτηριακού είδους από το οποίο προέρχεται ενώ η αλληλουχία του μπορεί να κωδικοποιεί για tRNA γονίδια.

Ο ITS ενισχύθηκε σε τρεις επαναλήψεις με τους παγκόσμιους για βακτήρια εκκινητές ITSFun (5'- GTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3') και ITSReub (5'- GCCAAGGCATCCACC-3') (Cardinale *et al.* 2004). Ο εκκινητής ITSFun ήταν σημασμένος με το FAM φθοριόχρωμα (fluorochrome) στο 5' άκρο. Οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) αποτελούνταν από 3 min αρχικής αποδιάταξης στους 94⁰ C, 30 κύκλους με 45 sec στους 94⁰ C, 45 sec στους 55⁰ C, και 90 sec στους 72⁰ C, και ένα βήμα τελικής

επιμήκυνσης με 5 min στους 72⁰ C. Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν με Sephadex G-50 Superfine (Sigma-Aldrich, Germany). Καθορισμένη ποσότητα καθαρισμένου DNA (150 ng) αναμίχθηκε με ένα μίγμα διαχωρισμού που περιείχε 0,5 μl εσωτερικού δείκτη μεγεθών Map Marker®1000 ROX (50-1000 bp; BioVentures Inc., Washington, DC, USA), 0,5 μl tracking dye (BioVentures) και 14μl απιονισμένου Hi-Di φορμαμιδίου (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Ο διαχωρισμός των ζωνών πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς σε συσκευή ABI 3200 (Applied Biosystems, USA).

Τα γραφήματα της ARISA αναλύθηκαν με τη χρήση του λογισμικού GENEMAPPER v 3.7. (Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA). Η συνολική επιφάνεια των κορυφών ανά δείγμα κανονικοποιήθηκε σε ένα. Μόνο κομμάτια πάνω από το κατώφλι των 50 μονάδων φθορισμού και με μήκος από 100 μέχρι 1000 βάσεις εξετάστηκαν. Τα εξερχόμενα αρχεία του GENEMAPPER αναλύθηκαν περαιτέρω με συμβατικά αρχεία εντολών του R (Ramette 2009). Για να συνυπολογιστεί η αβεβαιότητα στον υπολογισμό του μεγέθους, τα κομμάτια ομαδοποιήθηκαν σε ομάδες μεγέθους με τη χρήση αυτόματου και διαδραστικού «binning» όπως είχε αναλυθεί παλαιότερα (Ramette 2009). Το παράθυρο των 2,5 ζευγών βάσεων (ζ.β.) επιλέχθηκε τελικά ως το πλαίσιο που έδωσε τις ψηλότερες ομοιότητες ανά ζεύγη ανάμεσα στα δείγματα και χρησιμοποιήθηκε για την περαιτέρω πολυπαραγοντική ανάλυση.

Τα αποτελέσματα της ARISA αναλύθηκαν στατιστικά με την χρήση της μη-μετρικής πολυδιάστατης κατάταξης (nonMetric MultiDimensional Scaling, NMDS) (Kruskal 1964) για την εξαγωγή κάποιας πιθανής περιβαλλοντικής ερμηνείας. Τα αποτελέσματα των τριών επαναλήψεων για το κάθε δείγμα συγχωνεύτηκαν

«συναιναιετικά» (consensus) έτσι ώστε να διατηρηθούν κομμάτια που εμφανίστηκαν σε τουλάχιστον δύο από τις τρεις επαναλήψεις (consensus merging) (Boer *et al.* 2009, Ramette 2009). Πραγματοποιήθηκαν αβίαστες ταξιθετήσεις για τη γραφική απεικόνιση των σχέσεων ανάμεσα σε διαφορετικά δείγματα με την χρήση τρισδιάστατου NMDS, στο R (R, 2.7.0). Η ταξιθέτηση με NMDS προσπαθεί να τοποθετήσει όλα τα δείγματα σε έναν τρισδιάστατο χώρο έτσι ώστε να διατηρηθούν οι ταξινομικές τους σχέσεις, οι οποίες στη συγκεκριμένη περίπτωση βασίζονται σε μία μήτρα ομοιοτήτων Bray-Curtis. Συνεπώς, όσο πιο κοντά απεικονίζονται τα δείγματα τόσο περισσότερο μοιάζουν οι βακτηριακές κοινότητες στο πεπτικό σύστημα. Η τιμή του Kruskal stress είναι ενδεικτική της δυσκολίας να χωρέσουν όλες οι σχέσεις μεταξύ των δειγμάτων σε έναν τρισδιάστατο χώρο.

Για να προσδιοριστεί η πιθανή επίδραση της εποχής της συλλογής και των μορφομετρικών στοιχείων στην εξήγηση της δομής των βακτηριακών κοινοτήτων πραγματοποιήθηκε ανάλυση πλεονασμού (Redundancy analysis, RDA) (Ramette 2007) στο R και η στατιστική σημαντικότητά της αξιολογήθηκε με 999 δοκιμές μεταθέσεων. Η RDA θεωρείται επέκταση της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA) στην οποία οι κύριοι άξονες περιορίζονται στο να είναι γραμμικοί συνδυασμοί των περιβαλλοντικών μεταβλητών (Rao 1964). Στην RDA χρησιμοποιούνται πολλαπλές γραμμικές 'παλινδρομήσεις' για να εξηγήσουν τη σχέση μεταξύ ανεξάρτητων (περιβαλλοντικοί παράγοντες) και εξαρτημένων (βακτηριακή ποικιλότητα) μεταβλητών και για να βρουν κατά πόσο αυτή είναι στατιστικά σημαντική.

Η *a priori* υπόθεση της διαφοροποίησης των βακτηριακών κοινοτήτων ανάλογα με την εποχή συλλογής ελέγχθηκε με RDA και με τη μη παραμετρική ανάλυση ομοιοτήτων (ANalysis Of SIMilarities, ANOSIM) (Clarke & Green 1988). Το ANOSIM παράγει μία στατιστική δοκιμή R, που κυμαίνεται από -1 έως 1. Το μέγεθος της R είναι ενδεικτικό για το βαθμό του διαχωρισμού μεταξύ των ομάδων προς εξέταση με τιμές κοντά στο 0 να δείχνουν έλλειψη διαφοροποίησης και τιμές κοντά στον 1 απόλυτο διαχωρισμό (Clarke 1993). Το R είναι απίθανο να είναι χαμηλότερο του 0, εφόσον αυτό θα έδειχνε ότι οι ομοιότητες μέσα στην ομάδα είναι σημαντικά χαμηλότερες απ' ότι ανάμεσα σε διαφορετικές ομάδες. Το κρίσιμο επίπεδο σημαντικότητας που χρησιμοποιήθηκε για τα αποτελέσματα του ANOSIM ήταν $p=0,05$. Εφόσον πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές συγκρίσεις ανά ζεύγη (21) εφαρμόστηκε η διόρθωση Bonferroni και το κρίσιμο επίπεδο σημαντικότητας μειώθηκε στο 0,0024 ($0,05/21$). Η διόρθωση Bonferroni έχει κριθεί αρκετές φορές ως εξαιρετικά συντηρητική και πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή σε οικολογικά δεδομένα (Legendre & Legendre 1998).

2.5. Ανάλυση της μικροποικιλότητας αντιπροσώπων των Mollicutes και του CK_1C4-19

Η φυλογενετική ανάλυση και η αλληλούχιση των ITS φυλότυπων που εντοπίστηκαν στα δείγματα του *N. norvegicus* (βλ. § 2.6) έδειξε ότι οι ITS αλληλουχίες των φυλότυπων που ανήκαν στο Υπόφυλο των Mollicutes και στο υποψήφιο φύλο CK_1C4-19 παρουσίαζαν λάθος ταιριάσματα με τον παγκόσμιο εκκινητή ITSFun που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της ARISA. Για αυτό το λόγο για την ανάλυση της μικροποικιλότητας των ακαλλιέργητων Mollicutes και

των αντιπροσώπων του CK_1C4-19 σχεδιάστηκε ειδικός εκκινητής βάσει των αλληλουχιών που προέκυψαν από τη φυλογενετική ανάλυση. Η αλληλουχία του εκκινητή που προέκυψε ήταν ITSFmol (5'-GTCGTAACAAGGTATCWCTA-3', W=A/T), όπου υπογραμμισμένες φαίνονται οι διαφορετικές βάσεις από τον παγκόσμιο εκκινητή ITSFun.

Για τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας προσκόλλησης των εκκινητών για PCR με τους ITSFmol-ITSReub πραγματοποιήθηκε PCR βαθμιδωτών θερμοκρασιών (gradient PCR) όπου χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές θερμοκρασίες για τη σύνδεση των εκκινητών και επιλέχτηκε η θερμοκρασία που έδινε τα πιο καθαρά αποτελέσματα στο πήκτωμα αγαρόζης. Συγκεκριμένα ελέγχθηκαν οι θερμοκρασίες από 50 °C μέχρι 60 °C και τελικά επιλέχθηκε η θερμοκρασία των 56 °C.

Ο ITS ενισχύθηκε σε τρεις επαναλήψεις με τους εκκινητές ITSFmol (5'-GTCGTAACAAGGTATCWCTA-3', W=A/T) και ITSReub (5'-GCCAAGGCATCCACC-3') (Cardinale *et al.* 2004). Ο εκκινητής ITSr ήταν σημασμένος με το HEX φθοριόχρωμα στο 5' άκρο. Οι συνθήκες της PCR αποτελούνταν από 3 min αρχικής αποδιάταξης στους 94 °C, 30 κύκλους με 45 sec στους 94 °C, 45 sec στους 55 °C, και 90 sec στους 72 °C, και ένα βήμα τελικής επιμήκυνσης με 5 min στους 72 °C.

Με τους καινούριους εκκινητές αναλύθηκαν επιλεγμένα δείγματα από κάθε μήνα (Πίν. 2.1). Κάθε δείγμα αναλύθηκε σε τρεις επαναλήψεις και παράλληλα πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε τρία αντίγραφα με τους παγκόσμιους εκκινητές. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες μέθοδοι όπως περιγράφονται στο υποκεφάλαιο 2.4. Επιλέχθηκε παράθυρο τριών ζ.β. και πραγματοποιήθηκε συναινετική συγχώνευση των αντιγράφων για την περαιτέρω ανάλυση των

ζωνών που προέκυψαν από την ARISA. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με NMDS όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ξεχωριστά για κάθε ζεύγος εκκινητών. Στο τελικό στάδιο πραγματοποιήθηκε συγχώνευση των αποτελεσμάτων από τα δύο ζεύγη τα οποία και αναλύθηκαν στη συνέχεια ξανά με NMDS.

2.6. Ανάλυση της βακτηριακής ποικιλότητας. Κλωνοποίηση και αλληλούχιση των 16S rRNA γονιδίων και του ITS

Η ανάλυση της βακτηριακής ποικιλότητας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μοριακών τεχνικών στηριζόμενων στη μελέτη των αλληλουχιών των 16S rRNA βακτηριακών γονιδίων ως δεικτών για την εύρεση της φυλογενετικής θέσης των μικροοργανισμών (Woese & Fox 1977). Χρησιμοποιήθηκε το σύνολο των τεχνικών της 16S rRNA προσέγγισης (Olsen *et al.* 1986, Amann *et al.* 1995) όπως απομόνωση DNA από περιβαλλοντικά δείγματα, ανάλυση με PCR των 16S rRNA γονιδίων, κλωνοποίηση, ανάλυση των αλληλουχιών, κατασκευή φυλογενετικών δέντρων και εύρεση της σχετικής αφθονίας των φυλότυπων.

Τα βακτηριακά 16S rRNA γονίδια και ο ITS ενισχύθηκαν στα δείγματα F1, My46, J11, Ag31, Se3, O2 και D1 χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 27f BAC (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', M=A/C) (Lane 1991) και ITSReub. Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων της PCR ποίκιλε από 1800-2400 ζ.β. εξαιτίας της ποικιλίας στο μέγεθος του ITS. Οι συνθήκες της PCR ήταν 2 min στους 94 °C, 10 κύκλοι με 30 sec στους 94 °C, 1 min στους 55 °C και 3 min στους 72 °C, ακολουθούμενοι από 13-20 κύκλους με 30 sec στους 94 °C, 30 s στους 55 °C και 3 min (+5 sec σε κάθε κύκλο) στους 72 °C και τελικά 7 min στους 72° C. Οι κύκλοι της PCR προσαρμόστηκαν έτσι ώστε να μειωθεί η εμφάνιση μη ειδικών

προϊόντων. Στα δείγματα J11, Ag31 και O2 τα προϊόντα της PCR δεν ήταν αρκετά για περαιτέρω ανάλυση και πραγματοποιήθηκε εσωτερική (nested) PCR χρησιμοποιώντας τους εσωτερικούς, ως προς το προϊόν της πρώτης PCR, εκκινητές GM3_27 (5'-AGAGTTTGATCMTGGC-3') (Muyzer *et al.* 1995) και GM4_1492 (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') (Kane *et al.* 1993). Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων ήταν 1550-1600 ζ.β.. Οι συνθήκες της PCR περιλάμβαναν 3 min στου 94 °C, 10-13 κύκλοι με 1 min στους 94 °C, 1 min στους 44 °C και 3 min στους 72 °C και ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης με 5 min στους 72 °C. Οι συνολικοί κύκλοι και για τις δύο PCR ποίκιλαν από 25 κύκλους για το δείγμα Se3 μέχρι 37 κύκλους για τα δείγματα Ag31 και O2. Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc., Germany) και κλωνοποιήθηκαν άμεσα χρησιμοποιώντας το TOPO TA Kit for sequencing (Invitrogen Inc., Germany) χρησιμοποιώντας χημικώς δεκτικά κύτταρα *Escherichia coli*. Το μέγεθος του ενθέματος ελέγχθηκε μέσω PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές M13f (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') και M13R (5'-GCGGATAACAATTTCACACAGG-3') που προσδένονται στο πλασμίδιο. Οι συνθήκες της PCR περιλάμβαναν 5 min στους 94 °C, 25 κύκλους με 1 min στους 94 °C, 1 min στους 52,5 °C και 3 min στους 72 °C και ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης με 5 min στους 72 °C. Οι κλώνοι που περιείχαν το ένθεμα καλλιέργηθηκαν σε 1,5 ml θρεπτικού μέσου Luria-Bertani με αμπικιλίνη (100 µg/ml) και τα πλασμίδια απομονώθηκαν από τα κύτταρα των καλλιεργειών χρησιμοποιώντας το QIAprep Miniprep Kit (Qiagen Inc. Germany). Όλα τα πλασμίδια αλληλουχήθηκαν μερικώς χρησιμοποιώντας τον εκκινητή GM4_1492, ενώ για τις 16S rRNA-ITS βιβλιοθήκες χρησιμοποιήθηκε και ο ITSReub. Μετά από ευθυγράμμιση με τα λογισμικά

SEQUENCHER 4.6 (Gene Codes Corporation, USA) και CLUSTALW (Larkin *et al.* 2007), προσωπική διόρθωση, αποκλεισμό των χιμαιρικών αλληλουχιών που εντοπίστηκαν με το λογισμικό PINTAIL (Ashelford *et al.* 2005) και την οπτική εξέταση των ευθυγραμμίσεων, οι κλώνοι ομαδοποιήθηκαν βάσει της ομοιότητας των 16S rRNA αλληλουχιών σε επίπεδο ίσο με 98%. Αντιπροσωπευτικοί κλώνοι από κάθε ομάδα αλληλουχήθηκαν πλήρως χρησιμοποιώντας τους εκκινητές G5_341f (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'), GM1R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') και 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTTRAGTTT-3')(Muyzer *et al.* 1995).

Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε με χρήση των αντιδραστηρίων ABI BigDye σε συσκευή ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc., USA). Οι κοντινότεροι συγγενείς στις αλληλουχίες εντοπίστηκαν με την χρήση της λειτουργίας BLAST και όλες οι πλήρεις αλληλουχίες ελεγχθηκαν για χίμαιρες με την χρήση του PINTAIL.

Οι 16S rRNA αλληλουχίες ευθυγραμμίστηκαν με την χρήση του λογισμικού ARB (Ludwig *et al.* 2004) και την εφαρμογή SILVA aligner (Pruesse *et al.* 2007). Οι μήτρες αποστάσεων των 16S rRNA γονιδίων υπολογίστηκαν με το μοντέλο Jukes-Cantor και ομαδοποιήθηκαν με την χρήση της μεθόδου των πλησιέστερων γειτόνων (Neighbor-Joining). Το φυλογενετικό δέντρο δημιουργήθηκε με το λογισμικό ARB (Ludwig *et al.* 2004). Για τον έλεγχο της τοπολογίας πραγματοποιήθηκαν 1000 έλεγχοι bootstrap.

Όλες οι 16S rRNA αλληλουχίες από αυτό το κομμάτι της μελέτης έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων της GENBANK με κωδικούς GQ866066-GQ866111.

2.7. Αντιστοίχιση των ζωνών από την ARISA και των μηκών του ITS με συγκεκριμένους φυλότυπους

Το μήκος των αλληλουχιών του ITS των φυλότυπων που αναλύθηκαν (βλ. § 2.6), χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση της πιθανής προέλευσης των κορυφών των γραφημάτων που προέκυψαν από την ARISA (βλ. § 2.4, 2.5). Έτσι επιτεύχθηκε η μελέτη της μικροποικιλότητας των κυρίαρχων φυλότυπων. Τα μήκη των ITS των κυρίαρχων (με βάση το 16S) φυλότυπων που εντοπίστηκαν στις βιβλιοθήκες αντιστοιχίστηκαν στις Λειτουργικές Ταξινομικές Μονάδες (ΛΤΜ) με αντίστοιχο μήκος από τα αποτελέσματα της ARISA. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για τα αποτελέσματα της ARISA για τα δύο ζευγάρια των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν σε ξεχωριστές αναλύσεις.

Συμπληρωματικά, τα αποτελέσματα από όλες τις ARISA που πραγματοποιήθηκαν απεικονίστηκαν με αποστασιοποιημένη ανάλυση αντιστοίχισης (Detrended Correspondence Analysis, DCA), για την εύρεση της επίδρασης των επικρατών φυλότυπων στην κατανομή όλων των δειγμάτων σε δισδιάστατο χώρο, με τη χρήση του λογισμικού PAST. Η DCA αποτελεί μία παραλλαγή της ανάλυσης αντιστοίχισης (Correspondence analysis, CA), (Greenacre 1984) μίας πολυπαραγοντικής μεθόδου που χρησιμοποιείται σε πίνακες θετικών αριθμητικών δεδομένων.

2.8. Επιτόπιος φθορίζων υβριδισμός

Οι μονιμοποιημένοι ιστοί (βλ. § 2.3, Πίν. 2.1) ξεπλύθηκαν στο μέσο τύπου Optimal Cutting Temperature (OCT, HISTO Service, Germany) για κρυομικροτόμο

για 5 h στους 4⁰ C και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε ειδικές πλαστικές θήκες γεμάτες με το ίδιο μέσο για 16-18 h στους -20⁰ C. Τα παγωμένα και μονιμοποιημένα δείγματα τεμαχίστηκαν οριζόντια ως προς τα τοιχώματα του εντέρου σε κρυομικροτόμο (Microm GmbH, Germany) σε τομές πάχους 4-5 μ m. Οι τομές συλλέχθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες επιστρωμένες με πολυσίνη για την στερεοποίησή τους (Menzel-Glaeser, Germany). Η μέθοδος Catalyzed reporter deposition-FISH (CARD-FISH) χρησιμοποιήθηκε μόνο σε ένα δείγμα (FN2) ακολουθώντας το πρωτόκολλο των Fuchs *et al.* (2005) με κάποιες μετατροπές για την εφαρμογή της μεθόδου σε ιστούς. Για την απενεργοποίηση των ενδογενών υπεροξειδασών οι αντικειμενοφόροι επώαστηκαν για 30 min σε διάλυμα 0,5% δωδεκυλοθειικού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) σε μεθανόλη, στη συνέχεια πλύθηκαν δύο φορές σε διάλυμα 1x PBS για 10 min με ένα ενδιάμεσο στάδιο τριών λεπτών σε δις-αποστειρώμενο υπερκάθαρο νερό. Το ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού (hybridization buffer) ετοιμάστηκε για τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις φορμαμιδίου όπως περιγράφεται από τους Fuchs *et al.* (2005) και φαίνεται στον Πίνακα Π2. Οι τομές προϋβριδίστηκαν για 15 min στους 46⁰ C προσθέτοντας μόνο ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού. Η υβριδοποίηση ακολούθησε με τη χρήση ιχνηθετών (50 ng/ μ l) σημασμένων με υπεροξειδάση του ραπανιού (Horseradish peroxidase, HRP) διαλυμένων 1:100 στο αντίστοιχο διάλυμα υβριδισμού. Οι τομές επώαστηκαν για 90 min στους 46⁰ C. Ακολούθησε πλύσιμο για 15 min σε ρυθμιστικό διάλυμα ξεπλύματος (washing buffer) με σύσταση ανάλογη της συγκέντρωσης φορμαμιδίου που είχε χρησιμοποιηθεί στον υβριδισμό (Πίν. Π3). Ακολούθησε το βήμα της ενίσχυσης του σήματος με προσθήκη 30 μ l διαλύματος ενίσχυσης σε κάθε τομή και επώαση στο σκοτάδι στους 37⁰C για 20

min. Το διάλυμα ενίσχυσης αποτελούνταν από 1ml ρυθμιστικού διαλύματος ενίσχυσης (Πρωτόκολλο Π1, Π2), 10 μl 0,15% διαλύματος H₂O₂ σε 1X PBS και 2μl Τυραμίδης (Alexa488). Μετά την ενίσχυση ακολούθησε ξέπλυμα με δις-απιονισμένο υπερκάρθαρο νερό και αιθανόλη (96%) και αφού στέγνωσαν οι τομές πραγματοποιήθηκε χρώση με 4',6'-diaminido-2'-phenylindole (DAPI) (1μg/ml) για 10 min.

Τα υπόλοιπα δείγματα FN3, FSe1 και FSe3 αναλύθηκαν ακολουθώντας το πρωτόκολλο για την κλασική FISH όπως εφαρμόστηκε για ιστούς από τους Duperron *et al.* (2006). Το ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού ετοιμάστηκε για τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις φορμαμιδίου όπως φαίνεται στον Πίνακα Π4. Σε κάθε τομή προστέθηκε μίγμα διαλύματος υβριδισμού και ιχνηθέτη (50 ng/μl) σε τελική αραιώση 1/15. Οι τομές επώαστηκαν για δύο με τρεις h στους 46°C. Ακολούθησε πλύσιμο των τομών για 15 min στους 48°C με διάλυμα ξεπλύματος με συγκεντρώσεις σύμφωνα με τον Πίνακα Π5. Στη συνέχεια ακολούθησε χρώση των τομών με DAPI με τον ίδιο τρόπο όπως περιγράφηκε παραπάνω για την CARD-FISH. Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις φορμαμιδίου που χρησιμοποιήθηκαν ανάλογα με τον ιχνηθέτη φαίνονται στον Πίνακα 2.2.

Η κλασική FISH επιλέχτηκε για την ανάλυση περισσότερων δειγμάτων εξαιτίας των πιο καθαρών σημάτων που καθιστούν πιο εύκολο τον προσδιορισμό του μεγέθους των κυττάρων. Για την *in situ* αναγνώριση αντιπροσώπων των Bacteria, των α-, β- και γ-Proteobacteria, καθώς επίσης και για την αναγνώριση των λανθασμένα θετικών σημάτων χρησιμοποιήθηκαν γενικοί ή χωρίς νόημα αντίστοιχα, σημασμένοι με Cy3 ιχνηθέτες (Πίν. 2.2). Οι σημασμένοι ιχνηθέτες GAM42a και Bet42a χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με τους μη σημασμένους

Πίνακας 2.2: Ιχνηθέτες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη (FA: συγκέντρωση φορμαμιδίου, W=A/T).

Ιχνηθέτης	Ειδικότητα ομάδας	Αλληλουχία (5'-3')	Θέση στο 16S ή 23S rRNA του E.coli	FA%	Αναφορά
EUB338 (I-III)	σχεδόν όλα τα βακτήρια	GCWGCCWCCCGTAGGWT	338-355	35	Daims <i>et al.</i> 1999
NON338	αρνητικό	ACTCCTACGGGAGGCAGC	-	35	Amann <i>et al.</i> 1990
GAM42a	γ-Proteobacteria	GCCTTCCCACATCGTTT	έλικα 42a, 23S rRNA	35	Manz <i>et al.</i> 1992
BET42a	β-Proteobacteria	GCCTTCCCCTTCGTTT	έλικα 42a, 23S rRNA	35	Manz <i>et al.</i> 1992
ALF968 (*)	α-Proteobacteria	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	968	35	Glöckner <i>et al.</i> 1999
UncMol89	Φυλότυπος Se3-204	CGTTCGCCACTAACACCAAA ATC	89	35	Αυτή η μελέτη

* Ο ιχνηθέτης ALF968 παρουσιάζει χαμηλή ειδικότητα όπως φάνηκε από μελέτη σε βάσεις δεδομένων. Παρολαυτά σε αυτή τη μελέτη δεν ανιχνεύθηκαν σήματα με το συγκεκριμένο ιχνηθέτη οπότε δεν παραγματοποιήθηκαν περαιτέρω μελέτες.

Bet42a και GAM42a για την ελαχιστοποίηση των μη ειδικών σημάτων (Manz *et al.*, 1992).

Για τους στόχους της παρούσας εργασίας σχεδιάστηκε ένας ιχνηθέτης με στόχο τον κυρίαρχο φυλότυπο του δείγματος του Σεπτεμβρίου (Se3-204) που ομαδοποιείται στους Mollicutes. Για το σχεδιασμό χρησιμοποιήθηκε η λειτουργία probe design του λογισμικού ARB. Ο συγκεκριμένος ιχνηθέτης UncMol89 (5'-CGTTCGCCACTAACACCAAAATC-3') σχεδιάστηκε με σκοπό να είναι ειδικός για το συγκεκριμένο φυλότυπο και να έχει δύο ή παραπάνω διαφορές με όλες τις αλληλουχίες της βάσης δεδομένων SILVA (Pruesse *et al.* 2007). Ο σχεδιασμός του ιχνηθέτη υπολόγισε τη δυνατότητα πρόσβασης στις διαφορετικές περιοχές του rRNA όπως έχει περιγραφεί αλλού (Behrens *et al.* 2003) και τη θέση του ειδικού για το Candidatus Bacilloplasma ιχνηθέτη (Kostanjsek *et al.* 2007). Οι βέλτιστες συνθήκες για τη σύνδεση του ιχνηθέτη υπολογίστηκαν με έλεγχο της έντασης του σήματος σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις φορμαμιδίου (0-50%).

Η υψηλότερη συγκέντρωση που εμφανίστηκαν σήματα ήταν το 40%, αλλά ήταν αρκετά ασθενή. Για αυτό το λόγο επιλέχτηκε η συγκέντρωση 35% για τα υπόλοιπα πειράματα. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (Axioplan II, Carl Zeiss, Jena, Germany) και οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν με την χρήση του λογισμικού AXIOVISION Rel. 4.7.2 (Carl Zeiss).

2.9. Ανάλυση ομοιοτήτων και ποικιλότητας

Για την ανάλυση της ποικιλότητας χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες Shannon-Wiener (H), Simpson (D) και Margalef (d). Για το δείκτη Shannon, $H = -$

$\sum p_i * \ln(p_i)$, όπου υπολογίστηκε η αναλογία (p_i) του είδους i σχετικά με το συνολικό αριθμό των ατόμων ($p_i=i/S$) και μετά πολλαπλασιάστηκε με το φυσικό της λογάριθμο ($\ln p_i$). Το αποτέλεσμα προστέθηκε για όλα τα είδη και μετά πολλαπλασιάστηκε με το -1 (Shannon & Weaver 1949). Αντίστοιχα ο δείκτης Simpson (D) υπολογίστηκε ως $D=1/\sum(p_i^2)$ (Simpson 1949). Τέλος, ο δείκτης Margalef υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο $d = (S-1) / \ln N$, όπου S είναι ο αριθμός των διαφορετικών φυλότυπων και N ο αριθμός όλων των ατόμων (Margalef 1958).

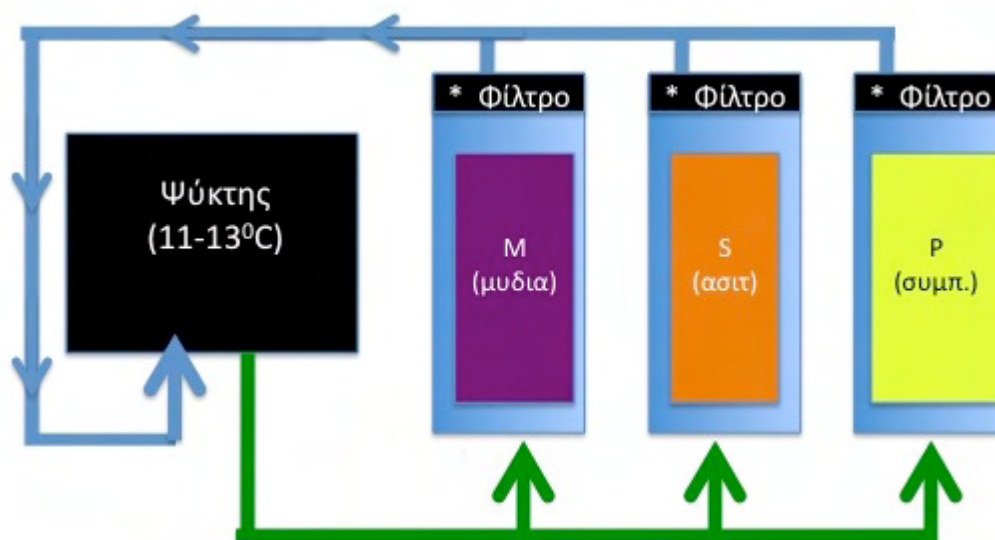
Η ομοιότητα μεταξύ των μικροοργανισμικών κοινοτήτων υπολογίστηκε με το δείκτη ομοιότητας Morisita (Wolda 1981) στο επίπεδο του φυλότυπου με την χρήση του λογισμικού SPADE (SPADE, 2011). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση ομαδοποίησης (Cluster analysis) στους δείκτες Morisita με χρήση του λογισμικού PAST (Hammer *et al.* 2001).

2.10. Εκτρεφόμενοι πληθυσμοί

2.10.1. Πειραματική διάταξη

Για την εκτροφή του *Nephrops norvegicus* σε εργαστηριακές ελεγχόμενες συνθήκες χρησιμοποιήθηκε κλειστό σύστημα παροχής νερού το οποίο αποτελούνταν από ενυδρεία όγκου 100 l με ατομικά φίλτρα που περιείχαν υαλοβάμβακα, ζεόλιθους και πορώδεις κατασκευές για τη μετέπειτα εγκατάσταση των βακτηρίων (Σχ. 2.1). Στα ατομικά φίλτρα προστέθηκαν ατομικές αντλίες νερού που μετέφεραν νερό από το ενυδρείο στον ψύκτη για τη ρύθμιση της

θερμοκρασίας του νερού στους 12⁰ C. Στη συνέχεια το κρύο και φιλτραρισμένο νερό μεταφερόταν στα ενυδρεία (Σχ. 2.1).



Σχήμα 2.1: Σχέδιο απεικόνισης του συστήματος των ενυδρείων που χρησιμοποιήθηκε για την εκτροφή του *Nephrops norvegicus*. Φαίνονται, το σύστημα ροής του νερού, ο ψύκτης, τα ενυδρεία, τα ατομικά φίλτρα και οι ατομικές αντλίες νερού (*). Σε κάθε ενυδρείο στον χρωματισμένο χώρο τοποθετήθηκαν οι ατομικές δεξαμενές για τις καραβίδες. Το σχήμα χαρακτηρίζεται ως απλοποιημένο γιατί ο ψύκτης ήταν συνδεδεμένος με πέντε ενυδρεία για την εξυπηρέτηση παράλληλων πειραμάτων εκτροφής καραβίδων.

Για τη ρύθμιση των φυσικοχημικών παραγόντων (σταθερή αλατότητα, χαμηλά επίπεδα αμμωνίας) πριν από τη μεταφορά των *N. norvegicus*, μεταφέρθηκε στα ενυδρεία, νερό από τον Παγασητικό κόλπο και για την εγκαθίδρυση των νιτροποιητικών βακτηρίων στα φίλτρα προστέθηκαν βακτήρια αγνώστου είδους από εμπορικά σκευάσματα (Stability, Seachem Inc., USA). Το σύστημα λειτούργησε για 15 μέρες χωρίς την προσθήκη ατόμων *N. norvegicus*. Κατά την επτάμηνη διάρκεια του πειράματος και μόνο για τους δυόμιση πρώτους

μήνες το νερό αντικαταστάθηκε σταδιακά δύο φορές στο συνολικό του όγκο λόγω παρατήρησης προβλημάτων στη σταθεροποίηση της αλατότητας.

Για την τοποθέτηση των ατόμων *N. norvegicus* κατασκευάστηκαν ατομικές δεξαμενές εκτροφής μήκους 20 cm, πλάτους 12 cm και ύψους 20 cm. Οι δεξαμενές αυτές αποτελούνταν στην κάτω επιφάνεια και στους άξονες από κομμάτια plexiglass συγκολλημένα με μη τοξική σιλικόνη και από πλαστικό δίκτυ στις υπόλοιπες επιφάνειες για την ανακύκλωση του νερού. Οι συνθήκες στα ενυδρεία ήταν σταθερές με συνεχή παροχή οξυγόνου, θερμοκρασία $11,9^{\circ} \pm 0,8^{\circ} \text{C}$, αλατότητα $37,4 \pm 0,2$ PSU και σκοτάδι σε συνεχή βάση. Τα επίπεδα του αμμωνίου (NH_4) όπως προσδιορίστηκαν με τη χρήση του ειδικού kit Sera ammonium/ammoniak kit (Sera, Germany) κυμάνθηκαν σε πολύ χαμηλά επίπεδα ($<0,5 \text{ mg/l}$) τα οποία αντιστοιχούν σε χαμηλά επίπεδα αμμωνίας ($<0,009 \text{ mg/l}$) σύμφωνα με το pH του νερού των ενυδρείων ($7,8 \pm 0,2$).

2.10.2. Συλλογή δειγμάτων

Η συλλογή των ατόμων *Nephrops norvegicus* πραγματοποιήθηκε το Μάρτιο και τον Απρίλιο του 2009 στον Παγασητικό κόλπο με τον ίδιο τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω (βλ. § 2.1). Τα άτομα *N. Norvegicus* μεταφέρθηκαν με αεριζόμενο θαλασσινό νερό άμεσα στο εργαστήριο όπου επιλέχθηκαν μόνο τα αρσενικά, τα οποία έχουν αποδειχθεί από προηγούμενα πειράματα εκτροφής να είναι πιο ανθεκτικά από τα θηλυκά κατά τις εκτροφές (Μεντέ Ε., προσωπική επικοινωνία). Σε κάθε δειγματοληψία ένα άτομο (Nat1, Nat2) θυσιάστηκε άμεσα

μετά τη μεταφορά στο εργαστήριο και αποτέλεσε το αρχικό δείγμα ενώ τα υπόλοιπα κρατήθηκαν για τις εκτροφές.

Η μεταφορά στα ενυδρεία έγινε με τη χρήση ατομικών παγίδων κυλινδρικού σχήματος, μήκους 17,5 cm και διαμέτρου 10 cm, που κατασκευάστηκαν από πλαστικό δίχτυ με μεγάλο άνοιγμα ματιού (1,2 cm). Τα άτομα *N. norvegicus* παρέμειναν στις ατομικές παγίδες για 15 μέρες (περίοδος εγκλιματισμού) και στη συνέχεια μετρήθηκε το βάρος τους και το μήκος του κεφαλοθώρακα (Πίν. 2.3). Έπειτα τοποθετήθηκαν στις ατομικές δεξαμενές εκτροφής που περιγράφηκαν παραπάνω (βλ § 2.10.1).

Πίνακας 2.3. Μορφομετρικά στοιχεία των ατόμων *Nephrops norvegicus* που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις (CL: μήκος κεφαλοθώρακα/ carapace length).

Δείγμα	Αρχικό βάρος (g)	Αρχικό CL (mm)
S3m1	72,17	48,9
S6m1	58,47	44
S6m2	47,06	43,7
M3m1	29,68	34,3
M6m1	49,35	41,6
M6m2	51,34	41,6
P6m1	43,93	36,4
P6m2	41,91	37,5

Μετά το πέρας της περιόδου εγκλιματισμού, που διήρκεσε 15 μέρες, τα άτομα *N. Norvegicus* χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες M, S και P . Στην ομάδα M

παρέχονταν κατεψυγμένα μύδια του εμπορίου (*Mytilus edulis*), στην ομάδα P σύμψηκτα εμπορίου που χρησιμοποιούνται σε ιχθυοκαλλιέργειες ενώ τα άτομα της ομάδας S παρέμειναν σε ασιτία (Πίν. 2.4). Οι τροφές παρέχονταν τρεις φορές την εβδομάδα στις 11:00 το πρωί και γινόταν καταμέτρηση της παρεχόμενης και της εναπομείνουσας τροφής. Παρέχονταν 10 σύμψηκτα/ άτομο (~ 1g), ενώ η ποσότητα της τροφής για τα μύδια δεν ήταν σταθερή και κυμαίνονταν από 1-4 g. Οι ποσότητες αυτές επιλέχθηκαν σύμφωνα με στοιχεία από προηγούμενες προσπάθειες εκτροφής του *N. norvegicus* όπου είχαν δείξει καλό ποσοστό επιβίωσης (Μεντέ Ε. προσωπική επικοινωνία).

Τρεις μήνες μετά από την έναρξη του πειράματος, ένα άτομο από τις ομάδες S και M θυσιάστηκε ενώ στην ομάδα P αυτό δεν ήταν δυνατό εξαιτίας του μικρού αριθμού ατόμων στις εκτροφές. Στους έξι μήνες θυσιάστηκαν δύο άτομα από κάθε ομάδα (Πίν. 2.4). Η επιλογή των τριών και έξι μηνών (για πρώτη φορά σε μελέτες βακτηριακής ποικιλότητας του εντέρου εκτρεφόμενων καρκινοειδών),

Πίνακας 2.4: Κωδικοί δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τις εκτροφές.

Με έντονα γράμματα φαίνονται τα δείγματα από τη δεύτερη δειγματοληψία (Απρίλιος 2009).

Δείγμα	t ₀ (αρχή)	t ₁ (3 μήνες)	t ₂ (6 μήνες)
Φυσικός πληθυσμός	Nat1/Nat2		
Ασιτία		S3m1	S6m1/S6m2
Μύδια		M3m1	M6m1/M6m2
Σύμψηκτα			P6m1/P6m2

έγινε ώστε να είναι αρκετό το χρονικό διάστημα των εκτροφών για την πιθανή εγκαθίδρυση σταθερών βακτηριακών κοινοτήτων, ώστε να μελετηθούν πιθανά φαινόμενα διαδοχής μεταξύ τους, αλλά και ώστε η μελέτη της βακτηριακής ποικιλότητας να συσχετισθεί με παράλληλες έρευνες που αφορούσαν την αύξηση και την πεπτική λειτουργία του *N. norvegicus* (Ε. Μεντέ, αδημοσίευτα δεδομένα).

2.10.3. Νερό και τροφές

Για την ανάλυση της βακτηριακής ποικιλότητας του νερού των ενυδρείων συλλέχθηκαν δείγματα νερού από τα ενυδρεία μία με δύο μέρες πριν από τη δειγματοληψία των ατόμων, ενώ για την ανάλυση της βακτηριακής ποικιλότητας των τροφών φυλλάχθηκαν δείγματα μυδιών και σύμπηκτων από τις αντίστοιχες παρτίδες που χρησιμοποιήθηκαν για τις εκτροφές.

Η συλλογή των δειγμάτων του νερού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αποστειρωμένων γυάλινων φιαλών του ενός λίτρου τρεις φορές, μία με δύο μέρες πριν από κάθε δειγματοληψία ατόμων *Nephrops norvegicus* από τα ενυδρεία (Πίν. 2.5). Δειγματοληψία νερού δεν πραγματοποιήθηκε στα πρώτα στάδια του πειράματος εφόσον, όπως παρουσιάστηκε παραπάνω, το νερό σταμάτησε να αντικαθίσταται μόλις 15 ημέρες πριν από την αρχική δειγματοληψία (βλ § 2.10.1).

Για την απομόνωση του DNA από τα δείγματα Wt2, Wt3 και Wt4, φιλτραρίστηκαν 1000 ml, 500 ml και 800 ml νερού αντίστοιχα. Το φιλτράρισμα πραγματοποιήθηκε υπό κενό (< 150 mm Hg) σε φίλτρα 0,2 μm (GTTP, Millipore, USA). Η μονιμοποίηση για την καταμέτρηση της ολικής βακτηριακής αφθονίας

πραγματοποιήθηκε με προσθήκη στα δείγματα φορμαλδεΰδης 40% σε τελική συγκέντρωση 1:10 και την αποθήκευσή τους στο ψυγείο.

Πίνακας 2.5: Δείγματα νερού που συλλέχθηκαν από τα ενυδρεία. Το (*)αντιστοιχεί στους 6 μήνες για την εκτροφή των ατόμων *Nephrops norvegicus* που συλλέχθηκαν στη δεύτερη δειγματοληψία.

Δείγμα	Δειγματοληψία	Ενυδρείο συλλογής	Αντιστοιχίες με δείγματα <i>Nephrops norvegicus</i>
Wt2	t1 (3 μήνες)	Ασιτία	M3m1, S3m1
Wt3	t2 (6 μήνες)	Ασιτία	M6m1, M6m2, S6m1, S6m2
Wt4	t2 (6 μήνες)*	Σύμπληκτα	P6m1, P6m2

Για τη μελέτη της βακτηριακής ποικιλότητας των μυδιών και των σύμπληκτων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτροφή, δείγματα από τις παρτίδες που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντίστοιχες εκτροφές αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη μέχρι την απομόνωση του DNA. Τα μύδια αποτελούνταν από κατεψυγμένη ψύχα ατόμων του είδους (*Mytilus edulis*) που κυκλοφορεί στην αγορά. Τα σύμπληκτα είχαν κατασκευαστεί από τη μίξη ιχθυέλαιων, ιχθυάλευρων, οργανικών αλεύρων και βιταμινών μετά από παραγγελία. Η πλήρης σύσταση των σύμπληκτων φαίνεται στον Πίνακα Π6.

2.10.4. Αναλύσεις

Για την ανάλυση της βακτηριακής ποικιλότητας του εντέρου του *Nephrops norvegicus*, του νερού των ενυδρείων και των παρεχόμενων τροφών χρησιμοποιήθηκε ανάλυση των 16S rRNA βακτηριακών γονιδίων με βιβλιοθήκες

και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Για την καταμέτρηση των προκαρυωτικών κυττάρων στα δείγματα του νερού πραγματοποιήθηκε χρώση με DAPI.

Η απομόνωση του μεσέντερου του *N. norvegicus* και η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε όπως αναφέρθηκε παραπάνω για τους φυσικούς πληθυσμούς (βλ. § 2.2, 2.3). Η απομόνωση του DNA από τα φίλτρα των δειγμάτων του νερού πραγματοποιήθηκε με την χρήση του UltraClean Soil DNA kit (MoBio Laboratories Inc. USA) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα τελικά δείγματα DNA (wt2, wt3, wt4) διαλύθηκαν σε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος του κατασκευαστή. Το DNA των μυδιών απομονώθηκε από τους ιστούς του πόδα, του μανδύα και των βραγχίων τριών μυδιών. Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε όπως αναφέρθηκε παραπάνω (βλ. § 2.3) για τα δείγματα του εντέρου. Το τελικό δείγμα (Mus) διαλύθηκε σε 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος του κατασκευαστή. Η απομόνωση του DNA από τα σύμπηκτα πραγματοποιήθηκε με την χρήση του UltraClean Soil DNA kit (MoBio Laboratories Inc. USA) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το τελικό δείγμα (PI) διαλύθηκε σε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος του κατασκευαστή.

Για την ενίσχυση των 16S rRNA βακτηριακών γονιδίων στα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 27f BAC (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') (Lane 1991) και 907r (5'-CCCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3') (Muyzer *et al.* 1995). Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων ήταν 850-950 ζ.β.. Οι συνθήκες της PCR περιλάμβαναν 5 min στους 94⁰ C, 22-27 κύκλους με 1 min στους 94⁰ C, 1 min στους 52,5⁰ C και 1 min στους 72⁰ C και ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης με 10 min στους 72⁰ C. Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το Montage

Purification Kit (Millipore, USA) και κλωνοποιήθηκαν άμεσα χρησιμοποιώντας το TOPO TA Kit for sequencing (Invitrogen Inc., Germany) χρησιμοποιώντας ηλεκτροδεκτικά κύτταρα *Escherichia coli*. Το μέγεθος του ενθέματος ελέγχθηκε μέσω PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές M13f και M13R που προσδένονται στο πλασμίδιο. Οι κλώνοι που περιείχαν το ένθεμα καλλιεργήθηκαν σε 1,5 ml θρεπτικού μέσου Luria-Bertani με καναμυκίνη (50 µg/ml) και τα πλασμίδια απομονώθηκαν από τα κύτταρα των καλλιεργειών χρησιμοποιώντας το Nucleospin Plasmid QuickPure kit (Macherey-Nagel GmbH and Co, KG, Germany). Τα πλασμίδια αλληλουχήθηκαν μερικώς χρησιμοποιώντας τον εκκινητή M13f. Μετά από ευθυγράμμιση με το λογισμικό CLUSTALW (Larkin *et al.*, 2007), προσωπική διόρθωση, αποκλεισμό των χημικών αλληλουχιών που εντοπίστηκαν με το λογισμικό PINTAIL (Ashelford *et al.* 2005) και την οπτική εξέταση των ευθυγραμμίσεων, οι κλώνοι ομαδοποιήθηκαν βάσει της ομοιότητας των 16S rRNA αλληλουχιών σε επίπεδο ίσο με 98%.

Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς με χρήση των αντιδραστηρίων BigDye Terminator kit (Applied Biosystems Inc., USA) από την εταιρεία Macrogen (Macrogen Inc. Korea). Οι πλησιέστεροι συγγενείς στις αλληλουχίες εντοπίστηκαν με την χρήση της λειτουργίας BLAST και όλες οι πλήρεις αλληλουχίες ελέγχθηκαν για χίμαιρες με την χρήση του PINTAIL. Όλες οι 16S rRNA αλληλουχίες από αυτό το κομμάτι της μελέτης έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων της GENBANK με κωδικούς JN092133-JN092292 για τα δείγματα του *N. Norvegicus*, JN639288-JN639332 για τα δείγματα του νερού των ενυδρείων και JN858926-JN858954 για τα δείγματα των τροφών.

Για τη μελέτη της ποικιλότητας των μικροοργανισμικών κοινοτήτων όλων των δειγμάτων υπολογίστηκαν οι δείκτες ποικιλότητας Shannon, Simpson και Margalef (βλ. § 2.9). Για τον υπολογισμό των ομοιοτήτων μεταξύ των δειγμάτων των εκτροφών πραγματοποιήθηκε ανάλυση ομαδοποίησης όπως περιγράφηκε στο Υποκεφάλαιο 2.9. Για την απεικόνιση της επίδρασης των φυλότυπων στην κατανομή των δειγμάτων των εκτροφών σε δύο διαστάσεις πραγματοποιήθηκε αποστασιοποιημένη ανάλυση αντιστοίχισης (DCA) όπως παρουσιάστηκε στο Υποκεφάλαιο 2.7. Τέλος, για την τρισδιάστατη απεικόνιση των αποτελεσμάτων όλων των δειγμάτων των εκτροφών και του νερού των ενυδρείων, βάσει των συχνοτήτων των φυλότυπων τους πραγματοποιήθηκε NMDS ανάλυση με χρήση του R (βλ. § 2.4). Για τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας όλων των *a priori* ομαδοποιήσεων χρησιμοποιήθηκε ANOSIM με χρήση του λογισμικού PAST (βλ. § 2.4).

Για την καταμέτρηση των προκαρυωτικών κυττάρων μονιμοποιημένο δείγμα (βλ. § 2.10.3) αραιώθηκε 1:2 με νερό όπου προστέθηκαν τρεις σταγόνες DAPI (10 µg/ml). Το δείγμα επωάστηκε για πέντε min στο σκοτάδι και στη συνέχεια διηθηθηκε υπό κενό σε φίλτρα με διάμετρο πόρων 0,2 µm. Η καταμέτρηση των προκαρυωτικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού (Axioplan I, Carl Zeiss, Jena, Germany), και ο συνολικός αριθμός των βακτηριακών κυττάρων/ ml υπολογίστηκε με την χρήση του τύπου $(A \cdot 12108,7 \cdot 10^9) / B$, με A=μ.ο. κυττάρων/ πλέγμα και B=όγκος δείγματος που φιλτραρίστηκε.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

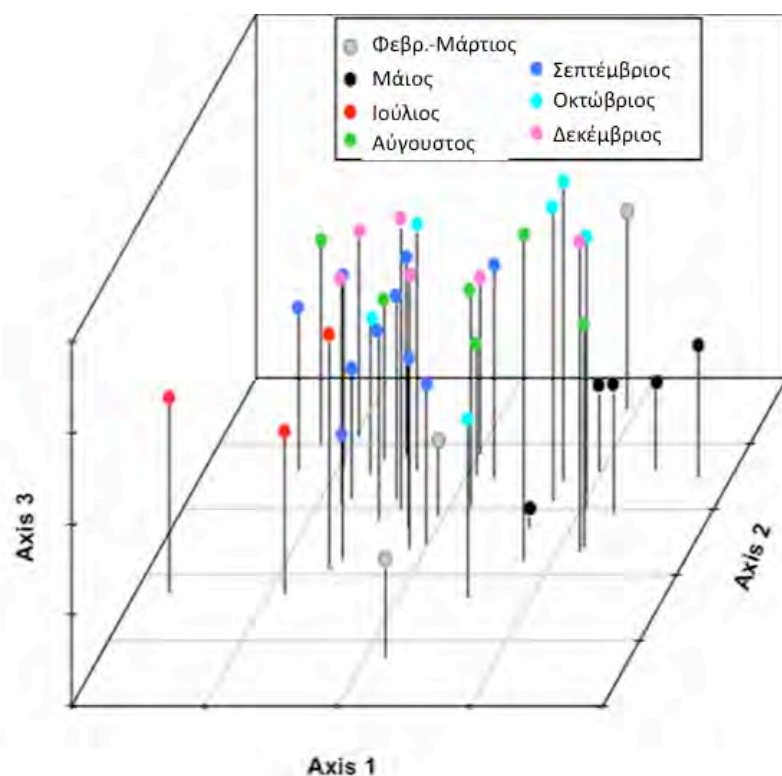
3.1. Φυσικοί πληθυσμοί

3.1.1. Ανάλυση της Μικροποικιλότητας

Τα αποτελέσματα της ARISA για τις βακτηριακές κοινότητες του μεσέντερου του *Nephrops norvegicus* έδειξαν υψηλή ποικιλότητα ανάμεσα στα δείγματα. Καμία από τις ζώνες που προέκυψαν δεν ήταν παρούσα σε όλα τα δείγματα και ο αριθμός των λειτουργικών ταξινομικών μονάδων κυμάνθηκε από 43 (My44) έως 147 (D2) (M.O. 91).

Με τη μείωση της πολυπλοκότητας στη σύνθεση των κοινοτήτων μέσω της χρήσης του NMDS (Σχ. 3.1) η περίοδος της δειγματοληψίας φάνηκε να είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την εξήγηση της βακτηριακής ποικιλότητας (ANOSIM, $R=0,553$, $P<0,001$ / RDA, $F=2,12$, $P<0,001$). Τα μορφομετρικά στοιχεία και το φύλο δεν αποδείχτηκαν ικανά για να εξηγήσουν την ποικιλότητα όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα του RDA ($F_{\text{φύλο}}= 0,9283$, $P= 0,529$ / $F_{\text{μορφ}}=1,1509$, $P=0,137$). Περαιτέρω συγκρίσεις ανά ζεύγη, με τη χρήση του ANOSIM, έδειξαν ότι υπήρχαν στατιστικά σημαντικές ($P<0,05$) διαφορές ανάμεσα στις βακτηριακές κοινότητες των περισσότερων μηνών (Πίν. 3.1).

Οι διαφορές ανά ζεύγη ήταν είτε έντονες ($R>0,75$) ή σημαντικές με κάποιες αλληλοεπικαλύψεις ($0,50<R<0,75$). Οι τιμές του R για τις δοκιμασίες ANOSIM μεταξύ των δειγμάτων του Αυγούστου του Σεπτεμβρίου, του Οκτωβρίου και του Δεκεμβρίου έδειξαν αρκετά επικαλυπτόμενες δομές ($R<0,5$) με μοναδική εξαίρεση το ζευγάρι Δεκεμβρίου-Σεπτεμβρίου. Κανένας στατιστικά σημαντικός



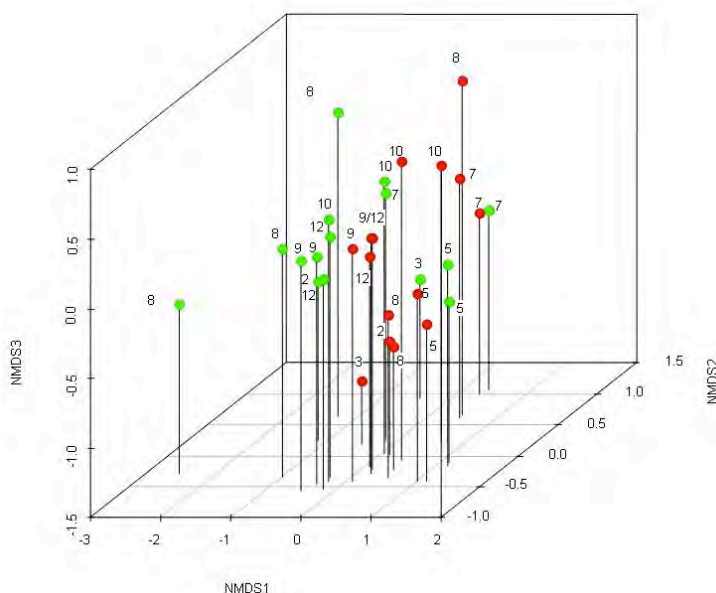
Σχήμα 3.1: Τρισδιάστατη NMDS απεικόνιση (Μήτρα αποστάσεων κατά Bray-Curtis) των αποτελεσμάτων της ARISA για τα δείγματα εντέρου του *Nephrops norvegicus* (stress=0,17). Κάθε μήνας απεικονίζεται με διαφορετικό χρώμα: γκρι, Φεβρουάριος- Μάρτιος/ μαύρο, Μάιος/ κόκκινο, Ιούλιος/ πράσινο, Αύγουστος/ μπλε, Σεπτέμβριος, γαλάζιο, Οκτώβριος/ ροζ, Δεκέμβριος. Οι άξονες του NMDS είναι αυθαίρετοι οπότε μπορούν να περιστραφούν αυθαίρετα.

διαχωρισμός δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των ζευγαριών Φεβρουάριος/Μαρτίος-Ιούλιος ($P=0,198$) και Αύγουστος-Οκτώβριος ($P=0,092$). Η εφαρμογή της διόρθωσης κατά Bonferroni για τις 21 συγκρίσεις που πραγματοποιήθηκαν έδειξε ότι υπήρξε σαφής διαχωρισμός μόνο μεταξύ των δειγμάτων του Μαΐου, του Σεπτεμβρίου και του Δεκεμβρίου. Όπως προαναφέρθηκε όμως, η διόρθωση Bonferroni έχει κριθεί ως εξαιρετικά συντηρητική (Legendre & Legendre 1998) και πρέπει να χρησιμοποιείται με πολλή προσοχή.

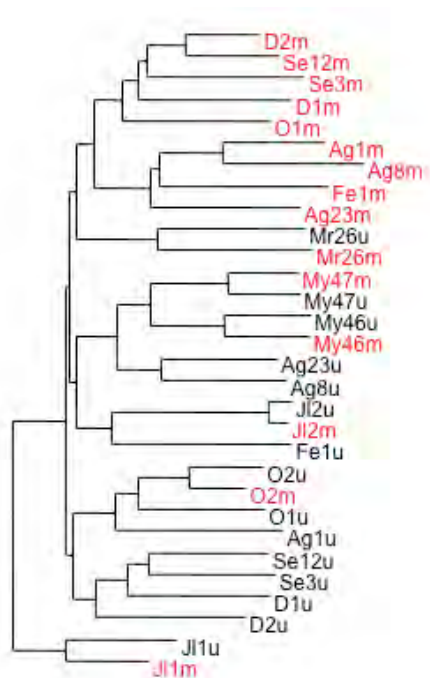
Πίνακας 3.1: Αποτελέσματα ANOSIM για τις *a priori* καθορισμένες εποχικές ομάδες. Οι στατιστικά σημαντικές μη διορθωμένες τιμές P ($<0,05$) φαίνονται με πλάγια γράμματα, ενώ οι στατιστικά σημαντικές μετά από διόρθωση Bonferroni (<0.0024) είναι υπογραμμισμένες. Οι τιμές του R φαίνονται με έντονα γράμματα.

	Φεβρουάριος/ Μάρτιος	Μάιος	Ιούλιος	Αύγουστος	Σεπτέμβριος	Οκτώβριος	Δεκέμβριος
Φεβρουάριος/ Μάρτιος		0.0166	0.1983	0.0484	0.0083	0.0231	0.0105
Μάιος	0.590		0.0183	0.0044	<u>0.0002</u>	0.0026	<u>0.0023</u>
Ιούλιος	0.444	0.969		0.0113	0.0027	0.013	0.0133
Αύγουστος	0.376	0.605	0.654		0.0138	0.0916	0.0154
Σεπτέμβριος	0.721	0.939	0.840	0.293		0.0043	<u>0.0003</u>
Οκτώβριος	0.500	0.872	0.697	0.161	0.403		0.0302
Δεκέμβριος	0.611	0.923	0.765	0.387	0.521	0.280	

Η ανάλυση των δειγμάτων με τον εκκινητή ITSFmol και τον εκκινητή ITSFun και η απεικόνιση των αποτελεσμάτων στο χώρο με NMDS έδειξε ότι σε κάποια δείγματα εμφανίζεται σαφής διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων από τη χρήση διαφορετικών εκκινητών ενώ σε κάποια άλλα τα αποτελέσματα μοιάζουν αρκετά μεταξύ τους (Σχ. 3.2).



Σχήμα 3.2 : Τρισδιάστατη απεικόνιση της NMDS ανάλυσης των αποτελεσμάτων της ARISA με την χρήση του εκκινητή ITSFmol (πράσινο) και ITSFun (κόκκινο). Μήτρα αποστάσεων Bray-curtis, stress=0,10. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στους αντίστοιχους μήνες του χρόνου (π.χ. 7=Ιούλιος)



Σχήμα 3.3: Δέντρο Neighbor-Joining για

τα αποτελέσματα της
χρήσης διαφορετικών
εκκινήτων σε επιλεγμένα
δείγματα (μάυρο:
παγκόσμιοι εκκινήτες,
κόκκινο: εκκινήτες για
Mollicutes)

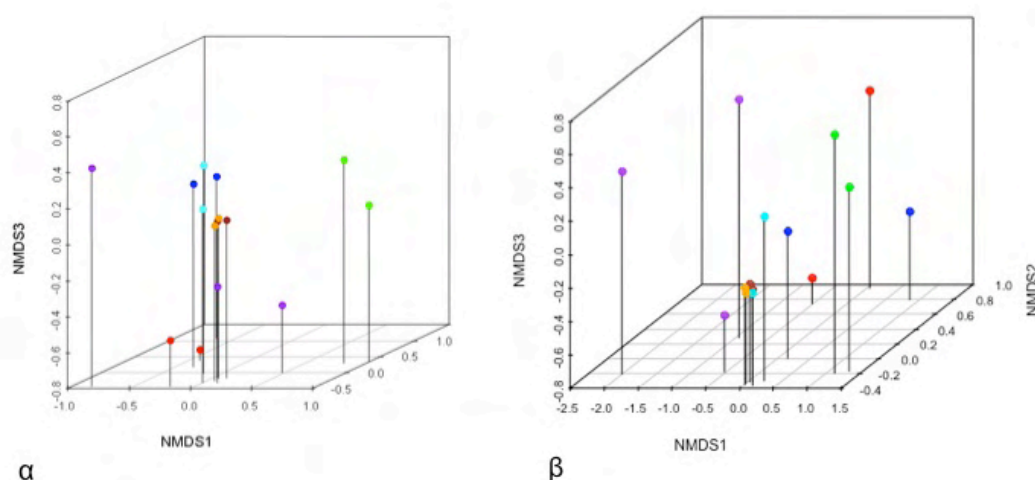
Αντίστοιχα αποτελέσματα

έδωσε και η ανάλυση με Neighbor-Joining (Σχ. 3.3). Πιο συγκεκριμένα φαίνεται ότι στα δείγματα Mr26, My46, My47, Jl1, Jl2 και O2 υπάρχει μικρή επίδραση από την χρήση διαφορετικού εκκινήτη ITSf. Αυτά τα δείγματα σχηματίζουν ξεχωριστά κλαδιά που αποτελούνται αποκλειστικά από τα αποτελέσματα των δύο εκκινήτων για το κάθε δείγμα.

Η NMDS ανάλυση μόνο για τα αποτελέσματα του εκκινήτη ITSf mol έδειξε μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των δειγμάτων του Σεπτεμβρίου και του Δεκεμβρίου όπως ήταν αναμενόμενο

και από την ανάλυση Neighbor-Joining. Τα δείγματα του Μαΐου εμφανίστηκαν και πάλι σαφώς διαχωρισμένα από τα υπόλοιπα (Σχ. 3.4β).

Τα αποτελέσματα της ανάμιξης των δύο εκκινήτων (Σχ. 3.4α) έδωσαν διαφορετική εικόνα από τα αποτελέσματα των παγκόσμιων εκκινήτων (Σχ. 3.1) αλλά και από την εικόνα του ζεύγους ITSf mol-ITSf Reub (Σχ. 3.4β). Τα δείγματα του Μαΐου όπως και του Φεβρουαρίου/Μαρτίου είναι εμφανώς απομακρυσμένα από



Σχήμα 3.4: α) Απεικόνιση της NMDS ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε μετά από τη μίξη των αποτελεσμάτων των δύο ζευγών εκκινητών. Μήτρα αποστάσεων Bray-Curtis, Stress=0,06 β) Απεικόνιση της NMDS ανάλυσης για τα αποτελέσματα με τον εκκινητή ITSFmol. Μήτρα αποστάσεων Bray-curtis, Stress=0,05. Φεβρουάριος-Μάρτιος (κόκκινο), Μάιος (πράσινο), Ιούλιος (μπλε), Αύγουστος (ιώδες), Σεπτέμβριος (πορτοκαλί), Οκτώβριος (γαλάζιο), Δεκέμβριος (καφέ).

τα υπόλοιπα αλλά και μεταξύ τους. Για τους υπόλοιπους μήνες εμφανίζονται αρκετά κοντά τα δείγματα Ιουλίου/ Σεπτεμβρίου/ Οκτωβρίου/ Δεκεμβρίου, ενώ τα δείγματα του Αυγούστου είναι διάσπαρτα . Ανάλυση ομοιοτήτων δεν πραγματοποιήθηκε σε αυτό το κομμάτι της μελέτης εφόσον ο αριθμός των δειγμάτων από κάθε μήνα δε θεωρήθηκε αρκετός για περαιτέρω αναλύσεις.

3.1.2. Φυλογενετική Ανάλυση

Από κάθε εποχή δειγματοληψίας αναλύθηκε με 16S rRNA βιβλιοθήκες ένα δείγμα (Πίν. 2.1, Π1). Συνολικά εντοπίστηκαν και αναλύθηκαν 312 πλήρεις

αλληλουχίες του 16S rRNA γονιδίου από τα δείγματα F1(31), My46 (58), J11 (30), Ag31 (22), Se3(53), O2 (25) και D1 (93).

Σε κάθε βιβλιοθήκη, εντοπίστηκαν 5-10 διαφορετικοί φυλότυποι βάσει ομοιοτήτων της τάξης του 98% (Πίν. 3.2, Π7, Σχ. 3.5, 3.6). Όλες οι βιβλιοθήκες είχαν σημαντική κάλυψη (Σχ. Π1) σύμφωνα με τον εκτιμητή Good's C (Kemp & Aller, 2004). Σε όλες κάλυψη ήταν πάνω από 90%, εκτός από αυτές του Φεβρουάριο (77%) και του Αύγουστο (82%).

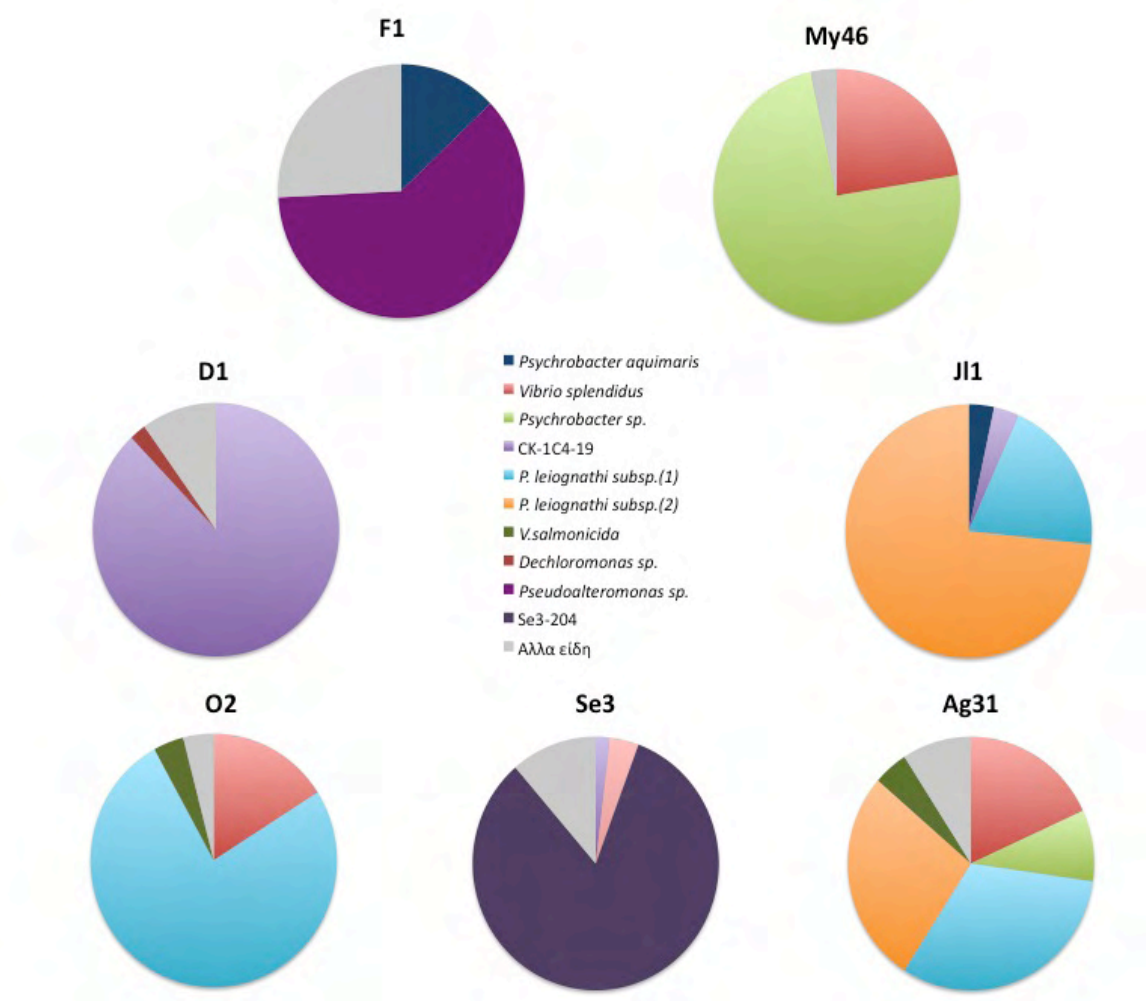
Εκτός από τη βιβλιοθήκη Ag31 που είχε δύο επικρατείς φυλότυπους με συχνότητες 31% και 27%, όλες οι υπόλοιπες παρουσίασαν έναν επικρατών φυλότυπο με συχνότητες παρουσίας από 58%-86% (Πίν. 3.2, Σχ. 3.5, 3.6). Σε όλες τις βιβλιοθήκες επικράτησαν φυλότυποι που ανήκαν είτε στα γ- Proteobacteria (F1, My46, J11, Ag31, O2) ή στα Mollicutes (Se3) ή στο υποψήφιο φύλο CK-1C4-19 (D1). Άλλοι φυλότυποι που εντοπίστηκαν σε χαμηλότερες αφθονίες ομαδοποιήθηκαν στα φύλα των Firmicutes, Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, και στα υπόφυλα των α-, β- και δ- Proteobacteria.

Το δείγμα F1 είχε έναν επικρατή φυλότυπο (F1-5, συχνότητα 58,1%) με 99% ομοιότητα με το *Pseudoalteromonas* sp. NPO-J1-58 ένα ετερότροφο βακτήριο που είχε απομονωθεί από τον Βόρειο Ειρηνικό ωκεανό (Du *et al.* 2006). Τα δύο κοντινότερα χαρακτηρισμένα είδη ήταν το *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 (Medigue *et al.* 2005) και το *Pseudoalteromonas elyakovii* (Sawabe *et al.* 2000) τα οποία διαθέτουν φυκολυτικές (alginolytic) ιδιότητες.

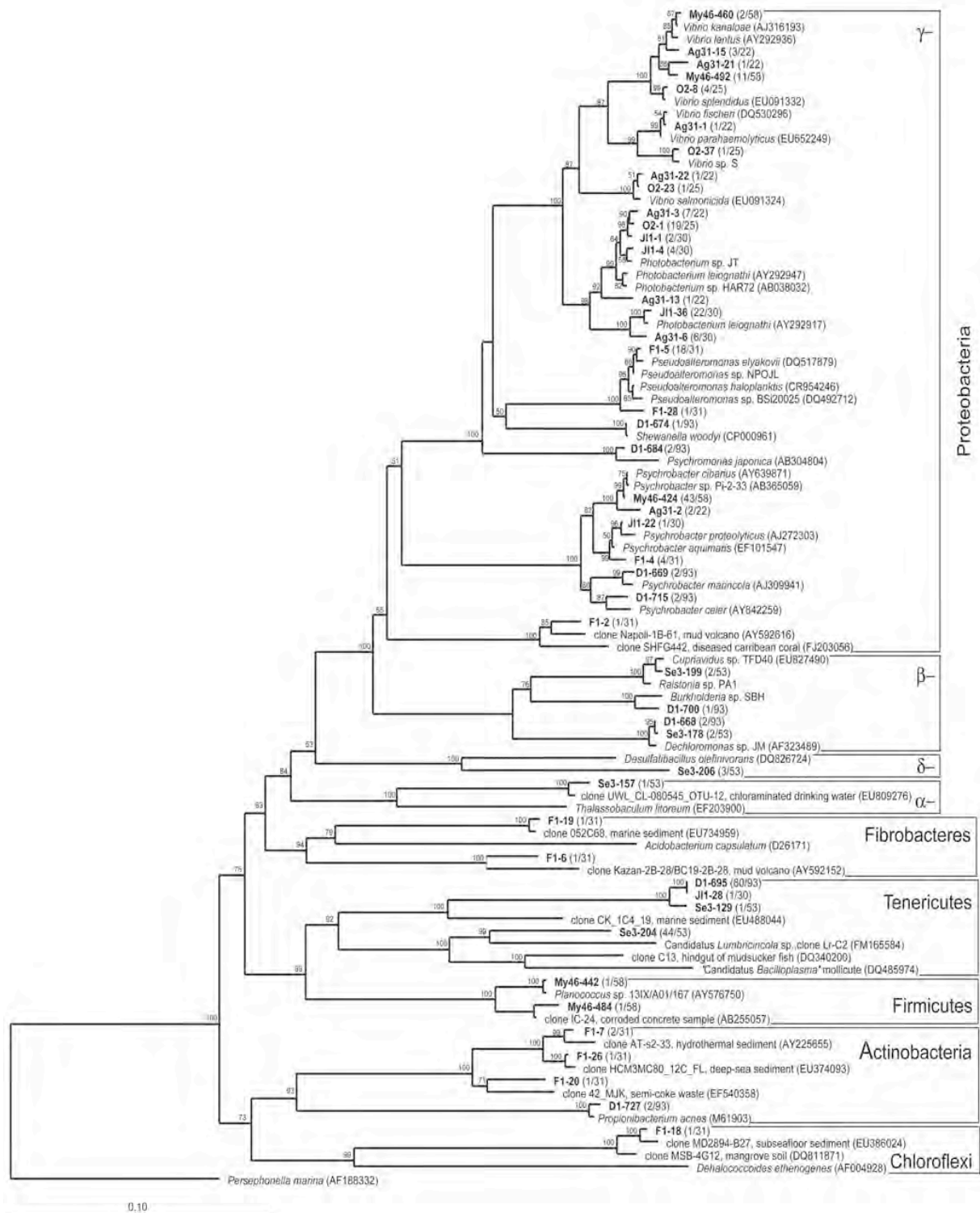
Το δείγμα My46 είχε έναν επικρατή φυλότυπο (My46-424, συχνότητα 74,1%) με 99% ομοιότητα με το *Psychrobacter* sp. Pi 2-33 (Romanenko *et al.* 2008). Αυτό το στέλεχος είχε απομονωθεί από παράκτιο θαλασσινό πάγο, και

Πίνακας 3.2: Πίνακας φυλότυπων για τους επικρατείς (συχνότητα > 10%) φυλότυπους των δειγμάτων των φυσικών πληθυσμών.

Φυλότυπος	Συχνότητα	Κοντινότερος συγγενής (Genbank #)(% ομοιότητα)	Φυλογενετική θέση	Αναφορά
F1-5	58,1%	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. NPO-Jl-58 (AY745828)(99)	γ-Proteobacteria	Du <i>et al.</i> 2006
F1-4	12,9%	<i>Psychrobacter aquimaris</i> , KOPRI 24929 (EF101547) (99)	γ-Proteobacteria	Lee <i>et al.</i> 2006
My46-424	74,1%	<i>Psychrobacter</i> sp. Pi 2-33 (AB365059)(99)	γ-Proteobacteria	Romanenko <i>et al.</i> 2008
My46-492	19,0%	<i>Vibrio lentus</i> (AY292936)(99)	γ-Proteobacteria	Nishiguchi & Nair 2003
Jl1-36	73,3%	<i>Photobacterium leiognathi</i> (AY292917)(99)	γ-Proteobacteria	Nishiguchi & Nair 2003
Jl1-4	13,3%	<i>Photobacterium</i> sp. JT-ISH-224 (AB293986) (99)	γ-Proteobacteria	Tsukamoto <i>et al.</i> 2008
Ag31-3	31,9%	<i>Photobacterium leiognathi</i> strain RM1 (AY292947)(99)	γ-Proteobacteria	Nishiguchi & Nair 2003
Ag31-6	27,3%	<i>Photobacterium leiognathi</i> (AY292917)(98)	γ-Proteobacteria	Nishiguchi & Nair 2003
Ag31-15	13,6%	<i>Vibrio lentus</i> (AY292936) (98)	γ-Proteobacteria	Nishiguchi & Nair 2003
Se3-204	83,0%	Uncultured Mollicutes (DQ340200) (90)	Mollicutes	Bano <i>et al.</i> 2007
O2-1	76,0%	<i>Photobacterium leiognathi</i> strain RM1(AY292947)(99)	γ-Proteobacteria	Nishiguchi & Nair 2003
O2-8	16,0%	<i>Vibrio splendidus</i> isolate PB1-10rrnH (EU091332)(99)	γ-Proteobacteria	Jensen <i>et al.</i> 2009
D1-695	86,0%	Uncultured bacterium clone CK_1C4-19 CK_1_C4_1 (EU488044)(87)	CK-1C4-19	Green-Garcia 2008



Σχήμα 3.5: Επικρατείς φυλότυποι στα δείγματα μεσέντερου των φυσικών πληθυσμών του *Nephrops norvegicus*. Με διαφορετικά χρώματα φαίνονται οι φυλογενετικές ομάδες ομαδοποίησης των φυλότυπων σε επίπεδο γένους η είδους. Η ομαδοποίηση έχει στηριχτεί σε επίπεδο ομοιότητας 98%



Σχήμα 3.6: Neighbor-Joining φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις 16S rRNA αλληλουχίες από το μεσέντερο φυσικών πληθυσμών του *Nephrops norvegicus*. Το *Persephonella marina* (Aquificae) έχει χρησιμοποιηθεί ως ρίζα. Η βαθμίδα αντιστοιχεί σε 10% νουκλεοτιδικές διαφορές και οι αξίες ελέγχου έχουν υπολογιστεί από 1000 αντίγραφα του δέντρου. Οι σχετικές αφθονίες των φυλότυπων σε κάθε βιβλιοθήκη φαίνονται σε παράνθεση. Μόνο αξίες bootstrap μεγαλύτερες από 50% φαίνονται στο δέντρο.

παρόλο που δεν είχε χαρακτηριθεί πλήρως είχε παρουσιάσει λιπολυτικές ιδιότητες και την ικανότητα αναγωγής των νιτρικών (NO_3^-) σε νιτρώδη (NO_2^-). Ο πλησιέστερος πλήρως χαρακτηρισμένος συγγενής ήταν το *Psychrobacter cibarius* strain JG-220 το οποίο είχε απομονωθεί από ζυμωμένο αλίευμα (Jung *et al.* 2005) παρουσιάζοντας επίσης λιπολυτικές ιδιότητες. Ένας παρόμοιος φυλότυπος (Ag31-2, 98% ομοιότητα) εντοπίστηκε στο δείγμα Ag31 σε χαμηλότερη συχνότητα (9%).

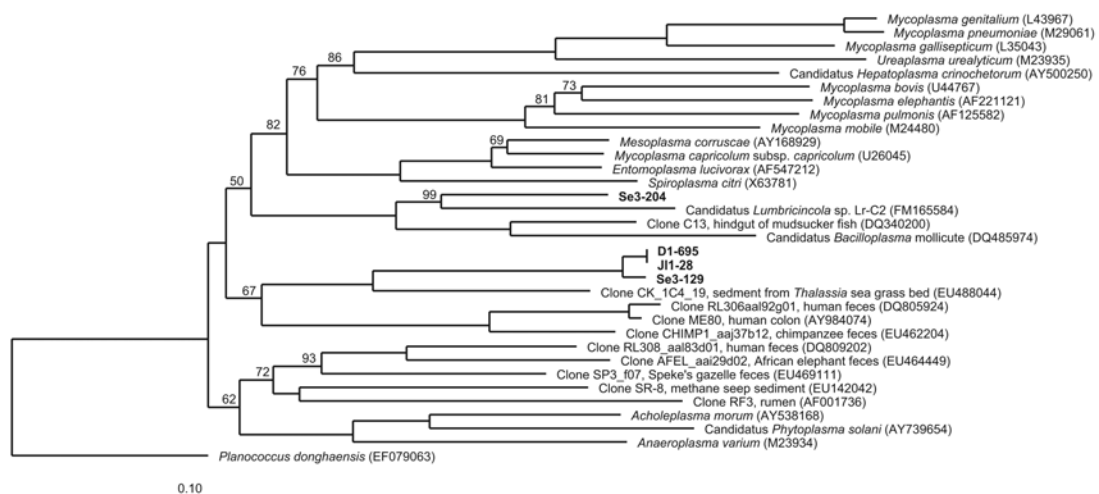
Στα δείγματα J11, Ag31 και O2 επικράτησαν φυλότυποι που ομαδοποιήθηκαν στο γένος *Photobacterium* sp. και παρουσίασαν >96% ομοιότητες μεταξύ τους. (Πίν. 3.3). Οι πλησιέστεροι καλλιεργημένοι συγγενείς

Πίνακας 3.3: Συγκρίσεις ανά ζεύγη των ομοιοτήτων των 16S rRNA αλληλουχιών που ομαδοποιούνται στο *Photobacterium* sp. και των κοντινότερων συγγενών τους 1: *Photobacterium leiognathi* στέλεχος RM1 (AY292947), 2: *P. leiognathi* (AY292917), 3: *Photobacterium* sp. HAR23 (AB038031), 4: *Photobacterium* sp. Jt-ISH-224 (AB293986). Ομοιότητες $\geq 98\%$ παρουσιάζονται με έντονα γράμματα.

1	2	3	4	J11-36	J11-4	J11-1	Ag31-3	Ag31-6	Ag31-13	O2-1	Φυλότυποι
-	96	99	98	96	99	99	99	96	97	99	1
	-	96	96	99	96	96	96	98	96	96	2
		-	98	96	99	99	98	97	98	99	3
			-	96	99	99	98	96	97	99	4
				-	96	96	96	98	96	96	J11-36
					-	98	98	96	97	98	J11-4
						-	99	96	97	99	J11-1
							-	96	97	99	Ag31-3
								-	96	96	Ag31-6
									-	97	Ag31-13

ήταν το *Photobacterium leiognathi* RM1 που είχε απομονωθεί από τα φωτεινά όργανα το καλαμαριού *Rondeletiola minor* (Nishiguchi & Nair 2003), το *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 που είχε απομονωθεί από το πεπτικό σύστημα του Ιαπωνικού μπακαλουνά (Tsukamoto *et al.*, 2008) και το *Photobacterium* sp. HAR23 που είχε απομονωθεί από τον Βορειοδυτικό Ειρηνικό ωκεανό (Urakawa *et al.* 1999).

Στο δείγμα Se3 επικράτησε καθαρά ο φυλότυπος Se3-204 (συχνότητα 83%) που ομαδοποιήθηκε σε μία ομάδα ακαλλιέργητων βακτηρίων (Σχ. 3.7) μέσα στην οικογένεια Mycoplasmataceae η οποία αποτελείται από βακτήρια που έχουν



Σχήμα 3.7: Neighbor-Joining φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις 16S rRNA αλληλουχίες από το μεσέντερο του *Nephrops norvegicus* για τους αντιπροσώπους των ακαλλιέργητων Mollicutes και της ομάδας CK_1C4-19. Το *Planococcus donghaensis* (Actinobacteria) έχει χρησιμοποιηθεί ως ρίζα. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 10% νουκλεοτιδικές διαφορές και οι αξίες ελέγχου έχουν υπολογιστεί από 1000 αντίγραφα του δέντρου. Οι σχετικές αφθονίες των φυλότυπων σε κάθε βιβλιοθήκη φαίνονται σε παράνθεση. Μόνο αξίες bootstrap μεγαλύτερες από 50% φαίνονται στο δέντρο.

εντοπίζεται στο πεπτικό σύστημα διάφορων θαλασσινών και χερσαίων ζώων (Σχ. 3.7). Ο φυλότυπος Se3-204 έμοιαζε σε ποσοστό 89% με ένα ακαλλιέργητο *Mollicutes* βακτήριο που είχε εντοπιστεί σε υψηλές αφθονίες στο πεπτικό σύστημα του ψαριού *Gillichthys mirabilis* (Bano *et al.* 2007). Άλλοι αντιπρόσωποι αυτής της ομάδας έχουν εντοπιστεί στο πεπτικό σύστημα Νοτοθενιοειδών (Notothenioid) ιχθύων (Ward *et al.* 2009), γεωσκώληκων της οικογένειας Lumbricidae (Nechitaylo *et al.* 2009) και του ισόποδου *Porcellio scaber* (Kostanjsek *et al.* 2007).

Ο επικρατής φυλότυπος στο δείγμα D1 (D1-695, συχνότητα 86%) ομαδοποιήθηκε στα υποψήφιο φύλο CK-1C4_19, το οποίο αποτελείται αποκλειστικά από ακαλλιέργητα βακτήρια που έχουν εντοπιστεί στο ίζημα (Green-Garcia 2008), στο πεπτικό σύστημα μυρμηγκιών (Russel *et al.* 09) και στα στομαχικά περιεχόμενα του ψαριού *Pelteobagrus fulvidraco* (Wu *et al.* 2009). Το υποψήφιο φύλο CK-1C4-19 βρίσκεται κοντά στο φύλο των *Tenericutes* και στην τάξη RF9 που αποτελείται κυρίως από ακαλλιέργητους αντιπροσώπους που έχουν εντοπιστεί στα κόπρανα διαφόρων θηλαστικών (Ley *et al.* 2008). Ο D1-695 είχε χαμηλά επίπεδα ομοιότητας (87%) με τον πλησιέστερο συγγενή φυλότυπο CK-1C4-19 που είχε εντοπιστεί σε θαλάσσια λιβάδια στον κόλπο του Μεξικό (Green-Garcia 2008). Οι φυλότυποι J11-28 και Se3-129 εντοπίστηκαν σε χαμηλές αφθονίες στα δείγματα J11 και Se3 (3,3% και 1,5% αντίστοιχα) και έμοιαζαν 99% με τον D1-695 όσο και μεταξύ τους.

Εξαιτίας των χαμηλών ποσοστών ομοιότητας με όλους τους πλησιέστερους καλλιεργημένους και ακαλλιέργητους συγγενείς τους οι αντιπρόσωποι των

Mollicutes όσο και του CK-1C4-19 ελέγχθηκαν ενδελεχώς για χίμαιρες με την χρήση του λογισμικού PINTAIL. Η φυλογενετική ανάλυση (ευθυγράμμιση) έδειξε την ύπαρξη μεγάλων περιοχών με εισαγωγές νουκλεοτιδίων στους κλάδους του 16S rRNA. Επιπλέον οι 'ανωμαλίες' στη αλληλουχία του rRNA επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω με την εύρεση πολλαπλών λάθος ταιριασμάτων (mismatches) με γενικούς βακτηριακούς εκκινητές και ιχνηθέτες όπως ο EUB (I-III), ITSF και GM5_341f (Πίν. 3.4.).

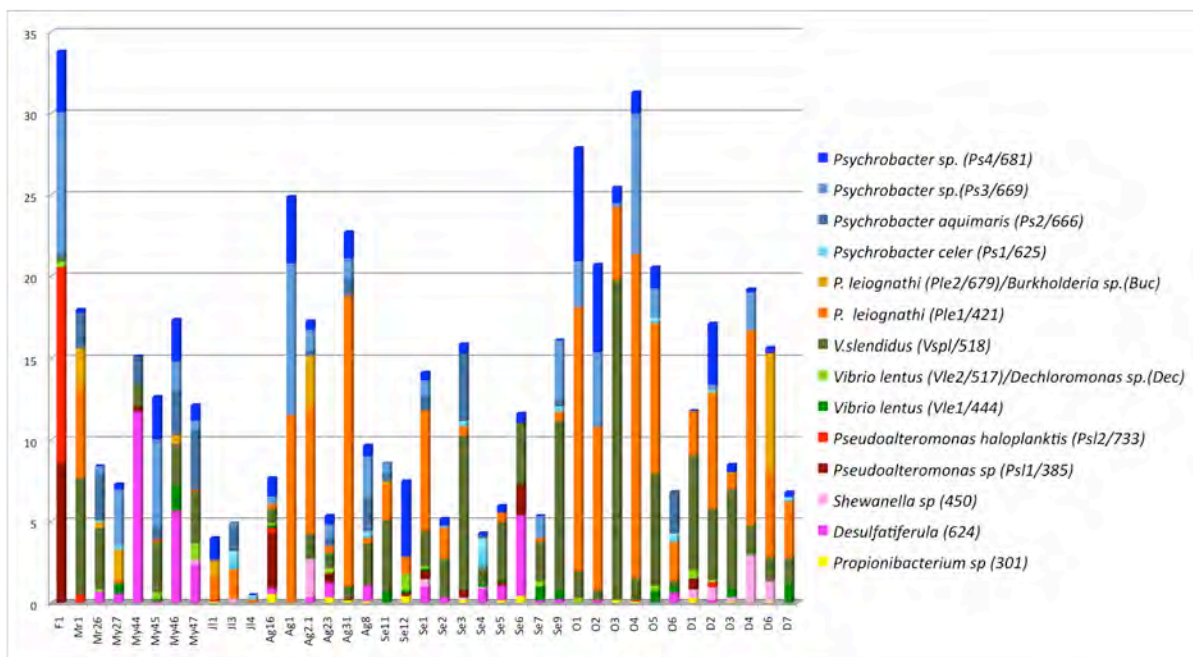
Πίνακας 3.4: *In silico* ανάλυση των λάθος ταιριασμάτων (υπογραμμισμένα) των 16S αλληλουχιών των Se3-204 και D1-695 με εκκινητές και ιχνηθέτες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη.

Εκκινητής/ Ιχνηθέτης	Σημείο πρόσδεσης	Λάθος ταιριάσματα
ITSFun	5'-GTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3'	
Se3-204	5'-GTCGTAACAAGGTA <u>TCTCTA</u> -3'	3
D1-695	5'-GTCGTAACAAGGTA <u>TCACTA</u> -3'	3
GM5_341f	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'	
Se3-204	5'- <u>TCTACGGA</u> AGGCTGCAG-3'	3
EUB338 (I-III)	5'-ACWCCTACGGGWGGCWGC-3'	
Se3-204	5'-ACT <u>TCTACGGA</u> AGGCTGC-3'	2

3.1.3. Φυλογενετική ταυτοποίηση ζωνών από την ARISA

Η αλληλούχιση των ITS, που πραγματοποιήθηκε στα δείγματα My46, Se3, O2 (μερικώς) και D1, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της ARISA με τους παγκόσμιους εκκινητές οδήγησε στην αναγνώριση των κορυφών των

γραφημάτων της ARISA που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένους φυλότυπους. Αναλυτικά, η ταύτιση των ζωνών με φυλότυπους που εντοπίστηκαν στις βιβλιοθήκες φαίνεται στον πίνακα Π8. Η αναγνώριση ζωνών που αντιστοιχούν στους επικρατείς φυλότυπους των βιβλιοθηκών απεικονίζεται στο σχήμα 3.8.



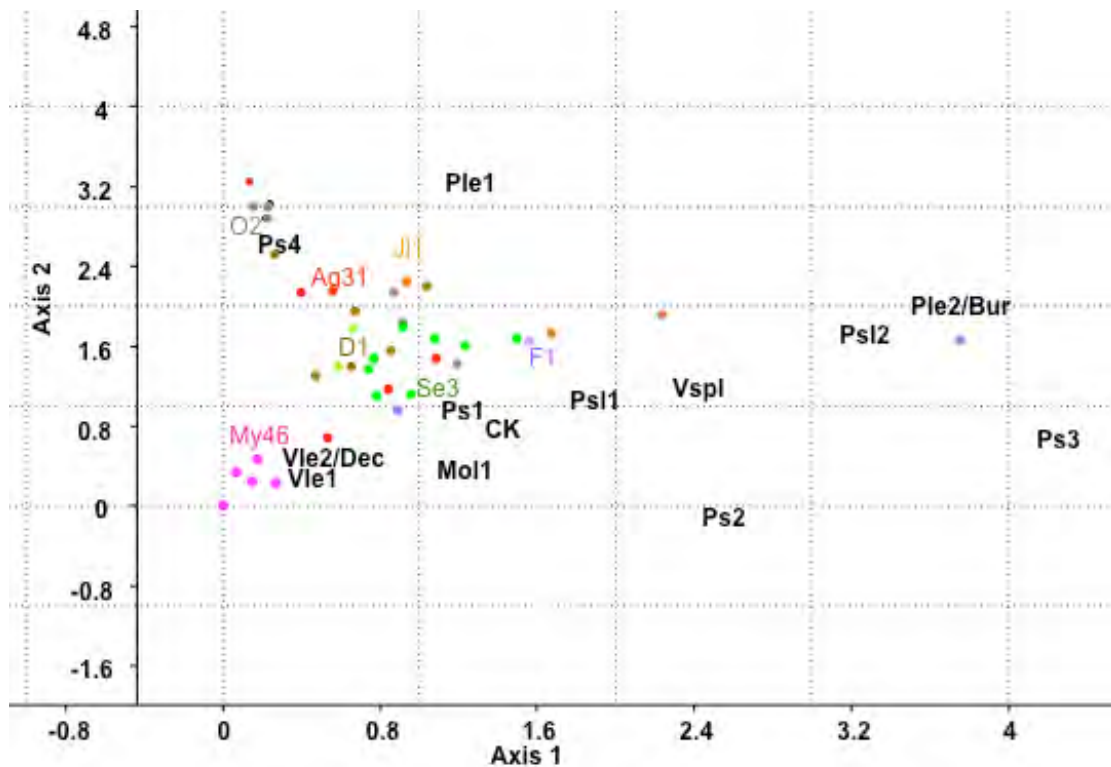
Σχήμα 3.8: Απεικόνιση των σχετικών αφθονιών (%100) ζωνών από την ARISA και αντιστοίχισή τους με το μήκος των ITS επικρατών φυλότυπων στις βιβλιοθήκες. Μέσα σε παρένθεση φαίνονται οι κωδικοί των φυλότυπων και το μήκος (ζώνη) του ITS.

Κορυφές που αντιστοιχούν στο γένος *Photobacterium* εμφανίστηκαν τους περισσότερους μήνες και κυρίως στα δείγματα του Αυγούστου, του Οκτωβρίου και του Δεκεμβρίου (πορτοκαλί αποχρώσεις), ενώ ζώνες που αντιστοιχούν στο γένος *Psychrobacter* (μπλε αποχρώσεις) και στο γένος *Vibrio* (πράσινες αποχρώσεις) εμφανίστηκαν σχεδόν σε όλους τους μήνες.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι κάποιες ζώνες (517 ζ.β. και 679 ζ.β.) αντιστοιχούν σε δύο φυλότυπους η καθεμία (Σχ. 3.8, Πίν. Π8). Επίσης η αντιστοίχιση των ζωνών με το μήκος του ITS έγινε βάσει του παράθυρου των 2,5 ζ.β. που προέκυψε από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της ARISA (βλ. § 2.4), οπότε είναι πιθανό μία ζώνη να αντιστοιχεί σε περισσότερους του ενός φυλότυπους.

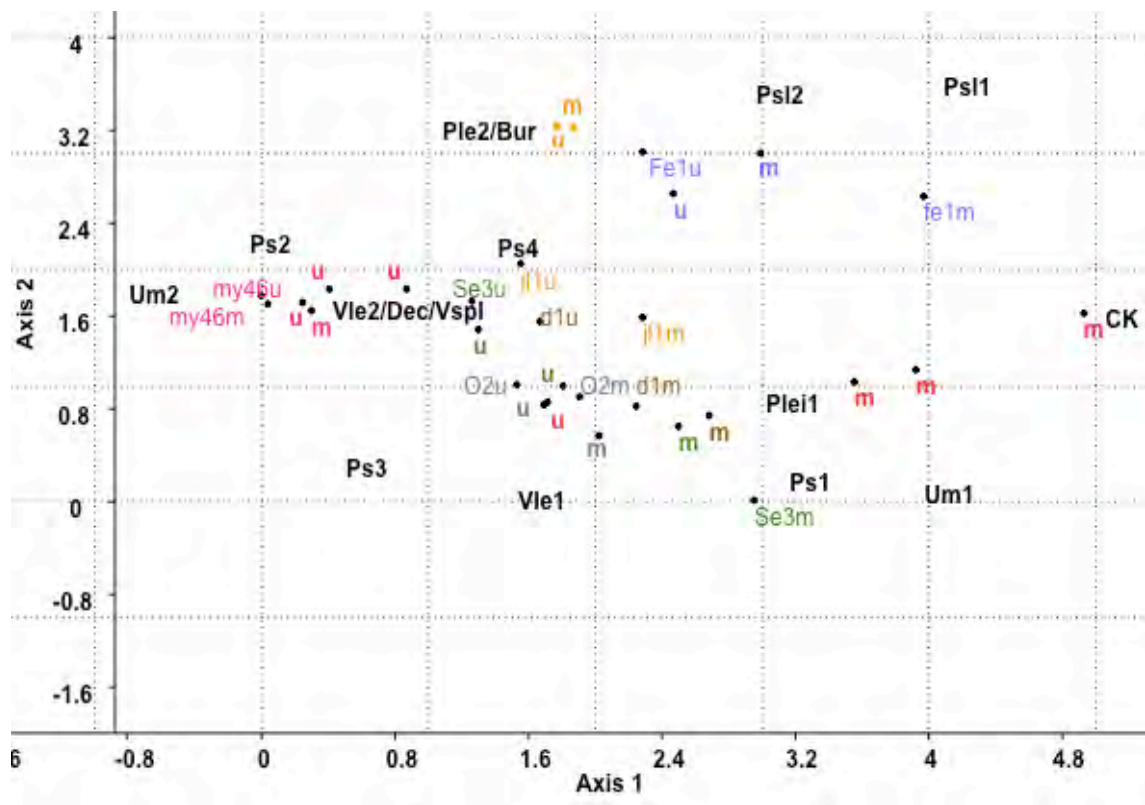
Οι αλληλουχίες των ITS που αντιστοιχούν στους ακαλλιέργητους *Mollicutes* και στους αντιπροσώπους του CK_1C4-19 είχαν μήκη 317/508 και 246 ζ.β. αντίστοιχα. Οι κορυφές της ARISA για αυτά τα μήκη ήταν σχεδόν μηδενικές (Πίν. Π8) και αυτό πιθανότατα οφείλεται στα λάθος ταιριάσματα των παγκόσμιων εκκινήτων με τους συγκεκριμένους φυλότυπους (Πιν. 3.4) που οδήγησε και στο σχεδιασμό του εκκινήτη ITSFmol (βλ. § 2.5). Τα αποτελέσματα από την αντίστοιχη ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για τη σύγκριση των ζευγών εκκινήτων ITSF-ITSReub και ITSFmol-ITSReub φαίνονται στον πίνακα Π9.

Η αποστασιοποιημένη ανάλυση αντιστοίχισης (DCA), για τα αποτελέσματα της ARISA με τους παγκόσμιους εκκινήτες (Σχ. 3.9), έδειξε την επίδραση του ITS που ανήκει σε φυλότυπο συγγενικό του *Photobacterium leiognathi* (Ple1) στην κατανομή των περισσότερων δειγμάτων του Οκτωβρίου (γκρι) και κάποιων δειγμάτων του Ιουλίου (πορτοκαλί), του Αυγούστου (κόκκινο) και του Δεκεμβρίου (καφέ). Τα ίδια δείγματα φάνηκαν να σχετίζονται με τον ITS φυλότυπου που ανήκει στο γένος *Psychrobacter* (Ps4). Τα δείγματα του Μαΐου (φούξια) εμφανίστηκαν σε μία ακόμα ανάλυση να μοιάζουν πολύ μεταξύ τους ενώ οι ITS που σχετίστηκαν πιο πολύ με την απεικόνιση τους αντιστοιχούν σε φυλότυπους που ανήκουν στα γένη *Vibrio* και *Dechloromonas*. Αντίστοιχα το δείγμα F1 (μωβ)



Σχήμα 3.9: Διάγραμμα αποστασιοποιημένης ανάλυσης αντιστοίχισης για τα αποτελέσματα της ARISA. Φαίνονται τα δείγματα από διαφορετικούς μήνες (Μωβ: Φεβρουάριος-Μάρτιος/Φούξια: Μάιος/Πορτοκαλί: Ιούλιος/ Κόκκινο: Αυγούστος/πράσινο: Σεπτέμβριος/γκρι: Οκτώβριος/καφέ: Δεκέμβριος) και τα ITS από επικρατείς φυλότυπους των βιβλιοθηκών που ανήκουν φυλογενετικά στις αντίστοιχες ομάδες (Ple: *Photobacterium leiognathi*, Ps: *Psychrobacter* sp., Vle: *Vibrio lentus*, Vspl: *Vibrio splendidus*, Bur: *Burkholderia* sp., Mol1: Se3-204, CK: CK_1C4-19, Dec: *Dechloromonas* sp.).

φάνηκε να επηρεάζεται από τα κομμάτια του ITS που αντιστοιχούν σε φυλότυπους που ανήκουν στα γένη *Pseudoalteromonas* και *Psychrobacter*. Το δείγμα Se3 (πράσινο) φάνηκε να επηρεάζεται από ITS που αντιστοιχούν στο φυλότυπο Se3-204 (Mol1) των ακαλλιέργητων Mollicutes, στο φυλότυπο του CK_1C4-19 (CK) και σε ένα φυλότυπο που ανήκει στο γένος *Psychrobacter* (Ps1). Αντίστοιχη ανάλυση πραγματοποιήθηκε για τα αποτελέσματα της ARISA με τα



Σχήμα 3.10: Διάγραμμα αποστασιοποιημένης ανάλυσης αντιστοίχισης για τα αποτελέσματα της ARISA με τα δύο ζεύγη εκκινητών. Φαίνονται τα δείγματα από διαφορετικούς μήνες (χρώματα όπως στο σχήμα 3.9), τους διαφορετικούς εκκινητές (u: ITSFun, m: ITSFmol) και τα ITS από επικρατείς φυλότυπους των βιβλιοθηκών που ανήκουν στις αντίστοιχες ομάδες (Ple: *P.leiognathi*, Ps: *Psychrobacter* sp., Vle: *Vibrio lentus*, Vspl: *Vibrio splendidus*, Bur: *Burkholderia* sp., Um: Se3-204, CK: CK_1C4-19, Dec: *Dechloromonas* sp.).

δύο ζεύγη των εκκινητών ITSFmol-ITSReub και ITSF-ITSReub (Σχ. 3.10).

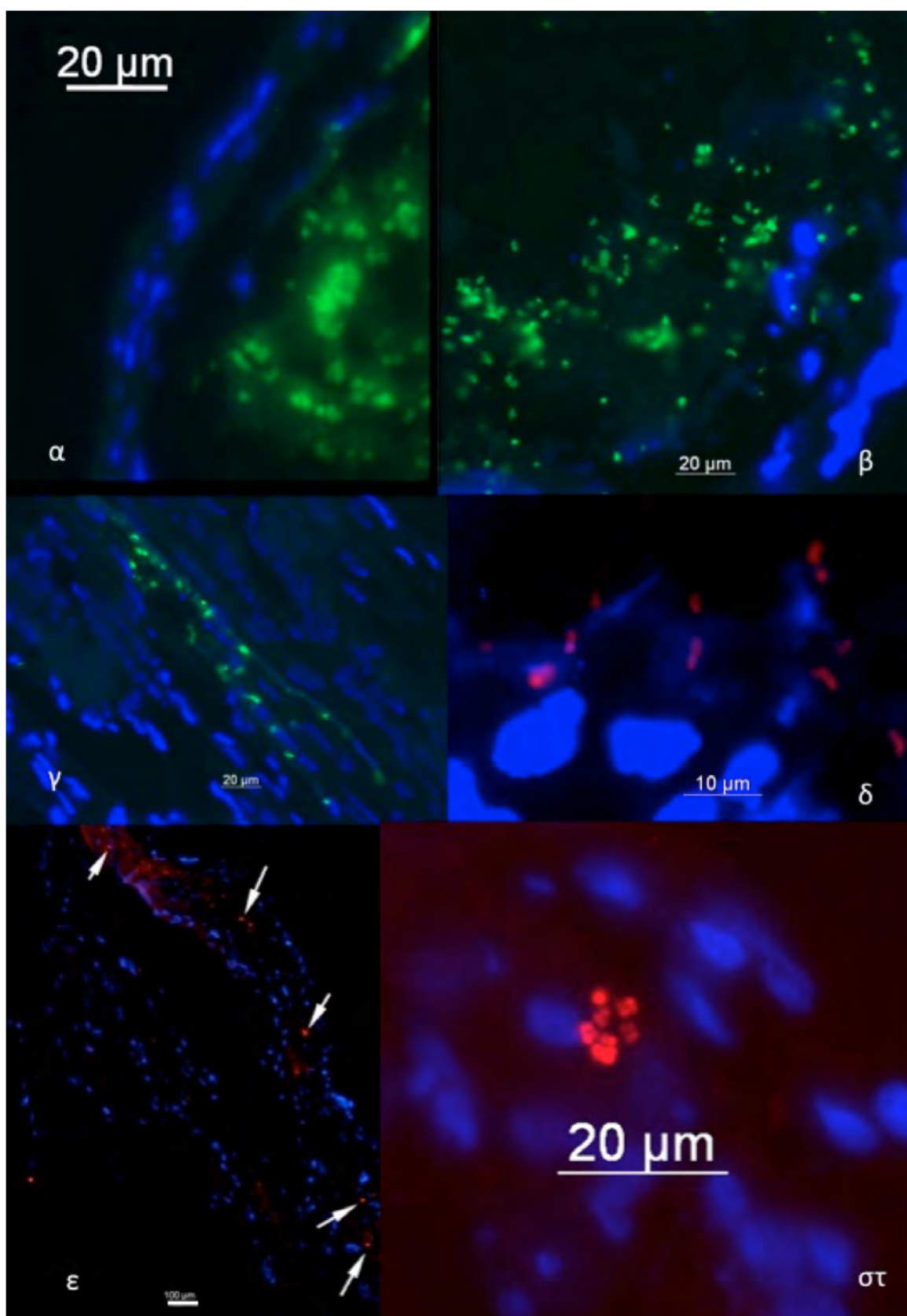
Τα ITS που αντιστοιχούν στο γένος *Pseudoalteromonas* sp. φάνηκαν να επηρεάζουν κυρίως το δείγμα F1 και με τα δύο ζεύγη εκκινητών, ενώ τα δείγματα του Μαΐου φάνηκαν να επηρεάζονται από ITS που αντιστοιχούν στα *Psychrobacter* sp. (Ps2), *Vibrio lentus*, *Vibrio splendidus* και *Dechloromonas* sp. Σε αντίθεση με την προηγούμενη ανάλυση ο ITS που αντιστοιχεί στο *P. leiognathi* (Plei1) δε φαίνεται να επηρεάζει ιδιαίτερα κάποιο δείγμα. Αξιοσημείωτη είναι η

επίδραση του ITS που αντιστοιχεί στο φυλότυπο Se3-204 (Um1) στο δείγμα Se3 όταν ενισχύθηκε με τον εκκινητή ITSFmol (Se3). Αναλυτικά τα αποτελέσματα της αντιστίχισης μηκών του ITS για τα αποτελέσματα της ARISA με το ζεύγος ITSFmol-ITSReub φαίνονται στον πίνακα Π9.

3.1.4. FISH

Στα τέσσερα δείγματα που ελέγχθηκαν δεν εντοπίστηκαν καθόλου σήματα από τους ιχνηθέτες NON338 και Bet42a. Τα πειράματα υβριδισμού με τους ιχνηθέτες EUB338 (I-III) και GAM42a ήταν θετικά στα δείγματα FN2 και FN3. Τα κύτταρα που ανιχνεύτηκαν ήταν κυρίως κυρτοί βάκιλοι (4μm x 1,5 μm) και εντοπίστηκαν στο εσωτερικό τοίχωμα του εντέρου (Εικ. 3.1.α-γ).

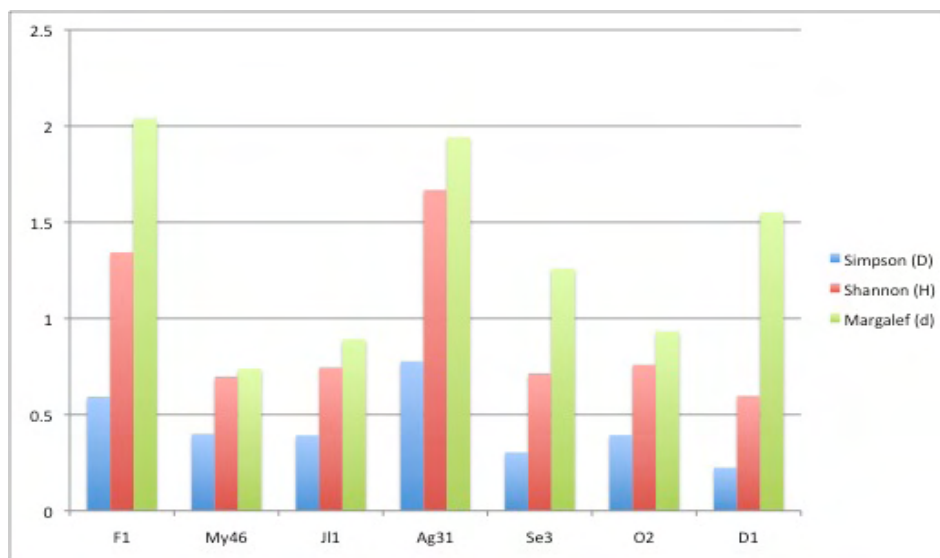
Ο υβριδισμός με τον καινούριο ιχνηθέτη για το φυλότυπο Se3-204, UncMol89 ήταν θετικός για τα δείγματα FSe1 και FSe3. Τα κύτταρα που ανιχνεύτηκαν ήταν συσσωματώματα από κόκκους οργανωμένους σε τέσσερα ή οχτώ κύτταρα (περίπου 1,5 μm για κάθε κύτταρο) (Εικ. 3.1.στ). Αυτός ο μορφότυπος (ζάρι) δε θεωρείται τυπικός για τους καλλιεργημένους μέχρι τώρα αντιπροσώπους των Mollicutes (Kostanjsek *et al.*, 2007). Πολύ λίγα σήματα ανιχνεύτηκαν με τον ιχνηθέτη EUB338(I-III) σε αυτά τα δείγματα και παρουσίασαν ένα διαφορετικό μορφότυπο από αυτόν που ανιχνεύτηκε με τον ιχνηθέτη UncMol89 (Εικ. 3.1.δ). Ο συγκεκριμένος μορφότυπος σε αυτές τις τομές εντοπίστηκε μόνο από τη χρώση DAPI προτίνοντας την ασθενή σύνδεση του ιχνηθέτη EUB338 (I-III) με τα άγνωστα βακτήρια.



Εικόνα 3.1. α-γ) Τομή (5μm) δείγματος εντέρου *Nephrops norvegicus* (FN2) υβριδισμένου με HRP σημασμένους EUB338(I-III) (α) και GAM42a (β,γ) ιχνηθέτες και βαμμένου με Alexa488 σημασμένη τυραμίδα. δ-στ) Τομές (4μm) δείγματος εντέρου του *Nephrops norvegicus* (FSE3) υβριδισμένου με Cy3 σημασμένους EUB (I-III) (δ) και UncMol89 (ε,στ) ιχνηθέτες. Τα μπλε σήματα αντιστοιχούν στα DAPI σήματα των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου και τα πράσινα (α-γ) και κόκκινα (δ-στ) στα υβριδισμένα βακτήρια.

3.1.5. Ανάλυση ομαδοποίησης και ποικιλότητας

Οι δείκτες ποικιλότητας που προσδιορίστηκαν (Σχ. 3.11, Πίν. Π10) έδειξαν ότι τα δείγματα F1 και Ag31 εμφανίζουν την υψηλότερη ποικιλότητα με όλους

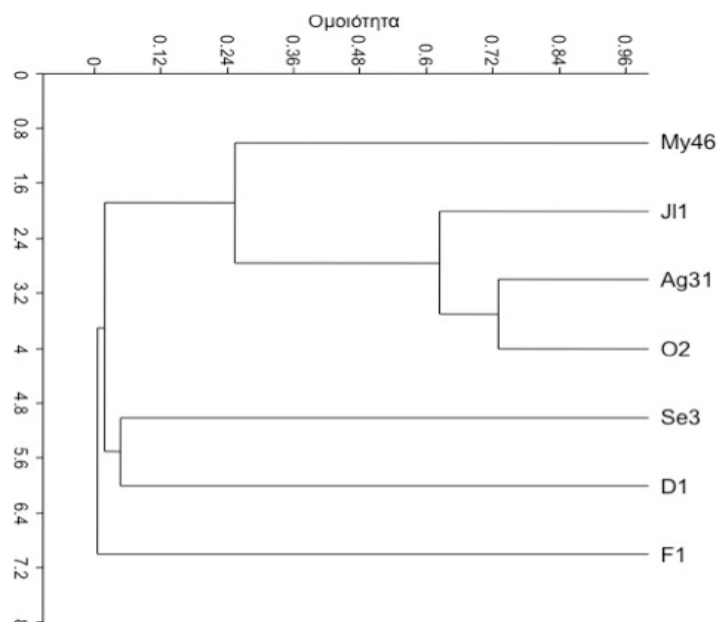


Σχήμα 3.11: Δείκτες ποικιλότητας για τα δείγματα των φυσικών πληθυσμών της καραβίδας *Nephrops norvegicus*.

τους δείκτες. Τα αποτελέσματα για τους δείκτες Shannon και Simpson ήταν παρόμοια για όλα τα δείγματα. Στην περίπτωση όμως των δειγμάτων D1 και Se3 ο δείκτης ποικιλότητας Simpson έδωσε τις χαμηλότερες τιμές ενώ ο δείκτης ποικιλότητας Margalef την τρίτη και την τέταρτη τιμή αντίστοιχα.

Η ανάλυση ομαδοποίησης με το δείκτη Morisita έδειξε ότι υπάρχουν υψηλές ομοιότητες ανάμεσα στα δείγματα του Ιουλίου του Αυγούστου και του Οκτωβρίου, ενώ οι ομοιότητες μειώνονται μεταξύ των υπόλοιπων δειγμάτων (Σχ. 3.12). Συγκεκριμένα τα δείγματα J11, Ag31 και O2 εμφανίζουν ομοιότητες

μεγαλύτερες από 60%, ενώ για όλα τα υπόλοιπα δείγματα οι ομοιότητες είναι μικρότερες από 25%.



Σχήμα 3.12: Ανάλυση ομαδοποίησης των δεικτών ομοιότητας Morisita για τις βακτηριακές κοινότητες του εντέρου των φυσικών πληθυσμών του *Nephrops norvegicus*.

3.2. Εκτρεφόμενοι πληθυσμοί

3.2.1. Φυλογενετική Ανάλυση

Αναλύθηκαν συνολικά 350 μερικές αλληλουχίες 16S rRNA για τα δείγματα Nat1 (30), Nat2 (25), S6m1 (39), S6m2 (43), M6m1(39), M6m2 (38), P6m1(24), P6m2 (34), M3m1 (38) και S3m1 (40). Οι 16S rRNA βιβλιοθήκες παρουσίασαν 6-

30 διαφορετικούς φυλότυπους βασισμένους σε επίπεδο ομοιότητας $\geq 98\%$ μεταξύ των αλληλουχιών (Πίν. Π11). Η κάλυψη των βιβλιοθηκών σύμφωνα με τον εκτιμητή Good's C ήταν ικανοποιητική (Kemp & Aller 2004) (Σχ. Π2). Όλες οι βιβλιοθήκες είχαν από έναν έως τέσσερις επικρατείς φυλότυπους ($>10\%$) (Πίν. 3.5) με κάποιους από αυτούς να μοιάζουν αρκετά μεταξύ τους (ομοιότητα $>97\%$) (Σχ. 3.13, 3.14)

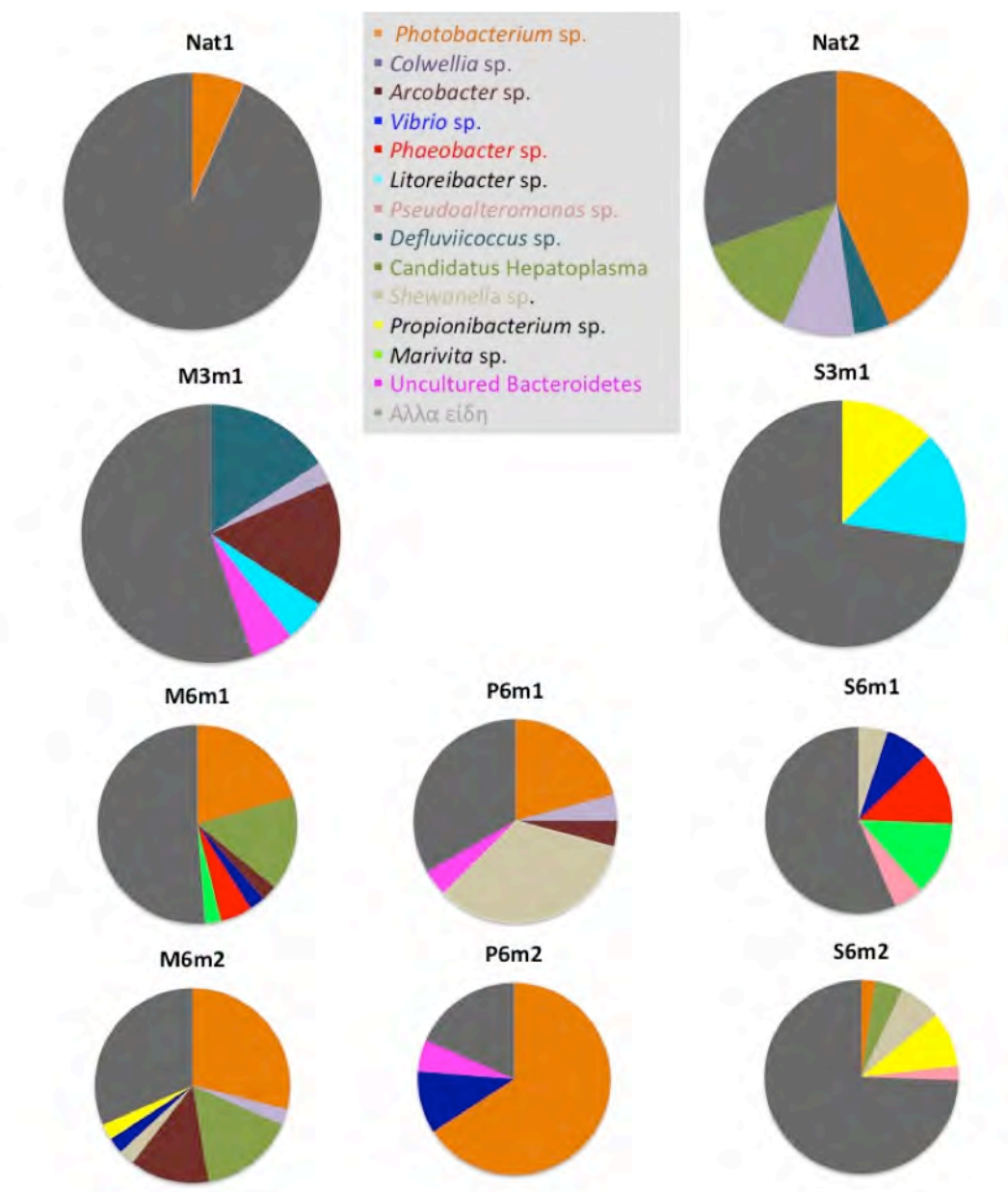
Σε πέντε δείγματα (Nat2, M6m1, M6m2, P6m1 και P6m2) οι επικρατείς φυλότυποι (Πίν. 3.5) έμοιαζαν μεταξύ τους σε επίπεδο 98%-99% και ήταν συγγενείς (ομοιότητα 98%-99%) με το *Photobacterim leiognathi* RM1 (AY292947) (Nishiguchi & Nair, 2003) και με τα ακαλλιέργητα βακτήρια J11-1 (GQ866087), 02-1 (GQ866108) και Ag31-3 (GQ866101) που είχαν ανιχνευθεί στους φυσικούς πληθυσμούς (βλ. § 3.1.2) (Σχ. 3.15).

Στο δείγμα P6m1 ο επικρατής φυλότυπος (33,3%) έμοιαζε σε ποσοστό 99% με το πρωτεολυτικό βακτήριο *Shewanella* sp. E5050-7 που έχει απομονωθεί από τη Νότια Θάλασσα της Κίνας (Zhou *et al.* 2009) και σε ποσοστό 98% με το φυλότυπο D1-674 που είχε εντοπιστεί στο μεσέντερο των φυσικών πληθυσμών του *Nephrops norvegicus* (βλ. § 3.1.2). Συγγενικοί φυλότυποι εντοπίστηκαν σε χαμηλότερες συχνότητες στα δείγματα M6m2, S6m1 και S6m2 (Σχ. 3.13, 3.15).

Ο επικρατής φυλότυπος M3m1-41 (15,8 %) έμοιαζε σε ποσοστό 99% με φυλότυπους από τα δείγματα M6m1, M6m2 και P6m1. Αυτοί ήταν συγγενείς με το ακαλλιέργητο βακτήριο Oy-M7 465.4 (DQ357825) που είχε εντοπιστεί σε στρείδια υπό καλλιέργεια (Schulze *et al.* 2006) και ανήκει στο γένος *Arcobacter*. Ο άλλος επικρατής φυλότυπος σε αυτό το δείγμα (M3m1-15, 15,8%) έμοιαζε (96%) στο ακαλλιέργητο βακτήριο C2E (DQ856531) που είχε ανιχνευτεί στο έντερο του

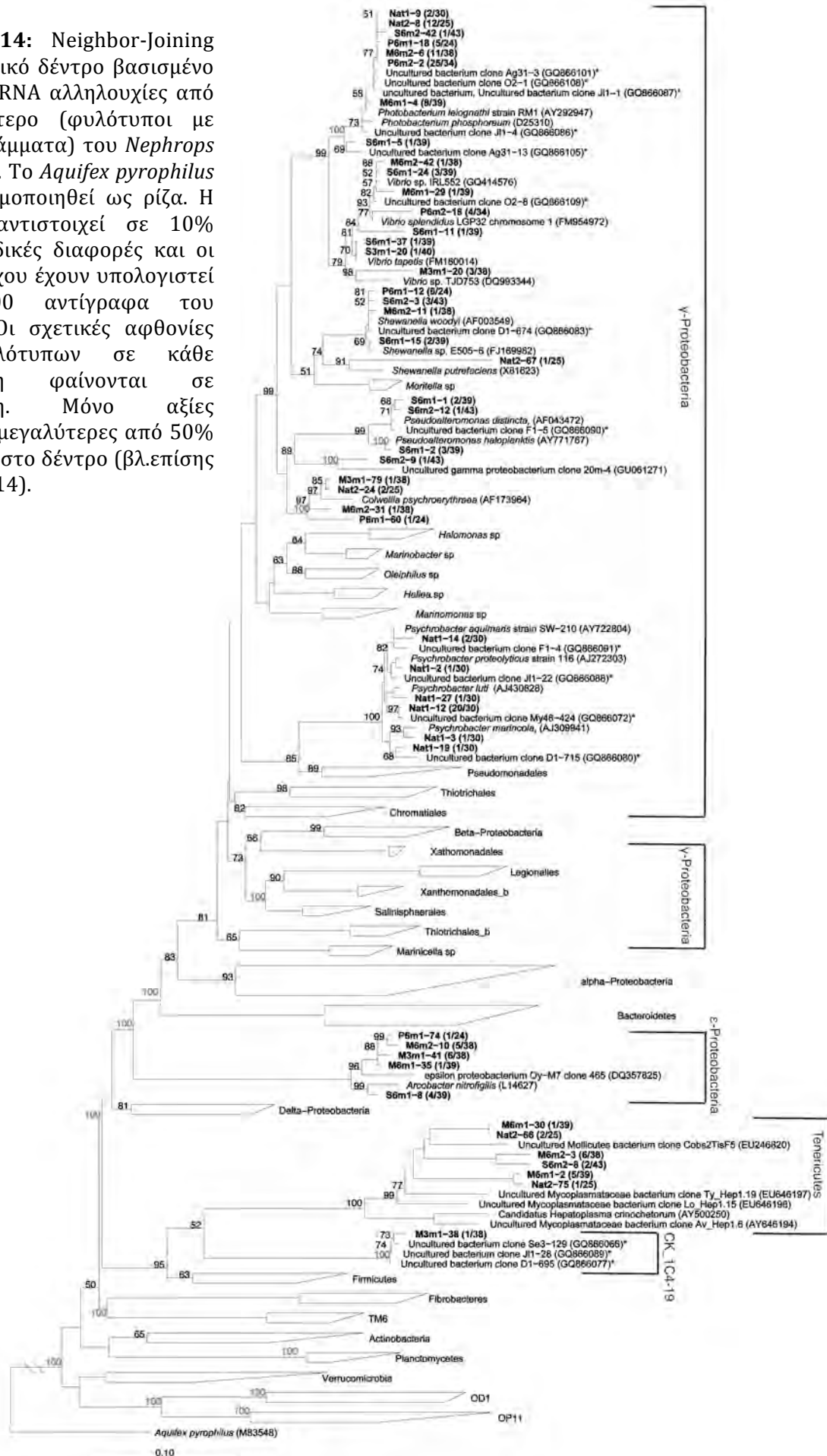
Πίνακας 3.5: Πίνακας κλώνων για τους επικρατείς φυλότυπους του πεπτικού συστήματος του *Nephrops norvegicus* για τα δείγματα των εκτροφών

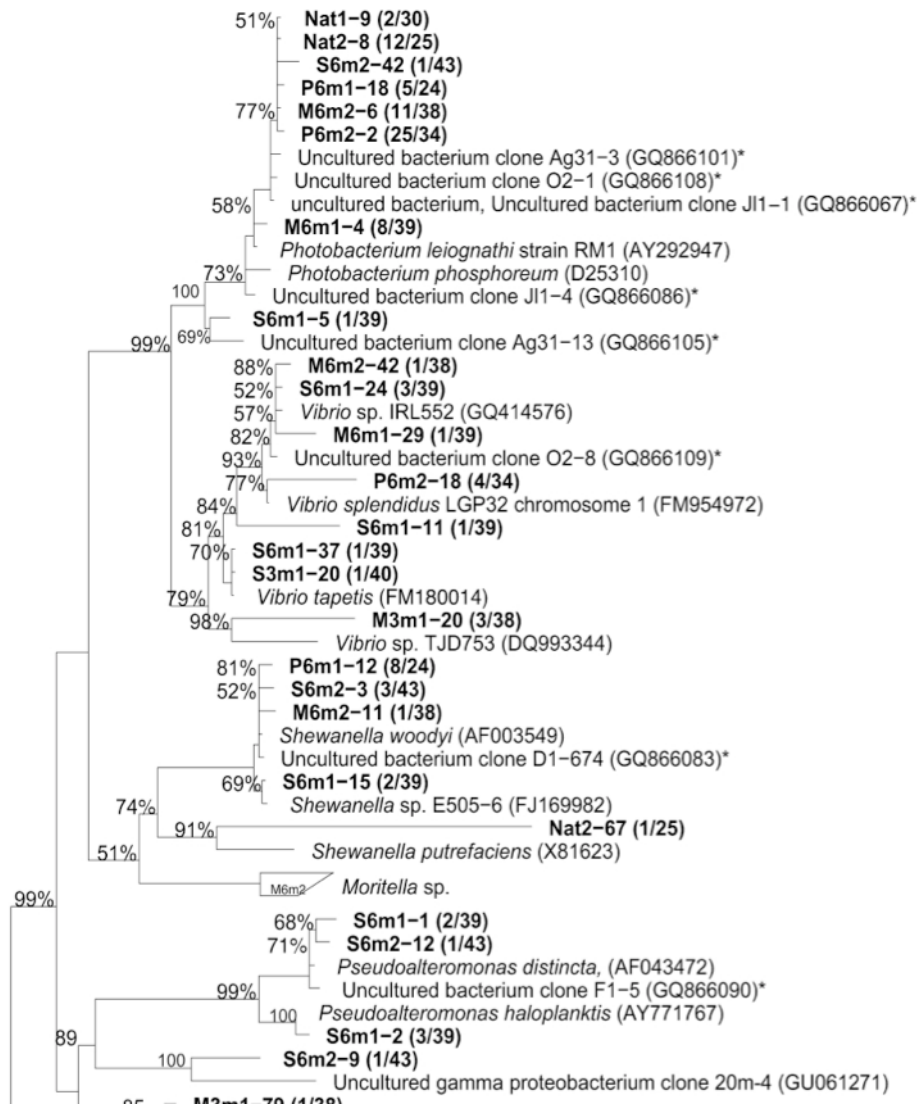
Φυλότυπος	Συχνότητα (%)	Πλησιέστερος συγγενής (GenBank No) (% ομοιότητα)	Φυλογενετική θέση	Αναφορά
Nat1-12	66,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος My46-424 (GQ866072) (99)	γ- Proteobacteria	Meziti <i>et al.</i> 2010
Nat2-8	48,0	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Ag31-3 (GQ866101) (99)	γ- Proteobacteria	Meziti <i>et al.</i> 2010
S3m1-3	15,0	Βακτήριο θαλάσσιου σπόγγου, κλώνος OTU18 (EU346505) (99)	α- Proteobacteria	Sipkema <i>et al.</i> 2011
S3m1-6	15,0	<i>Marinicella litoralis</i> (AB500095) (96)	γ-Proteobacteria	Romanenko <i>et al.</i> 2010
S3m1-7	15,0	<i>Litoreibacter albidus</i> (AB518881) (99)	α- Proteobacteria	Romanenko <i>et al.</i> 2011
S3m1-19	12,5	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος D1-727 (GQ866081) 98%	Actinobacteria	Meziti <i>et al.</i> 2010
S6m1-3	12,8	<i>Marivita cryptomonadis</i> CL-SK44 (EU515919), 99%	α- Proteobacteria	Hwang <i>et al.</i> 2009
S6m1-10	12,8	Θαλάσσιο βακτήριο, στέλεχος ATAM407-56 (AF359535) 100%	α- Proteobacteria	Hold <i>et al.</i> 2001
S6m1-8	10,2	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος FS118-51B-02 (AY704399) (99)	ε-Proteobacteria	Huber <i>et al.</i> 2006
S6m1-36	10,2	<i>Roseobacter</i> sp. 38.98 (AY870684) (98%)	α- Proteobacteria	Farto <i>et al.</i> 2006
M3m1-15	15,8	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος C2E (DQ856531) (96)	α- Proteobacteria	Li <i>et al.</i> 2007
M3m1-41	15,8	ε- proteobacterium Oy-M7 clone 465.4 (DQ357825) (96)	ε-Proteobacteria	Schulze <i>et al.</i> 2006
M3m1-25	10,5	Ακαλλιέργητο α-proteobacterium κλώνος G7-29 (EU005339) (98)	α- Proteobacteria	Unpublished
M6m1-4	20,5	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Ag31-3 (GQ866101) (99)	γ- Proteobacteria	Meziti <i>et al.</i> 2010
M6m1-56	17,9	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος TIGU1075 (HM558927) (99)	γ- Proteobacteria	Suen <i>et al.</i> 2010
M6m1-2	12,8	Ακαλλιέργητο Mycoplasmataceae κλώνος Ty_Hep1.19 (EU646197) (90)	Tenericutes	Fraune & Zimmer 2008
M6m2-6	28,9	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Ag31-3 (GQ866101) (99)	γ-Proteobacteria	Meziti <i>et al.</i> 2010
M6m2-3	15,8	Ακαλλιέργητο Mycoplasmataceae κλώνος Lo_Hep1.15 (EU646198) (88)	Tenericutes	Fraune & Zimmer 2008
M6m2-10	13,2	ε-Proteobacterium Oy-M7 κλώνος 465.4 (DQ357825) (95)	ε- Proteobacteria	Schulze <i>et al.</i> 2006
P6m1-12	33,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος D1-674 (GQ866083) (99)	γ-Proteobacteria	Meziti <i>et al.</i> 2010
P6m1-11	20,8	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Ag31-3 (GQ866101) (99)	γ-Proteobacteria	Meziti <i>et al.</i> 2010
P6m2-2	73,5	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Ag31-3 (GQ866101) (99)	γ-Proteobacteria	Meziti <i>et al.</i> 2010
P6m2-18	11,8	<i>Vibrio splendidus</i> PB1-10rrnD (EU091328) (99)	γ-Proteobacteria	Jensen <i>et al.</i> 2009



Σχήμα 3.13. Επικρατείς φυλότυποι στα δείγματα μεσέντερου των εκτρεφόμενων πληθυσμών του *N. norvegicus*. Με διαφορετικά χρώματα φαίνονται οι φυλογενετικές ομάδες ομαδοποίησης των φυλότυπων σε επίπεδο γένους. Η ομαδοποίηση έχει στηριχτεί σε επίπεδο ομοιότητας 97%, εκτός από τους συγγενείς του *Hepatoplasma* sp. (<97%).

Σχήμα 3.14: Neighbor-Joining φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις 16S rRNA αλληλουχίες από το μεσέντερο (φυλότυποι με έντονα γράμματα) του *Nephraps norvegicus*. Το *Aquifex pyrophilus* έχει χρησιμοποιηθεί ως ρίζα. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 10% νουκλεοτιδικές διαφορές και οι αξίες ελέγχου έχουν υπολογιστεί από 1000 αντίγραφα του δέντρου. Οι σχετικές αφθονίες των φυλότυπων σε κάθε βιβλιοθήκη φαίνονται σε παράνθεση. Μόνο αξίες bootstrap μεγαλύτερες από 50% φαίνονται στο δέντρο (βλ. επίσης Σχήμα Π3.14).





Σχήμα 3.15: Μεγέθυνση τμήματος των γ-Proteobacteria από το σχήμα 3.14.

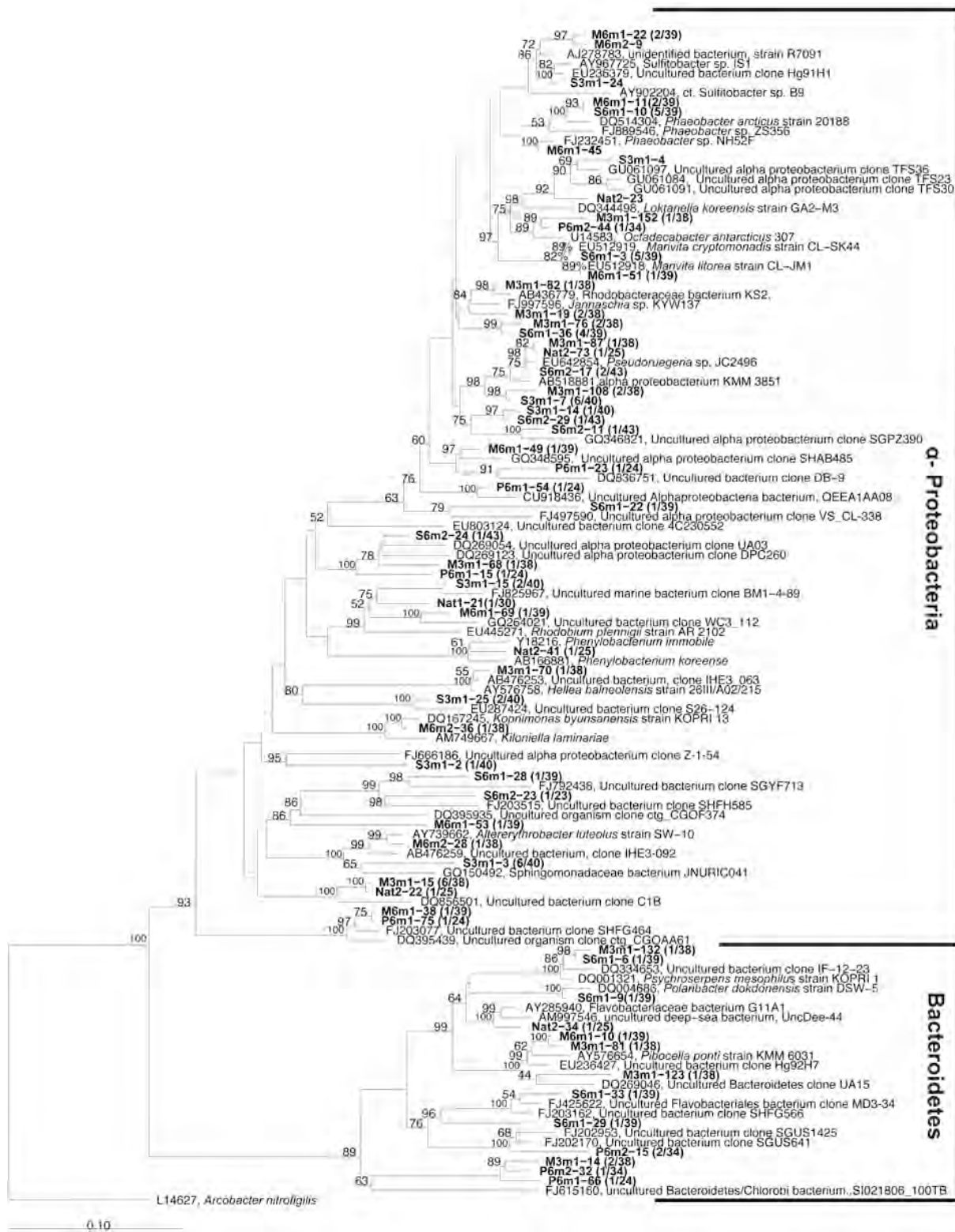
Φαίνονται με έντονα γράμματα οι φυλότυποι που εντοπίστηκαν στους εκτρεφόμενους πληθυσμούς του *Nephrops norvegicus* ενώ με αστερίσκο οι πλησιέστεροι συγγενείς τους από τους φυσικούς πληθυσμούς

κινέζικου καβουριού *Eriocheir sinensis* (Li *et al.* 1997) και ανήκει στα α-Proteobacteria και στο γένος *Defluviicoccus*. Παρόμοιος φυλότυπος εντοπίστηκε σε ένα από τα δείγματα των φυσικών πληθυσμών (Nat2-22) παρουσιάζοντας χαμηλή παρουσία (4%), (Σχ. 3.13).

Οι επικρατείς φυλότυποι M6m1-2 (12.8%) και M6m2-3 (15.7%) ομαδοποιήθηκαν στην τάξη Entomoplasmatales παρόλο που είναι αρκετά απομακρυσμένοι φυλογενετικά (91%) από τα υπόλοιπα μέλη της τάξης. Οι κοντινότεροι συγγενείς τους όπως φάνηκε από το BLAST ήταν τα ακαλλιέργητα βακτήρια της τάξης Entomoplasmatales, Ty-Hep1.19 και Lo-Hep 11.5 που έχουν εντοπιστεί στο ηπατοπάγκρεας των ισόποδων *Tylos europaeus* και *Ligia oceanica* αντίστοιχα (Fraune & Zimmer 2008). Φυλότυποι της ίδιας ομάδας ανιχνεύτηκαν και σε άλλα δείγματα (S6m2 και Nat2) σε χαμηλότερες συχνότητες (Σχ.3.14).

Ο φυλότυπος Nat2-24 παρουσίασε υψηλά ποσοστά ομοιότητας (98%) με το στέλεχος *Colwellia psychrerythraea* που είχε απομονωθεί από το Βορειοδυτικό Ειρηνικό ωκεανό στην Ιαπωνία (Urakawa *et al.* 1999). Παρόμοιοι φυλότυποι εντοπίστηκαν στα δείγματα M3m1, P6m1 και M6m2 σε αντίστοιχα χαμηλές συχνότητες (Πίν. Π11, Σχ. 3.13, 3.14).

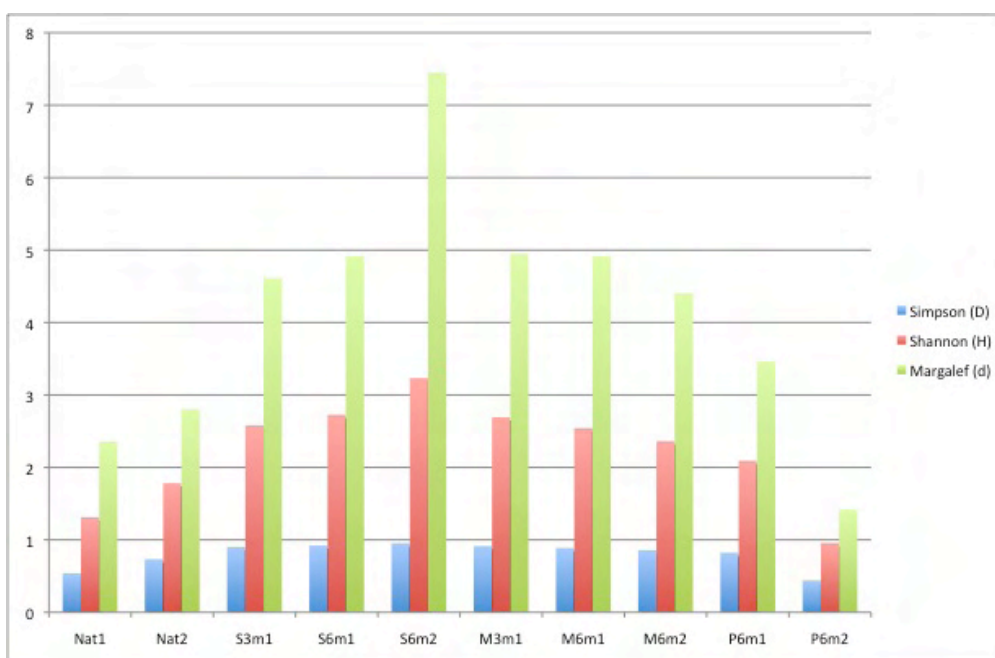
Οι υπόλοιποι φυλότυποι ομαδοποιήθηκαν στα υπόφυλα των α-, β- και γ-Proteobacteria, στα Φύλα Bacteroidetes, Fibrobacteres, Firmicutes, Actinobacteria και στα υποψήφια φύλα OD1, OP11 και TM6. Οι περισσότεροι από τους φυλότυπους των α-Proteobacteria (Σχ. 3.16) ανιχνεύτηκαν στα δείγματα που παρέμειναν σε ασιτία, ομαδοποιήθηκαν στην τάξη των Rhodobacterales και ήταν παρόμοιοι με φυλότυπους που ανιχνεύτηκαν στο νερό των ενυδρείων (βλ. § 3.4).



Σχήμα 3.16: Neighbor-Joining φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις 16S rRNA αλληλουχίες από το μεσέντερο (φυλότυποι με έντονα γράμματα) του *Nephrops norvegicus*. Παρουσιάζονται οι αντιπρόσωποι των α-Proteobacteria και Bacteroidetes. Το *Arcobacter nitrofigilis* (ε-Proteobacteria) έχει χρησιμοποιηθεί ως ρίζα. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 10% νουκλεοτιδικές διαφορές και οι αξίες bootstrap έχουν υπολογιστεί από 1000 αντίγραφα του δέντρου. Οι σχετικές αφθονίες φαίνονται σε παράνθεση. Μόνο αξίες bootstrap μεγαλύτερες από 50% φαίνονται στο δέντρο (βλ. επίσης Σχήμα Π3.16)

3.2.2. Στατιστική ανάλυση

Οι δείκτες ποικιλότητας κατά Shannon (H), Simpson (D) και Margalef (d) έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα για όλα τα δείγματα (Πίν. Π12, Σχ. 3.17). Η ποικιλότητα ήταν χαμηλότερη στο δείγμα P6m2 με $H=0,95$, $D=0,44$ και $d=1,42$, ενώ η πιο υψηλή ποικιλότητα εντοπίστηκε στο δείγμα S6m2 με $H=3,03$, $D=0,94$ και $d=6,46$.

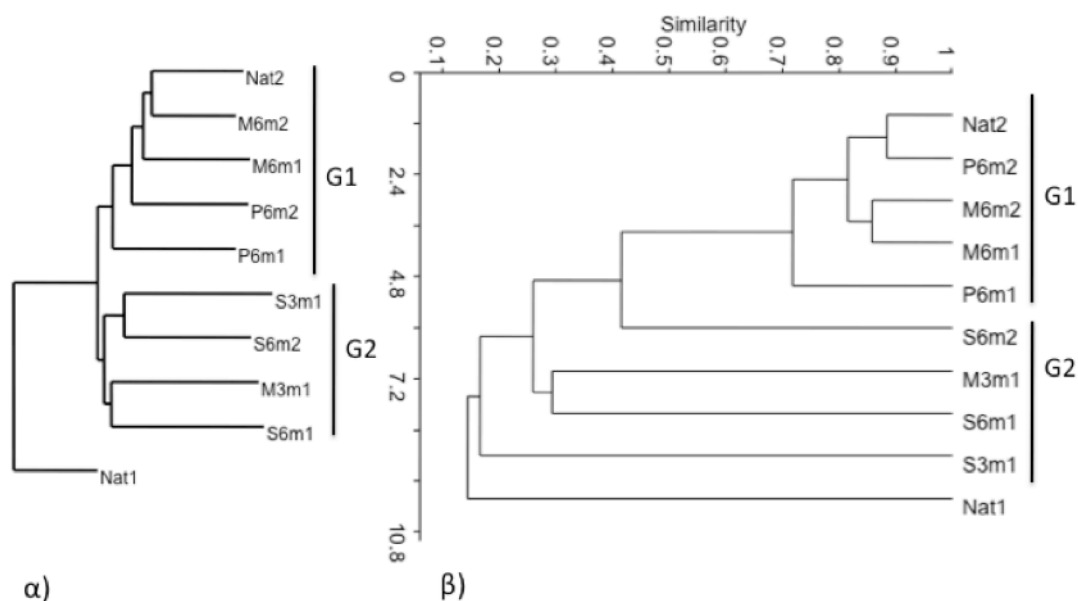


Σχήμα 3.17: Δείκτες ποικιλότητας για τις βακτηριακές κοινότητες του εντέρου εκτρεφόμενων πληθυσμών του *Nephrops norvegicus*.

Η ανάλυση κατά Neighbor joining στις συχνότητες των φυλότυπων έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με την ανάλυση ομαδοποίησης σύμφωνα με τις ομοιότητες κατά Morisita (Σχ. 3.18). Και οι δύο μέθοδοι έδειξαν μία διαφοροποίηση μεταξύ της ομάδας 1 (G1: M6m1, M6m2, P6m1, P6m2 και Nat2) και της ομάδας 2 (G2: M3m1, S3m1, S6m1 και S6m2) με το δείγμα Nat1 να

χρησιμοποιείται ως ρίζα. Αυτή η ομαδοποίηση αποδείχτηκε στατιστικά σημαντική μετά την ανάλυση ομοιοτήτων ANOSIM ($R=0.684$, $P=0.026$).

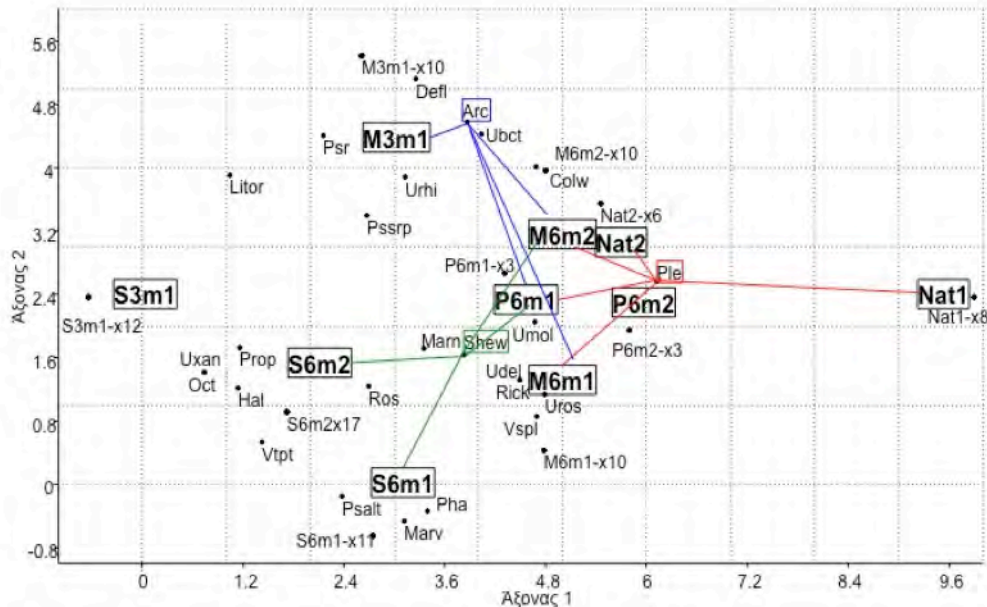
Σχετικά με την ποικιλότητα μέσα στο G1 τα δείγματα που τράφηκαν με μύδια είχαν υψηλότερη ποικιλότητα σε σχέση με τα δείγματα που τράφηκαν με σύμψηκτα.



Σχήμα 3.18: α) Neighbor-Joining ανάλυση των σχετικών αφθονιών των φυλότυπων στα δείγματα του εντέρου της καραβίδας *N. norvegicus*. β) ανάλυση ομαδοποίησης των ομοιοτήτων κατά Morisita στα δείγματα από τις εκτροφές.

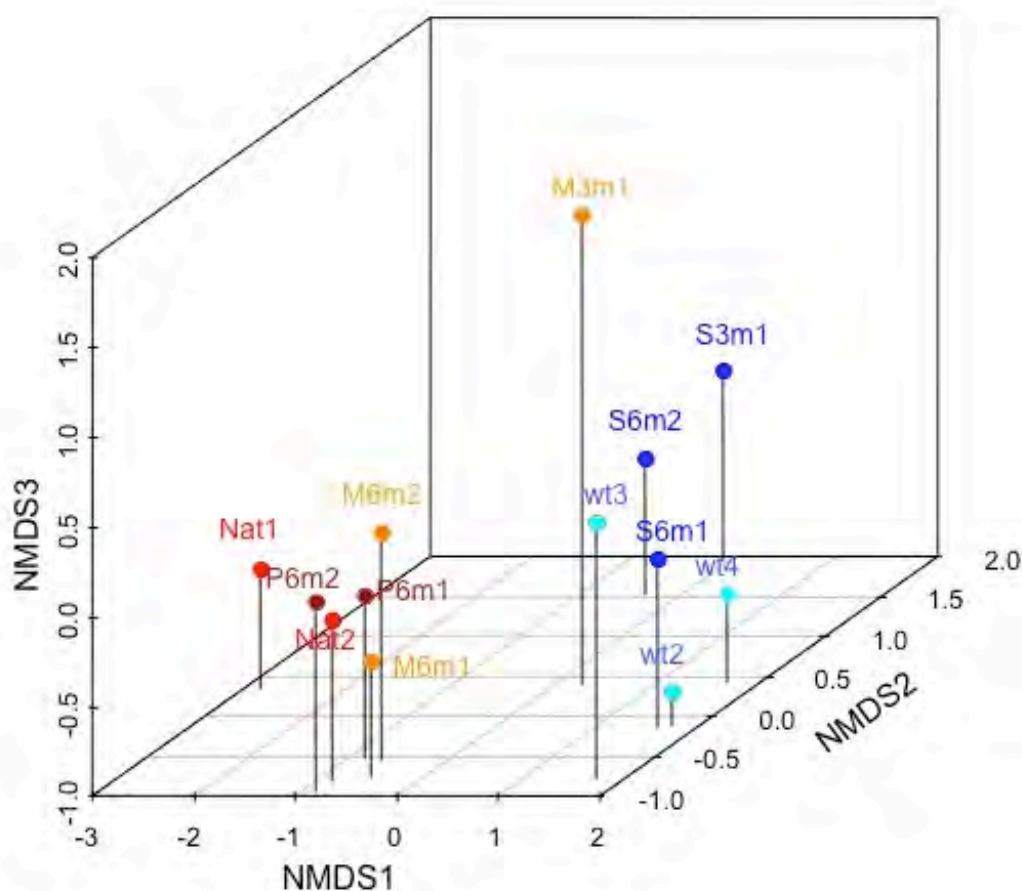
Η αποστασιοποιημένη ανάλυση αντιστοίχισης (Σχ. 3.19) έδειξε για άλλη μία φορά την ομοιότητα μεταξύ των δειγμάτων του *Nephrops norvegicus* της G1 λόγω της επίδρασης των φυλότυπων που ομαδοποιούνται στο *Photobacterium leiognathi* σε αυτά. Επίσης φάνηκε η επίδραση των φυλότυπων που ανήκουν στο γένος *Arcobacter* στην κατανομή των δειγμάτων που είχαν διατραφεί με μύδια και αυτών που ανήκουν στο *Shewanella* sp. στη θέση του δείγματος P6m1.

Η τρισδιάστατη απεικόνιση των αποτελεσμάτων των βιβλιοθηκών των εκτρεφόμενων πληθυσμών και του νερού με την χρήση του NMDS (Σχ. 3.20) έδειξε



Σχήμα 3.19: Ανάλυση αντιστίχισης των σχετικών αφθονιών των φυλότυπων με τα δείγματα των εκτρεφόμενων πληθυσμών του *Nephrops norvegicus*. Φαίνονται τα δείγματα (έντονα γράμματα σε τετράγωνο) και οι φυλότυποι με τα ονόματα των κοντινότερων συγγενών τους (Marv: *Marivita* sp., Psalt: *Pseudoalteromonas* sp. Pha: *Phaeobacter* sp., Vtpt: *V. tapetis*, Hal: *Haliea* sp., Prop: *Propionibacterium* sp., Uxan: ακαλλιέργητο xanthomonadales, Oct: *Octadecabacter* sp., Ros: *Roseobacter* sp., Vspl: *V. splendidus*, Uros: ακαλλιέργητο *Roseobacter*, Rick: *Rickettsia* sp. Udel: ακαλλιέργητο Delta, Marn: *Marinicella* sp., Umol: ακαλλιέργητο Mollicutes, Ple: *Photobacterium leiognathi*, Pssrp: *Psychroserpens* sp., Urhi: ακαλλιέργητο Rhizobiales, Litor: *Litoreaibacter* sp., Psr: *Pseudoruegeria* sp., Colw: *Colwellia* sp., Arc: *Arcobacter* sp., Defl: *Defluviicoccus* sp., Ubct: ακαλλιέργητο Bacteroidetes. Με χρωματιστές γραμμές εμφανίζεται η επίδραση μερικών επικρατών φυλότυπων στην κατανομή των δειγμάτων.

πάλι την ύπαρξη δύο ομάδων στα εκτρεφόμενα δείγματα ενώ φάνηκε η σχέση της G1 με τα δείγματα των φυσικών πληθυσμών και η σχέση της G2 με τα δείγματα του νερού. Η ομαδοποίηση αυτή πιστοποιήθηκε και στατιστικά με ANOSIM ($R=0,613$, $P=0,004$).



Σχήμα 3.20: Τρισδιάστατη NMDS απεικόνιση (Μήτρα αποστάσεων κατά Bray-Curtis) των αποτελεσμάτων της ARISA για τα δείγματα εντέρου των εκτρεφόμενων *Nephrops norvegicus* μαζί με τα δείγματα του νερού (stress=0,04). (κόκκινο: φυσικοί πληθυσμοί, κίτρινο: δείγματα εκτρεφόμενα με μύδια, καφέ: δείγματα εκτρεφόμενα με σύμψηκτα, μπλε: δείγματα σε ασιτία, γαλάζιο: δείγματα νερού).

3.3. Παρεχόμενες τροφές

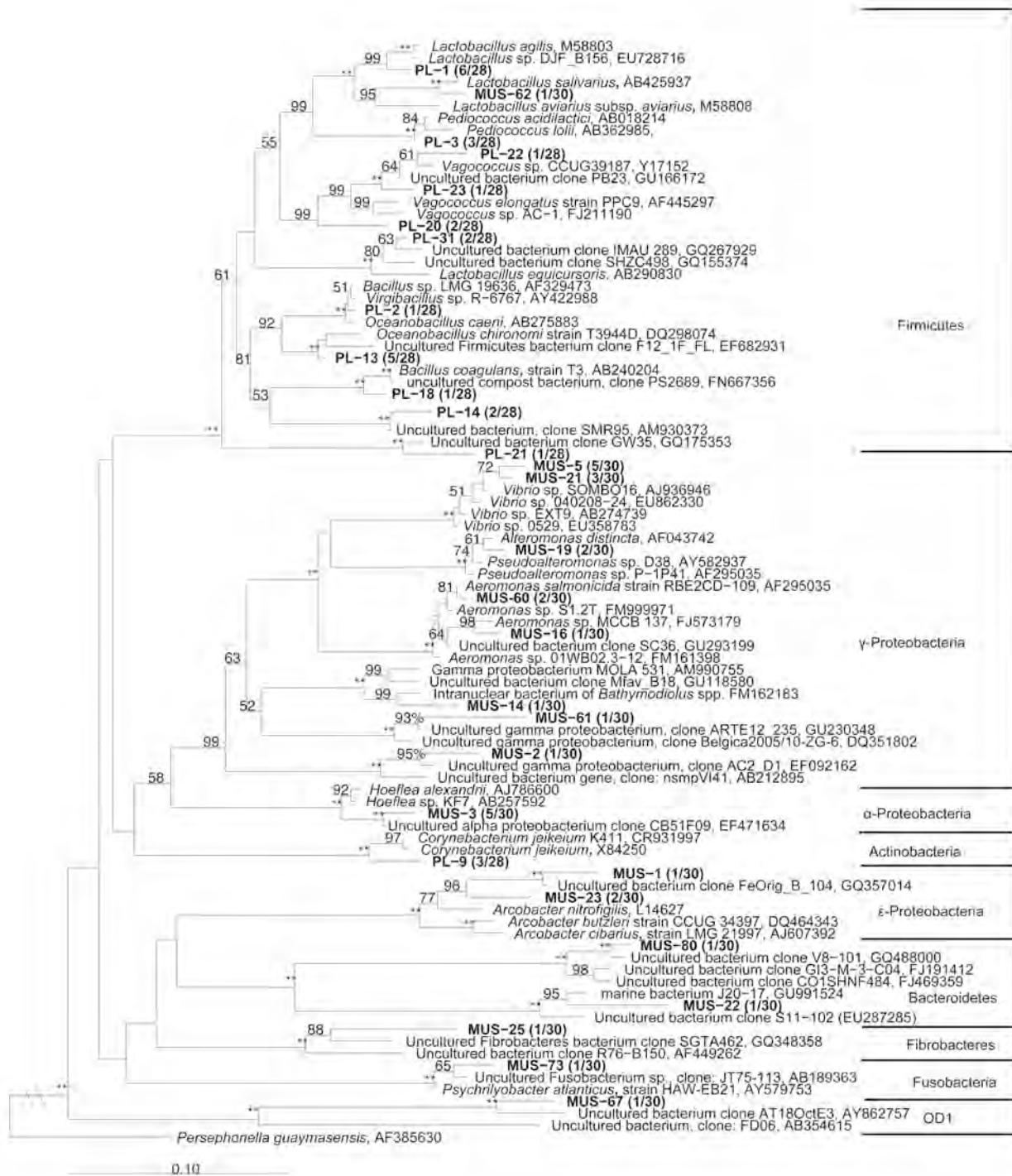
3.3.1. Μύδια

Συνολικά αναλύθηκαν 30 αλληλουχίες από το δείγμα Mus και εντοπίστηκαν 18 διαφορετικοί φυλότυποι. Από αυτούς οι δύο (Mus-3, Mus-5) ήταν επικρατείς και εντοπίστηκαν σε ποσοστό 17,8%. Η κάλυψη των βιβλιοθηκών σύμφωνα με τον εκτιμητή Good's C (Kemp & Aller 2004) ήταν ικανοποιητική (63%).

Ο επικρατής φυλότυπος Mus-3 ομαδοποιήθηκε στα α-Proteobacteria, στην οικογένεια Phyllobacteriaceae στο γένος *Hoeflea*. Παρουσίασε υψηλά ποσοστά ομοιότητας με τον κλώνο CB51F09 (EF471634) που έχει απομονωθεί από επιφανειακά ύδατα του όρμου Chesapeake (Kan *et al.* 2008) αλλά και με τον κλώνο Tun3B.E2 (FJ169210) από το ασκίδιο *Synoicum adareanum* στα νερά της Ανταρκτικής (Riesenfeld *et al.* 2008).

Ο δεύτερος επικρατής φυλότυπος Mus-5 ομαδοποιήθηκε στο γένος *Vibrio*. Ο πλησιέστερος συγγενής του (99%) ήταν το στέλεχος *Vibrio splendidus* Mj82 (GQ455013) που είχε απομονωθεί από την αιμόλεμφο του καβουριού αράχνη *Maja brachydactyla* (Gomez-Gil *et al.* 2010). Άλλοι κοντινοί συγγενείς από μελέτες με αδημοσίευτα δεδομένα άνηκαν επίσης στο είδος *V. splendidus* και είχαν εντοπιστεί στην υδάτινη στήλη.

Οι υπόλοιποι φυλότυποι που εντοπίστηκαν σε χαμηλότερες αφθονίες (3,5%-7%) ομαδοποιήθηκαν στα γ-Proteobacteria (32%), στα ε-Proteobacteria (10,5%) και στα Firmicutes, Bacteroidetes, Flavobacteria, Fusobacteria, OD1 και TG3 (Πίν. 3.6, Π13, Σχ.3.21).



Σχήμα 3.21: Neighbor-Joining φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις 16S rRNA αλληλουχίες από τις τροφές που παρασχέθηκαν στις καραβίδες (φυλότυποι με έντονα γράμματα). Το *Persephonella guaymasensis* έχει χρησιμοποιηθεί ως ρίζα. Η βαθμίδα αντιστοιχεί σε 10% νουκλεοτιδικές διαφορές και οι αξίες bootstrap έχουν υπολογιστεί από 1000 αντίγραφα του δέντρου. Οι σχετικές αφθονίες των φυλότυπων σε κάθε βιβλιοθήκη φαίνονται σε παράνθεση. Μόνο αξίες bootstrap μεγαλύτερες από 50% φαίνονται στο δέντρο. Το ** αντιστοιχεί σε bootstrap 100% (βλ. επίσης Σχήμα Π3.21).

3.3.2. Σύμψηκτα

Από το δείγμα PI αναλύθηκαν συνολικά 28 αλληλουχίες και εντοπίστηκαν 13 διαφορετικοί φυλότυποι (Πίν. Π13). Η κάλυψη σύμφωνα με τον εκτιμητή Good's C ήταν 75% (Σχ. Π3). Συνολικά εντοπίστηκαν δύο φυλότυποι (PI-1, PI-13), με ποσοστά εμφάνισης 21,4% και 17,8% αντίστοιχα, οι οποίοι ομαδοποιήθηκαν στα Firmicutes και πιο συγκεκριμένα στα γένη *Lactobacillus* και *Oceanobacillus*.

Ο κοντινότερος συγγενής του PI-1 ήταν το στέλεχος *Lactobacillus agilis* TB-B13 που είχε απομονωθεί από κόπρανα αλόγων (Morita *et al.* 2009). Ο κοντινότερος συγγενής του PI-13 ήταν το στέλεχος *Oceanobacillus chironomi* T3944D (DQ298074) που είχε απομονωθεί από αυγά χιρονομίδων (Halpern *et al.* 2007).

Πίνακας 3.6. Πίνακας φυλότυπων για τους επικρατείς φυλότυπους των τροφών (μύδια και σύμψηκτα που χρησιμοποιήθηκαν στις εκτροφές)

Φυλότυπος	Συχνότητα (%)	Κοντινότερος Συγγενής (Genbank #)(% ομοιότητα)	Φυλογένεση	Αναφορά
Mus-3	16,66	Uncultured bacterium clone Tun3b.E2 (FJ169210) (99)	α- Proteobacteria	Riesenfeld <i>et al.</i> 2008
Mus-5	16,66	<i>Vibrio splendidus</i> Mj82 (GQ455013)(99)	γ-Proteobacteria	Gomez-Gil <i>et al.</i> 2010
Mus-21	10	Uncultured <i>Vibrio</i> sp. clone HG369 (FN646711)(99)	γ-Proteobacteria	Αδημοσίευτο
PI-1	21,4	<i>Lactobacillus agilis</i> strain: TB-B13(AB425919)(100)	Firmicutes	Morita <i>et al.</i> 2009
PI-13	17,8	Uncultured <i>Oceanobacillus</i> sp. clone 0-80-33 (EU862162)(99)	Firmicutes	Αδημοσίευτο
PI-3	10,7	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain DSPV 358T (FJ751795)(99)	Firmicutes	Αδημοσίευτο
PI-9	10,7	<i>Corynebacterium urealyticum</i> DSM 7109 (AM942444)(99)	Actinobacteria	Tauch <i>et al.</i> 2008

Συνολικά οι περισσότεροι φυλότυποι (89,3%) ομαδοποιήθηκαν στα Firmicutes και στο υπόφυλο Bacilli. Από αυτούς το 60% ομαδοποιήθηκε στην τάξη Lactobacilliales ενώ το υπόλοιπο 40% στην τάξη Bacillales. Οι περισσότεροι από τους κοντινούς συγγενείς των φυλότυπων που εντοπίστηκαν στα σύμπληκτα είχαν απομονωθεί από δείγματα σε κομποστοποίηση ή από το πεπτικό σύστημα ζώων (Πίν. Π13, 3.6, Σχ. 3.21).

3.4. Νερό ενυδρείων

3.4.1. Μετρήσεις ολικών προκαρυωτικών κυττάρων

Οι μετρήσεις DAPI έδειξαν αρχικά μία μείωση των προκαρυωτικών κυττάρων από $5,75 \times 10^6$ κύτταρα/ml στο δείγμα wt2 σε $3,62 \times 10^6$ κύτταρα/ml στο δείγμα wt3. Από το wt3 στο wt4 τα προκαρυωτικά κύτταρα σχεδόν πενταπλασιάστηκαν και έφτασαν στον αριθμό $15,58 \times 10^6$ κύτταρα/ml.

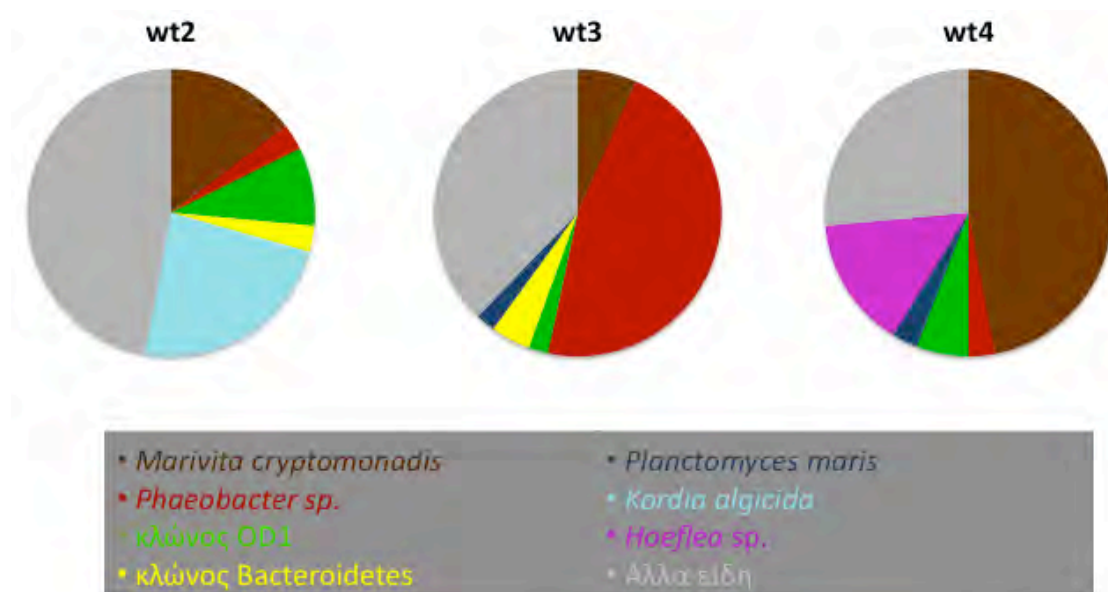
Από τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά την καταμέτρηση προέκυψε ότι η πλειονότητα των κυττάρων (>90%) και στα τρία δείγματα αποτελούνταν από κόκκους, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό ήταν κυρίως βάκιλοι.

3.4.2. Φυλογενετική ανάλυση

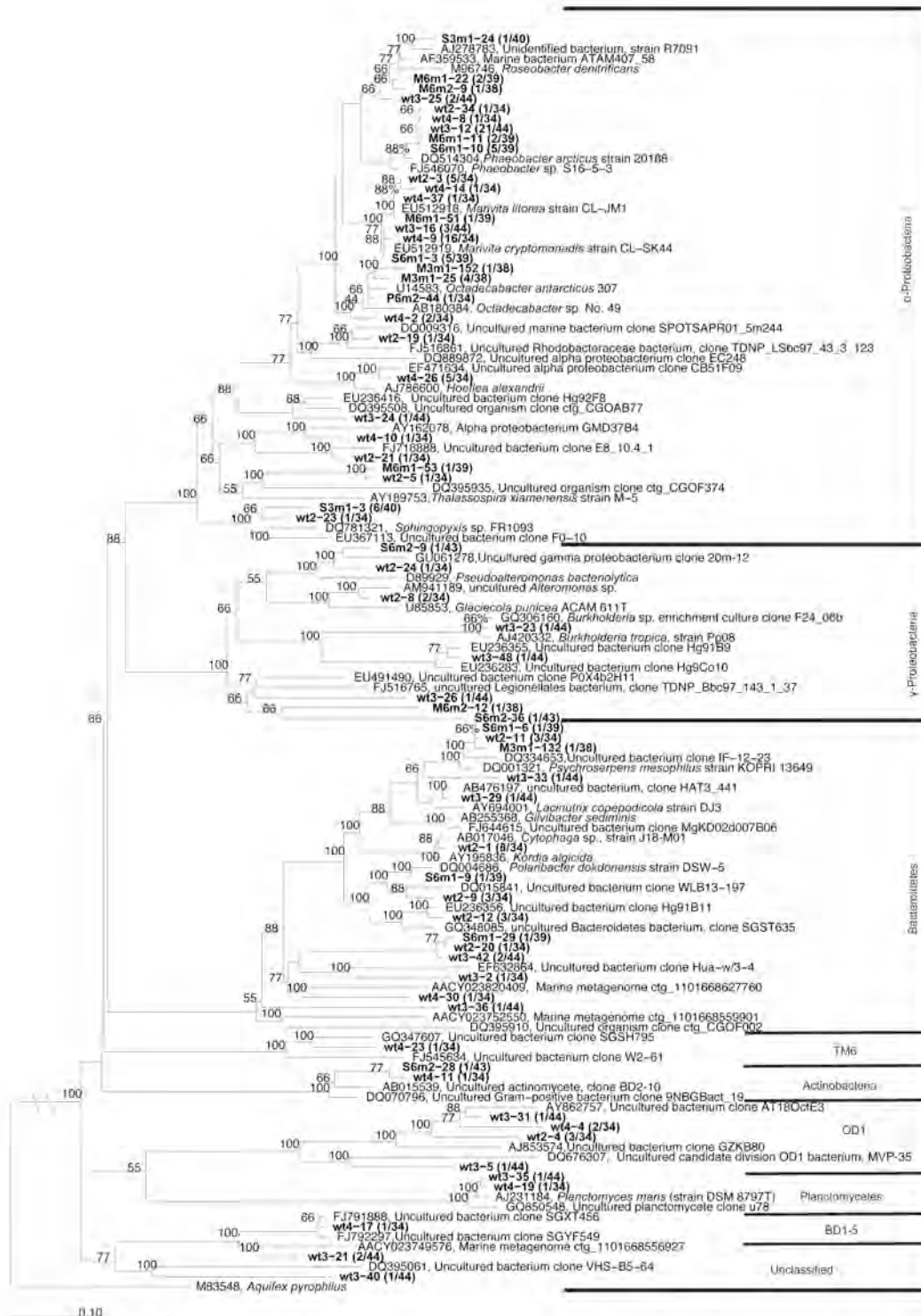
Συνολικά αναλύθηκαν 112 αλληλουχίες από τα δείγματα wt2(34), wt3(44) και wt4 (34). Η κάλυψη των τριών βιβλιοθηκών έφτασε αντίστοιχα το 80%, 71%

και 71% (Σχ. Π3). Σε κάθε δείγμα εντοπίστηκε ένας επικρατής φυλότυπος με ποσοστό αφθονίας μεγαλύτερο του 20% (Σχ. 3.22, 3.23).

Στο δείγμα wt2 ο επικρατής φυλότυπος wt2-1 εντοπίστηκε σε ποσοστό 23,53% και ομαδοποιήθηκε στην κλάση των *Flavobacteriia*. Ο πλησιέστερος (98%) συγγενής ήταν το στέλεχος *Kordia algicida* OT-1 που είχε απομονωθεί από το θαλάσσιο περιβάλλον και διαθέτει ικανότητες για την αποικοδόμηση του διατόμου *Skeletonema costatum* που είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία ερυθρών παλιρροιών (Sohn *et al.* 2004).



Σχήμα 3.22: Επικρατείς φυλότυποι στα δείγματα νερού των ενυδρείων εκτροφής. Με διαφορετικά χρώματα φαίνονται οι φυλογενετικές ομάδες ομαδοποίησης των φυλότυπων σε επίπεδο γένους η είδους. Η ομαδοποίηση έχει στηριχτεί σε επίπεδο ομοιότητας 98%.



Σχήμα 3.23: Neighbor-Joining φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις 16S rRNA αλληλουχίες από το νερό των ενυδρείων και σε επιλεγμένες από το μεσέντερο του *Nephrops norvegicus* (φυλότυποι με έντονα γράμματα). Το *Aquifex pyrophilus* έχει χρησιμοποιηθεί ως ρίζα. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 10% νουκλεοτιδικές διαφορές και οι αξίες bootstrap έχουν υπολογιστεί από 1000 αντίγραφα του δέντρου. Οι σχετικές αφθονίες των φυλότυπων σε κάθε βιβλιοθήκη φαίνονται σε παρένθεση. Μόνο αξίες bootstrap μεγαλύτερες από 50% φαίνονται στο δέντρο (βλ. επίσης σχήμα Π3.23).

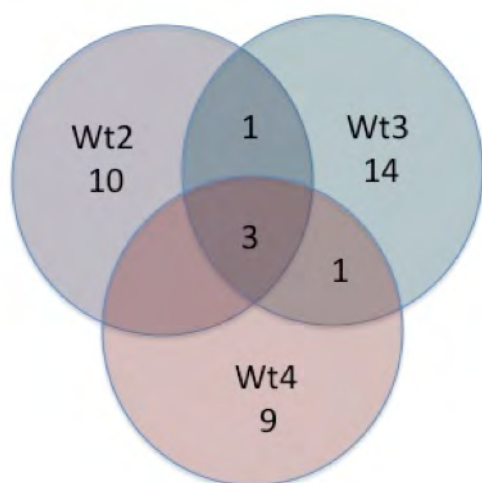
Στο δείγμα wt3 ο επικρατής φυλότυπος wt3-12 εμφανίστηκε σε ποσοστό 46,66% και ομαδοποιήθηκε στην οικογένεια Rhodobacteraceae των α-Proteobacteria. Ο πλησιέστερος (99%) συγγενής ήταν το στέλεχος ATAM407_56 που ανήκει στο γένος *Phaeobacter* και έχει απομονωθεί από καλλιέργειες του ελαφρώς τοξικού δινομαστιγώτου *Alexandrium affine* NEPCC 607 (Hold *et al.* 2001).

Στο δείγμα wt4 ο επικρατής φυλότυπος wt4-9, εμφανίστηκε σε ποσοστό 47,05% και ομαδοποιήθηκε στην οικογένεια Rhodobacteraceae των α-Proteobacteria. Ο κοντινότερος συγγενής του ήταν το στέλεχος *Marivita cryptomonadis* CL-SK44 (EU512919) που έχει απομονωθεί από το θαλάσσιο

Πίνακας 3.7: Πίνακας φυλότυπων για τους επικρατείς φυλότυπους των δειγμάτων από το νερό των ενυδρείων.

Φυλότυπος	Συχνότητα(%)	Κοντινότερος Συγγενής (Genbank #)(% ομοιότητα)	Φυλογένεση	Αναφορά
Wt2-1	23,52	<i>Kordia algicida</i> strain OT-1 (NR_027568)(98)	Bacteroidetes	Sohn <i>et al.</i> 2004
Wt2-3	14,70	<i>Marivita litorea</i> strain CL-JM1 (EU512918)(98)	α-Proteobacteria	Hwang <i>et al.</i> 2009
Wt3-12	47,7	Marine bacterium ATAM407-56 (AF359535)(99)	α-Proteobacteria	Hold <i>et al.</i> 2001
Wt4-9	47,1	<i>Marivita cryptomonadis</i> CL-SK44 ,(EU512919)(99)	α-Proteobacteria	Hwang <i>et al.</i> 2009
Wt4-26	14,7	Uncultured alpha proteobacterium clone CB51F09 (EF471634)(99)	α-Proteobacteria	Kan <i>et al.</i> 2008

κρυπτοφύκος *Cryptophyta* sp.CR-MAL01 (Hwang *et al.* 2009). Ο δεύτερος επικρατής φυλότυπος (wt4-26) εντοπίστηκε σε ποσοστό 14,7%, ομαδοποιήθηκε στο γένος *Hoeflea* και παρουσίασε υψηλό ποσοστό ομοιότητας (99%) με έναν από τους επικρατείς φυλότυπους του δείγματος των μυδιών (Mus-3).

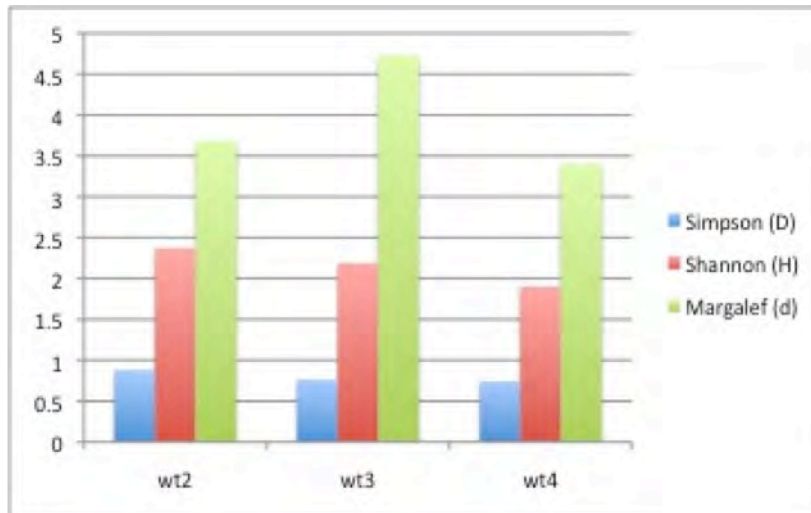


Σχήμα 3.24: Διάγραμμα Venn για τους φυλότυπους που βρέθηκαν στα δείγματα του νερού (ομοιότητα >97%).

Συνολικά στα τρία δείγματα εντοπίστηκαν και αναλύθηκαν 45 διαφορετικοί φυλότυποι πολλοί εκ των οποίων παρουσίασαν ομοιότητες >97% μεταξύ τους (Σχ. 3.22, 3.23, 3.24). Συγκεκριμένα οι φυλότυποι που παρουσίασαν υψηλή ομοιότητα με τα είδη *Marivita cryptomonadis*, *Phaeobacter* sp. και με ένα ακαλλιέργητο βακτήριο του υποψήφιου φύλου OD1, εντοπίστηκαν και στα τρία δείγματα, ενώ οι φυλότυποι που

έμοιαζαν με το ακαλλιέργητο Bacteroidetes βακτήριο 6C232235 και με το είδος *Planctomyces maris*, εντοπίστηκαν στα δείγματα wt2-wt3 και wt3-wt4 αντίστοιχα. Οι υπόλοιποι φυλότυποι ομαδοποιήθηκαν κυρίως στις τάξεις Rhodobacterales και Rhizobiales των α-Proteobacteria, στα Flavobacteriales του φύλου Bacteroidetes και στο υποψήφιο φύλο OD1 (Πίν. 3.7, Π14, Σχ. 3.23, Σχ. 3.24).

Η στατιστική ανάλυση των συχνοτήτων των διαφορετικών φυλότυπων έδειξε με την χρήση των δεικτών κατά Shannon (H) και κατά Simpson (D) ότι η ποικιλότητα στα δείγματα του νερού μειώνεται διαδοχικά από το wt2 στο wt3 και αργότερα στο wt4. Αντίθετα ο δείκτης ποικιλότητας κατά Margalef (d) έδειξε ότι η ποικιλότητα έχει τη μέγιστη τιμή της στο wt3 και την ελάχιστη στο wt4 (Σχ. 3.25).



Σχήμα 3.25: Τιμές των δεικτών ποικιλότητας για τα δείγματα του νερού των ενυδρείων.

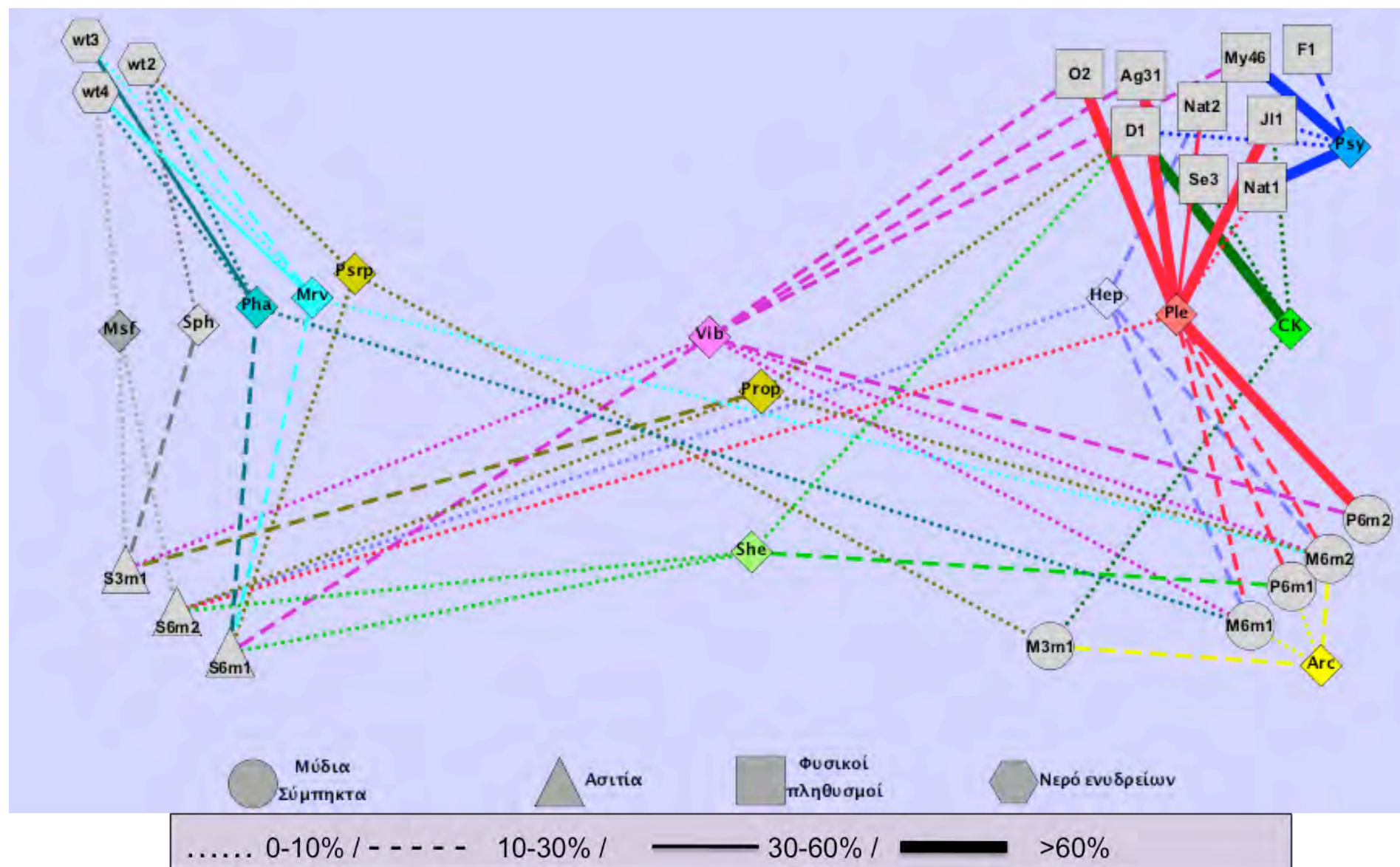
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε αυτή την εργασία μελέτηθηκε για πρώτη φορά η βακτηριακή ποικιλότητα και αφθονία του μεσέντερου φυσικών και εκτρεφόμενων πληθυσμών της καραβίδας *Nephrops norvegicus*. Ανιχνεύθηκαν οι παράγοντες που επηρεάζουν τη βακτηριακή ποικιλότητα στους φυσικούς πληθυσμούς και ελέγχθηκε η επίδραση διαφορετικών σιτηρεσίων στους εκτρεφόμενους πληθυσμούς. Τέλος εντοπίστηκαν οι επικρατείς βακτηριακοί φυλότυποι που εμφανίζονται σε φυσικούς και εκτρεφόμενους πληθυσμούς (Σχ.4.1) και εξετάστηκε η πιθανότητα χρήσης τους ως προβιοτικά σε μελλοντικές προσπάθειες εμπορικής εκτροφής.

4.1. Φυσικοί πληθυσμοί

Στο μέρος αυτό μελετήθηκαν σε μηνιαίο επίπεδο οι μικροοργανισμικές κοινότητες του μεσέντερου φυσικών πληθυσμών της καραβίδας *Nephrops norvegicus* συλλεγμένων από τον Παγασητικό κόλπο. Η *a priori* υπόθεση ότι οι μικροοργανισμικές κοινότητες του εντέρου μπορεί να εμφανίζουν ένα εποχικό πρότυπο στηρίχτηκε στις εποχικές αλλαγές στη διαθεσιμότητα της τροφής, που όπως έχει φανεί από προηγούμενες μελέτες επηρεάζει τις εντερικές μικροοργανισμικές κοινότητες (Harris 1993, Lau *et al.* 2002, Ley *et al.* 2008 και αναφορές).

Οι εποχικές διακυμάνσεις της διαθέσιμης τροφής για το *Nephrops norvegicus* στον Παγασητικό Κόλπο συμπεραίνονται από μοντέλο που είχε κατασκευασθεί για την περιοχή. Στηριζόμενοι σε στοιχεία από προηγούμενες μελέτες οι Petihakis *et al.* (2005) κατασκεύασαν ένα ετήσιο μοντέλο για τις



Σχήμα 4.1. Ανάλυση δικτύων για τους κοινούς φυλότυπους (◊) μεταξύ των δειγμάτων που αναλύθηκαν. Msf: *Marinosulfomonas*, Sph: *Sphingobacter*, Pha: *Phaeobacter*, Mrv: *Marivita*, Psrp: *Psychroserpens*, Prop: *Propionibacterium*, She: *Shewanella*, Vib: *Vibrio*, Ple: *Photobacterium leiognathi*, CK: CK_1C4_19, Hep: candidatus *Hepatoplasma*, Arc: *Arcobacter*, Psy: *Psychrobacter* sp. Τα ποσοστά του κάθε φυλότυπου απεικονίζονται με διαφορετικές συνδέσεις.

φυσικοχημικές αλλαγές στις διάφορες ζώνες του Παγασητικού Κόλπου το οποίο προεκτάθηκε και σε μοντελοποίηση των ανθίσεων του φυτοπλαγκτού αλλά και των επιδράσεων τους στην υπόλοιπη τροφική αλυσίδα. Σύμφωνα με το παραπάνω μοντέλο η περιοχή του Παγασητικού χωρίστηκε σε τρεις περιοχές: 1) την εσωτερική περιοχή, όπου βρίσκεται κοντά στις ακτές, παρουσιάζει μικρά βάθη, έχει μικρή επίδραση από το Αιγαίο Πέλαγος και ισχυρή σύζευξη του βένθους με την υδάτινη στήλη, 2) την ανώτερη ζώνη της κεντρική εξωτερικής περιοχής (<50 m βάθος) όπου παρατηρείται ισχυρό θερμοκλινές και 3) την κατώτερη ζώνη της κεντρικής εξωτερικής περιοχής (>50 m βάθος) όπου παρατηρούνται σχετικά χαμηλές συνθήκες φωτισμού και θερμοκρασίας αλλά γενικά οι φυσικοχημικοί παράγοντες παραμένουν σταθεροί κατά τη διάρκεια του χρόνου.

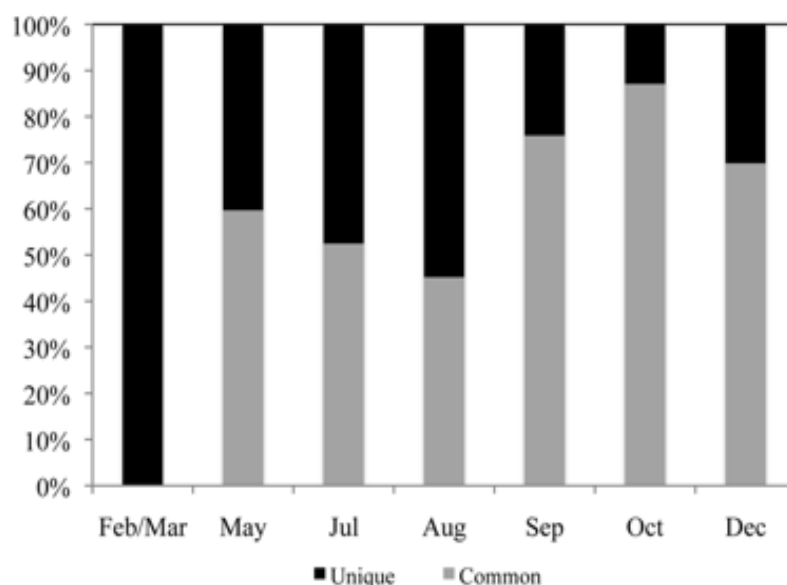
Το *N. norvegicus* στον Παγασητικό εντοπίζεται στη βαθύτερη ζώνη της κεντρικής εξωτερικής περιοχής, όπου κυριαρχούν χαμηλές (13°C) και σταθερές θερμοκρασίες καθόλη τη διάρκεια του χρόνου όπως και χαμηλές συνθήκες φωτισμού. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τις βενθικές κοινότητες όπως η βιομάζα του φυτοπλαγκτού που καθιζάνει μετά το πέρας της χειμωνιάτικης άνθισης, τα θρύμματα και τα βακτήρια δείχνουν ετήσια πρότυπα (Petihakis *et al.* 2005) και καθορίζονται από την άνθιση του φυτοπλαγκτού που ξεκινάει περίπου τον Ιανουάριο με Φεβρουάριο κάθε χρόνο. Η βιομάζα του φυτοπλαγκτού στο ίζημα φτάνει στο μέγιστο σύντομα μετά την έναρξη της άνθισης κάτι που οφείλεται στο ότι η άνθιση αποτελείται κυρίως από μεγάλα διάτομα (Triantafyllou *et al.* 2001). Η μέγιστη συγκέντρωση των θρυμμάτων στο ίζημα παρατηρείται κατά το Φεβρουάριο με Μάρτιο, προκαλώντας μία σχεδόν άμεση απόκριση από τα βακτήρια όπου παρατηρείται αύξηση της αφθονίας τους. Μετά

τον Απρίλιο παρατηρείται μείωση στην αφθονία του φυτοπλαγκτού, των θρυμμάτων και της βακτηριακής βιομάζας (Kormas *et al.* in prep.). Αυτά τα πρότυπα έχουν θετική επίδραση στη τροφική αλυσίδα του βένθους, αυξάνοντας τη δραστηριότητα των αιωρηματοφάγων και των ιζηματοφάγων οργανισμών, σύντομα μετά από το μέγιστο του φυτοπλαγκτού, των βακτηρίων και των θρυμμάτων, κατά τον Απρίλιο ή Μάιο.

Συνεπώς, εποχικές διακυμάνσεις στο οικοσύστημα του Παγασητικού μπορεί να καταλήξουν σε διαφοροποίηση στην ποσότητα και στην ποιότητα της διαθέσιμης τροφής, που φτάνει στο ίζημα, της οποίας τα ακριβή χαρακτηριστικά παραμένουν άγνωστα. Συνδυάζοντας τις διατροφικές συνήθειες του *N. norvegicus* που δρα είτε ως θηρευτής (μικρά μαλάκια, καρκινοειδή και πολύχαιτοι) ή ως σαπροφάγος (ψάρια, μεγαλύτερα ασπόνδυλα) με την περιοδικότητα που παρατηρείται στο σύστημα του Παγασητικού Κόλπου συμπεραίνεται ότι η υψηλότερη διαθεσιμότητα σε τροφή για το *N. norvegicus* αναμένεται κατά τον Απρίλιο-Μάιο και διαδοχικά μειώνεται μέχρι την επόμενη άνθιση.

Οι συγκεκριμένες διακυμάνσεις στη διαθεσιμότητα της τροφής αντικατοπτρίζονται σε ένα βαθμό στο επίπεδο της δομής των μικροοργανισμικών κοινοτήτων του μεσέντερου (Πίν. 3.1), όχι άμεσα αλλά μερικούς μήνες μετά όπως ήταν αναμενόμενο λόγω του χρόνου απόκρισης που απαιτείται από τις βενθικές κοινότητες κατά τη βενθοπελαγική σύζευξη (Graf 1992). Οι βακτηριακές κοινότητες παρουσίασαν διαφορετικές δομές με κάποιο βαθμό αλληλοεπικάλυψης ($R=0.589$, $p=0,016$) μεταξύ της περιόδου με τη μέγιστη ποσότητα φυτοπλαγκτικών θρυμμάτων (Φεβρουάριος/Μάρτιος) και της περιόδου με τη μέγιστη διαθεσιμότητα σε τροφή (Μάιος). Μετά το Μάιο η δομή των

βακτηριακών κοινοτήτων επηρεάστηκε δραστικά ($R=0,969$ μεταξύ Μαΐου και Ιουλίου). Η σταδιακή μείωση της τροφής οδήγησε σε μικρές αλλαγές μεταξύ Ιουλίου και Αυγούστου ($R=0,654$). Από τον Αύγουστο μέχρι το Δεκέμβριο που η τροφή έχει πλέον μειωθεί αισθητά οι βακτηριακές κοινότητες διαφοροποιούνται ελάχιστα ($R<0,41$). Η ανάλυση της διαδοχής των μικροοργανισμικών λειτουργικών ταξινομικών μονάδων (ΛΤΜ) μεταξύ διαδοχικών μηνών δειγματοληψίας ενίσχυσε την παραπάνω υπόθεση. Στο Σχήμα 4.2 φαίνεται ότι από το Φεβρουάριο μέχρι τον Αύγουστο οι ΛΤΜ διαφοροποιούνται συνεχώς με αντικατάσταση $>40\%-50\%$ σε κάθε μήνα, ενώ αυτός ο ρυθμός αλλάζει δραστικά στην περίοδο Αύγουστος-Δεκέμβριος (αντικατάσταση $<30\%$). Αντίστοιχα, όπως φαίνεται από την ανάλυση των ΛΤΜ όπως αυτές αναγνωρίστηκαν από το μήκος



Σχήμα 4.2. Σχετικές αφθονίες των κοινών βακτηριακών Λειτουργικών Ταξινομικών Μονάδων από το μεσέντερο της καραβίδας *Nephrops norvegicus* μεταξύ δειγμάτων διαδοχικών μηνών, όπως υπολογίστηκε από τα αποτελέσματα της ARISA. Το ποσοστό των φυλότυπων που εμφανίζεται και στον προηγούμενο μήνα φαίνεται με ανοιχτό γκρι.

των ITS των φυλότυπων στις βιβλιοθήκες κλώνων, η επικράτηση παρόμοιων ATM μετά τον Αύγουστο, με εξαίρεση κάποια δείγματα, στηρίζει την ύπαρξη πιο σταθερών μικροοργανισμικών κοινοτήτων σε αυτή την περίοδο (Σχ. 3.8).

Όπως σημειώθηκε η χρήση των παγκόσμιων εκκινήτων για την ARISA δεν ήταν ικανή για την αντιπροσώπευση των ακαλλιέργητων *Mollicutes* και των μελών του CK_1C4_19 (Πίν. Π8). Η χρήση του εκκινήτη ITSFmol που σχεδιάστηκε για τους φυλότυπους αυτών των ομάδων έδειξε την επίδραση των διαφορετικών εκκινήτων στα αποτελέσματα της ARISA για τα περισσότερα δείγματα (Σχ. 3.2, 3.3) και κυρίως για αυτά που βρέθηκαν να περιέχουν αντιπροσώπους των ακαλλιέργητων *Mollicutes* και του CK_1C4_19 σε μεγάλο ποσοστό στις βιβλιοθήκες (Se3, D1). Με τη χρήση του καινούριου εκκινήτη ITSFmol φάνηκε ότι οι ATM που αντιστοιχούν σε ακαλλιέργητους *Mollicutes* και στην ομάδα CK_1C4-19 αντιπροσωπεύθηκαν καλύτερα στα αποτελέσματα της ARISA (Πίν. Π9). Παρολαυτά δεν πρέπει να αγνοηθεί η πιθανή υποαντιπροσώπευση φυλότυπων που ενισχύονται ικανοποιητικά από το παγκόσμιο ζεύγος εκκινήτων, όταν χρησιμοποιήθηκε ο εκκινήτης ITSFmol. Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων από τα δύο ζεύγη (Σχ. 3.4α), αν και δεν χρησιμοποιείται συχνά, έδειξε με μεγαλύτερη σαφήνεια την εποχική διαφοροποίηση από τον Αύγουστο και μετά, με τον Αύγουστο να παρουσιάζεται ως μία μεταβατική περίοδος όπου δεν υπάρχει μεγάλη συνοχή μεταξύ των δειγμάτων που ελέγχθηκαν. Σε αυτή την περίπτωση όμως, δεν πρέπει να αγνοηθεί η υπερεκτίμηση φυλότυπων που ενισχύονται ικανοποιητικά και από τα δύο ζεύγη εκκινήτων.

Από τα παραπάνω συμπεράσματα αποκαλύφθηκαν προβλήματα στον ακριβή καθορισμό της μικροποικιλότητας με τη χρήση των παγκόσμιων

εκκινητών. Μερικές φορές αυτό μπορεί να επηρεάζει σημαντικά τα αποτελέσματα, ειδικά όταν στα δείγματα που μελετώνται εντοπίζονται σε υψηλές αφθονίες βακτηριακές ομάδες που υποαντιπροσωπεύονται από τους παγκόσμιους εκκινητές και δεν έχουν μελετηθεί αρκετά (π.χ. Mollicutes σε αλληλεπίδραση με ανώτερους οργανισμούς).

Πέρα από την ανίχνευση των επικρατών φυλότυπων των βιβλιοθηκών στα αποτελέσματα της ARISA, δεν πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω συγκρίσεις μεταξύ των δύο τεχνικών, αφού οι δύο αυτές μέθοδοι μελετούν δύο εντελώς διαφορετικά στοιχεία της ποικιλότητας των μικροοργανισμικών κοινοτήτων (Bent & Forney 2008). Επιπρόσθετα, η ARISA πραγματοποιήθηκε στο επίπεδο του μήκους του ITS ενώ οι βιβλιοθήκες στο επίπεδο των αλληλουχιών του 16S και του ITS. Συνεπώς οι τεχνικές δε διαφέρουν μόνο ως προς τον τρόπο προσέγγισης αλλά και ως προς το μοριακό δείκτη που στοχεύουν. Επιπλέον παρόμοιες 16S rRNA αλληλουχίες μπορούν να υπάρχουν σε διαφορετικά δείγματα και να συνδέονται με διαφορετικά ITS λόγω ενδογονιδιωματικής ή διαγονιδιωματικής ποικιλότητας.

Οι 16S rRNA βιβλιοθήκες έδειξαν την ύπαρξη ενός ή δύο επικρατών φυλότυπων για κάθε δείγμα υποδεικνύοντας την ύπαρξη σχετικά εξειδικευμένων βακτηριακών κοινοτήτων (Πίν. 3.2, Π2, Σχ. 4.1). Το Φεβρουάριο επικράτησε ένας φυλότυπος του γένους *Pseudoalteromonas*, στο οποίο ανήκουν βακτήρια που σχετίζονται με ανώτερους οργανισμούς, έχουν τη δυνατότητα να εποικίζουν επιφάνειες και παρουσιάζουν αντιβακτηριακές, βακτηριολυτικές και φυκολυτικές (alginolytic) ιδιότητες (Hollstrom & Kjelleberg 1999). Το *N. norvegicus* δεν τρέφεται ενεργητικώς με φύκη αλλά απομεινάρια αυτών έχουν βρεθεί στο στομάχι του, πιθανότατα μέσω παθητικής κατάποσης (Cristo & Cartes 1998). Η

παρουσία μελών του γένους *Pseudoalteromonas* στο πεπτικό σύστημα του *N. norvegicus* θα μπορούσε να βοηθήσει στη διάσπαση φυκών που καταναλώθηκαν. Επίσης, ο δεύτερος πιο επικρατής φυλότυπος στο δείγμα του Φεβρουαρίου παρουσίασε υψηλά ποσοστά ομοιότητας με ένα στέλεχος του *Psychrobacter aquimaris* που έχει απομονωθεί από θαλάσσια φύκη (Lee *et al.* 2006) και ενισχύει ακόμα περισσότερο την υπόθεση για το φυκολυτικό ρόλο αυτών των βακτηριακών κοινοτήτων.

Άλλοι αντιπρόσωποι του γένους *Psychrobacter* με πιθανές λιπολυτικές ιδιότητες, εντοπίστηκαν στο δείγμα του Μαΐου όπου και επικράτησαν (Πιν. 3.2., Σχ. 4.1). Μέλη αυτού του γένους έχουν εντοπιστεί σε πολλά ενδιαιτήματα, όπως στο θαλασσινό νερό, σε θαλάσσια ιζήματα, σε έλη, σε εδάφη από περιττώματα πτηνών (guano), σε τρόφιμα, σε ιστούς ζώων και σε σπόγγους (Bowman 2006). Το είδος *Psychrobacter proteolyticus* είχε απομονωθεί από το στομάχι του καρκινοειδούς *Euphausia superba* και είχε βρεθεί να παρουσιάζει πρωτεϊνολυτικές ιδιότητες (Denner *et al.* 2001). Συνδυάζοντας τις ιδιότητες των κοντινότερων συγγενών αλλά και την υψηλή διαθεσιμότητα τροφής κατά την περίοδο του Μαΐου συμπεραίνεται η πιθανή λιπολυτική και πρωτεϊνολυτική δράση των βακτηριακών κοινοτήτων κατά την περίοδο αυτή.

Στις βακτηριακές κοινότητες του εντέρου των δειγμάτων του Ιουλίου, του Αυγούστου και του Οκτωβρίου επικράτησαν όμοιοι (>96%) φυλότυποι του γένους *Photobacterium* (Πίν. 3.2, Π7, Σχ. 3.5, 3.6, 4.1) με κοντινότερους συγγενείς από το είδος *Photobacterium leiognathi*. Οι αντιπρόσωποι του γένους διαθέτουν ζυμωτικό μεταβολισμό και έχουν απομονωθεί από τα φωτεινά όργανα διαφόρων θαλάσσιων ζώων. Έχει βρεθεί ότι τα βιοφωτίζοντα βακτήρια είναι οι πιο άφθονοι

αερόβιοι οργανισμοί στο πεπτικό σύστημα διαφόρων ψαριών (Farmer & Hickmann-Brener 2006, Ward *et al.* 2009). Βιοχημικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε στελέχη του *P. leiognathi* απέδειξαν ότι το 96% των στελεχών παρουσιάζει χιτινολυτικές ιδιότητες και το 82% λιπολυτικές ιδιότητες (Farmer & Hickmann Brenner, 2006). Επιπλέον η πρόσφατη δημοσίευση (22 Απριλίου 2011) του γονιδιώματος του *P. leiognathi* (NZ_BACE000000000) (Microbial Genome Resources, 2011) πιστοποίησε την παρουσία γονιδίων που κωδικοποιούν για χιτινάσες, λιπάσες αλλά και πρωτεάσες. Αν και τα 16S rRNA γονίδια του γονιδιώματος του *P. leiognathi* δεν έχουν ανακοινωθεί ακόμα, μελέτη του γονιδιώματος με τη λειτουργία genome BLAST έδειξε την παρουσία μόνο ενός αντιγράφου 16S rRNA γονιδίου σε όλο το γονιδίωμα το οποίο παρουσίασε 97% ομοιότητα με τους φυλότυπους που εντοπίστηκαν στο μεσέντερο του *N. norvegicus*. Η ύπαρξη ενός μόνο αντιγράφου για το 16S rRNA γονίδιο, αν και σπάνια για τα γ-Proteobacteria και τα μέλη της οικογένειας Vibrionaceae, δείχνει ότι δεν υπάρχει λόγος επανεκτίμησης των δεικτών ποικιλότητας αλλά και της κάλυψης των βιβλιοθηκών, όπως έχει προταθεί από τον Kormas (2011), για την περίπτωση βιβλιοθηκών με υψηλές αφθονίες μελών των Proteobacteria με γονιδιώματα που διαθέτουν πολλάπλά αντίγραφα των 16S rRNA γονιδίων. Αν και στη συγκεκριμένη έρευνα δεν πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες για λιπάσες, χιτινάσες και πρωτεάσες, τα δεδομένα όπως οι υψηλές ομοιότητες μεταξύ των φυλότυπων που ομαδοποιούνται στο είδος *P. leiognathi*, η έντονη επικράτηση (>60%) των συγκεκριμένων φυλότυπων σε τρεις διαφορετικούς μήνες (Σχ.4.1), οι μεταβολικές ικανότητες της πλειονότητας των απομονωμένων στελεχών του είδους, καθώς και η παρουσία αντίστοιχων γονιδίων στο μοναδικό δημοσιευμένο

γονιδιώμά του, υποδεικνύουν την ύπαρξη μίας εξειδικευμένης βακτηριακής κοινότητας με πιθανές ευεργετικές επιδράσεις στην πεπτική λειτουργία του *N. norvegicus*. Επιπροσθέτως οι κοντινότεροι συγγενείς των μελών αυτής της κοινότητας, είχαν απομονωθεί κυρίως από ιστούς θαλάσσιων ζώων ενισχύοντας ακόμα περισσότερο την υπόθεση της δυνατότητας τους να εποικίσουν το μεσέντερο του *N. norvegicus*.

Μετά το καλοκαίρι, ο φυλότυπος Se3-204 που ανήκει σε μία ομάδα από ακαλλιέργητους αντιπροσώπους του υπόφυλου Mollicutes επικράτησε στο δείγμα του Σεπτεμβρίου. Πολλά από τα μέλη των Mollicutes είναι υποχρεωτικώς ενδοσυμβιωτικοί μικροοργανισμοί που έχουν μερικά από τα μικρότερα γονιδιώματα αυτοδιαιρούμενων οργανισμών (Razin *et al.* 1998). Τα περισσότερα βακτήρια του γένους *Mycoplasma* είναι παθογόνα αλλά πολλά από αυτά απλώς αποτελούν μέρος των φυσιολογικού μικροβιώματος ενός οργανισμού χωρίς να είναι επιβλαβή για τον ξενιστή τους (Giebel *et al.* 1990). Για τους συγκεκριμένους φυλότυπους δεν ήταν δυνατόν να εξαχθούν συμπεράσματα για πιθανές φυσιολογικές διεργασίες εφόσον η φυλογενετική απόσταση με τους κοντινότερους καλλιεργημένους συγγενείς ήταν πολύ υψηλή (ομοιότητα <83%). Επιπλέον, όπως έχει προταθεί από παλαιότερη μελέτη (Kostanjsek *et al.* 2007) ενδέχεται η συγκεκριμένη ομάδα των ακαλλιέργητων Mollicutes να αποτελεί μέρος μίας νέας, μέχρι τώρα ακαλλιέργητης, φυλογενετικής διακλάδωσης που αποτελείται από βακτήρια που εποικίζουν το πεπτικό σύστημα ασπόνδυλων και σπονδυλόζων ξενιστών. Αυτά τα βακτήρια δε φαίνεται να είναι βλαβερά για τους ξενιστές τους αφού αυτοί, όπως αναφέρεται και στις αντίστοιχες μελέτες,

ήταν υγιείς όταν μελετήθηκαν (Bano *et al.* 2007, Kostanjsek *et al.* 2007, Nechitaylo *et al.* 2009, Ward *et al.* 2009).

Σχετικά με τον επικρατή φυλότυπο του Δεκεμβρίου (D1-695) και αντιπρόσωπο του υποψήφιου φύλου CK_1C4_19, ισχύουν παρόμοια συμπεράσματα με τα παραπάνω για τους ακαλλιέργητους Mollicutes. Αυτός ο κλάδος αποτελεί μία καινούρια ομάδα που ανήκε στους Mollicutes και μόλις πρόσφατα αποτέλεσε ένα ξεχωριστό κλάδο στη βάση δεδομένων SILVA 106 (Pruesse *et al.* 2007, SILVA 2011).

Για τον έλεγχο της ειδικότητας του ιχνηθέτη UncMol89 χρησιμοποιήθηκαν μόνο έλεγχοι *in silico* και όχι πειραματικοί. Παρολαυτά η συνέπεια στο μορφότυπο που ανιχνεύτηκε με τον καινούριο ιχνηθέτη σε συνδυασμό με την απουσία σημάτων του συγκεκριμένου μορφότυπου με τον ιχνηθέτη EUB338(I-III) συνάδει με την προέλευση του φυλότυπου Se3-204 από τα βακτήρια με μορφότυπο σαρκίνας. Παρόλο που ο ιχνηθέτης UncMol89 παρουσιάζει δύο λάθος ταιριάσματα με όλους τους φυλότυπους της ομάδας των ακαλλιέργητων Mollicutes του εντέρου και πάνω από τρία λάθος ταιριάσματα με όλους τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς στις βάσεις δεδομένων, περαιτέρω έλεγχοι, όπως ο σχεδιασμός μη σημασμένων ανταγωνιστικών ιχνηθετών για το μπλοκάρισμα των αλληλουχιών που δεν είναι στόχοι (Manz *et al.* 1992), θα πρέπει να πραγματοποιηθούν ώστε να επιβεβαιωθεί πλήρως η προέλευση του Se3-204 από τον μορφότυπο της σαρκίνας.

Οι φυλότυποι που ανήκουν στο γένος *Vibrio* εντοπίστηκαν στα περισσότερα από τα δείγματα έχοντας χαμηλή έως μέση παρουσία (3,5%-19%)(Σχ.4.1). Η πλειονότητα των πλησιέστερων συγγενών τους προερχόντουσαν

από θαλάσσια ζώα (Nasu *et al.* 2000, Nishiguchi & Nair 2003, Jensen *et al.* 2009). Αυτό το γένος εντοπίζεται πολύ συχνά στο έντερο θαλασσίων ζώων εμφανίζοντας μία σχέση που ποικίλει από παρασιτική μέχρι αλληλοβοήθειας, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις το ίδιο είδος μπορεί ταυτόχρονα να είναι παθογόνο ή μη παθογόνο για έναν οργανισμό ανάλογα με τις συνθήκες (Thompson *et al.* 2004).

Οι υπόλοιποι φυλότυποι ομαδοποιήθηκαν στα φύλα των Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, Firmicutes και στα υπόφυλα των α-, β- και δ-Proteobacteria. Οι κοντινότεροι συγγενείς τους έχουν εντοπιστεί κυρίως στο ίζημα, στο έδαφος και στο νερό (Πιν. Π7). Η παρουσία τους στο μεσέντερο θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως «ευκαιριακή» εξαιτίας της παρουσίας τους μόνο σε ένα δείγμα αλλά και των χαμηλών συχνοτήτων τους. Παρολαυτά σύμφωνα με τη θεωρία της «σπάνιας βιόσφαιρας» (rare biosphere) (Sogin *et al.* 2006), δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανή προσφορά αυτών των σπάνιων φυλότυπων στο πεπτικό σύστημα του *N. norvegicus* ανάλογα με τις συνθήκες που θα μπορούσαν πιθανώς να ευνοήσουν την αύξηση τους σε άλλη χρονική στιγμή.

Η κάλυψη των βιβλιοθηκών (Σχ. Π1) όπως υπολογίστηκε με το δείκτη Good's C (Kemp & Aller 2004) ήταν ικανοποιητική και κυμάνθηκε από 77%-98%. Τα ποσοστά δείχνουν ότι ανιχνεύθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό της βακτηριακής ποικιλότητας σε κάθε δείγμα.

Οι δείκτες ποικιλότητας Simpson και Shannon έδωσαν αναμενόμενα αποτελέσματα ανάλογα με τα αποτελέσματα των βιβλιοθηκών (Σχ. 3.11, Πίν. Π9). Έδειξαν τη χαμηλή ποικιλότητα των δειγμάτων Se3 και D1 όπως αναμενόταν από την επικράτηση ενός και μόνο φυλότυπου. Αντίθετα όμως ο δείκτης Margalef έδειξε μέσους και όχι χαμηλούς βαθμούς ποικιλότητας για αυτά τα δείγματα. Αυτή

η ασυμφωνία οφείλεται στα διαφορετικά στοιχεία που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των δεικτών. Οι δείκτες Shannon και Simpson συνυπολογίζουν την αφθονία, τη συχνότητα αλλά και την ισοκατανομή των διαφορετικών φυλότυπων ενώ ο δείκτης Margalef χρησιμοποιεί μόνο τον αριθμό τους και δεν μπορεί να ανιχνεύσει αλλαγές στην ισοκατανομή τους (Hill *et al.* 2003). Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι ο δείκτης Margalef αργεί να σταθεροποιηθεί σε δείγματα με αυξανόμενο αριθμό κλώνων ενώ κάτι παρόμοιο δεν ισχύει στον ίδιο βαθμό για τους άλλους δείκτες. Σύνεπως στα δείγματα με ισχυρή επικράτηση ενός φυλότυπου (Se3, D1) και μελέτη μεγάλου αριθμού κλώνων (53 και 92 αντίστοιχα) προέκυψαν μέσες τιμές ποικιλότητας με το δείκτη Margalef αφού δε υπολογίστηκε η κατανομή των συχνοτήτων εμφάνισης των φυλότυπων μέσα στο δείγμα.

Η ανάλυση ομαδοποίησης βάσει των αποτελεσμάτων του δείκτη ομοιότητας Morisita (Σχ. 3.12) έδειξε τη μεγάλη ομοιότητα ανάμεσα στα δείγματα J11, Ag31 και O2, η οποία φαίνεται να καθορίζεται από την παρουσία φυλότυπων συγγενών με το *P. leiognathi*. Όλα τα υπόλοιπα δείγματα εμφανίζονται αρκετά απομακρυσμένα μεταξύ τους εφόσον σε καθένα από αυτά εντοπίστηκαν αρκετά διαφορετικοί επικρατείς φυλότυποι.

Συνολικά, οι περισσότεροι από τους φυλότυπους που εντοπίστηκαν σχετίζονταν είτε με τον πεπτικό σωλήνα θαλάσσιων ζώων είτε με τα φωτεινά τους όργανα. Συμπεραίνεται λοιπόν, από τις ιδιότητες των κοντινότερων συγγενών τους, ότι η πλειονότητα αυτών έχει τη δυνατότητα να προσκολλάται σε επιφάνειες και να εποικίζει με επιτυχία τον πεπτικό σωλήνα. Η παρουσία παρόμοιων φυλότυπων (>98%) σε διαφορετικούς μήνες με διαφορετικές

συχνότητες παρουσίας αποδεικνύει ότι αυτοί οι φυλότυποι έχουν τη δυνατότητα να είναι παρόντες καθόλη τη διάρκεια του χρόνου παρά τις εναλλασσόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (Σχ.4.1). Αυτό ενισχύεται ακόμα περισσότερο από την εμφάνιση των ίδιων επικρατών φυλότυπων σε όλους τους μήνες όπως φάνηκε από την αντιστοίχιση των μηκών των ITS με τα αποτελέσματα της ARISA (Σχ. 3.8). Η παρουσία αυτών των επαναλαμβανόμενων φυλότυπων δείχνει ότι αυτά τα βακτήρια μπορεί να αποτελούν μέλη κοινοτήτων με εξειδικευμένες λειτουργίες που μπορεί ακόμα και να συμμετέχουν σε αμιγώς συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις.

4.2. Εκτρεφόμενοι πληθυσμοί

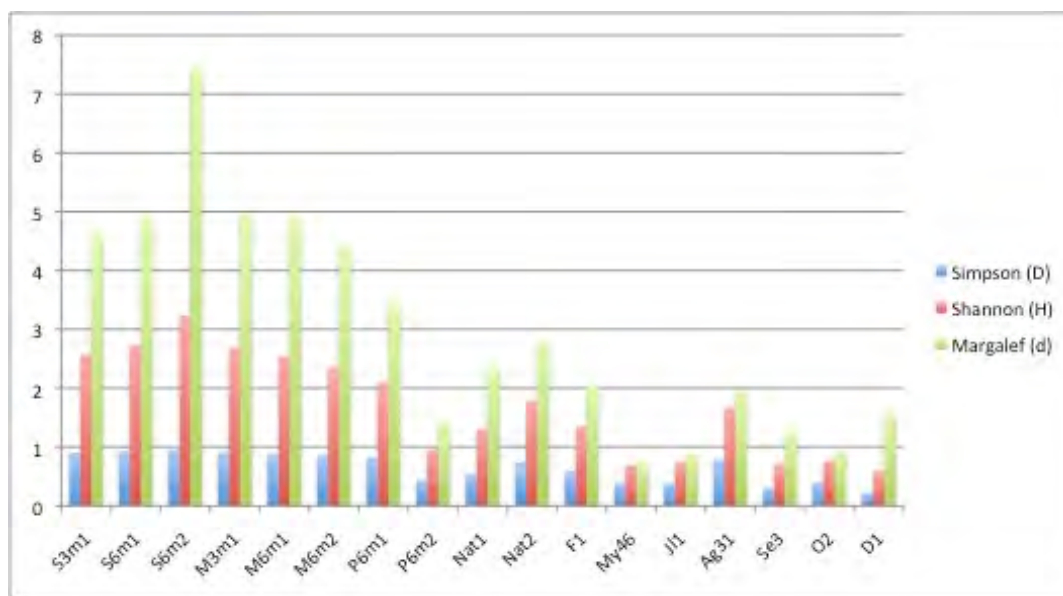
Σε αυτό το μέρος αναλύθηκαν οι διαφορές στις βακτηριακές κοινότητες του εντέρου σε εκτρεφόμενες καραβίδες *Nephrops norvegicus* μετά από παροχή διαφορετικών ειδών τροφών ή μετά από παραμονή σε ασιτία. Η στατιστική ανάλυση έδειξε την ύπαρξη δύο ομάδων εξαρτώμενων κυρίως από το αν είχε παρασχεθεί τροφή ή όχι. Η βακτηριακή ποικιλότητα των δειγμάτων της G1 (παροχή τροφής για έξι μήνες ή φυσικός πληθυσμός) ήταν χαμηλότερη από αυτή των δειγμάτων της G2 (ασιτία ή παροχή τροφής για τρεις μήνες) (Σχ. 3.17). Αυτή η διαφορά της βακτηριακής ποικιλότητας αποδόθηκε στην παροχή τροφής που τροφοδότησε τη συγκρότηση σταθερών κοινοτήτων με επικρατή βακτηριακά είδη στα μέλη της G1. Η υψηλή ποικιλότητα στα δείγματα της G2 αποδόθηκε είτε στην ασιτία που βρισκόντουσαν τα τρία από τα τέσσερα μέλη της ή στο ότι δεν είχε μεσολαβήσει αρκετός χρόνος από την έναρξη των εκτροφών για την

εδραίωση πιο σταθερών βακτηριακών κοινοτήτων (δείγμα M3m1). Η υψηλή βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου σε συνθήκες ασιτίας είναι ένα φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί και στις ακρίδες του είδους *Schistocerca gergaria* (Dillon *et al.* 2010). Το φαινόμενο αυτό είχε αποδοθεί στην προστασία που προσφέρει η αυξημένη βακτηριακή ποικιλότητα σε άτομα που παραμένουν σε ασιτία εμποδίζοντας την εγκατάσταση παθογόνων βακτηρίων.

Μελετώντας την ποικιλότητα στα δείγματα της G1 παρατηρήθηκε ότι εκτός από τα δείγματα Nat2 και P6m2 η επικράτηση συγκεκριμένων φυλότυπων δεν ξεπέρασε ποτέ το 30% (P6m1-12). Φάνηκε ότι δεν υπήρχε σημαντική επικράτηση κάποιου φυλότυπου όπως συνέβη με τα δείγματα των φυσικών πληθυσμών (βλ. § 3.1.2 και § 4.1) όπου οι επικρατούντες φυλότυποι εμφάνιζαν συχνότητες μεγαλύτερες από 58%.

Συνεπώς, παρατηρήθηκε ότι στα δείγματα των εκτρεφόμενων *N. norvegicus* οι βακτηριακές κοινότητες του εντέρου παρουσίασαν υψηλότερη ποικιλότητα από τους φυσικούς πληθυσμούς (Πίν. Π10, Π12, Σχ. 4.3). Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από την αργή διαδικασία εγκαθίδρυσης των βακτηριακών κοινοτήτων ως αποτέλεσμα των χαμηλών επιπέδων κατανάλωσης τροφής (0.049-0.069 mg_{ξηρού βάρους}/g_{σωμ.βάρους}/day) που παρατηρήθηκαν (αδημοσίευτα δεδομένα) συγκριτικά με προηγούμενα πειράματα (0.025 g/g_{σωμ.βάρους}/day) (Sarda & Valladares 1990).

Συγκρίνοντας την βακτηριακή ποικιλότητα ανάμεσα στα δείγματα της G1 παρατηρήθηκε ότι στα άτομα που διατράφηκαν με σύμπηκτα εντοπίστηκε χαμηλότερη βακτηριακή ποικιλότητα από τα άτομα που διατράφηκαν με μύδια (Σχ. 4.3).



Σχήμα 4.3: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των δεικτών ποικιλότητας για τους φυσικούς και τους εκτρεφόμενους πληθυσμούς

Παράλληλες μελέτες στη φυσιολογία και στην ιστολογία του ηπατοπαγκρέατος των ατόμων που μελετήθηκαν (αδημοσίευτα δεδομένα) έδειξαν ότι τα άτομα που διατράφηκαν με μύδια ήταν σε καλύτερη διατροφική κατάσταση συγκριτικά με τα υπόλοιπα. Αντίστοιχα οι διαδικασίες της πέψης φάνηκαν πιο αποδοτικές στα ίδια άτομα. Ο ηπατοσωματικός δείκτης ($\text{βάρος}_{\text{ηπατοπάγκρεας}}/\text{βάρος}_{\text{σώμα}}$) παρουσίασε μεγαλύτερες τιμές στα δείγματα που διατράφηκαν με μύδια σχετικά με αυτά που διατράφηκαν με σύμπηκτα, ενώ η αναλογία της επιφάνειας του αυλού προς τη συνολική επιφάνεια των σωληνίσκων του πεπτικού αδένου ήταν μικρότερη στα δείγματα των μυδιών (αδημοσίευτα δεδομένα). Τα δύο αυτά χαρακτηριστικά σύμφωνα με αντίστοιχα πειράματα εκτροφής που είχαν πραγματοποιηθεί στον αστακό *Jasus edwardsii* (Simon 2009) είναι ενδεικτικά καλύτερης πέψης της τροφής, ενώ τα αντίθετα αποτελέσματα για

τα άτομα που διατράφηκαν με σύμπηκτα είναι ενδεικτικά μεγαλύτερης προσπάθειας για πέψη στο ηπατοπάγκρεας αλλά και μεγαλύτερης ποσότητας άπεπτης τροφής που περνάει το ηπατοπάγκρεας και καταλήγει στο έντερο (Brunet *et al.* 1994). Η κατάληξη περισσότερων άπεπτων συστατικών στο έντερο των ατόμων που διατράφηκαν με σύμπηκτα και η άμεση απόκριση των βακτηριακών κοινοτήτων ακόμα και σε μικρές διαφορές παροχής τροφής, μπορεί να εξηγήσει τις πιο εξειδικευμένες βακτηριακές κοινότητες (χαμηλότερη ποικιλότητα) που εντοπίστηκαν στα αντίστοιχα δείγματα που αναλύθηκαν. Πέρα από αυτές τις διαφορές, στο συγκεκριμένο πείραμα δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην επιβίωση, ούτε στατιστικά σημαντικές διαφορές στην κατανάλωση τροφής ανάλογα με το είδος τροφής που καταναλώθηκε.

Οι φυλότυποι που ανήκουν στο *Photobacterium leiognathi* και είναι παρόμοιοι (98%-99%) με αυτούς που είχαν εντοπιστεί στους φυσικούς πληθυσμούς του *N. norvegicus* (βλ § 3.1.2) ήταν παρόντες σε όλα τα δείγματα της G1 τα οποία είχαν καταναλώσει σύμπηκτα και μύδια για έξι μήνες, δείχνοντας ότι το *P. leiognathi* μπορεί να εγκατασταθεί στο έντερο εκτρεφόμενων πληθυσμών όχι άμεσα αλλά μετά από κάποιο χρονικό διάστημα. Επίσης η ανάλυση αντιστοίχισης (Σχ. 3.19) έδειξε την επίδραση της παρουσίας των συγκεκριμένων φυλότυπων στην κατανομή των δειγμάτων της G1.

Όπως προαναφέρθηκε (βλ. § 4.1) η πλειονότητα των στελεχών του *P. leiognathi* διαθέτουν χιτινολυτικές και λιπολυτικές ιδιότητες, και πρόσφατα το πρώτο γονιδίωμα του είδους έδειξε την ύπαρξη πολλών γονιδίων που κωδικοποιούν για χιτινάσες, λιπάσες και πρωτεάσες. Συνεπώς είναι πιθανό οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί να βοηθούν το *N. norvegicus* στη πέψη

αντίστοιχων ουσιών και στους εκτρεφόμενους πληθυσμούς. Η παρουσία του *P. leiognathi* ενισχύεται από την ικανότητα του να αυξάνεται σε N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνη και γλυκερόλη τα οποία, αποτελώντας μονομερές της χιτίνης και προϊόν της διάσπασης των λιπιδίων αντίστοιχα, ενδέχεται να εντοπίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο μεσέντερο των εκτρεφόμενων πληθυσμών. Επιπρόσθετα έχει βρεθεί ότι το *P. leiognathi* έχει την ικανότητα να αυξάνεται σε προλίνη (Thyssen & Ollevier 2004). Το συγκεκριμένο αμινοξύ έχει βρεθεί σε αφθονία και στα δύο είδη τροφής που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα (Mente 2010). Η βέλτιστη θερμοκρασία αύξησης του *P. leiognathi* είναι οι 30 °C (Thyssen & Ollevier 2004). Αυτό δείχνει ότι η αύξησή του στο μεσέντερο του *Nephrops norvegicus* (10 °C-12 °C) δεν είναι ευκαιριακή αλλά πιθανώς τροφοδοτείται από άλλους παράγοντες όπως η παροχή θρεπτικών συστατικών που την ευνοούν. Παράλληλα ενδέχεται να πρόκειται για διαφορετικό στέλεχος του *P. leiognathi* που παρουσιάζει χαμηλότερη βέλτιστη θερμοκρασία αύξησης.

Παρόμοιοι φυλότυποι, συνδεδεμένοι με το *P. leiognathi*, ήταν επικρατείς (73%) στο δείγμα P6m2 που είχε πραγματοποιήσει έκδυση δύο με τρεις ημέρες πριν από τη θανάτωση και τη δειγματοληψία του πεπτικού σωλήνα. Κατά την έκδυση εκτός από τον εξωσκελετό αποβάλλεται και η επιστρώση από χιτίνη που καλύπτει την επιφάνεια του οπισθέντερου (Conklin 1995) και έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της βακτηριακής αφθονίας του οπισθέντερου (Crawford *et al.* 1983). Η επίδραση όμως των βακτηρίων του μεσέντερου στη διαδικασία της έκδυσης παραμένει απροσδιόριστη. Κάποιες μελέτες έχουν δείξει την αύξηση της ενεργότητας των χιτινασών κατά τη μετεκδυτική περίοδο (δύο με τρεις μέρες μετά την έκδυση) (Gulmann 2004) και η δράση τους έχει συνδεθεί με τη βοήθεια

στην απελευθέρωση του εκδύματος (Lustigman *et al.* 1996, Vega-Villasante *et al.* 1999). Σε αυτήν την περίπτωση οι πιθανές χιτινολυτικές ιδιότητες των συγγενών ως προς το *P. leiognathi* φυλότυπων θα μπορούσαν να εξηγήσουν την επικράτησή του στο μετεκδυτικό δείγμα P6m2.

Φυλότυποι του γένους *Arcobacter* επικράτησαν κυρίως στο μεσέντερο των ατόμων που είχαν διατραφεί με μύδια (Πίν. 3.5, Σχ. 3.13, 3.14). Ο κοντινότερος συγγενής τους είχε απομονωθεί από το μανδύα στρειδιών (Schulze *et al.* 2006). Το γένος *Arcobacter* οξειδώνει υδρόθειο προς παραγωγή θείου (Vandamme *et al.* 2004) ενώ κάποια στελέχη του επιτελούν απονιτροποίηση (Heylen *et al.* 2006). Αντιπρόσωποι του γένους έχουν εντοπιστεί στο πεπτικό σύστημα του ανθρώπου και άλλων ζώων, στο θαλάσσιο ίζημα (Huber *et al.* 2006, Schmidtova *et al.* 2009) σε ενεργά απόβλητα και σε εκτροφεία στρειδιών (Schulze *et al.* 2006). Σε άλλα καρκινοειδή αντιπρόσωποι των ε-Proteobacteria έχουν εντοπιστεί στο μεσέντερο της γαρίδας *Rimicaris exoculata* που εντοπίζεται σε υδροθερμικές πηγές (Zbinden & Cambon-Bonavita 2003, Durand *et al.* 2010) και η παρουσία των συγκεκριμένων βακτηρίων είχε αποδοθεί σε προσαρμογή της γαρίδας στις επικρατούσες στην περιοχή γεωχημικές συνθήκες (Zbinden *et al.* 2008). Η παρουσία των συγκεκριμένων φυλότυπων θα μπορούσε να αποδοθεί στην πέψη μέρους των πλούσιων σε πρωτεΐνες μυδιών που χρησιμοποιήθηκαν ως τροφή και να συνδεθεί με το μεταβολισμό του αζώτου και τον κύκλο του θείου. Αντίστοιχα, σε προηγούμενες μελέτες (Heisterkamp *et al.* 2010), έντονη απονιτροποίηση είχε παρατηρηθεί στο έντερο της υπό καλλιέργεια γαρίδας *Litopenaeus vannamei*, χωρίς όμως να εντοπιστούν τα βακτήρια που επιτελούσαν τη συγκεκριμένη διαδικασία.

Οι φυλότυποι του γένους *Shewanella* (Πίν. 3.5) είχαν ως πλησιέστερο συγγενή το στέλεχος *Shewanella* sp. E5050-7 που έχει τη δυνατότητα παραγωγής πρωτεασών (Zhou *et al.* 2009). Πέρα από την πιθανή πρωτεϊνολυτική τους ικανότητα στο μεσέντερο του *N. norvegicus* αυτοί οι φυλότυποι ήταν συγγενείς (>98%) με τον φυλότυπο D1-674. Αυτός ο φυλότυπος ανιχνεύτηκε στο δείγμα του Δεκεμβρίου (D1) από τους φυσικούς πληθυσμούς. (βλ. § 3.1.2) αλλά και στα αποτελέσματα της ARISA μετά από την αναγνώριση των μηκών των ITS (Σχ. 3.8) δείχνοντας ότι αποτελεί μέλος μίας σταθερής κοινότητας του πεπτικού συστήματος.

Οι φυλότυποι που ανήκουν στους Mollicutes και στην τάξη Entomoplasmatales εμφανίστηκαν σε υψηλές αφθονίες στα άτομα που τράφηκαν με μύδια για έξι μήνες ενώ είχαν χαμηλότερες συχνότητες σε άλλα δείγματα. Φυλότυποι από την ίδια ευρύτερη ομάδα έχουν εμφανιστεί στο έντερο (Zbinden & Cambon-Bonavita 2003, Bano *et al.* 2007, Demiri *et al.* 2009, Durand *et al.* 2010) και στο ηπατοπάγκρεας (Fraune & Zimmer 2008) άλλων ασπόνδυλων και σπονδυλόζων συμπεριλαμβανομένων και των φυσικών πληθυσμών του *N. norvegicus* (βλ. § 3.1.2, Σχ. 4.1) με άγνωστες λειτουργίες. Το ακαλλιέργητο *candidatus Hepatoplasma* αποτελεί έναν από τους πλησιέστερους συγγενείς των φυλότυπων που ανιχνεύτηκαν σε αυτήν τη μελέτη και έχει συνδεθεί με υψηλότερους βαθμούς επιβίωσης των ξενιστών του στις περιπτώσεις που παρέχεται τροφή χαμηλής ποιότητας (Fraune & Zimmer 2008). Η χαμηλή ομοιότητα (< 93%) όμως των φυλότυπων που ανιχνεύτηκαν στο *Nephrops* με το *candidatus Hepatoplasma* υποδεικνύει ότι μπορεί να ανήκουν ακόμα και σε διαφορετικά γένη. Τα υψηλά επίπεδα ποικιλότητας που παρατηρούνται μέσα

στην τάξη των Entomoplasmatales υποδεικνύουν ότι στη συγκεκριμένη μελέτη μία αντίστοιχη σχέση των φυλότυπων που εντοπίστηκαν με υψηλότερους ρυθμούς επιβίωσης δεν μπορεί να υποτεθεί.

Σχετικά με τους συγγενείς των φυλότυπων που ανήκουν στο γένος *Defluvicoccus* η παρουσία τους στο πεπτικό σύστημα του κινέζικου καβουριού, *Eriocheir sinensis*, δεν είχε συσχετιστεί με κάποια συγκεκριμένη λειτουργία ενώ το συγκεκριμένο γένος έχει εντοπιστεί σε πληθώρα ενδιαιτημάτων όπως ιζήματα βαθιάς θάλασσας (Li *et al.* 1999), ενεργά απόβλητα (Nittami *et al.* 2009), σε υγρότοπους (forested wetlands) (Brofft *et al.* 2002) και σε σπόγγους του είδους *Aplysina aerophoba* (Hentschel *et al.* 2002). Παρολαυτά σε καμία από τις παραπάνω μελέτες δεν είχαν πραγματοποιηθεί έρευνες για το ρόλο του στα παραπάνω ενδιαιτήματα. Στην παρούσα εργασία φάνηκε ότι οι συνθήκες των εκτροφών δεν ευνόησαν την ανάπτυξη και την περαιτέρω εγκατάσταση του στο πεπτικό σύστημα του *N. Norvegicus*.

Αντιπρόσωποι του γένους *Colwellia* έχουν εντοπιστεί κυρίως σε θαλάσσια περιβάλλοντα στην υδάτινη στήλη (Urakawa *et al.* 1999) ενώ σχετίζονται και με θαλάσσια δίθυρα (Fujiwara *et al.* 2010). Αποτελούν ψυχρόφιλα ετερότροφα βακτήρια με ικανότητα διάσπασης της ζελατίνης και του αμύλου και αναγωγής των νιτρικών. Οι αντιπρόσωποι του γένους *Colwellia* φάνηκε ότι διατήρησαν σταθερά τα ποσοστά της παρουσίας τους στα περισσότερα από τα δείγματα χωρίς να επηρεάζονται θετικά ή αρνητικά από τις συνθήκες των εκτροφών.

Τα δείγματα που παρέμειναν σε ασιτία παρουσίασαν υψηλή βακτηριακή ποικιλότητα χωρίς να διαφαίνεται κάποιο χρονικό πρότυπο ή κάποια χαρακτηριστική επικρατής ομάδα. Οι φυλότυποι που εντοπίστηκαν στα δείγματα

της ασιτίας ομαδοποιήθηκαν κυρίως στα α-Proteobacteria και παρουσίασαν υψηλές ομοιότητες με φυλότυπους που εντοπίστηκαν στα δείγματα από τα ενυδρεία (βλ. § 3.4.2, Σχ.3.23), υποδεικνύοντας μία πιθανή επίδραση αυτών των βακτηριακών κοινοτήτων από το νερό των ενυδρείων. Η επίδραση αυτή φάνηκε με την χρήση τρισδιάστατου NMDS που απεικόνισε στο χώρο τη σχέση της βακτηριακής ποικιλότητας των δειγμάτων του νερού με τα δείγματα της ασιτίας (Σχ. 3.20). Τρεις άλλοι φυλότυποι των δειγμάτων της ασιτίας (Σχ. 3.13, 3.14) έμοιαζαν (98%-99%) με τους φυλότυπους των γενών *Photobacterium* και *Shewanella* που εντοπίστηκαν στα δείγματα M6m και P6m. Παρόλα αυτά η παρουσία τους στα δείγματα της ασιτίας ήταν χαμηλή (<7%) και περιστασιακή.

Η κάλυψη των βιβλιοθηκών κλώνων στα εκτρεφόμενα άτομα κυμάνθηκε στα περισσότερα δείγματα από 62% μέχρι 91%, με μόνο ένα δείγμα να έχει κάλυψη 52% (Σχ. Π2). Παρόλο που το ποσοστό κάλυψης για κάποιες βιβλιοθήκες ήταν σχετικά χαμηλό (<70%), τα αποτελέσματα των μεμονωμένων φυλότυπων (σύνολο επικρατών φυλότυπων >50%, Πιν.3.5) σε συνδυασμό με τις ασυμπτωτικές καμπύλες δείχνουν ότι θα ήταν δύσκολο να ανιχνευθούν περαιτέρω επικρατείς φυλότυποι με τη μελέτη περισσότερων κλώνων.

Γενικά, αν και δεν υπάρχουν ξεκάθαρες διαφορές στις βακτηριακές κοινότητες ανάλογα με το είδος της τροφής, φαίνεται ότι η παρουσία της τροφοδοτεί την εγκαθίδρυση σταθερών βακτηριακών κοινοτήτων. Οι βακτηριακές κοινότητες του μεσέντερου πιθανότατα διαταράσσονται μετά τη μεταφορά στα ενυδρεία εκτροφής εφόσον οι κοινότητες των δειγμάτων σε ασιτία καθώς και αυτού που τράφηκε με μύδια για τρεις μήνες παρουσίασαν πολύ

υψηλότερη ποικιλότητα από αυτή που εντοπίστηκε στους φυσικούς πληθυσμούς (Σχ. 4.3).

Για την ανίχνευση μικροοργανισμών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως προβιοτικά οι φυλότυποι που εντοπίστηκαν ελέγχθηκαν ως προς τα κριτήρια που παρουσιάστηκαν παραπάνω (βλ § 1.7). Συνολικά και από τα δύο μέρη της μελέτης εντοπίστηκαν φυλότυποι με παρουσία στους φυσικούς και στους εκτρεφόμενους πληθυσμούς. Οι φυλότυποι αυτοί ομαδοποιήθηκαν στα γένη *Photobacterium*, *Shewanella*, *Pseudoalteromonas*, *Colwellia*, *Defluviicoccus* και *candidatus Hepatoplasma* και στο υποψήφιο φύλο CK-1C4-19. Η παρουσία τους σε υγιείς φυσικούς και εκτρεφόμενους πληθυσμούς δείχνει ότι δεν είναι παθογόνοι ή τοξικοί και ότι έχουν τη δυνατότητα επιβίωσης και εποίκισης του πεπτικού σωλήνα του ξενιστή. Από τους παραπάνω φυλότυπους, η επικράτηση αυτών που ανήκουν στα *Photobacterium* sp. και *Shewanella* sp. και αυτών που ανήκουν στην τάξη Entomoplasmatales στα δείγματα της G1, δείχνει ότι ενισχύονται από την παροχή τροφής και είναι σταθεροί σε συνθήκες υδατοκαλλιέργειών. Αυτοί οι φυλότυποι αν και πιθανότατα εδρεύοντες δείχνουν χαμηλή και περιστασιακή παρουσία στα δείγματα της G2 και σχηματίζουν πιο σταθερές κοινότητες έπειτα από έξι μήνες θρέψης.

Από τα χαρακτηριστικά όλων των παραπάνω φυλότυπων φαίνεται ότι το πολλά υποσχόμενο είδος για τη χρήση τους ως προβιοτικό είναι το *P. leiognathi*. Πέρα από τα κριτήρια που προαναφέρθηκαν, τα δεδομένα για τις φυσιολογικές δυνατότητές του (Farmer & Hickmann Brenner 2006), καθώς επίσης και η *in silico* ανάλυση του γονιδιώματός του (NZ_BACE000000000) δείχνουν την ύπαρξη λιπολυτικών, πρωτεϊνολυτικών και χιτινολυτικών δυνατοτήτων που θα

μπορούσαν να βοηθήσουν το *N. Norvegicus* στην καλύτερη πεπτική λειτουργία και επιβίωση.

4.3. Παρεχόμενες τροφές

Η ανάλυση της βακτηριακής ποικιλότητας των μυδιών έδειξε την ύπαρξη κοινών ομάδων με προηγούμενη μελέτη που είχε πραγματοποιηθεί για την ποικιλότητα του είδους *Mytilus galloprovincialis* (Cavallo *et al.* 2009). Και στις δύο περιπτώσεις επικράτησαν αντιπρόσωποι του γένους *Aeromonas* και ανιχνεύτηκαν αντιπρόσωποι του γένους *Vibrio* και των *Flavobacteria*. Η βακτηριακή ποικιλότητα ήταν μικρότερη από το αναμενόμενο, αλλά είναι πιθανό η άγνωστη διάρκεια κατάψυξη των μυδιών του εμπορίου να είχε οδηγήσει σε καταστροφή μεγάλου μέρους των βακτηρίων. Σε αντίστοιχους λόγους, πιθανότατα οφείλεται η μη ανίχνευση κοινών φυλότυπων με τα δείγματα των *Nephrops norvegicus* και του νερού των ενυδρείων. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί ο φυλότυπος Mus-3 στενός συγγενής του οποίου εμφανίστηκε στα δείγματα του νερού (wt4-26).

Τα σύμψηκτα παρουσίασαν μεγάλο αριθμό αντιπροσώπων του φύλου Firmicutes και πιο συγκεκριμένα αντιπροσώπους των γενών *Lactobacillus* και *Oceanobacillus*. Αυτά τα δύο γένη αποτελούν μέλη των οξυγαλακτικών βακτηρίων και έχουν την ιδιότητα παραγωγής γαλακτικού οξέος από το μεταβολισμό των υδατανθράκων. Βακτήρια του γένους *Lactobacillus* εντοπίζονται σε μεγάλες ποσότητες στο πεπτικό σύστημα των ανθρώπων και άλλων ζώων και τα

τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται και πολύ συχνά ως προβιοτικά (Hammes & Hertel 2006).

Η παρουσία προβιοτικών στα σύμπηκτα δεν ήταν αναμενόμενη εφόσον κάτι τέτοιο δεν αναφερόταν στη σύσταση από τους κατασκευαστές. Επομένως η παρουσία των συγκεκριμένων οξυγαλακτικών βακτηρίων στα σύμπηκτα οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στις συνθήκες συντήρησης που ευνοούσαν την αύξηση τους. Η αποθήκευση στους 4⁰ C σε συνδυασμό με το σχετικά χαμηλό pH, από τη διαδικασία της ζύμωσης και τα συστατικά των σύμπηκτων που χρησιμοποιήθηκαν (Πίν. Π6) πιθανότατα ευνόησε την ανάπτυξή τους.

Συνολικά, από την ανάλυση των τροφών που χρησιμοποιήθηκαν, συμπεραίνεται η έλλειψη επίδρασης της βακτηριακής τους ποικιλότητας στη βακτηριακή ποικιλότητα του πεπτικού συστήματος του *N. norvegicus* εφόσον δεν ανιχνεύτηκαν κοινοί φυλότυποι. Στην περίπτωση των μυδιών αυτό οφείλεται στη μη βιωσιμότητα της πλειονότητας των βακτηρίων μετά από τη συντήρηση των μυδιών στην κατάψυξη. Στην περίπτωση των σύμπηκτων η έλλειψη κοινών φυλότυπων οφείλεται στην ανικανότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων των σύμπηκτων να αναπτυχθούν στο πεπτικό σύστημα του *N. norvegicus*, αλλά και σε πιθανό ανταγωνισμό με άλλες σταθερές βακτηριακές κοινότητες που εδρεύουν στο μεσέντερο του *N. norvegicus* όπως αποδείχθηκε από αυτή τη μελέτη.

4.4. Νερό ενυδρείων

Σε αυτό το τμήμα αναλύθηκε ο αριθμός των βακτηρίων και η βακτηριακή ποικιλότητα σε τρία δείγματα νερού από τα ενυδρεία εκτροφής κατά τη διάρκεια

των δειγματοληψιών. Ο αριθμός των προκαρυωτικών κυττάρων όπως προσδιορίστηκε από τις DAPI μετρήσεις είναι κοντά στις μέσες συγκεντρώσεις της τάξης των 10^6 κύτταρα/ml που ισχύουν για το θαλασσινό νερό. Η μείωση που πραγματοποιήθηκε στον αριθμό των προκαρυωτικών κυττάρων μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης δειγματοληψίας δεν μπορεί να εξηγηθεί με τα υπάρχοντα δεδομένα. Βασικοί λόγοι για τη μείωση των βακτηρίων είναι η θήρευση από πρωτόζωα και η δράση των ιών, αλλά στην παρούσα μελέτη κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε. Η σημαντική αύξηση από τη δεύτερη στην τρίτη δειγματοληψία είναι πιθανό να οφείλεται στην έλλειψη θηρευτών και στις ευνοϊκές για τα βακτήρια συνθήκες μέσα στα ενυδρεία, όπως οι σταθερές θερμοκρασίες που ευνοούν συγκεκριμένα είδη αλλά και η συνεχής αιώρηση και απόθεση οργανικού υλικού από τις τροφές μέσα στα ενυδρεία.

Η βακτηριακή ποικιλότητα κυμάνθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα από τα αναμενόμενα. Από προηγούμενες μελέτες (Curtis *et al.* 2002) έχει υπολογιστεί ότι η προκαρυωτική ποικιλότητα στο θαλασσινό νερό κυμαίνεται κοντά στις 160 ομάδες/ml ενώ στην παρούσα μελέτη εντοπίστηκαν 14, 18 και 13 φυλότυποι (επίπεδο είδους) στα δείγματα wt2 (1 l), wt3 (0,5 l) και wt4 (0,8 l) αντίστοιχα. Αυτή η μείωση της ποικιλότητας είναι πιθανό να οφείλεται στις σταθερές συνθήκες που επικρατούσαν στα ενυδρεία και προωθούσαν την αύξηση συγκεκριμένων βακτηριακών ομάδων. Επιπρόσθετα, η έλλειψη θηρευτών αποτέλεσε έναν επιπρόσθετο παράγοντα για τη μείωση της βακτηριακής ποικιλότητας, καθώς όπως έχει φανεί από προηγούμενες μελέτες η θήρευση προάγει την ποικιλότητα των βακτηριακών κοινοτήτων (Kirchman *et al.* 2010)

Οι επικρατείς φυλότυποι και στα τρία δείγματα παρουσίασαν κοντινότερους συγγενείς (99%) που είχαν εντοπιστεί να αλληλεπιδρούν με διάτομα (wt2), θαλάσσια δινομαστιγωτά (wt3) ή κρυπτοφύκη (wt4). Από τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις κατά τη διάρκεια των μετρήσεων δεν εντοπίστηκαν οργανισμοί αντίστοιχων μεγεθών (>3 μm) στα δείγματα, πιθανότατα εξαιτίας της έλλειψης φωτός αλλά και από τη λειτουργία του μηχανικού φίλτρου των ενυδρείων που τους κατακρατούσε.

Οι δεκαπέντε μέρες που μεσολάβησαν (βλ. § 2.10.1) από την οριστική πλήρωση των ενυδρείων μέχρι την πρώτη δειγματοληψία και οι συνθήκες σκότους που επικράτησαν σε αυτήν την περίοδο πιθανότατα ήταν αρκετές για την δραστική μείωση φωτοσυνθετικών οργανισμών όπως τα διάτομα. Η επικράτηση των φυλότυπων που ανήκουν στο γένος *Kordia* (Οικ. Flavobacteriaceae) μπορεί να οφείλεται στις φυκολυτικές ιδιότητες των Bacteroidetes που συνετέλεσαν στην αποικοδόμηση των διατόμων, στην ικανότητά τους για την αποικοδόμηση του διαλυμένου οργανικού υλικού (Dissolved Organic Matter) (Reichenbach & Weeks 1981, Pinhassi *et al.* 2004) αλλά και στις πιθανές ιδιότητες που έχουν αναπτύξει μέλη των Flavobacteriaceae για την αποφυγή της θήρευσης από πρωτόζωα όπως έχει προταθεί στο παρελθόν (Lebaron *et al.* 2001). Ο συγκεκριμένος φυλότυπος δεν παρουσιάστηκε σε κανένα άλλο δείγμα.

Στην επόμενη δειγματοληψία (wt3) ο επικρατών φυλότυπος ανήκε στο γένος *Phaeobacter* και ο κοντινότερος συγγενής του είχε βρεθεί σε συσχέτιση με ανθίσεις του είδους *Alexandrium tamarense*. Το γένος *Phaeobacter* είναι ετερότροφο και υποχρεωτικά αερόβιο. Το πιο κοντινό χαρακτηρισμένο είδος (99%) είναι το *Phaeobacter arcticus* που έχει απομονωθεί από τις ακτές της

αρκτηκής το οποίο πέρα από τη δυνατότητα αύξησης σε N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη δεν παρουσιάζει κάποιο άλλο χαρακτηριστικό που να δικαιολογεί τη συνεχή παρουσία του στα ενυδρεία (Zhang *et al.* 2008). Οι άριστες για το είδος συνθήκες θερμοκρασίας και αλατότητας, η απουσία θηρευτών και η υποχώρηση του επικρατούς φυλοτύπου του wt2 μάλλον οδήγησαν στην επικράτησή του σε αυτό το χρονικό σημείο.

Ο κοντινότερος συγγενής του επικρατούς φυλότυπου στο δείγμα wt4 ομαδοποιήθηκε στο γένος *Marivita*. Παρά τη σχέση του συγκεκριμένου βακτηρίου με καλλιέργειες κρυπτοφυκών (Hwang *et al.* 2001), στη συγκεκριμένη περίπτωση όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, δεν εντοπίστηκαν αντιστοιχοί οργανισμοί στις μικροσκοπικές παρατηρήσεις. Από την άποψη της οικοφυσιολογίας ο συγκεκριμένος φυλότυπος θα μπορούσε να προσφέρει στο ενυδρείο εξαιτίας των λιπολυτικών ιδιοτήτων που πιθανώς διαθέτει όπως φαίνεται από τον κοντινότερο συγγενή του (Hwang *et al.* 2001). Παρόλη τη λειτουργία του φίλτρου των ενυδρείων η προσθήκη των σύμπληκτων για μεγάλο χρονικό διάστημα είχε ανεβάσει ιδιαίτερα τη συγκέντρωση λιπαρών ουσιών στο νερό, κάτι που ήταν ορατό στο τελευταίο στάδιο του πειράματος (προσωπική παρατήρηση).

Αξιοσημείωτη είναι η παρουσία του δεύτερου επικρατέστερου φυλότυπου (wt4-26) που ομαδοποιήθηκε στο γένος *Hoeflea*. Παρόμοιος φυλότυπος εντοπίστηκε στη φυλογεντική ανάλυση των μυδιών που χρησιμοποιήθηκαν για εκτροφές. Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός έχει βρεθεί σε συσχέτιση με θαλάσσιους οργανισμούς όπως ασκίδια και σπόγγους και είναι πιθανό η παρουσία του στο νερό να προέρχεται από την εξάμηνη και πλέον προσθήκη μυδιών μέσα στα ενυδρεία.

Συνολικά οι φυλότυποι που εντοπίστηκαν στα δείγματα του νερού (Πίν. Π14) σχετίζονται με ομάδες βακτηρίων με έντονη παρουσία σε δεξαμενές θαλασσινού νερού με τα α-Proteobacteria και τους Bacteroidetes να αποτελούν τις επικρατείς ομάδες όπως έχει επισημανθεί και σε προηγούμενες μελέτες. Αντίστοιχα, οι υπόλοιποι φυλότυποι που εμφανίστηκαν σε χαμηλότερες συχνότητες όπως αντιπρόσωποι των γενών *Polaribacter*, *Psychroserpens* και *Alteromonas*, συμφωνούν με παλαιότερες έρευνες (Lebaron *et al.* 2001).

Οι μελέτες που αναφέρθηκαν παραπάνω μελετούν την πορεία των βακτηριακών κοινοτήτων σε μεσοκόσμους θαλασσινού νερού εξάγοντας συμπεράσματα για τους ρυθμούς της θήρευσης σε επίπεδο ωρών ή ημερών. Το χρονικό εύρος της συγκεκριμένης εργασίας κινήθηκε στο επίπεδο των πέντε μηνών με αποτέλεσμα τα συμπεράσματα να μην είναι συγκρίσιμα. Επιπλέον η έλλειψη θηρευτών αποτελεί ανασταλατικό παράγοντα για τον έλεγχο του μεγέθους των βακτηριακών κοινοτήτων οι οποίες ελέγχονται κυρίως από την παροχή θρεπτικών στοιχείων. Συνολικά, τα αποτελέσματα της βακτηριακής ποικιλότητας των δειγμάτων του νερού, αποδεικνύουν την ύπαρξη συγκεκριμένων κοινοτήτων μέσα στο κλειστό κύκλωμα, οι οποίες παρουσιάζουν χρονικές διακυμάνσεις ως προς τις συχνότητες των φυλότυπων τους (Σχ. 3.23, 3.24, 3.25).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Για πρώτη φορά μελετήθηκε η βακτηριακή ποικιλότητα του πεπτικού συστήματος της καραβίδας *Nephrops norvegicus* σε φυσικούς και εκτρεφόμενους πληθυσμούς. Ανιχνεύθηκαν οι παράγοντες καθορισμού της ποικιλότητας και οι επικρατείς φυλότυποι στα διαφορετικά δείγματα. Μελετήθηκε η ύπαρξη κοινών φυλότυπων ανάμεσα σε φυσικούς και εκτρεφόμενους πληθυσμούς, για τους οποίους εξετάστηκε αν και κατά πόσο πληρούν τις προϋποθέσεις να χρησιμοποιηθούν ως προβιοτικά σε μελλοντικές προσπάθειες εκτροφής του είδους.

Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους στόχους που τέθηκαν στην παρούσα μελέτη (βλ. § 1.8), η μελέτη της βακτηριακής μικροποικιλότητας και η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξαν την επίδραση της εποχής συλλογής στη σύνθεση των βακτηριακών κοινοτήτων του μεσέντερου σε αντίθεση με τους άλλους παράγοντες που εξετάστηκαν (φύλο, βάρος, κλπ.) οι οποίοι δεν είχαν καμία επίδραση. Η εποχή συλλογής, βάσει παλαιότερων μελετών, συσχετίστηκε έμμεσα με την διαθεσιμότητα τροφής στο ενδιαίτημα του *N. norvegicus*, δείχνοντας την πιθανή επίδραση της τροφής στη βακτηριακή ποικιλότητα του μεσέντερου του *N. norvegicus*.

Η φυλογενετική ανάλυση των φυσικών πληθυσμών σε μηνιαίο επίπεδο έδειξε την ύπαρξη σταθερών βακτηριακών κοινοτήτων με χαμηλή ποικιλότητα και παρουσία επικρατών φυλότυπων με υψηλές συχνότητες εμφάνισης (>58%). Οι επικρατείς φυλότυποι αποτελούνταν από αντιπροσώπους των γενών

Pseudoalteromonas, *Psychrobacter* και *Photobacterium* και από αντιπροσώπους των Mollicutes και του υποψήφιου φύλου CK_1C4-19.

Η μελέτη της βακτηριακής ποικιλότητας του μεσέντερου του *N. norvegicus* υπό συνθήκες εκτροφής απέδειξε την επίδραση της παροχής τροφής στη διαμόρφωση των βακτηριακών κοινοτήτων. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε την παρουσία δύο ομάδων ανάλογα με το αν είχε παρασχεθεί τροφή ή όχι. Τα δείγματα στα οποία είχε παρασχεθεί τροφή παρουσίασαν πιο σταθερές βακτηριακές κοινότητες με χαμηλότερη ποικιλότητα, ενώ σε όλα, εντοπίστηκαν ως επικρατείς, φυλότυποι που ανήκαν στο είδος *Photobacterium leiognathi*. Αντίθετα τα δείγματα της ασιτίας και το δείγμα που είχε τραφεί μόνο για τρεις μήνες σχημάτισαν μία άλλη ομάδα με υψηλότερη βακτηριακή ποικιλότητα η οποία φάνηκε να επηρεάζεται από την βακτηριακή ποικιλότητα του νερού των ενυδρείων.

Ο έλεγχος των κριτηρίων για τη χρήση μικροοργανισμών ως προβιοτικά ανέδειξε το *Photobacterium leiognathi* ως το καταλληλότερο υποψήφιο είδος για προβιοτική χρήση σε μελλοντικές προσπάθειες εμπορικής εκτροφής του *N. norvegicus*. Η συμβιωτική αυτή σχέση που αναδείχτηκε από την παρούσα έρευνα, θέτει τις βάσεις για μελλοντικές μελέτες στη χρήση των προβιοτικών στην εκτροφή της καραβίδας *N. norvegicus*.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Διεθνής Βιβλιογραφία

- Abello P., Abella A., Adamidou A., Jukic-Peladic S., Majorano P., 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: 125-141.
- Aiken D.E., and Waddy S.L. (1995) Aquaculture. In: . Factor, J.R. (ed). *Biology of the Lobster Homarus americanus* Academic Press, San Diego: .
- Ali A. (2000) Probiotics in fish farming. Evaluation of a bacterial mixture. PhD thesis, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Alvandi S.V., Vijayan K.K., Santiago T.C., Poornima M., Jithendran K.P., Ali S.A., Rajan J.J.S. (2004) Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunology*, 17: 115-120.
- Amann R.I., Krumholz L., Stahl D.A. (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*, 172: 762-770.
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*, 59: 143-169.
- Ashelford K.E., Chuzhanova N.A., Fry J.C., Jones A.J., Weightman A.J. (2005) At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 7724-7736.
- Balcázar J.L., Rojas-Luna T., Cunningham D.P. (2007) Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96: 147-150.
- Bano N., DeRae Smith A., Bennett W., Vasquez L., Hollibaugh J.T. (2007) Dominance of *Mycoplasma* in the guts of the Long-Jawed Mudsucker, *Gillichthys mirabilis*, from five California salt marshes. *Environmental Microbiology*, 9: 2636-2641.
- Beckwith T.D., Rose E.J. (1929) Cellulose digestion by organisms from the termite gut. *Proceedings of Society of Experimental Biology and Medicine*, 27: 4-6.
- Behrens S., Fuchs B.M., Mueller F., Amann R. (2003) Is the in situ accessibility of the 16S rRNA of *Escherichia coli* for Cy3-labeled oligonucleotide probes predicted by a three-dimensional structure model of the 30S ribosomal subunit? *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 4935-4941.
- Bell M., Redant F., Tuck I. (2006) *Nephrops* species. In: Phillips, B. (ed), *Lobsters: biology, management, aquaculture and fisheries*. Oxford: Blackwell, p. 412-469.
- Bent S.J., Forney L.J. (2008) The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *ISME Journal*, 2: 689-695.
- Bignell D.E. (1984) The arthropod gut as an environment for microorganisms. In: Anderson, J.M., Raynon, A.D.M., and Walton, D.W.A. (eds), *Invertebrate-microbial interactions*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 205-227.

- Boer S.I., Hedtkamp S.I.C., van Beusekom J.E.E., Fuhrman J.A., Boetius A., Ramette A. (2009) Time- and sediment depth-related variations in bacterial diversity and community structure in subtidal sands. *ISME Journal*, 3: 780-791.
- Booth J.N. (2006) *Jasus* species. In: Phillips, B.F. (ed), *Lobsters: Biology, management, aquaculture and fisheries*. Oxford, UK: Blackwell publishing.
- Bowman J.P. (2006) The genus *Psychrobacter*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Stackenbrandt, E. (eds), *The Prokaryotes*. New York: Springer, p. 920-930.
- Boyle P.J., Mitchell R. (1978) Absence of microorganisms in crustacean digestive tracts. *Science*, 200: 1157-1159.
- Brofft J.E., McArthur J.V., Shimkets L.J. (2002) Recovery of novel bacterial diversity from a forested wetland impacted by reject coal. *Environmental Microbiology*, 4: 764-769.
- Brunet M., Arnaud J., Mazza J. (1994) Gut structure and digestive cellular processes in marine Crustacea. *Oceanographic Marine Biology Annuals*, 32: 335-367.
- Cardinale M., Brusetti L., Quatrini P., Borin S., Puglia A.M., Rizzi A., Zanardini E., Sorlini C., Corselli C., Daffonchio D. (2004) Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 6147-6156.
- Cavallo R.A., Acquaviva M.I., Stabili L. (2009) Culturable heterotrophic bacteria in seawater and *Mytilus galloprovincialis* from a Mediterranean area (Northern Ionian Sea – Italy). *Environmental Monitoring and Assessment*, 149: 465-475.
- Cavanaugh C.M., Gardiner S.L., Jones M.L., Jannasch H.W., Waterbury J.B. (1981) Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*: possible chemoautotrophic symbionts. *Science*, 213: 340-342.
- Ceccaldi H.J. (1989) Anatomy and physiology of digestive tract of crustaceans Decapods reared in aquaculture. *Proceedings of Advances in tropical aquaculture conference*. Tahiti, pp. 243-259.
- Chapman C.J. (1980) Ecology of juvenile and adult Nephrops. In: Cobb, J.S., and Phillips, B.F. (eds), *The biology and management of Lobsters*. London: Academic Press, pp. 143-178.
- Chiu C.-H., Guu Y.-K., Liu C.-H., Pan T.-M., Cheng W. (2007) Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish and Shellfish Immunology*, 23: 364-377.
- Clarke K.R. (1993) Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, 18: 117-143.
- Clarke K.R., Green R.H. (1988) *Statistical Design and Analysis for a Biological Effects Study*. Marine Ecology-Progress Series, 46: 213-226.
- Colorni A. (1985) A study on the bacterial flora of the giant prawn *Macrobrachium rosenbergii*, larvae fed with *Artemia salina* nauplii. *Aquaculture*, 49: 1-10.
- Conklin D.E. (1995) Digestive physiology and Nutrition. In: Factor, I.R. (ed). *Biology of the lobster Homarus americanus*. USA: Academic Press, pp. 441-458.
- Crawford G.S., Minion G.P., Boyers M.D.I.J.I. (1983) Intima morphology, bacterial morphotypes, and effects of annual molt on microflora in the hindgut of the desert millipede, *Orthopus ornatus* (Girard) (Diplopoda: Spirostreptidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 12: 301-312.
- 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: 81-90.

- Curtis T.P., Sloan W.T., Scannell J.W. (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 99: 10494-10499.
- Daims H., Bruhl A., Amann R., Schleifer K.H., Wagner M. (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology*, 22: 434-444.
- Dalmin G., Kathiresan K., Purushothaman A. (2001) Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian Journal of Experimental Biology*, 39: 939-942.
- Danovaro R., Company J.B., Corinaldesi C., D'Onghia G., Galil B., Gambi C., Gooday A.J., Lampadariou N., Luna G-M., Morigi C., Olu K., Polymenakou P., Ramirez-Llodra E., Sabbatini A., Sarda F., Sibuet M., Tselepides A. (2010) Deep-Sea Biodiversity in the Mediterranean Sea: The known, the unknown and the unknowable. *PLoS ONE*, 5: e11832.
- Deming J.W., Colwell R.R. (1981) Barophilic bacteria associated with deep-sea animals. *Bioscience*, 31: 507-511.
- Demiri A., Meziti A., Papaspyrou S., Thessalou-Legaki M., Kormas K.A. (2009) Abdominal setae and midgut bacteria of the mudshrimp *Pestarella tyrrhena*. *Central European Journal of Biology*, 4: 558-566.
- Dempsey A.C., Kitting C.L. (1987) Characteristics of bacteria isolated from penaeid shrimp. *Crustaceana* 52:90-94.
- Dempsey A.C., Kitting C.L., Rosson R.A. (1989). Bacterial variability among individual penaeid shrimp digestive tracts. *Crustaceana*, 56: 266-278.
- Denner E.B., Mark B., Busse H.J., Turkiewicz M., Lubitz W. (2001) *Psychrobacter proteolyticus* sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium isolated from the Antarctic krill *Euphausia superba* Dana, excreting a cold-adapted metalloprotease. *Systematic and Applied Microbiology*, 24: 44-53.
- Dillon R.J., Webster G., Weightman A.J., Charnley A.K. (2010) Diversity of gut microbiota increases with aging and starvation in the desert locust. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 97: 69-77.
- Donachie S.P., Zdanowski M.K. (1998) Potential digestive function of bacteria in krill *Euphausia superba* stomach. *Aquatic Microbial Ecology*, 14: 129-136.
- Drach P. (1939). Mue et cycle d'intermue chez les crustacees decapodes. . *Annales du Service de l'Océanographie*, 19: 103-391.
- Du H.L., Jiao N.Z., Hu Y.H., Zeng Y.H. (2006) Diversity and distribution of pigmented heterotrophic bacteria in marine environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 57: 92-105.
- Dubilier N., Mulders C., Ferdelman T., de Beer D., Pernthaler A., Klein M., Wagner M., Erseus C., Thiermann F., Krieger J., Giere O., Amann R. (2001) Endosymbiotic sulphate-reducing and sulphide-oxidizing bacteria in an oligochaete worm. *Nature*, 411: 298-302.
- Dubilier N., Bergin C. and Lott C. (2008) Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nature Reviews Microbiology*, 6: 725-740.
- Duperron S., Bergin C., Zielinski F., Blazejak A., Pernthaler A., McKiness Z.P., DeChaine E., Cavanaugh C.M., Dubilier N. (2006) A dual symbiosis shared by two mussel species, *Bathymodiolus azoricus* and *Bathymodiolus puteoserpentis* (Bivalvia : Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology*, 8: 1441-1447.

- Durand L., Zbinden M., Cuff-Gauchard V., Duperron S., Roussel E.G., Shillito B., Cambon-Bonavita M.A. (2010) Microbial diversity associated with the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* gut and occurrence of a resident microbial community. *FEMS Microbiology Ecology*, 71: 291-303.
- Farmer A.S. (1973) Age and growth in *Nephrops norvegicus* (Decapoda, Nephropidae). *Marine Biology*, 23: 315-325.
- Farmer A.S. (1974) A new technique applied to the chromosomes of *Nephrops norvegicus* (L.) (DECA-PODA, NEPHROPIDAE). *Crustaceana*, 27: 17-21.
- Farmer A.S.D. (1975) Synopsis of data on the Norway lobster *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). *FAO fisheries synopsis*, 112: 1-97.
- Farmer J., J. III, and Hickman-Brenner (2006) The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackenbrandt, E. (eds), *The Prokaryotes*. New York: Springer, p 508-563.
- Farto R., Guisande J.A., Armada S.P., Prado S., Nieto T.P. (2006) An improved and rapid biochemical identification of indigenous aerobic culturable bacteria associated with galician oyster production. *Journal of Shellfish Research*, 25: 1059-1065.
- Farzanfar A. (2006). The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 48: 149-158.
- Figueiredo M.J., Vilela M.H. (1972) On the artificial culture of *Nephrops norvegicus* reared from the egg. *Aquaculture*, 1: 173-180.
- Fisher M.M., Triplett E.W. (1999) Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4630-4636.
- Flint H.J., Bayer E.A., Rincon M.T., Lamed R., White B.A. (2008) Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews Microbiology*, 6: 121-131.
- Fraune S., Zimmer M. (2008) Host-specificity of environmentally transmitted *Mycoplasma*-like isopod symbionts. *Environmental Microbiology*, 10: 2497-2504.
- Fuchs B.M., Woebken D., Zubkov M.V., Burkill P., Amann R. (2005) Molecular identification of picoplankton populations in contrasting waters of the Arabian Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 39: 145-157.
- Fujiwara Y., Kawato M., Noda C., Kinoshita G., Yamanaka T.E.A. (2010) Extracellular and Mixotrophic Symbiosis in the Whale-Fall Mussel *Adipicola pacifica*: A Trend in Evolution from Extra- to Intracellular Symbiosis. *PLoS ONE*, 5: e11808. doi:10.1371/journal.pone.0011808.
- Fuller R. (1991) Probiotics in human medicine. *Gut*, 32: 439-442.
- Fuller R. (1992) *Probiotics: History and Development of Probiotics*. New York: Chapman & Hall.
- Giebel J., Binder A., Kirchhoff H. (1990) Isolation of *Mycoplasma moatsii* from the Intestine of Wild Norway Rats (*Rattus norvegicus*). *Veterinary Microbiology*, 22: 23-29.
- Giovannoni S.J., Britschgi T.B., Moyer C.L., Field K.G. (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*, 345: 60-63.
- Glöckner F.O., Fuchs B.M., Amann R. (1999) Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 3721-3726.

- Gomez-Gil B., Roque A., Lacuesta B., Rotllant G. (2010) Diversity of vibrios in the haemolymph of the spider crab *Maja brachydactyla*. *Journal of Applied Microbiology*, 109: 918-926.
- Graf G. (1992) Benthic-pelagic coupling: A benthic view. *Oceanography and marine biology: an annual review*, 30: 149-190.
- Graham N., Ferro R.S.T. (2004) The *Nephrops* Fisheries of the Northeast Atlantic and Mediterranean – A Review and Assessment of Fishing Gear Design. ICES Cooperative Research Report, 270.
- Green-Garcia A.M. (2008) Characterization of the Lucinid bivalve-bacteria symbiotic system: the significance of the geochemical habitat on bacterial symbiont diversity and phylogeny. In M. Sc. Thesis. Louisiana state University.
- Greenacre M.J. (1984) Theory and applications of correspondence analysis. London: Academic Press.
- Guarner F., Schaafsma G.J. (1998) Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39: 237-238.
- Gulmann L.K. (2004) Gut associated microbial symbionts of the marsh fiddler crab, *Uca pugnax*. PhD thesis, Woods Hole Oceanographic Institution. Massachusetts.
- Halpern M., Landsberg O., Raats D., Rosenberg E. (2007) Culturable and VBNC *Vibrio cholerae*: Interactions with chironomid egg masses and their bacterial population. *Microbial Ecology*, 53: 285-293.
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. (2001) Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4: 1-9.
- Hammes W.P., Hertel C. (2006) The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Dworkin, M. (ed). *The Prokaryotes*. New York: Springer, p. 320-403.
- Harris J.M. (1993) The Presence, Nature, and Role of Gut Microflora in Aquatic invertebrates: A Synthesis. *Microbial 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*. *Microbial Ecology*, 21: 63-82.
- Hayward P.J., Ryland J.S. (1990) The Marine Fauna of the British Isles and North-West Europe, I, Introduction and Protozoans to Arthropods. Oxford: Clarendon Press, p.489-552.
- Hehemann J.-H., Correc G., Barbeyron T., Helbert W., Czejek M., Michel G. (2010) Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature*, 464: 908-912.
- Heisterkamp I.M., Schramm A., de Beer D., Stief P. (2010) Nitrous oxide production associated with coastal marine invertebrates. *Marine Ecology Progress Series*, 415: 1-9.
- Hentschel U., Hopke J., Horn M., Friedrich A.B., Wagner M., Hacker J., Moore B.S. (2002) Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4431-4440.
- Heylen K., Vanprays B., Wittebolle L., Verstraete W., Boon N., De Vos P. (2006) Cultivation of denitrifying bacteria: Optimization of isolation conditions and diversity study. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 2637-2643.
- Hill T.C.J., Walsh K.A., Harris J.A., Moffett B.F. (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 1-11.
- Hold G.L., Smith E.A., Rappe M.S., Maas E.W., Moore E.R.B., Stroempl C., Stephen J.R., Prosser J.I., Birkbeck T.H., Gallacher S. (2001) Characterization of bacterial

- communities associated with toxic and non-toxic dinoflagellates: *Alexandrium* spp. and *Scrippsiella trochoidea*. FEMS Microbiology Ecology, 37: 161-173.
- Holmstrom C., Kjelleberg S. (1999) Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. FEMS Microbiology Ecology, 30: 285-293.
- Hood M.A., Meyers S.P., Colmer A.R. (1971) Bacteria of the digestive tract of the white shrimp *Penaeus setiferus*. Bacteriology, 71: 48.
- Huber A.J., Johnson H.P., Butterfield D.A., Baross J.A. (2006) Microbial life in ridge flank crystal fluids. Environmental Microbiology, 8: 88-99.
- Hwang C.Y., Bae G.D., Yih W., Cho B.C. (2009) *Marivita cryptomonadis* gen.nov., sp. nov. and *Marivita litorea* sp. nov., of the family Rhodobacteraceae, isolated from marine habitats. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59: 1568-1575.
- Irianto A., Austin B. (2002) Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Diseases, 25: 633-642.
- Irianto A., Austin B. (2003) Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*. Journal of Fish Diseases, 26: 59-62.
- Jensen S., Frost P., Torsvik V.L. (2009) The nonrandom microheterogeneity of 16S rRNA genes in *Vibrio splendidus* may reflect adaptation to versatile lifestyles. FEMS Microbiology Letters, 294: 207-215.
- Jung S.Y., Lee M.H., Oh T.K., Park Y.H., Yoon J.H. (2005) *Psychrobacter cibarius* sp nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55: 577-582.
- Kan J., Evans S.E., Chen F., Suzuki M.T. (2008) Novel estuarine bacterioplankton in rRNA operon libraries from the Chesapeake Bay. Aquatic Microbial Ecology, 51: 55-56.
- Kane M.D., Poulsen L.K., Stahl D.A. (1993) Monitoring the Enrichment and Isolation of Sulfate-Reducing Bacteria by Using Oligonucleotide Hybridization Probes Designed from Environmentally Derived 16s Ribosomal-Rna Sequences. Applied and Environmental Microbiology, 59: 682-686.
- Kemp P.F., Aller J.Y. (2004) Estimating prokaryotic diversity: When are 16S rDNA libraries large enough? Limnology and Oceanography-Methods, 2: 114-125.
- Kim C.-J., Yoon S.-K., Kim H.-I., Park Y.-H., Oh H.-M. (2006) Effect of *Spirulina platensis* and probiotics as feed additives on growth of shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 16: 1248-1254.
- Kirchman D.L., Cottrell M.T., Lovejoy C. (2010) The structure of bacterial communities in the western Arctic Ocean as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes. Environmental Microbiology, 12: 1132-1143.
- Kormas K.A. (2011) Interpreting diversity of Proteobacteria based on 16S rRNA gene copy number. In Proteobacteria: Phylogeny, metabolic diversity and ecological effects. Sezena, M.L. (ed). New York: Nova Publishers, pp. 73-89.
- Kostanjsek R., Strus J., Avgustin G. (2007) "Candidatus *Bacilloplasma*" a novel lineage of Mollicutes associated with the hindgut wall of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea : Isopoda). Applied and Environmental Microbiology, 73: 5566-5573.
- Kruskal J.B. (1964) Multidimensional scaling by optimizing a goodness of fit to a nonmetric hypothesis. . Psychometrics 29: 1-28.
- Lane D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Stackenbrandt, E., and Goodfellow, M. (eds). Chichester: John Wiley & Sons, pp. 115-175.

- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.
- Lau W.W.Y., Jumars P.A., Armbrust E.V. (2002) Genetic diversity of attached bacteria in the hindgut of the deposit-feeding shrimp *Neotrypaea* (formerly *Callinassa*) *californiensis* (Decapoda : Thalassinidae). *Microbial Ecology*, 43: 455-466.
- Lebaron P., Servais P., Troussellier M., Courties C., Muyzer G., Bernard L., Schaefer H., Pukall R., Stackebrandt E., Guindulain T., Vives-Rego J. (2001) Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in abundances, activity and composition. *FEMS Microbiology Ecology*, 34: 255-266.
- Lee Y.K., Jung H.J., Lee H.K. (2006) Marine bacteria associated with the Korean brown alga, *Undaria pinnatifida*. *Journal of Microbiol*, 44: 694-698.
- Legendre P., Legendre L. (1998) *Numerical Ecology*. Amsterdam: Elsevier, p. 671-672.
- Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.I. (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444: 1022-1023.
- Ley R.E., Hamady M., Lozupone C., Turnbaugh P.J., Ramey R.R., Bircher J.S., Schlegel M.L., Tucker T.A., Schrenzel M.D., Knight R., Gordon J.I. (2008) Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320: 1647-1651.
- Li J., Tan B., Mai K., Ai Q., Zhang W., Xu W., Liufu Z., Hongming M. (2006) Comparative study between probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 and chloramphenicol on protection of *Penaeus chinensis* post-larvae from pathogenic vibrios. *Aquaculture*, 253: 140-147.
- Li K., Guan W., Wei G., Liu B., Xu J., Zhao L., Zhang Y. (2007) Phylogenetic analysis of intestinal bacteria in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Journal of Applied Microbiology*, 103: 675-682.
- Li L., Kato C., Horikoshi K. (1999) Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. *Biodiversity and Conservation*, 8: 659-677.
- Lin H.Z., Guo Z., Yang Y., Zheng W., Li Z.J. (2004) Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. *Aquaculture Research*, 35: 1441-1447.
- Ludwig W., Strunk O., Westram R., Richter L., Meier H., Yadhukumar, Buchner A., Lai T., Steppi S., Jobb G., Foerster W., Brettske I., Gerber S., Ginhart A.W., Gross O., Grumann S., Hermann S., Jost R., Koenig A., Liss T., Luessmann R., May M., Nonhoff B., Reichel B., Strehlow R., Stakatakis A., Stuckmann N., Vilbig A., Lenke M., Ludwig T., Bode A., Schleifer K.-H. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research*, 32: 1363-1371.
- Lustigman S., McKerrow J.H., Shah K., Lui J., Huima T., Hough M., Brotman B. (1996) Cloning of a Cysteine Protease Required for the Molting of *Onchocerca volvulus* Third Stage Larvae. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 30181-30189.
- Maltagliati F., Camilli L., Biagi F., Abbiati M. (1998) Genetic structure of Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.) (Crustacea: Nephropidae), from the Mediterranean Sea. *Scientia Marina*, 62: 91-99.
- Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., Schleifer K.-H. (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology*, 15: 593-600.
- Margalef R. (1958) Temporal succession and spatial heterogeneity in phytoplankton. *In Perspectives in marine biology*. Berkeley and Los Angeles: Univ. Calif. Press., p. 323-350.

- Medigue C., Krin E., Pascal G., Barbe V., Bernsel A., Bertin P.N., Cheung F., Cruveiller S., D'Amico S., Duilio A., Fang G., Feller G., Ho C., Mangenot S., Marino G., Nilsson J., Parrilli E., Rocha E.P.C., Rouy Z., Sekowska A., Tutino M.L., Vallenet D., von Heijne G., Danchin A. (2005) Coping with cold: the genome of the versatile marine Antarctica bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Genome Res*, 15: 1325-1335.
- Mente E., Karapanagiotidis I.T., Logothetis P., Vafidis D., Malandrakis E., Neofitou N., Exadactylos A., Stratakis A. (2009) The reproductive cycle of Norway lobster. *Journal of Zoology*, 278: 324-332.
- Mente E. (2010) Survival, food consumption and growth of Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) kept in laboratory conditions. *Integrative Zoology*, 5: 256-263.
- Meziti A., Ramette A., Mente E., Kormas K.A. (2010) Temporal shifts of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) gut bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 74: 472-484.
- Morita H., Nakano A., Shimazu M., Toh H., Nakajima F., Nagayama M., Hisamatsu S., Kato Y., Takagi M., Takami H., Akita H., Matsumoto M., Masaoka T., Murakami M. (2009) *Lactobacillus hayakitensis*, *L. equigenerosi* and *L. equi*, predominant lactobacilli in the intestinal flora of healthy thoroughbreds. *Animal Science Journal*, 80: 339-346.
- Muyzer G., Teske A., Wirsén 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.
- Nasu H., Iida T., Sugahara T., Yamaichi Y., Park K.S., Yokoyama K., Makino K., Shinagawa H., Honda T. (2000) A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 2156-2161.
- Nayak S.K. (2010) Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41: 1553-1573.
- Nechitaylo T.Y., Timmis K.N., Golyshin P.N. (2009) 'Candidatus *Lumbricincola*', a novel lineage of uncultured Mollicutes from earthworms of family Lumbricidae. *Environmental Microbiology*, 11: 1016-1026.
- Nicosia F., Lavalli K. (1999) Homarid lobster hatcheries: their history and role in research, management, and aquaculture. *Marine Fisheries Review*, 61: 1-57.
- Nishiguchi M.K., Nair V.S. (2003) Evolution of symbiosis in the Vibronaceae: a combined approach using molecules and physiology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 2019-2026.
- Nittami T., McIlroy S., Seviour E.M., Schroeder S., Seviour R.J. (2009) Candidatus *Monilibacter* spp., common bulking filaments in activated sludge, are members of Cluster III *Defluviicoccus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 32: 480-489.
- Olsen G.J., Lane D.J., Giovannoni S.J., Pace N.R., Stahl D.A. (1986) Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Review of Microbiology*, 40: 337-365.
- Orozco-Medina C., Maeda-Martínez A.M., López-Cortés A. (2002) Effect of aerobic Gram-positive heterotrophic bacteria associated with *Artemia franciscana* cysts on the survival and development of its larvae. *Aquaculture*, 213: 15-29.
- Passamonti M., Mantovani B., Scali V., Froggia C. (1997) Allozymic characterization of Scottish and Aegean populations of *Nephrops norvegicus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 77: 727-735.

- 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.
- Phillips B.F., Melville-Smith R. (2006) *Panulirus* species. In: Phillips, B.F. (ed), *Lobsters: Biology, management, aquaculture and fisheries*. Oxford, UK: Blackwell publishing.
- Pinhassi J., Sala M.M., Havskum H., Peters F., Guadayol O., Malits A., Marrasse C.L. (2004) Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 6753-6766.
- Pinn E.H., Nickell L.A., Rogerson A., Atkinson R.J.A. (1999) Comparison of gut morphology and gut microflora of seven species of mud shrimp (Crustacea: Decapoda: Thalassinidea). *Marine Biology*, 133: 103-114.
- Price H.J., Boyd K.R., Boyd C.M. (1988) Omnivorous feeding behaviour of the Antarctic krill *Euphausia superba*. *Marine Biology*, 97: 67-77.
- Pruesse E., Quast C., Knittel K., Fuchs B.M., Ludwig W., Peplies J., Glockner F.O. (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res*, 35: 7188-7196.
- Pryde S.E., Duncan S.H., Hold G.L., Stewart C.S., Flint H.J. (2002) The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiology Letters*, 217: 133-139.
- Ramette A. (2007) Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 62: 142-160.
- Ramette A. (2009) Quantitative Community Fingerprinting Methods for Estimating the Abundance of Operational Taxonomic Units in Natural Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 2495-2505.
- Rao C.R. (1964) The use and interpretation of principal component analysis in applied research. *Sankhya A*, 26: 329-358.
- Razin S., Yogev D., Naot Y. (1998) Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 1094-+.
- Reichenbach H., Weeks O. (1981) *The Flavobacterium-Cytophaga group*. Weinheim, Germany: Verlag Chemie.
- Rengpipat S., Tunyamum A., Fast A.W., Piyatiratitivoraku S., Menasveta P. (2003) Enhanced growth and resistance to vibrio challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55: 169-173.
- Rice A.L., Chapman C.J. (1971) Observations on the burrows and burrowing behaviour of two mud-dwelling decapod crustaceans, *Nephrops norvegicus* and *Goneplax rhomboides*. *Marine Biology*, 10: 330-342.
- Riesenfeld C.S., Murray A.E., Baker B.J. (2008) Characterization of the Microbial Community and Polyketide Biosynthetic Potential in the Palmerolide-Producing Tunicate *Synoicum adareanum*. *Journal of Natural Products*, 71: 1812-1818.
- Romanenko L.A., Tanaka N., Frolova G.M., Mikhailov V.V. (2010) *Marinicella litoralis* gen. nov., sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from coastal seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 1613-1619.

- Romanenko L.A., Tanaka N., Uchino M., Kalinovskaya N.I., Mikhailov V.V. (2008) Diversity and Antagonistic Activity of Sea lce Bacteria Isolated from the Sea of Japan. *Microbes and Environments*, 23: 209-214.
- Romanenko L.A., Tanaka N., Frolova G.M., Svetashev V.I., Mikhailov V.V. (2011) *Litoreibacter albidus* gen. nov., sp. nov. and *Litoreibacter janthinus* sp. nov., members of the class Alphaproteobacteria isolated from the seashore. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61.
- Rosa R., Morais S., Calado R., Narciso L., Nunes M.L. (2003) Biochemical changes during the embryonic development of Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. *Aquaculture*, 221: 507-522.
- Rotllant G., Charmantier-Daures M., Charmantier G., Anger K., Sarda F. (2001) Effects of diet on *Nephrops norvegicus* (L.) larval and postlarval development, growth, and elemental composition. *Journal of Shellfish Research*, 20: 347-352.
- Russell J.A., Moreau C.S., Goldman-Huertas B., Fujiwara M., Lohman D.J., and Pierce N.E. (2009) Bacterial gut symbionts are tightly linked with the evolution of herbivory in ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 21236-21241.
- Sarda F. (1983) Determinación de los estados de intermuda en *Nephrops norvegicus* (L.), mediante la observación de los pléopodos. *Investigacion Pesquera*, 47: 95-112.
- Sarda F. (1991) Reproduction and moult synchronism in *Nephrops norvegicus* (L.) (Decapoda, Nephropidae) in the western Mediterranean: is spawning annual or biennial? . *Crustaceana*, 60: 186-199.
- Sarda F. (1995) A review (1967–1990) of some aspects of the life history of *Nephrops norvegicus*. *ICES marine science symposia*, 199: 78-88.
- Sarda F., Valladares F.J. (1990) Gastric Evacuation of Different Foods by *Nephrops Norvegicus* (Crustacea, Decapoda) and Estimation of Soft-Tissue Ingested, Maximum Food-Intake and Cannibalism in Captivity. *Marine Biology*, 104: 25-30.
- Sawabe T., Narita M., Tanaka R., Onji M., Tajima K., Ezura Y. (2000) Isolation of *Pseudoalteromonas elyakovii* strains from spot-wounded fronds of *Laminaria japonica*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 66: 249-254.
- Schmidtova J., Hallam S.J., Baldwin S.A. (2009) Phylogenetic diversity of transition and anoxic zone bacterial communities within a near-shore anoxic basin: Nitinat lake. *Environmental Microbiology*, 11: 3233-3251.
- Schulze A.D., Alabi A.O., Tattersall-Sheldrake A.R., Miller K.M. (2006) Bacterial diversity in a marine hatchery: Balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. *Aquaculture*, 256: 50-73.
- Shannon C.E., Weaver W. (1949) *The Mathematical Theory of Communication*. Urbana: University of Illinois Press.
- Simon C.J. (2009) Digestive enzyme response to natural and formulated diets in cultured juvenile spiny lobster, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture*, 294: 271-281.
- Simpson E.H. (1949) Measurement of diversity. *Nature*, 163: 688.
- Sipkema D., Schippers K., Maalcke W.J., Yang Y., Salim S., Blanch H.W. (2011) Multiple Approaches To Enhance the Cultivability of Bacteria Associated with the Marine Sponge *Haliclona gellius* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 2130-2140.
- 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.

- Sogin M.L., Morrison H.G., Huber J.A., Welch D.M., Huse S.M., Neal P.R., Arrieta J.M., Herndl G.H. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored 'rare biosphere'. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 103: 12115-12120.
- Sohn J.H., Lee J.-H., Yi H., Chun J., Bae K.S., Ahn T.-Y., Kim S.-J. (2004) *Kordia algicida* gen. nov., sp. nov., an algicidal bacterium isolated from red tide. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 675-680
- Stamatis C., Triantafyllidis A., Moutou K.A., Mamuris Z. (2004) Mitochondrial DNA variation in northeast atlantic and mediterranean populations of norway lobster, *Nephrops norvegicus*. *Molecular Ecology*, 13: 1377-1390.
- Suen G., Scott J.J., Aylward F.O., Adams S.M., Tringe S.G., Pinto-Tomas A.A., Foster C.E., Pauly M., Weimer P.J., Barry K.W., Goodwin L.A. Bouffard P., Li L., Osterberger J., Harkins T.T., Slater S.C., Donohue T.J., Currie C.R. (2010) An insect herbivore microbiome with high plant biomass-degrading capacity. *PLoS Genetics*, 6: e1001129.
- Tauch A., Trost E., Tilker A., Ludewig U., Schneiker S., Goesmann A., Arnold W., Bekel T., Brinkoff K., Brune I., Goetker S., Kalinowski J., Kamp P.-B., Pereira Lobo F., Viehoveer P., Weisshaar B., Soriano F., Droege M., Puehler A. (2008) The lifestyle of *Corynebacterium urealyticum* derived from its complete genome sequence established by pyrosequencing. *Journal of Biotechnology*, 136: 11-21.
- Thompson F.L., Iida T., Swings J. (2004) Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68: 403-431
- Thyssen A., Ollevier F. (2004) The Family Vibrionaceae, The genus *Photobacterium*. In: Garrity, G.M. (ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Michigan, USA: Springer, p. 546-552.
- Triantafyllou G., Petihakis G., Dounas C., Theodorou A. (2001) Assessing marine ecosystem response to nutrient inputs. *Marine Pollution Bulletin*, 43: 175-186.
- Tsukamoto H., Takakura Y., Mine T., Yamamoto T. (2008) *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 produces two sialyltransferases, alpha-/beta-galactoside alpha2,3-sialyltransferase and beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase. *Journal of Biochemistry*, 143: 187-197.
- Tuck I.D., Atkinson R.J., 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.
- Turnbaugh P.J., Ley R.E., Mahowald M.A., Magrini V., Mardis E.R., Gordon J.I. (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444: 1027-1031.
- Urakawa H., Kita-Tsukamoto K., Ohwada K. (1999) Restriction fragment length polymorphism analysis of psychrophilic and psychrotrophic *Vibrio* and *Photobacterium* from the north-western Pacific Ocean and Otsuchi Bay, Japan. *Canadian Journal of Microbiology*, 45: 67-76.
- Vandamme P., Dewhirst F.E., Paster B.J., On S.L.W. (2004) Genus II. *Arcobacter*. In: Garrity, G.M. (ed). *Bergey's Manual of Bacteriology*. Michigan, USA: Springer, p. 1161-1165.
- Vaseeharan B., Ramasamy P. (2003) Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology*, 36: 83-87.
- Vega-Villasante F., Fernandez I., Preciado R., Oliva M., Torvar D. (1999) The activity of digestive enzymes during the molting stages of the arched swimming *Callinectes*

- arcuatus*, Ordway, 1963 (Crustacea: Decapoda: Portunidae). Bulletin of Marine Science, 65: 1-9.
- Verschuere L., Rombout G., Sorgeloos P., Verstraete W. (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64: 655-671.
- Ward N.L., Steven B., Penn K., Methe B.A., Detrich W.H. (2009) Characterization of the intestinal microbiota of two Antarctic notothenioid fish species. Extremophiles, 13: 679-685.
- Woese C.R., Fox G.E. (1977) Phylogenetic structure of the Prokaryotic domain: The primary Kingdoms. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 74: 5088-5090.
- Wolda H. (1981) Similarity indices, sample size and diversity. Oecologia, 50: 296-302.
- Wu S., Gao T., Zheng Y., Wang W., Cheng Y., Wang G. (2010) Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Aquaculture, 303: 1-7.
- Yonge C.M. (1924) Studies on the Comparative Physiology of Digestion: II. The Mechanism of Feeding, Digestion, and Assimilation in *Nephrops Norvegicus*. Journal of Experimental Biology, 1: 343-389.
- Zbinden M., Cambon-Bonavita M.A. (2003) Occurrence of Deferribacterales and Entomoplasmatales in the deep-sea Alvinocarid shrimp *Rimicaris exoculata* gut. FEMS Microbiology Ecology, 46: 23-30.
- Zbinden M., Shilito B., Le Bris N., de Villardi de Montlaur C., Roussel E., Guyot F., Gaill F., Cambon-Bonavita M.-A. (2008) New insights on the metabolic diversity among the epibiotic microbial community of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 359: 131-140.
- Zhang D.-C., Li H.-R., Xin Y.-H., Liu H.-C., Chi Z.-M., Zhou P.-J., Yu Y. (2008) *Phaeobacter arcticus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from the Arctic. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58: 1384-1387.
- Zhou M.-Y., Chen X.-L., Zhao H.-L., Dang H.-Y., Luan X.-W., Zhang X.-Y., He H.-L., Zhou B.-C., Zhang Y.-Z. (2009) Diversity of both cultivable protease-producing bacteria and their extracellular proteases in the sediments of the south china Sea. Microbial Ecology, 58: 582-590.

Ελληνική βιβλιογραφία

- Μεντέ Ε., Στρατάκος Α., Μπαντίδος Σ., Βαφείδης Δ., Νεοφύτου Χ. (2007) Αύξηση του *Nephrops norvegicus* στο εργαστήριο. 3ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιχθυολόγων. Μυτιλήνη.

Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία

BLAST (2011):

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&MEGABLAST=on&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome (01/05-01/09/2011)

FAO (2011): FAO Fisheries and Aquaculture Department

<http://www.fao.org/docrep/009/A0699e/A0699E00.HTM> (04/10/2011)

Microbial Genome Resources (2011):

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=7287 (05/10/2011)

SILVA (2011): <http://www.arb-silva.de/browser/> (15/06/2011)

SPADE (2010): <http://chao.stat.nthu.edu.tw/softwareCE.html> (01/06/2011)

Zimmer C. (2011): the wired atlas of the human ecosystem:

http://www.wired.com/magazine/2011/09/mf_microbiome/ (15/10/2011)

ABSTRACT

The Norway lobster *Nephrops norvegicus*, also known as Dublin bay prawn is a Decapod Crustacean of the Family Nephropidae that is widely distributed in silty areas, of the continental shelf and the upper continental slope, of the Northeast Atlantic and the Mediterranean Sea. The Norway lobster is a highly commercial species in the areas where it is found. Efforts for the commercial rearing of the species have not succeeded yet due to lack of knowledge on the nutritional habits of the species on rearing conditions and on its exact nutritional demands.

This thesis studied for the first time the gut bacterial diversity of *Nephrops norvegicus*. Studies were performed in natural and reared populations, where different food sources were provided. The project targeted in finding the factors that shape gut bacterial diversity and in detecting symbiotic, non toxic and non pathogenic bacterial species that can influence the digestive functions of *N. norvegicus* and could potentially be used as probiotics in future rearing efforts.

For the study of the natural populations *N. norvegicus* individuals were collected from Pagasitikos gulf during different months in 2007. The digestive tract was extracted and evacuated, followed by DNA extraction. DNA was analyzed with the use of molecular tools studying 16S rRNA and the Intergenic Transcribed Spacer (ITS). The 16S rRNA diversity was studied with the use of clone libraries and Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) while the ITS diversity was studied with the use of clone libraries and Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA). The study of the ITS diversity with the use of ARISA showed that

gut bacterial microdiversity was influenced by sampling season while other factors that were checked such as sex or weight had no influence. Seasonal differences in Pagasitikos gulf, and mostly in the areas where *N. norvegicus* is found, are based in changes in food availability and quality and not in physicochemical factors. In this area temperature and salinity are almost stable all over the year, while changes are observed in the quantity and the quality of the organic matter from upper layers that finally influences the trophic webs in the bottom.

Further analysis of selected samples from all collection months with 16S-ITS clone libraries showed the dominance of specific phylotypes (>58%) in each one of them. The dominant phylotypes in the samples of February/March, May, July, August and October clustered in the genera of *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter* and *Photobacterium* while the ones in the samples of September and December clustered in an uncultured Mollicutes group and in the candidate division CK-1C4-19 respectively. The presence of γ -Proteobacteria in August samples and of uncultured Mollicutes in September samples was further verified with the FISH results. For the detection of cells belonging to γ -Proteobacteria, probe GAM42a was used while for the cells belonging to the dominant Mollicute phylotype a specific probe was designed.

The combination of ARISA results with the ITS lengths of the dominant phylotypes from the clone libraries further confirmed the presence of *Photobacterium* sp. and *Psychrobacter* sp. representatives in most of the samples studied. However the presence of the Mollicutes and CK-1C4-19 phylotypes was underestimated in the ARISA as a result of mismatches of their sequences with the primers used.

Rearing experiments were performed in order to confirm the effect of feeding in gut bacterial diversity. *N. norvegicus* individuals were divided in three groups and were kept for six months in rearing tanks where three different kinds of food were checked (S: starvation, M: mussels, P: pellets). Mussels and pellets were provided in the respective groups three times per week. In order to study the gut bacterial diversity, *N. norvegicus* samplings were performed at the beginning of the experiment (t0) and after three (t1) and six months (t2). At the same time water samples from the rearing tanks and samples from the food provided were analyzed.

All the samples were analyzed using 16S rRNA clone libraries. Samples from the initial time point (t0) had similar results with the natural populations showing low bacterial diversities and dominant phylotypes with closest relatives belonging to the genera *Psychrobacter* and *Photobacterium*. All samples after six month rearing with pellets and mussels showed higher bacterial diversity than wild samples. However all of them had dominant phylotypes, with frequencies ranging from 22% to 73.5%, clustering in the species *Photobacterium leiognathi* and showing high percentages of similarity (>98%) with the respective *Photobacterium* like phylotypes of the wild populations. Previous microbiological and genomic studies have shown the presence of lipolytic, proteinolytic and chitinolytic enzymes in *P. leiognathi* enhancing the hypothesis of its assistance in *N. norvegicus* digestive activity.

Starvation samples as well as the three months mussel reared sample showed higher bacterial diversity than all other samples. As it was proved after statistical analysis their bacterial diversity was mostly influenced by the tanks'

water bacterial diversity. Statistical analysis for all samples showed the existence of two groups depending mostly on whether food was provided or not regardless of its kind. The basic discriminative characteristic between these two groups was the presence of phylotypes clustering in *P. leiognathi*.

For the first time, it was proved that food provision is an important factor for the shaping of gut bacterial communities of *N. norvegicus*. The factors that shape gut bacterial diversity, as well as abundant and potentially symbiotic microorganisms were detected. Bacterial phylotypes clustering in *P. leiognathi* with potential chitinolytic, proteinolytic and lipolytic activities were found abundant in the gut of wild and reared populations of *N. norvegicus* suggesting their use as probiotics in future rearing efforts.

Keywords: *Nephrops norvegicus*, midgut, Bacteria, 16S rRNA, rearing, *Photobacterium*, probiotics

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Π1:Μορφομετρικά στοιχεία των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ARISA και τις βιβλιοθήκες. Τα αναμεμιγμένα δείγματα φαίνονται με πλαγιαστά γράμματα, ενώ τα δείγματα για τις βιβλιοθήκες με έντονα γράμματα.

Δείγμα	Μήνας	Φύλο	Βάρος σώματος	Μήκος κεφαλοθώρακα	Πλάτος κεφαλοθώρακα
F40	Φεβρουάριος	A	89,91	50,21	27,47
F44	Φεβρουάριος	A	44,71	26,77	24,5
F1 <i>(F40/F44)</i>	Φεβρουάριο ς	A	67,31	38,49	25,985
Mr4	Μάρτιος	Θ	17,98	36,04	18,25
Mr10	Μάρτιος	Θ	26,31	36,4	18,6
Mr1(Mr4/ Mr10)	Μάρτιος	Θ	22,145	36,22	18,425
Mr26	Μάρτιος	A	30,35	40,6	22,47
My27	Μάιος	Θ	12,47	27,32	13,95
My44	Μάιος	A	49,79	42,75	21,84
My45	Μάιος	A	27,69	36,15	18,89
My46	Μάιος	A	29,2	37,22	17,64
My47	Μάιος	A	39,21	40,36	21,3
Jl1	Ιούλιος	Θ	38,51	38,54	20,51
Jl3	Ιούλιος	Θ	65,28	48,13	25,22
Jl14	Ιούλιος	A	59,9	44,79	23,18
Jl17	Ιούλιος	A	50,38	41,92	20,78
Jl19	Ιούλιος	A	39,73	40,16	19,65
Jl4(Jl14/Jl 17/Jl19)	Ιούλιος	A	50	42,29	21,2
Ag4	Αύγουστος	Θ	22,53	35,18	17,94
Ag6	Αύγουστος	Θ	28,35	35,94	18,67
Ag9	Αύγουστος	Θ	43,54	42,53	21,39
Ag1(Ag4/A g6/Ag9)	Αύγουστος	Θ	31,47	37,88	19,33
Ag2,1	Αύγουστος	Θ	30,66	36,4	18,3
Ag8	Αύγουστος	Θ	23,72	32,93	16,53
Ag16	Αύγουστος	Θ	22,05	35,66	18
Ag23	Αύγουστος	Θ	31,48	37,41	18,63
Ag31	Αύγουστος	A	52,58	42,46	21,34
Se1	Σεπτέμβριος	A	43,3	40,32	22,74
Se2	Σεπτέμβριος	A	68,9	44,96	27,17
Se3	Σεπτέμβριος	A	22,297	31,47	17,59
Se4	Σεπτέμβριος	Θ	45,85	40,92	20,53
Se5	Σεπτέμβριος	Θ	27,5	35,04	17,83
Se6	Σεπτέμβριος	Θ	21,61	31,67	19,32
Se7	Σεπτέμβριος	Θ	36,04	38,9	19,98
Se9	Σεπτέμβριος	Θ	31,51	37,58	19,35
Se11	Σεπτέμβριος	A	28,88	35,33	17,83
Se12	Σεπτέμβριος	A	32,41	37,94	18,45
O1	Οκτώβριος	Θ	36,71	38,36	19,21
O2	Οκτώβριος	Θ	24,8	35,61	16,44
O3	Οκτώβριος	Θ	17,37	29,97	14,91
O4	Οκτώβριος	Θ	11,85	28,59	13,34
O5	Οκτώβριος	A	29,12	36,84	17,72
O6	Οκτώβριος	A	27,76	35,71	17,35
D1	Δεκέμβριος	Θ	22,06	35,25	17,3
D2	Δεκέμβριος	Θ	21,99	32,12	16,23

Δείγμα	Μήνας	Φύλο	Βάρος σώματος	Μήκος κεφαλοθώρακα	Πλάτος κεφαλοθώρακα
D3	Δεκέμβριος	Θ	20,77	32,18	15,51
D4	Δεκέμβριος	A	32,78	40,05	19,48
D6	Δεκέμβριος	A	59,47	45,88	24,09
D7	Δεκέμβριος	A	18,85	35	17,32

Πίνακας Π2: Διάλυμα υβριδισμού για CARD FISH

FA%	20	30	40	50	60
NaCl 5 M			3.6 ml		
Tris-HCl 1 M			0.4 ml		
pH=8					
SDS 20%			20 μl		
Φορμαμίδιο (ml)	4	6	8	10	12
Νερό MiliQ (ml)	10	8	6	4	2
Αντιδραστήριο μπλοκαρίσματος			2ml		

Πίνακας Π3: Διάλυμα ξεπλύματος για CARD-FISH

FA%	20	30	40	50	60
EDTA 0.5M			0.5 ml		
Tris-HCl 1M			1.0 ml		
NaCl 5M (μl)	2150	1020	460	180	40
Νερό MiliQ		Προσθήκη σε τελικό όγκο 50 ml			
SDS 20%			25 μl		

Πίνακας Π4: Διάλυμα υβριδισμού για FISH (τελικός όγκος 2 ml)

FA%	0	10	20	30	40	50	60	70
NaCl 5M					360 μl			
Tris-HCl 1M					40 μl			
Φορμαμίδιο (μl)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1	1.2	1.4
10% SDS					2 μl			
Νερό MiliQ (ml)	1.6	1.4	1.2	1	0.8	0.6	0.4	0.2

Πίνακας Π5. Διάλυμα ξεπλύματος FISH

FA%	0	10	20	30	40	50	60	70
Tris-HCl 1M, pH=8					1 ml			
NaCl 5 M (ml)	9	4.5	2.15	1.02	0.46	0.18	0.04	-
EDTA 0.5 M (ml)	-	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.35

SDS 10%
MiliQ water

50 μl
Προσθήκη σε τελικό όγκο 50 ml

Πίνακας Π6: Σύσταση σύμψηκτων

Συστατικά (g/100g)	Σύμψηκτα
Ιχθυάλευρα	63.0
Ιχθυέλαια	9.0
Οργανικό πιστοποιημένο αλεύρι	26.5
<i>Ανάλυση κατά προσέγγιση</i>	Σύμψηκτα
Υγρασία (%)	10
Πρωτεΐνη (%)	45
Λιπίδια (%)	14
Ίνες (%)	0.6
Τέφρα (%)	11
Βιταμίνη A (IU/kg)	16000
Βιταμίνη D (IU/kg)	1600
Βιταμίνη C (mg/kg)	715
Βιταμίνη E (mg/kg)	830
Οξείδιο Ψευδαργύρου (mg/kg)	107
Θειικός σίδηρος (mg/kg)	267
Οξείδιο του μαγγανίου (mg/kg)	110
Θειικό κοβάλτιο (mg/kg)	8
Θειικός χαλκός (mg/kg)	9
Ινοσιτόλη	300
P (%)	1.5

Πίνακας Π7: Φυλότυποι των δειγμάτων των φυσικών πληθυσμών

Φυλότυπος	Συχνότητα	Κοντινότερος συγγενής	GenBank #	Ομοιότητα	Δείγμα εντοπισμού	Φυλογενετική θέση
F1-5	58,1%	<i>Pseudoalteromonas</i> sp, NPO-Jl-58	AY745828	99%	Βόρειος Ειρηνικός Ωκεανός	γ-Proteobacteria
F1-4	12,9%	<i>Psychrobacter aquimaris</i> , KOPRI 24929	EF101547	99%	Φαιοφύκος <i>Undaria pinnatifida</i>	γ-Proteobacteria
F1-7	6,4%	Ακαλλιέργητο Actinobacterium	EU374093	97%	Θαλάσσιο ιζημα	Actinobacteria
F1-2	3,2%	Ακαλλιέργητο βακτήριο	FJ203056	96%	Κοράλι <i>Montastrea faveolata</i>	γ-Proteobacteria
F1-6	3,2%	Ακαλλιέργητο βακτήριο	FJ545576	96%	Θαλάσσιο ιζημα	Acidobacteria
F1-18	3,2%	Ακαλλιέργητο Chloroflexi	DQ811871	98%	Έδαφος Μαγγρόβιων	Chloroflexi
F1-19	3,2%	Ακαλλιέργητο Acidobacterium	DQ395041	96%	Θαλάσσιο ιζημα σε λιμάνι	Acidobacteria
F1-20	3,2%	ακαλλιέργητο Actinobacterium	EF208654	96%	Αμμόδες ιζημα	Actinobacteria
F1-26	3,2%	ακαλλιέργητο Actinobacterium	EU374093	99%	Θαλάσσιο ιζημα	Actinobacteria
F1-28	3,2%	ακαλλιέργητο bacterium	FJ695595	98%	Κοράλι <i>Acropora digitifera</i>	γ-Proteobacteria
My46-424	74,1%	<i>Psychrobacter</i> sp, Pi 2-33	AB365059	99%	Παράκτιος θαλασσινος πάγος	γ-Proteobacteria
My46-492	19,0%	<i>Vibrio lentus</i> στέλεχος Sat201	AY292936	99%	<i>Sepiolo atlantica</i>	γ-Proteobacteria
My46-460	3,4%	<i>Vibrio lentus</i> στέλεχος Sat201	AY292936	99%	<i>Sepiolo atlantica</i>	γ-Proteobacteria
My46-442	1,7%	<i>Planococcus rifitiensis</i> strain M8	AJ493659	99%	Θειούχο νερό	Firmicutes
My46-484	1,7%	ακαλλιέργητο bacterium, κλώνος IC-24	AB255057	98%	Διαβρωμένο τσιμέντο	Firmicutes
Jl1-36	73,3%	<i>Photobacterium leiognathi</i>	AY292917	99%	Στέλεχος	γ-Proteobacteria
Jl1-4	13,3%	<i>Photobacterium</i> sp, JT-ISH-224	AB293986	99%	Έντερο Μπαράκουντα	γ-Proteobacteria
Jl1-1	6,6%	<i>Photobacterium leiognathi</i> strain RM1	AY292947	99%	Έντερο καλαμαριού <i>Rondeltiola minor</i>	γ-Proteobacteria
Jl1-22	3,3%	<i>Psychrobacter aquimaris</i>	EF101547	99%	Φαιοφύκος <i>Undaria pinnatifida</i>	γ-Proteobacteria
Jl1-28	3,3%	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος CK_1_C4_1	EU488044	87%	Ίζημα από θαλάσσια λιβάδια	CK-1C4-19
Ag31-3	31,9%	<i>Photobacterium leiognathi</i> στέλεχος RM1	AY292947	99%	Έντερο καλαμαριού <i>Rondeltiola minor</i>	γ-Proteobacteria
Ag31-6	27,3%	<i>Photobacterium leiognathi</i>	AY292917	98%	Στέλεχος	γ-Proteobacteria
Ag31-15	13,6%	<i>Vibrio lentus</i>	AY292936	98%	<i>Sepiolo atlantica</i>	γ-Proteobacteria

Φυλότυπος	Συχνότητα	Κοντινότερος συγγενής	GenBank #	Ομοιότητα	Δείγμα εντοπισμού	Φυλογενετική θέση
Ag31-2	9,1%	ακαλλιέργητο bacterium, κλωνος IC-41	AB255065	99%	Διαβρωμένο τσιμέντο	γ-Proteobacteria
Ag31-1	4,5%	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633	BA000031	99%	Στέλεχος	γ-Proteobacteria
Ag31-21	4,5%	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 chromosome 1	FM954972	98%	Στέλεχος	γ-Proteobacteria
Ag31-22	4,5%	<i>Vibrio salmonicida</i> στέλεχος PB1-8rrnB	EU091324	99%	Ιππόγλωσσος <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	γ-Proteobacteria
Ag31-13	4,5%	<i>Photobacterium</i> sp, HAR23	AB038031	99%	Βορειοδυτικός Ειρηνικός Ωκεανός	γ-Proteobacteria
Se3-204	83,0%	ακαλλιέργητο Mollicutes	DQ340200	90%	Έντερο <i>Gillichthys mirabilis</i>	Mollicutes
Se3-206	5,6%	<i>Desulfatibacillus olefinivorans</i> στέλεχος LM2801	DQ826724	87%	Στέλεχος	δ-Proteobacteria
Se3-199	3,8%	<i>Ralstonia</i> sp, FRA01	AF098288	99%	Κλινικό δείγμα	β-Proteobacteria
Se3-178	3,8%	<i>Dechloromonas</i> sp, HZ	AF479766	98%	Γλυκό νερό	β-Proteobacteria
Se3-129	1,9%	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος CK_1_C4_19	EU488044	87%	Ίζημα από θαλάσσια λιβάδια	CK-1C4-19
Se3-157	1,9%	ακαλλιέργητο bacterium, DSSD33	AY328732	99%	Σύστημα διανομής πόσιμου νερού	α-Proteobacteria
O2-1	76,0%	<i>Photobacterium leiognathi</i> στέλεχος RM1	AY292947	99%	Έντερο καλαμαριού <i>Rondeltiola minor</i>	γ-Proteobacteria
O2-8	16,0%	<i>Vibrio splendidus</i> στέλεχος PB1-10rrnH	EU091332	99%	Στέλεχος	γ-Proteobacteria
O2-23	4,0%	<i>Vibrio salmonicida</i> στέλεχος PB1-8rrnB	EU091324	99%	Στέλεχος	γ-Proteobacteria
O2-37	4,0%	ακαλλιέργητο bacterium, WA_08f	EF123487	98%	Κοράλι <i>Siderastrea siderata</i>	γ-Proteobacteria
D1-695	86,0%	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος CK_1_C4_19	EU488044	87%	Ίζημα από θαλάσσια λιβάδια	CK-1C4-19
D1-668	2,2%	<i>Dechloromonas</i> sp, HZ	AF479766	99%	Γλυκό νερό	β-Proteobacteria
D1-669	2,2%	Βακτήριο αρκτικού πάγου	AF468382	99%	Αρκτικός πάγος	γ-Proteobacteria
D1-715	2,2%	<i>Psychrobacter celer</i>	EF101550	98%	Φαιοφύκος <i>Undaria pinnatifida</i>	γ-Proteobacteria
D1-727	2,2%	Ακαλλιέργητο bacterium	EU137440	99%	<i>Oropsyla hirsuta</i> (ψύλλος)	Actinobacteria

Φυλότυπος	Συχνότητα	Κοντινότερος συγγενής	GenBank #	Ομοιότητα	Δείγμα εντοπισμού	Φυλογενετική θέση
D1-684	2,2%	Oh3137A10B <i>Psychromonas japonica</i>	AB304804	98%	από σκύλο Ίζημα σε whale falls	γ-Proteobacteria
D1-674	1,1%	<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908	CP000961	99%	Στέλεχος	γ-Proteobacteria
D1-700	1,1%	<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN	CP001053	98%	Στέλεχος	β-Proteobacteria

Πίνακας Π8: Πίνακας αναγνώρισης κορυφών της ARISA από την χρήση των παγκόσμιων εκκινητών

Φυλότυποι	Φυλογενετική θέση	F1	Mr1	Mr26	My27	My44	My45	My46	My47	JI1	JI3	JI4	Ag16	Ag1	Ag2,1	Ag23	Ag31	Ag8
Se3-129/D1-695/ JI1-28	CK_1C4-19 (246)	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,10	-	-	-	-	-
My46-442	<i>Planococcus</i> sp.(273)	-	-	-	-	-	-	0,33	-	-	-	-	0,32	-	-	-	-	-
My46-484	<i>Planomicrobium</i> sp (295)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D1-727	<i>Propionibacterium</i> sp (301)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,10	-	-	0,56	-	-	0,36	0,17	0,12
Se3-204	Mollicutes 1 (317)	-	0,09	-	-	-	-	-	-	0,50	1,54	18,65	1,59	0,18	-	0,51	0,36	0,46
F1-6	<i>Acidobacterium</i> (320)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,32	9,41	9,62	-	-	-	-	-
F1-20	<i>Actinobacterium</i> (367)	-	2,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,24	-	-	-	-	-
F1-5	<i>Pseudoalteromonas</i> sp (385)	8,63	-	-	-	0,29	-	-	-	-	-	-	3,42	-	-	0,62	0,11	-
F1-26	<i>Actinobacterium</i> (390)	-	-	1,17	-	-	-	-	-	0,28	-	0,14	0,25	-	-	-	-	-
NO2-2	<i>Photobacterium leiognathi</i> (421)	-	5,57	-	0,28	-	0,14	-	0,11	1,43	1,80	0,22	0,30	11,53	7,76	0,40	17,77	0,34
My46-492	<i>Vibrio lentus</i> (444)	-	-	-	0,65	-	0,15	1,53	-	-	-	-	0,19	-	-	-	-	-
D1-674	<i>Shewanella</i> sp (450)	-	-	-	-	-	-	-	0,29	-	0,27	-	-	-	2,34	-	-	-
F1-7	<i>actinobacterium</i> (455)	-	0,10	2,89	2,75	-	0,29	-	0,22	0,12	-	0,59	-	2,51	0,51	-	-	-
F1-18	<i>chloroflexi</i> (489)	0,28	-	-	-	-	-	-	0,94	0,80	-	-	7,66	0,12	0,21	3,35	2,15	0,78
Se3-204	Mollicutes (508)	0,33	-	0,95	-	-	4,80	1,93	5,57	0,18	-	-	0,62	-	0,73	1,00	0,73	1,95
My46-460/Se3-178/D1-668	<i>Vibrio lentus</i> (517)/ <i>Dechloromonas</i> sp,	0,35	-	0,17	-	-	0,41	-	1,02	-	-	-	0,11	-	-	0,31	-	-
NO2-10	<i>V.slendius</i> (518)	0,27	7,13	3,73	-	1,42	3,09	2,60	3,19	-	-	-	0,88	-	1,56	0,94	0,75	2,57
Se3-206	<i>Desulfatiferula</i> (624)	-	-	0,69	0,56	11,75	0,10	5,65	2,36	-	-	-	0,34	-	0,35	0,86	-	0,97
D1-715	<i>Psychrobacter celer</i> (625)	-	-	0,10	0,26	-	-	-	-	-	1,10	0,27	-	-	-	-	-	0,37

Φυλότυποι	Φυλογενετική θέση	F1	Mr1	Mr26	My27	My44	My45	My46	My47	Jl1	Jl3	Jl4	Ag16	Ag1	Ag2,1	Ag23	Ag31	Ag8
F1-2	Unc gamma (639)	-	-	-	0,60	-	-	0,40	-	-	0,17	-	-	5,50	1,93	-	0,18	-
F1-4	<i>Psychrobacter aquimaris</i> (666)	0,17	2,11	2,79	-	1,68	0,75	2,74	3,67	0,10	1,52	-	-	-	0,31	0,51	1,08	2,09
My46-424b	<i>Psychrobacter</i> sp.(669)	8,74	-	0,54	3,40	-	5,39	1,79	0,54	-	0,21	-	0,48	9,27	1,23	0,84	1,25	2,54
N02-46(679bp)	<i>Photobacterium leiognathi</i> (679)																	
D1-700 (679)	<i>Burkholderia</i> sp (679)	-	2,43	0,38	1,80	-	-	0,53	-	0,93	-	-	-	-	3,15	-	-	-
My46-424a	<i>Psychrobacter</i> sp, (681)	-	-	0,37	3,55	1,68	1,76	-	0,52	-	3,87	1,02	-	-	0,17	2,74	-	0,54
Se3-157	Uncultured alpha (707)	-	-	4,15	-	2,00	-	-	-	0,34	0,12	-	-	-	0,89	0,34	0,17	2,10
F1-29	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> (733)	11,93	0,51	-	-	-	-	-	-	0,13	-	-	0,28	-	-	-	-	-

Φυλότυποι	Φυλογενετική θέση	Se11	Se12	Se1	Se2	Se3	Se4	Se5	Se6	Se7	Se9	O1	O2	O3	O4	O5	O6	D1	D2	D3	D4	D6	D7
Se3-129	CK_1C4-19 (246)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
My46-442	<i>Planococcus</i> sp.(273)	-	0.1	-	-	-	0.1	0.1	0.1	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	-	-	-
My46-484	<i>Planomicrobium</i> sp (295)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-
D1-727	<i>Propionibacterium</i> sp (301)	-	0.4	-	-	0.2	-	0.2	0.4	-	-	-	-	0.2	0.1	-	-	0.3	-	0.1	-	0.1	-
Se3-204	<i>Mollicutes</i> 1 (317)	0.6	3.8	0.2	0.2	1.0	0.3	0.6	0.9	5.3	2.4	0.2	0.2	1.3	0.7	0.8	-	0.7	5.5	0.5	-	0.2	0.3
F1-6	<i>Acidobacterium</i> sp. (320)	-	-	-	-	-	-	-	-	3.5	0.8	-	-	-	-	-	-	2.1	-	-	-	-	-
F1-20	<i>Actinobacterium</i> (367)	0.3	0.3	-	-	0.1	-	0.2	0.3	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	0.2	0.1	-	-	-
F1-5	<i>Pseudoalteromonas</i> sp (385)	-	0.2	0.5	-	0.4	-	0.2	1.9	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-
F1-26	<i>Actinobacterium</i> (390)	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	0.3	-
N02-2	<i>Photobacterium leiognathi</i> (421)	2.3	1.1	7.4	1.9	0.6	-	0.6	-	0.3	0.5	16.2	10.1	4.5	19.9	9.2	2.4	2.7	7.0	1.0	11.9	5.3	3.5
My46-492	<i>Vibrio lentus</i> (444)	0.7	0.2	0.1	-	-	0.2	0.1	-	0.9	0.5	-	-	-	-	0.8	0.4	-	-	0.5	0.1	-	1.2
D1-674	<i>Shewanella</i> sp (450)	-	-	0.5	-	0.2	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	0.8	0.3	2.9	1.2	-
F1-7	<i>actinobacterium</i> (455)	0.3	1.2	0.3	-	-	0.3	0.1	0.6	0.6	0.2	1.3	1.7	0.6	4.7	0.7	0.1	0.7	0.3	0.5	-	0.9	0.4
F1-18	<i>chloroflexi</i> (489)	2.7	5.0	1.5	0.8	2.7	0.9	2.5	4.6	0.4	3.9	0.9	0.3	2.2	0.7	1.4	0.5	2.6	1.3	0.9	0.4	0.3	1.5
Se3-204	<i>Mollicutes</i> (508)	0.6	0.5	0.2	0.4	0.5	0.2	0.6	1.0	-	0.7	0.3	-	0.3	0.4	0.5	0.2	0.2	0.4	0.4	0.2	-	0.2
My46-	<i>Vibrio lentus</i>	-	1.0	0.2	-	-	-	-	-	0.3	-	0.3	-	-	-	0.3	-	0.5	0.1	-	-	-	-

Φυλότυποι	Φυλογενετική θέση	Se11	Se12	Se1	Se2	Se3	Se4	Se5	Se6	Se7	Se9	O1	O2	O3	O4	O5	O6	D1	D2	D3	D4	D6	D7
460/Se3-178	(517)/ <i>Dechloromonas</i> sp.																						
N02-10	<i>V.slendius</i> (518)	4.4	-	2.1	2.4	9.5	1.0	3.6	3.8	2.4	10.4	1.6	0.6	19.6	1.3	6.9	0.3	7.0	4.4	6.1	1.8	1.5	1.5
Se3-206	<i>Desulfatiferula</i> (624)	-	-	1.0	0.3	-	0.9	0.9	4.9	0.2	0.2	-	0.2	-	-	-	0.6	-	0.2	-	-	-	-
D1-715	<i>Psychrobacter celer</i> (625)	-	-	-	-	0.3	1.8	-	-	-	0.3	-	-	-	-	0.3	0.5	-	0.2	-	-	-	0.2
F1-2	Unc gamma (639)	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	1.3	1.4	-	3.8	1.3	-	-	0.4	-	3.6	0.9	0.2
F1-4	<i>Psychrobacter aquimaris</i> (666)	0.4	-	0.9	-	4.2	0.2	-	-	-	0.4	-	0.1	-	-	-	2.6	-	-	-	-	-	-
My46-424b	<i>Psychrobacter</i> sp.(669)	0.7	-	1.0	0.2	-	-	-	-	1.3	3.6	2.8	4.4	0.2	8.6	1.8	-	-	0.3	-	2.3	-	-
N02-46	<i>Photobacterium leiognathi</i> (679)																						
D1-700	<i>Burkholderia</i> sp (679)	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	-	7.3	-
My46-424a	<i>Psychrobacter</i> sp. (681)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	0.3	0.1	-	-	-
Se3-157	Uncultured alpha (707)	-	1.1	0.5	5.1	1.5	0.3	0.5	0.9	0.2	0.4	-	0.3	2.0	-	0.8	-	0.3	0.2	0.3	-	0.2	0.1
F1-29	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> (733)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-	-	0.3	-	-	-	-

Πίνακας Π9: Αναγνώριση φυλογενετικής θέσης κορυφών της ARISA με τη χρήση του εκκινητή ITSFmol

Φυλότυπος	Φυλογενετική θέση	fe1u	fe1m	mr26u	mr26m	my46u	my46m	my47u	my47m	jl1u	jl1m	jl3u	jl3m	ag1u	ag1m	ag23u	ag23m
Se3-129/D1-695/ J11-28	CK_1C4-19 (246)	0.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.34
My46-442	<i>Planococcus</i> sp.(273)	0.12	-	0.13	-	0.54	-	-	-	-	-	-	-	-	0.32	-	-
My46-484	<i>Planomicrobium</i> sp (295)	1.86	0.34	-	-	-	-	-	-	0.49	-	-	-	0.80	-	9.55	-
D1-727	<i>Propionibacterium</i> sp (301)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.38
Se3-204a	Mollicutes 1 (317)	-	1.20	-	0.29	-	-	-	-	0.18	1.82	-	-	-	5.78	0.36	2.26
F1-20	<i>Actinobacterium</i> (367)	-	-	0.64	1.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F1-5	<i>Pseudoalteromonas</i> sp (385)	7.32	16.17	0.17	-	-	-	-	-	-	0.10	-	-	-	-	-	-
F1-26	<i>Actinobacterium</i> (390)	-	0.18	0.25	1.23	-	-	-	-	-	-	1.20	1.37	-	-	-	0.45

Φυλότυπος	Φυλογενετική θέση	fe1u	fe1m	mr26u	mr26m	my46u	my46m	my47u	my47m	jl1u	jl1m	jl3u	jl3m	ag1u	ag1m	ag23u	ag23m
N02-2	<i>Photobacterium leiognathi</i> (421)	-	0.26	6.06	11.75	-	-	0.28	0.28	2.83	1.58	1.24	1.39	5.82	30.23	-	0.54
My46-492	<i>Vibrio lentus</i> (444)	0.11	1.12	0.73	1.02	-	-	-	-	1.99	1.04	-	-	-	-	-	-
D1-674	<i>Shewanella</i> sp (450)	-	0.20	-	1.58	-	-	-	-	0.23	-	0.13	0.10	1.10	0.97	1.41	-
F1-7	actinobacterium (455)	-	-	-	-	-	0.13	0.23	0.35	4.63	2.65	-	-	6.99	5.57	0.83	-
F1-18	chloroflexi (489)	0.31	0.17	-	-	-	-	0.45	0.62	-	-	-	-	-	-	-	-
Se3-204b	Mollicutes 2 (508)	0.39	-	-	-	1.86	2.30	4.73	5.71	-	-	-	-	-	-	1.36	-
My46-460/Se3-178/D1-668	<i>Vibrio lentus</i> (517)/ <i>Dechloromonas</i> sp.	0.50	-	3.79	-	2.24	2.68	2.15	2.30	0.12	-	-	-	-	-	3.94	-
Se3-206	<i>Desulfatiferula</i> (624)	-	-	-	-	1.56	3.29	0.55	2.73	-	-	-	-	-	-	1.33	-
D1-715	<i>Psychrobacter celer</i> (625)	-	0.22	-	-	2.05	3.43	0.14	0.22	-	9.41	1.25	1.37	-	-	-	30.52
F1-2	Unc gamma (639)	0.26	-	-	-	0.12	0.33	-	-	-	-	0.44	0.18	6.72	1.48	-	-
F1-4	<i>Psychrobacter aquimaris</i> (666)	0.45	0.15	1.09	-	1.39	4.19	0.76	1.37	-	-	0.21	0.27	-	-	2.16	-
My46-424b	<i>Psychrobacter</i> sp.(669)	-	-	-	-	1.14	-	1.13	1.79	-	-	-	-	3.34	-	-	-
N02-46(679bp)/D1-700	<i>Photobacterium leiognathi</i> (679)/ <i>Burkholderia</i>	-	-	2.91	0.27	-	0.42	0.62	0.90	-	-	7.62	5.40	0.34	-	3.79	-
My46-424a	<i>Psychrobacter</i> sp. (681)	5.47	-	-	0.71	2.33	-	1.53	2.64	1.32	0.86	4.49	5.01	3.06	-	-	-
Se3-157	Uncultured alpha (707)	-	-	-	-	-	-	-	0.22	-	-	-	-	-	-	-	-

Φυλότυπος	Φυλογενετική θέση	ag8u	ag8m	Se12u	Se12m	Se3u	Se3m	O1u	O1m	O2u	O2m	d1u	d1m	d2u	d2m
Se3-129/D1-695/ J11-28	CK_1C4-19 (246)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,86	-	-
My46-442	<i>Planococcus</i> sp,(273)	0,14	-	0,55	0,13	0,52	-	0,20	0,10	-	-	0,45	0,53	0,49	0,11
My46-484	<i>Planomicrobium</i> sp (295)	4,57	-	3,40	0,43	5,82	0,50	1,37	0,53	0,59	0,10	2,25	0,53	0,91	0,48
D1-727	<i>Propionibacterium</i> sp (301)	-	-	0,11	0,19	0,19	0,27	-	0,24	-	-	0,17	0,47	0,13	0,38
Se3-204a	Mollicutes 1 (317)	0,35	2,05	-	0,24	1,18	5,29	-	0,68	0,19	0,20	0,36	-	-	0,70
F1-20	<i>Actinobacterium</i> (367)	-	-	0,29	0,31	0,16	0,16	-	-	-	0,12	-	-	0,22	0,29
F1-5	<i>Pseudoalteromonas</i> sp (385)	0,20	-	-	-	0,41	-	-	-	-	-	-	0,10	-	-
F1-26	<i>Actinobacterium</i> (390)	-	-	-	0,42	0,15	0,18	-	0,13	-	0,14	1,75	0,18	-	0,32
O2-2	<i>Photobacterium leiognathi</i> (421)	0,84	-	1,62	0,58	0,70	-	18,34	9,27	7,55	9,85	0,13	-	8,57	3,92

Φυλότυπος	Φυλογενετική θέση	ag8u	ag8m	Se12u	Se12m	Se3u	Se3m	O1u	O1m	O2u	O2m	d1u	d1m	d2u	d2m
My46-492	<i>Vibrio lentus</i> (444)	0,19	-	-	-	0,34	-	0,17	-	1,13	0,29	0,50	-	-	-
D1-674	<i>Shewanella</i> sp (450)	-	-	0,22	-	1,34	0,22	-	-	-	-	0,44	12,79	0,49	-
F1-7	<i>actinobacterium</i> (455)	0,19	-	0,91	-	0,26	0,15	1,57	0,55	2,04	1,67	7,10	-	-	0,78
F1-18	<i>chloroflexi</i> (489)	0,22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,18	-	-
Se3-204b	<i>Mollicutes</i> 2 (508)	2,63	-	-	-	-	-	0,28	0,14	-	-	-	-	-	-
My46-460/Se3-178/D1-668	<i>Vibrio lentus</i> (517)/ <i>Dechloromonas</i> sp,	5,09	-	18,11	-	12,30	-	2,32	-	0,32	0,17	8,11	-	4,09	-
Se3-206	<i>Desulfatiferula</i> (624)	0,46	-	1,17	2,50	-	-	-	0,70	0,16	-	-	0,19	-	0,11
D1-715	<i>Psychrobacter celer</i> (625)	-	-	-	20,08	1,08	6,16	-	5,55	0,12	4,17	0,33	5,55	0,11	14,16
F1-2	<i>Unc gamma</i> (639)	-	-	-	0,23	-	-	1,21	0,44	1,18	1,24	-	-	0,23	0,31
F1-4	<i>Psychrobacter aquimaris</i> (666)	5,74	-	0,88	-	2,84	-	0,25	-	-	0,13	1,39	0,30	0,20	-
My46-424b	<i>Psychrobacter</i> sp,(669)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,07	0,12	-
N02-46(679bp)/D1-700	<i>Photobacterium leiognathi</i> (679)	0,47	-	0,41	-	-	-	-	-	2,81	2,83	0,14	-	-	-
My46-424a	<i>Psychrobacter</i> sp, (681)	-	-	-	-	-	-	9,52	2,56	6,26	7,09	-	-	3,09	1,25
Se3-157	Uncultured alpha (707)	-	-	-	0,32	-	0,30	-	0,20	-	-	-	0,31	0,50	0,52

Πίνακας Π10: Δείκτες ποικιλότητας για τα δείγματα των φυσικών πληθυσμών

0	F1	My46	Jl1	Ag31	Se3	O2	D1
Simpson (D)	0,5931	0,3995	0,3924	0,7769	0,304	0,3936	0,2249
Shannon (H)	1,344	0,6971	0,7449	1,668	0,7142	0,7593	0,5976
Margalef (d)	2,038	0,7388	0,8909	1,941	1,259	0,932	1,552

Πίνακας Π11: Πίνακας φυλότυπων για τα δείγματα του *Nephrops norvegicus* από τις εκτροφές

Φυλότυπος	Συχνότητα (%)	Κοντινότερος συγγενής	Genbank #	Ομοιότητα %	Δείγμα εντοπισμού	Φυλογενετική θέση
Nat1-12	66,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος My46-424	GQ866072	99	Έντερο <i>Nephrops norvegicus</i>	γ-Proteobacteria
Nat1-14	6,6	<i>Psychrobacter aquimaris</i> strain KOPRI24929	EF101547	98	Φαιοφύκος <i>Undaria pinnatifida</i>	γ-Proteobacteria
Nat1-9	6,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Ag31-3 (1)	GQ866101	99	Έντερο <i>Nephrops norvegicus</i>	γ-Proteobacteria
Nat1-2	3,3	<i>Psychrobacter</i> sp. JT05 g	AB554726	99	Ίζημα βαθιάς θάλασσας	γ-Proteobacteria
Nat1-3	3,3	<i>Psychrobacter</i> sp. mp2	AJ551116	99	Ίζημα βαθιάς θάλασσας	γ-Proteobacteria
Nat1-21	3,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος PET-137	JF344261	95	Θαλάσσιο ίζημα με πετρέλαιο	α-Proteobacteria
Nat1-19	3,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος D1-715	GQ866080	97	Έντερο <i>Nephrops norvegicus</i>	γ-Proteobacteria
Nat1-22	3,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Sc36	EU375214	100	Ίζημα με πετρέλαιο	Actinobacteria
Nat1-27	3,3	<i>Psychrobacter</i> sp. OK1	AB302184	99	Krill Ανταρκτικής (<i>Euphausia superba</i>)	γ-Proteobacteria
Nat2-8	48	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Ag31-3 (1)	GQ866101	99	Έντερο <i>Nephrops norvegicus</i>	γ-Proteobacteria
Nat2-24	8	<i>Colwellia psychroerythraea</i> (2)	AB011364	95	Θαλασσινό νερό	γ-Proteobacteria
Nat2-66	8	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Ty_Hep1.19 (3)	EU646197	91	Ηπατοπάγκρεας ισόποδου <i>Tylos europaeus</i>	Tenericutes

Φυλότυπος	Συχνότητα (%)	Κοντινότερος συγγενής	Genbank #	Ομοιότητα %	Δείγμα εντοπισμού	Φυλογενετική θέση
Nat2-35	8	<i>Acinetobacter</i> sp. 8A12N2	HQ246231	99	Σύστημα εκτροφής Tilapia (οστεϊχθείς)	γ-Proteobacteria
Nat2-22	4	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος C2E	DQ856531	97	Κινέζικος κάβουρας	α-Proteobacteria
Nat2-23	4	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος HG325	FN646739	96	Βλέννα ιππόκαμπου <i>Hippocampus guttulatus</i>	α-Proteobacteria
Nat2-34	4	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος UncDee44	AM997546	96	Βαθεία θάλασσα, νότιος ατλαντικός ωκεανός	Bacteroidetes
Nat2-41	4	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος 3H-225	EU786124	99	Ριζόσφαιρα βαμβακιού	α-Proteobacteria
Nat2-67	4	<i>Shewanella xiamenensis</i> strain CAIM 1494	HM584096	96	Βάτραχος <i>Rana catesbeiana</i>	γ-Proteobacteria
Nat2-73	4	<i>Pseudoruegeria</i> sp. JC2225	EU642855	99	Στέλεχος	α-Proteobacteria
Nat2-75	4,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Ty_Hep1.19	EU646197	90	Ηπατοπάγκρεας ισόποδου <i>Tylos europaeus</i>	Tenericutes
S3m1-6	15	<i>Marinicella litoralis</i>	AB500095	96	Θαλασσινό νερό	γ-Proteobacteria
S3m1-7	15	<i>Litoreibacter albidus</i> KMM3851	AB518881	99	Παράκτιο θαλασσινό περιβάλλον	α-Proteobacteria
S3m1-3	15	Βακτήριο θαλάσσιου σπόγγου plateOTU18	EU346505	99	Θαλάσσιος σπόγγος	α-Proteobacteria
S3m1-19	12,5	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος D1-727	GQ866081	98	Έντερο <i>Nephrops norvegicus</i>	Actinobacteria
S3m1-25	5	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος S26-124	EU287424	98	Αρκτικό ίζημα	α-Proteobacteria

Φυλότυπος	Συχνότητα (%)	Κοντινότερος συγγενής	Genbank #	Ομοιότητα %	Δείγμα εντοπισμού	Φυλογενετική θέση
S3m1-5	5	<i>Halomonas subterranea</i> strain ZG16	EF144148	99	Υπεράλμυρο ενδιαίτημα	γ-Proteobacteria
S3m1-15	5	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος DG948	AY258091	100	<i>Gymnodinium catenatum</i>	Alpha
S3m1-2	2,5	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος D6DMAG02	HQ216328	99	Μεσόκοσμος θαλάσσιων λυμάτων	α-Proteobacteria
S3m1-4	2,5	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος b66	EU919786	97	Θαλασσινό νερό αρκτικής	α-Proteobacteria
S3m1-8	2,5	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος 61 T0h-oil	FM242237	99	Ίζημα	γ-Proteobacteria
S3m1-10	2,5	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος 9 EDB2	AM882553	97	Ίζημα ρυπασμένο με έλαια	γ-Proteobacteria
S3m1-11	2,5	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος PM2-33	EF215821	97	Τεχνητές επιφάνειες σε θαλασσινό νερό	γ-Proteobacteria
S3m1-14	2,5	<i>Octadecabacter</i> sp. NF3-22	FJ196058	97	Θαλασσινό νερό ανταρκτικής	α-Proteobacteria
S3m1-18	2,5	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Tet1mes1B1	EU290251	97	Σπόγγος <i>Tethya californiana</i>	Verrucomicrobia
S3m1-20	2,5	<i>Vibrio tapetis</i> strain LP2	AY129278	99	<i>Symphodus melops</i> (οστεϊχθύς)	γ-Proteobacteria
S3m1-24	2,5	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Hg91H1	EU236379	99	<i>Haliclona</i> cf. <i>Gellius</i> sp. sponge	α-Proteobacteria
S3m1-29	2,5	<i>Marinomonas</i> sp. SC22	FN433057	99	Θυσανόποδο <i>Amphibalanus amphitrite</i>	γ-Proteobacteria
S3m1-42	2,5	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος B194	EU328045	99	Σχετικά αλμυρό έδαφος	γ-Proteobacteria

Φυλότυπος	Συχνότητα (%)	Κοντινότερος συγγενής	Genbank #	Ομοιότητα %	Δείγμα εντοπισμού	Φυλογενετική θέση
S6m1-2	7,6	<i>Pseudoalteromonas translucida</i> strain KMM 520	NR025655	99	Θαλασσινό νερό	γ-Proteobacteria
S6m1-3	12,8	<i>Marivita cryptomonadis</i> CL-SK44	EU512919	99	<i>Cryptophyta</i> sp. CR-MAL01	α-Proteobacteria
S6m1-10	12,8	Θαλάσσινο βακτήριο, στέλεχος ATAM 407-56	AF359535	100	Καλλιέργεια <i>Alexandrium tamarense</i>	α-Proteobacteria
S6m1-8	10,2	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος FS118-51B-02	AY704399	99	Ωκεάνια κρούστα	ε-Proteobacteria
S6m1-36	10,2	<i>Roseobacter</i> sp. 38.98	AY870684	98	Στρείδια	α-Proteobacteria
S6m1-15	5,1	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος D1-674	GQ866083	99	Έντερο <i>N.norvegicus</i>	γ-Proteobacteria
S6m1-1	5,1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. P58	EU935093	99	Ίζημα βαθιάς θάλασσας	γ-Proteobacteria
S6m1-24	7,7	<i>Vibrio splendidus</i> isolate PB1-10rrnH	EU091332	99	Ιππόγλωσσος <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	γ-Proteobacteria
S6m1-5	2,6	<i>Photobacterium leiognathi</i> strain LN101	AY292944	99	Καλαμάρι <i>Uroteuthis noctiluca</i>	γ-Proteobacteria
S6m1-6	2,6	<i>Psychroserpens mesophilus</i> strain KOPRI 13649	DQ001321	98	Θαλάσσιο biofilm	Bacteroidetes
S6m1-9	2,6	<i>Polaribacter dokdonensis</i> strain MED152	DQ481463	99	Επιφανειακό νερό Μεσογείου	Bacteroidetes
S6m1-11	2,6	<i>Vibrio gallaecicus</i> strain CECT 7244	EU541605	99	Καλλιεργημένα δίθυρα	γ-Proteobacteria
S6m1-22	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος plankton_H03	FJ664810	92		α-Proteobacteria

Φυλότυπος	Συχνότητα (%)	Κοντινότερος συγγενής	Genbank #	Ομοιότητα %	Δείγμα εντοπισμού	Φυλογενετική θέση
S6m1-28	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Milano-WF2B-15	AY592903	99	Μικροβιακός τάπητας βαθιάς θάλασσας	α-Proteobacteria
S6m1-29	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος SGUS1484	FJ202554	90	Κοράλι <i>Montastraea faveolata</i> σε ενυδρείο	Bacteroidetes
S6m1-33	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος MD2.22	FJ403071	97	<i>Montastrea faveolata</i>	Bacteroidetes
S6m1-35	2,6	<i>Marinomonas</i> sp. 139Z-17	GU584157	98	Θαλασσινό νερό	γ-Proteobacteria
S6m1-37	2,6	<i>Vibrio tapetis</i> strain LP2	AY129278	99	<i>Symphodus Melops</i> (οστεϊχθύς)	γ-Proteobacteria
S6m1-38	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος MD2.17	FJ403066	94	<i>Montastrea faveolata</i>	δ-Proteobacteria
S6m2-2	9,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος D1-727	GQ866081	98	Έντερο <i>Nephrops norvegicus</i>	Actinobacteria
S6m2-13	4,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος cuticle_2.4	HQ111166	99	Εμβρυϊκά στάδια <i>Hydra vulgaris</i>	β-Proteobacteria
S6m2-16	9,3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain ATCC 53510	FJ976090	99	Περιοχή ρυπασμένη με μέταλλα	γ-Proteobacteria
S6m2-15	4,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος W16_7	FR729092	100	Siboglinid πολύχαιτος	β-Proteobacteria
S6m2-3	7	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος D1-674	GQ866083	99	Έντερο <i>N.norvegicus</i>	γ-Proteobacteria
S6m2-8	4,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Lo_Hep1.15	EU646198	89	Ηπατοπάγκρεας Ισόποδου <i>Ligia oceanica</i>	Tenericutes

Φυλότυπος	Συχνότητα (%)	Κοντινότερος συγγενής	Genbank #	Ομοιότητα %	Δείγμα εντοπισμού	Φυλογενετική θέση
S6m2-59	4,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος F9P122000_S_G11	HQ673860	90	Υποαρктиκός Ειρηνικός ωκεανός. 2000 μ βάθος	Actinobacteria
S6m2-1	4,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος 61 T0h-oil	FM242237	99	Ίζημα	γ-Proteobacteria
S6m2-17	4,6	<i>Litoreibacter albidus</i> KMM3851	AB518881	98	Παράκτιο θαλασσινό ενδιαίτημα	α-Proteobacteria
S6m2-9	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος SS1_B_02_66	EU050781	96	Αρκτικό ίζημα	γ-Proteobacteria
S6m2-11	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος 1C226856	EU799275	98	Νερό λιμανιού	α-Proteobacteria
S6m2-12	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος F1-5	GQ866090	99	Έντερο <i>N.norvegicus</i>	γ-Proteobacteria
S6m2-14	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος SHZZ715	HQ163591	97	Υδάτινη στήλη, 120 μ βάθος	γ-Proteobacteria
S6m2-21	2,3	<i>Marinomonas blandensis</i> strain MED 121	DQ403809	96	Μεσογειακό επιφανειακό νερό	γ-Proteobacteria
S6m2-23	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος StromF11	EU918014	92	Στρωματολίτης	α-Proteobacteria
S6m2-24	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Bs28	EF137383	96	Ασκίδια	α-Proteobacteria
S6m2-28	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος HG343	FN646757	97	Βλενώδες κάλυμα του <i>Hippocampus guttulatus</i>	Actinobacteria
S6m2-29	2,3	<i>Octadecabacter</i> sp. NF3-22	FJ196058	97	Νερό από ανταρκτική	α-Proteobacteria
S6m2-34	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος OT-B09.21	AB252434	98	Θαλάσσιο ίζημα	δ-Proteobacteria

Φυλότυπος	Συχνότητα (%)	Κοντινότερος συγγενής	Genbank #	Ομοιότητα %	Δείγμα εντοπισμού	Φυλογενετική θέση
S6m2-35	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος 656080	DQ404635	88	Ρυπασμένο ίζημα	OP11
S6m2-36	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος ctg_CGOF357	DQ395670	95	Κοράλι βαθιάς θάλασσας	γ-Proteobacteria
S6m2-40	2,3	<i>Halomonas</i> sp. L18	EF533980	98	Νερό αλυκών	γ-Proteobacteria
S6m2-41	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος HAT3_488	AB476199	98	Κοιλιακή περιοχή καβουριών <i>Shinkaia crosnieri</i>	γ-Proteobacteria
S6m2-42	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Ag31-3	GQ866101	99%	Έντερο <i>N.norvegicus</i>	γ-Proteobacteria
S6m2-44	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος b28	EU919768	95	Θαλασσινό νερό	Verrucomicrobia
S6m2-47	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος BM1-F-19	FJ826117	98	Επιφανειακό θαλασσινό νερό μετά από άνθιση	γ-Proteobacteria
S6m2-51	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος B194	EU328045	99	Ελαφρώς αλμυρό έδαφος	γ-Proteobacteria
S6m2-54	2,3	<i>Candidatus Nitrotoga arctica</i> κλώνος 6680	DQ839562	99	Μόνιμα παγωμένο έδαφος	β-Proteobacteria
S6m2-62	2,3	<i>Geobacillus</i> sp. 46	GU994000	99	Στέλεχος	Firmicutes
M3m1-15	15,8	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος C2E	DQ856531	96	Έντερο κινέζικου κάβουρα	α-Proteobacteria
M3m1-41	15,8	ε-Proteobacterium Oy-M7 κλώνος 465.4	DQ357825	96	Μανδύας ενήλικου στρειδιού	ε-Proteobacteria
M3m1-25	10,5	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος G7-29	EU005339	98	Τεχνητές επιφάνειες σε θαλασσινό νερό	α-Proteobacteria

Φυλότυπος	Συχνότητα (%)	Κοντινότερος συγγενής	Genbank #	Ομοιότητα %	Δείγμα εντοπισμού	Φυλογενετική θέση
M3m1-20	7,9	<i>Vibrio</i> sp. r17	AB470928	95	Κοράλι <i>Montipora</i> sp.	γ-Proteobacteria
M3m1-14	5,3	<i>Persicivirga</i> sp. PHSCD-1	HM854017	87	<i>Laminaria</i> sp.	Bacteroidetes
M3m1-19	5,3	Rhodobacteraceae βακτήριο 183	AJ810844	97	Θαλασσινό νερό	α-Proteobacteria
M3m1-108	5,3	<i>Litoreibacter albidus</i> KMM3851	AB518881	96	Παράκτιο θαλασσινό ενδιάιτημα	α-Proteobacteria
M3m1-76	5,3	<i>Roseobacter</i> sp. 38.98 (12)	AY870684	97	Στρείδια	α-Proteobacteria
M3m1-38	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος J11-28	GQ866089	99	Έντερο <i>N. norvegicus</i>	CK-1C4-19
M3m1-68	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Bs28	EF137383	96	Ασκίδια	α-Proteobacteria
M3m1-70	2,6	<i>Hellea balneolensis</i> strain 26III/A02/215	AY576758	99	Στέλεχος	α-Proteobacteria
M3m1-79	2,6	<i>Colwellia psychroerythraea</i>	AB011364	98	Θαλασσινό νερό	γ-Proteobacteria
M3m1-81	2,6	<i>Pibocella ponti</i> strain KMM 6031	NR_025821	95	Φύκος <i>Acrosiphonia sonderi</i>	Bacteroidetes
M3m1-82	2,6	<i>Roseovarius</i> sp. E4-1	FN377714	99	Ίζημα (Svalbard)	α-Proteobacteria
M3m1-87	2,6	<i>Litoreibacter albidus</i> KMM3851	AB518881	98	Παράκτιο θαλασσινό περιβάλλον	α-Proteobacteria
M3m1-121	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος CF-28	FJ535311	98	Τάπητας σιδήρου	γ-Proteobacteria
M3m1-123	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Tet2mes1E10	EU290363	94	Σπόγγος <i>Tethya californiana</i>	Bacteroidetes
M3m1-132	2,6	<i>Psychroserpens mesophilus</i> strain KOPRI 13649	DQ001321	97	Θαλάσσιο biofilm	Bacteroidetes

Φυλότυπος	Συχνότητα (%)	Κοντινότερος συγγενής	Genbank #	Ομοιότητα %	Δείγμα εντοπισμού	Φυλογενετική θέση
M3m1-152	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος PM2-22	EF215810	99	Τεχνητές επιφάνειες βυθισμένες σε θαλασσινό νερό	α-Proteobacteria
M6m1-4	20,5	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Ag31-3	GQ866101	99%	Έντερο <i>Nephrops norvegicus</i>	γ-Proteobacteria
M6m1-56	17,9	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος TIGU1075	HM558927	99	Μυρμήγκι <i>Atta colombica</i>	γ-Proteobacteria
M6m1-2	12,8	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Ty_Hep1.19	EU646197	90	ηπατοπάγκρεας <i>Tylos europaeus</i>	Tenericutes
M6m1-22	5,1	Θαλάσσιο βακτήριο, στέλεχος ATAM407_2031	AF359536	98	Καλλιέργεια <i>Alexandrium tamarense</i>	α-Proteobacteria
M6m1-11	5,1	Θαλάσσιο βακτήριο, στέλεχος ATAM407-56	AF359535	99	Καλλιέργεια <i>Alexandrium tamarense</i>	α-Proteobacteria
M6m1-1	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος BMS_10	AF172925	85	Περιβαλλοντικό δείγμα	Unclassified
M6m1-10	2,6	<i>Pibocella ponti</i> strain KMM 6031	NR_025821	96	Φύκος <i>Acrosiphonia sonderi</i>	Bacteroidetes
M6m1-29	2,6	<i>Vibrio splendidus</i> isolate PB1-10rrnD	EU091328	99	Ιππόγλωσσος <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	γ-Proteobacteria
M6m1-30	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Ty_Hep1.19	EU646197	91	Ηπατοπάγκρεας ισόποδου <i>Tylos europaeus</i>	Tenericutes
M6m1-35	2,6	ε-Proteobacterium Oy-M7 κλώνος 465.4	DQ357825	96	Μανδύας ενήλικου στρειδιού	ε-Proteobacteria
M6m1-38	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος	FJ203077	98	Κοράλι <i>Montastrea</i>	α-Proteobacteria

Φυλότυπος	Συχνότητα (%)	Κοντινότερος συγγενής	Genbank #	Ομοιότητα %	Δείγμα εντοπισμού	Φυλογενετική θέση
		SHFG464			<i>falveolata</i>	
M6m1-41	2,6	<i>Acinetobacter</i> sp. Hg4-05	Eu304251	88	Έντερο προνύμφης <i>Hepialus gonggaensis</i>	γ-Proteobacteria
M6m1-45	2,6	<i>Leisingera nanhaiensis</i> DSM 24252 strain NH52F	FJ232451	99	Θαλάσσιο ίζημα	α-Proteobacteria
M6m1-47	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος clone v1t38	FM165265	98	σωλήνας χιτίνης του <i>Lamellibrachia</i> sp.	δ-Proteobacteria
M6m1-49	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος SHAB485	GQ348595	97	Υδάτινη στήλη 10 m βάθος	α-Proteobacteria
M6m1-51	2,6	<i>Marivita litorea</i> strain CL-JM1	EU512918	100	Παράκτιο θαλασσινό νερό	α-Proteobacteria
M6m1-53	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος PIS139	AY779705	89	Έντερο αχινού <i>Paracentrotus lividus</i>	α-Proteobacteria
M6m1-54	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος SHZZ715	HQ163591	97	Υδάτινη στήλη 120 m βάθος	γ-Proteobacteria
M6m1-62	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος A03-04A	FJ542833	93	Έντερο <i>Eisenia fetida</i> (Ανελίδες)	Verrucomicrobia
M6m1-69	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος AKAU3547	DQ125562	98	Έδαφος ρυπασμένο με ουράνιο	α-Proteobacteria
M6m2-6	28,9	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Ag31-3	GQ866101	99%	Έντερο <i>Nephrops norvegicus</i>	γ-Proteobacteria
M6m2-3	15,8	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Lo_Hep1.15	EU646198	88	Ηπατοπάγκρεας Ισόποδου <i>Ligia oceanica</i>	Tenericutes
M6m2-10	13,2	ε-Proteobacterium Oy-M7 κλώνος	DQ357825	95	Μανδύας ενήλικου	ε-Proteobacteria

Φυλότυπος	Συχνότητα (%)	Κοντινότερος συγγενής	Genbank #	Ομοιότητα %	Δείγμα εντοπισμού	Φυλογενετική θέση
		465.4			στρειδιού	
M6m2-4	7,9	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος SGS0523	GQ347793	99	Υδάτινη στήλη (10 m βάθος)	γ-Proteobacteria
M6m2-1	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος D1-727	GQ866081	99	Έντερο <i>Nephrops norvegicus</i>	Actinobacteria
M6m2-5	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Tun3b.G11	FJ169217	96	Ασκίδιο <i>Synoicum adareanum</i>	β-Proteobacteria
M6m2-8	2,6	<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain HNR19	EU373384	99	Ρίζα κινέζικου λάχανου	Firmicutes
M6m2-9	2,6	Θαλάσσιο βακτήριο ATAM407_2031	AF359536	97	Καλλιέργεια <i>Alexandrium tamarense</i>	α-Proteobacteria
M6m2-11	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος D1-674	GQ866083	98	Έντερο <i>Nephrops norvegicus</i>	γ-Proteobacteria
M6m2-12	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Ulrdd_31	AM997495	89	Λεκάνη Αγκόλας	γ-Proteobacteria
M6m2-20	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος ncd1041f04c1	HM343200	99	<i>Homo sapiens</i>	Firmicutes
M6m2-25	2,6	<i>Moritella</i> sp. ODA02	AB011353	98	Ειρηνικός ωκεανός	γ-Proteobacteria
M6m2-28	2,6	<i>Altererythrobacter luteolus</i> strain SW-109	AY739662	98	Κίτρινη θάλασσα	α-Proteobacteria
M6m2-31	2,6	<i>Colwellia psychroerythraea</i>	AB011364	97	Θαλασσινό νερό	γ-Proteobacteria
M6m2-36	2,6	<i>Kopriimonas byunsanensis</i> strain KOPRI 13522	DQ167245	99	Θαλάσσιο biofilm	α-Proteobacteria

Φυλότυπος	Συχνότητα (%)	Κοντινότερος συγγενής	Genbank #	Ομοιότητα %	Δείγμα εντοπισμού	Φυλογενετική θέση
M6m2-38	2,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος P9X2b7E03	EU491195	92	Λάβα	TM6
M6m2-42	2,6	<i>Vibrio splendidus</i> isolate PB1-10rrnB	EU091326	99	Ιππόγλωσσος <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	γ-Proteobacteria
P6m1-12	33,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος D1-674	GQ866083	99	Έντερο <i>Nephrops norvegicus</i>	γ-Proteobacteria
P6m1-18	20,8	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Ag31-3	GQ866101	99%	Έντερο <i>Nephrops norvegicus</i>	γ-Proteobacteria
P6m1-72	8,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος FCPN637	EF515914	94	Έδαφος λιβαδιού	Fibrobacteres
P6m1-15	4,2	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Bs28	EF137383	95	Ασκίδια	α-Proteobacteria
P6m1-23	4,2	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος B01-02G	FJ542926	96	Έντερο <i>Eisenia fetida</i> (Αννελίδες)	α-Proteobacteria
P6m1-54	4,2	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος LA07Ba03	GU133211	91	Μεσόκοσμοι αποικοδόμησης τουλουένιου	α-Proteobacteria
P6m1-58	4,2	<i>Marinomonas blandensis</i> strain MED 121	DQ403809	98	Μεσογειακό επιφανειακό νερό	γ-Proteobacteria
P6m1-60	4,2	<i>Colwellia psychroerythraea</i>	AB011364	95	Θαλασσινό νερό	γ-Proteobacteria
P6m1-61	4,2	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος v1t38	FM165265	99	σωλήνας χιτίνης του <i>Lamellibrachia</i> sp.	δ-Proteobacteria
P6m1-66	4,2	<i>Persicivirga</i> sp. PHSCD-1	HM854017	87	<i>Laminaria</i> sp.	Bactroidetes
P6m1-74	4,2	ε-Proteobacterium Oy-M7 κλώνος	DQ357825	96	Μανδύας ενήλικου	ε-Proteobacteria

Φυλότυπος	Συχνότητα (%)	Κοντινότερος συγγενής	Genbank #	Ομοιότητα %	Δείγμα εντοπισμού	Φυλογενετική θέση
		465.4			στρειδιού	
P6m1-75	4,2	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος SHFG464	FJ203077	98	Κοράλι <i>Montastrea falveolata</i>	α-Proteobacteria
P6m2-2	73,5	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Ag31-3	GQ866101	99%	Έντερο <i>Nephrops norvegicus</i>	γ-Proteobacteria
P6m2-18	11,8	<i>Vibrio splendidus</i> isolate PB1-10rrnD	EU091328	99	Ιππόγλωσσος <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	γ-Proteobacteria
p6m2-15	5,9	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος SGUS1261	FJ202774	93	Κοράλι <i>Montastrea falveolata</i>	Bacteroidetes
P6m2-20	2,9	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος WC3_191	GQ264091	98	Περιοχή με λύματα	Planctomycetes
P6m2-32	2,9	<i>Persicivirga</i> sp. PHSCD-1	HM854017	87	<i>Laminaria</i> sp.	Bactroidetes
P6m2-44	2,9	<i>Octadecabacter</i> sp. TB 71	EU237141	99	Σπόγγος ανταρκτικής	α-Proteobacteria

Πίνακας Π12: Δείκτες ποικιλότητας για τα δείγματα των εκτροφών

0	Nat1	Nat2	S3m1	S6m1	S6m2	M3m1	M6m1	M6m2	P6m1	P6m2
Simpson_1_D	0,54	0,7328	0,9025	0,9218	0,954	0,9141	0,8876	0,8587	0,8229	0,4394
Shannon_H	1,312	1,783	2,577	2,726	3,233	2,693	2,541	2,362	2,092	0,9557
Margalef	2,352	2,796	4,608	4,913	7,444	4,948	4,913	4,399	3,461	1,418

Πίνακας Π13: Πίνακας κλώνων για τα δείγματα των τροφών

Φυλότυπος	Συχνότητα(%)	Κοντινότερος Συγγενής	Genbank #	Ομοιότητα (%)	Απομόνωση	Φυλογένεση
Mus1-3	16,66	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Tun3b.E2	FJ169210	99	Χιτινόζωο	α- Proteobacteria
Mus1-5	16,66	<i>Vibrio</i> sp. κλώνος H02C48	HQ161443	99	Ανατολική Μεσόγειος	γ-Proteobacteria
Mus1-21	10	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος HG369	FN646711	99	Ιππόκαμπος	γ-Proteobacteria
Mus1-19	6,66	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SDMRI-B9	JF268254	99	Κοράλια	γ-Proteobacteria
Mus1-23	6,66	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος EB24.3	EU573099	97	Πετρελαιοφόρος περιοχή	ε-Proteobacteria
Mus1-60	6,66	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain IPC6	HQ108173	98	Λίμνη σταθεροποίησης	γ-Proteobacteria
Mus1-1	3,33	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος PI_RT201	AY580421	98	Βακτηριοπλαγκτόν	ε-Proteobacteria
Mus1-2	3,33	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Tc05Tet1ect	EU290395	98	Θαλάσσιος σπόγγος	γ-Proteobacteria
Mus1-14	3,33	Intranuclear bacterium of Bathymodiolus spp	FM162194	97	Bathymodiolus spp.	γ-Proteobacteria
Mus1-16	3,33	<i>Aeromonas veronii</i> strain CYJ102	FJ940846	99	Συκώτι κυπρίνου	γ-Proteobacteria
Mus1-22	3,33	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος FILTER11C226m	EU346429	94	Θαλάσσιος σπόγγος	Bacteroidetes
Mus1-25	3,33	Ακαλλιέργητο TG3 βακτήριο, κλώνος 700-II-8	AB256016	97	Ίζημα βαθιάς θάλασσας	TG3
Mus1-61	3,33	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος 2 3B 6	FJ800218	95	Θαλάσσιο ίζημα	γ-Proteobacteria
Mus1-62	3,33	<i>Lactobacillus</i> sp. C56	FJ611792	99	Έντερο κοτόπουλου	Firmicutes
Mus1-67	3,33	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος HG310	FN646724	93	Ιππόκαμπος	OD1
Mus1-73	3,33	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος FeSO4_B_168	GQ356983	99	Ίζημα πηγών μεθανίου	Fusobacteria
Mus1-80	3,33	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος V8-101	GQ488000	99	Ίζημα με βαρέα μέταλλα	Bacteroidetes
PI-1	21,4	<i>Lactobacillus agilis</i> strain: TB-B13.	AB425919	100	Κόπρανα αλόγων	Firmicutes
PI-13	17,8	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος O-80-33	EU862162	99	Σόγια υπό ζύμωση	Firmicutes
PI-3	10,7	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain DSPV 358T	FJ751795	99	Έντερο μόσχου	Firmicutes
PI-9	10,7	<i>Corynebacterium urealyticum</i> DSM 7109	AM942444	99	Στέλεχος	Actinobacteria
PI-20	7,1	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος B03271	FN667450	99	Δημοτική	Firmicutes

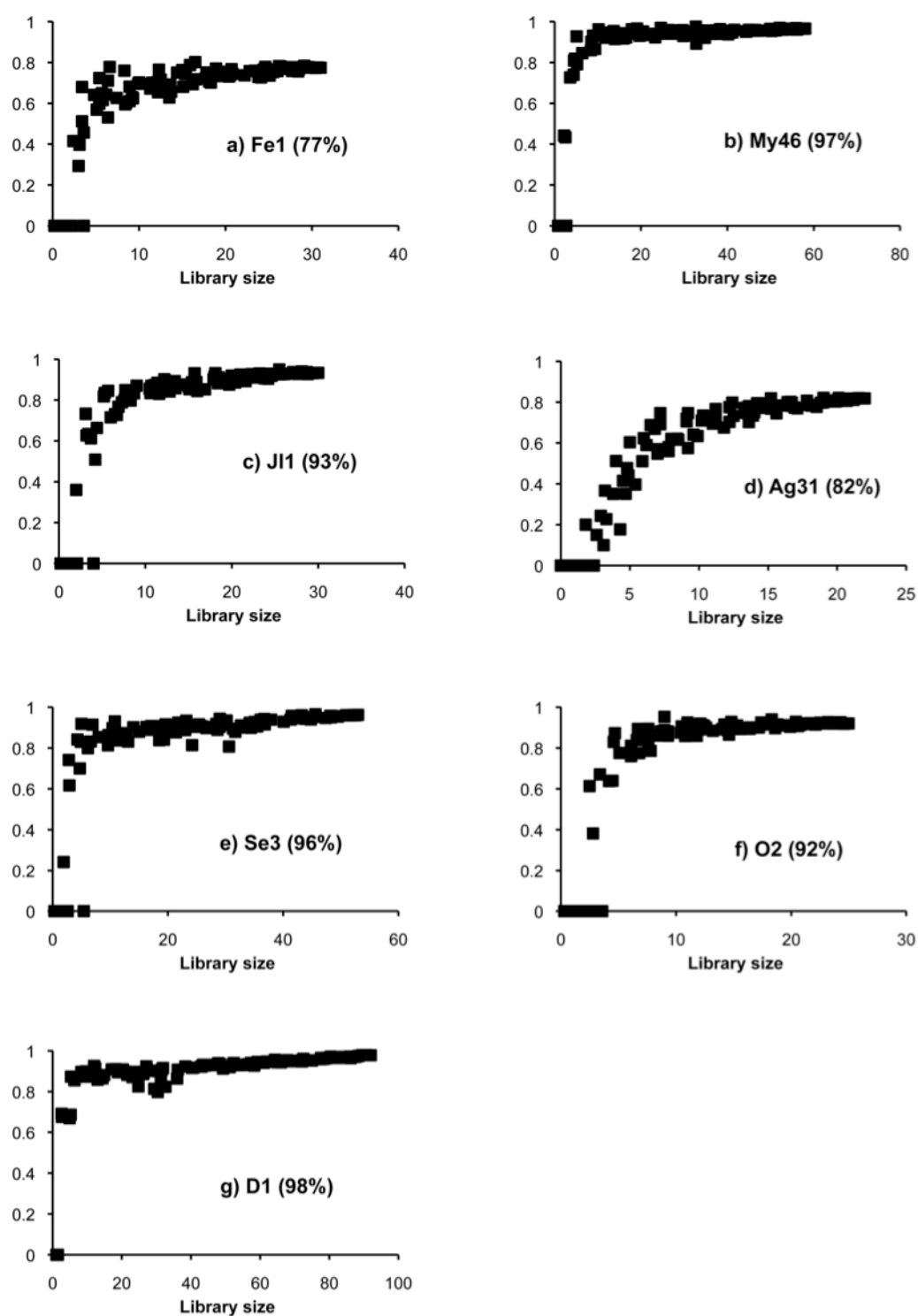
PI-31	7,1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> strain: YIT 0080 (= ATCC 9649)	AB008207	99	Στελεχος	Firmicutes
PI-2	3,6	<i>Oceanobacillus</i> sp. AvH 7	HQ316193	99	Δείγμα άμμου	Firmicutes
PI-14	7,1	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος E2	AM500764	99	Δείγμα κομποστοποίησης	Firmicutes
PI-18	3,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος PS2689	FN667356	99	Δείγμα κομποστοποίησης	Firmicutes
PI-21	3,6	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος GW35	GQ175353	99	Απορρίματα κοτόπουλων	Firmicutes
PI-22	3,5	<i>Vagococcus lutrae</i> isolate F01595	DQ395281	99	Θαλασσινό νερό	Firmicutes
PI-23	3,5	<i>Vagococcus lutrae</i> strain CAIM 1759	HM584114	99	-	Firmicutes

Πίνακας Π14: Πίνακας κλώνων για τα δείγματα του νερού

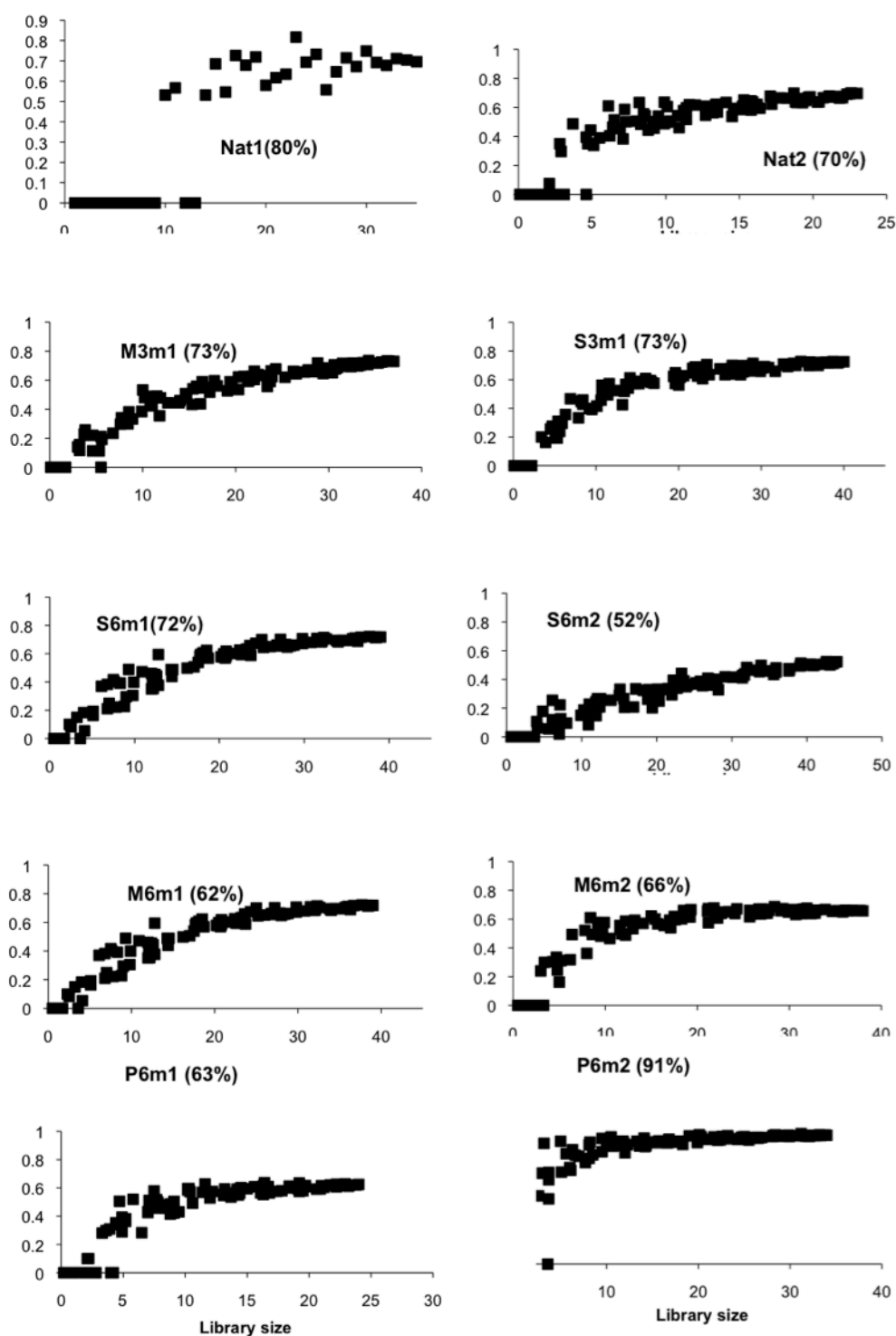
Φυλότυπος	Συχνότητα(%)	Κοντινότερος Συγγενής	Genbank #	Ομοιότητα (%)	Απομόνωση	Φυλογένεση
Wt2-1	23,52	<i>Kordia algicida</i> strain OT-1	NR_027568	98	Θαλάσσιο περιβάλλον	Bacteroidetes
Wt2-3	14,70	<i>Marivita litorea</i> strain CL-JM1	EU512918	98	Παράκτιο θαλασσινό νερό	Alpha
Wt2-4	8,8	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος HG310	FN646724	90	Βλέννα θαλάσσιου ίππου	OD1
Wt2-8	5,8	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος S1-43	EF491304	99	ατσαλινες επιφάνειες σε θαλασσινό νερό	Gamma
Wt2-9	8,8	<i>Polaribacter</i> sp. K20-5	HM010403	96	Θαλασσινό νερό	Bacteroidetes
Wt2-11	8,8	<i>Psychroserpens mesophilus</i> strain KOPRI 13649	DQ001321	98	Θαλάσσιος μικροβιακός τάπητας	Bacteroidetes
Wt2-12	8,8	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος PLY-P1-99	AY354728	96	Θαλασσινό νερό (άνθηση)	Bacteroidetes
Wt2-5	2,9	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος PLS139	AY770705	89	Πεπτικό σύστημα αχινού	Alpha
Wt2-19	2,9	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος PM2-21	EF215890	98	Τεχνητές επιφάνειες βυθισμένες	Alpha

Φυλότυπος	Συχνότητα(%)	Κοντινότερος Συγγενής	Genbank #	Ομοιότητα (%)	Απομόνωση	Φυλογένεση
Wt2-20	2,9	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος 6C232235	EU804332	89	σε θαλασσινό νερό	Alpha
Wt2-21	2,9	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος S26-41	EU287341	99	Θαλασσινό νερό	Alpha
Wt2-23	2,9	Βακτήριο plateOTU18	EU346505	99	Θαλάσσιο ίζημα αρκτικής	Alpha
Wt2-24	2,9	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος SHZW466	HQ163166	94	Θαλάσσιος σπόγγος	Alpha
Wt2-34	2,9	στέλεχος ATAM407-56 (11)	AF359535	99	Θαλασσινό νερό	Gamma
Wt3-12	47,7	στέλεχος ATAM407-56 (11)	AF359535	99	Alexandrium tamarense culture	Alpha
Wt3-15	4,5	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος Tet1ect1D1	EU290190	91	Alexandrium tamarense culture	Alpha
Wt3-21	4,5	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος 33C6	EU183908	97	Θαλάσσιος σπόγγος	Delta
Wt3-19	6,8	<i>Marivita cryptomonadis</i> CL-SK44	EU512919	99	Θαλάσσιος σπόγγος	Unclassified
Wt3-25	4,5	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος EthaneSIP11-4-13	GU584583	97	Cryptophyta sp. CR-MAL01	Alpha
Wt3-42	4,5	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος 6C232235	EU804332	89	Θαλάσσια πηγή	Αταξινόμητο
Wt3-2	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος PI_4c10d	AY580694	99	υδρογονανθράκων	Alpha
Wt3-5	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος pltb-HW-70	AB294914	90	Θαλασσινό νερό	Alpha
Wt3-23	2,3	<i>Burkholderia tropica</i> strain TAt-0750	EU723241	99	Βακτηριοπλανκτόν	Bacteroidetes
Wt3-24	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος G7-25	EU005335	98	Ρηχή υδροθερμική πηγή	Αταξινόμητο
Wt3-26	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος S25_468	EF574124	88	Ριζοσφαιρα ντομάτας	Beta
Wt3-29	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος HAT3_441	AB476197	98	Τεχνητές επιφάνειες βυθισμένες σε θαλασσινό νερό	Alpha
Wt3-31	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος HG310	FN646724	95	Θαλασσινό νερό	Gamma
Wt3-33	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος S2-66	EU491382	96	Επιβιώτης καβουριού	Bacteroidetes
Wt3-35	2,3	<i>Planctomyces maris</i> strain 534-30	NR_025327	99	Βλέννα θαλάσσιου ίππου	OD1
Wt3-36	2,3	<i>Roseivirga</i> sp. F8	EU697080	87	ατσαλινες επιφάνειες σε θαλασσινό νερό	Bacteroidetes
Wt3-40	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος 137b1	EF459871	89	Στέλεχος	Planctomycetes
Wt3-48	2,3	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος MethaneSIP16-4-01	GU584424	98	Ίζημα μαγγρόβιων	Bacteroidetes
Wt4-9	47,1	<i>Marivita cryptomonadis</i> CL-SK44 , 99%	EU512919	99	Θαλάσσιο ίζημα	Αταξινόμητο
Wt4-26	14,7	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος CB51F09	EF471634	99	Πηγή υδρογονανθράκων	Αταξινόμητο
Wt4-2	5,9	<i>Octadecabacter</i> sp. ZS6-13	FJ889680	96	Θαλασσινό νερό ανταρκτικής	Alpha

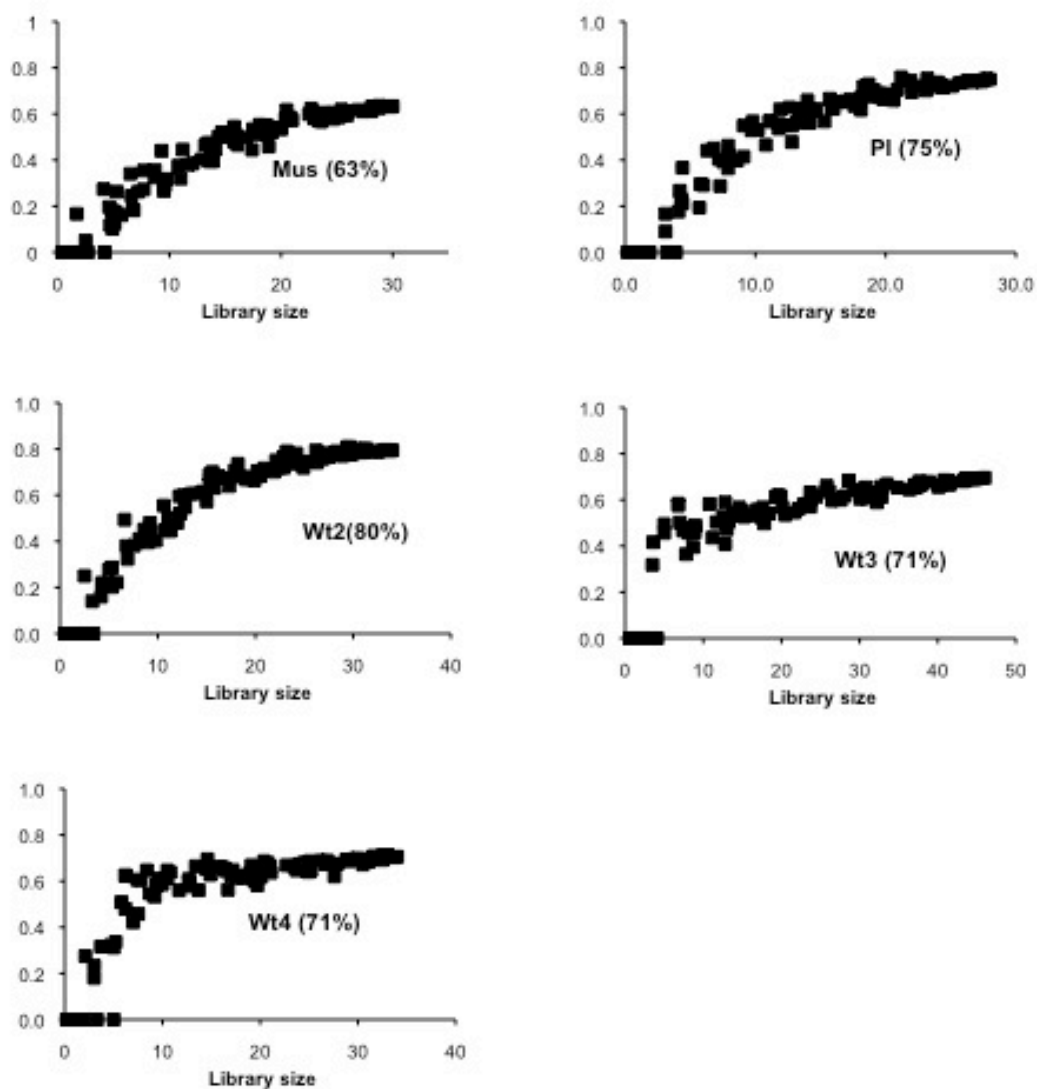
Φυλότυπος	Συχνότητα(%)	Κοντινότερος Συγγενής	Genbank #	Ομοιότητα (%)	Απομόνωση	Φυλογένεση
Wt4-4	5,9	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος HG310	FN646724	93	Βλέννα θαλάσσιου ίππου	OD1
Wt4-8	2,9	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος xmg-7	HM116850	99	Θαλασσινό νερό	Alpha
Wt4-10	2,9	Στέλεχος GMD37B4	AY162078	95	Βακτηριοπλανκτόν	Alpha
Wt4-11	2,9	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος HG344	FN646758	97	Βλέννα θαλάσσιου ίππου	Αταξινόμητο
Wt4-14	2,9	<i>Marivita litorea</i> strain CL-JM1	EU512918	97	Coastal seawater	Alpha
Wt4-17	2,9	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος IHE3_151.	AB476267	97	Επιβιωτικό βακτήριο σε καβουρι	BD1-5
Wt4-19	2,9	<i>Planctomyces maris</i> strain 534-30	NR_025327	99	Στέλεχος	Planctomycetes
Wt4-23	2,9	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος SGSH795	GQ347607	95	Θαλασσινό νερό	TM6
Wt4-30	2,9	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος EF0505	EF657862	91	Συμβιώτης κοραλίου	Bacteroidetes
Wt4-37	2,9	Ακαλλιέργητο βακτήριο, κλώνος ctg_CGOF326	DQ395877	95	Συμβιώτης κοραλίου	Alpha



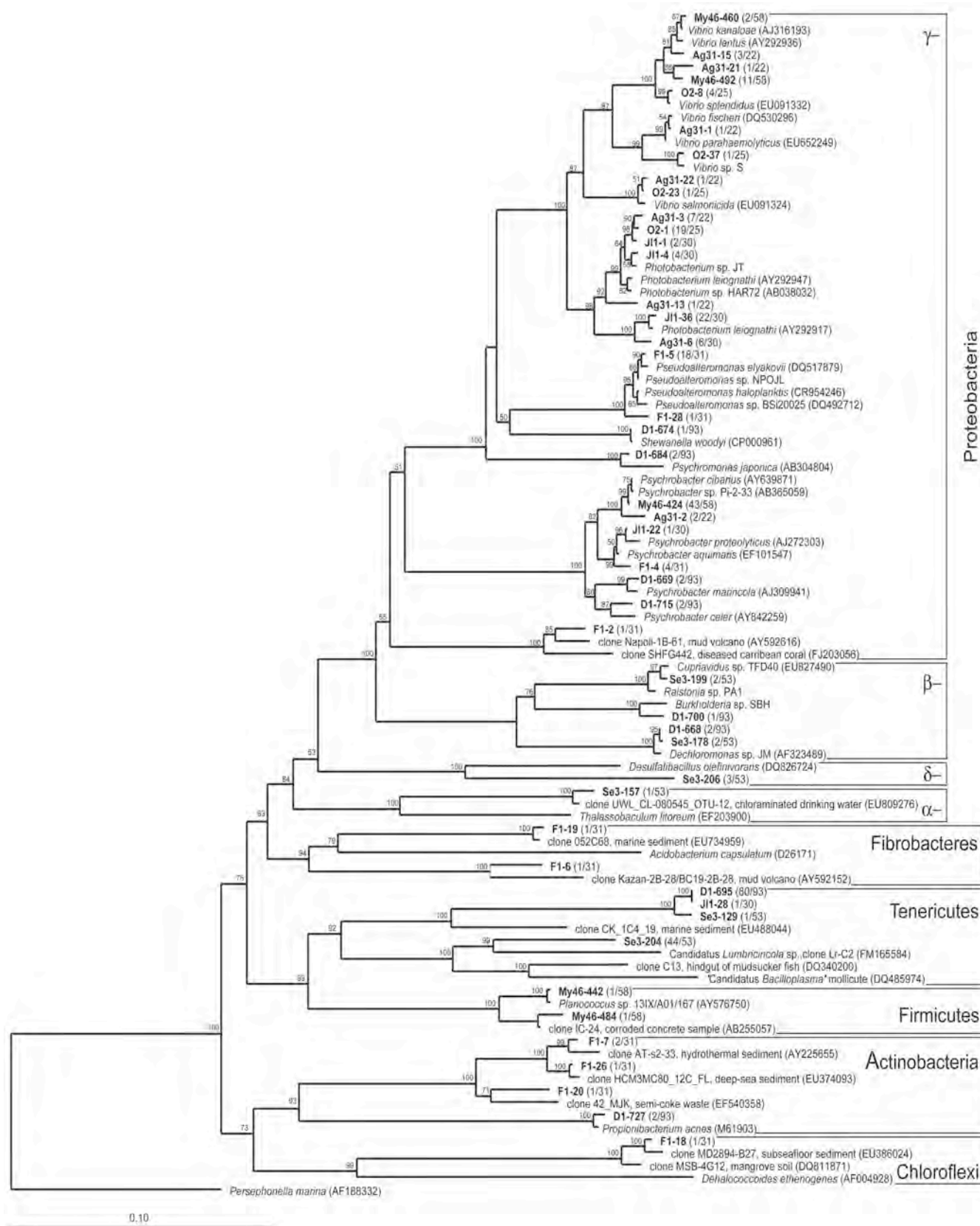
Σχήμα Π1: Κάλυψη των βιβλιοθηκών των φυσικών πληθυσμών



Σχήμα Π2: Κάλυψη των βιβλιοθηκών των εκτρεφόμενων πληθυσμών

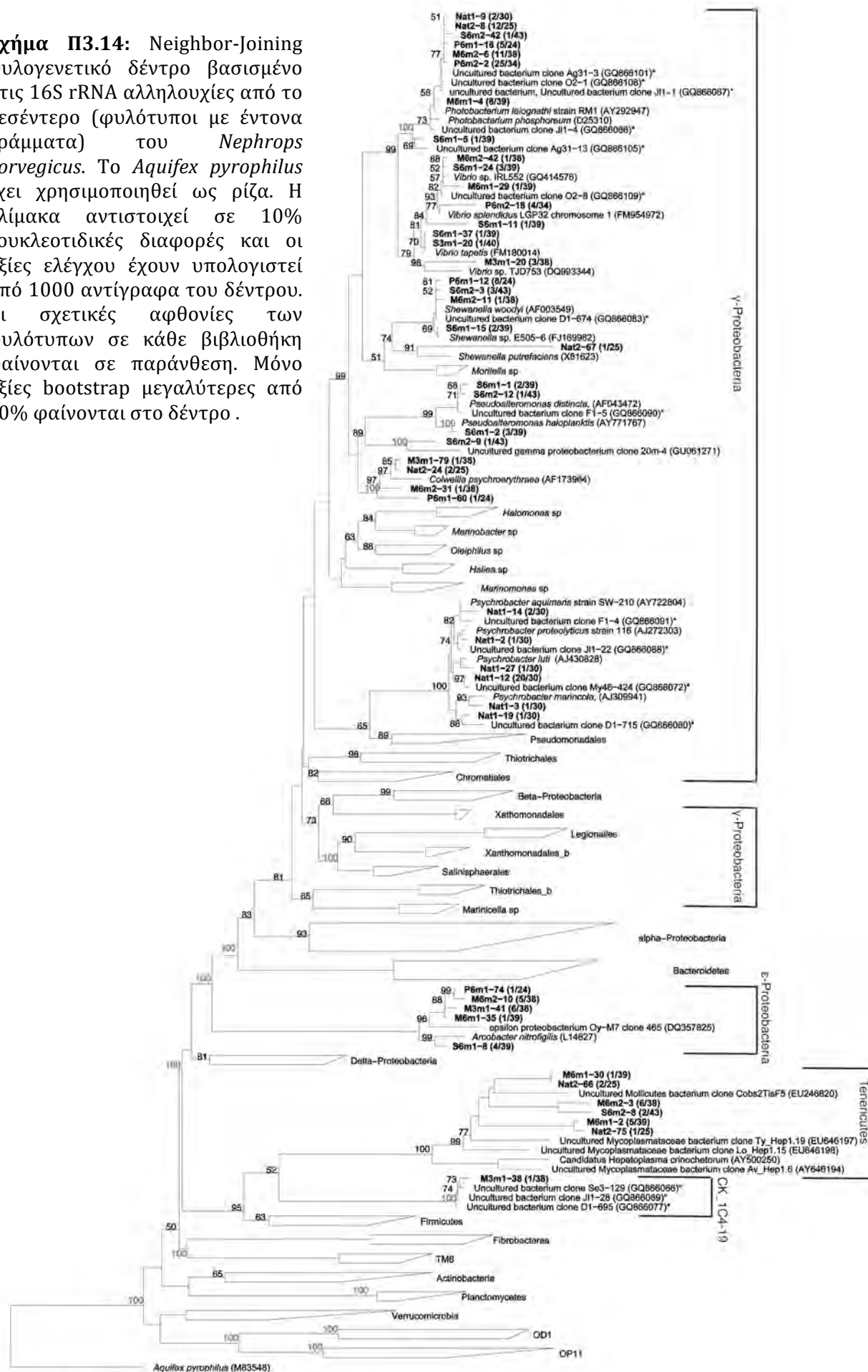


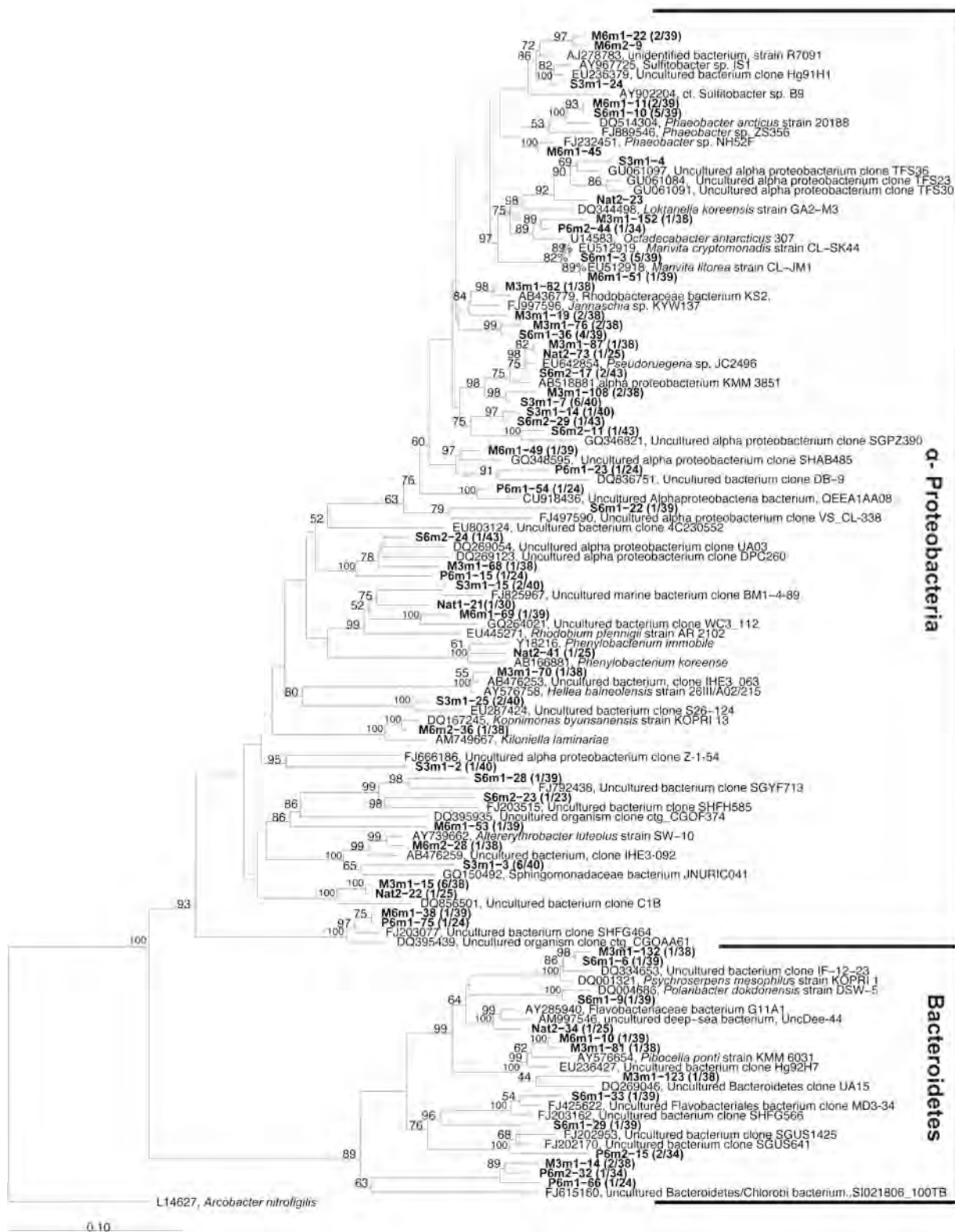
Σχήμα Π3: Κάλυψη των βιβλιοθηκών των τροφών και του νερού



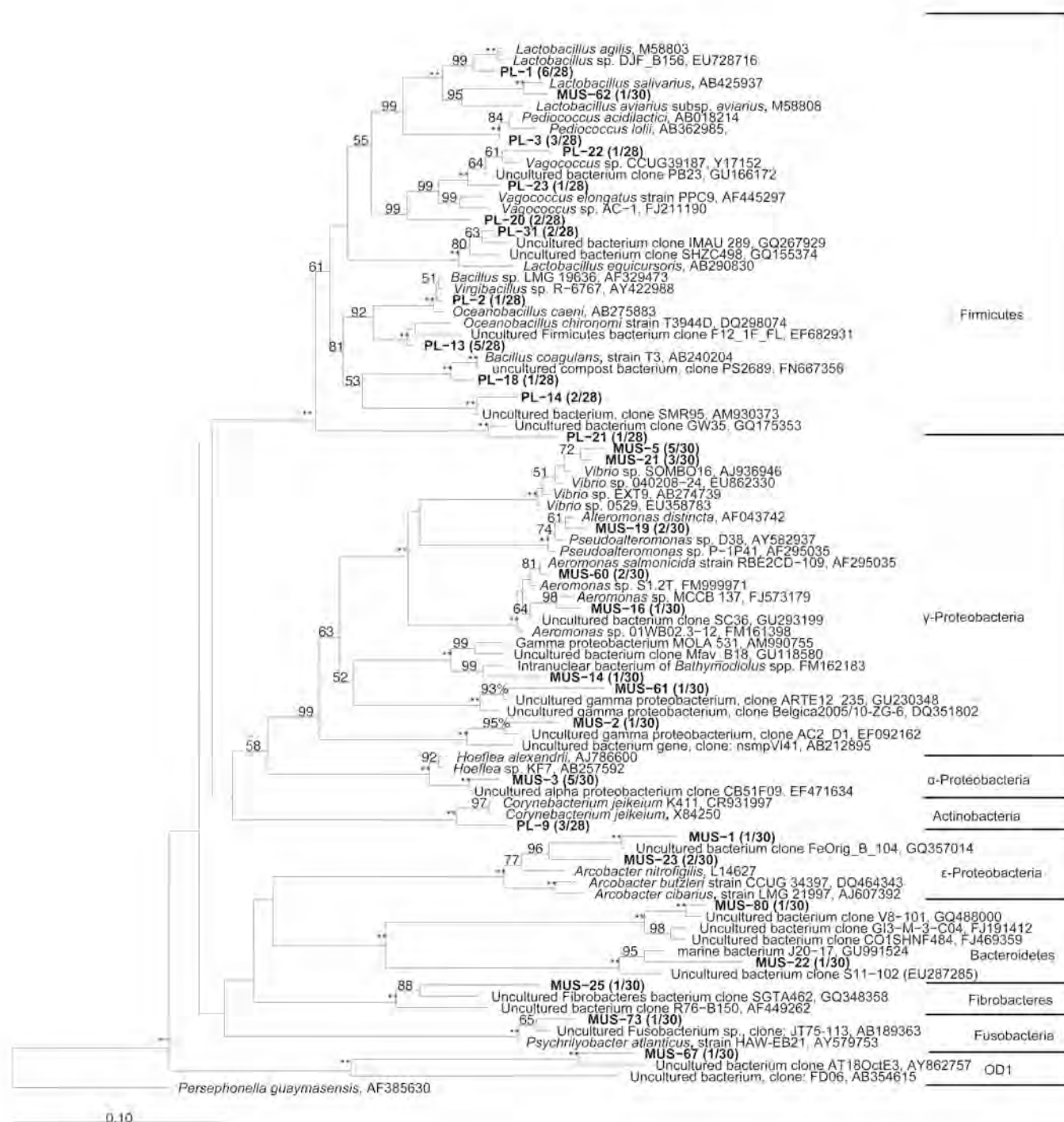
Σχήμα Π3.6. Neighbor-joining φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις 16S rRNA αλληλουχίες από το μεσέντερο φυσικών πληθυσμών του *Nephrops norvegicus*. Το *Persephonella marina* (Aquificae) έχει χρησιμοποιηθεί ως ρίζα. Η βαθμίδα αντιστοιχεί σε 10% νουκλεοτιδικές διαφορές και οι αξίες ελέγχου έχουν υπολογιστεί από 1000 αντίγραφα του δέντρου. Οι σχετικές αθρονίες των φυλότυπων σε κάθε βιβλιοθήκη φαίνονται σε παράνθεση. Μόνο αξίες bootstrap μεγαλύτερες από 50% φαίνονται στο δέντρο.

Σχήμα Π3.14: Neighbor-Joining φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις 16S rRNA αλληλουχίες από το μεσέντερο (φυλότυποι με έντονα γράμματα) του *Nephrops norvegicus*. Το *Aquifex pyrophilus* έχει χρησιμοποιηθεί ως ρίζα. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 10% νουκλεοτιδικές διαφορές και οι αξίες ελέγχου έχουν υπολογιστεί από 1000 αντίγραφα του δέντρου. Οι σχετικές αφθονίες των φυλότυπων σε κάθε βιβλιοθήκη φαίνονται σε παράνθεση. Μόνο αξίες bootstrap μεγαλύτερες από 50% φαίνονται στο δέντρο.

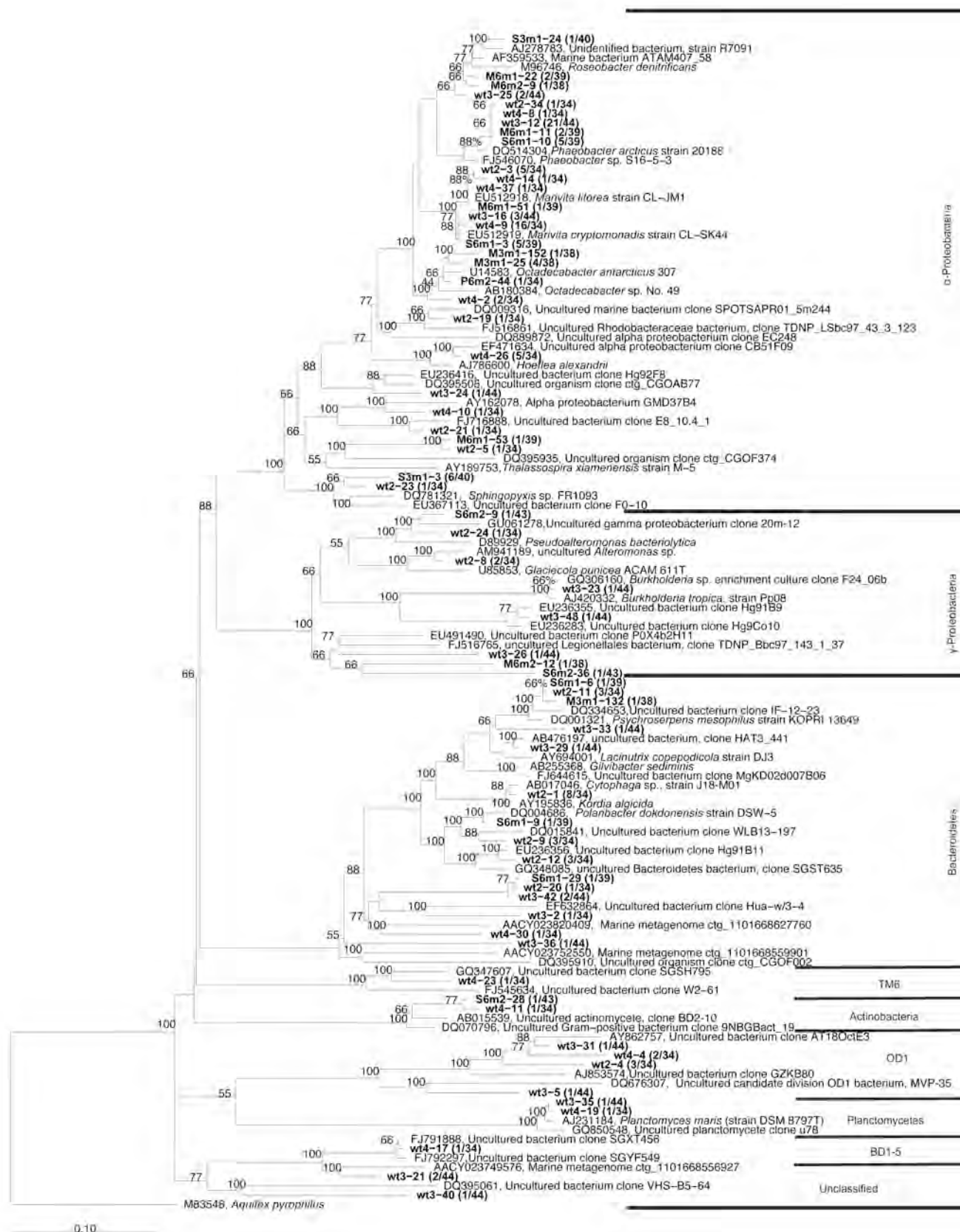




Σχήμα Π3.16: Neighbor-Joining φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις 16S rRNA αλληλουχίες από το μεσέντερο (φυλότυποι με έντονα γράμματα) του *Nephrops norvegicus*. Παρουσιάζονται οι αντιπρόσωποι των α-Proteobacteria και Bacteroidetes. Το *Arcobacter nitrofigilis* (ε-Proteobacteria) έχει χρησιμοποιηθεί ως ρίζα. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 10% νουκλεοτιδικές διαφορές και οι αξίες bootstrap έχουν υπολογιστεί από 1000 αντίγραφα του δέντρου. Οι σχετικές αφθονίες φαίνονται σε παράνθεση. Μόνο αξίες bootstrap μεγαλύτερες από 50% φαίνονται στο δέντρο.



Σχήμα Π3.21: Neighbor-joining φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις 16S rRNA αλληλουχίες από τις τροφές που παρασχέθηκαν στις καραβίδες (φυλότυποι με έντονα γράμματα). Το *Persephonella guaymasensis* έχει χρησιμοποιηθεί ως ρίζα. Η βαθμίδα αντιστοιχεί σε 10% νουκλεοτιδικές διαφορές και οι αξίες bootstrap έχουν υπολογιστεί από 1000 αντίγραφα του δέντρου. Οι σχετικές αφθονίες των φυλότυπων σε κάθε βιβλιοθήκη φαίνονται σε παράνθεση. Μόνο αξίες bootstrap μεγαλύτερες από 50% φαίνονται στο δέντρο. Το ** αντιστοιχεί σε bootstrap 100%.



Σχήμα Π3.23: Neighbor-Joining φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις 16S rRNA αλληλουχίες από το νερό των ενυδρείων και σε επιλεγμένες από το μεσέντερο του *Nephrops norvegicus* (φυλότυποι με έντονα γράμματα). Το *Aquifex pyrophilus* έχει χρησιμοποιηθεί ως ρίζα. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 10% νουκλεοτιδικές διαφορές και οι αξίες bootstrap έχουν υπολογιστεί από 1000 αντίγραφα του δέντρου. Οι σχετικές αφθονίες των φυλότυπων σε κάθε βιβλιοθήκη φαίνονται σε παρένθεση. Μόνο αξίες bootstrap μεγαλύτερες από 50% φαίνονται στο δέντρο.

Πρωτόκολλο 1: Προετοιμασία ρυθμιστικού διαλύματος ενίσχυσης

Ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης

- 1) 4 ml 10X PBS
- 2) 0.4 ml 10X Αντιδραστηρίου μπλοκαρίσματος (Blocking Reagent)
- 3) 16 ml 5M NaCl
- 4) Υπερκάθαρο νερό σε τελικό όγκο 40 ml
- 5) 4 g θειικής δεξτράνης στους 40°C- 60°C μέχρι να διαλυθεί εντελώς

Πρωτόκολλο 2: Αντιδραστήριο μπλοκαρίσματος

Το αντιδραστήριο μπλοκαρίσματος διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα Μαλεϊκού οξέως.

Για την προετοιμασία 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος Μαλεϊκού οξέος

- 1) 100 mM Μαλεϊκού οξέος (0.58 g in 50 ml MilliQ)
- 2) 150 mM NaCl (όγκος 50 ml)

Ρυθμίζουμε το pH στο 7,5 και διαλύουμε 10g αντιδραστηρίου μπλοκαρίσματος.

Ζεσταίνουμε και αποστειρώνουμε

Δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά

Meziti A., Ramette A., Mente E., Kormas K.A. (2010). Temporal shifts of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) gut bacterial communities. FEMS Microbiology Ecology, 74: 472-484.

Meziti A., Mente E., Kormas K.A. (2012). Gut bacteria associated with different diets in reared *Nephrops norvegicus*. In preparation.

RESEARCH ARTICLE

Temporal shifts of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) gut bacterial communities

Alexandra Meziti^{1,2}, Alban Ramette², Eleni Mente^{1,3} & Konstantinos Ar. Kormas¹

¹Department of Ichthyology and Aquatic Environment, University of Thessaly, Magnisia, Greece; ²Max Planck Institute for Marine Microbiology, Bremen, Germany; and ³School of Biological Sciences, University of Aberdeen, Aberdeen, Scotland, UK

Correspondence: Konstantinos Ar. Kormas, Department of Ichthyology and Aquatic Environment, University of Thessaly, 384 46 Nea Ionia, Magnisia, Greece.
Tel.: +30 242 109 3082; fax: +30 242 109 3157; e-mail: kkormas@uth.gr

Received 7 March 2010; revised 20 July 2010; accepted 30 July 2010.
Final version published online 10 September 2010.

DOI:10.1111/j.1574-6941.2010.00964.x

Editor: Julian Marchesi

Keywords

Bacteria; FISH; ARISA; 16S rRNA gene; gut; *Nephrops norvegicus*.

Abstract

The aim of this study was to investigate the gut bacterial communities of *Nephrops norvegicus* individuals, using a suite of molecular tools consisting of automated ribosomal intergenic spacer analysis, 16S rRNA gene–internal transcribed spacer clone libraries and FISH. The animals were collected from Pagasitikos Gulf, Greece, during different months of the year. The diversity of the gut bacterial communities was found to mostly vary with sampling time, which could be related to temporal variations in food supply. The 16S rRNA gene diversity analysis showed dominance of specific phylotypes for each month studied. February, May, July, August and October samples were rich in sequences related to the gammaproteobacterial genera *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter* and *Photobacterium*. September and December samples were dominated by phylotypes affiliated with uncultured representatives of *Mollicutes*, which are generally associated with the intestinal tracts of various animals. The presence of *Gammaproteobacteria* and uncultured *Mollicutes* in August and September samples, respectively, was further confirmed by FISH. None of the morphometric parameters considered was related to the temporal pattern of dominant bacterial communities.

Introduction

The Norway lobster *Nephrops norvegicus* (also called Dublin bay prawn) is a burrowing decapod crustacean living at 20–800 m depth. It is widely distributed on muddy substrata throughout the northeast Atlantic Ocean from Iceland in the north to Morocco in the south, at the British coasts and in the Mediterranean Sea and has a high commercial importance in these areas (Bell, 2009). However, concerns about possible depletion and recruitment failure for *Nephrops* fisheries have been expressed due to overexploitation and insufficient or inappropriate management strategies. *Nephrops norvegicus* feeds mainly on fish, molluscs, crustaceans, polychaetes, echinoderms and foraminifera (Cristo & Cartes, 1998). Differences in diet are attributed mainly to differences in prey abundance rather than to differences in prey preference. *Nephrops norvegicus* is considered to be an opportunistic predator and a scavenger. It has been suggested that it can act as a suspension feeder. This occurs when food resources are limited (Loo *et al.*, 1993). In captivity, cannibalism has also been observed when food supply is insufficient

(Sarda & Valladares, 1990) and when other individuals are vulnerable, for example due to molting (A. Meziti, I. Karapanagiotidis, K. Kormas & E. Mente, pers. commun.).

The digestive system of *N. norvegicus* consists of three parts: (1) the foregut, consisting of the esophagus, the cardiac and the pyloric stomach, (2) the midgut, which includes the hepatopancreas and the intestine till the sixth abdominal segment and (3) the hindgut, which is the last very short chitin-lined part after the midgut leading to the anus. The main part of the food assimilation occurs in the upper part of the midgut either by enzymes excreted from the hepatopancreas or by mechanical disruption from the gastric mill. The midgut is the main absorbing organ, and no absorption occurs in the short hindgut (Yonge, 1924).

Gut microorganisms are considered very important for the nutrition of many animal species including crustaceans (Harris, 1993). The microorganisms grow in a stable environment inside the animal gut, while the host usually benefits either from microbially mediated digestion of ingested food or from important nutrients. However, the microbial

colonization of *N. norvegicus* has not been studied in detail as yet.

Most of the available studies have focused on the hindgut microbiota of other *Decapoda*, mainly *Thalassinidae*, and have found thriving microbial communities because no assimilation of nutrients occurs there and consequently no competition with the hosts (Lau *et al.*, 2002 and references therein). However, over the last years, there has been an increasing interest on the shifts of gut microbial communities driven by the nutritional habits of the host (Ley *et al.*, 2008), making the parts of the intestinal tract where nutrient absorption takes place, such as the *Decapoda* midgut, appropriate systems for the investigation of microorganism–host interactions.

Pagasetikos Gulf, Greece, is a major *N. norvegicus* fishing ground. According to models constructed by Petihakis *et al.* (2005), the sediment surface of the central-external area < 50 m depth is characterized by rather constantly low temperatures (13 °C average) and dim light conditions. Other factors influencing the benthic communities, such as settling phytoplankton biomass, detritus and bacteria, show annual patterns (Petihakis *et al.*, 2005) and are regulated by the phytoplankton bloom starting between January and February each year. Phytoplankton biomass reaches its maximum near the sediment soon after the bloom initiation. Maximum detritus concentrations reach the sediment surface during February and March, causing an almost immediate bacterial response (i.e. increased abundance). After April, a decrease is observed for phytoplankton, detritus and bacterial biomass (Petihakis *et al.*, 2005). These patterns have positive effects on the benthic food web by increasing the activity of suspension and deposit feeders soon after the peaks of phytoplankton, bacteria and detritus around April or May.

The aim of this study was to investigate whether temporal changes, which reflect different food supply, as discussed above, influence the gut microbial communities along with other morphological factors. For this purpose, midgut samples from *N. norvegicus* individuals were collected during different months from the same habitat and were investigated by 16S rRNA gene diversity and internal transcribed spacer (ITS) analysis. To the knowledge of the authors, there is no similar study for the molecular analysis of the gut microbial communities in *N. norvegicus*. Midgut was selected for analysis as the gut part where additional nutrient absorption from the host could occur and a relationship of mutualism with the bacteria could evolve. The examination of the gut bacterial communities provides useful insights into the feeding and nutritional behavior of the animal, especially in commercial rearing efforts that are suggested as alternative to the overexploitation and insufficient or inappropriate management strategies of *N. norvegicus*.

Materials and methods

Nephrops norvegicus collection and morphometric analysis

Samples were collected from Pagasetikos Gulf (Greece) from an area determined by four points: North (39°17.34'N, 23°02.27'E), West (39°15.55'N, 22°56.45'E), South (39°10.33'N, 23°00.59'E) and East (39°09.14'N, 23°08.52'E). Samples were collected monthly in 2007, apart from January, April, June and November, when sampling was not possible due to bad weather conditions or fishing restrictions. Individual, large traps (60 cm × 45 cm × 30 cm) were used to avoid stress on the animals during capture. The traps were left at the bottom of the sea for a maximum of 7 h before retrieving them. Only live animals upon retrieval of the traps were kept for the current work until return to the laboratory (≤ 2 h). The sampling depth varied from 60 to 88 m. After collection, the *N. norvegicus* individuals were immediately transferred on ice to the laboratory, and animal sex, weight, carapace length and width and abdominal width were measured (Supporting Information, Table S1). In total, 53 gut samples were collected for further analysis. Encoding of the samples according to collection month is shown in Table S2.

Midgut isolation

The animals were dissected using sterile lancets and the midgut was extracted using sterile forceps. In order to exclude as many as possible transient bacterial cells ingested with food particles, the extracted midgut was emptied by applying mechanical force and by rinsing in autoclaved particle-free sea water (filtered by 0.2-µm pore size). All dissecting tools were alcohol flame sterilized between each individual sample.

DNA extraction and tissue fixation

DNA extraction was performed on 49 gut tissues from all sampling months using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc.) following the manufacturer's standard protocol. Some of the gut tissues deriving from the same collection month and from animals of the same sex were pooled for the DNA extraction due to low tissue mass (Table S1). At the final step, DNA was diluted in 100 µL of elution buffer, provided with the kit, and was stored at –20 °C. Because of low numbers of animals available, only samples from August and September were fixed in 4% formaldehyde in sterile 1 × phosphate-buffered saline (PBS) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) at 4 °C for 3 h. Samples were rinsed three times in 1 × PBS for 10 min and were washed in sterile double-distilled water. Samples were stored in 1.5 mL 1 × PBS:ethanol (1:1). In total, 39

DNA samples were further analyzed as a result of the pooled tissues and four gut tissues were used for FISH.

Automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA), nonmetric multidimensional scaling (NMDS) analysis and environmental interpretation

The gut bacterial community structure was estimated by ARISA (Fisher & Triplett, 1999). PCR amplification was conducted in triplicates using primers ITSf (5'-GTCGTAA CAAGGTAGCCGTA-3') and ITSReub (5'-GCCAAGG CATCCACC-3') (Cardinale *et al.*, 2004). Primer ITSf was labeled with FAM fluorochrome at the 5' end. The PCR conditions consisted of an initial denaturation step at 94 °C for 3 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 45 s, 55 °C for 45 s, 72 °C for 90 s and a final extension at 72 °C for 5 min. PCR-amplified fragments were purified with Sephadex G-50 Superfine (Sigma-Aldrich, Germany) and the preparation for capillary electrophoresis separation was performed as described previously (Boer *et al.*, 2009). ARISA profiles were analyzed using the GENEMAPPER software v 3.7 (Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA). The total peak area per sample was normalized to one, and only fragments above a threshold of 50 fluorescence units and between 100 and 1000 bp length were considered. GENEMAPPER output files were further analyzed by custom R scripts (Ramette, 2009). To account for size calling imprecision, samples were binned with automatic and interactive binner as described previously (Ramette, 2009). A 'window' of 2.5 bp was selected as the frame offering the highest pairwise similarities among samples and was further subjected to multivariate analyses.

Triplicate profiles were merged to only keep bands that appeared at least twice among the replicates of a given sample (Boer *et al.*, 2009; Ramette, 2009). Unconstrained ordinations were performed to graphically illustrate the relationships between different samples using three-dimensional NMDS (Kruskal, 1964), implemented in R (version 2.7.0). NMDS ordination attempts to place all samples in a three-dimensional space such that their ordering relationships (here based on a Bray–Curtis similarity matrix) are preserved. Hence, the closer the samples are in the resulting ordination, the more similar their overall gut bacterial communities are. Kruskal's stress value reflects the difficulty involved in fitting the samples' relationships into a three-dimensional ordination space. To determine whether season and morphometric data could significantly explain the variation in bacterial community structure, a redundancy analysis (RDA) [reviewed in Ramette (2007)] was implemented in R and its significance was assessed by 999 permutation tests. The *a priori* hypothesis that gut microbial communities differ between different seasons was tested using RDA and the nonparametric ANOSIM (Clarke & Green,

1988). ANOSIM generates a test statistic, *R*, that ranges from –1 to 1. The magnitude of *R* is indicative of the degree of separation between groups, with a score of 1 indicating complete separation and 0 indicating no separation (Clarke, 1993). *R* is unlikely to be substantially smaller than 0 because this would indicate that similarities within groups are systematically lower than those among groups. The critical significance level used for ANOSIM results was *P* = 0.05. Since multiple pairwise comparisons (21) were performed, the Bonferroni correction was applied, decreasing the critical significance level to 0.0024 (0.05/21). It has to be mentioned that the Bonferroni correction has often been judged to be overly conservative (Legendre & Legendre, 1998), and so care should be taken when applied to ecological data. Only results from the ANOSIM method are presented because both methods gave the same conclusions.

Cloning and sequencing of 16S rRNA genes and ITS

Bacterial 16S rRNA gene and the ITS were amplified from samples F1, My46, J11, Ag31, Se3, O2 and D1 using the 27f BAC (5'-AGAGTTTGATCMTGGTCAG-3') (Lane, 1991) and ITSReub primers. Expected amplicon sizes varied from 1800 to 2400 bp due to variation in ITS size. PCR conditions were 2 min at 94 °C, followed by 10 cycles with 30 s at 94 °C, 1 min at 55 °C and 3 min at 72 °C, followed by 13–20 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C and 3 min (+5 s in each cycle) at 72 °C and finally 7 min at 72 °C. PCR cycles were adjusted when needed to decrease nonspecific products. In samples, J11, Ag31 and O2, where PCR products were not enough to allow for further analysis, a nested PCR was performed with primers GM3 (5'-AGAGTTTGATCMTGGC-3') (Muyzer *et al.*, 1995) and GM4 (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') (Kane *et al.*, 1993). The expected amplicon size was 1550–1600 bp. PCR conditions involved an initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 10–13 cycles of 94 °C for 1 min, 44 °C for 1 min, 72 °C for 3 min and a final extension at 72 °C for 5 min. The total cycles for all samples for both PCRs varied from 25 cycles in Se3 to 37 cycles in Ag31 and O2. PCR products were purified using QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc., Germany) and were cloned directly using TOPO TA Kit for sequencing (Invitrogen Inc., Germany) with chemically competent cells. The insert size was checked via PCR with M13f-M13R vector-binding primers. Positive clones were grown overnight in 1.5 mL of Luria–Bertani medium containing ampicillin (100 µg mL⁻¹), and plasmids were prepared from the pelleted cells with a QIAprep Miniprep Kit (Qiagen Inc.). Plasmids were partially sequenced with primers GM4 and ITSReub (the latter used only for the 16S–ITS libraries). After alignment with SEQUENCHER 4.6 (Gene Codes Corporation) and CLUSTALW (Larkin *et al.*, 2007), manual correction, elimination of

chimeras using PINTAIL (Ashelford *et al.*, 2005) and visual examination of the alignments, clones were grouped based on a 16S rRNA gene similarity cutoff of 99% and representatives from each group were fully sequenced using primers GM5_341f, GM1R and 907R (Muyzer *et al.*, 1995). Sequencing reactions were performed using ABI BigDye and an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc.). Sequences were checked for closest relatives using the BLAST application and all sequences were checked for chimeras using PINTAIL. 16S rRNA gene sequences were aligned using the ARB software (Ludwig *et al.*, 2004) and the SILVA aligner application (Pruesse *et al.*, 2007). 16S rRNA gene distance matrices were calculated with the Jukes–Cantor formula and were clustered using the neighbor-joining method. The phylogenetic tree was created in ARB software (Ludwig *et al.*, 2004). Bootstrap values were obtained from 1000 replicates using similar parameters. The length of the ITS sequences was used for the identification of ARISA peaks and for the study of the microdiversity of dominant 16S rRNA gene-derived phylotypes (data not presented here). All 16S rRNA gene sequences from this study have been deposited under GenBank numbers GQ866066–GQ866111.

FISH

Fixed tissues were washed in optimal cutting temperature (OCT) cryomicrotome medium (HISTO Service, Germany) for 5 h at 4 °C and were embedded in specific plastic wells filled with OCT overnight at –20 °C. The frozen embedded samples were sliced horizontally to the gut walls with a cryomicrotome (Microm GmbH, Germany) into 4–5- μ m-thick slices. Slices were collected on Menzel-Gläser Polysine Microscope Slides (Menzel-Gläser, Germany). Catalyzed reporter deposition-FISH was performed only in sample FN2 following a protocol described previously (Fuchs *et al.*, 2005) with the following modifications. For the deactivation of endogenous peroxidases, slides were incubated for 30 min with 0.5% sodium dodecyl sulfate in methanol, followed by two washing steps of 10 min in 1 \times PBS and of 3 min in sterile double-distilled water. Hybridization buffer was prepared for the respective formamide concentrations as described previously (Fuchs *et al.*, 2005). Sections were prehybridized for 15 min at 46 °C by adding hybridization buffer only. Hybridization was followed by the addition of horseradish peroxidase-labeled probe (50 ng μ L^{–1}) in a 1 : 50 dilution with the respective hybridization buffer. Samples FN3, FSe1 and FSe3 were analyzed following the basic FISH protocol (Duperron *et al.*, 2006) with the appropriate concentrations of formamide (Table S3). Basic FISH was preferentially used in most of our samples because it yielded better results in terms of clearer signals, less background and the better calculation of cell dimensions. General Cy3-labeled probes were used for the *in situ* identification of

Bacteria, *Alpha*-, *Beta*- and *Gammaproteobacteria*; NON338 was used for the detection of false-positive signals (Table S3). Cy3-labeled GAM42a probe was combined with non-labeled BET42a, and vice versa, as described before (Manz *et al.*, 1992). The current specificity of these probes has recently been reviewed (Amann & Fuchs, 2008). A specific probe targeting the 16S rRNA gene sequence of the dominant in September samples phylotype (Se3-204) clustering with *Mollicutes* was designed using the ARB ‘probe design’ function (Ludwig *et al.*, 2004). This probe (UncMol89 5'-CGTTCGCCACTAACACCAAATC-3') was designed in order to be specific for this phylotype and to have two or more mismatches with the sequences found in the SILVA database (Pruesse *et al.*, 2007). The probe design considered the accessibility of 16S rRNA gene probe target sites reported elsewhere (Behrens *et al.*, 2003) and the position of the specific for the *Candidatus* Bacilloplasma probe (Kostanjsek *et al.*, 2007). Optimal stringency conditions were determined for the new probe by checking the signal intensities at increasing formamide concentrations (0–40%). The highest formamide concentration where signals were detected was 40%. However, these signals were weak, and finally 35% was chosen for the rest of the analysis. Four gut samples were analyzed, two from August 2007 (FN2, FN3) and two from September 2007 (FSe1, FSe3). Samples were visualized using an Axioplan II Imaging epifluorescence microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany), and pictures were realized using software AXIOVISION Rel. 4.7.2 (Carl Zeiss).

Results

Analysis of shifts in community structure

The ARISA profiles generated from the bacterial communities associated with the midgut tissue of *N. norvegicus* showed high variability between samples. None of the ARISA fragments were present in all samples and the number of operational taxonomic units (OTUs) varied between 43 (sample My44) and 147 (D2) (average 91). When the complexity of the community profile was reduced by NMDS (Fig. 1), sampling time emerged as an important factor (ANOSIM $R = 0.5531$, $P < 0.001$). Morphometric factors did not significantly explain changes in microbial community structures ($P > 0.05$). Further pairwise comparisons showed that gut bacterial communities varied significantly ($P < 0.05$) between almost all months (Table 1), with either strong community differentiation ($R > 0.75$) or with differentiated, yet overlapping structure ($0.50 < R < 0.75$). The R values for the ANOSIM tests between August, September, October and December indicated largely overlapping structure ($R < 0.5$), with only the exception of the December–September comparison. No group separation was observed between the sample pairs February/March–July ($P = 0.198$) and August–October

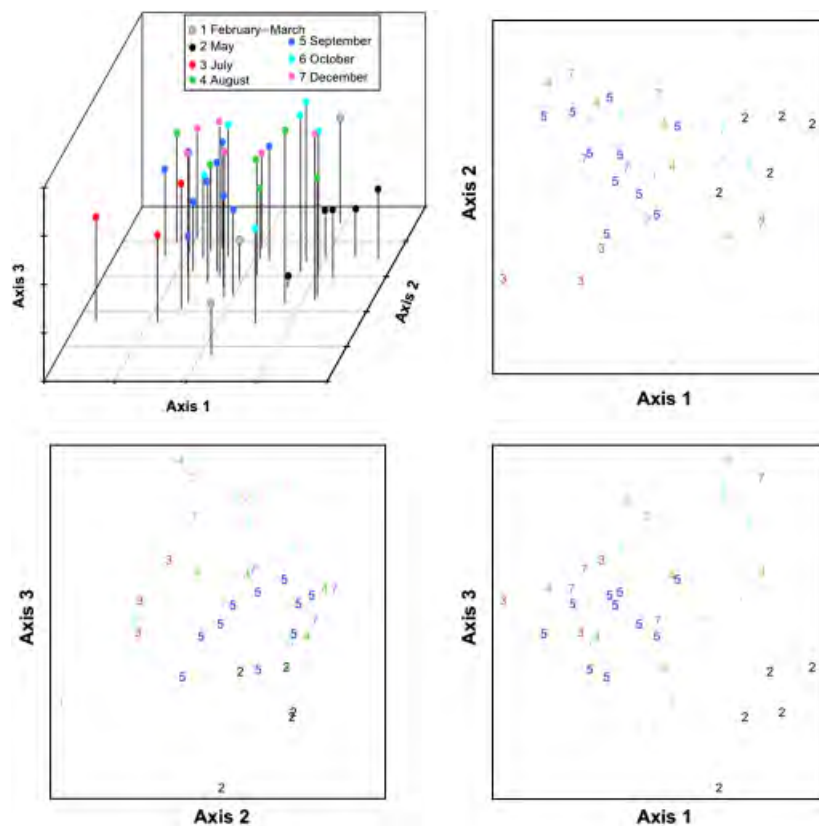


Fig. 1. NMDS ordination plots (Bray–Curtis distance matrix) of merged ARISA profiles for the *Nephrops norvegicus* gut-derived samples (ordination stress = 0.17). Each month is indicated by a different color with filled circle or number: (1) gray, February–March; (2) black, May; (3) red, July; (4) green, August; (5) blue, September; (6) light blue, October; and (7) pink, December. (a) provides three-dimensional representation of the results, (b)–(d) represent separate two-dimensional plots for all combinations of the three NMDS axes. NMDS axes are arbitrary, so that plots may arbitrarily be rotated, centered or inverted.

Table 1. ANOSIM results for the *a priori* determined temporal groups

	February/March	May	July	August	September	October	December
February/March		0.0166	0.1983	0.0484	0.0083	0.0231	0.0105
May	0.5897		0.0183	0.0044	<u>0.0002</u>	0.0026	<u>0.0023</u>
July	0.4444*	0.9692		0.0113	0.0027	0.013	0.0133
August	0.3765*	0.6053	0.6543		0.0138	0.0916	0.0154
September	0.7208	0.9389	0.8403	0.2933*		0.0043	<u>0.0003</u>
October	0.5000	0.8720	0.6975	0.1611*	0.4028*		0.0302
December	0.6111	0.9227	0.7654	0.3870*	0.5206	0.2796*	

*Largely overlapping groups.

Significant noncorrected *P*-values ($P < 0.05$) are indicated with italics, significant Bonferroni corrected *P*-values ($P < 0.0024$) are underlined (upper right triangle) and *R* values are in bold (lower left triangle).

($P = 0.092$). When applying a Bonferroni correction for the 21 comparisons being made, a clear separation only occurred between all pairwise comparisons involving May, September and December samples. As mentioned above, the Bonferroni correction has often been judged to be overly conservative (Legendre & Legendre, 1998), and so care should be taken when applied to ecological data.

Phylogenetic analysis

Seven samples from different sampling seasons (Table S2) were further analyzed with the construction of clone

libraries. A total of 311 full-length 16S rRNA gene sequences were determined for samples F1 (31), MY46 (58), J11 (30), Ag31 (22), Se3 (53), O2 (25) and D1 (92). In each clone library, 5–10 different phylotypes were detected based on a cutoff similarity of 99% (Table 2, Fig. 2). All clone libraries had a satisfactory coverage (Fig. S1) according to Good's *C* estimator (Kemp & Aller, 2004). Almost all clone libraries had coverage higher than 90%, apart from February (77%) and August (82%).

Except for clone library Ag31 that had two dominant phylotypes with a frequency of 31% and 27%, all clone libraries were dominated by a single phylotype being present

Table 2. 16S rRNA gene phylotypes detected in midgut samples of *Nephrops norvegicus* individuals

Phylotype	Frequency (%)	Name of closest relative	GenBank accession no.	Similarity (%)	Phylogenetic affiliation
F1-5	58.1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. NPO-JI-58	AY745828	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
F1-4	12.9	<i>Psychrobacter aquimaris</i> , KOPRI 24929	EF101547	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
F1-7	6.4	Uncultured actinobacterium	EU374093	97	<i>Actinobacteria</i>
F1-2	3.2	Uncultured bacterium	FJ203056	96	<i>Gammaproteobacteria</i>
F1-6	3.2	Uncultured bacterium	FJ545576.1	96	<i>Acidobacteria</i>
F1-18	3.2	Uncultured <i>Chloroflexi</i>	DQ811871	98	<i>Chloroflexi</i>
F1-19	3.2	Uncultured acidobacterium	DQ395041	96	<i>Acidobacteria</i>
F1-20	3.2	Uncultured actinobacterium	EF208654	96	<i>Actinobacteria</i>
F1-26	3.2	Uncultured actinobacterium	EU374093	99	<i>Actinobacteria</i>
F1-28	3.2	Uncultured bacterium	FJ695595	98	<i>Gammaproteobacteria</i>
My46-424	74.1	<i>Psychrobacter</i> sp. Pi 2-33	AB365059	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
My46-492	19.0	<i>Vibrio lentus</i>	AY292936	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
My46-460	3.4	<i>Vibrio lentus</i>	AY292936	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
My46-442	1.7	<i>Planococcus rifitensis</i> strain M8	AJ493659	99	<i>Firmicutes</i>
My46-484	1.7	Uncultured bacterium	AB255057	98	<i>Firmicutes</i>
Jl1-36	73.3	<i>Photobacterium leiognathi</i>	AY292917	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
Jl1-4	13.3	<i>Photobacterium</i> sp. JT-ISH-224	AB293986	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
Jl1-1	6.6	<i>Photobacterium leiognathi</i> strain RM1	AY292947	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
Jl1-22	3.3	<i>Psychrobacter aquimaris</i>	EF101547	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
Jl1-28	3.3	Uncultured bacterium clone CK_1_C4_1	EU488044	87	<i>Firmicutes</i>
Ag31-3	31.9	<i>Photobacterium leiognathi</i> strain RM1	AY292947	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ag31-6	27.3	<i>Photobacterium leiognathi</i>	AY292917	98	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ag31-15	13.6	<i>Vibrio lentus</i>	AY292936	98	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ag31-2	9.1	Uncultured bacterium	AB255065	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ag31-1	4.5	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633	BA000031	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ag31-21	4.5	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 chromosome 1	FM954972	98	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ag31-22	4.5	<i>Vibrio salmonicida</i> isolate PB1-8rrnB	EU091324	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ag31-13	4.5	<i>Photobacterium</i> sp. HAR23	AB038031	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
Se3-204	83.0	Uncultured <i>Mollicutes</i>	DQ340200	90	<i>Mollicutes</i>
Se3-206	5.6	<i>Desulfatibacillus olefinivorans</i> strain LM2801	DQ826724	87	<i>Deltaproteobacteria</i>
Se3-199	3.8	<i>Ralstonia</i> sp. FRA01	AF098288	99	<i>Betaproteobacteria</i>
Se3-178	3.8	<i>Dechloromonas</i> sp. HZ	AF479766	98	<i>Betaproteobacteria</i>
Se3-129	1.9	Uncultured bacterium clone CK_1_C4_19	EU488044	87	<i>Mollicutes</i>
Se3-157	1.9	Uncultured bacterium	AY328732	99	<i>Alphaproteobacteria</i>
O2-1	76.0	<i>Photobacterium leiognathi</i> strain RM1	AY292947	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
O2-8	16.0	<i>Vibrio splendidus</i> isolate PB1-10rrnH	EU091332	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
O2-23	4.0	<i>Vibrio salmonicida</i> isolate PB1-8rrnB	EU091324	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
O2-37	4.0	Uncultured bacterium	EF123487	98	<i>Gammaproteobacteria</i>
D1-695	86.0	Uncultured bacterium clone CK_1_C4_1	EU488044	87	<i>Firmicutes</i>
D1-668	2.2	<i>Dechloromonas</i> sp. HZ	AF479766	99	<i>Betaproteobacteria</i>
D1-669	2.2	Arctic sea ice bacterium	AF468382	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
D1-715	2.2	<i>Psychrobacter celer</i>	EF101550	98	<i>Gammaproteobacteria</i>
D1-727	2.2	Uncultured bacterium	EU137440	99	<i>Actinobacteria</i>
D1-684	1.1	<i>Psychromonas japonica</i>	AB304804	98	<i>Gammaproteobacteria</i>
D1-674	1.1	<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908	CP000961	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
D1-700	1.1	<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN	CP001053	98	<i>Betaproteobacteria</i>

For sample code, see text. Closest relative determined via BLAST top score and phylogenetic affiliation via tree reconstruction (see Fig. 2).

with a frequency of 56–87%. All clone libraries were either dominated by sequences affiliated with *Gammaproteobacteria* (F1, My46, Jl1, Ag31, O2) or *Mollicutes* (Se3, D1). Other phylotypes detected in lower abundances were clustered with *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Alpha*-,

Beta- and *Deltaproteobacteria*. Sample F1 had one dominant phylotype (F1-5, frequency 58.06%) with 99% similarity with *Pseudoalteromonas* sp. NPO-JI-58, a heterotroph isolated from the North Pacific Ocean (Du *et al.*, 2006). The two closest known species were

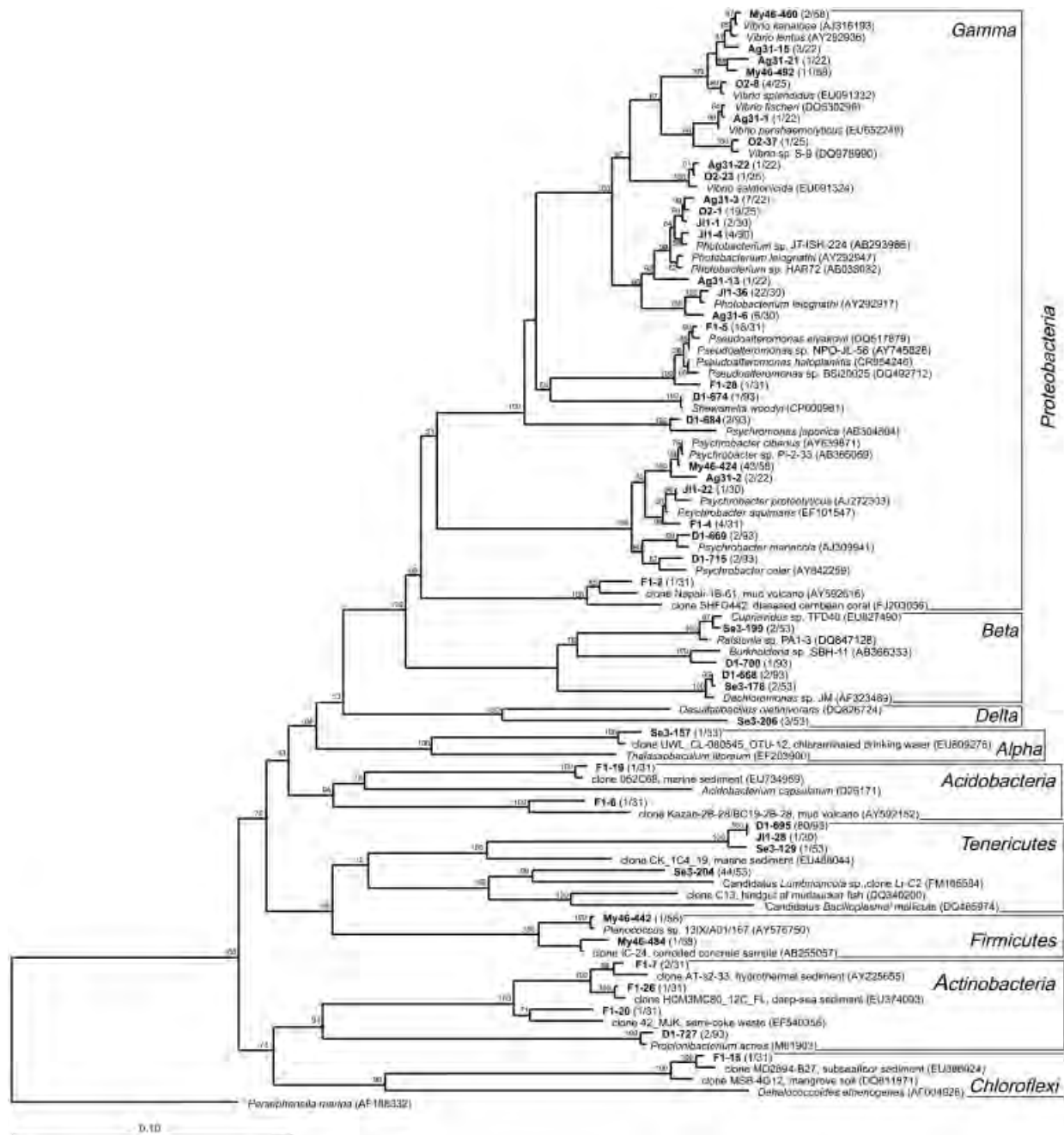


Fig. 2. Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences from the midgut of *Nephrops norvegicus*. *Persephonella marina* (Aquificae) was used as an outgroup. The bar corresponds to 10% nucleotide difference and bootstrap values were calculated from 1000 replicate trees. Relative abundances of retrieved phylotypes in each clone library are shown in parentheses. Only bootstrap values over 50% are shown in the tree.

Pseudoalteromonas haloplanktis TAC125 (Medigue *et al.*, 2005) and *Pseudoalteromonas elyakovii* (Sawabe *et al.*, 2000), exhibiting alginolytic activity.

Sample My46 had one dominant phylotype (My46-424, frequency 72%) with 99% similarity with *Psychrobacter* sp. Pi 2-33 (Romanenko *et al.*, 2008). This strain was isolated

from coastal sea ice, and although not fully characterized, it was positively tested for lipolytic activity and the reduction of nitrate to nitrite. The closest fully characterized relative was *Psychrobacter cibarius* strain JG-220 isolated from fermented seafood (Jung *et al.*, 2005), exhibiting lipolytic activity as well. A closely related phylotype

(Ag31-2, 98% similarity) was detected in Ag31 in a lower frequency (9%).

Samples J11, Ag31 and O2 were dominated by phylotypes clustering with the genus *Photobacterium* and showing > 96% similarity between them (Table S4). The closest cultured relatives were a free-living strain, *Photobacterium leiognathi* RM1, isolated from the light organs of the squid *Rondeletiola minor* (Nishiguchi & Nair, 2003), *Photobacterium* sp. JT-ISH-224, isolated from the gut of the Japanese barracuda (Tsukamoto *et al.*, 2008) and *Photobacterium* sp. HAR23, isolated from the north-west Pacific Ocean water column (Urakawa *et al.*, 1999).

Sample Se3 was clearly dominated by phylotype Se3-204 (83% frequency), which clustered in a group of uncultured *Mollicutes* affiliated as a sister group of the *Mycoplasma* clade and consisting of bacteria found in the intestinal tracts of various terrestrial and marine animals (Fig. S2). Se3-204 was only 89% similar with an uncultured *Mollicutes* bacterium detected in high abundances in the gut of the long-jawed mudsucker *Gillichthys mirabilis* (Bano *et al.*, 2007). Other representatives of this group have been found in the intestine of notothenioid fishes (Ward *et al.*, 2009), the gut of *Lumbricidae* earthworms (Nechitaylo *et al.*, 2009) and the isopod *Porcellio scaber* (Kostanjsek *et al.*, 2007).

The dominant phylotype of sample D1 (D1-695, frequency 86%) fell within a highly divergent group of uncultured *Mollicutes* (Fig. S2). The representatives of the group, showing high heterogeneity between them, originate from various habitats including mammals' feces (Ley *et al.*, 2008), humans' intestinal tract where they were related to obesity (Ley *et al.*, 2006) and sediment samples (Green-Garcia, 2008). D1-695 showed low similarity (87%) with its closest relative, phylotype CK_1C4_19, found in sea-grass bed sediment from the Gulf of Mexico (Green-Garcia, 2008). Phylotypes J11-28 and Se3-129, found in low abundances in samples J11 and Se3 (3.3% and 1.5%, respectively), were 99% similar with D1-695 and with each other. Because

of the low percentages of similarity with their closest relatives, both phylotypes were thoroughly checked for chimeras with the PINTAIL tool. The phylogenetic analysis (alignment) showed the presence of stem areas with large insertions. Moreover, the 'abnormalities' in the 16S rRNA gene sequences were further confirmed with the mismatches found with universal bacterial primers and probes such as EUB (I-III), ITSf and GM5_341f (Table S5).

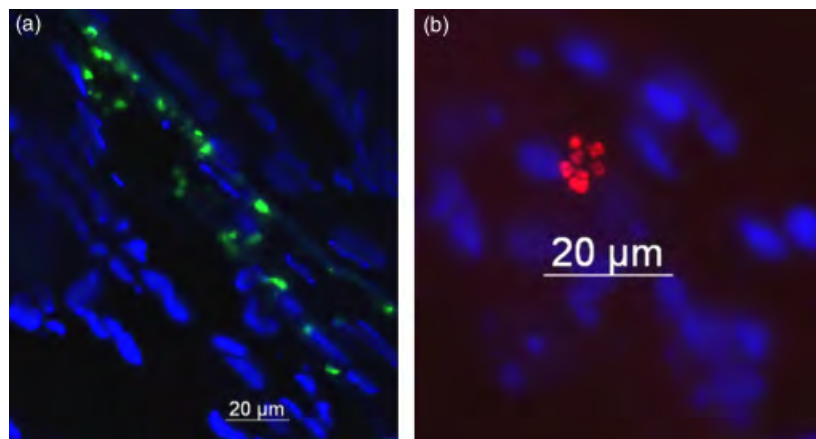
FISH

No signals were detected with the negative control NON338 and with probe BET42a. Hybridization experiments with probes EUB338 (I-III) and GAM42a were positive in samples FN2 and FN3. The cells detected were mostly curved rods ($4\ \mu\text{m} \times 1.5\ \mu\text{m}$) and were located in the internal gut wall (Fig. 3a). Hybridization experiments with the newly designed UncMol89 probe, targeting phylotype Se3-204, were positive in FSe1 and FSe3. The cells detected were packages of cocci organized in groups of four cells or eight cells (each cell around $1.5\ \mu\text{m}$) (Figs 3b and S3), a sarcina morphotype, which is not consistent with that of known *Mollicutes*. They were located in the internal wall surface of the gut and showed a patchy distribution. Such distribution has been described previously for another uncultured gut *Mollicutes* (Kostanjsek *et al.*, 2007). Very few signals were detected with probe EUB338 (I-III) in samples FSe1 and FSe3 and showed a different morphotype to the sarcina detected with probe UncMol89. The sarcina morphotype was detected on the same sections only through DAPI signals, suggesting the weak binding of EUB338 (I-III) to the unknown bacteria.

Discussion

This study analyzed the temporal variability throughout a year of gut microbial communities of *N. norvegicus* individuals along with their morphometric characteristics in order

Fig. 3. (a) Gut section (thickness $5\ \mu\text{m}$) of *Nephrops norvegicus* sample FN2 (August) hybridized with horseradish peroxidase-labeled GAM42a probe specific for *Gammaproteobacteria*, and stained with Alexa488-labeled tyramide. Blue signal corresponds to DAPI signal from the gut-wall epithelial cells and green signal corresponds to the hybridized bacteria. (b) Gut section (thickness $4\ \mu\text{m}$) of *N. norvegicus* sample FSE3 (September) hybridized with Cy3-labeled probe UncMol89 specific for uncultured *Mollicutes* phylotype Se3-204 detected in this study. Blue signal corresponds to DAPI signal from the gut-wall epithelial cells and red signal corresponds to the hybridized bacteria.



to reveal the factors that might influence their gut microbial diversity. None of the morphological factors could explain significantly the bacterial community shifts, while a temporal pattern of variation was observed (Fig. 1; Table 1). The *a priori* hypothesis that gut microbial communities may show a temporal pattern was based on the temporal changes in food availability, which has been shown to potentially influence the gut microbiota (Harris, 1993; Lau *et al.*, 2002; Ley *et al.*, 2008 and references therein). Hence, ecosystem seasonal fluctuations (e.g. phytoplankton bloom) result in differential food availability and quality, whose exact components are still to be determined. Combining the feeding behavior of *N. norvegicus* acting either as a predator (small mollusks, crustaceans and polychaetes) or as a scavenger (fish, bigger invertebrates), with the periodicity observed in the system of Pagasitikos Gulf, it is assumed that the highest quality of available food for *N. norvegicus* would occur around April–May and would slowly decrease till the next bloom.

Interestingly, the above-mentioned fluctuations in food quality and quantity were reflected at the level of microbial community structure (Table 1), not at the onset of the food changes, but a few months later. Indeed, bacterial communities presented a different structure but some degree of overlap ($R = 0.5897$; $P = 0.0166$) between February/March (maximum phytodetritus season) and May (highest food quality and availability). However, it was only after May that the structures of the gut bacterial communities were drastically affected ($R = 0.969$ between May and July). July–August could further represent a transition zone where food still decreases in abundance or quality and thus slight changes in community structures are still observed ($R = 0.6543$). From August to December, when food becomes scarce, there is no drastic change in diet and the gut bacterial communities would not differentiate considerably ($R < 0.41$). These hypotheses were also supported by analyzing the microbial OTU turnover between any two consecutive months (Fig. 4). Between February and August, bacterial communities became gradually more and more dissimilar (> 40 – 55% replacement of the OTUs each time), while after August, no further variation was evidenced ($< 30\%$ turnover).

Noticeably, the results of the clone libraries and FISH experiments, for representatives of these groups, showed that December and September samples were dominated by uncultured *Mollicutes* while August and October samples contained more *Gammaproteobacteria*. The *in silico* analysis for both *Mollicutes* dominant phylotypes showed that the ITS primer used in this study for ARISA had three mismatches with the binding site (Table S5). The ITS length found for the two dominant phylotypes, Se3-204 and D1-695, was 317 and 246 bp, respectively. These two ITS sizes were found in the ARISA tables showing very low relative area values ($< 0.5\%$) (data not shown in this study).

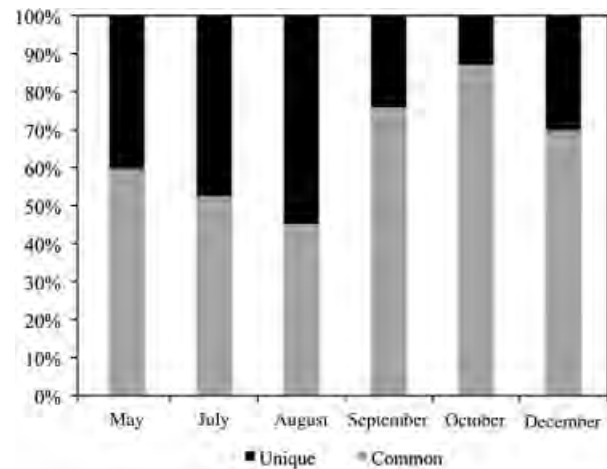


Fig. 4. Relative abundance of common bacterial OTUs from the midgut of *Nephrops norvegicus* between two consecutive months' samples as calculated from the ARISA experiments. The percentage of phylotypes that is shared with the previous month's samples is designated with light gray. February/March is not shown because there was no previous month with which it could be compared.

Consequently, the *Mollicutes*' microdiversity is not totally represented in the NMDS plot due to PCR and primer biases. In order to design a novel forward ARISA primer targeting at the same time *Mollicutes* and the rest of the Bacteria, a primer with three degenerate positions at the 3' primer end with one of them being degenerate for more than two nucleotides (Table S5) would be needed. Because this could lead to additional PCR biases, the testing of such a primer will be addressed in our future research. Apart from this technical consideration, further comparisons between the two techniques (ARISA and clone libraries) are not presented, because the two approaches describe fundamentally different components of the diversity of microbial communities (Bent & Forney, 2008). In addition, ARISA was performed on the ITS level, while sequencing was performed on the 16S and ITS levels; therefore, not only the techniques differed but also the targeted molecular markers. It is then not surprising that a discrepancy between the clone libraries and the ARISA results may be evidenced for OTU numbers. Indeed, it is conceivable that a given 16S rRNA gene sequence might occur in many samples, but could be associated with different ITS sequences (representing intra- or intergenomic variability), the latter being associated only with specific samples.

The clone libraries analysis showed one or two dominant phylotypes for each sample (Table 2), suggesting rather specialized bacterial communities. February was dominated by a *Pseudoalteromonas*-like phylotype. Members of this genus are associated with higher organisms, have the ability of easily colonizing surfaces and display antibacterial, bacteriolytic, agarolytic and algicidal activities (Holmstrom &

Kjelleberg, 1999). Although *N. norvegicus* does not feed on algae, remains of plants can be found in its stomach (Cristo & Cartes, 1998) probably due to passive ingestion. The presence of *Pseudoalteromonas*-like organisms could be related to the presence of algal material in the intestine of *N. norvegicus* assisting in its decomposition. In addition, the second most dominant phylotype in the same sample was closely related to a *Psychrobacter aquimaris* strain, originating from a marine alga, enhancing the inferred alginolytic character of the bacterial community.

Another *Psychrobacter*-like phylotype, with potential lipolytic activity, dominated in May. Members of this genus have been found in a wide range of environments, such as sea ice, sea water, marine sediments, salt marshes, ornithogenic soils, food microbiota, animal tissues and sponges (Bowman, 2006). For example, *Psychrobacter proteolyticus* has been isolated from the gut of the krill *Euphausia superba* (Denner *et al.*, 2001). The lipolytic activity inferred from its closest relatives, combined with the expected high food availability, indicates that lipid digestion is feasible.

The July, August and October communities were dominated by highly similar phylotypes of the genus *Photobacterium* (Tables 2 and S4). Representatives of this genus show fermentative metabolism and are isolated from the light organs of several marine animals. However, bioluminescent bacteria are ubiquitous in fish intestinal tracts, being the most abundant aerobes in such habitats (Farmer & Hickman-Brenner, 2006; Ward *et al.*, 2009). Biochemical studies proved chitinase activity and lipase activity in 96% and 82% of *P. leiognathi* strains, respectively (Farmer & Hickman-Brenner, 2006). Strains of *Photobacterium phosphoreum* have characteristics similar to that of *P. leiognathi* including chitinase activity. Although we did not investigate lipase or chitinase activity in our samples, the dominance (> 60%) of almost identical phylotypes in three different months reveals a specialized community. The phylotypes detected were closely related, as described above, to *Photobacterium* sp. isolated from tissues of marine animals enhancing the hypothesis of their ability to colonize the *N. norvegicus* gut.

After the summer, phylotypes Se3-204 and D1-695 clustered within two groups of uncultured *Mollicutes* (Fig. S2). Many members of *Mollicutes* are obligate intracellular symbionts that possess the smallest genomes of self-replicating organisms (Razin *et al.*, 1998). Some mycoplasmas are known pathogens, but many species appear to be simply part of the natural microbiota of their hosts and seem to have no harmful effects on the host (Giebel *et al.*, 1990). No physiological properties can be inferred for the found *Mollicutes*-related phylotypes, because they share < 83% similarity with cultured representatives. Moreover, it has been suggested that members from the two groups of uncultured *Mollicutes* to which the phylotypes of this study belonged (Fig. S2) may represent only a small part of an

as-yet-uncultured bacterial lineage colonizing the intestines of various arthropods and vertebrate hosts (Kostanjsek *et al.*, 2007). Importantly, these bacteria do not seem to have a parasitic relationship with their hosts, because in most cases, the animals that harbored were healthy (Bano *et al.*, 2007; Kostanjsek *et al.*, 2007; Nechitaylo *et al.*, 2009; Ward *et al.*, 2009).

The FISH specificity of UncMol89, targeting Se3-204 was only tested *in silico* and not empirically. However, the consistent sarcina morphotype detected with UncMol89 and the expected absence of EUB338 (I-III) signals of this specific morphotype (Table S5) argues in favor of sequence Se3-204 originating from the sarcina morphotypes. Although probe UncMol89 had minimum two mismatches with the 'closely' related gut uncultured *Mollicutes* and more than three mismatches to all other known sequences, additional experiments such as the design of nonlabeled competitor probes for the blocking of non-target-binding sites (Manz *et al.*, 1992) should be used in future experiments to ensure the origin of the Se3-204 phylotype from the sarcina cells.

Other ways to better test the specificity of UncMol89 would be the design of a modified UncMol89 with two to three mismatches to the Se3-204 phylotype where diminished probe signaling from the sarcina cells would be expected. Alternatively, UncMol89 could be tested against cultured organisms with two or more mismatches to test whether probe signaling disappears. The absence of signals from the sarcina cells when using EUB338 (I-III) could be explained by the two central mismatches of the probe with the 16S rRNA gene sequence of the phylotype Se3-204 (Table S5). The design of modified EUB probes correcting the mismatches with Se3-204 and resulting in better probe signalling for the sarcina cells would further confirm their origin from Se3-204.

Phylotypes clustering within the genus *Vibrio* were present in most of the samples, showing low (3.5%) to moderate (19.0%) relative abundance. The majority of their closest relatives originated from marine animals (Nasu *et al.*, 2000; Nishiguchi & Nair, 2003; Jensen *et al.*, 2009). This genus is often found in associations with the gut of marine animals varying from parasitism to mutualism and showing diverse metabolic capabilities (Thompson *et al.*, 2004).

The rest of the phylotypes clustered within the groups of *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Alpha*-, *Beta*- and *Deltaproteobacteria*. These phyla dominate frequently in sediment samples. Their low presence could be attributed to remains of sediment particles of ingested food that were not removed by the mechanical evacuation and the rinsing of the gut.

Overall, most of the phylotypes found were associated either with the intestinal tract of marine animals or with their light organs. Consequently, it is most likely that these

phylotypes have the ability to attach to tissue surfaces and successfully colonize the midgut. Some of the phylotypes could also be pathogens, although all animals collected were healthy. The presence of highly similar ($\geq 99\%$) phylotypes in different months at varying frequencies (Tables 2 and S4, Fig. 2) indicates that at least the dominant phylotypes may be present throughout the year, despite fluctuating environmental conditions. The existence of these recurring phylotypes indicates that these bacteria might be representative of specific communities or even participate in symbiotic interactions, i.e. resident bacteria, with *N. norvegicus*. More specifically, the *Gammaproteobacteria* detected are universally dispersed in different animals and varying habitats and appear in *N. norvegicus*' gut at different abundances throughout the year. The hypothesis of the temporal effect of the trophic state of the overlying water column on the gut microbial communities, which this study supports, needs to be further investigated with feeding experiments and estimation of prey availability or phytodetritus flux.

Acknowledgements

We acknowledge support from the International Max Planck Research School of Marine Microbiology (MarMic), the Deutscher Akademischer Austausch Dienst (DAAD). Part of this research was cofunded by the European Social Fund & National Resources EPEAK II-PYTHAGORAS II. Rudolf Amann is acknowledged for advice on FISH and for his comments on the manuscript. We also thank two anonymous reviewers for their comments.

References

- Amann R & Fuchs BM (2008) Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Nat Rev Microbiol* **6**: 339–348.
- Ashelford KE, Chuzhanova NA, Fry JC, Jones AJ & Weightman AJ (2005) At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Appl Environ Microb* **71**: 7724–7736.
- Bano N, DeRae Smith A, Bennett W, Vasquez L & Hollibaugh JT (2007) Dominance of *Mycoplasma* in the guts of the Long-Jawed Mudsucker, *Gillichthys mirabilis*, from five California salt marshes. *Environ Microbiol* **9**: 2636–2641.
- Behrens S, Ruhland C, Inacio J, Huber H, Fonseca A, Spencer-Martins I, Fuchs BM & Amann R (2003) *In situ* accessibility of small-subunit rRNA of members of the domains Bacteria, Archaea, and Eucarya to Cy3-labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microb* **69**: 1748–1758.
- Bell MC, Redant F & Tuck I (2006) *Nephrops* species. *Lobsters: biology, management, aquaculture and fisheries* (Phillips BF, ed), pp. 412–469. Blackwell, Oxford.
- Bent SJ & Forney LJ (2008) The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *ISME J* **2**: 689–695.
- Boer SI, Hedtkamp SIC, van Beusekom JEE, Fuhrman JA, Boetius A & Ramette A (2009) Time- and sediment depth-related variations in bacterial diversity and community structure in subtidal sands. *ISME J* **3**: 780–791.
- Bowman JP (2006) The genus *Psychrobacter*. *The Prokaryotes* (Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H & Stackenbrandt E, eds), pp. 920–930. Springer, New York.
- Cardinale M, Brusetti L, Quatrini P, Borin S, Puglia AM, Rizzi A, Zanardini E, Sorlini C, Corselli C & Daffonchio D (2004) Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. *Appl Environ Microb* **70**: 6147–6156.
- Clarke KR (1993) Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust J Ecol* **18**: 117–143.
- Clarke KR & Green RH (1988) Statistical design and analysis for a biological effects study. *Mar Ecol-Prog Ser* **46**: 213–226.
- Cristo M & Cartes JE (1998) A comparative study of the feeding ecology of *Nephrops norvegicus* (L.), (Decapoda: Nephropidae) in the bathyal Mediterranean and the adjacent Atlantic. *Sci Mar* **62**: 81–90.
- Denner EB, Mark B, Busse HJ, Turkiewicz M & Lubitz W (2001) *Psychrobacter proteolyticus* sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium isolated from the Antarctic krill *Euphausia superba* Dana, excreting a cold-adapted metalloprotease. *Syst Appl Microbiol* **24**: 44–53.
- Du HL, Jiao NZ, Hu YH & Zeng YH (2006) Diversity and distribution of pigmented heterotrophic bacteria in marine environments. *FEMS Microbiol Ecol* **57**: 92–105.
- Duperron S, Bergin C, Zielinski F, Blazejak A, Pernthaler A, McKiness ZP, DeChaine E, Cavanaugh CM & Dubilier N (2006) A dual symbiosis shared by two mussel species, *Bathymodiolus azoricus* and *Bathymodiolus puteoserpentis* (Bivalvia: Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge. *Environ Microbiol* **8**: 1441–1447.
- Farmer JJ III & Hickman-Brenner FW (2006) The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. *The Prokaryotes* (Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H & Stackenbrandt E, eds), pp. 508–563. Springer, New York.
- Fisher MM & Triplett EW (1999) Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl Environ Microb* **65**: 4630–4636.
- Fuchs BM, Woebken D, Zubkov MV, Burkill P & Amann R (2005) Molecular identification of picoplankton populations in contrasting waters of the Arabian Sea. *Aquat Microb Ecol* **39**: 145–157.
- Giebel J, Binder A & Kirchhoff H (1990) Isolation of *Mycoplasma moatsii* from the intestine of wild Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Vet Microbiol* **22**: 23–29.
- Green-Garcia AM (2008) Characterization of the Lucinid bivalve-bacteria symbiotic system: the significance of the geochemical

- habitat on bacterial symbiont diversity and phylogeny. MSc Thesis, Louisiana State University, Baton Rouge, LA.
- Harris JM (1993) The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. *Microb Ecol* **25**: 195–231.
- Holmstrom C & Kjelleberg S (1999) Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiol Ecol* **30**: 285–293.
- Jensen S, Frost P & Torsvik VL (2009) The nonrandom microheterogeneity of 16S rRNA genes in *Vibrio splendidus* may reflect adaptation to versatile lifestyles. *FEMS Microbiol Lett* **294**: 207–215.
- Jung SY, Lee MH, Oh TK, Park YH & Yoon JH (2005) *Psychrobacter cibarius* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int J Syst Evol Micro* **55**: 577–582.
- Kane MD, Poulsen LK & Stahl DA (1993) Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16Ss ribosomal-RNA sequences. *Appl Environ Microb* **59**: 682–686.
- Kemp PF & Aller JY (2004) Estimating prokaryotic diversity: when are 16S rDNA libraries large enough? *Limnol Oceanogr-Meth* **2**: 114–125.
- Kostanjsek R, Strus J & Avgustin G (2007) 'Candidatus Bacilloplasma,' a novel lineage of *Mollicutes* associated with the hindgut wall of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Appl Environ Microb* **73**: 5566–5573.
- Kruskal JB (1964) Multidimensional scaling by optimizing a goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika* **29**: 1–28.
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (Stackenbrandt E & Goodfellow M, eds), pp. 115–175. John Wiley & Sons, Chichester.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP *et al.* (2007) Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947–2948.
- Lau WWY, Jumars PA & Armbrust EV (2002) Genetic diversity of attached bacteria in the hindgut of the deposit-feeding shrimp *Neotrypaea* (formerly *Callinassa*) *californiensis* (Decapoda: Thalassinidae). *Microb Ecol* **43**: 455–466.
- Legendre P & Legendre L (1998) *Numerical Ecology*, 2nd edn. Elsevier, Amsterdam.
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S & Gordon JI (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**: 1022–1023.
- Ley RE, Hamady M, Lozupone C *et al.* (2008) Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* **320**: 1647–1651.
- Loo LO, Baden SP & Ulmestrand M (1993) Suspension-feeding in adult *Nephrops norvegicus* (L.) and *Homarus gammarus* (L.) (decapoda). *Neth J Sea Res* **31**: 291–297.
- Ludwig W, Strunk O, Westram R *et al.* (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**: 1363–1371.
- Manz W, Amann R, Ludwig W, Wagner M & Schleifer K-H (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol* **15**: 593–600.
- Medigue C, Krin E, Pascal G *et al.* (2005) Coping with cold: the genome of the versatile marine Antarctica bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Genome Res* **15**: 1325–1335.
- Muyzer G, Teske A, Wirsén CO & Jannasch HW (1995) Phylogenetic-relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel-electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch Microbiol* **164**: 165–172.
- Nasu H, Iida T, Sugahara T, Yamaichi Y, Park KS, Yokoyama K, Makino K, Shinagawa H & Honda T (2000) A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. *J Clin Microbiol* **38**: 2156–2161.
- Nechitaylo TY, Timmis KN & Golyshin PN (2009) 'Candidatus Lumbricincola', a novel lineage of uncultured *Mollicutes* from earthworms of family Lumbricidae. *Environ Microbiol* **11**: 1016–1026.
- Nishiguchi MK & Nair VS (2003) Evolution of symbiosis in the Vibronaceae: a combined approach using molecules and physiology. *Int J Syst Evol Micro* **53**: 2019–2026.
- 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. *Mar Environ Res* **59**: 493–518.
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J & Glockner FO (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* **35**: 7188–7196.
- Ramette A (2007) Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* **62**: 142–160.
- Ramette A (2009) Quantitative community fingerprinting methods for estimating the abundance of operational taxonomic units in natural microbial communities. *Appl Environ Microb* **75**: 2495–2505.
- Razin S, Yogev D & Naot Y (1998) Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol R* **62**: 1094–1156.
- Romanenko LA, Tanaka N, Uchino M, Kalinovskaya NI & Mikhailov VV (2008) Diversity and antagonistic activity of sea ice bacteria isolated from the sea of Japan. *Microbes Environ* **23**: 209–214.
- Sarda F & Valladares FJ (1990) Gastric evacuation of different foods by *Nephrops norvegicus* (Crustacea: Decapoda) and estimation of soft-tissue ingested, maximum food-intake and cannibalism in captivity. *Mar Biol* **104**: 25–30.
- Sawabe T, Tanaka R, Iqbal MM, Tajima K, Ezura Y, Ivanova EP & Christen R (2000) Assignment of *Alteromonas elyakovii* KMM 162(T) and five strains isolated from spot-wounded fronds of

- Laminaria japonica* to *Pseudoalteromonas elyakovii* comb. nov. and the extended description of the species. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 265–271.
- Thompson FL, Iida T & Swings J (2004) Biodiversity of vibrios. *Microbiol Mol Biol R* **68**: 403–431.
- Tsukamoto H, Takakura Y, Mine T & Yamamoto T (2008) *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 produces two sialyltransferases, alpha-/beta-galactoside alpha2,3-sialyltransferase and beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase. *J Biochem* **143**: 187–197.
- Urakawa H, Kita-Tsukamoto K & Ohwada K (1999) Restriction fragment length polymorphism analysis of psychrophilic and psychrotrophic *Vibrio* and *Photobacterium* from the north-western Pacific Ocean and Otsuchi Bay, Japan. *Can J Microbiol* **45**: 67–76.
- Ward NL, Steven B, Penn K, Methe BA & Detrich WH (2009) Characterization of the intestinal microbiota of two Antarctic notothenioid fish species. *Extremophiles* **13**: 679–685.
- Yonge CM (1924) Studies on the comparative physiology of digestion: II. The mechanism of feeding, digestion, and assimilation in *Nephrops norvegicus*. *J Exp Biol* **1**: 343–389.
- Figure S2.** Neighbour-joining tree based on the *Mollicutes* 16S rRNA gene sequences from the midgut of *Nephrops norvegicus*.
- Figure S3.** Gut section (thickness 4 µm) of *Nephrops norvegicus* sample FSE3 (September) hybridized with Cy3-labeled probe UncMol89 specific for uncultured *Mollicutes* phylo-type Se3-204 detected in this study.
- Table S1.** Morphometric data for the samples used for ARISA and clone libraries analysis.
- Table S2.** Samples used for DNA extraction and FISH (all DNA samples were used for ARISA analysis).
- Table S3.** Oligonucleotide probes used in the study.
- Table S4.** Pairwise comparisons of the 16S rRNA gene sequence similarities (%) of *Photobacterium* sp.-like sequences and their closest relatives: (1) *Photobacterium leiognathi* strain RM1 (AY292947), (2) *P. leiognathi* (AY292917), (3) *Photobacterium* sp. HAR23 (AB038031), (4) *Photobacterium* sp. Jt-ISH-224 (AB293986).
- Table S5.** *In silico* detected mismatches (underlined) of phylotypes Se3-204 and D1-695 with primers and probe EUB338 (I-III) used in this study with.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Clone library coverage based on Good's C estimator.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Table S1. Morphometric data for the samples used for ARISA and clone libraries analysis. Pooled samples are designated with italics, and samples analyzed with clone libraries are in boldface.

Sample	Month	Sex	Body weight (g)	Carapace length (mm)	Carapace width (mm)	Abdominal width (mm)
F40	February	M	89.91	50.21	27.47	24.57
F44	February	M	44.71	26.77	24.5	23.48
<i>F1 (F40/F44)</i>	<i>February</i>	<i>M</i>	<i>67.31</i>	<i>38.49</i>	<i>25.985</i>	<i>24.025</i>
Mr4	March	F	17.98	36.04	18.25	17.59
Mr10	March	F	26.31	36.4	18.6	19.8
<i>Mr1 (Mr4/Mr10)</i>	<i>March</i>	<i>F</i>	<i>22.145</i>	<i>36.22</i>	<i>18.425</i>	<i>18.695</i>
Mr26	March	M	30.35	40.6	22.47	21.18
My27	May	F	12.47	27.32	13.95	15.33
My44	May	M	49.79	42.75	21.84	21.83
My45	May	M	27.69	36.15	18.89	18.65
My46	May	M	29.2	37.22	17.64	19.22
My47	May	M	39.21	40.36	21.3	20.63
Jl1	July	F	38.51	38.54	20.51	22.57
Jl3	July	F	65.28	48.13	25.22	26.82
Jl14	July	M	59.9	44.79	23.18	23.12
Jl17	July	M	50.38	41.92	20.78	21.41
Jl19	July	M	39.73	40.16	19.65	20.37
<i>Jl4 (Jl14/Jl17/Jl19)</i>	<i>July</i>	<i>M</i>	<i>50</i>	<i>42.29</i>	<i>21.2</i>	<i>21.63</i>
Ag4	August	F	22.53	35.18	17.94	19.8
Ag6	August	F	28.35	35.94	18.67	19
Ag9	August	F	43.54	42.53	21.39	23.33
<i>Ag1 (Ag4/Ag6/Ag9)</i>	<i>August</i>	<i>F</i>	<i>31.47</i>	<i>37.88</i>	<i>19.33</i>	<i>20.71</i>
Ag2.1	August	F	30.66	36.4	18.3	20.5
Ag8	August	F	23.72	32.93	16.53	18.4
Ag16	August	F	22.05	35.66	18	20.46
Ag23	August	F	31.48	37.41	18.63	21.4
Ag31	August	M	52.58	42.46	21.34	21.88
Se1	September	M	43.3	40.32	22.74	21.83
Se2	September	M	68.9	44.96	27.17	27.09
Se3	September	M	22.297	31.47	17.59	17
Se4	September	F	45.85	40.92	20.53	20.45
Se5	September	F	27.5	35.04	17.83	18.32
Se6	September	F	21.61	31.67	19.32	18.67
Se7	September	F	36.04	38.9	19.98	22.5
Se9	September	F	31.51	37.58	19.35	21.22
Se11	September	M	28.88	35.33	17.83	18.51
Se12	September	M	32.41	37.94	18.45	17.51
O1	October	F	36.71	38.36	19.21	22.11
O2	October	F	24.8	35.61	16.44	19.75
O3	October	F	17.37	29.97	14.91	16.85
O4	October	F	11.85	28.59	13.34	13.9
O5	October	M	29.12	36.84	17.72	18.53
O6	October	M	27.76	35.71	17.35	18.12
D1	December	F	22.06	35.25	17.3	19.86
D2	December	F	21.99	32.12	16.23	18.18
D3	December	F	20.77	32.18	15.51	17.17
D4	December	M	32.78	40.05	19.48	20.27
D6	December	M	59.47	45.88	24.09	23.1
D7	December	M	18.85	35	17.32	17.87

Table S2. Samples used for DNA extraction and FISH (all DNA samples were used for ARISA analysis). Samples used for the construction of the clone libraries are indicated by bold letters. F: February, Mr: March, My: May, Jl: July, Ag: August, Se: September, O: October, D: December, FN: fixed August samples, FSe: fixed September samples

Month	Sample code	Pooled samples	Fixed samples
February	-	F1 (F40/F44)	
March	Mr26	Mr1 (Mr4/Mr10)	
May	My27/My44/My45/ My46 /My47		
July	Jl1 /Jl3	Jl4 (Jl14/Jl17/Jl19)	
August	Ag2.1/Ag8/Ag16/Ag23/ Ag31	Ag1 (Ag4/Ag6/Ag9)	FN2/FN3
September	Se1/Se2/ Se3 /Se4/Se5/Se6/Se7/Se9/Se11/Se12		FSe3/FSe1
October	O1/ O2 /O3/O4/O5/O6		
December	D1 /D2/D3/D4/D6/D7		

Table S3. Oligonucleotide probes used in the study. FA: formamide concentration.

Probe	Group specificity	Sequence (5' → 3')	<i>Escherichia coli</i> 16S or 23S rRNA position	FA%	Reference
EUB338 (I-III)	Almost all Bacteria	GCWGCCWCCCGTAGGWGT	338-355	35	Daims, <i>et al.</i> , 1999
NON338	Negative control	ACTCCTACGGGAGGCAGC	-	35	Amann, <i>et al.</i> , 1990
GAM42a	γ-Proteobacteria	GCCTTCCCACATCGTTT	helix 42a, 23S rRNA	35	Manz <i>et al.</i> , 1992
BET42a	β-Proteobacteria	GCCTTCCCACCTTCGTTT	helix 42a, 23S rRNA	35	Manz <i>et al.</i> , 1992
ALF968 (*)	α-Proteobacteria	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	968	35	Gloeckner, <i>et al.</i> , 1999
UncMol89	Uncult. Mollicutes	CGTTCGCCACTAACACCAAATC	89	35	This study

*: ALF968 has low specificity as determined from database search. However in this study no signals were detected with this probe so no further checking was performed

Amann RI, Krumholz L & Stahl DA (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol* **172**: 762-770.

Daims H, Bruhl A, Amann R, Schleifer KH & Wagner M (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol* **22**: 434-444.

Glockner FO, Fuchs BM & Amann R (1999) Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3721-3726.

Manz W, Amann R, Ludwig W, Wagner M & Schleifer K-H (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol* **15**: 593-600.

Table S4. Pairwise comparisons of the 16S rRNA gene sequence similarities (%) of *Photobacterium* sp.-like sequences and their closest relatives, 1: *Photobacterium leiognathi* strain RM1 (AY292947), 2: *P. leiognathi* (AY292917), 3: *Photobacterium* sp. HAR23 (AB038031), 4: *Photobacterium* sp. Jt-ISH-224 (AB293986). Highest similarity, 99%, is indicated in boldface. For sample codes see text.

1	2	3	4	Jl1-36	Jl1-4	Jl1-1	Ag31-3	Ag31-6	Ag31-13	O2-1	phylotypes
-	96	99	98	96	99	99	99	96	97	99	1
	-	96	96	99	96	96	96	98	96	96	2
		-	98	96	99	99	98	97	98	99	3
			-	96	99	99	98	96	97	99	4
				-	96	96	96	98	96	96	Jl1-36
					-	98	98	96	97	98	Jl1-4
						-	99	96	97	99	Jl1-1
							-	96	97	99	Ag31-3
								-	96	96	Ag31-6
									-	97	Ag31-13
										-	O2-1

Table S5. *In silico* detected mismatches (underlined) of phylotypes Se3-204 and D1-695 with primers and probe EUB338 (I-III) used in this study with.

Primer/Probe	Primer sequence/Probe binding site	
ITSF	5'-GTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3'	
Se3-204	5'-GTCGTAACAAGGTAT <u>CTCT</u> TA-3'	3 mismatches
D1-695	5'-GTCGTAACAAGGTAT <u>CACT</u> A-3'	3 mismatches
GM5_341f	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'	
Se3-204	5'- <u>TCT</u> ACGGA <u>A</u> GGCTGCAG-3'	3 mismatches
EUB338 (I-III)	5'-ACWCCTACGGGWGGCWGC-3'	
Se3-204	5'-ACT <u>TCT</u> ACGGA <u>A</u> GGCTGC-3'	2 mismatches

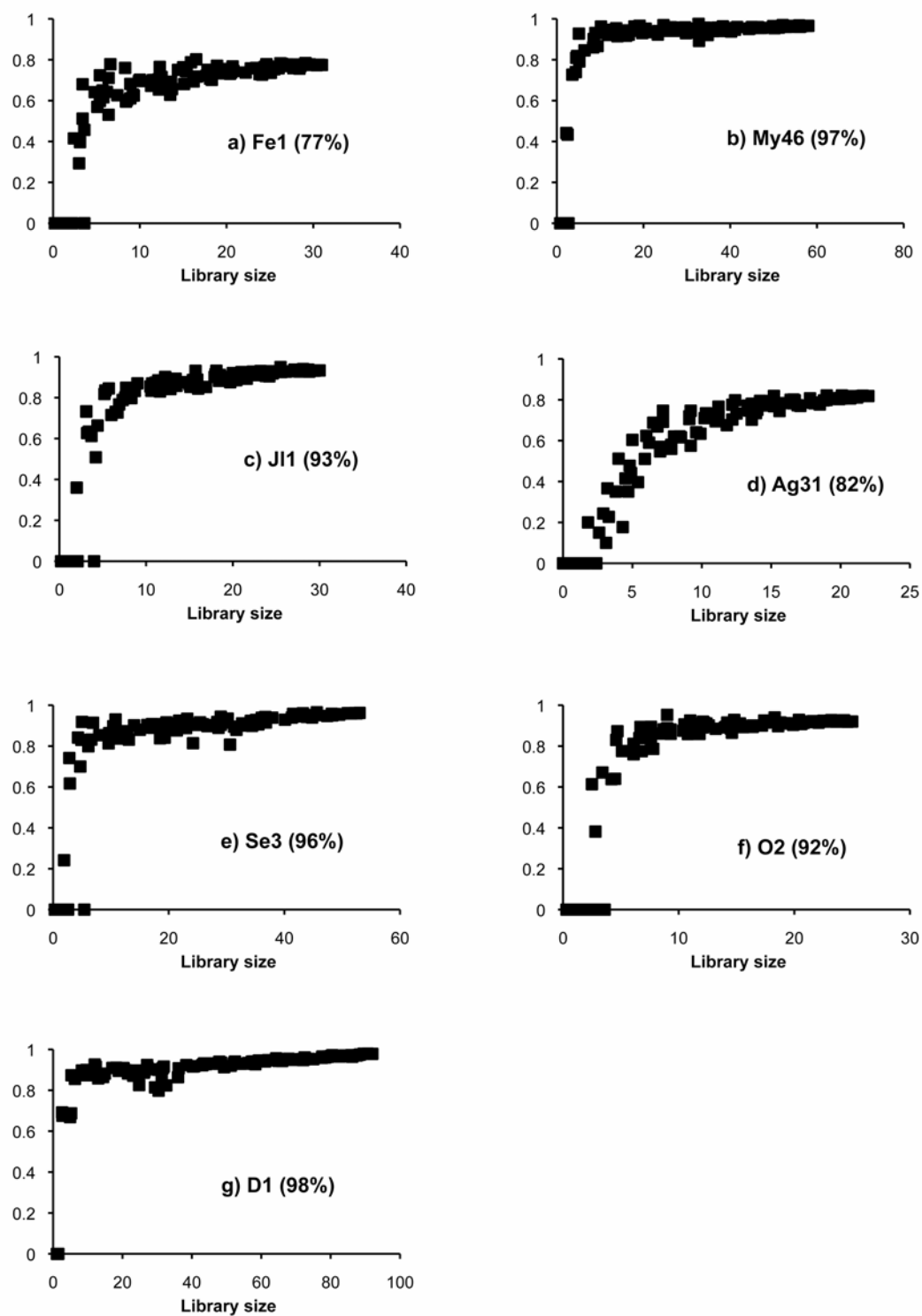


Figure S1. Clone library coverage based on Good's C estimator. The coverage value is indicated for each sample in parenthesis.

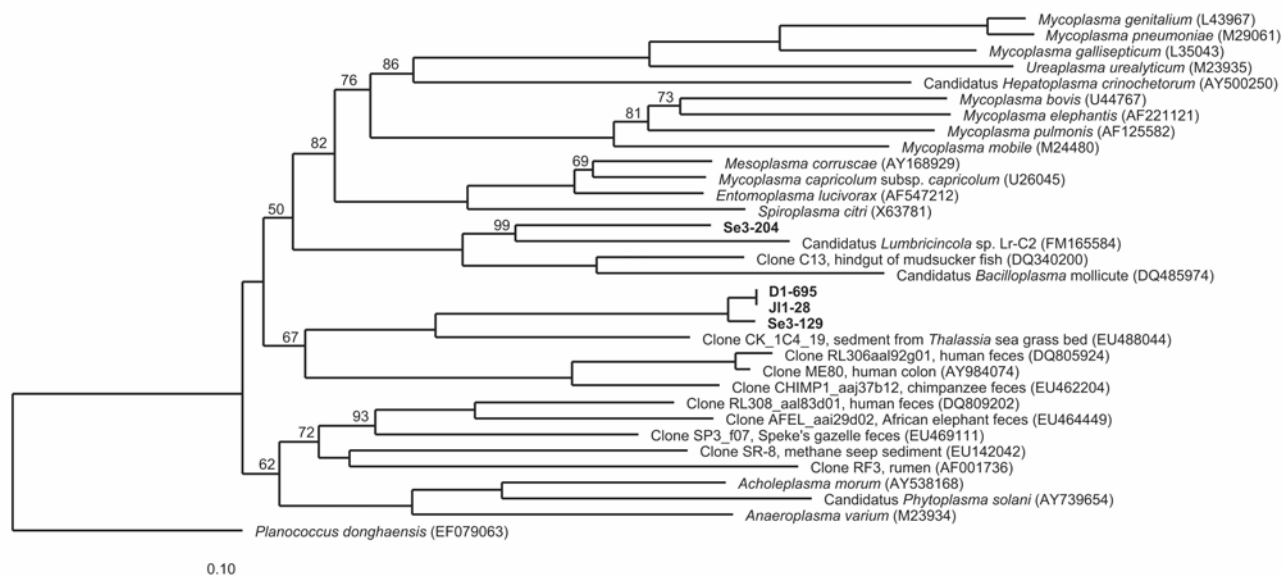


Figure S2. Neighbour-joining tree based on the Mollicutes 16S rRNA sequences from the midgut of *Nephrops norvegicus*. *Planococcus donghaensis* (Firmicutes) was used as an outgroup. The bar corresponds to 10% nucleotide difference and bootstrap values were calculated from 1000 replicate trees. Only bootstrap values over 50% are shown in the tree.

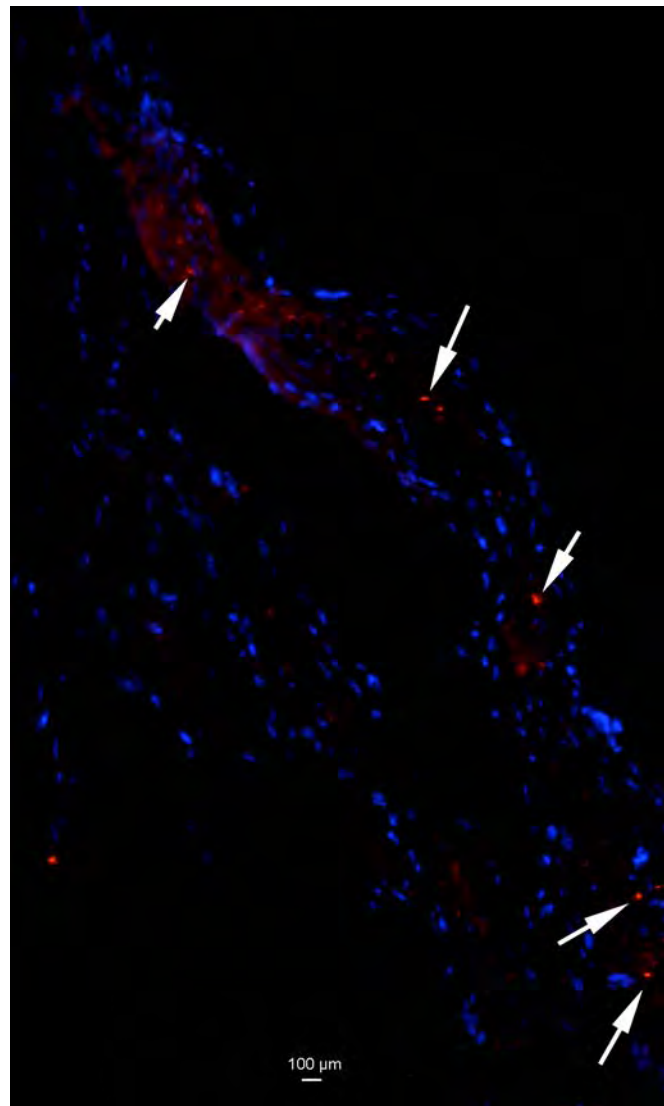


Figure S3. Gut section (thickness 4 μm) of *Nephrops norvegicus* sample FSE3 (September) hybridized with Cy3 labeled probe UncMol89 specific for uncultured Mollicutes phylotype Se3-204 detected in this study. Arrows indicate sarcina-like aggregates of Mollicutes. Blue signal corresponds to DAPI signal from the gut wall epithelial cells and red signal to the hybridized bacteria

Gut bacteria associated with different diets in reared *Nephrops norvegicus*

Alexandra Meziti, Eleni Mente, Konstantinos Ar. Kormas

ABSTRACT

The impact of different diets on the gut microbiota of reared *Nephrops norvegicus* was investigated, based on the bacterial 16S rRNA gene diversity. *N. norvegicus* specimens were collected from Pagasitikos Gulf (Greece) and were kept in rearing tanks in the laboratory, reflecting *in situ* conditions, for six months. Animals were divided into three groups based on the supplied diet: frozen natural food (mussels, Group M), dry formulated pellet (Group P) and starvation (Group S). Gut samples were collected at the initiation of the experiment, and after three and six months. Water samples from the tanks were analyzed at all *N. norvegicus* sampling points as well as samples from the food provided. All samples were analyzed by studying the 16S rRNA bacterial diversity. Statistical analysis in gut samples showed the presence of two groups (G1 and G2) depending on whether food was provided or not (M and P samples vs. S samples). No significant differences were detected between M and P samples. NMDS analysis in gut and water samples' bacterial communities revealed that starvation samples as well as three months mussel fed sample were more similar to the tanks' water samples than with the rest of the gut samples. Multiple diversity indices revealed higher diversity in the starvation samples. M samples were dominated by groups of γ -, ϵ - Proteobacteria and Tenericutes, while P samples were mostly dominated by γ -Proteobacteria. Phylotypes clustering in *Photobacterium leiognathi*, *Shewanella* sp. and the

order Entomoplasmatales were abundant in the M and P samples but had low abundance in S samples. Our study showed that starvation of the animals induces a rather opportunistic bacterial community in the *N. norvegicus* gut, while food-induced changes resulted in the selection of specific species, which occur in the natural population, and might be related to the animal's nutrition.