

**ΠΑΝΕΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΤΙΤΛΟΣ:** Ανάπτυξη, αναγνώριση και μικροσκοπική μελέτη βιοϋμενίων  
σε εξωσκελετό της γαρίδας *Melicertus kerathurus*

Εαξίρη Νικολίνα – Αλεξάνδρα

ΒΟΛΟΣ 2018

**UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF AGRICULTURAL SCIENCES  
DEPARTMENT OF ICHTHYOLOGY AND AQUATIC  
ENVIRONMENT**

**POSTGRADUATE MASTERS THESIS**

**<<Biofilm development on the shell of the shrimp *Melicertus kerathurus*  
scanning electron microscopy identification>>**

**Xaxiri Nikolina – Alexandra**

**VOLOS 2018**

**II**

**<< Ανάπτυξη, αναγνώριση και μικροσκοπική μελέτη βιοϋμενίων σε  
εξωσκελετό της γαρίδας *Melicertus kerathurus* >>**

### **Τριμελής επιτροπή:**

1. Βερίλλης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής, Μικροσκοπία και Ανάλυση Εικόνας στην Ιστολογία και στους Υδρόβιους Οργανισμούς, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων.
2. Κορμάς Κωνσταντίνος, Καθηγητής, Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.
3. Καραγιάννη Ήρα, Επίκουρη Καθηγήτρια, Υδροβιολογία, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Μέλος.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

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

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Βερίλλη Παναγιώτη καθώς και το μέλος της εξεταστικής επιτροπής μου Καθηγητή κ. Κορμά Κωνσταντίνο για την πολύτιμη βοήθειά τους και τη διαρκή υποστήριξή τους, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Νικούλη Ελένη για την άμεση και πολύτιμη βοήθεια της.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της διατριβής ήταν η παρακολούθηση της αύξησης βακτηριακών βιοϋμενίων σε τμήματα από κομμάτια του εξωσκελετού της γαρίδας *Melicertus kerathurus* σε θαλασσινό νερό. Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε εξωσκελετός γαρίδας και θαλασσινό νερό που συλλέχθηκε από τα Καλά Νερά Μαγνησίας. Δημιουργήθηκαν τρεις ομάδες δειγμάτων και η κάθε ομάδα αποτελούνταν από τρία δοχεία, που διέφεραν μόνο ως προς τη μεταχείριση του περιχεόμενου νερού. Στην πρώτη ομάδα (ABC) χρησιμοποιήθηκε διηθημένο θαλασσινό νερό από φίλτρο διαμέτρου πόρου 0,1μm για την απομάκρυνση των περισσότερων μικροοργανισμών, στην δεύτερη ομάδα (DEF) χρησιμοποιήθηκε διηθημένο θαλασσινό νερό από φίλτρο διαμέτρου πόρου 2μm, ενώ στην τελευταία ομάδα (GHI) χρησιμοποιήθηκε τεχνητό θαλασσινό νερό (NaCl 35 ppt σε απιονισμένο νερό). Σε χρόνο T0 έγινε η πρώτη δειγματοληψία για να παρατηρηθεί η ύπαρξη βιοϋμενίου στην επιφάνεια του εξωσκελετού πριν την έναρξη των επωάσεων. Συνολικά έγιναν 5 δειγματοληψίες σε διάστημα 12 ημερών. Για τη μονιμοποίηση των δειγμάτων προς παρατήρηση χρησιμοποιήθηκε 2,5% γλουταραλδεΐδη σε αποστειρωμένο θαλασσινό νερό για τέσσερις ώρες στους 4°C και έπειτα αφυδατώθηκαν και επιμεταλλώθηκαν. Από κάθε δειγματοληψία τοποθετούνταν ένα δείγμα στην κατάψυξη στους -80°C για μοριακή ανάλυση. Τέλος, ακολούθησε παρατήρηση των δειγμάτων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης και εξετάστηκαν τα αποτελέσματα από τις μοριακές αναλύσεις.

Σε κάθε δειγματοληψία παρατηρήθηκε αρκετά ταχεία ανάπτυξη των βιοϋμενίων και στις τρεις ομάδες δειγμάτων από την 2<sup>η</sup> κιόλας ημέρα. Στην ομάδα του μάρτυρα DEF υπήρξε ο μεγαλύτερος πληθυσμός βιοϋμενίων. Αλλά και στις υπόλοιπες ομάδες υπήρχε μεγάλη ανάπτυξη βακτηρίων και έπειτα και βιοϋμενίων από την πρώτη

κιάλας δειγματοληψία. Στην 9<sup>η</sup> ημέρα άρχισε να υπάρχει μείωση βακτηρίων και αλλοίωση της επιφάνειας του εξωσκελετού. Το ίδιο συνέβη και την 12<sup>η</sup> ημέρα, οπότε και ολοκληρώθηκαν οι επωάσεις. Η διατριβή ανέδειξε πως είναι δυνατή η αύξηση βακτηριακών βιοϋμενίων σε χιτινοσκελετό γαρίδας σε θαλασσινό νερό. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι πιθανοί αποικοδομητές του εξωσκελετού και είναι πιθανόν να αξιοποιηθούν για την αποικοδόμηση υπολειμμάτων χιτίνης από υδατοεκτροφές αρθροπόδων.

Οι μοριακές αναλύσεις έδειξαν ότι το κοινό ποσοστό για τις δειγματοληψίες ήταν γύρω στο 9% και στις ίδιες ημέρες, αλλά με διαφορετική μεταχείριση ήταν γύρω στο 21-25%. Η υψηλότερη μικροβιακή βιομάζα ήταν στο 10G με max=43213. Όσον αφορά τον αριθμό αλληλουχιών, ο μεγαλύτερος ήταν στα 16D με N=87921 και όσον αφορά τον αριθμό ειδών ο μεγαλύτερος ήταν στα 16A με S=286.

**Λέξεις κλειδιά:** βακτήρια, βιοϋμένιο, γαρίδα, *Melicertus kerathurus*, χιτίνη, εξωσκελετός, θαλασσινό νερό, ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως, μοριακές αναλύσεις.

## Περιεχόμενα

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 ΒΙΟΪΜΕΝΙΑ.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 ΒΙΟΪΜΕΝΙΑ ΣΕ ΘΑΛΑΣΣΙΝΟ ΝΕΡΟ.....</b>	<b>4</b>
<b>1.4 ΧΙΤΙΝΗ .....</b>	<b>4</b>
<b>1.5 ΓΑΡΙΔΑ <i>MELICERTUS KERATHURUS</i>.....</b>	<b>7</b>
<b>1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....</b>	<b>9</b>
<b>2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 ΔΙΗΘΗΣΗ ΝΕΡΟΥ.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....</b>	<b>10</b>
<b>2.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ .....</b>	<b>11</b>
<b>2.4 ΑΦΥΔΑΤΩΣΗ .....</b>	<b>11</b>
<b>2.5 ΕΠΙΜΕΤΑΛΛΩΣΗ.....</b>	<b>12</b>
<b>2.6 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ .....</b>	<b>12</b>
<b>2.7 ΜΕΤΡΗΣΗ ΒΙΟΟΓΚΩΝ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ .....</b>	<b>13</b>
<b>2.8 ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....</b>	<b>13</b>
<b>3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΒΙΟΟΓΚΟΥ.....</b>	<b>30</b>
<b>3.3 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ.....</b>	<b>33</b>
<b>3.4 ΒΑΡΗ.....</b>	<b>40</b>



<b>4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>43</b>
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>46</b>
<b>7.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>48</b>
<b>6. ABSTRACT .....</b>	<b>51</b>

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Βιοϋμένια

Τα περισσότερα βακτήρια, τα οποία ζουν και αναπτύσσονται σε υδάτινα οικοσυστήματα, προτιμούν να αναπτύσσονται σε κοινότητες προσκολλημένες σε μια στερεή επιφάνεια. Όταν προκαρυωτικοί και ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί προσκολληθούν σε κάποια εξωτερική πλευρά και δημιουργήσουν ένα τρισδιάστατο σύνολο το οποίο αγγίζει τα  $10^9$  κύτταρα ανά στοιβάδα, τότε αναπτύσσονται με την μορφή των βιοϋμενίων. Μπορεί να ειπωθεί ότι είναι μια συνένωση μικροβιακών κυττάρων και περιβάλλεται από την ενδοκυτταρική πολυσακχαριδική μεμβράνη που παράγεται από τα βακτήρια. Η ακριβής φυσιολογία των βιοϋμενίων ποικίλει και σχετίζεται με τη φύση των μικροοργανισμών και το περιβάλλον στο οποίο διαβιώνουν (Nadel et.al. 2008).

Το βιοϋμένιο είναι βυθισμένο μέσα σε μια στοιβάδα πολυμερούς οργανικής ύλης που αποτελείται από μία συνάθροιση φωτότροφων, χημειότροφων και ετερότροφων μικροοργανισμών. Γενικά δεν υπάρχει κάποιος σημαντικός λόγος για να πρέπει να γίνεται μεταβολή από πλαγκτικούς οργανισμούς σε βιοϋμένια, και επειδή υπάρχει μεγάλη αντίθεση από είδος σε είδος, είναι ένα φαινόμενο πολύ σύνθετο, όταν συμβαίνει. Αυτό βέβαια μπορεί και να οφείλεται στο γεγονός ότι ένα τέτοιο σύστημα παρέχει μια σχετική προστασία από διάφορους θηρευτές, αντιμικροβιακές και τοξικές ενώσεις, αλλά και από θερμική αλλαγή (Johnson 2007).

Διάτομα και νηματοειδή βακτήρια περιέχονται τα βιοϋμένια, τα οποία καλλιεργούνται σε επιφάνειες που βρίσκονται βαθιά στο νερό, ενώ αυτά που

καλλιεργούνται σε εργαστηριακά περιβάλλοντα αποτελούνται από κροκοειδείς μικροοργανισμούς οι οποίοι συνδέονται με την εξωτερική μεμβράνη. Τα βιοϋμένια μπορεί να περιλαμβάνουν επίσης μη κυτταρικά υλικά ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο έχει αναπτυχθεί το βιοϋμένιο. Τέτοια υλικά μπορεί να είναι ορυκτοί κρύσταλλοι, διαβρωμένα σωματίδια, συστατικά αίματος και άλλα (Donlan 2002).

Σημαντική μπορεί να χαρακτηριστεί η ομοιότητα που παρατηρείται μεταξύ των βιοϋμενίων. Αυτό, βέβαια, μπορεί να προκύπτει εξαιτίας της διάρθρωσής τους η οποία έχει σχέση με την εξωτερική μεμβράνη που σχηματίζεται από τα συστατικά των κυττάρων. Όμως η χημεία και φυσιολογία των βιοϋμενίων ποικίλει ανάλογα με τη φύση των μικροοργανισμών και το περιβάλλον ανάπτυξής τους. Η αύξηση του πληθυσμού των βιοϋμενίων επιτυγχάνεται μέσω της αύξησης των ίδιων των κυττάρων τους, τα οποία είναι διαφορετικά μεταξύ τους ως προς τη μορφή τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα και την διαφορετική μορφή της εξωτερικής μεμβράνης τους (Κορμάς, 2010).

Τα συσσωματώματα στο πόσιμο νερό περιέχουν αρκετούς παθογόνους οργανισμούς όπως *Escherichiacoli*, *Aeromonas* και *Pseudomonas* spp. οι οποίοι είναι γνωστό ότι μπορεί να προκαλέσουν κίνδυνο στην υγεία του ανθρώπου (Septemberetal. 2007). Επίσης τα βιοϋμένια είναι υπεύθυνα για διάφορα προβλήματα στα δόντια, μολύνσεις σε ιατρικά όργανα καθώς και για μηχανικά προβλήματα πλεύσης των πλοίων. Ωστόσο, ο ρόλος που έχουν σε σχέση με την οικολογία των ρεόντων υδάτων είναι αρκετά σημαντικός. Ως πράσινοι γλοιώδεις σχηματισμοί μακροσκοπικά μπορούν να γίνουν ορατοί σε πέτρες, φυτά και άλλες επιφάνειες του υδάτινου περιβάλλοντος. Αυτοί οι σχηματισμοί βοηθούν στο να διατηρείται το υδάτινο περιβάλλον σε καλή ποιότητα το νερό, συμβάλουν στην απομάκρυνση των αιωρούμενων σωματιδίων, στην ανακύκλιση ανόργανων

αλάτων και στη μεταφορά ενέργειας στα υψηλότερα τροφικά επίπεδα, καθώς είναι αυτοί που αποτελούν τους κύριους λειτουργούς πρωτογενούς παραγωγής (Κορμάς, 2010).

## 1.2 Σχηματισμός και ανάπτυξη

Το βιοϋμένιο μπορεί να αποτελείται από μια συνάθροιση διαφόρων ειδών μικροοργανισμών, ενώ ο σχηματισμός του είναι μια αναπτυξιακή διαδικασία που ξεκινά με την έκκριση της εξωκυτταρικής πολυσακχαριδικής μεμβράνης και οδηγεί στον σχηματισμό ενός τρισδιάστατου βιοϋμενίου (Nadel et.al. 2008). Για να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός και η ανάπτυξη του βιοϋμενίου είναι σημαντικό πρώτα να πραγματοποιηθούν πολλά στάδια εποίκησης. Στην αρχή η επιλογή του περιβάλλοντος μπορεί να αλλάξει για τα πρώτα λεπτά, διότι υπάρχει προσκόλληση των βακτηρίων σε μία επιφάνεια ακριβώς πριν γίνει η αφαίρεση του νερού μεταξύ του κύτταρου και της επιφάνειας προσκόλλησης. Με αυτό τον τρόπο μπορούν τα βακτήρια να εξετάσουν αν είναι κατάλληλη προς αύξηση η επιφάνεια, ώστε να μην αποκτήσουν αμετάβλητη ανάπτυξη σε ακατάλληλες επιφάνειες (Johnson 2007).

Πρώτα δημιουργούνται οι εποικιστές, έπειτα υπάρχει προσκόλληση των δευτερογενών εποικιστών και δημιουργείται το πολυεδρικό βιοϋμένιο. Με αυτόν τον τρόπο ξεκινάει η σταδιακή εξέλιξη του σχηματισμού που περιέχει και την αύξηση της μικροβιακής μάζας. Αποδείχθηκε ότι αρχιτεκτονικά η δομή της εξωκυτταρικής στοιβάδας είναι αρκετά περίεργη και διαθέτει ελεύθερη ροή νερού (Wahl, 2012). Η διαμόρφωση του βιοϋμενίου είναι σωστή, όταν μπορεί να αντισταθεί σε δυνάμεις αποκόλλησης. Αυτό πρέπει να συμβαίνει, για να μην υπάρξει αποκόλληση σε μερικά περιφερειακά τμήματα, όταν οι τυρβώδεις δυνάμεις γίνουν ισχυρές (Κορμάς, 2010).

### 1.3 Βιοϋμένια σε θαλασσινό νερό

Το υδάτινο περιβάλλον αποτελεί ένα από τα πιο ευνοϊκά περιβάλλοντα για τους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς, καθώς αυτοί μπορούν να εποικίσουν σε διάφορες επιφάνειες, αρκεί η επιφάνεια να είναι βυθισμένη μέσα στο νερό. Από διάτομα και βακτήρια σχηματίζονται βιοϋμένια τα οποία μπορούν να προσκολλούν σε επιφάνειες σχηματίζοντας τρισδιάστατους σχηματισμούς. Τα βακτηριακά βιοϋμένια στο υδάτινο περιβάλλον συνδέονται με επιφάνειες ζώντων ιστών, επιφάνειες καθετήρων και σωληνώσεις βιομηχανικού ή πόσιμου νερού. Η ακριβής φυσιολογία των βιοϋμενίων διαφέρει και αφορά στη φύση των μικροοργανισμών και στο περιβάλλον στο οποίο διαβιώνουν. Τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στη χρήση αντιβιοτικών την έχουν τα βακτηριακά βιοϋμένια (Salta et.al. 2013).

Μια από τις πιο ιδανικές επιφάνειες για την υποδοχή των βιοϋμενίων είναι η εξωτερική επιφάνεια των θαλάσσιων οργανισμών. Επειδή η ύπαρξη βιοϋμενίου έχει σπουδαίο ρόλο στην ροή πληροφοριών, ενέργειας και ύλης του ξενιστή, συνθέτουν έναν καθοριστικό παράγοντα στο σχηματισμό των αβιοτικών και βιοτικών αλληλεπιδράσεων του ξενιστή όπου σχηματίζονται (Wahl, 2012).

### 1.4 Χιτίνη

Η χιτίνη είναι ένας φυσικός γραμμικός πολυσακχαρίτης υψηλής σημασίας. Με τις αλυσίδες της σχηματίζει στρώματα ορθογώνια μεταξύ τους και δημιουργεί ένα βιοπολυμερές το οποίο αποτελείται από ένα τεράστιο αριθμό ζωντανών οργανισμών και άφθονη κυταρίνη. Οι ιδιότητες της μοιάζουν με της κερατίνης και δεν απαντάται σε σπονδυλωτά. Η χιτίνη, είναι ένας πολυμερής υδατάνθρακας που αποτελείται από εναλλασσόμενα β-1,4-συνδεδεμένα υπολείμματα N-ακετυλογλυκοζαμίνης (Εικ. 1) και είναι η δεύτερη σε αφθονία οργανική ένωση στη

φύση. Μόνο στην υδάτινη βιόσφαιρα, εκτιμάται ότι περισσότεροι από 1.011 τόνους χιτίνης παράγονται σε ετήσια βάση. Εάν αυτή η μεγάλη ποσότητα αδιάλυτου άνθρακα και αζώτου δεν μετατρέπεται σε βιολογικά χρήσιμο υλικό, οι ωκεανοί θα είχαν εξαντληθεί από αυτά τα στοιχεία σε μία δεκαετία. Στην πραγματικότητα, τα θαλάσσια ιζήματα περιέχουν μόνο ίχνη της χιτίνης και ο κύκλος εργασιών του πολυσακχαρίτη αποδίδεται κατά κύριο λόγο στα θαλάσσια βακτήρια (Keyhani 1999).

Συνήθως απαντάται σε αυξανόμενες διαταγμένες κρυσταλλικές μικροϊνώδεις δομές και είναι η βασική δομική συνιστώσα των μυκήτων και του εξωσκελετού των αρθρόποδων. Μπορεί να χαρακτηριστεί με βάση την πηγή της σε δύο αλλομορφές, την α και β. Έχει γνωστοποιηθεί και μία τρίτη αλλομορφή της, η γ- χιτίνη, η οποία πιθανόν να έχει προκύψει ως μια ξεχωριστή μορφή της α αλλομορφής. Βασικός της ρόλος είναι ότι αποτελεί πηγή πρωτεϊνών και ασβεστίου (Κουτρουμάνης 2008).

Πιο αναλυτικά, στα αρθρόποδα ο εξωσκελετός απαρτίζεται από ένα πολυφασικό βιολογικό σύνθετο υλικό το οποίο αποτελείται από οργανικές ουσίες (κρυσταλλική α-χιτίνη και διάφορους τύπους πρωτεϊνών) και μέταλλα/ορυκτά (κυρίως ασβεστίτη). Η σκληρότητα προέρχεται από πρωτεΐνες και επιτυγχάνεται μόνο μερικές ώρες μετά την έκδυση. Όπως η κυτταρίνη έτσι και η χιτίνη βρίσκεται στον εξωσκελετό των αρθρόποδων και των εντόμων που φέρουν κέλυφος ως κρυσταλλικά ινίδια νανο-μεγέθους που βρίσκονται ενσωματωμένα σε μια μήτρα πρωτεΐνης.

Η α-χιτίνη (που συνήθως εμφανίζεται στα έντομα) έχει διαπιστωθεί ότι πιο συχνά συναντάται σε κρυσταλλογραφική υφή. Το μεγαλύτερο τμήμα της παρουσιάζει παράλληλο προσανατολισμό με την επιφάνεια του εξωσκελετού. Γενικά η χιτίνη

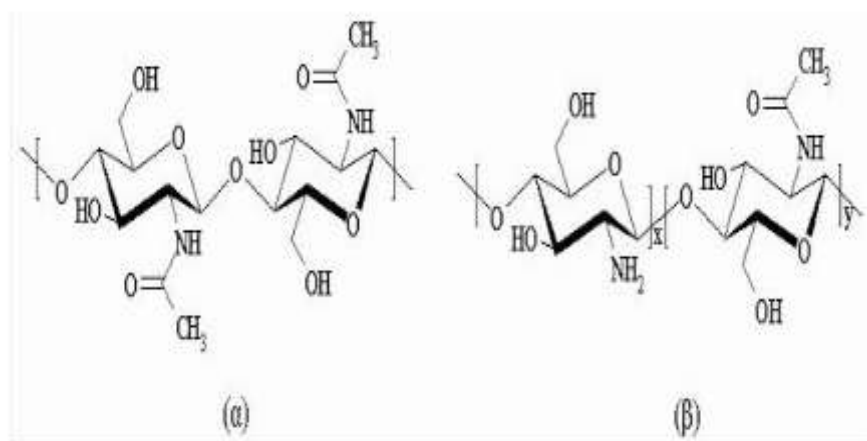
είναι αδιάλυτη στο νερό, στην αιθυλική αλκοόλη και στους οργανικούς διαλύτες. Είναι άπεπτη για τα περισσότερα ζώα και αποικοδομείται μόνο από μερικά βακτήρια και ακτινομύκητες (Robles et.al., 2016).

Η χιτίνη και η χιτοζάνη έχουν πολύ χαμηλή τοξικότητα και είναι βιοσυμβατές και βιοδιασπώμενες. Το γεγονός ότι η χιτίνη έχει υψηλή κρυσταλλικότητα που προέρχεται από τους δεσμούς υδρογόνου της ακετάμιδο-ομάδας, έχει ως αποτέλεσμα να εμφανίζει χαμηλή διαλυτότητα. Η ακριβής ταυτοποίηση της δομής της χιτίνης με περίθλαση ακτίνων X απέδειξε ότι το μόριο της αποτελείται από γλυκοζαμίνη και οξικό οξύ. Επιπλέον έχει βρεθεί και παρουσία αζώτου σε αυτήν (Κουτρουμάνης 2008).

Είναι γνωστό ότι ο εξωσκελετός των θαλασσινών αρθροπόδων είναι πλούσιος σε χιτίνη, από την οποία δημιουργείται η χιτοζάνη. Το ενδιαφέρον για τη χιτίνη είναι αυξημένο, διότι, πέραν του γεγονότος ότι μετά την κυτταρίνη είναι το δεύτερο αφθονότερο βιοπολυμερές, αποτελεί ταυτόχρονα και απεριόριστη πηγή χιτοζάνης, τον μοναδικό ψευδο-φυσικό κατιονικό πολυσακχαρίτη. Μελέτες έχουν εστιάσει στη βιοσυγγένεια, στη βιοδιασπασιμότητα και τη διαθεσιμότητα της χιτίνης. Αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό της είναι η ανάπτυξη πολυμερών νανοσωματιδίων μέσω της οποίας ενισχύονται οι μήτρες ή οι σύνθετες επιστρώσεις και διασφαλίζεται η βιολογική δραστηριότητα και η προστασία τους από ενζυμικούς παράγοντες (Salaberia 2015).

Κρίνεται απαραίτητη η αναφορά στις θετικές ιδιότητες της χιτίνης. Ειδικότερα, ο συνδυασμός της χιτίνης και του παραγώγου 6-O- καρβοξυλομεθύλου επιτυγχάνουν την ενεργοποίηση των περιτοναϊκών μακροφάγων, τα οποία συμβάλλουν στην καθυστέρηση της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων. Απόδειξη αποτελεί η πειραματική εφαρμογή που διεξήχθη σε ποντίκια και έφερε

το αντίστοιχο αποτέλεσμα. Επίσης, μέσω της χιτίνης ενεργοποιούνται μηχανισμοί μη ειδικής άμυνας οι οποίοι προστατεύουν τον ανθρώπινο οργανισμό από ενδεχόμενη μόλυνση του στο βακτήριο *E. coli*. Συμπερασματικά, γίνεται κατανοητή η αντικαρκινική, αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή της δράση (Κουτρομάνης 2008).



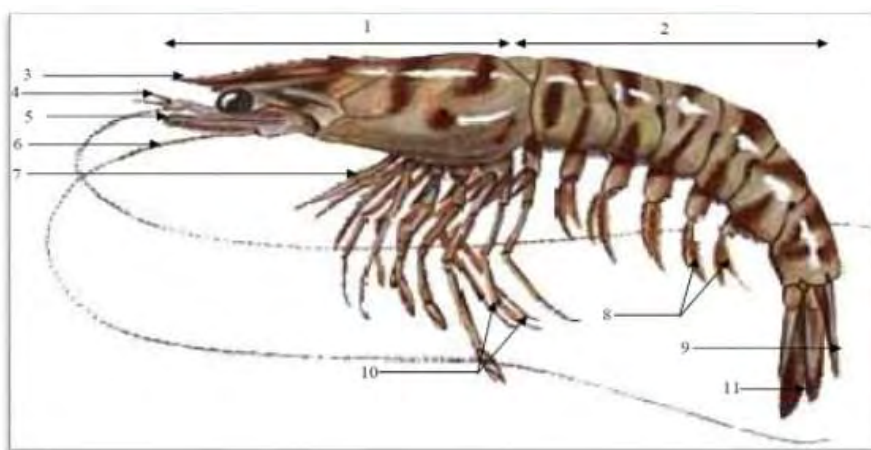
**Εικόνα 1:** Χημική δομή α) χιτίνης, β) χιτοζάνης (Robles et.al., 2016).

### 1.5 Γαρίδα *Melicertus kerathurus*

Η γαρίδα *Melicertus kerathurus* (Εικ. 2) είναι ένα δεκάποδο της ομοταξίας των μαλακοστράκων και ανήκει στην οικογένεια *Penaeidae*. Εξετάζοντας τη μορφολογία της διαπιστώθηκε ότι αποτελείται από ένα βαριά ασβεστοποιημένο κέλυφος, τον θώρακα, έναν κοντό λαιμό ο οποίος βρίσκεται στην αυλάκωση του κεφαλιού, δύο εγκοπές καρδιάς που επιτρέπουν την αναγνώριση της διαμήκουσ διάμεσης καρδιακής περιοχής και δύο πλευρικών εγκάρσιων περιοχών, από οκτώ ζεύγη προσθηκών εκ των οποίων τα τρία πρώτα ζεύγη ανήκουν στα στόμια και παρέχουν λειτουργίες μάσησης, ενώ τα πέντε πίσω ζευγάρια επιτρέπουν κίνηση και τερματίζονται με πείρους (πρέπει να σημειωθεί ότι το τρίτο βαδιστικό πόδι



είναι λίγο πιο ανεπτυγμένο από το δεύτερο) και υπάρχουν βράγχια για την αναπνοή. Το γένος αλλά κυρίως τα γεννητικά χαρακτηριστικά αναδιοργανώθηκαν μετά την πρόταση των Perez Farfante και Kensley που αφορούσε μορφολογικές διαφορές. Έτσι πολλά είδη που ανήκαν στο γένος *Melicertus* μετατέθηκαν σε νέα γένη στην οικογένεια Penaeidae. Το *M. kerathurus* είναι μια μεγάλη γαρίδα, της οποίας το συνολικό μήκος της είναι συνήθως 11-14 cm για τα αρσενικά και 13-17 cm για τα θηλυκά. Το μέγιστο μέγεθος ( $L_{\infty}$ ) παρατηρήθηκε στην Ελλάδα και στην Ιταλία, συνολικού μήκους 25,2 και 27,2 cm αντίστοιχα (TL) (Anon 2011).



**Εικόνα 2.** Μορφολογία της γαρίδας (*Melicertus kerathurus*) 1 - Κεφαλοθώρακας, 2 - Κοιλιά, 3 - Ρύγχος, 4 - Κερατίδιο, 5-Σκαφοκέριτο, 6 - Κεραίες, 7 - Γναθικά πόδια, 8 - Πλεπόδια, 9 - Τέλσο, 10 - Βαδιστικά πόδια, 11 - Ουροπόδια (Anon., 2011).

Το *Melicertus kerathurus* έχει ευρεία γεωγραφική κατανομή στον κόσμο (Εικ. 3). Βρίσκεται σε όλη τη λεκάνη της Μεσογείου (συμπεριλαμβανομένης της Θάλασσας του Μαρμαρά) και στον Ατλαντικό από την Πορτογαλία έως και την Αγκόλα (d'Udekemd'Acoz, 1999). Στον ανατολικό Ατλαντικό έχουν αναφερθεί περιστασιακά στη νότια Αγγλία. Στη Τυνησία, αυτό το είδος είναι ιδιαίτερα άφθονο στον κόλπο του Gabes.



**Εικόνα 3.**Γεωγραφική εξάπλωση της *M. Kerathurus*.

### 1.6 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η καλλιέργεια βιοϋμενίων σε κομμάτια εξωσκελετού της γαρίδας *M. kerathurus*, η παρακολούθηση του ρυθμού ανάπτυξής τους και η κατανόηση των συνθηκών που επιταχύνουν την ανάπτυξη αυτή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης ώστε να είναι ευδιάκριτες οι διαφορές του χιτινοσκελετού καθώς και του πληθυσμού των βιοϋμενίων σε κάθε δειγματοληψία. Ακολούθησαν μοριακές αναλύσεις της δομής των βακτηριακών κοινοτήτων που αναπτύχθηκαν.

## 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Διήθηση νερού

Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκε δείγμα νερού από τα Καλά Νερά Μαγνησίας. Δημιουργήθηκαν 3 ομάδες από τρία επαναληπτικά δοχεία των 500ml καλλιέργειας σε κάθε μία με διαφορετική διήθηση νερού (αρίθμηση από το Α έως και το Ι) για την παρατήρηση της αύξησης βιοϋμενίων σε διαφορετικές συνθήκες (Εικ. 4-5). Στην πρώτη ομάδα (ABC) χρησιμοποιήθηκε

διηθημένο θαλασσινό νερό από φίλτρο διαμέτρου πόρου 0.1μm για την απομάκρυνση του μεγαλύτερου μέρους των μικροοργανισμών, στην δεύτερη ομάδα (DEF) χρησιμοποιήθηκε διηθημένο θαλασσινό νερό από φίλτρο διαμέτρου πόρου 2μm, ώστε να συμπεριληφθεί το μεγαλύτερο μέρος των βακτηρίων αλλά όχι και των θηρευτών τους ενώ στην τελευταία ομάδα (GHI) χρησιμοποιήθηκε τεχνητό θαλασσινό νερό (NaCl), ώστε να διαπιστωθεί η πιθανή αύξηση βιοϋμενίων από βακτήρια που υπήρχαν ήδη στον εξωσκελετό της γαρίδας και μπορούν να αυξηθούν αποκλειστικά με μοναδικές πηγές ανόργανων θρεπτικών και οργανικού υλικού από τον ίδιο τον εξωσκελετό.

## 2.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Πρώτα αφαιρέθηκε ο εξωσκελετός της γαρίδας ο οποίος τεμαχίστηκε σε μικρότερα τμήματα (διαστάσεων περίπου 1 cm) και εν συνεχεία έγινε έκπλυση με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό. Η διαδικασία αυτή στοχεύει στην απομάκρυνση των βακτηρίων που επικάθονται στον εξωσκελετό αλλά δεν απομακρύνει τα βακτήρια που πιθανώς να είναι ήδη προσκολλημένα στον εξωσκελετό. Τέλος, τοποθετήθηκαν 10-12 κομμάτια εξωσκελετού σε κάθε μπουκάλι. Ακολούθησε η διαδικασία καλλιέργειας σε αναδευτήρα στους 18°C με συνεχή ανάδευση σε σκιερό μέρος έως ότου διαπιστωθεί η μη περαιτέρω αύξηση βιοϋμενίων



**Εικόνες 4-5 :** Μπουκάλια με θαλασσίνο νερό από φίλτρο διαμέτρου πόρου 0.1μm, 2 μm και τεχνητό θαλασσίνο νερό (NaCl).

### 2.3 Διαδικασία

Σε χρόνο t<sub>0</sub> απομονώθηκε ένα κομμάτι εξωσκελετού για να εξεταστεί η δομή του βιοϋμενίου πριν την έναρξη των επώσεων. Η πρώτη δειγματοληψία έγινε στις δύο ημέρες παραμονής του δείγματος στο θαλασσίνο νερό. Αφαιρέθηκαν τρία κομμάτια από την κάθε ομάδα (ABC, DEF και GHI). Δύο από αυτά τοποθετήθηκαν σε πλαστικά μπουκαλάκια (falcon) με γλουταραλδεύδη 2,5% για να γίνει η μονιμοποίηση και το ένα τοποθετήθηκε στους -80<sup>0</sup>C για τις μοριακές αναλύσεις. Τα προς μονιμοποίηση δείγματα μεταφέρθηκαν στο ψυγείο για τέσσερις ώρες. Ακολούθησε η διαδικασία της αφυδάτωσης και της επιμετάλλωσης και η παρατήρηση του δείγματος σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως και λήψη φωτογραφιών. Έγιναν πέντε δειγματοληψίες μέσα σε 14 ημέρες.

### 2.4 Αφυδάτωση

Για την αφυδάτωση χρησιμοποιήθηκε αλκοόλη 100% και αποστειρωμένο θαλασσίνο

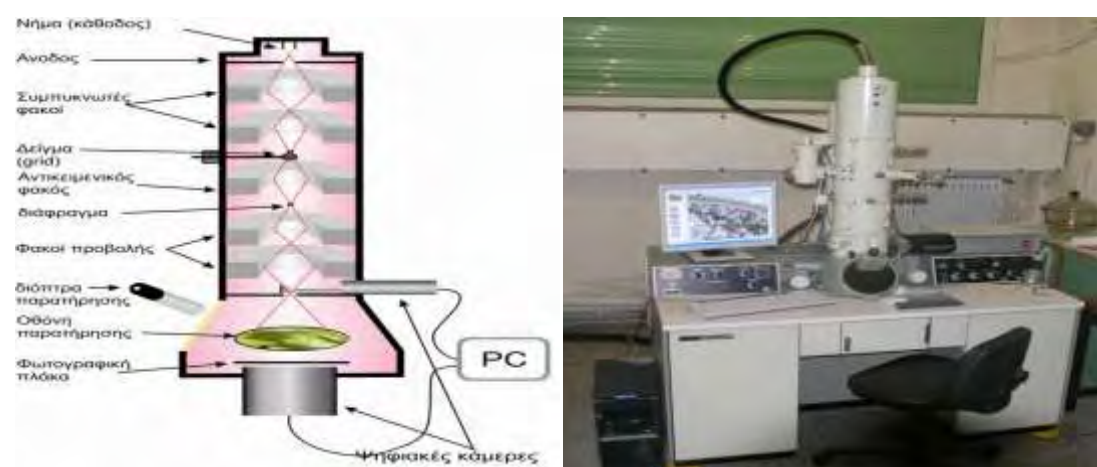
νερό. Η αφυδάτωση έγινε σε 10 στάδια αλλάζοντας τη σύσταση του διαλύματος ανά 10 λεπτά της ώρας σε ποσοστά αλκοόλης (30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 95% X2 και 100% X3).

## 2.5 Επιμετάλλωση

Σημαντική είναι η επιμετάλλωση των δειγμάτων για την παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Πρώτα έγινε επικόλληση των δειγμάτων σε ειδικές βάσεις (stubs) με αγώγιμη ταινία διπλής όψεως. Τέλος με τη βοήθεια αερίου αργού τα δείγματα επιμεταλλώθηκαν στη συσκευή επιμετάλλωσης χρυσού (40 mA, 120 sec).

## 2.6 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης Cambridge Stereo Scan 240. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης χρησιμοποιεί δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας. Τα ηλεκτρόνια προσκρούουν στην επιφάνεια του δείγματος και η εικόνα προκύπτει μέσω δευτερευόντων και οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων.



Εικόνες 6-7: Ηλεκτρονικό (μικροσκόπιο σάρωσης) (<http://sfa.univ-poitiers.fr/>).

## 2.7 Μέτρηση βιοόγκων – Μοριακή ανάλυση

Για την μέτρηση των βιοόγκων των βακτηριακών κυττάρων μετρήθηκε η διάμετρος από 500 βακτήρια ανά δείγμα, τα οποία ήταν από όλες τις δειγματοληψίες ξεχωριστά για την επάνω και την κάτω επιφάνεια. Έπειτα χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Origin pro 8 μετρήθηκαν 500 διαστάσεις από βακτήρια και για να γίνει η μέτρηση εφαρμόστηκε η μέθοδος των 3.

Για να γίνει η μοριακή ανάλυση ποικιλότητας των βακτηρίων έπρεπε από κάθε δειγματοληψία να κρατείται ένα δείγμα και να τοποθετείται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι το τέλος των δειγματοληψιών. Αφού πρώτα έγινε απομόνωση DNA, έπειτα στάλθηκαν σε εξειδικευμένο εργαστήριο αλληλούχισης DNA (MRDNA, Shallowater, TX, USA) και μετά από περίπου ένα μήνα τα αποτελέσματα ήταν έτοιμα προς εξέταση μετά από την απαραίτητη βιοπληροφορική επεξεργασία με το λογισμικό MOTHUR (Schloss et al. 2009)

## 2.8 Μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα Origin Pro 8. Η στατιστική ανάλυση από 500 βακτήρια ξεχωριστά για κάθε δειγματοληψία, για την κάθε μεταχείριση και ξεχωριστά για την επάνω και την κάτω επιφάνεια. Στο πρώτο στάδιο εξετάστηκαν οι βιοόγκο εάν οι παρατηρήσεις του καθενός από τα δείγματα ξεχωριστά ακολουθούν την κανονική κατανομή ή όχι με τη χρήση του One way Anova with Tuckeytest. Για να προκύψει η σύγκριση των αποτελεσμάτων των βιοόγκων πραγματοποιήθηκε t-test διότι τα δεδομένα του πειράματος ακολούθησαν την κανονική κατανομή συνεπώς οι τιμές των δειγμάτων οι οποίες παρουσιάζουν κατανομή εμφανίζουν ως διάμεσο  $\pm$  τυπική απόκλιση.

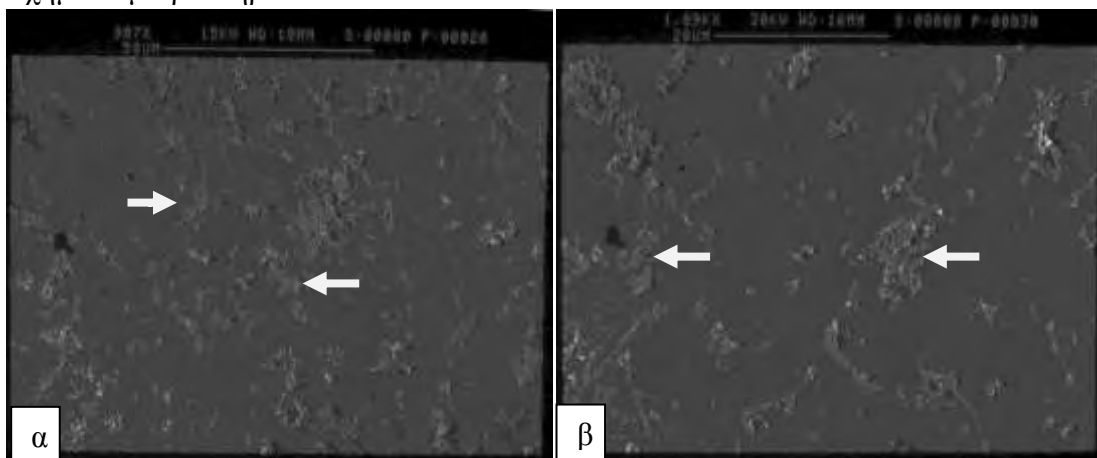
### 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Μικροσκοπική μελέτη

Για την παρατήρηση των μικροοργανισμών, προτού αρχίσει δημιουργία καλλιέργειας, έγινε δειγματοληψία σε χρόνο  $t_0$ . Κατά την παρατήρηση πρέπει να τονισθεί ότι τα βακτήρια σχημάτισαν κάποια μορφή αποικίας. Πιο συγκεκριμένα στην επάνω επιφάνεια εμφανίστηκαν κατά τόπους βακτήρια μικρού μεγέθους (εικ. 8 α,β). Στην κάτω επιφάνεια τα βακτήρια ήταν περισσότερα από ότι στην επάνω, αλλά και εδώ το μέγεθος τους ήταν μικρό (εικ. 9 α,β).



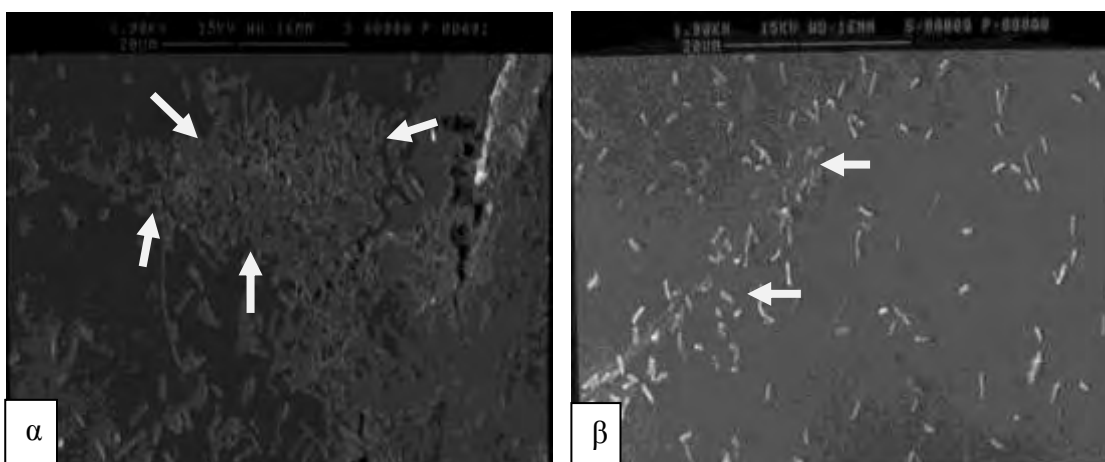
**Εικόνα 8:** Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως, πληθυσμός σε χρόνο  $t_0$  της επάνω επιφάνειας. Τα βέλη στις 8 α,β δείχνουν έναν μικρό σχηματισμό βακτηρίων.



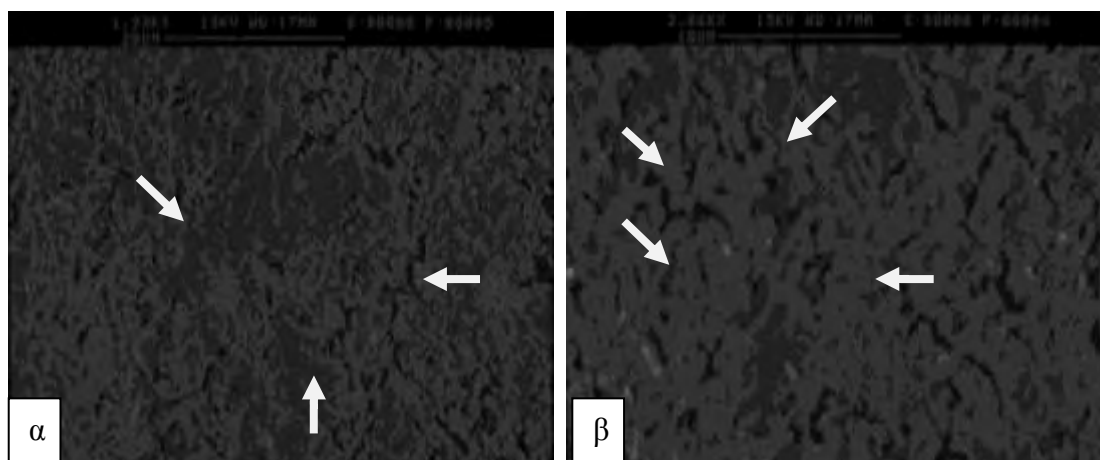
**Εικόνα 9:** Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως, πληθυσμός σε

χρόνο  $t_0$  της κάτω επιφάνειας. Τα βέλη δείχνουν μερικά βακτήρια μικρού μεγέθους.

Η πρώτη δειγματοληψία έγινε στις 2 πρώτες ημέρες. Στο δείγμα που βρισκόταν σε διηθημένο θαλασσινό νερό από φίλτρο διαμέτρου πόρου  $0,1\mu\text{m}$  βρέθηκαν στην επάνω επιφάνεια κατά τόπους περιοχές με έντονη συγκέντρωση βακτηρίων καθώς και περιοχές με μικρή κάλυψη βακτηρίων (Εικόνα 10 α, β). Όσον αφορά την κάτω επιφάνεια παρατηρήθηκε η ύπαρξη αρκετών βακτηρίων κατά τόπους αλλά και σχηματισμός βιοϋμενίου (Εικόνα 11 α, β)..



**Εικόνα 10:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 2 ημέρες καλλιέργειας της επάνω επιφάνειας, με διηθημένο φίλτρο διαμέτρου πόρου  $0,1\mu\text{m}$ . Τα βέλη δείχνουν έντονη συγκέντρωση βακτηρίων (εικ. 10α), επίσης δείχνουν περιοχές με μικρή κάλυψη βακτηρίων (εικ. 10β). Κλίμακα μπάρας:  $20\mu\text{m}$ .

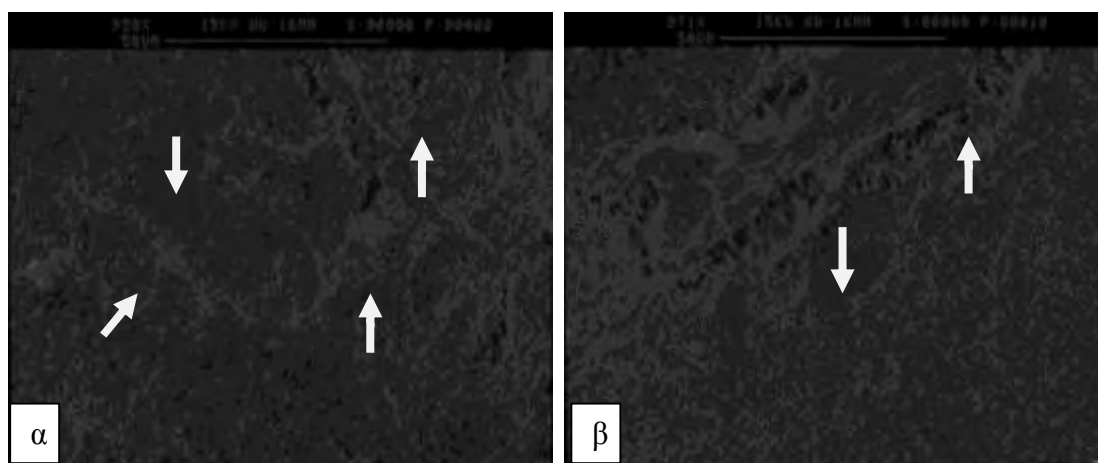


**Εικόνα 11:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 2 ημέρες καλλιέργειας της κάτω

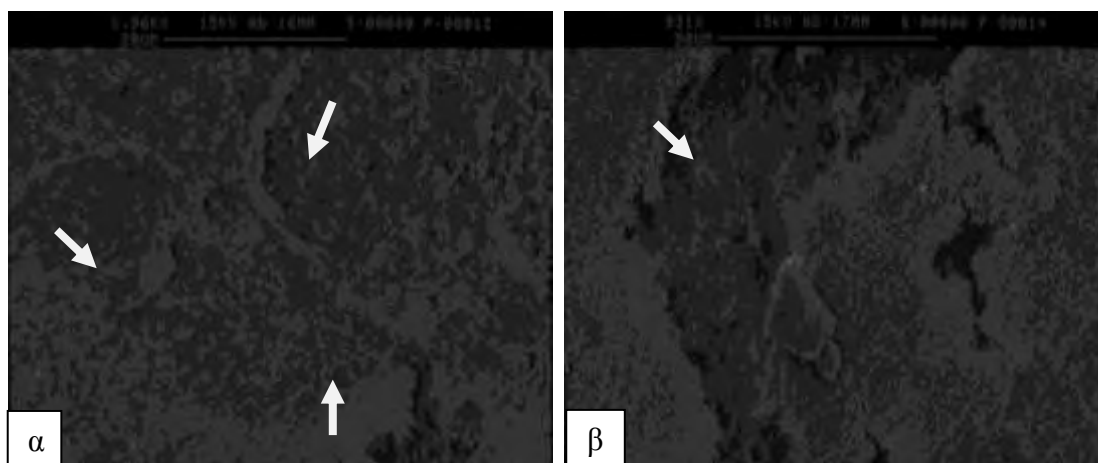


επιφάνειας με διηθημένο φίλτρο διαμέτρου πόρου 0,1 $\mu$ m. Τα βέλη δείχνουν ύπαρξη αρκετών βακτηρίων και σχηματισμός βιοϋμενίου. Κλίμακα μπάρας: 10 $\mu$ m και 20 $\mu$ m.

Στη διήθηση με θαλασσινό νερό από φίλτρο διαμέτρου πόρου 2 $\mu$ m υπήρχαν αρκετά βακτήρια και στις δύο επιφάνειες.



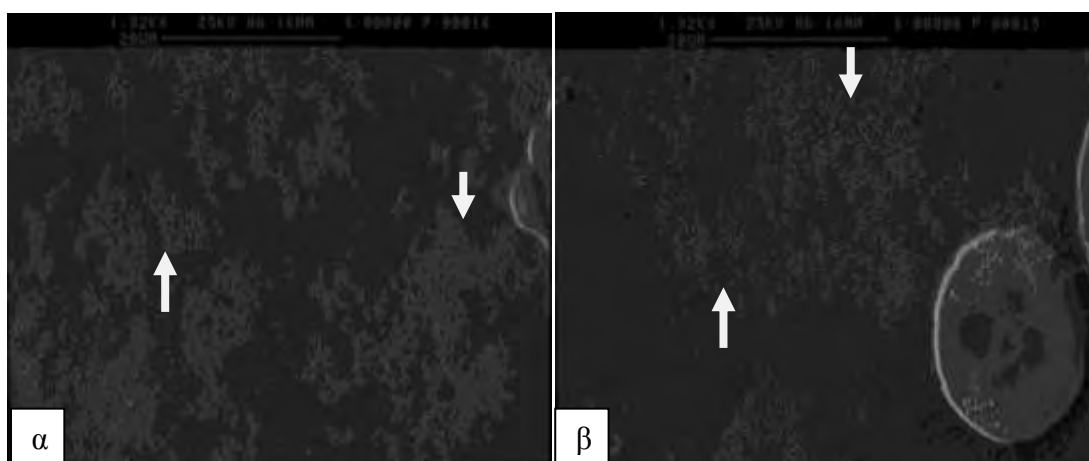
**Εικόνα 12:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 2 ημέρες καλλιέργειας της επάνω επιφάνειας, με διηθημένο φίλτρο διαμέτρου πόρου 2 $\mu$ m. Τα βέλη δείχνουν αρκετά βακτήρια. Κλίμακα μπάρας: 50 $\mu$ m.



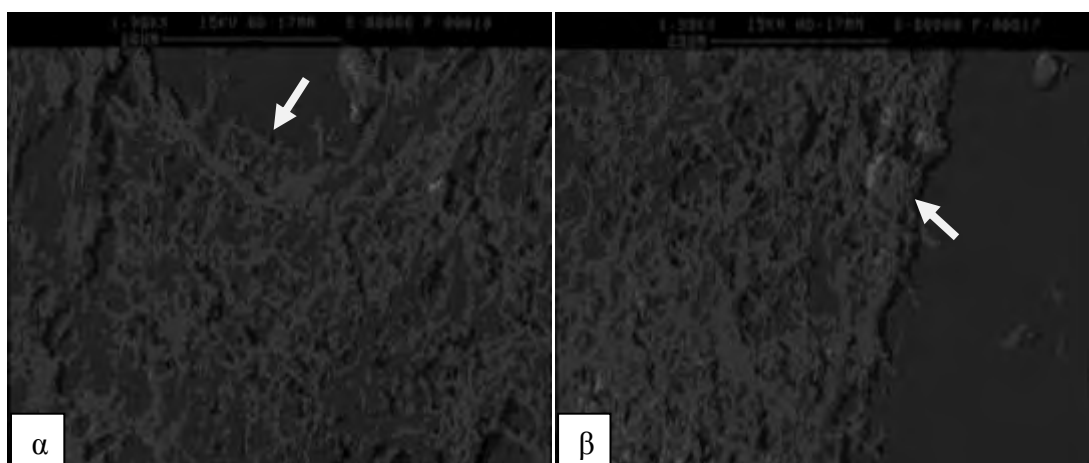
**Εικόνα 13:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 2 ημέρες καλλιέργειας της κάτω επιφάνειας, με διηθημένο φίλτρο διαμέτρου πόρου 2 $\mu$ m. Τα βέλη δείχνουν αρκετά βακτήρια και έναν μικρό σχηματισμό βιοϋμενίων (εικ. 13α) και δείχνουν βακτήρια (εικ.13β).

Κλίμακα μπάρας: 20μm και 50μm.

Στη διήθηση με τεχνητό θαλασσινό νερό στην επάνω επιφάνεια υπάρχουν σαφώς λιγότερα βακτήρια από τις δυο προηγούμενες διηθήσεις, τα οποία είχαν και μικρότερο μέγεθος (εικ. 14 α , β). Στην κάτω επιφάνεια τα βακτήρια έχουν και εδώ μικρό μέγεθος αλλά υπάρχει και σχηματισμός βιοϋμενίου (εικ. 15 α, β).

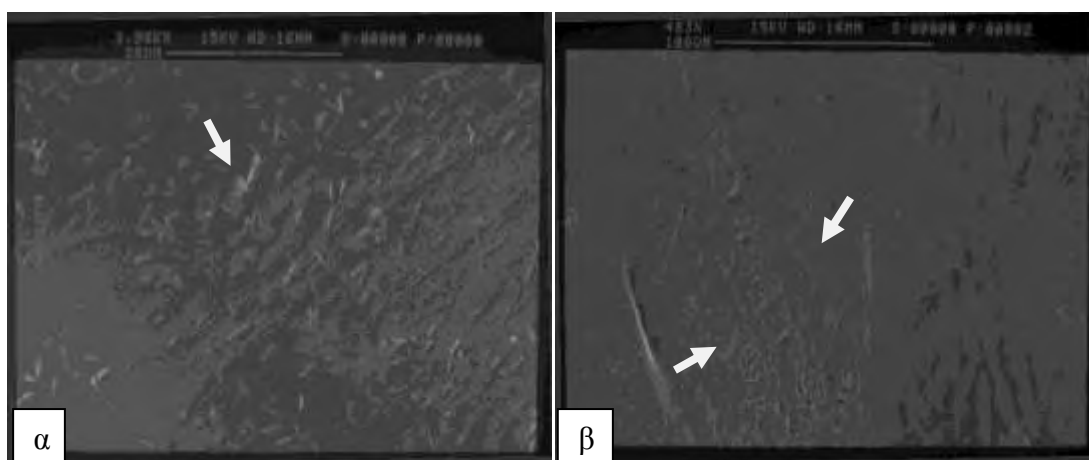


**Εικόνα 14:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 2 ημέρες καλλιέργειας της επάνω επιφάνειας, με τεχνητό θαλασσινό νερό. Τα βέλη δείχνουν βακτήρια, αλλά στη (εικ. 14β). Κλίμακα μπάρας: 20μm.

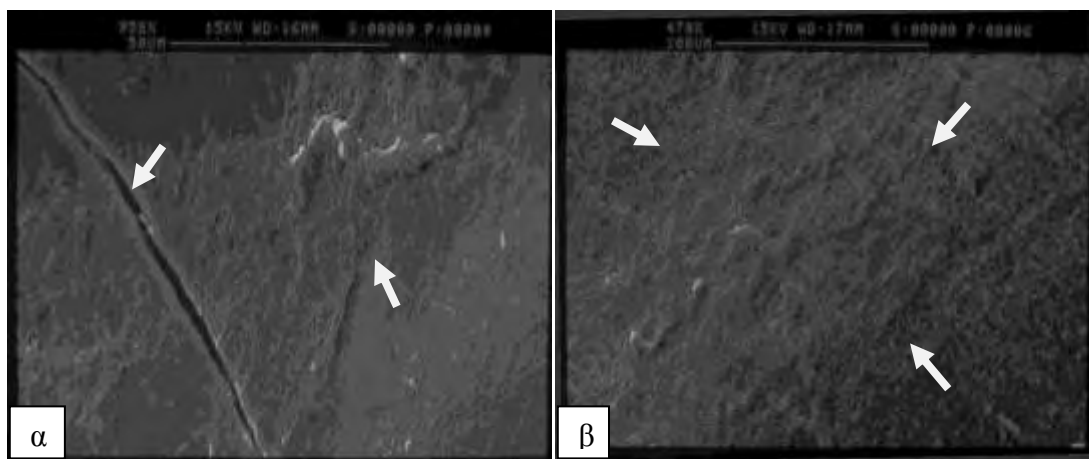


**Εικόνα 15:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 2 ημέρες καλλιέργειας της κάτω επιφάνειας, με τεχνητό θαλασσινό νερό. Τα βέλη δείχνουν βακτήρια και σχηματισμό βιοϋμενίου. Κλίμακα μπάρας: 20μm.

Η δεύτερη δειγματοληψία έγινε στις 4 ημέρες. στην επάνω επιφάνεια, η οποία ήταν με διηθημένο θαλασσινό νερό από φίλτρο διαμέτρου πόρου 0,1μm, το δείγμα ήταν πιο λεπτό από την προηγούμενη φορά. Εξαιτίας αυτού παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις στον εξωσκελετό και σχηματισμός βιοϋμενίου σε ένα σημείο. Στην κάτω επιφάνεια παρατηρήθηκε η ύπαρξη αρκετών βακτηρίων και σχηματισμός βιοϋμενίου σε μεγαλύτερο εύρος της επιφάνειας συγκριτικά με την πρώτη δειγματοληψία.



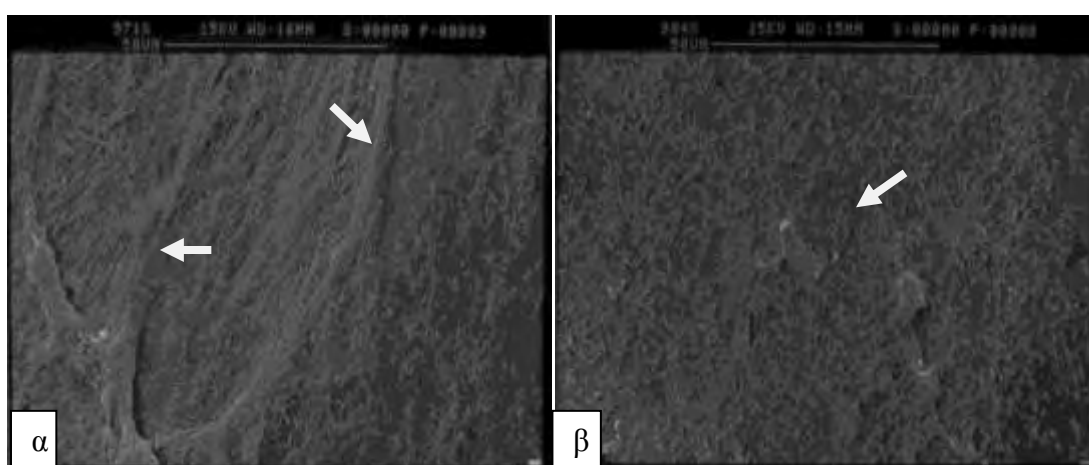
**Εικόνα 16:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 4 ημέρες καλλιέργειας της επάνω επιφάνειας, με διηθημένο φίλτρο διαμέτρου πόρου 0,1μm. Τα βέλη δείχνουν βακτήρια (εικ. 16α) και δείχνουν σχηματισμός βιοϋμενίου (εικ. 17β). Κλίμακα μπάρας: 20μm και 100μm.



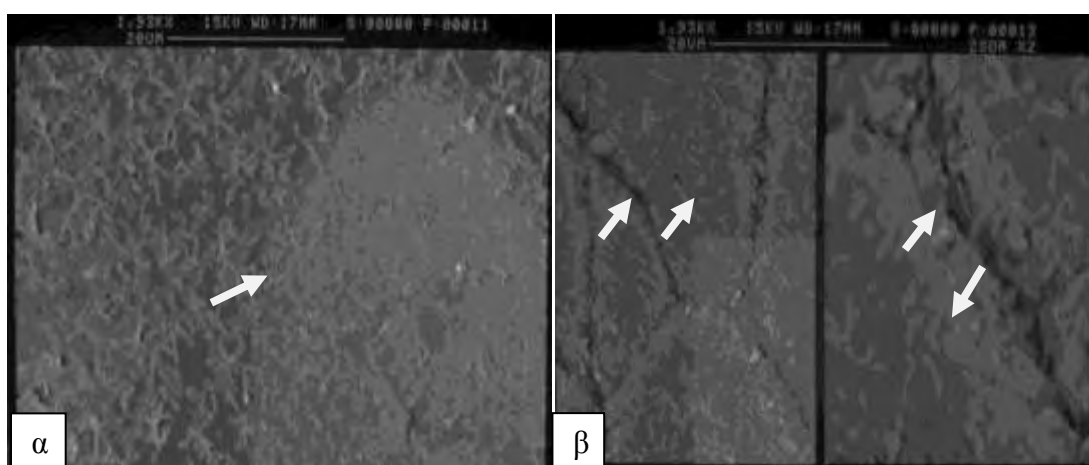
**Εικόνα 17:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 4 ημέρες καλλιέργειας της κάτω

επιφάνειας, με διηθημένο φίλτρο διαμέτρου πόρου 0.1μm. Τα βέλη δείχνουν βακτήρια και σχηματισμό βιοϋμενίου (στη εικ. 17α το αριστερό βέλος δείχνει κάποιο σπάσιμο της επιφάνειας του εξωσκελετού). Κλίμακα μπάρας: 50μm και 100μm.

Στη διήθηση με θαλασσινό νερό από φίλτρο διαμέτρου πόρου 2μm και στις δυο επιφάνειες υπήρχαν αρκετά βακτήρια και σχηματισμός βιοϋμενίου.



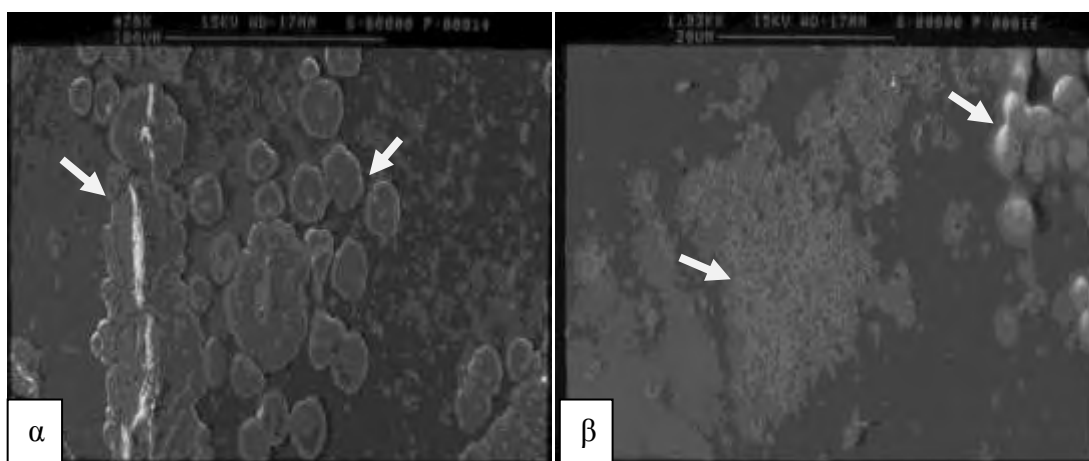
**Εικόνα 18:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 4 ημέρες καλλιέργειας της επάνω επιφάνειας, με διηθημένο φίλτρο διαμέτρου πόρου 2μm. Τα βέλη δείχνουν βακτήρια και σχηματισμό βιοϋμενίου. Κλίμακα μπάρας: 50μm.



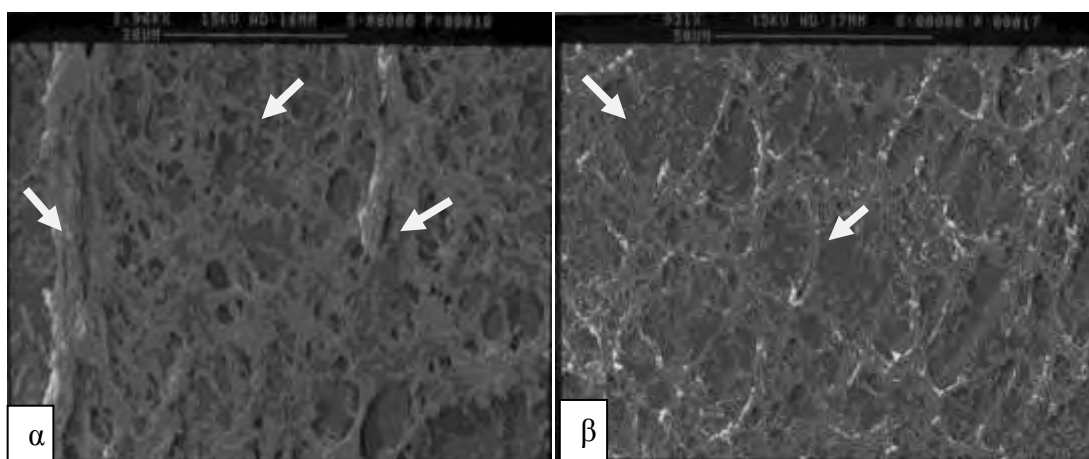
**Εικόνα 19:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 4 ημέρες καλλιέργειας της κάτω επιφάνειας, με διηθημένο φίλτρο διαμέτρου πόρου 2μm. Το βέλος δείχνει

βακτήρια (εικ. 19α). Επίσης τα βέλη δείχνουν σπάσιμο της επιφάνειας και βακτήρια (εικ. 19β). Κλίμακα μπάρας: 20 μm.

Στη διήθηση με τεχνητό θαλασσινό νερό στην επάνω επιφάνεια και σε σχέση με την πρώτη δειγματοληψία υπήρχαν αρκετά βακτήρια και ζύμες. Στην κάτω επιφάνεια διαπιστώθηκε σχεδόν πλήρης κάλυψη βακτηρίων και σχηματισμός βιοϋμενίου.

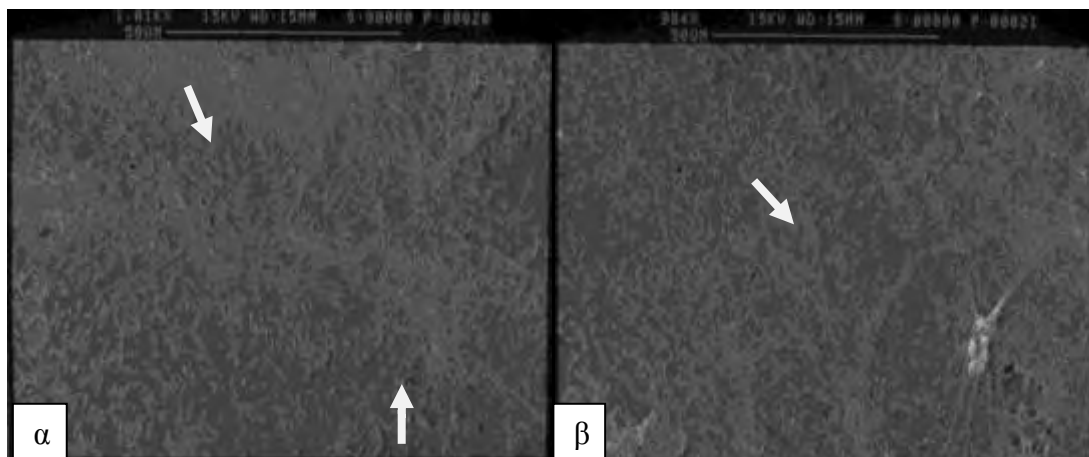


**Εικόνα 20:** Παρατήρηση ζύμων και βακτηρίων στις 4ημέρες καλλιέργειας της επάνω επιφάνειας, με τεχνητό θαλασσινό νερό. Τα βέλη δείχνουν βακτήρια και ζύμες. Κλίμακα μπάρας: 100μm και 20μm.

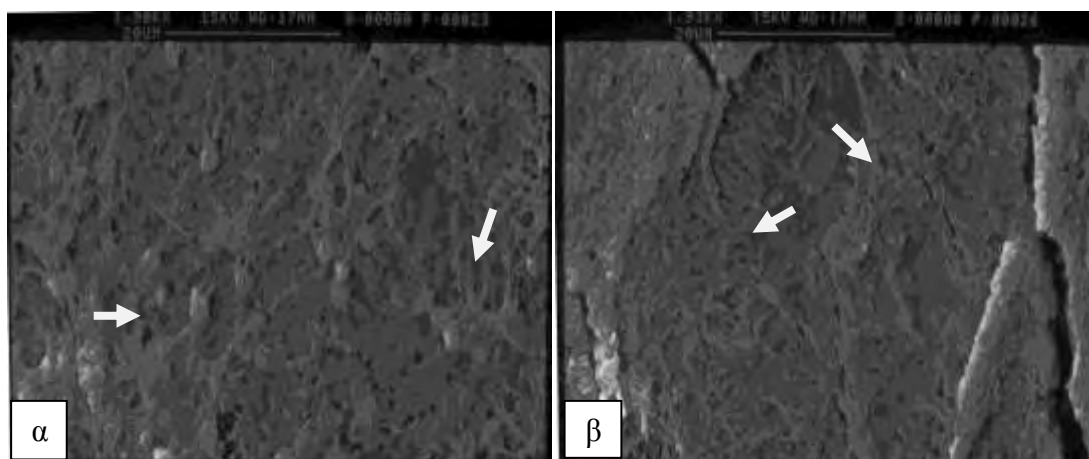


**Εικόνα 21:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 4 ημέρες καλλιέργειας της επάνω επιφάνειας, με τεχνητό θαλασσινό νερό. Τα βέλη δείχνουν βακτήρια και σχηματισμός βιοϋμενίου. Κλίμακα μπάρας: 20μm και 50μm.

Στη τρίτη δειγματοληψία η οποία έγινε στις 6 ημέρες, παρατηρήθηκε στην επάνω επιφάνεια, η οποία ήταν με διηθημένο θαλασσινό νερό από φίλτρο διαμέτρου πόρου 0.1μm, πως υπήρχαν πάρα πολλά βακτήρια και αρκετά βιοϋμένια κατά τόπους. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην κάτω επιφάνεια.

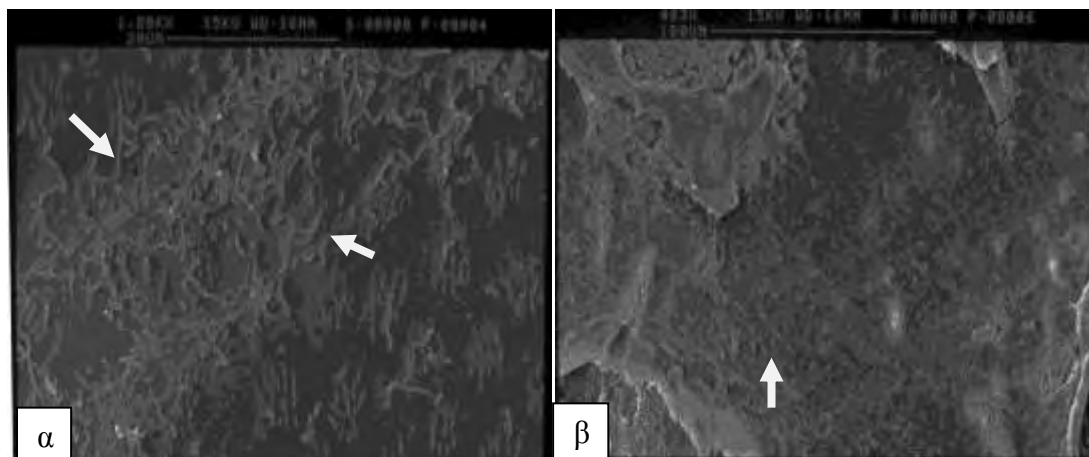


**Εικόνα 22:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 6 ημέρες καλλιέργειας της επάνω επιφάνειας, με διηθημένο φίλτρο διαμέτρου πόρου 0,1μm. Τα βέλη δείχνουν βακτήρια και αρκετά βιοϋμένια. Κλίμακα μπάρας: 50μm.

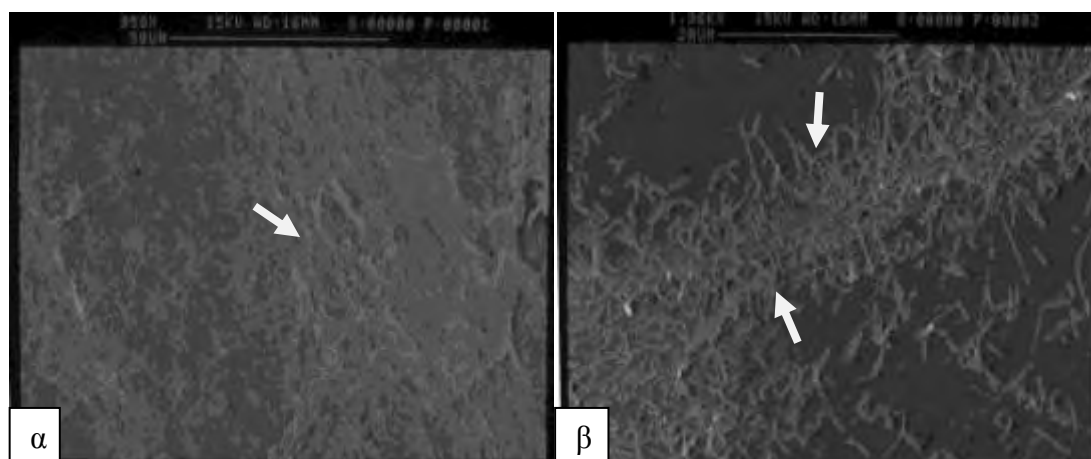


**Εικόνα 23:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 6 ημέρες καλλιέργειας της κάτω επιφάνειας, με διηθημένο φίλτρο διαμέτρου πόρου 0,1μm. Τα βέλη δείχνουν βακτήρια και αρκετά βιοϋμένια. Κλίμακα μπάρας: 20μm.

Στη διήθηση με θαλασσινό νερό από φίλτρο διαμέτρου πόρου 2 $\mu\text{m}$  στην επάνω επιφάνεια ήταν μικρή η ύπαρξη βακτηρίων και ο σχηματισμός βιοϋμενίου. Αντίθετα, στην κάτω επιφάνεια υπήρχε κάλυψη και σχηματισμός βακτηρίων σε μεγάλο βαθμό όπως και βιοϋμενίου.

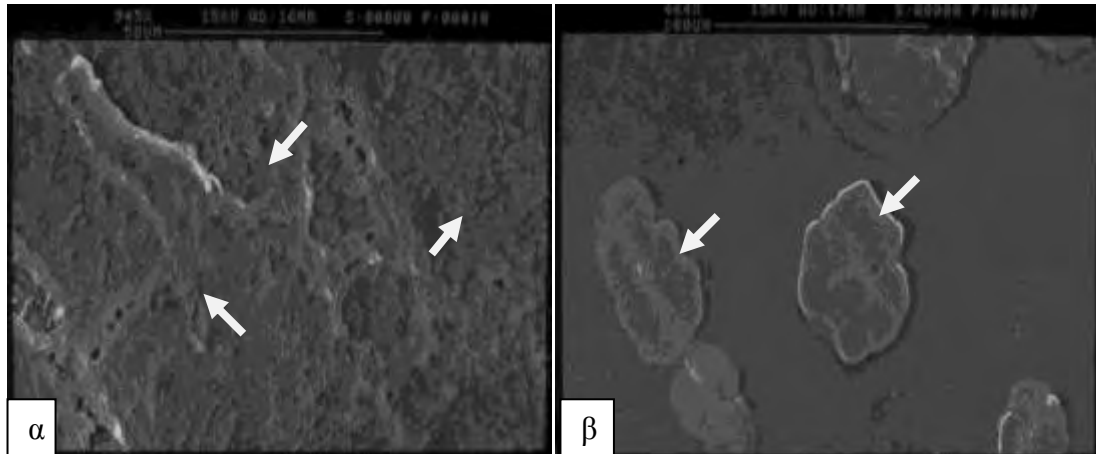


**Εικόνα 24:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 6 ημέρες καλλιέργειας της επάνω επιφάνειας, με διηθημένο φίλτρο διαμέτρου πόρου 2 $\mu\text{m}$ . Τα βέλη δείχνουν βακτήρια. Κλίμακα μπάρας: 20 $\mu\text{m}$  και 100 $\mu\text{m}$ .

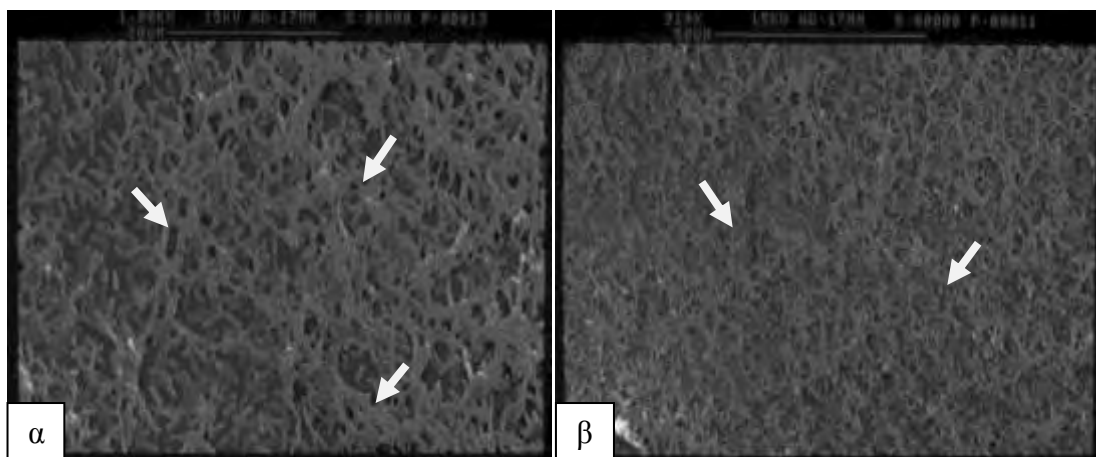


**Εικόνα 25:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 6 ημέρες καλλιέργειας της κάτω επιφάνειας, με διηθημένο φίλτρο διαμέτρου πόρου 2 $\mu\text{m}$ . Τα βέλη δείχνουν βακτηρίων και σχηματισμό βιοϋμενίου. Κλίμακα μπάρας: 50 $\mu\text{m}$  και 20 $\mu\text{m}$ .

Στη διήθηση με τεχνητό θαλασσινό νερό στην επάνω επιφάνεια υπήρχαν ζύμες, μικρά βακτήρια και σχηματισμός βιοϋμενίου. Στην κάτω επιφάνεια υπήρχε σχεδόν πλήρης κάλυψη βακτηρίων με δημιουργία πλέγματος και σχηματισμός βιοϋμενίου.



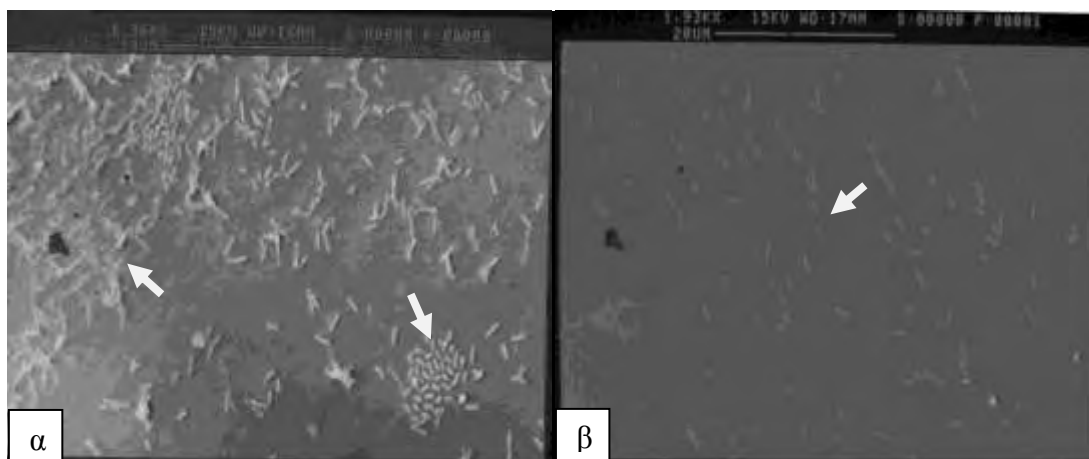
**Εικόνα 26:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 6 ημέρες καλλιέργειας της επάνω επιφάνειας, με τεχνητό θαλασσινό νερό. Τα βέλη δείχνουν βακτήρια και σχηματισμό βιοϋμενίου (εικ. 26α) και ορισμένες ζύμες (εικ. 26β). Κλίμακα μπάρας: 50μm και 100μm.



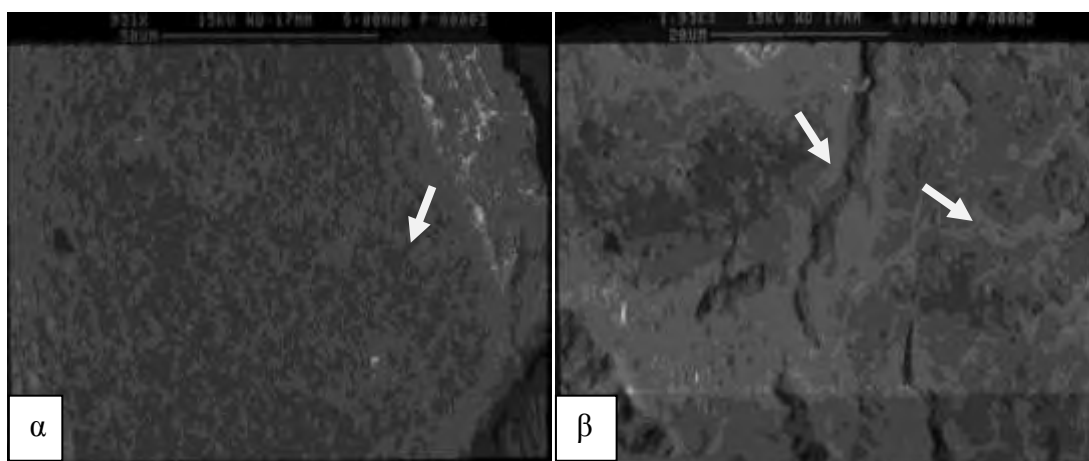
**Εικόνα 27:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 6 ημέρες καλλιέργειας της κάτω επιφάνειας, με τεχνητό θαλασσινό νερό. Τα βέλη δείχνουν βακτήρια με δημιουργία πλέγματος και σχηματισμό βιοϋμενίου. Κλίμακα μπάρας: 20μm και 50μm.



Στη τέταρτη δειγματοληψία η οποία έγινε στις 9 ημέρες, παρατηρήθηκε στην επάνω επιφάνεια η οποία ήταν με διηθημένο θαλασσινό νερό από φίλτρο διαμέτρου πόρου 0,1μm, πως υπήρχε μικρή κάλυψη από βακτήρια και δεν υπήρχε σχηματισμός από βιοϋμένια. Ενώ στην κάτω επιφάνεια υπήρχε πλήρης κάλυψη βακτηρίων, σχηματισμός βιοϋμενίων και υπήρχε καταστροφή της χιτίνης στο κατώτερο μέρος της κάτω επιφάνειας.



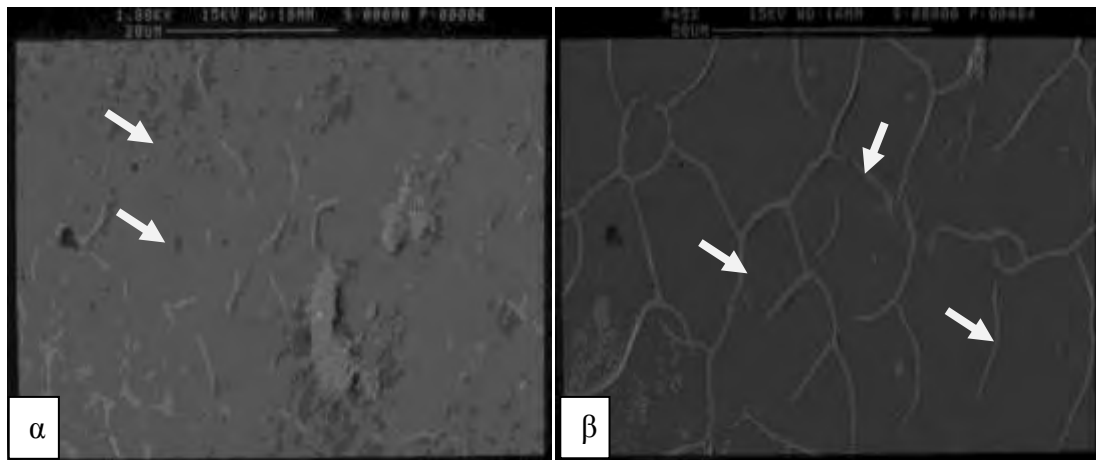
**Εικόνα 28:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 9 ημέρες καλλιέργειας της επάνω επιφάνειας, με διηθημένο φίλτρο διαμέτρου πόρου 0,1μm. Τα βέλη δείχνουν ορισμένα βακτήρια. Κλίμακα μπάρας: 20μm.



**Εικόνα 29:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 9 ημέρες καλλιέργειας της κάτω επιφάνειας, με διηθημένο φίλτρο διαμέτρου πόρου 0,1μm. Τα βέλη δείχνουν κάλυψη βακτηρίων, σχηματισμός βιοϋμενίων (εικ. 29α) και καταστροφή της

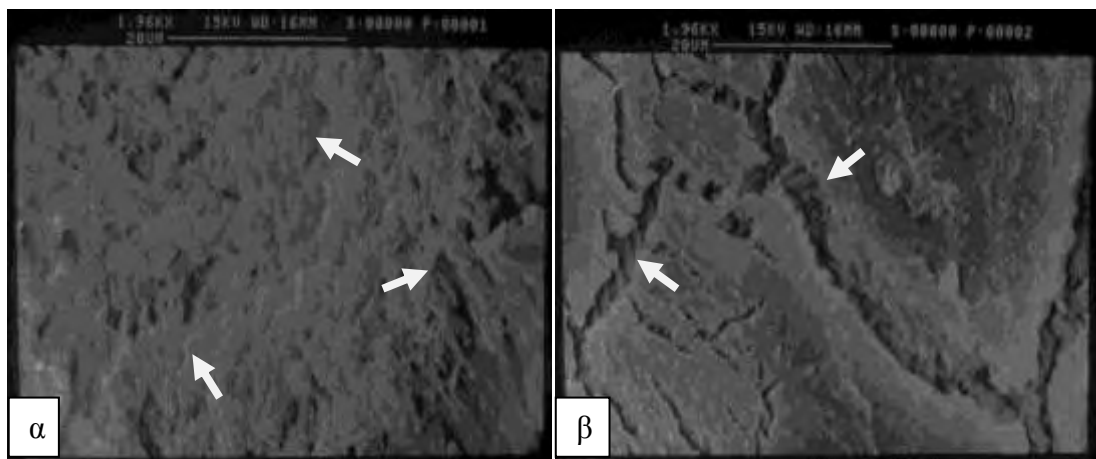
χιτίνης (εικ. 29β). Κλίμακα μπάρας: 20μm και 50 μm.

Στη διήθηση με θαλασσινό νερό από φίλτρο διαμέτρου πόρου 2μm στην επάνω επιφάνεια παρατηρήθηκε μικρή ύπαρξη βακτηρίων έως ελάχιστη και κάποιοι περιέργοι δικτυωτοί σχηματισμοί. Αντίθετα στην κάτω επιφάνεια υπήρχε πλήρης κάλυψη βακτηρίων και σχηματισμός βιοϋμενίου και σπάσιμο της επιφάνειας.



**Εικόνα30:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 9 ημέρες καλλιέργειας της επάνω επιφάνειας, με διηθημένο φίλτρο διαμέτρου πόρου 2μm. Τα βέλη δείχνουν μικρά βακτήρια (εικ. 30α) και δείχνουν κάποιους δικτυωτούς σχηματισμούς (εικ. 30β).

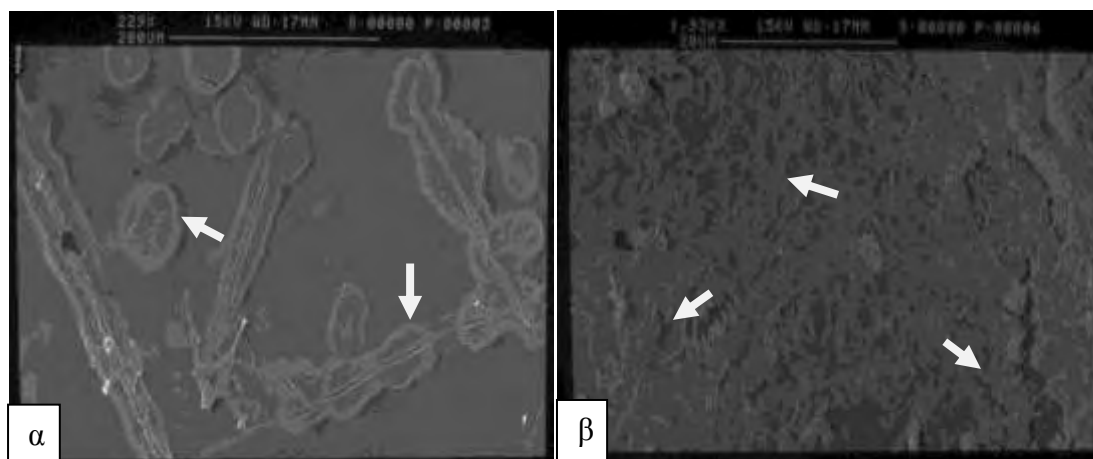
Κλίμακα μπάρας: 20μm και 50μm.



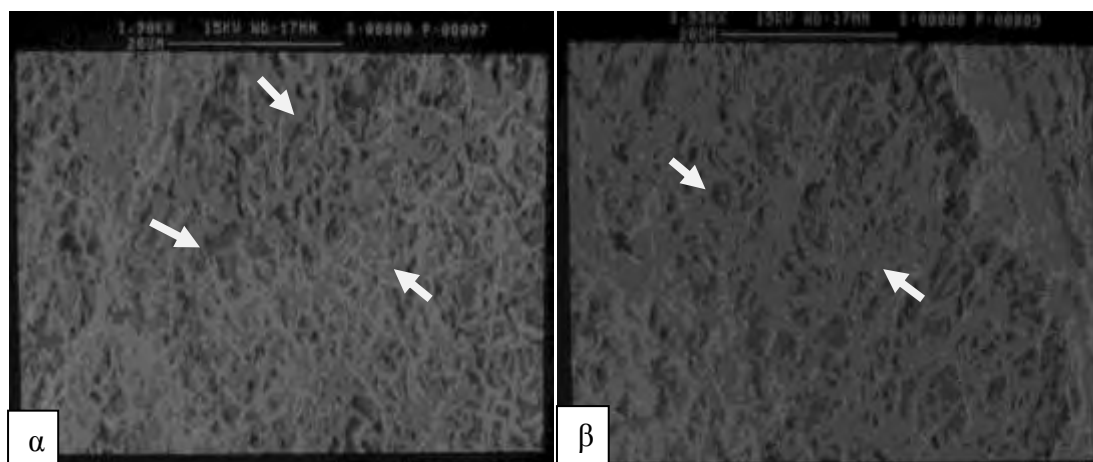
**Εικόνα 31:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 9 ημέρες καλλιέργειας της επάνω

επιφάνειας, με διηθημένο φίλτρο διαμέτρου πόρου 2μm. Τα βέλη δείχνουν βακτήρια και σχηματισμό βιοϋμενίου (εικ. 31α). Ακόμα δείχνουν σπάσιμο της επιφάνειας (εικ. 31β). Κλίμακα μπάρας: 20μm.

Στη διήθηση με τεχνητό θαλασσινό νερό στην επάνω επιφάνεια υπήρχαν ζύμες και ύπαρξη βακτηρίων κατά τόπους. Στην κάτω επιφάνεια υπήρχε πλήρης κάλυψη βακτηρίων και σχηματισμός βιοϋμενίου.



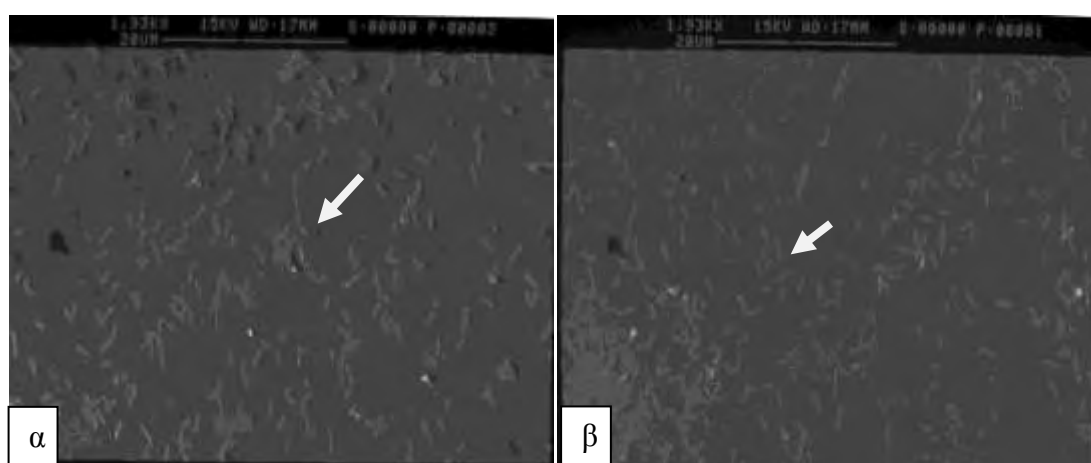
**Εικόνα 32:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 9 ημέρες καλλιέργειας της επάνω επιφάνειας, με τεχνητό θαλασσινό νερό. Τα βέλη δείχνουν διάφορες ζύμες (εικ. 32α). Επίσης βακτήρια και σχηματισμό βιοϋμενίου (εικ. 32β). Κλίμακα μπάρας: 20μm.



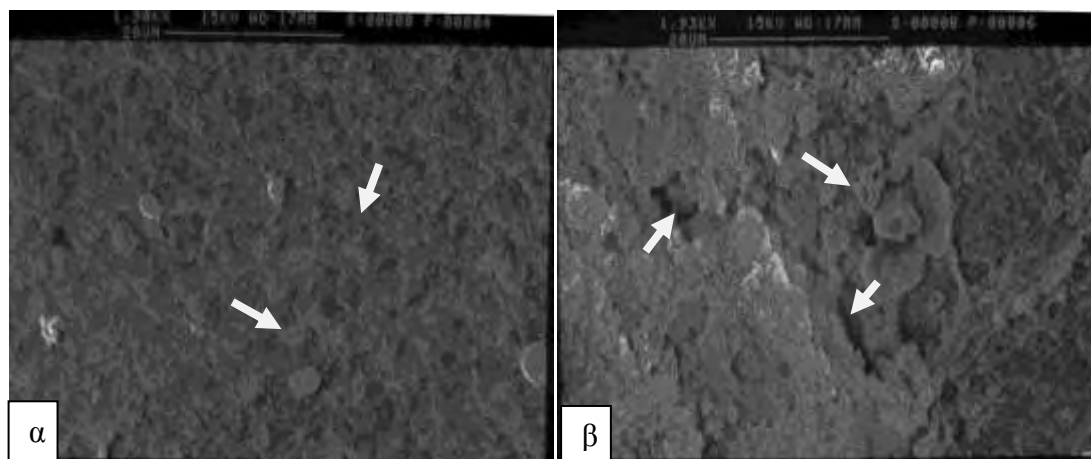
**Εικόνα 33:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 9 ημέρες καλλιέργειας της κάτω

επιφάνειας, με τεχνητό θαλασσινό νερό. Τα βέλη δείχνουν κάλυψη βακτηρίων και σχηματισμό βιοϋμενίου. Κλίμακα μπάρας:20μm.

Η πέμπτη δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε στις 12 ημέρες ήταν και η τελευταία. Στην επάνω επιφάνεια η οποία ήταν με διηθημένο θαλασσινό νερό από φίλτρο διαμέτρου πόρου 0,1μm υπήρχε μικρή κάλυψη από βακτήρια χωρίς σχηματισμό από βιοϋμένια. Αντίθετα στην κάτω επιφάνεια υπήρχε πλήρης κάλυψη βακτηρίων και σχηματισμός βιοϋμενίων.



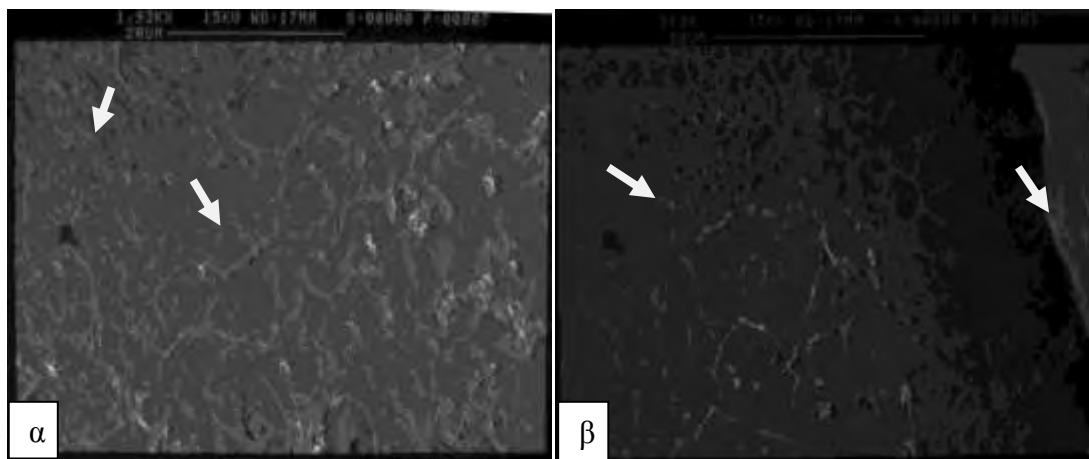
**Εικόνα 34:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 12 ημέρες καλλιέργειας της επάνω επιφάνειας, με διηθημένο φίλτρο διαμέτρου πόρου 0,1μm. Τα βέλη δείχνουν ορισμένα βακτήρια. Κλίμακα μπάρας: 20μm.



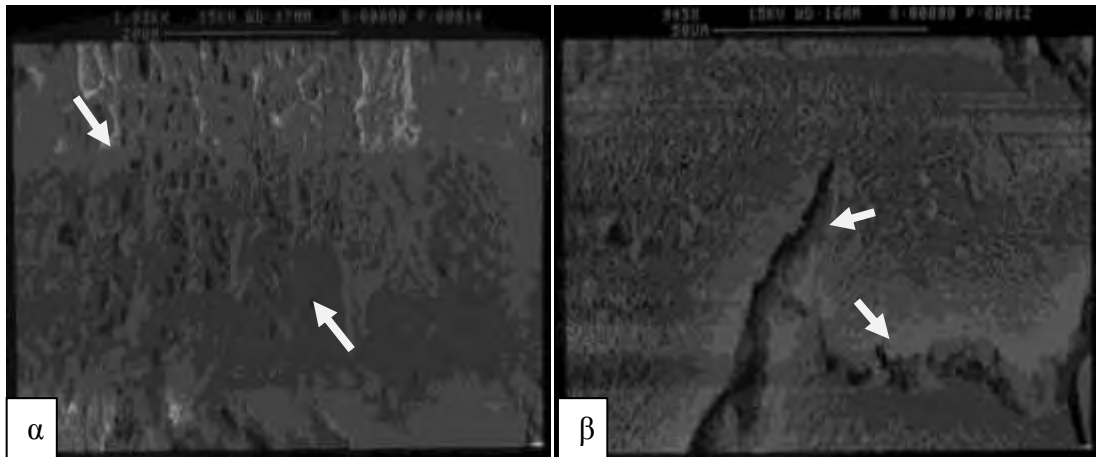
**Εικόνα35:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 12 ημέρες καλλιέργειας της κάτω

επιφάνειας, με διηθημένο φίλτρο διαμέτρου πόρου 0,1μm. Τα βέλη δείχνουν βακτήρια και σχηματισμό βιοϋμενίου. Κλίμακα μπάρας: 20μm.

Στη διήθηση με θαλασσινό νερό από φίλτρο διαμέτρου πόρου 2μm στην επάνω επιφάνεια είχε αρχίσει να αλλοιώνεται η δομή και ο αριθμός των βακτηρίων ήταν μικρότερος όπως στην προηγούμενη δειγματοληψία. Στην κάτω επιφάνεια είχε επίσης αρχίσει να αλλοιώνεται η δομή αλλά υπήρχε πλήρης κάλυψη βακτηρίων και σχηματισμός βιοϋμενίου.

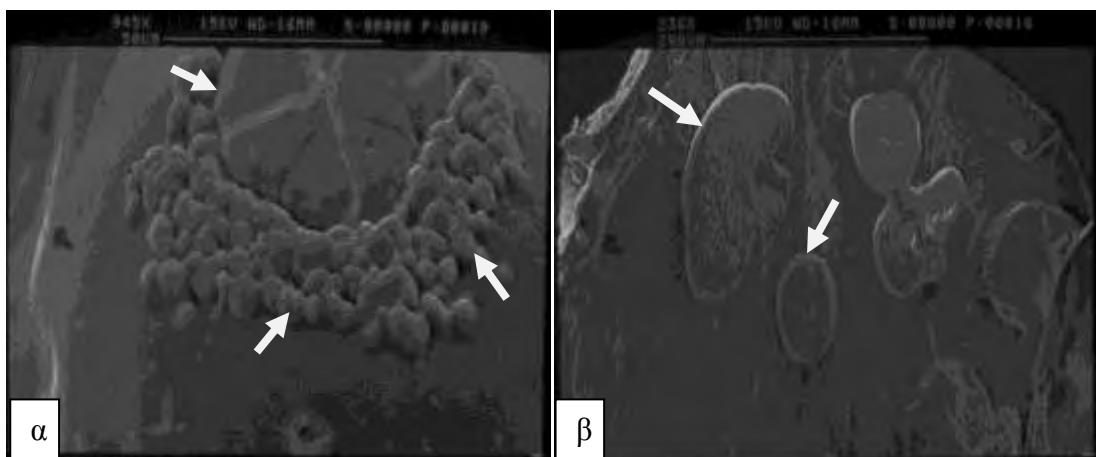


**Εικόνα 36:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 12 ημέρες καλλιέργειας της επάνω επιφάνειας, με διηθημένο φίλτρο διαμέτρου πόρου 2μm. Τα βέλη δείχνουν ορισμένα βακτήρια (εικ. 36α) και δείχνουν αλλοίωση της δομής (εικ. 36β). Κλίμακα μπάρας: 20μm και 50μm.

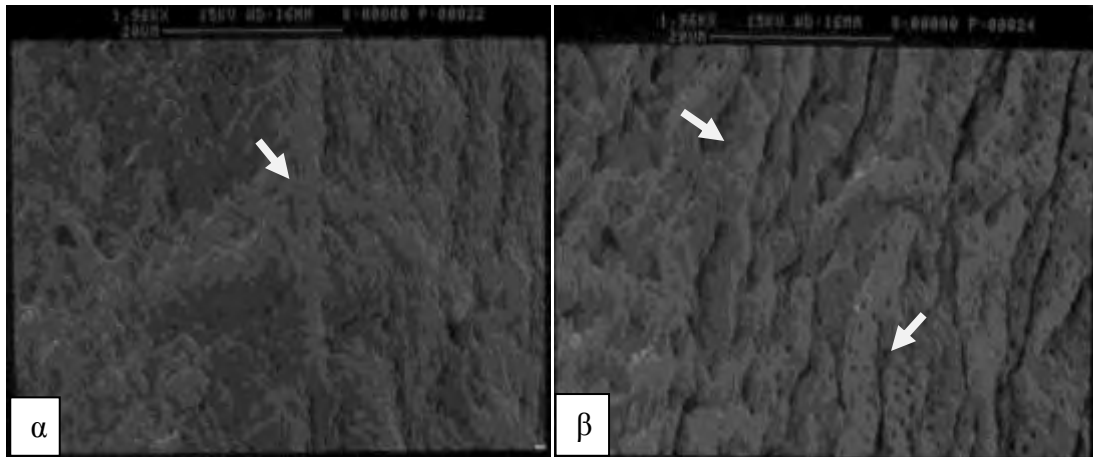


**Εικόνα 37:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 12 ημέρες καλλιέργειας της κάτω επιφάνειας, με διηθημένο φίλτρο διαμέτρου πόρου 2μm. Τα βέλη δείχνουν κάλυψη βακτηρίων και σχηματισμός βιοϋμενίου (εικ. 37α) και αλλοίωση της δομής (εικ. 37β). Κλίμακα μπάρας: 20μm και 50μm.

Στη διήθηση με τεχνητό θαλασσινό νερό στην επάνω επιφάνεια υπήρχαν ζύμες, ύπαρξη λίγων βακτηρίων και η επιφάνεια είχε ξεκινήσει να σπάει. Στην κάτω επιφάνεια υπήρχε πλήρης κάλυψη βακτηρίων και σχηματισμός βιοϋμενίου.



**Εικόνα 38:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 12 ημέρες καλλιέργειας της επάνω επιφάνειας, με τεχνητό θαλασσινό νερό. Τα βέλη δείχνουν διάφορες ζύμες. Κλίμακα μπάρας: 50μm και 20μm.



**Εικόνα 39:** Παρατήρηση βακτηρίων στις 12 ημέρες καλλιέργειας της κάτω επιφάνειας, με τεχνητό θαλασσινό νερό. Τα βέλη δείχνουν κάλυψη βακτηρίων και σχηματισμό βιοϋμενίου. Κλίμακα μπάρας: 20μm.

### 3.2 Υπολογισμός βιοόγκου

Με βάση τα στατιστικά αποτελέσματα που προέκυψαν, αρχικά στα 0,1μm στην επάνω επιφάνεια οι τιμές των βιοόγκων ανάμεσα στις δειγματοληψίες δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους, εκτός από την πέμπτη δειγματοληψία που διέφερε συγκριτικά με το T0, την 1<sup>η</sup>, 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> δειγματοληψία. Στην κάτω επιφάνεια στην ίδια μεταχείριση στατιστικά δεν διέφεραν η 2<sup>η</sup> και η 3<sup>η</sup> δειγματοληψία με το T0, η 3<sup>η</sup> με την 2<sup>η</sup> και την 4<sup>η</sup>. Στα 2μm στην επάνω επιφάνεια στατιστικά δεν διέφεραν μεταξύ τους η 1<sup>η</sup> με το T0 και την 5<sup>η</sup>. Στην ίδια μεταχείριση στα 2μm αλλά στην κάτω επιφάνεια δεν διαφέρουν μεταξύ τους η 2<sup>η</sup>, η 3<sup>η</sup>, η 4<sup>η</sup> και η 5<sup>η</sup> δειγματοληψία με το T0, όπως επίσης δεν διαφέρουν μεταξύ τους η 2<sup>η</sup> με την 3<sup>η</sup>. Στην επάνω επιφάνεια στο NaCl η 1<sup>η</sup> διαφέρει σημαντικά στατιστικά με την 2<sup>η</sup>, την 4<sup>η</sup> και την 5<sup>η</sup> δειγματοληψία, επίσης διαφέρουν η 2<sup>η</sup> με την 3<sup>η</sup> μεταξύ τους και η 5<sup>η</sup> διαφέρει με την 3<sup>η</sup>. Στην κάτω επιφάνεια στο NaCl στατιστικά δεν διαφέρει καμία από τις

δειγματοληψίες μεταξύ τους. Όσον αφορά τους βιοόγκους των βακτηρίων απεικονίζονται παρακάτω δυο χαρακτηριστικοί πίνακες:

Πίνακας 1: Τα αποτελέσματα διαφορετικών παρατηρήσεων ανάλογα με τις ημέρες που πραγματοποιήθηκαν οι διαφορετικές μετρήσεις στην επάνω επιφάνεια. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα μέγιστα των διαφορετικών μετρήσεων. Για να προκύψει η σύγκριση των αποτελεσμάτων των βιοόγκων πραγματοποιήθηκε το στατιστικό τεστ τ-τεστ (One way Anova with Tuckeytest), διότι τα δεδομένα του πειράματος ακολούθησαν την κανονική κατανομή συνεπώς οι τιμές των δειγμάτων οι οποίες παρουσιάζουν κατανομή εμφανίζουν ως διάμεσο  $\pm$  τυπικό σφάλμα. Μέσα στην παρένθεση είναι ο αριθμός των μετρήσεων των βακτηρίων.

0,1 πάνω	τυπικό σφάλμα	2 πάνω	τυπικό σφάλμα	NaCl πάνω	τυπικό σφάλμα
1,04a $\pm$ 0,0542 (500)	0,0542	1,04a $\pm$ 0,0542 (500)	0,0542	1,04a $\pm$ 0,0542 (500)	0,0542
0,95a $\pm$ 0,0420 (500)	0,0420	1,06a $\pm$ 0,0481 (500)	0,0481	1,20b $\pm$ 0,0441 (500)	0,0441
0,96a $\pm$ 0,0455 (500)	0,0455	1,26b $\pm$ 0,0491 (500)	0,0491	0,89a $\pm$ 0,0499 (500)	0,0499
1,03a $\pm$ 0,0372 (500)	0,0372	0,78b $\pm$ 0,0345 (500)	0,0345	1,14b $\pm$ 0,0603 (500)	0,0603
0,91a $\pm$ 0,0429 (500)	0,0429	0,52b $\pm$ 0,0260 (500)	0,0260	0,91a $\pm$ 0,0430 (500)	0,0430
0,74b $\pm$ 0,0421 (500)	0,0421	0,50a $\pm$ 0,0481 (500)	0,0481	0,87a $\pm$ 0,0334 (500)	0,0334

Τα δεδομένα ανά γραμμή που έχουν το ίδιο εκθέτη δεν διαφέρουν σημαντικά ( $P > 0,05$ ).

Παρατηρείται μια σταδιακή μείωση και στις 3 μεταχειρίσεις, αφού όσο περνούσαν οι μέρες τελείωνε η τροφή και άρχιζε να υπάρχει αλλοίωση της επιφάνειας. Επίσης παρατηρείται με βάση το τυπικό σφάλμα ότι οι απώλειες στις μετρήσεις μας δεν ήταν σημαντικές.



Πίνακας 2: Τα αποτελέσματα διαφορετικών παρατηρήσεων ανάλογα με τις ημέρες που πραγματοποιήθηκαν οι διαφορετικές μετρήσεις στην κάτω επιφάνεια. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα μέγιστα των διαφορετικών μετρήσεων. Για να προκύψει η σύγκριση των αποτελεσμάτων των βιοόγκων πραγματοποιήθηκε το στατιστικό τεστ τ-τεστ (One way Anova with Tuckeytest), διότι τα δεδομένα του πειράματος ακολούθησαν την κανονική κατανομή συνεπώς οι τιμές των δειγμάτων οι οποίες παρουσιάζουν κατανομή εμφανίζουν ως διάμεσο  $\pm$  τυπικό σφάλμα. Μέσα στην παρένθεση είναι ο αριθμός των μετρήσεων των βακτηρίων.

0,1 κάτω	τυπικό σφάλμα	2 κάτω	NaCl κάτω	τυπικό σφάλμα
0,85 $\pm$ 0,0368 (500)	0,0368	0,85 $\pm$ 0,0368 (500)	0,0368	0,85 $\pm$ 0,0368 (500)
1,24b $\pm$ 0,0572 (500)	0,0572	1,43b $\pm$ 0,0545 (500)	0,0545	0,71a $\pm$ 0,0407 (500)
0,79a $\pm$ 0,0358 (500)	0,0358	1,02a $\pm$ 0,0537 (500)	0,0537	0,79a $\pm$ 0,0358 (500)
0,74a $\pm$ 0,0357 (500)	0,0357	0,97a $\pm$ 0,0469 (500)	0,0469	0,77a $\pm$ 0,0405 (500)
0,65a $\pm$ 0,0293 (500)	0,0293	1,17a $\pm$ 0,0486 (500)	0,0486	0,86a $\pm$ 0,0366 (500)
0,62b $\pm$ 0,0465 (500)	0,0465	0,90a $\pm$ 0,0427 (500)	0,0427	0,79a $\pm$ 0,0449 (500)

Τα δεδομένα ανά γραμμή που έχουν το ίδιο εκθέτη δεν διαφέρουν σημαντικά ( $P>0,05$ ).

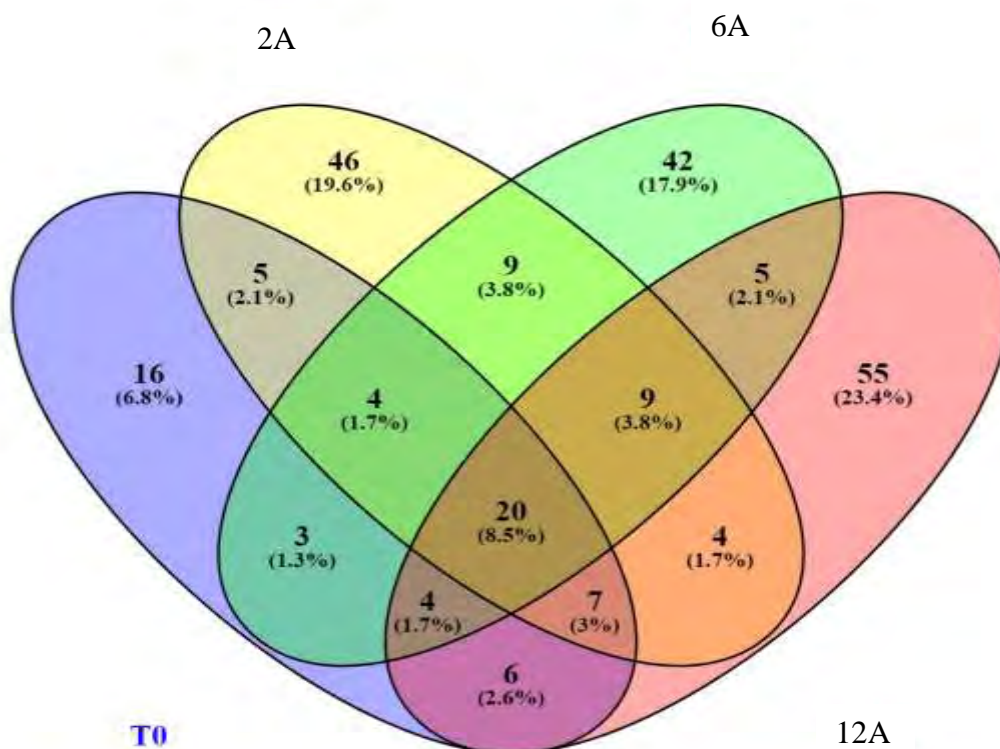
Παρατηρείται και στη κάτω επιφάνεια μια σταδιακή μείωση και στις 3 μεταχειρίσεις, αφού και εδώ όσο περνούσαν οι μέρες τελείωνε η τροφή και άρχισε να υπάρχει αλλοίωση της επιφάνειας. Ακόμα παρατηρείται με βάση το τυπικό σφάλμα ότι οι απώλειες στις μετρήσεις μας δεν ήταν σεμαντικές

### 3.3 Μοριακές αναλύσεις

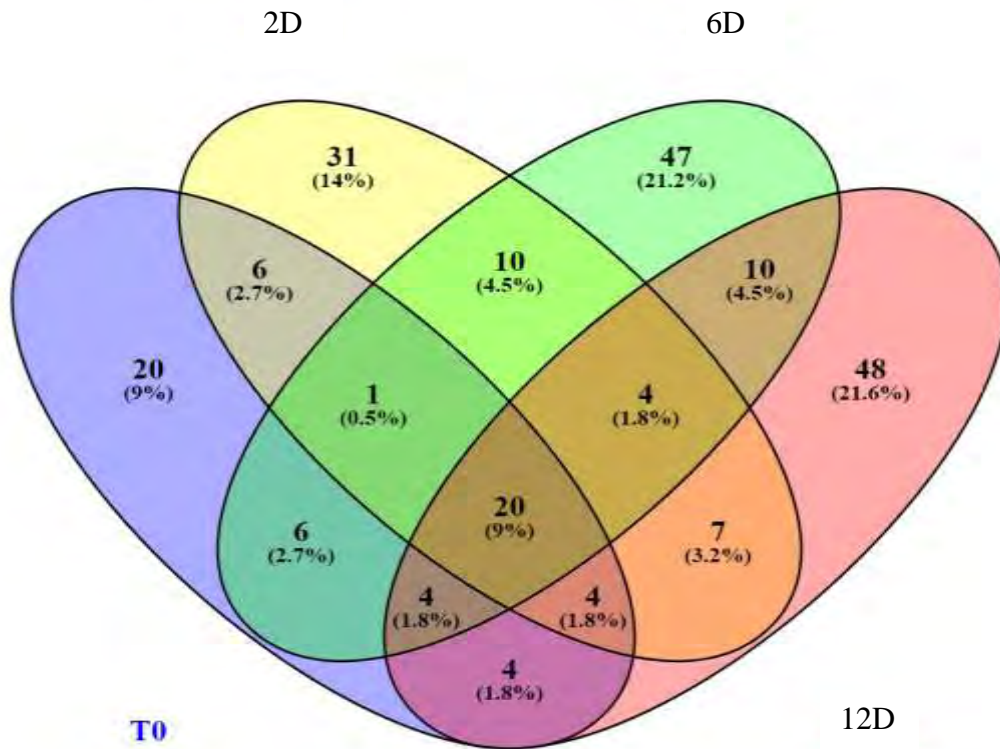
Τέλος, στάλθηκε ένα κομμάτι από τον εξωσκελετό από κάθε δειγματοληψία, για να γίνουν οι μοριακές αναλύσεις, στις οποίες καταγράφονται οι τρεις διαφορετικές ημέρες δειγματοληψίας με τις τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις δηλαδή: 2A-6A-12A ακόμη 2D-6D-12D και 2G-6G-12G αλλά και το T0 το σημείο 0, η αρχή των δειγματοληψιών. Η μέγιστη μικροβιακή βιομάζα για το T0 ήταν  $\max=1343$ , ο αριθμός αλληλουχιών  $N=8075$  και ο αριθμός με τα διαφορετικά είδη ήταν  $S=161$ . Για το 2A η μέγιστη μικροβιακή του μάζα ήταν  $\max=30538$ , ο αριθμός αλληλουχιών  $N=126318$  και ο αριθμός ειδών  $S=248$ . Για το 10A η μέγιστη μικροβιακή μάζα ήταν  $\max=21062$ , ο αριθμός αλληλουχιών  $N=78848$  και ο αριθμός ειδών  $S=246$ . Στο 16A διαπιστώθηκε ότι η μέγιστη μικροβιακή του μάζα ήταν  $\max=12292$ , ο αριθμός αλληλουχιών  $N=74231$  και ο αριθμός ειδών  $S=286$ . Για τα 6D η μέγιστη μικροβιακή μάζα ισούται με  $\max=25744$ , ο αριθμός αλληλουχιών  $N=68571$  και ο αριθμός ειδών  $S=198$ . Έπειτα για το 6D η μέγιστη μικροβιακή μάζα ήταν  $\max=26478$ , ο αριθμός αλληλουχιών  $N=83662$  και ο αριθμός από τα είδη  $S=239$ . Για το 12D η μέγιστη μικροβιακή μάζα ήταν  $\max=24973$ , ο αριθμός αλληλουχιών  $N=87921$  και ο αριθμός ειδών τους  $S=264$ . Για το 2G η μέγιστη μικροβιακή μάζα διαπιστώθηκε πως ήταν  $\max=27807$ , ο αριθμός αλληλουχιών  $N=74820$  και ο αριθμός ειδών  $S=151$ . Για το 10G η μέγιστη μικροβιακή μάζα ήταν  $\max=43213$ , ο αριθμός αλληλουχιών ισούται με  $N=77454$  και ο αριθμός ειδών  $S=162$ . Τέλος για το 16G η μέγιστη μικροβιακή μάζα ήταν  $\max=18491$  ο αριθμός αλληλουχιών  $N=76925$  και ο αριθμός ειδών  $S=176$ . Από όλες τις δειγματοληψίες και όλες τις μεταχειρίσεις τη μέγιστη μικροβιακή μάζα την είχε το 6G με  $\max=43213$ .

Στη συνέχεια, έγιναν συγκρίσεις μεταξύ των T0-2A-6A-12A, των T0-2D-6D-12D και των T0-2G-6G-12G με τη βοήθεια του προγράμματος Venny, για να αποδειχθεί ποιες

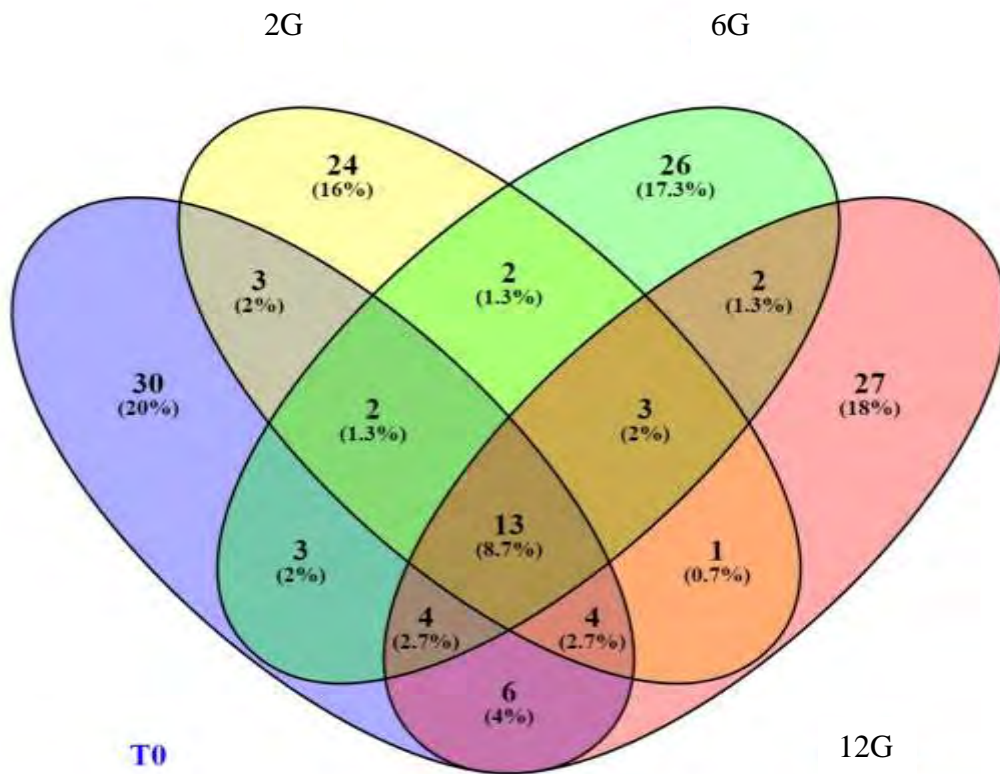
ήταν οι κοινές βιομάζες. Άλλη μια σύγκριση που έγινε ήταν στις ίδιες ημέρες αλλά με διαφορετική μεταχείριση μεταξύ των 6A-6D-6G, των 10A-10D-10G και των 16A-16D-16G. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι τα εξής:



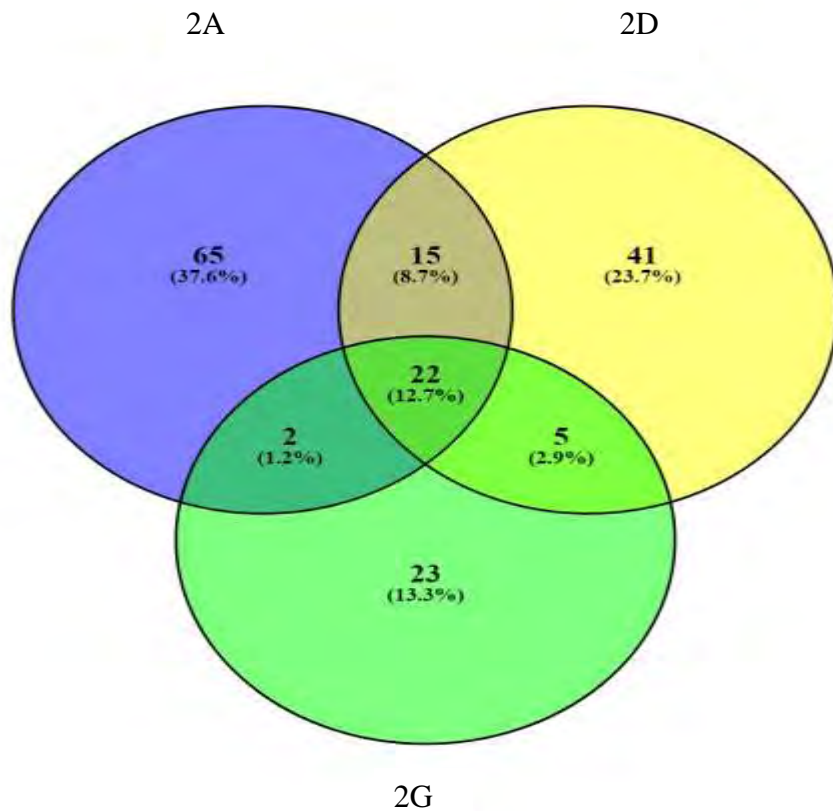
**Εικόνα 40:** Σύγκριση μεταξύ των T0-2A-6A-12A: σύμφωνα με τις μετρήσεις παρατηρήθηκαν 20 κοινές βιομάζες των οποίων το ποσοστό αντιστοιχεί στο 8,5% του κοινού πληθυσμού, οι οποίες παρέμειναν ίδιες από την αρχή μέχρι το τέλος του πειράματος. Με διαφορετικά χρώματα αποδίδονται οι διαφορετικές κοινές βιομάζες που είχαν κατά καιρούς οι διαφορετικές δειγματοληψίες.



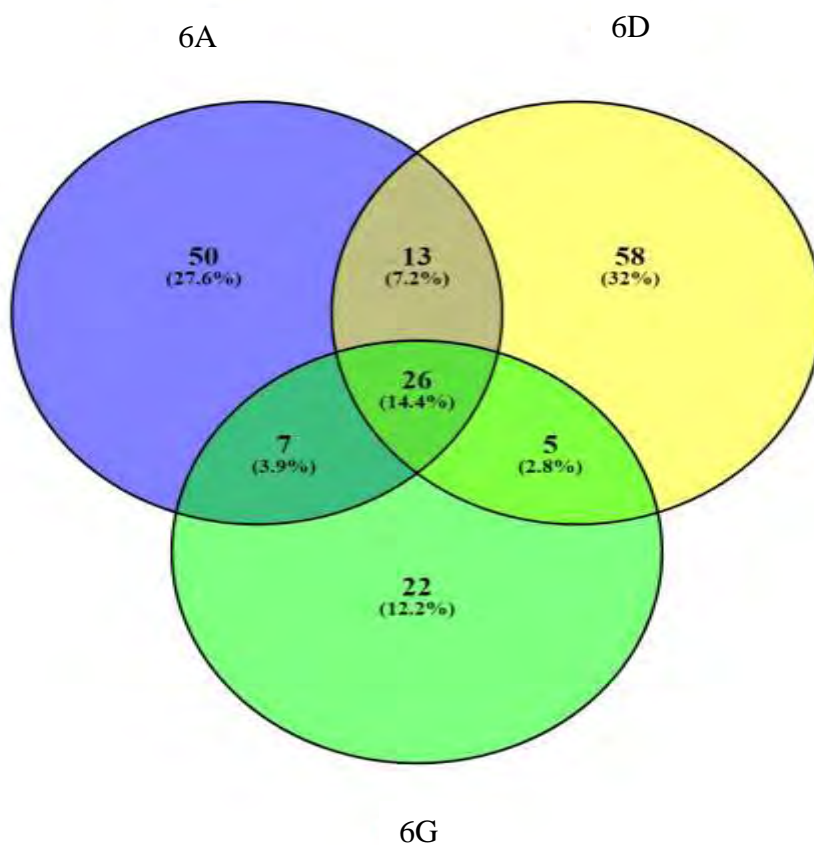
**Εικόνα 41:** Σύγκριση μεταξύ των T0-2D-6D-12D: σύμφωνα με τις μετρήσεις παρατηρήθηκαν 20 κοινές βιομάζες των οποίων το ποσοστό αντιστοιχεί στο 9% του κοινού πληθυσμού, οι οποίες παρέμειναν ίδιες από την αρχή μέχρι το τέλος του πειράματος. Με διαφορετικά χρώματα αποδίδονται οι διαφορετικές κοινές βιομάζες που είχαν κατά καιρούς οι διαφορετικές δειγματοληψίες.



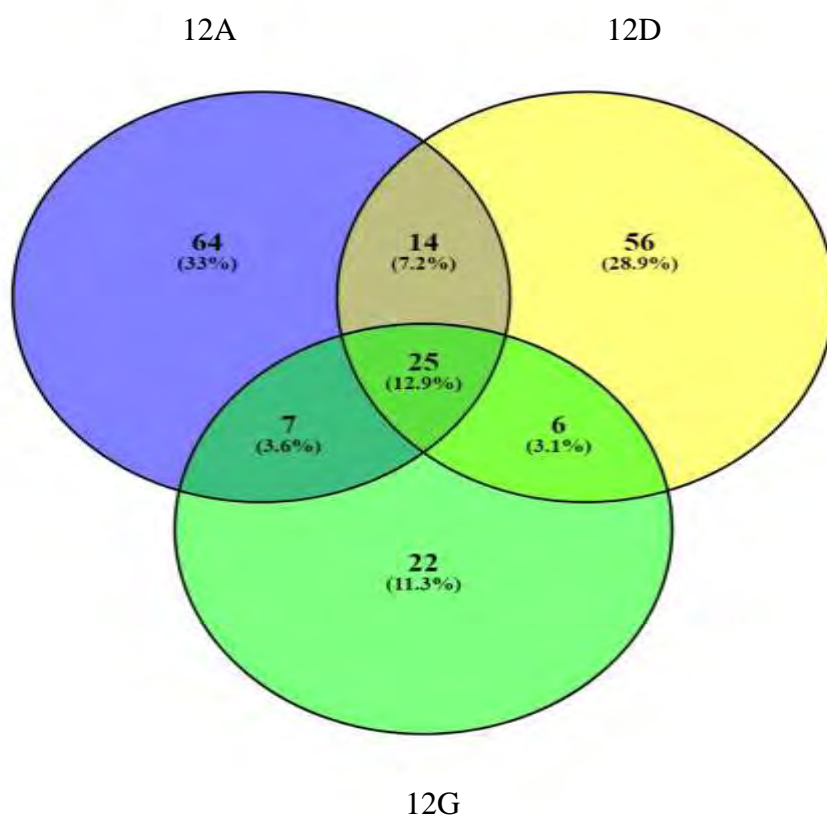
**Εικόνα 42:** Σύγκριση μεταξύ των T0-2G-6G-12G: σύμφωνα με τις μετρήσεις παρατηρήθηκαν 13 κοινές βιομάζες των οποίων το ποσοστό αντιστοιχεί στο 8,7% του κοινού πληθυσμού, οι οποίες παρέμειναν ίδιες από την αρχή μέχρι το τέλος του πείραματος. Με διαφορετικά χρώματα αποδίδονται οι διαφορετικές κοινές βιομάζες που είχαν κατά καιρούς οι διαφορετικές δειγματοληψίες.



**Εικόνα 43:** Σύγκριση στις ίδιες ημέρες αλλά με διαφορετική μεταχείριση μεταξύ των 2A-2D-2G: σύμφωνα με τις μετρήσεις παρατηρήθηκαν 22 κοινές βιομάζες των οποίων το ποσοστό αντιστοιχεί στο 12,7% του κοινού πληθυσμού, οι οποίες παρέμειναν ίδιες από την αρχή μέχρι το τέλος του πειράματος. Με διαφορετικά χρώματα αποδίδονται οι διαφορετικές κοινές βιομάζες που είχαν κατά καιρούς οι διαφορετικές δειγματοληψίες.



**Εικόνα 44:** Σύγκριση στις ίδιες ημέρες αλλά με διαφορετική μεταχείριση μεταξύ των 6A-6D-6G: σύμφωνα με τις μετρήσεις παρατηρήθηκαν 26 κοινές βιομάζες των οποίων το ποσοστό αντιστοιχεί στο 14,4% του κοινού πληθυσμού, οι οποίες παρέμειναν ίδιες από την αρχή μέχρι το τέλος του πειράματος. Με διαφορετικά χρώματα αποδίδονται οι διαφορετικές κοινές βιομάζες που είχαν κατά καιρούς οι διαφορετικές δειγματοληψίες.



**Εικόνα 45:** Σύγκριση στις ίδιες ημέρες αλλά με διαφορετική μεταχείριση μεταξύ των 12A-12D-12G: σύμφωνα με την εικόνα στις μετρήσεις παρατηρήθηκαν 25 κοινές βιομάζες των οποίων το ποσοστό αντιστοιχεί στο 12,9% του κοινού πληθυσμού, οι οποίες παρέμειναν ίδιες από την αρχή μέχρι το τέλος του πειράματος. Με διαφορετικά χρώματα αποδίδονται οι διαφορετικές κοινές βιομάζες που είχαν κατά καιρούς οι διαφορετικές δειγματοληψίες.

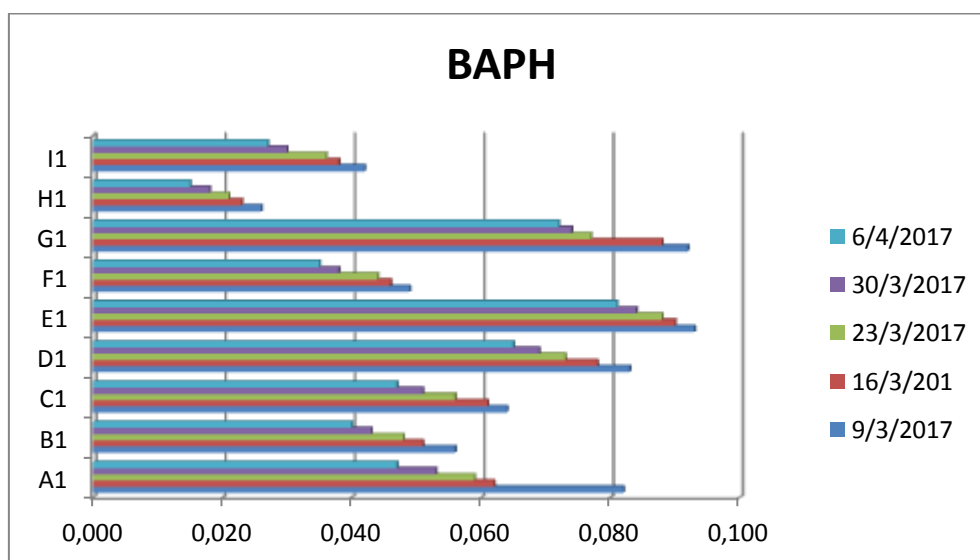


### 3.4 Βάρη

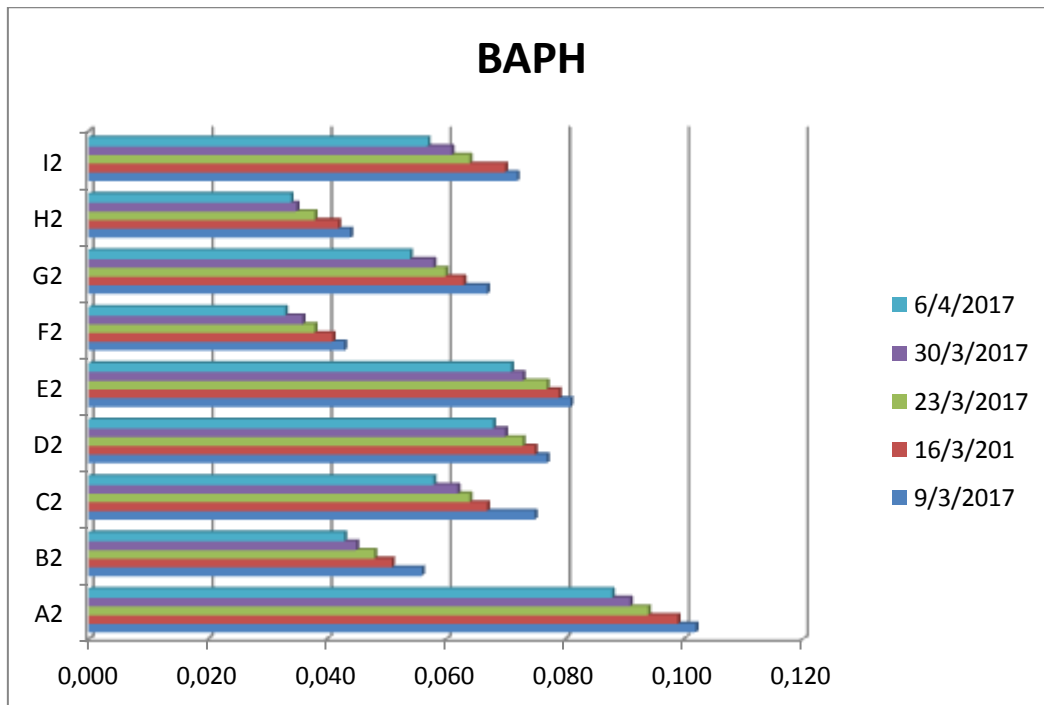
Στο τέλος καθαρίστηκε πάλι εξωσκελετός γαρίδας, τεμαχίστηκε σε κομμάτια και τοποθετήθηκε στην κατάψυξη. Έπειτα, χωρίστηκαν τα κομμάτια στις ίδιες ομάδες με τις ίδιες διηθήσεις. Τα κομμάτια αυτά ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας. Η διαδικασία διήρκησε 28 ημέρες, έγινε 5 φορές και τα βάρη ζυγίζοντουσαν κάθε 7 ημέρες. Κάθε μπουκάλι είχε 3 κομμάτια, έτσι προέκυψαν 3 διαφορετικοί πίνακες.

Πίνακας 3-4-5: Έγινε στατιστική επεξεργασία και βγήκε ο μέσος όρος  $\pm$  το σφάλμα του μέσου όρου. Στο τέλος του εκάστοτε πίνακα καταγράφεται ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση και το τυπικό σφάλμα. Κάτω από το κάθε πίνακα είναι ραβδόγραμμα με τα βάρη (gr) και τις ημερομηνίες που ζυγίστηκαν. Τα αποτελέσματα είναι τα εξής:

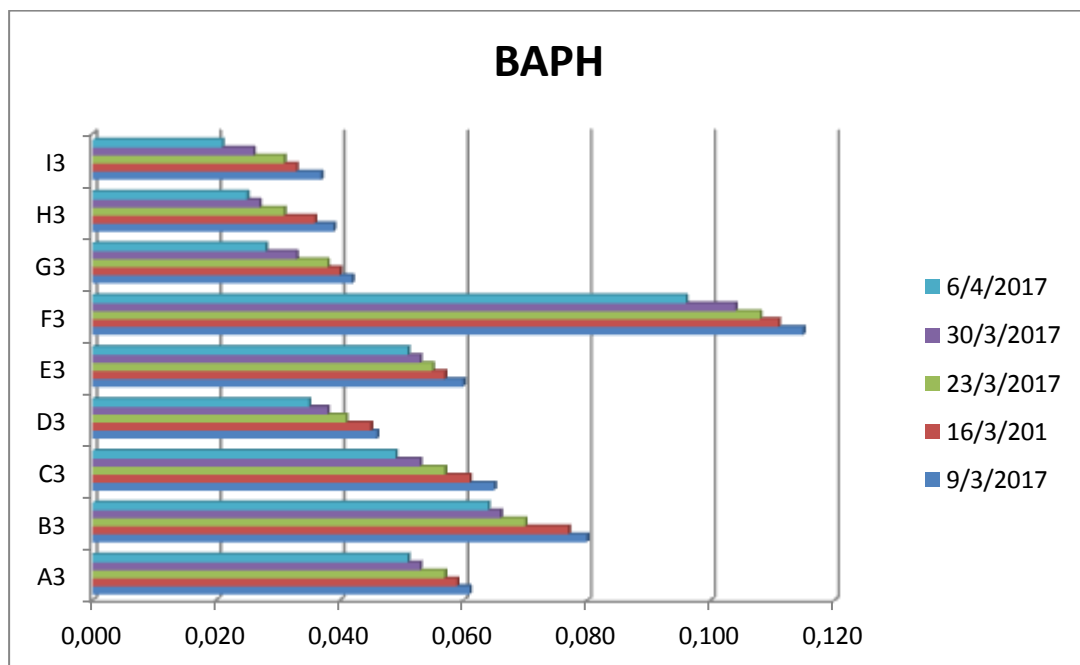
	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1	I1
	0,082	0,056	0,064	0,083	0,093	0,049	0,092	0,026	0,042
	0,062	0,051	0,061	0,078	0,090	0,046	0,088	0,023	0,038
	0,059	0,048	0,056	0,073	0,088	0,044	0,077	0,021	0,036
	0,053	0,043	0,051	0,069	0,084	0,038	0,074	0,018	0,030
	0,047	0,040	0,047	0,065	0,081	0,035	0,072	0,015	0,027
M.O	0,061	0,048	0,056	0,074	0,087	0,042	0,081	0,021	0,035
stdev	0,012	0,006	0,006	0,006	0,004	0,005	0,008	0,004	0,005
τυπικό σφάλμα	0,006	0,003	0,003	0,003	0,002	0,003	0,004	0,002	0,003



	A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2	I2
	0,102	0,056	0,075	0,077	0,081	0,043	0,067	0,044	0,072
	0,099	0,051	0,067	0,075	0,079	0,041	0,063	0,042	0,070
	0,094	0,048	0,064	0,073	0,077	0,038	0,060	0,038	0,064
	0,091	0,045	0,062	0,070	0,073	0,036	0,058	0,035	0,061
	0,088	0,043	0,058	0,068	0,071	0,033	0,054	0,034	0,057
M.O	0,095	0,049	0,065	0,073	0,076	0,038	0,060	0,039	0,065
stden	0,005	0,005	0,006	0,003	0,004	0,004	0,004	0,004	0,006
τυπικό σφάλμα	0,003	0,002	0,003	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003



	A3	B3	C3	D3	E3	F3	G3	H3	I3
	0,061	0,080	0,065	0,046	0,060	0,115	0,042	0,039	0,037
	0,059	0,077	0,061	0,045	0,057	0,111	0,040	0,036	0,033
	0,057	0,070	0,057	0,041	0,055	0,108	0,038	0,031	0,031
	0,053	0,066	0,053	0,038	0,053	0,104	0,033	0,027	0,026
	0,051	0,064	0,049	0,035	0,051	0,096	0,028	0,025	0,021
M.O	0,056	0,071	0,057	0,041	0,055	0,107	0,036	0,032	0,030
stden	0,004	0,006	0,006	0,004	0,003	0,006	0,005	0,005	0,006
τυπικό σφάλμα	0,002	0,003	0,003	0,002	0,002	0,003	0,003	0,003	0,003



Διαπιστώθηκε, με το πέρασμα του καιρού και το επαναλαμβανόμενο ζύγισμά τους ανά 7 ημέρες, σταδιακή μείωση στο βάρος τους. Αυτό αποδεικνύει ότι αυτού του τύπου η μείωση οφείλεται στην αλλοίωση οι μικροοργανισμοί τρεφόντουσαν από οτιδήποτε ήταν προσκολλημένο επάνω στην επιφάνεια. Επίσης παρατηρείται ότι το τυπικό σφάλμα δεν ήταν σημαντικό σε όλα τα βάρη. Τέλος στη τυπική απόκλιση οι τιμές από την μέση τιμή δεν αποκλίνουν.

#### 4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναφέρθηκε και στο σκοπό της εργασίας, τέτοιες έρευνες εκλείπουν, οπότε δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές σε σχέση με την ανάπτυξη βιοϋμενίων σε εξωσκελετό γαρίδας. Οι έρευνες που υπάρχουν αφορούν παράσιτα και συμβιώτες του είδους στοματικούς θύλακες, ουρά και άλλα. Η μόνη έρευνα που αναφέρεται σε κάτι αντίστοιχο με το προς εξέταση ζήτημα είναι από μια συγκεκριμένη διατριβή που αφορά στην ανάπτυξη βιοϋμενίων σε κεφαλοθώρακα καραβίδας (Δημητριάδου Χ., 2016). Το προαναφερθέν πείραμα διήρκησε μεν περισσότερες ημέρες, όμως τα αποτελέσματα και των δύο πειραμάτων εμφανίζονται κοινά, δηλαδή και στις δύο έρευνες διαπιστώθηκε πως υπήρξε μεγάλη αύξηση βιοϋμενίων σε όλες τις ομάδες των δειγμάτων και τα συμπεράσματα ήταν παρόμοια. Οι διαφορές ανάμεσα στις δυο έρευνες ήταν οι διηθήσεις του νερού, οι ομάδες που στην μια ήταν 2 και στη συγκεκριμένη ήταν 3 και οι δειγματοληψίες που στην μια ήταν 7 και στην συγκεκριμένη ήταν 5.

Στην παρούσα έρευνα όλες οι ομάδες παρουσίασαν αύξηση των βιοϋμενίων, αλλά κάποια μεγαλύτερη αύξηση υπήρχε στην ομάδα DEF. Αυτό μας προϊδεάζει για το ότι ο χιτινοσκελετός γαρίδας αποτελεί ιδανικό τόπο προσκόλλησης βακτηρίων.

Παρόλ' αυτά είναι γνωστό ότι στο ετερογενές υδάτινο οικοσύστημα υπάρχουν αρκετοί αποικοδομητές και κάποιοι από αυτούς είναι τα βακτήρια, τα πρωτόζωα, οι μύκητες του γένους *Lindra* και *Lulworthia*, οι αμοιβάδες, τα θαλάσσια σκουλήκια, τα νηματώδη και κάποια αρθρόποδα. Τα βακτήρια και γενικά οι αποικοδομητές έχουν ως σκοπό την ανακύκλωση αποβλήτων, η οποία είναι απαραίτητη, ώστε να υπάρχει ισορροπία στο περιβάλλον. Αυτό συμβαίνει με δύο τρόπους: α) με την ανακύκλωση διάφορων περιττωμάτων και των υπολειμμάτων τροφής και β) με την κατάποση άλλων μικροοργανισμών η οποία παίζει πρωταρχικό ρόλο για τη μεταφορά ζώσης

ύλης στη θαλάσσια τροφική αλυσίδα (<https://www.reference.com/science/list-decomposers-ocean-5411a852dfa0d650>).

Αν και δεν υπάρχουν αρκετές έρευνες για την ανάπτυξη βιοϋμενίων, υπάρχουν αρκετές έρευνες όσον αφορά τη χιτίνη, αφού το τελευταίο χρονικό διάστημα υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για το ποιες μπορεί να είναι οι ιδιότητες της χιτίνης στα τρόφιμα, καθώς έχουν γίνει διάφορες έρευνες για να χρησιμεύει στη συσκευασία των τροφίμων. Διαπιστώθηκε, μετά από πειράματα, ότι, αντίθετα με τα θερμοπλαστικά φιλμ αμύλου, οι μήτρες νανοκρυστάλλων χιτίνης καθώς και νανοφίλμ χιτίνης (ως μέλος μεμβράνης στη συσκευασία τροφίμων) μπορούν να προσφέρουν καλύτερη προφύλαξη του τροφίμου (Salaberria A.M., 2014).

Όσον αφορά τη χρησιμότητα της χιτίνης, διαπιστώθηκε πως η διασπορά νανοϊνιδούς χιτίνης σε ένα οικοσύστημα παίζει σημαντικό ρόλο στην υγεία του ίδιου του οικοσυστήματος, αφού αποτελεί σημαντικό ανανεώσιμο πόρο. Το προσόν της νανοϊνιδούς χιτίνης, το οποίο την κάνει τόσο ξεχωριστή είναι ότι αλληλεπιδρά με τα κύτταρα, τις πρωτεΐνες και άλλες ενώσεις. Τα ινίδια χιτίνης έχουν τη δυνατότητα να συμβάλλουν σε χημικές τροποποιήσεις, διότι έχουν μια επιφάνεια αντίδρασης καλυμμένης με υδροξυλικές ομάδες. Αυτό έχει ως αφορμή να παρουσιάζεται ενδιαφέρον για περαιτέρω έρευνες σχετικά με τη προσφορά της χιτίνης ως βιώσιμο υλικό για βιοϊατρικά ζητήματα, στη βιομηχανία καλλυντικών αλλά και για την παραγωγή βιοαισθητήρων (Mincea, 2012). Μάλιστα, πρόσφατα έγιναν έρευνες σχετικά με την αντιμυκητιακή δράση των νανοϊνιδίων χιτίνης (Salaberria A, 2016). Αποδείχθηκε πως με τη δημιουργία σύνθετων νανοκρυστάλλων χιτίνης και κυτταρίνης παρέχονται καλές αντιμυκητιακές ιδιότητες.

Άλλες έρευνες που έχουν διεκπεραιωθεί αναφορικά με την παρασιτολογία και τις

νόσους των οστρακοειδών έχουν υποδείξει πως στο κέλυφος γενικά μπορούν να συμβιώσουν άτομα του είδους *Pseudomonas spp.* και του *Enterobacteraglomerans*, τα οποία, όμως, επειδή μπορούν να δρουν στη χιτίνη φέρουν ως αποτέλεσμα να καταστρέφουν το κέλυφος (Stentiford, 2011). Οι χιτινολυτικοί μικροοργανισμοί υπάρχουν στη θάλασσα, γι' αυτό έγινε το πείραμα σε θαλασσινό νερό, ώστε να γίνει το πρώτο βήμα για να αναγνωριστούν πιθανοί μικροοργανισμοί που μπορούν εύκολα να αποικοδομούν χιτίνη. Με την αποικοδόμηση της χιτίνης αντιμετωπίζονται τα απόβλητα των γαριδοεκτροφών.

Στα αποτελέσματα των βιοόγκων τόσο στην πάνω όσο και στην κάτω επιφάνεια παρατηρήθηκε μια σταδιακή μείωση και στις 3 μεταχειρίσεις, αυτό οφείλεται στο ότι όσο περνούσαν οι μέρες τελείωναν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για τη μικροβιακή αύξηση και άρχιζε να υπάρχει αλλοίωση της επιφάνειας. Επίσης παρατηρήθηκε με βάση το τυπικό σφάλμα ότι οι απώλειες στις μετρήσεις στην παρούσα έρευνα δεν ήταν σημαντικές. Τα στατιστικά αποτελέσματα έδειξαν ότι στις 3 διαφορετικές μεταχειρίσεις ανάμεσα στις δειγματοληψίες υπήρχαν κάποιες διαφορές μεταξύ τους, η σημαντικότερη ήταν ότι υπήρξε πιο γρήγορη ανάπτυξη στα 0,1μm και στα 2μm από ότι στο NaCl. Διαπιστώθηκε, όμως και στα αποτελέσματα των βιοόγκων όπως και στα βάρη των κομματιών του εξωσκελετού σταδιακή μείωση, αφού οι μικροοργανισμοί τρεφόντουσαν από οτιδήποτε ήταν προσκολλημένο επάνω στην επιφάνεια. Επίσης παρατηρείται ότι το τυπικό σφάλμα δεν ήταν σημαντικό σε όλα τα βάρη και στη τυπική απόκλιση οι τιμές από την μέση τιμή δεν αποκλίνουν. Τέλος οι μοριακές αναλύσεις έδειξαν ότι το κοινό ποσοστό για τις δειγματοληψίες ήταν γύρω στο 9% και στις ίδιες ημέρες, αλλά με διαφορετική μεταχείριση ήταν γύρω στο 21-25 %, το ποσοστό είναι αρκετά ικανοποιητικό σε σχέση με την ανάπτυξη που υπήρξε. Η μικροβιακή βιομάζα τους ήταν αρκετά υψηλή, με υψηλότερη στο 10G με

max= 43213. Όσον αφορά τον αριθμό αλληλουχιών, ο μεγαλύτερος ήταν στα 16D με N= 87921 και όσον αφορά τον αριθμό ειδών ο μεγαλύτερος ήταν στα 16A με S= 286. Τα αποτελέσματα ήταν θετικά γιατί και ανάπτυξη υπήρχε σε μικρό χρονικό διάστημα (άρα οι συνθήκες ήταν κατάλληλες). Επίσης τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος ήταν πιο ικανοποιητικά συγκριτικά με τα αποτελέσματα αντίστοιχων πειραμάτων.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική έγινε καλλιέργεια βιοϋμενίων σε όλο τον εξωσκελετό της γαρίδας του είδους *Melicertus kerathurus* σε θαλασσινό νερό. Το τμήμα του εξωσκελετού αποδείχθηκε σωστή επιλογή αφού είναι μια από τις καταλληλότερες επιφάνειες, διότι τα βακτήρια μπορούν να προσκολληθούν έστω και προσωρινά σε αυτή σε μικρό χρονικό διάστημα. Τα πρώτα βιοϋμένια σχηματίστηκαν από την 1<sup>η</sup> κιόλας δειγματοληψία (δηλαδή στη 2<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας), τόσο στην επάνω όσο και την κάτω επιφάνεια του τμήματος του εξωσκελετού. Διαπιστώθηκε ότι υπήρξε μια πιο γρήγορη ανάπτυξη στην ομάδα DEF, έπειτα στην ομάδα ABC και τέλος στη GHI. Αυτό μας προϊδεάζει στο γεγονός πως τα βακτήρια θρέφονται από τη χιτίνη αφού υπήρξε σχηματισμός και ανάπτυξη βιοϋμενίου και στις δύο επιφάνειες. Η αύξηση βιοϋμενίου επιτευχθηκε με δύο τρόπους: σε φυσικό και σε τεχνητό θαλασσινό νερό. Αποδείχθηκε όμως, ότι πιο γρήγορη δημιουργία γίνεται με τον πρώτο τρόπο. Αυτό συμβαίνει, ίσως, λόγω εποίκισης του εξωσκελετού από εξωγενή βακτήρια.

Κατά την παρατήρηση των δειγμάτων με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως παρατηρήθηκε η διαδικασία της ανάπτυξης των βιοϋμενίων, η αλλοίωση της χιτίνης στον κεφαλοθώρακα, καθώς επίσης διαπιστώθηκαν και δείγματα μυκήτων

(ζύμες). Επίσης, οι μοριακές αναλύσεις έδειξαν ότι το κοινό ποσοστό για τις δειγματοληψίες ήταν γύρω στο 9% και στις ίδιες ημέρες, αλλά με διαφορετική μεταχείριση ήταν γύρω στο 21-25 %. Η μικροβιακή βιομάζα τους ήταν αρκετά υψηλή, με υψηλότερη στο 10G με  $\max = 43213$ . Όσον αφορά τον αριθμό αλληλουχιών, ο μεγαλύτερος ήταν στα 16D με  $N = 87921$  και όσον αφορά τον αριθμό ειδών ο μεγαλύτερος ήταν στα 16A με  $S = 286$ .



## 7.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ξενογλώσση Βιβλιογραφία

- ❖ Bengtsson M. et al., Seasonal dynamics of bacterial biofilms on the kelp *Laminaria hyperborea*, Inter-Research 2010
- ❖ Bouma Carolyn L., et al., Sugar Transport by the Marine Chitinolytic Bacterium *Vibrio furnissii*, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc., 1996
- ❖ Donlan Rodney M., Biofilms: Microbial Life on Surfaces, Emerging Infectious Diseases, 2002
- ❖ Flemming H.C., Wingender J., Griegbe T., Mayer C. (2000) Physico-chemical properties of biofilms. Biofilms: recent advances in their study and control. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 19-34.
- ❖ Johnson Mark P. et al., Habitat and Ecology of *Nephrops norvegicus*, Elsevier Ltd., 2013
- ❖ Keyhani N., et. al. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc, 1996
- ❖ Kormas K. et al., Comparison of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) gut bacterial communities using 16S rDNA clone libraries and pyrosequencing, Elsevier Ltd., 2013
- ❖ Kormas K. et al., Gut bacteria associated with different diets in reared *Nephrops norvegicus*, Elsevier GmbH, 2012.
- ❖ Martin Wahl, et al., The Second Skin: Ecological Role of Epibiotic Biofilms on Marine Organisms, Front Microbiol, 2012

- ❖ Mincea M. et al., PREPARATION, MODIFICATION, AND APPLICATIONS OF CHITIN NANOWHISKERS: A REVIEW, Advanced Study Center Co. Ltd., 2012
- ❖ Nadell C., Xavier J., Levin S., Foster K. (2008) *The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms*. PloSBiol, 6:e14.
- ❖ Obst Matthias et al., *The microhabitat of Symbionpandora (Cycliophora) on the mouthparts of its host Nephropsnorvegicus(Decapoda: Nephropidae)*, Springer-Verlag, 200
- ❖ Radwan S.S. et al., *Bioremediation of oily sea water by bacteria immobilized in biofilms*
- ❖ Ridgway I.D. et al., *Journal of Invertebrate Pathology*, Elsevier Inc., 2008
- ❖ Salaberria A. M., et al., *Role of chitin nanocrystals and nanofibers on physical, mechanical and functional properties in thermoplastic starch films*, Elsevier Ltd., 2014
- ❖ Salaberria A. M., et al., *Self-bonded composite films based on cellulose nanofibers and chitin nanocrystals as antifungal materials*, Elsevier Ltd., 2016
- ❖ Salta M. et al., *Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics*, Environmental Microbiology, 2013
- ❖ September S., et. al.. *Prevalence of bacterial pathogens in biofilms of drinking water distribution systems*. J Water Health, 5:219-227, 2007
- ❖ Stentiford Grant D., *Diseases of the European edible crab (Cancer pagurus): a review*, ICES Journal of Marine Science, 65: 1578-1592,

2008

- ❖ Stentiford Grant D. et al., Diseases of Nephrops and Metanephrops: A review, Elsevier Inc., 2010

### **Ελληνική Βιβλιογραφία**

- ❖ Έκθεση ποιότητας των νερών κολύμβησης της Ελλάδας, Υπουργείο Περιβάλλοντος, Χωροταξίας και Δημόσιων έργων, 2007
- ❖ Κουή Μ., Λιμπεροπούλου Θ., SCANNING ELECTRON MICROSCOPE WITH ENERGY DISPERSIVE X-RAY SPECTROMETER (SEM-EDAX), 2003
- ❖ Dimitradou Η. Ανάπτυξη βιοϋμενίων σε εξωσκελετό караβίδας (Nephrops norvegicus), 2016

### **Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία**

- ❖ <https://www.reference.com/science/list-decomposers-ocean-5411a852dfa0d650>).
- ❖ slideplayer.com, Lobsteranatomy, 2015

## 6. ABSTRACT

The purpose of this thesis was to observe the augmentation of the biological biofilms in parts of pieces of the shrimp's exoskeleton in sea water.

For the experimental procedure it was used exoskeleton of shrimp and sea water that was collected from Kala Nera. Three sample groups were created and each one of them was composed by three bottles, the main difference among them was the filtration of the water. In the first group ABC, filtrated sea water by a filter was used, whose pore diameter was 0,1 $\mu$ m, in order to remove the microorganisms, in the second group DEF, filtrated sea water by a filter was used, whose pore diameter was 2 $\mu$ m, and in the last group GHI artificial sea water (NaCl) was used. In T0 time the first sampling occurred so that the surface of the incubation could be observed, before the augmentation of the biofilms. In the aggregate, 5 samplings occurred in a period of 12 days. In order to make the samples long-lasting for observation, it was used 2,5% glutaraldehyde in sterile sea water for 4 hours at 4°C and they were dehydrated and electroplated afterwards. From each one of the samplings, a sample was placed in the freezer at -80°C for molecular analysis. Finally, the observation of the samples under a scanning electron microscope followed, and the results from the molecular analysis were examined.

In each one of the samplings it was observed a rather rapid evolution of the biofilms and in the 3 sample groups even from the 2<sup>nd</sup> day. Given that, the samplings should change and become more frequent than planned. In the group of the control of DEF, there was the widest population of biofilms. However, in the rest of the groups there was also a large bacterial increase and afterwards an increase of biofilms, even from the very first sampling. In the 9<sup>th</sup> day a bacterial reduction started to happen and also spoiling of the surface of the cephalothorax. The same thing happened also in the 12<sup>th</sup>

day.

This thesis proved that the augmentation of bacterial biofilms at chitin-skeleton of the shrimp's cephalothorax can be possible. The exoskeleton of crustaceans mainly consists of chitin and it can form a nutrient medium for sea bacteria increase.

**Key words:** bacteria, biofilm, shrimp, *Penaeus kerathurus*, chitin, exoskeleton, sea water, scanning electron microscope, molecular analysis

