

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ**

**ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΤΙΤΛΟΣ: Ανάπτυξη βιοϋμενίων σε εξωσκελετό καραβίδας (*Nephrops  
norvegicus*)**

**ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΟΥ ΧΑΡΑ**

**A.E.M :1339**

**Βόλος 2016**

**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. Μεντέ Έλενα**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Φυσιολογία Θρέψης Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

*Αφιερώνεται*

Στην οικογένειά μου..

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ευχαριστώ τους καθηγητές που με βοήθησαν να κατανοήσω την λειτουργία και την αξία των βιοϋμενίων, τους συμφοιτητές μου για την στήριξη και την πολύτιμη βοήθειά τους και φυσικά τους γονείς μου για την πίστη τους σε μένα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της διατριβής ήταν η παρακολούθηση της αύξησης βακτηριακών βιοϋμενίων σε τμήματα κεφαλοθώρακα χιτινοσκελετού καραβίδας σε θαλασσινό νερό.

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε εξωσκελετός καραβίδας και θαλασσινό νερό που συλλέχθηκε από τον Άναυρο Μαγνησίας. Δημιουργήθηκαν δύο ομάδες δειγμάτων σε σωλήνες τύπου falkon των 50 ml, στις οποίες η σημαντική διαφορά ήταν η διήθηση του νερού. Στην πρώτη ομάδα (HDb) χρησιμοποιήθηκε νερό διηθημένο από μεμβράνη πόρου 0,2 μm που αποτελούσε την ομάδα μάρτυρα για το πείραμα, καθώς ο ηθμός αυτός απομακρύνει πρακτικώς όλα τα βακτήρια από το νερό, ενώ στην ομάδα HDc χρησιμοποιήθηκε νερό διηθημένο από μεμβράνη πόρου 0,8 μm, που επιτρέπει τη διέλευση των περισσότερων βακτηρίων ενώ ταυτόχρονα απομακρύνει όλα τα σωματίδια και τους οργανισμούς με μεγαλύτερο μέγεθος από 0,8 μm Η καλλιέργεια έγινε σε συνθήκες δωματίου (θερμοκρασία 20 °C και φωτοπερίοδος 12Φ:12Σ). Σε χρόνο T0 έγινε η πρώτη δειγματοληψία για να παρατηρηθεί η επιφάνεια επώασης πριν την αύξηση βιοϋμενίων. Συνολικά έγιναν επτά δειγματοληψίες σε διάστημα 209 ημερών. Για τη μονιμοποίηση των δειγμάτων προς παρατήρηση χρησιμοποιήθηκε 2,5% γλουταλδεΐδη σε αποστειρωμένο θαλασσινό νερό για τέσσερις ώρες στους 4 °C και έπειτα αφυδατώθηκαν και επιμεταλλώθηκαν. Τέλος, ακολούθησε παρατήρηση των δειγμάτων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

Σε κάθε δειγματοληψία παρατηρήθηκε σταδιακή ανάπτυξη των βιοϋμενίων και στις δύο ομάδες δειγμάτων από την 12<sup>η</sup> κιόλας ημέρα. Στην ομάδα του μάρτυρα HDb εμφανίστηκαν ταχύτερα τα βιοϋμένια στην επιφάνεια όμως μετά από τις 21 ημέρες η ανάπτυξη έγινε βραδύτερη. Σε αντίθεση με την ομάδα χιτίνης HDc στην οποία άργησαν να εμφανιστούν βιοϋμένια όμως στη συνέχεια η αύξηση συνέβη με αρκετά ταχείς ρυθμούς. Την 21<sup>η</sup> και την 30<sup>η</sup> ημέρα δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές σε σχέση με τις υπόλοιπες δειγματοληψίες. Στις 56 ημέρες επώασης, ωστόσο είχαμε σημαντική αύξηση των βιοϋμενίων, καθώς και αυλακώσεις στην επιφάνεια του χιτινοσκελετού.

Η διατριβή ανέδειξε πως είναι δυνατή η αύξηση βακτηριακών βιοϋμενίων σε χιτινοσκελετό

κεφαλοθώρακα караβίδας μετά την επώαση σε θαλασσινό νερό και ότι εξωσκελετός καρκινοειδών (που αποτελείται κυρίως από χιτίνη) μπορεί να αποτελέσει θρεπτικό υπόστρωμα αύξησης θαλάσσιων βακτηρίων.

**Λέξεις κλειδιά:** βακτήρια, βιοϋμένιο, καρκινοειδή, караβίδα, *Nephrops norvegicus*, χιτίνη, εξωσκελετός, θαλασσινό νερό, ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>8</b>
1.1. Βιοϋμένια Γενικά.....	8
1.2. Σχηματισμός και ανάπτυξη βιοϋμενίων.....	9
1.3. Βιοϋμένια σε θαλασσινό νερό.....	10
1.4. Άναυρος Μαγνησίας.....	11
1.5. Καραβίδα.....	14
1.5.1 Παράσιτα και συμβιώτες στην καραβίδα.....	15
1.5.2 Χιτίνη.....	16
1.6. Σκοπός Διατριβής.....	19
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>20</b>
2.1 Διήθηση νερού.....	20
2.2 Προετοιμασία δειγμάτων.....	20
2.3 Διαδικασία.....	21
2.4 Αφυδάτωση.....	22
2.5 Επιμετάλλωση.....	22
2.6 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.....	23
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>24</b>
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>33</b>
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>38</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>39</b>
<b>7. ABSTRACT.....</b>	<b>43</b>

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Βιοϋμένια Γενικά

Με τον όρο Βιοϋμένια εννοούμε τους προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς που ζουν προσκολλημένοι σε κάποια επιφάνεια σχηματίζοντας έναν τρισδιάστατο πληθυσμό που μπορεί να φτάσει τα  $1.0 \times 10^9$  κύτταρα ανά στοιβάδα. . Αποτελείται από μια σύζευξη μικροβιακών κυττάρων και περιβάλλεται από την ενδοκυτταρική πολυσακχαριδική μεμβράνη που εκκρίνεται από τα βακτήρια (Nadel et al. 2008). Ένα βιοϋμένιο είναι ένα πολύπλοκο συσσωμάτωμα φωτότροφων, χημειότροφων και ετερότροφων μικροοργανισμών εμβαπτισμένο μέσα σε μια στοιβάδα πολυμερούς οργανικής ύλης. Ο λόγος που επιλέγουν να μετατραπούν από πλαγκτικούς οργανισμούς σε βιοϋμένια δεν είναι ακόμη κατανοητός και είναι αρκετά περίπλοκος διότι οι σχετικοί μηχανισμοί των κυττάρων διαφέρουν από είδος σε είδος. Υπάρχει πιθανότητα να συμβαίνει λόγω μερικής προστασίας που προσφέρει ένα τέτοιο σύστημα από τοξικές ενώσεις, θηρευτές, αντιβιοτικά καθώς και από θερμική μεταβολή (Johnson 2007). Η χημεία και φυσιολογία των βιοϋμενίων ποικίλει και αφορά τη φύση των μικροοργανισμών και το περιβάλλον ανάπτυξής τους. Αξίζει να τονισθεί ότι η ομοιότητα που έχει παρατηρηθεί ανάμεσα σε βιοϋμένια είναι ότι η δομική τους ακεραιότητα εξαρτάται από την εξωτερική μεμβράνη που παράγεται από τα συστατικά των κυττάρων. Κάθε εξωτερική μεμβράνη είναι διαφορετική λόγω της διαφορετικότητας των κυττάρων παίζουν όμως σημαντικό ρόλο στην αύξηση και τη σταθεροποίηση του βιοϋμενίου. Παρ' όλα αυτά η διαβίωση σε βιοϋμένια προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα (Κορμάς, 2010)

Τα βιοϋμένια μπορεί να περιλαμβάνουν μη κυτταρικά υλικά όπως ορυκτοί κρύσταλλοι,

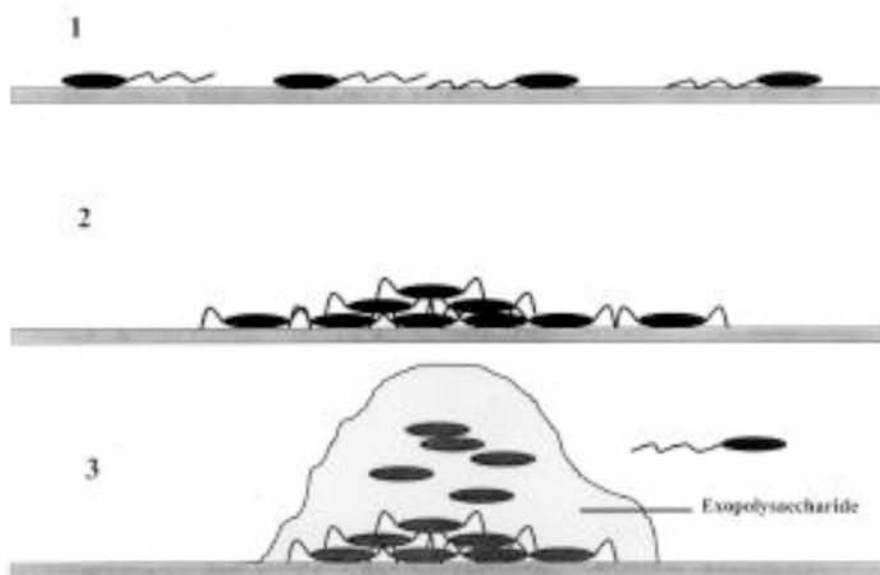


διαβρωμένα σωματίδια, συστατικά αίματος και άλλα, ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται. Τα βιοϋμένια που αναπτύσσονται σε επιφάνειες που είναι βυθισμένες στο νερό περιέχουν διάτομα και νηματοειδή βακτήρια ενώ τα βιοϋμένια που αναπτύσσονται σε ελεγχόμενα εργαστηριακά περιβάλλοντα αποτελούνται συνήθως από κροκοειδείς μικροοργανισμούς συνδεδεμένους με την εξωτερική μεμβράνη (Donlan 2002). Τα συσσωματώματα στο πόσιμο νερό περιέχουν παθογόνους οργανισμούς όπως *Escherichia coli*, *Aeromonas* και *Pseudomonas spp.*, που αποτελούν κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου (September et al. 2007). Τα βιοϋμένια ευθύνονται για βλάβες δοντιών, μολύνσεις ιατρικών οργάνων, επικαθήσεις σε σωληνώσεις καθώς και για μηχανικά προβλήματα πλεύσης των πλοίων. Όμως παίζουν σημαντικό ρόλο και στην οικολογία των ρεόντων υδάτων. Μακροσκοπικά μπορούν να γίνουν ορατοί σε πέτρες, φυτά και άλλες επιφάνειες του υδάτινου περιβάλλοντος ως πράσινοι γλοιώδεις σχηματισμοί. Και ο οικολογικός λόγος που είναι σημαντικοί αυτοί οι σχηματισμοί στο υδάτινο περιβάλλον είναι πως βοηθούν στη διατήρηση της καλής ποιότητας του νερού, στην ανακύκλιση ανόργανων αλάτων, στην απομάκρυνση των αιωρούμενων σωματιδίων και στην μεταφορά ενέργειας σε ανώτερα τροφικά επίπεδα καθώς αποτελούν και τους κύριους λειτουργούς πρωτογενούς παραγωγής (Κορμάς, 2010).

## 1.2 Σχηματισμός και ανάπτυξη

Η διαδικασία σχηματισμού και ανάπτυξης βιοϋμενίου είναι πολύπλοκη καθώς απαιτεί αρκετά στάδια αποίκησης (Σχήμα 1) . Αρχικά υπάρχει προσκόλληση των βακτηρίων σε μία επιφάνεια. Στην πρώτη αυτή φάση η επιλογή του περιβάλλοντος θεωρείται αναστρέψιμη για τα πρώτα λεπτά πριν την έναρξη της απομάκρυνσης του νερού ανάμεσα στο κύτταρο και την επιφάνειας προσκόλλησης. Η φάση αυτή επιτρέπει στα βιοϋμένια να ελέγχουν την καταλληλότητα της επιφάνειας ώστε να μην βιώσουν τη μη αναστρέψιμη ανάπτυξη σε ακατάλληλες επιφάνειες.

Μετά την εγκατάσταση των αρχικών εποικιστών γίνεται προσκόλληση των δευτερογενών εποικιστών σχηματίζοντας το πολυειδικό βιοϋμένιο. Έπειτα, αρχίζει η σταδιακή ανάπτυξη του σχηματισμού που περιλαμβάνει την αύξηση της μικροβιακής μάζας καθώς και την παραγωγή μιας πολυμερούς εξωκυτταρικής στοιβάδας. Η παρατήρηση βιοϋμενίων με συνεστιακό μικροσκόπιο έχει φανερώσει πως η αρχιτεκτονική δομή της εξωκυτταρικής στοιβάδας είναι πολύπλοκη και παρέχει διασυνδεδεμένα κανάλια και ελεύθερη ροή νερού. Τέλος, μετά τη δημιουργία του ώριμου βιοϋμενίου, θα πρέπει να είναι σε θέση να αντιστέκεται σε δυνάμεις αποκόλλησής και κυρίως στην τύρβη. Εάν οι τυρβώδεις δυνάμεις γίνουν ισχυρές υπάρχει μεγάλη πιθανότητα μερικά περιφερειακά τμήματα του να αποκολληθούν (Κορμάς, 2010).



Σχήμα 1: Στάδια δημιουργίας και αναπαραγωγής Βιοϋμενίου (Dunne M., 2002)

### 1.3 Βιοϋμένια σε θαλασσινό νερό

Σε αντίθεση με τον αέρα, το υδάτινο περιβάλλον αποτελεί ένα ευνοϊκό περιβάλλον για τους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς. Στο θαλάσσιο περιβάλλον τα βιοϋμένια υπάρχουν σε σχεδόν σε κάθε στερεή επιφάνεια. Δημιουργούνται συνήθως από διάτομα

και βακτήρια τα οποία μπορούν και προσκολλούν εύκολα σε επιφάνειες και δημιουργούν γρήγορα περίπλοκους σχηματισμούς με τρισδιάστατο σχήμα. Η επικράτηση των ειδών εξαρτάται από τις γεωγραφικές και εποχιακές διακυμάνσεις. Τα βακτηριακά βιοϋμένια είναι εκείνα που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στη χρήση αντιβιοτικών και σε άλλους τύπους stress σε σύγκριση με άλλους πλαγκτονικούς μικροοργανισμούς (Salta et al 2013). Ωστόσο, τα βακτηριακά κύτταρα στα βιοϋμένια του θαλάσσιου περιβάλλοντος είναι λιγότερο πλαγκτικά.

Η εξωτερική επιφάνεια του σώματος των θαλάσσιων οργανισμών αποτελεί συχνά μία εξαιρετική επιφάνεια υποδοχής βιοϋμενίου. Λόγω της επίδρασης που ασκεί η παρουσία βιοϋμενίου στην ροή πληροφοριών, ενέργειας και ύλης του ξενιστή, αποτελεί σημαντικό παράγοντα στη διαμόρφωση των αβιοτικών και βιοτικών αλληλεπιδράσεων του ξενιστή (Wahl, 2012).

#### 1.4 Άναυρος Μαγνησίας

Ο Άναυρος Μαγνησίας βρίσκεται στο ανατολικό μέρος του Παγασητικού κόλπου και είναι μια ακτή που ανήκει στο δήμο Βόλου. Έχει χαρακτηριστεί κατάλληλη ακτή για κολύμπι κατέχοντας την πιστοποίηση της Γαλάζιας σημαίας. Παράλληλα με τον Παγασητικό φιλοξενεί αρκετά είδη και υδρόβιους πληθυσμούς.

Βάσει της Ευρωπαϊκής Νομοθεσίας για να χαρακτηριστεί η ποιότητα των νερών εξαιρετική, θα πρέπει οι συγκεντρώσεις εντερόκοκκων να είναι μικρότερες από 100 αποικίες μικροβίων ανά 100ml και κολοβακτηριδίων μικρότερες από 250 αποικίες μικροβίων ανά 100ml. Οι αναλύσεις που έγιναν τον Ιούνιο του 2016 από το διαπιστευμένο εργαστήριο για την ΔΕΥΑΜΒ, σε δείγματα νερού από οκτώ ακτές του Δήμου Βόλου, κατέδειξαν ότι οι αποικίες κυμαίνονται πολύ κάτω από τα όρια. Στην έβδομη θέση βρίσκεται ο Άναυρος Μαγνησίας με 40 E. coli και 0 εντερόκοκκους (Υπουργείο Περιβάλλοντος, Χωροταξίας και Δημόσιων έργων 2016)

Σύμφωνα με την Οδηγία 76/160/ΕΟΚ “περί της ποιότητας υδάτων κολύμβησης” στο πλαίσιο ενός προγράμματος που οργανώνει το Υ.Π.Ε.ΧΩ.Δ.Ε. τα νερά κολύμβησης της χώρας ανά σημείο δειγματοληψίας και σύμφωνα με τη μικροβιολογική ποιότητα κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες:

**Κατηγορία GI:** Σ' αυτή την κατηγορία ανήκουν όλα τα σημεία για τα οποία το σύνολο των ληφθέντων δειγμάτων ικανοποιεί τουλάχιστον κατά 80% τις Επιθυμητές τιμές (G) και κατά 95% τις Υποχρεωτικές τιμές (I) της οδηγίας 76/160/ΕΟΚ για τις παραμέτρους “ολικά κολοβακτηριοειδή” και “καλοβακτηροειδή κοπρανώδους προέλευσης”.

**Κατηγορία EI:** Στην κατηγορία αυτή ανήκουν όλα τα σημεία για τα οποία το σύνολο των ληφθέντων δειγμάτων ικανοποιεί τουλάχιστον κατά 95% τις Υποχρεωτικές τιμές (I) της οδηγίας 76/160/ΕΟΚ για τις Μικροβιολογικές παραμέτρους “ολικά κολοβακτηριοειδή” και “κολοβακτηριοειδή κοπρανώδους προελεύσεως”.

**Κατηγορία OC:** Σ' αυτή την κατηγορία ανήκουν όλα τα σημεία στα οποία τα δείγματα που λήφθηκαν, δεν ικανοποιούν τις Υποχρεωτικές τιμές (I) της οδηγίας 76/160/ΕΟΚ για τις μικροβιολογικές παραμέτρους “ολικά κολοβακτηριοειδή” και “κολοβακτηριοειδή κοπρανώδους προελεύσεως” στο απαιτούμενο ποσοστό, που είναι 95% , αλλά η εμφανιζόμενη απόκλιση από το παραπάνω ποσοστό παρατηρείται διότι τα αποτελέσματα μια και μόνο ανάλυσης από το σύνολο των αναλύσεων, υπερβαίνει τα όρια της Νομοθεσίας. Αυτό αποδεικνύει πως η επιβάρυνση των σημείων αυτών είναι τυχαία ή περιστασιακή και όχι μόνιμη κατάσταση.

**Κατηγορία NC:** Στη συγκεκριμένη κατηγορία ανήκουν όλα τα σημεία για τα οποία το σύνολο των ληφθέντων δειγμάτων δεν ικανοποιεί τις Υποχρεωτικές τιμές (I) της οδηγίας 76/160/ΕΟΚ για τις παραμέτρους “ολικά κολοβακτηριοειδή” και “κολοβακτηριοειδή κοπρανώδους προελεύσεως” στο απαιτούμενο ποσοστό 95%.

Κατηγορία IS: Στη τελευταία κατηγορία ανήκουν όλα τα σημεία , στα οποία η συχνότητα δειγματοληψίας δεν ανταποκρίνεται στην ελάχιστη απαιτούμενη συχνότητα που ορίζει η οδηγία 76/160/ΕΟΚ, αλλά οι μετρούμενες παράμετροι ανταποκρίνονται στις Υποχρεωτικές τιμές (I). Στα συγκεκριμένα σημεία δεν δύναται να ληφθεί αντιπροσωπευτικό στατιστικό συμπέρασμα για την ποιότητα των νερών κολύμβησης (Εκθεση ποιότητας Νερών Κολύμβησης της Ελλάδας,2006).

Σύμφωνα με τις φυσικοχημικές παραμέτρους που εκτιμήθηκαν με οπτικό έλεγχο και στα πλαίσια του προγράμματος του Υ.Π.Ε.ΧΩ.Δ.Ε. Τα Νερά Κολύμβησης της χώρας κατατάσσονται σύμφωνα με τις παρακάτω κατηγορίες:

Κατηγορία Α: Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν όλα τα σημεία για τα οποία το σύνολο των ληφθέντων δειγμάτων ικανοποιεί τουλάχιστον κατά 95% τις Υποχρεωτικές τιμές (I) της οδηγίας για τις φυσικοχημικές παραμέτρους “ορυκτέλαια”, “επιφανειακών ενεργών ουσιών αντιδρόντων με κυανούν μεθυλένιο” και “φαινόλες”.

Κατηγορία Β: Στην κατηγορία αυτή ανήκουν, όσο αναφορά την ποιότητα των Νερών Κολύμβησης για τις φυσικοχημικές παραμέτρους “ορυκτέλαια”, “επιφανειακών ενεργές ουσίες αντιδρώντων με κυανούν μεθυλενίου” και “φαινόλες, όλα τα υπόλοιπα σημεία που δεν ανήκουν στην προηγούμενη κατηγορία Α.

Κατηγορία IS: Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν όλα τα σημεία, στα οποία η συχνότητα δειγματοληψίας δεν ανταποκρίνεται στην ελάχιστη απαιτούμενη συχνότητα που ορίζει η οδηγία 76/160/ΕΟΚ, αλλά οι μετρούμενες παράμετροι ανταποκρίνονται στις Υποχρεωτικές τιμές (I). Στα σημεία αυτά δεν είναι δυνατή η εξαγωγή αντιπροσωπευτικού στατιστικού συμπεράσματος για την ποιότητα των νερών κολύμβησης.

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των αναλύσεων πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα Υποχρεωτικά (Imperative) ή/ και τα Επιθυμητά (Guide) όρια της κοινοτικής

οδηγίας 76/160/ΕΟΚ. (Έκθεση ποιότητας Νερών Κολύμβησης της Ελλάδας, 2006)

Πίνακας 1: Αποτελέσματα αναλύσεων έκθεσης ποιότητας των νερών κολύμβησης στο Βόλο (2009).

Ονομασία ακτής	Δήμος	Σύνολο δειγμάτων	Κατηγορία Μικροβιολογικής ποιότητας	Κατηγορία Φυσικοχημικής ποιότητας
Βόλος-	Βόλου	12	GI	A

### 1.5 Καραβίδα

Η καραβίδα (*Nephrops norvegicus*) είναι ένα δεκάποδο της τάξης των μαλακοστράκων και ανήκει στην οικογένεια *Nephropidae*. Είναι ένα λεπτό δεκάποδο που φθάνει σε μέγεθος τα 25cm. Το κομμάτι του κεφαλοθώρακα καλύπτει ένα καβούκι και το υπογάστριο είναι μακρύ και χωρισμένο σε τμήματα. Συναντάται σε βάθος από 20 έως 800 μέτρα με λασπώδη πυθμένες για να μπορεί να σκάβει λαγούμια για άμυνα σε κινδύνους και για θήρευση τροφής.

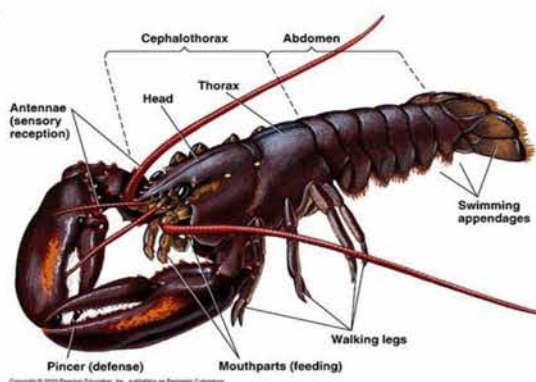
Απαντάται από το βορειο-ανατολικό Ατλαντικό Ωκεανό και τη Βόρεια Θάλασσα έως την Ισλανδία και τη Βόρεια Νορβηγία. Στη Μεσόγειο δεν είναι πολύ κοινή ενώ απουσιάζει από την Μαύρη και τη Βαλτική Θάλασσα. Λόγω των οικολογικών απαιτήσεων που την διακατέχει, η κατανομή της καραβίδας είναι αρκετά άνιση και χωρίζεται σε παραπάνω από 30 πληθυσμούς.

Η καραβίδα είναι δεσμευτής τροφής καθώς και θηρευτής που κάνει σύντομες εξορμήσεις για αναζήτηση τροφής κυρίως σε περιόδους με χαμηλό φωτισμό. Τρέφεται

συνήθως με ψάρια και σκουλήκια τα οποία μπορεί να συλλάβει με της δαγκάνες, τα πρόσθια πόδια της και τη βοήθεια των μασητικών υποποδίων (maxillipeds) που βρίσκονται στο πρόσθιο μέρος κάτω από τις δαγκάνες.

## Lobster Anatomy – a decapod crustacean

- Carapace
  - Covers cephalothorax
  - Chitin w/ calcium salts
- Antennae – 2 pair
  - sensory
- Mandibles – 1 pair
  - Bite/grind food
- Maxillae – 2 pair
  - feeding
- Maxillipeds – 3 pair
  - Chop food, pass to mouth



**Εικόνα 1:** Εμφανίζονται τα ζεύγη ποδιών και βοηθητικών τμημάτων μάσησης της караβίδας (slideplayer.com, Lobster anatomy, 2015)

Οι ενήλικες караβίδες προτιμούν να κατοικήσουν συνήθως σε λασπόδη ιζήματα με περισσότερο από 40 % ιλύς και αργίλου. Αποτελούν τους «καθαριστές» του οικοσυστήματος, ωστόσο είναι και αρπακτικά. Σε περιόδους με χαμηλό φωτισμό κάνουν μικρές αποστάσεις για αναζήτηση τροφής την οποία θηρεύουν με τα πρόσθια πόδια.

### 1.5.1 Παράσιτα και συμβιώτες στην караβίδα (*Nephrops norvegicus*)

Η караβίδα αποτελεί ιδανικό περιβάλλον στέγασης αρκετών παρασίτων καθώς και συμβιωτών. Πολλοί άμισχοι οργανισμοί προσκολλώνται στον εξωσκελετό της

καραβίδας συμπεριλαμβάνοντας το *Balanus crenatus* και το πρότιστο *Cyclogyra*, ωστόσο το είδος *Nephrops norvegicus* υποφέρει από τις λιγότερες μολύνσεις από άλλα καρκινοειδή δεκάποδα. Μια έρευνα του Simon Conway Morris που έγινε το 1995 στους οργανισμούς που συμβιώνουν στον κεφαλοθώρακα της караβίδας έδειξε πως το πιο συνήθης άτομο που συναντάται είναι το *Symbion pandora* και παρατηρήθηκε πως είναι το πρώτο μέλος ενός νέου φύλου, το φύλο *Cycliophora* (Obst et al, 2006).

Το πιο σημαντικό παράσιτο του συγκεκριμένου είδους караβίδας είναι ένα δινομαστιγωτό του γένους *Hematodinium* το οποίο μπορεί να είναι υπεύθυνο για επιδημίες λοιμώξεων. Άλλα παράσιτα που προσκολλώνται στην караβίδα είναι είδη *Pseudomonas* spp. και του *Enterobacter agglomerans* τα οποία έχουν δραστηριότητα στη χιτίνη και καταστρέφουν το κέλυφος καθώς και τα πρωτόζωα *Porospora nephropis*, τα τρηματώδη *Stichocotyle nephropis* και τέλος, οι πολύχαιτοι *Histriobdella homari* (Stentiford et al, 2011).

### 1.5.2 Χιτίνη

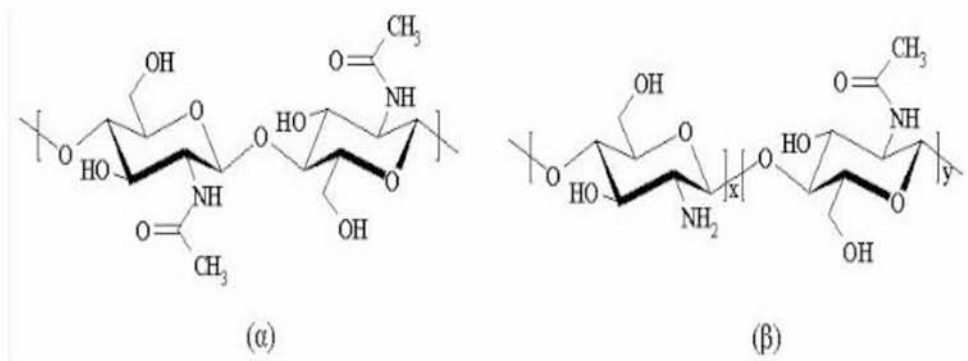
Η χιτίνη, είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης υψηλής σημασίας. Αποτελεί ένα βιοπολυμερές από ένα τεράστιο αριθμό ζωντανών οργανισμών και άφθονη κυτταρίνη. Συναντάται σε υψηλές διαταγμένες κρυσταλλικές μικροϊνώδεις δομές και είναι η κύρια δομική συνιστώσα των μυκήτων και του εξωσκελετού των αρθρόποδων. Ανάλογα με την πηγή της διακρίνεται σε δύο αλλομορφές την α και β, καθώς έχει αναφερθεί και μία τρίτη αλλομορφή η γ- χιτίνη. Η γ-χιτίνη πιθανόν να πρόκειται για διαφοροποίηση της α αλλομορφής. Στο υδάτινο οικοσύστημα απαντάται στα κωνικά σαλιγκάρια( cone nails), στο σκουλήκι βέλος (arrow worm) και στο φύκι *Phaeocystis*. Αποτελεί κατά κύριο λόγο πηγή πρωτεϊνών, ασβεστίου και πνιγμένων. (Κουτρουμάνης Κ. 2008). Στα αθρόποδα ο εξωσκελετός αποτελείται από ένα πολυφασικό βιολογικό σύνθετο υλικό



από οργανικές ουσίες (κρυσταλλική α-χιτίνη και διάφορους τύπους πρωτεϊνών) και μέταλλα (κυρίως ασβεστίτη). Η α-χιτίνη έχει παρατηρηθεί πως εμφανίζει κρυσταλλογραφική υφή και το μεγαλύτερο τμήμα της εμφανίζει προσανατολισμό παράλληλο με την επιφάνεια του εξωσκελετού. Όπως η κυτταρίνη, η χιτίνη βρίσκεται στον εξωσκελετό των αρθρόποδων και των εντόμων που φέρουν κέλυφος ως κρυσταλλικά ινίδια νανο-μεγέθους ενσωματωμένα σε μια μήτρα πρωτεΐνης. 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. Είναι το δεύτερο σε αφθονία βιολογικό μόριο μετά την κυτταρίνη και η βιοσύνθεσή της έχει υπολογιστεί στους  $10^9$  με  $10^{11}$  τόνους ετησίως (Robles et al., 2016).

Έχει αποδειχθεί πως η χιτίνη και η χιτοζάνη έχουν πολύ χαμηλή τοξικότητα και είναι βιοσυμβατές καθώς και βιοδιασπώμενες. Παρά την ομοιότητά της με την κυτταρίνη η χιτίνη παρουσιάζει χαμηλή διαλυτότητα. Αυτό συμβαίνει λόγω της υψηλής κρυσταλλικότητας που οφείλεται στους δεσμούς υδρογόνου της ακετάμιδο-ομάδας.

Ιστορικά αποτελεί την πρώτη απομόνωση πολυσακχαρίτη. Αργότερα ερευνήθηκε η δομή της ταυτιζόταν με δομές των εντόμων και φυτών και ονομάστηκε “χιτίνη”, από την ελληνική λέξη χιτώνας. Έπειτα ανακαλύφθηκε η χιτοζάνη η οποία είναι η ικανότητα της χιτίνης να γίνεται διαλυτή όταν θερμανθεί με συμπυκνωμένο διάλυμα καυστικού νατρίου. Οι πρώτες πληροφορίες για το μόριο της χιτίνης συμπεριλάμβαναν την παρουσία αζώτου στη χιτίνη. Αποδείχθηκε πως η χιτίνη αποτελείται από γλυκοζαμίνη και οξικό οξύ καθώς συνέβη και η ακριβής ταυτοποίηση της δομής της με περίθλαση ακτινών Χ. Το ενδιαφέρον για τη χιτίνη ήταν αυξημένο διότι αποτελεί ανεξάντλητη πηγή χιτιοζάνης, τον μοναδικό ψευδο-φυσικό κατιονικό πολυσακχαρίτη (Κουτρουμάνης Κ. 2008).

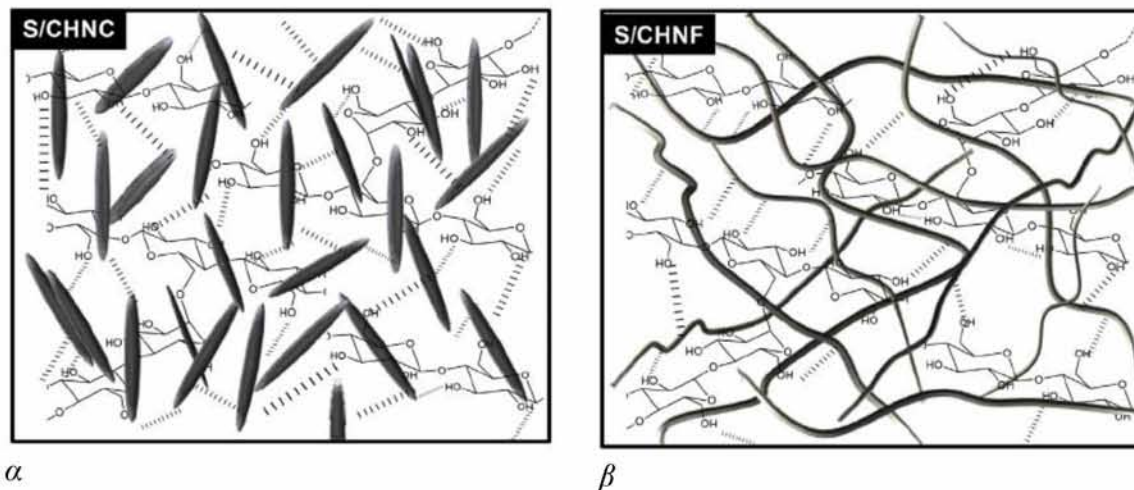


**Εικόνα 2:** Χημική δομή α) χιτίνης, β) χιτοζάνης. (Κουτρουμάνης Κ. 2008)

Ο εξωσκελετός των θαλασσινών αρθροπόδων είναι πλούσιος σε χιτίνη, από την οποία δημιουργείται η χιτοζάνη. Η μελέτη της χιτοζάνης έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, αλλά η μελέτη της χιτίνης δεν είναι τόσο αυξημένη αν σκεφτεί κανείς πως δεν είναι διαλυτή σε κοινούς διαλύτες. Η χιτίνη είναι το δεύτερο αφθονότερο βιοπολυμερές μετά την κυτταρίνη και ως εκ τούτου, οι πρόσφατες μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε άλλα στοιχεία χιτίνης ως προς τη βιοσυγγένεια, τη βιοδιασπασιμότητα και της διαθεσιμότητάς της. Μία από τις κυριότερες εφαρμογές είναι η απόκτηση πολυμερών νανοσωματιδίων για την ενίσχυση μητρών ή σύνθετων επιστρώσεων λόγω βιολογικής δραστηριότητας και την προστασία τους από ενζυματικούς παράγοντες (Salaberia, 2015).

Έχουν περιγραφεί διάφορες μορφολογίες από διαφορετικές διαδικασίες για την προετοιμασία κρυσταλλικών ινιδίων νανο- μεγέθους χιτίνης. Η απομόνωση αυτών των νανο-χιτινικών μορφών περιλαμβάνουν κυρίως: α) συνθήκες οξέος με αποτέλεσμα τους νανοκρυστάλλους χιτίνης (CHNC) και β) μηχανικές επεξεργασίες/ αποσύνθεση με αποτέλεσμα ινιδίων χιτίνης (CHNF). Τα χιτινικά αυτά ινίδια έχει βρεθεί πως αποτελούν θεμελιώδη ρόλο στη νανოსύνθεση υλικών σαν πληρωτικό υλικό λόγω της

χρησιμοποιήσιμης μορφής τους και των εγγενών ιδιοτήτων τους (M. Salaberia, 2015).



**Εικόνα 3:** α) μορφολογία των νανοκρυστάλλων χιτίνης, β) μορφολογία νανοφιλιμ χιτίνης. (M. Salaberia, 2015)

Η χιτίνη και το 6-O- καρβοξυλομέθυλο παράγωγο της ενεργοποιούν τα περιτοναϊκά μακροφάγα, αναστέλλουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων σε ποντίκια και ενεργοποιούν μηχανισμούς μη ειδικής άμυνας του οργανισμού σε μόλυνση από βακτήριο *E. coli*. Έχει αποδειχθεί η αντικαρκινική, αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή της δράση (Κουτρομάνης Κ. 2008).

#### 1.6 Σκοπός του πειράματος

Αναφορές σχετικά με την ανάπτυξη βιοϋμενίων στον χιτινοσκελετό της караβίδας εκλείπουν. Επομένως, σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η καλλιέργεια βιοϋμενίων σε κομμάτια χιτινοσκελετού караβίδας και η παρακολούθηση του ρυθμού ανάπτυξής τους και να κατανοήσουμε τις συνθήκες 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 σε κάθε δειγματοληψία.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Διήθηση νερού

Για την περάτωση του πειράματος χρησιμοποιήθηκε δείγμα νερού από τον Άναυρο Μαγνησίας. Δημιουργήθηκαν δύο ομάδες των πέντε σωλήνων τύπου falcon των 50 ml με διαφορετική διήθηση νερού για την παρατήρηση της αύξησης βιοϋμενίων σε διαφορετικές συνθήκες. Στην πρώτη ομάδα HD b (1,2,3,4,5) χρησιμοποιήθηκε νερό διήθημένο σε μεμβράνη πόρου 0,2 μm για την απομάκρυνση των μικροοργανισμών που είναι μεγαλύτερα από το συγκεκριμένο μέγεθος. Στην δεύτερη ομάδα HD c (1,2,3,4,5) χρησιμοποιήθηκε νερό διήθημένο σε μεμβράνη πόρου 0,8 μm για την απομάκρυνση των μικροοργανισμών που είναι μεγαλύτερα από το μέγεθος αυτό.

### 2.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Αρχικά αφαιρέθηκε ο κεφαλοθώρακας της караβίδας ο οποίος τεμαχίσθηκε σε μέρη μικρότερα τμήματα (διαστάσεων περίπου 1 cm) και εν συνεχεία έγινε έκπλυση. Για την έκπλυση χρησιμοποιήθηκαν δύο τρυβλία με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό όπου τοποθετήθηκαν τα κομμάτια караβίδας. Στο πρώτο έγινε μια πρώτη έκπλυση και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ένα δεύτερο για αποτελεσματικότερη έκπλυση. 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 7 κομμάτια κεφαλοθώρακα σε κάθε φιαλίδιο τύπου falcon της ομάδας HD b (μάρτυρας) καθώς και της ομάδας HD c (ομάδα ελέγχου χιτίνης).

Ακολούθησε η διαδικασία καλλιέργειας για 209 ημέρες μέσα στο διάστημα της οποίας τα φιαλίδια ανακινούνταν μία φορά την ημέρα μέχρι και τις 56 ημέρες και δύο φορές την ημέρα έπειτα.



**Εικόνα 4:** Ομάδα μάρτυρα καλλιέργειας βιοϋμενίου σε θαλασσινό νερό (HDb)



**Εικόνα 5:** Ομάδα καλλιέργειας βιοϋμενίου ελέγχου χιτίνης (HDc)

### 2.3 Διαδικασία

Σε χρόνο  $t_0$  απομονώθηκαν 2 κομμάτια από τα φιαλίδια HDb1, HDc1 για να γνωρίζουμε σε ποιά κατάσταση μικροοργανισμών είναι το δείγμα πριν την καλλιέργεια.

Η πρώτη δειγματοληψία έγινε την πέμπτη μέρα παραμονής του δείγματος στο θαλασσινό νερό. Αφαιρέθηκε ένα κομμάτι από την κάθε ομάδα (HDb1, HDc1) και τοποθετήθηκε σε μικρότερο φιαλίδιο με γλουταλδεΰδη 2,5%, για να γίνει η μονιμοποίηση. Μεταφέρθηκαν στο ψυγείο για τέσσερις ώρες και έπειτα έγινε η διαδικασία της αφυδάτωσης και της επιμετάλλωσης που είναι απαραίτητες για την παρατήρηση του δείγματος σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως και τη λήψη των απαραίτητων φωτογραφιών για τη διεξαγωγή της έρευνας.

Τελικά έλαβαν χώρα επτά δειγματοληψίες σε διάστημα 209 ημερών.

## 2.4 Αφυδάτωση

Για την αφυδάτωση χρησιμοποιήθηκε αλκοόλη 100% και αποστειρωμένο θαλασσινό 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% επί δυο φορές , και 100% επί τρεις φορές) .

## 2.5 Επιμετάλλωση

Η επιμετάλλωση των δειγμάτων είναι απαραίτητη για την παρατήρησή τους σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο για να αυξηθεί η αγωγιμότητά τους, για να αυξηθούν τα δευτερογενή ηλεκτρόνια που παράγονται αλλά και τα οπισσοσκεδαζόμενα, για να αυξηθεί η θερμική αντοχή τους και για να αυξηθεί η μηχανική αντοχή τους.

Αρχικά γίνεται επικόλληση των δειγμάτων σε ειδικές βάσεις stubs με αγωγή ταινία διπλής όψεως. Έπειτα τοποθετούνται στη συσκευή επιμετάλλωσης χρυσού (40 mA, 120 sec) με τη βοήθεια αέριου αργού.



**Εικόνα 6:** Συσκευή επιμετάλλωσης δειγμάτων (<http://sfa.univ-poitiers.fr/>).

## 2.6 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης Cambridge Stereo Scan 240. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης είναι ένα όργανο που λειτουργεί όπως ένα οπτικό μικροσκόπιο μόνο που αντί για δέσμη φωτός χρησιμοποιεί δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας, για να εξετάσει αντικείμενα σε λεπτομερή κλίμακα. Τα ηλεκτρόνια προσκρούουν στην επιφάνεια του δείγματος και μέσω της οπισθοσκέδασης προκύπτουν ακτίνες  $\chi$  και αντανάκλαση πρωτονίων και δευτερευόντων ηλεκτρονίων. Κατά τη διαδικασία αυτή προκύπτει η εικόνα του δείγματος (Εικόνα 7).

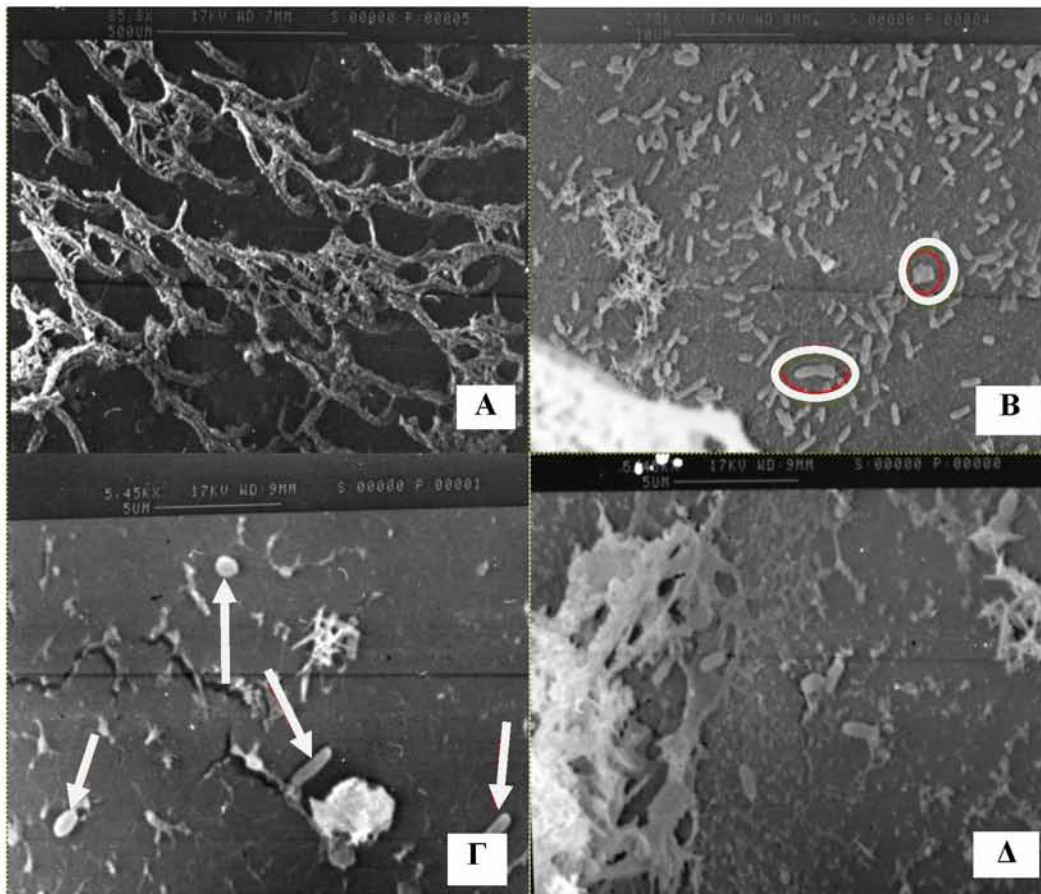


**Εικόνα 7:** Φαινόμενα αλληλεπίδρασης δέσμης- δείγματος  
(Θ.Λυμπεροπούλου, 2003)

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η πρώτη δειγματοληψία έγινε σε χρόνο  $t_0$  για να παρατηρηθεί η ποικιλότητα μικροοργανισμών πριν αρχίσει καλλιέργεια. Κατά την παρατήρηση εμφανίστηκαν κάποια ραβδόμορφα βακτήρια και λίγα σφαιρικού σχήματος (Εικόνα 8, Β). Πρέπει να τονισθεί πως σε χρόνο  $t_0$  τα βακτήρια σχημάτισαν κάποια μορφή αποικίας στην εξωτερική επιφάνεια (ΠΕ) του εξωσκελετού, ενώ στην εσωτερική (ΚΕ) ήταν λίγα και σκορπισμένα.

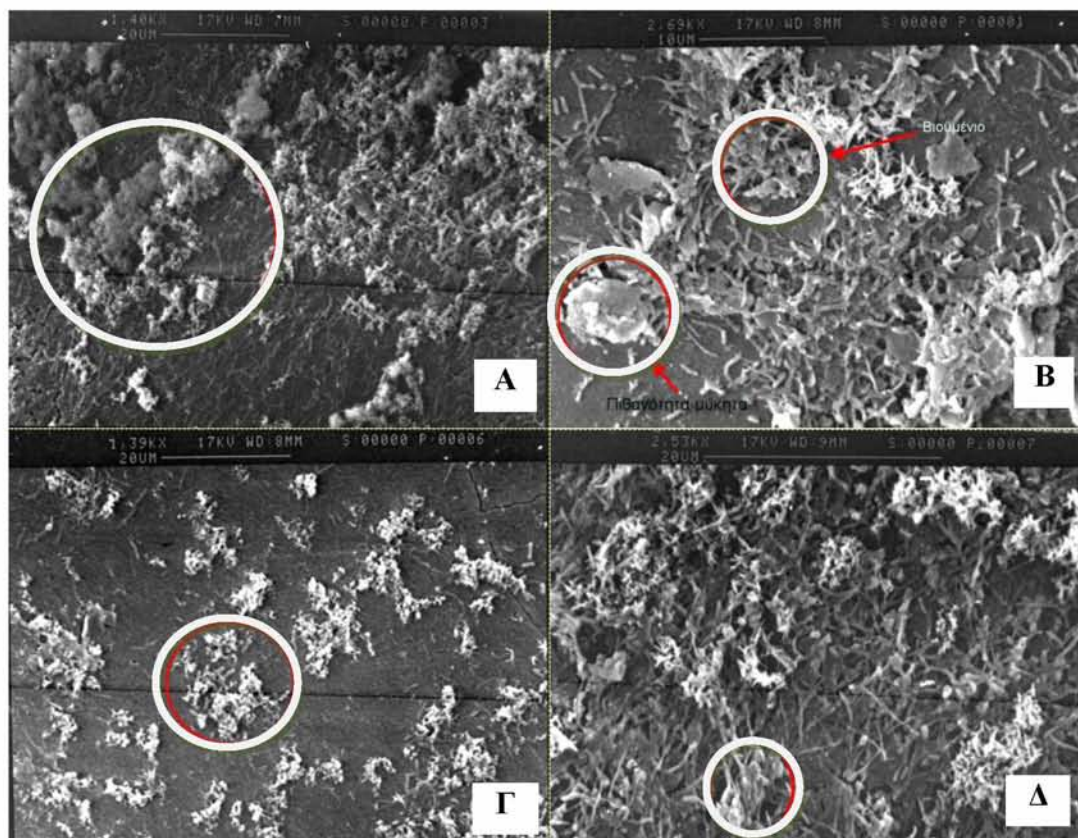




**Εικόνα 8:** Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως, πληθυσμός σε χρόνο t0. Και στα δυο δείγματα υπάρχουν λίγα βακτήρια σε κάθε επιφάνεια. Α) Τριχίδια εξωτερικού κελύφους καραβίδας, Διάταξη: HDt0ΠΕ1 κλίμακα μπάρας: 500μm, Β) Εξωτερική επιφάνεια χιτινοσκελετού, Διάταξη: HDt0ΠΕ2, Κλίμακα μπάρας: 10μm, Γ) Εσωτερική επιφάνεια χιτινοσκελετού, Διάταξη: HDt0ΚΕ1 , Κλίμακα μπάρας: 5μm, Δ) εσωτερική επιφάνεια χιτινοσκελετού, Διάταξη: HDt0ΚΕ2, Κλίμακα μπάρας: 5μm.

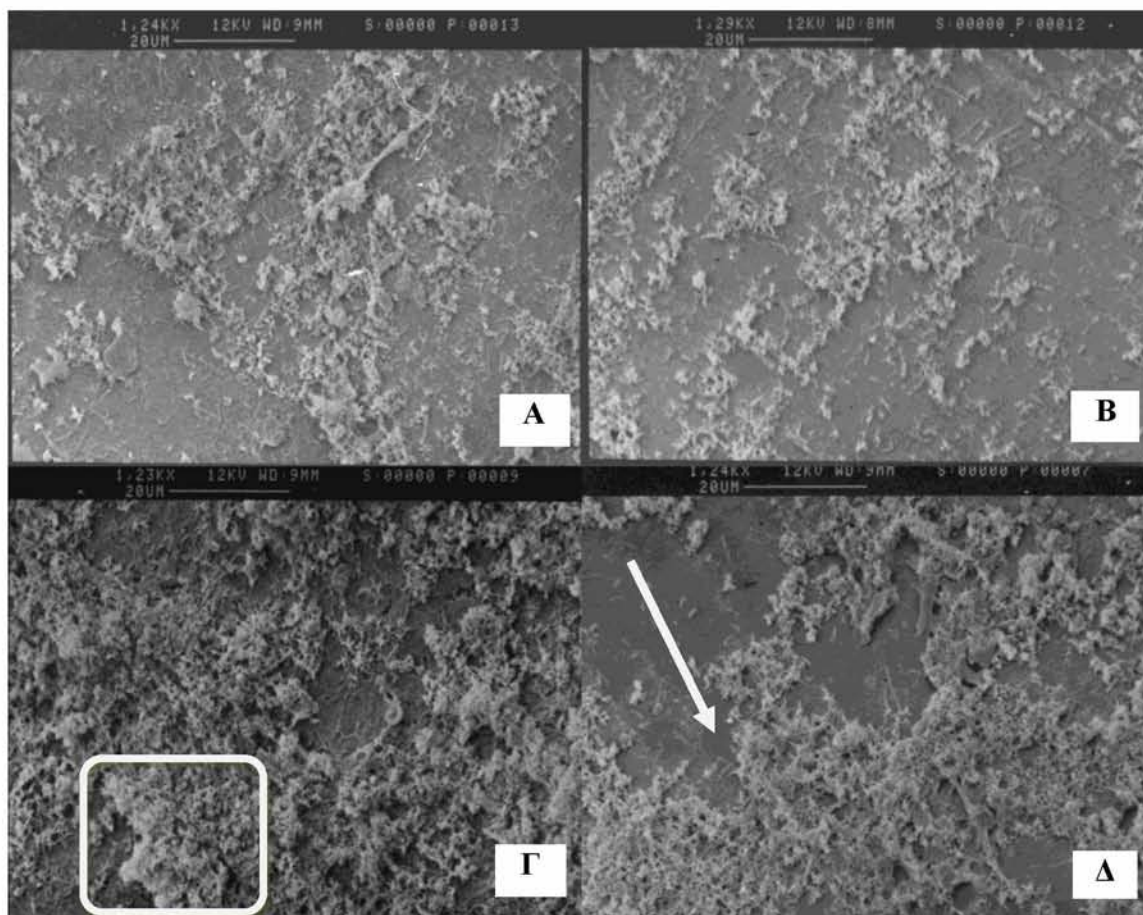
Η επόμενη δειγματοληψία συνέβη την 5<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας όπου παρατηρήθηκε μια μορφή αποικίας βιοϋμενίων κυρίως στην εξωτερική επιφάνεια του χιτινοσκελετού στο δείγμα του μάρτυρα (Εικόνα 8 Α) ενώ παρουσιάστηκε και πιθανότητα ύπαρξης μυκήτων (Εικόνα 9 Β). Στην εσωτερική επιφάνεια του κελύφους υπήρξε μικρότερη ανάπτυξη των βακτηρίων (Εικόνα 9 Α). Ενώ στο δείγμα ελέγχου χιτίνης υπήρξε μικρότερη ανάπτυξη βακτηρίων στην εξωτερική

επιφάνεια από ότι στην εσωτερική, όμως σημειώθηκε υποψία ανάπτυξης βιοϋμενίου (Εικόνα 9 Γ,Δ).



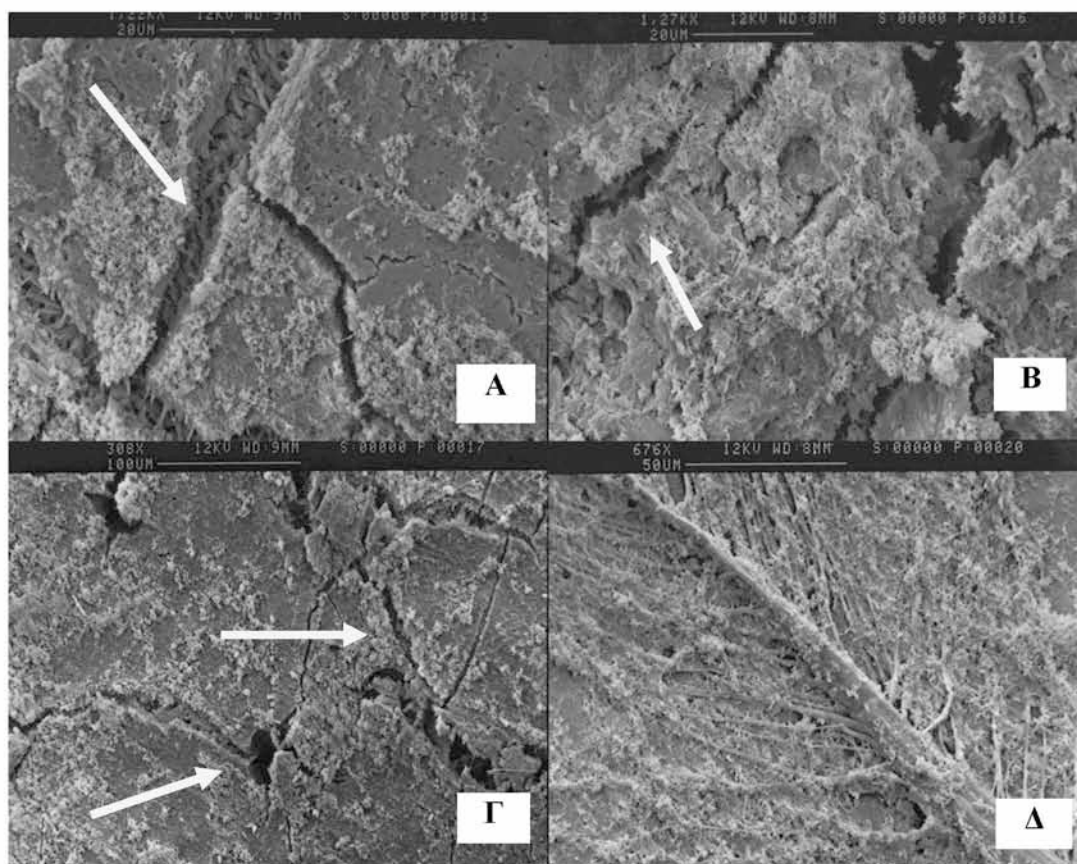
**Εικόνα 9:** Παρατήρηση Βακτηρίων στις 5 ημέρες καλλιέργειας. Α) Διάταξη: HDb1KE1, Κλίμακα μπάρας: 20μm, Β) Διάταξη: HDb1ΠΕ2, Κλίμακα μπάρας: 10μm, Γ) Διάταξη: HDc1KE1, Κλίμακα μπάρας: 20μm, Δ) Διάταξη: HDc1ΠΕ2, Κλίμακα μπάρας: 20μm.

Στις 12 ημέρες έγινε η τρίτη δειγματοληψία στην οποία δεν υπήρξε ακόμα μεγάλη διαφορά. Παρατηρήθηκε ανάπτυξη βακτηριδίων και στα δείγματα ελέγχου χιτίνης και στο μάρτυρα, καθώς είχαμε και την πρώτη παρατήρηση βιοϋμενίου στην εξωτερική επιφάνεια χιτινοσκελετού στο δείγμα HDc2 (Εικόνα 10 Γ, Δ).



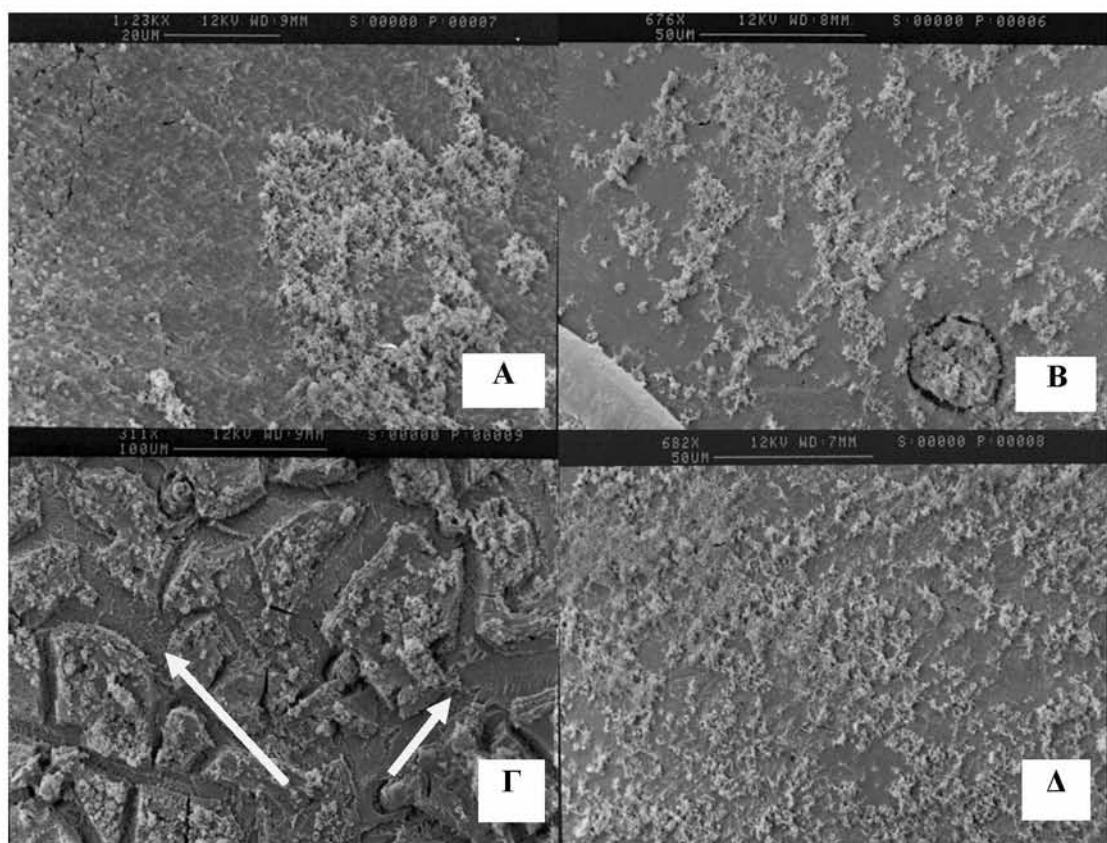
**Εικόνα 10:** Παρατήρηση δειγμάτων στις 12ημέρες καλλιέργειας. Α) Διάταξη: HDb2KE1, Κλίμακα μπάρας: 20μm, Β) Διάταξη: HDb2ΠΕ2, Κλίμακα μπάρας: 20μm, Γ) Διάταξη: HDc2ΠΕ1, Κλίμακα μπάρας: 20μm, Δ) Διάταξη: HDc2KE1, Κλίμακα μπάρας: 20μm.

Η τέταρτη δειγματοληψία συνέβη στις 21 ημέρες καλλιέργειας όπου και παρατηρήθηκαν οι πρώτες έντονες διαφορές. Το δείγμα της ομάδας του μάρτυρα έδειξε μικρότερη ανάπτυξη σε σχέση με το δείγμα της ομάδας ελέγχου χιτίνης. Επίσης παρατηρήθηκε ότι στην εξωτερική επιφάνεια όλων των δειγμάτων η ανάπτυξη συμβαίνει ταχύτερα σε σχέση με την εσωτερική επιφάνεια του σκελετού. Σημειώνεται πως στις 21 ημέρες ανάπτυξης έχουν πλέον εμφανιστεί βιοϋμένια σε όλα τα δείγματα. Επίσης παρατηρήθηκαν αυλακώσεις στην επιφάνεια του χιτινισκελετού που δίνει την υποψία πως τα βιοϋμένια τρέφονται με τη χιτίνη του σκελετού.



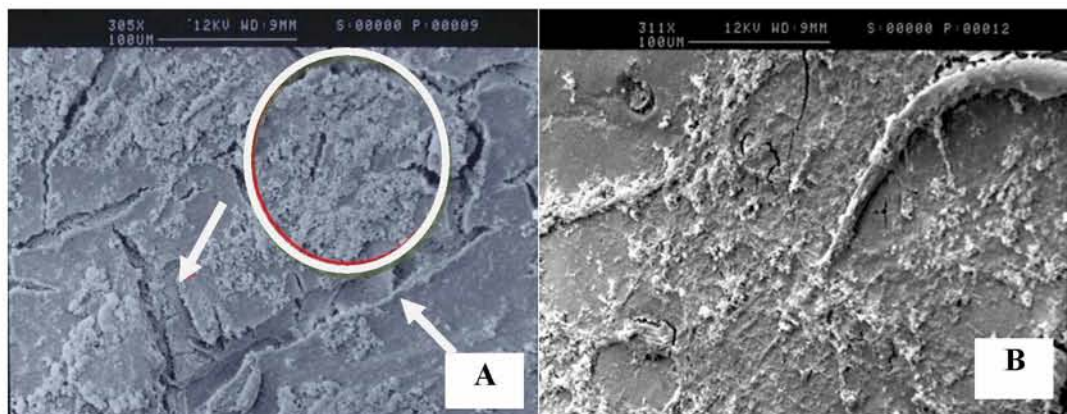
**Εικόνα 11:** Παρατήρηση δειγμάτων στις 21 ημέρες καλλιέργειας. Α) Διάταξη: HDc3KE1, Κλίμακα μπάρας: 20 μm. Β) Διάταξη: HDc3ΠΕ1, Κλίμακα μπάρας: 20μm. Γ) Διάταξη: HDb3KE1, Κλίμακα μπάρας:100 μm. Δ) Διάταξη: HDb3ΠΕ1, Κλίμακα μπάρας: 50μm.

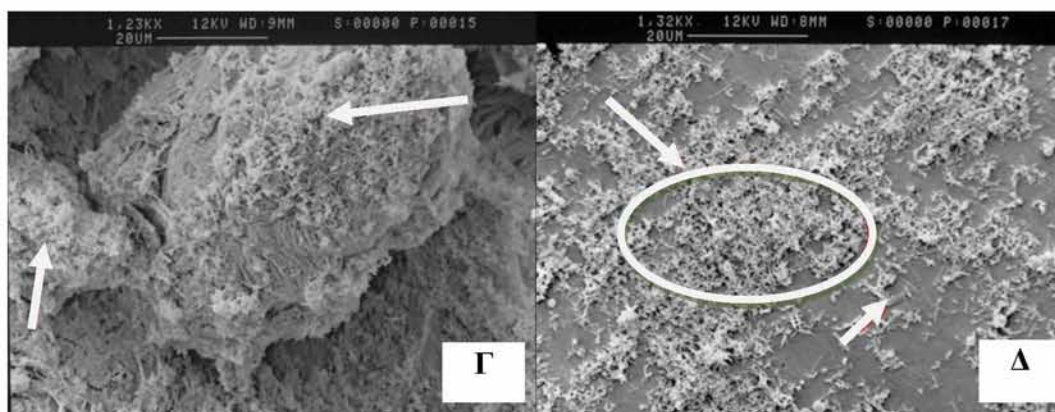
Η τέταρτη δειγματοληψία συνέβη στις 30 ημέρες καλλιέργειας, στην οποία παρατηρήθηκε αρχικά πως η ανάπτυξη των βιοϋμενίων στα δείγματα του μάρτυρα η ανάπτυξη ήταν πολύ πιο αργή σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου χιτίνης. Επίσης παρατηρήθηκε πως στα δείγματα μάρτυρα τα αυλάκια που είχαμε παρατηρήσει δεν οφείλονται στη χιτίνη ενώ στα δείγματα ελέγχου χιτίνης υπάρχει ακόμα η πιθανότητα να σχηματίζονται αυλάκια λόγω χιτίνης καθώς η ανάπτυξη είναι αρκετά αυξημένη και εμφανίζεται έντονη επίστρωση βιοϋμενίων (Εικόνα 12 Γ, Δ).



**Εικόνα 12:** Παρατήρηση καλλιέργειας στις 30 ημέρες. Α) Διάταξη: HDb4KE1, Κλίμακα μπάρας: 20 μm., Β) Διάταξη: HDb4PE1 , Κλίμακα μπάρας: 50μm, Γ) Διάταξη: HDc4KE1 , Κλίμακα μπάρας: 100μm, Δ) Διάταξη: HDc4PE1 , Κλίμακα μπάρας: 50μm.

Στις 42 ημέρες έγινε και η πέμπτη δειγματοληψία όπου δεν υπήρχε σημαντική διαφορά σε καμία από τις δυο ομάδες δειγμάτων, παρ' όλα αυτά υπήρχε ανάπτυξη.

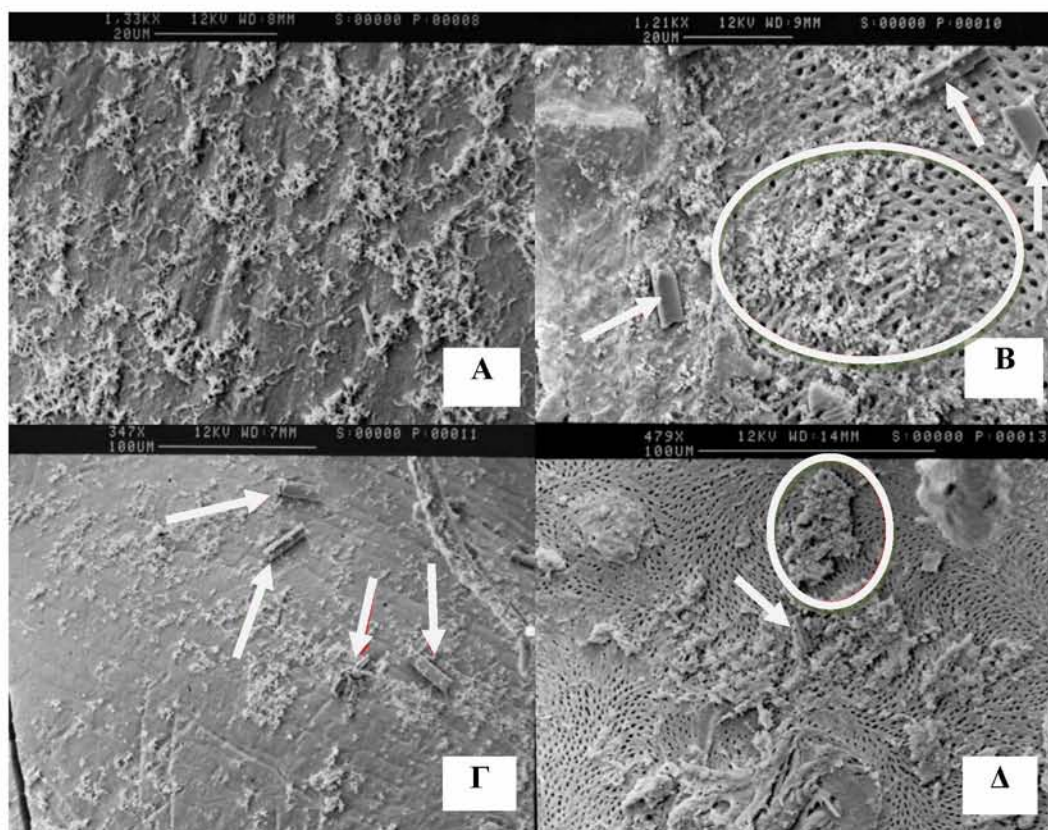




**Εικόνα 13:** Παρατήρηση καλλιέργειας στις 42 ημέρες. Α) Διάταξη: HDb5KE1, Κλίμακα μπάρας: 100 μm., Β) Διάταξη: HDb5ΠΕ1 , Κλίμακα μπάρας: 100μm, Γ) Διάταξη: HDc5KE1 , Κλίμακα μπάρας: 20μm, Δ) Διάταξη: HDc5ΠΕ1 , Κλίμακα μπάρας: 20μm.

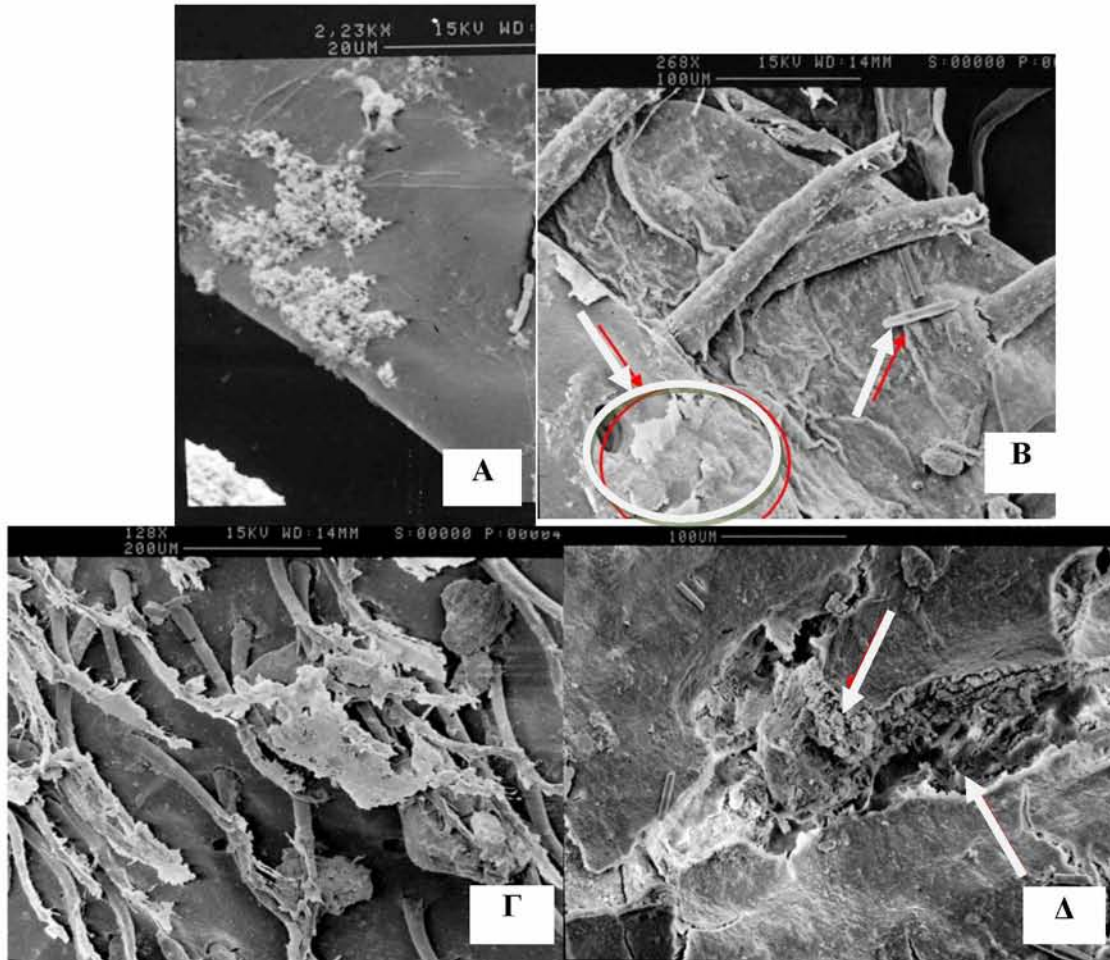
Αξίζει να σημειωθεί ότι στο σημείο αυτό (56 ημέρες) το νερό στα δείγματα C κιτρίνισε και έγινε έλεγχος σαλμονέλας η οποία ήταν αρνητική και αλλαγή νερού στα φιαλίδια διότι παρατηρήθηκε κίτρινο χρώμα και θολερότητα. Υπάρχει πιθανότητα να μειώθηκε η ανάπτυξη λόγω της αλλοίωσης νερού (υποξικές συνθήκες). Επίσης μετά την αλλαγή νερού η ανάπτυξη συνεχίστηκε στη μισή ποσότητα νερού στα φιαλίδια.

Έπειτα έγινε η έκτη δειγματοληψία όπου παρατηρήθηκε έντονη αύξηση των βιοϋμενίων καθώς και κάποιες κρυσταλλικές δομές. Επιπλέον έγινε πιο έντονη αλλοίωση της χιτίνης καθώς παρατηρήθηκαν τρύπες στην επιφάνεια επιφάνεια- πλέγμα.



**Εικόνα 14:** Παρατήρηση καλλιέργειας στις 56 ημέρες. Α) Διάταξη: HDb1ΠE1, Κλίμακα μπάρας: 20 μm., Β) Διάταξη: HDb1KE1 , Κλίμακα μπάρας: 20μm, Γ) Διάταξη: HDc1ΠE1 , Κλίμακα μπάρας: 100μm, Δ) Διάταξη: HDc1KE1 , Κλίμακα μπάρας: 20μm.

Η τελευταία δειγματοληψία συνέβη στις 209 ημέρες καλλιέργειας όπου είχαμε τα τελικά αποτελέσματα της καλλιέργειας με πολλά βιοϋμένια και πλήρη κάλυψη των επιφανειών. Αξίζει να σημειωθεί πως η τελευταία παρατήρηση ήταν ιδιαίτερα δύσκολη διότι τα δείγματα έχουν γίνει πολύ λεπτά για επεξεργασία και αυτό οφείλεται στην αλλοίωση της χιτίνης.



**Εικόνα 15:** Παρατήρηση καλλιέργειας στις 209 ημέρες. Α) Διάταξη: HDb3 KE1, Κλίμακα μπάρας: 20 μm, Β) Διάταξη: HDb3ΠΕ1, Κλίμακα μπάρας: 100 μm, Γ) Διάταξη: HDc5ΠΕ1, Κλίμακα μπάρας: 200 μm, Δ) Διάταξη: HDc1KE1, Κλίμακα μπάρας: 100 μm.

Τελικά έγιναν επτά δειγματοληψίες σε διάστημα 209 ημερών και η ανάπτυξη ήταν έντονη ιδίως στην ομάδα δειγμάτων HDc πιθανώς λόγω της δραστηριότητας των βακτηρίων στη χιτίνη. Τη χρονική στιγμή των 56 ημερών παρατηρήθηκε αλλοίωση του νερού στα φιαλίδια της ομάδας c, έγινε έλεγχος σαλμονέλας ο οποίος βγήκε αρνητικός και τελικά παρατηρήθηκε πως η αλλοίωση συνέβη λόγω της κακής ανακίνησης των φιαλιδίων. Οπότε το πείραμα συνεχίστηκε με ανακίνηση των



δειγμάτων δύο φορές τη μέρα.

**Πίνακας 1 :** Παρουσίαση αποτελεσμάτων καλλιέργειας

<b>Ημέρα πειράματος</b>	<b>HDb</b>	<b>HDc</b>
T0	Λίγα διάσπαρτα βακτηρίων	Λίγα διάσπαρτα βακτηρίων
5	Αύξηση πληθυσμού βακτηρίων	Αύξηση πληθυσμού βακτηρίων
12	Πρώτα δείγματα Βιοϋμενίου	Πρώτα δείγματα Βιοϋμενίου
21	Βιοϋμένιο	Βιοϋμένιο- Αυλακώσεις επιφάνειας
30	Βιοϋμένιο	Βιοϋμένιο- αυλακώσεις επιφάνειας
42	Τριασδιάστατη αύξηση βιοϋμενίου	Τριασδιάστατη Αύξηση βιοϋμενίου
56	Αύξηση βιοϋμενίου- Έντονη αυλάκωση χιτίνης.	Αύξηση βιοϋμενίου- Έντονη αυλάκωση χιτίνης
209	Πλήρη κάλυψη από Βιοϋμένια	Πλήρη κάλυψη από Βιοϋμένια

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές σε σχέση με την ανάπτυξη βιοϋμενίων σε κεφαλοθώρακα караβίδας, ωστόσο έχουν ερευνηθεί αρκετά από τα παράσιτα και τους συμβιώτες του είδους, τόσο στον κεφαλοθώρακα όσο και σε άλλα σημεία όπως οι στοματικοί θύλακες, η ουρά και άλλα. Στην συγκεκριμένη έρευνα διαπιστώθηκε πως υπήρξε αύξηση βιοϋμενίων και στις δύο ομάδες δειγμάτων. Όμως η ομάδα HD c παρουσίασε μεγαλύτερη αύξηση βιοϋμενίων και αυτό μας προϊδεάζει ότι ο χιτινοσκελετός караβίδας αποτελεί ιδανικό τόπο προσκόλλησης βακτηρίων.

Στο πολύπλοκο και ετερογενή υδάτινο οικοσύστημα υπάρχουν πολλοί αποικοδομητές όπως τα βακτήρια, οι μύκητες του γένους *Lindra* και *Lulworthia*, τα πρωτόζωα, τα θαλάσσια σκουλήκια, τα νηματώδη, οι αμοιβάδες και κάποια αρθρόποδα. Ο ρόλος τους είναι η ανακύκλωση αποβλήτων η οποία είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη διατήρηση της ισορροπίας στο περιβάλλον. Αυτό συμβαίνει είτε με την ανακύκλωση των περιττωμάτων και των υπολειμμάτων τροφής, είτε με την κατάποση άλλων μικροοργανισμών η οποία είναι η αρχική οδός για τη μεταφορά ζώσας ύλης στη θαλάσσια τροφική αλυσίδα (<https://www.reference.com/science/list-decomposers-ocean-5411a852dfa0d650>).

Η χιτίνη, είναι ένας πολυμερές υδατάνθρακας που αποτελείται από εναλλασσόμενα β-1,4-συνδεδεμένα υπολείμματα N-ακετυλογλυκοζαμίνης και είναι δεύτερη σε αφθονία οργανική ένωση στη φύση. Μόνο στην υδάτινη βιόσφαιρα, εκτιμάται ότι περισσότεροι από 1011 τόνους χιτίνη παράγονται σε ετήσια βάση. Εάν αυτή η τεράστια ποσότητα αδιάλυτου άνθρακα και αζώτου δεν μετατρέποταν 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. Αλλά η συνολική διαδικασία περιλαμβάνει πολλά βήματα, τα περισσότερα από τα οποία μένουν ακόμα αδιευκρίνιστα. Τα θαλάσσια βακτήρια έχουν πολύπλοκα συστήματα μεταγωγής σήματος για: την εξεύρεση χιτίνης, την τήρηση chitinaceous υποστρώματος, την υποβάθμιση της χιτίνης σε ολιγοσακχαρίτες, τη μεταφορά των ολιγοσακχαριτών στο κυτταρόπλασμα, και για να καταβολίζουν τα προϊόντα μεταφοράς σε φρουκτόζη-6-P, οξικό και NH<sub>3</sub>. Οι πρωτεΐνες και τα ένζυμα βρίσκονται εξωκυτταρικά στο φάκελο κύτταρο, το περιπλασματικό χώρο, το εσωτερικό της μεμβράνης και το κυτταρόπλασμα. Εκτός από αυτά τα επίπεδα πολυπλοκότητας, τα

διάφορα συστατικά αυτών των συστημάτων εμφανίζονται να συντονίζονται προσεκτικά από περίπλοκους ρυθμιστικούς μηχανισμούς (Keyhani N., 1999).

Έχουν σημειωθεί σημαντικές έρευνες για τον καταβολισμό χιτίνης από το βακτήριο *Vibrio furnissii*. Ο καταβολισμός χιτίνης περιλαμβάνει πολύπλοκα συστήματα μεταφοράς και πολλές πρωτεΐνες. Δύο από αυτά τα συστήματα είναι το περιπλασμικό και η μετατροπή του ολιγοσακχαρίτη της χιτίνης σε GlcNAc και (GlcNAc)<sub>2</sub>. Το θαλάσσιο βακτήριο *Vibrio furnissii* μπορεί να χρησιμοποιήσει τη χιτίνη ως πηγή άνθρακα και αζώτου. Τα κύτταρα καταβολίζουν ταχέως τα GlcNAc και των διαλυτών ολιγοσακχαρίτων χιτίνης. Επίσης το ποσοστό απορρόφησης GlcNAc είναι συγκρίσιμη με τον βέλτιστο ρυθμό καταβολισμού γλυκόζης από το *Escherichia coli* (Carolyn L., 1996).

Το 1939 αναφέρθηκε η παρατήρηση κλειδί για τον καταβολισμό χιτίνης. Το αδιάλυτο πολυμερές μετατράπηκε σε μονομερές GlcNAc, με δύο ένζυμα, την χιτινάση (Polysaccharidase) και την δισακχαριδάση ένα *b*-Nacetylglucosaminidase ή chitobiase. Επιπλέον, πρόσφατες αναφορές περιγράφουν παρόμοια ένζυμα σε ανώτερα ζώα. Αν και οι ακριβείς ιδιαιτερότητες και οι λειτουργίες τους μένει να καθοριστούν, διάφορα ένζυμα είναι ικανά να διασπούν ολιγοσακχαρίτες χιτίνης. Χαρακτηριστικά έχουν αναφερθεί σε ανθρώπινο πλάσμα, αρθρικά χονδροκύτταρα και αρθρικά κύτταρα. Όπως σημειώνεται σε αναφορές πολλά από τα δομικά γονίδια που κωδικοποιούν τα συγκεκριμένα ένζυμα έχουν κλωνοποιηθεί και έχει γίνει γνωστή η αλληλουχία τους. Σύμφωνα με τη μέχρι τώρα έρευνα η απόδοση της χιτινάσης (GlcNAc)<sub>2</sub> είναι το κύριο προϊόν της υδρόλυσης χιτίνης, αν και υψηλότερα ολιγομερή βρίσκονται ενίοτε ενδιάμεσα στη διαδικασία (Keyhani N., 1996)

Το 1995 έγινε μια σημαντική αναφορά για τους εποικιστές της караβίδας και συγκεκριμένα του είδους *Nephrops norvegicus* στην οποία παρατηρήθηκε για πρώτη

φορά τον εξωσυμβιώτη *Symbion pandora* και χαρακτηρίστηκε ως το πρώτο μέλος ενός νέου φύλου, του φύλου *Cycliophora* (Obst et al, 2005). Το *Symbion pandora* είναι ένας εξωσυμβιώτης που εποικεί στο στοματικό τμήμα των караβίδων και άλλων δεκάποδων. Το φύλλο *Cycliophora* αποτελεί μια ομάδα μικροσκοπικών θαλάσσιων μεταζώων με αβέβαιες φυλλογεννητικές συγγένειες. Σε έρευνα με καλλιέργεια του συγκεκριμένου είδους σε караβίδες παρατηρήθηκε πως δεν υπήρχε ανάπτυξη σε άτομα με μήκος κελύφους μικρότερο από 35 mm και αυτό μπορεί να συμβαίνει διότι η περίοδος συμβίωσης σε αυτού του μήκους την επιφάνεια είναι πολύ μικρή για να αναπαραχθούν (Obst et al, 2005).

Στην περιοχή της Σκωτίας υπάρχει ιστορικό προσβολών του είδους *Nephrops norvegicus* από τα παράσιτα *Balanus crenatus*. Η αύξηση των επικοιστών του συγκεκριμένου είδους ήταν μεγαλύτερη σε μεγαλύτερα ζώα. Αν και η παρουσία τους δεν αποτελεί άμεσο κίνδυνο για την караβίδα σπανίως έχουν αναφερθεί προσβολή στις τρίχες και διατάραξη από παθογόνα και περιβαλλοντικές διαταραχές (Stentiford, 2011). Μία επιπλέον μελέτη που διεξήχθη στην Ιρλανδική θάλασσα οδήγησε στη ανακάλυψη του επιβιώτη *Foraminiferans* του γένους *Cyclogyra* στα πλεοπόδια αρσενικών караβίδων. Η συγκεκριμένη έρευνα παρατήρησε πως δεν υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές για τα παράσιτα που συμβιώνουν στον οργανισμό αυτό, όμως κατά καιρούς έχουν παρατηρηθεί διάφοροι οργανισμοί (συμπεριλαμβανομένων και των πολύχαιτων και των μαλάκιων) στο είδος *N. norvegicus* συγκεκριμένα σε σχέση με άλλα αρθρόποδα καρκινοειδή (Balasundaram C., 2000).

Άλλες έρευνες που έχουν διεκπεραιωθεί σχετικά με την παρασιτολογία και τις νόσους των οστρακοειδών έχουν υποδείξει πως στο κέλυφος μπορούν να συμβιώσουν άτομα του είδους *Pseudomonas* spp. και του *Enterobacter agglomerans* τα οποία έχουν δραστηριότητα στη χιτίνη και καταστρέφουν το κέλυφος (Stentiford, 2011).

Σε ορισμένες έρευνες έχει παρατηρηθεί μία αντιμυκητική δράση των νανοκρυστάλλων της χιτίνης (Salaberria A, 2016). Όμως στη συγκεκριμένη έρευνα είχαμε πιθανότητα εμφάνισης μυκήτων στην τρίτη δειγματοληψία.

Πρόσφατα έγιναν έρευνες σχετικά με την αντιμυκητιακή δράση των νανοϊνιδίων χιτίνης (Salaberria A, 2016). Έχει αποδειχθεί πως με τη δημιουργία σύνθετων νανοκρυστάλλων χιτίνης και κυτταρίνης παρέχονται καλές αντιμυκητιακές ιδιότητες.

Το τελευταίο χρονικό διάστημα υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για τις χρήσεις της χιτίνης και στα τρόφιμα, καθώς έχουν γίνει έρευνες για τη χρησιμότητά της στη συσκευασία τροφίμων. Έχουν γίνει πειράματα με μήτρες νανοκρυστάλλων χιτίνης καθώς και νανοφίλμ χιτίνης ως μέλος μεμβράνης στη συσκευασία τροφίμων και σε αντίθεση με τα θερμοπλαστικά φιλμ αμύλου έδειξαν να έχουν περισσότερες ιδιότητες που προφυλάσσουν το τρόφιμο (A.M. Salaberria, 2014).

Η χιτίνη μπορεί να μετασχηματισθεί και να χρησιμοποιηθεί ως ίνες, φιλμ, σφουγγάρι ή σκόνη. Έχει διαπιστωθεί πως έχει αντιβακτηριακές και μυκητοστατικές ιδιότητες και διακατέχει ιδιότητες πύκνωσης. Γι' αυτό το λόγο συζητείται αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συστατικό σε διάφορα φαρμακευτικά προϊόντα όπως το σαπούνι μαλλιών, σπρέι μαλλιών, βαφές μαλλιών και βερνίκια. Συγκεκριμένα για τις τρίχες έχει ερευνηθεί πως προσφέρει ιδιότητες όπως το να κρατάει σταθερή την υγρασία του κεφαλιού και να τα κάνει πιο απαλά (M. Rinaudo, 2006)

Σε μια έρευνα που έγινε το 2012 για την χρησιμότητα της χιτίνης διαπιστώθηκε πως η διασπορά νανοϊνιδίων χιτίνης σε ένα οικοσύστημα συμβάλλει στην υγεία του οικοσυστήματος αυτού και αποτελεί έναν επιπλέον ανανεώσιμο πόρο. Ερευνήθηκαν οι ιδιότητες απορροφητικότητας της χιτίνης, η βιοαποικοδομισιμότητα και η ανανεωσιμότητά της, καθώς και η μη τοξικότητα και η εύκολη τροποποίησή της. Η έρευνα εμφάνισε ένα αρκετά σημαντικό πλεονέκτημα των νανοϊνιδίων χιτίνης, την

ιδιότητα τους να αλληλεπιδρούν αποτελεσματικά με τα κύτταρα, τις πρωτεΐνες και άλλες ενώσεις. Τα ινίδια χιτίνης έχουν μια επιφάνεια αντίδρασης καλυμμένη με υδροξυλικές ομάδες δίνοντας τη δυνατότητα της χημικής τροποποίησης. Αυτό δίνει την ευκαιρία για περαιτέρω έρευνες σχετικά με τη χρήση της χιτίνης ως βιώσιμο υλικό για βιοϊατρικά ζητήματα, στη βιομηχανία καλλυντικών καθώς και για την παραγωγή βιοαισθητήρων (Mincea, 2012).

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα έρευνα έγινε καλλιέργεια βιοϋμενίων σε κεφαλοθώρακα караβίδας του είδους *N. norvegicus* σε θαλασσινό νερό. Συμπερασματικά αποδείχθηκε πως το τμήμα του κεφαλοθώρακα συγκεκριμένα αποτελεί αρκετά προσοδοφόρα επιφάνεια για τα βακτήρια που μπορούν να προσκολληθούν έστω και προσωρινά σε αυτή. Τα πρώτα βιοϋμένια σχηματίστηκαν από την 12<sup>η</sup> κιόλας ημέρα καλλιέργειας τόσο στην επάνω όσο και την κάτω επιφάνεια του τμήματος κεφαλοθώρακα. Ταχύτερα ήταν τα αποτελέσματα στην ομάδα HD c και αυτό μας προϊδεάζει στο γεγονός πως τα βακτήρια θρέφονται από τη χιτίνη. Η χιτίνη είναι η ουσία που από την οποία αποτελείται ο εξωσκελετός της караβίδας και περιέχει αρκετά θρεπτικά συστατικά ώστε να θρέψει έναν οργανισμό. Συμπεραίνουμε λοιπόν πως τα βακτήρια που σχημάτισαν τα βιοϋμένια τόσο στην πάνω όσο και στην κάτω επιφάνεια του τμήματος κεφαλοθώρακα θρεφόταν από αυτή και έτσι συνεχίστηκε η ανάπτυξή τους.

Κατά την παρατήρηση των δειγμάτων με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως παρατηρήθηκε όλη η διαδικασία της ανάπτυξης των βιοϋμενίων και η αλλοίωση της χιτίνης στον κεφαλοθώρακα καθώς πιθανώς εμφανίστηκαν και δείγματα μυκήτων.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Balasundaram C. et al., Decapod crustacean chelipeds: An overview, Journal of Biosciences, 2000
- Bassler Bonnie L., et al., Chitin Utilization by Marine Bacteria, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc, 1991
- Bengtsson Mia M. et al., Seasonal dynamics of bacterial biofilms on the kelp *Laminaria hyperborea*, Inter-Research 2010
- Benton Anne G., CHITINOVOROUS BACTERIAL A PRELIMINARY SURVEY, Vassar College, Poughkeepsie, N. Y., 1934.
- Bouma Carolyn L., et al., Sugar Transport by the Marine Chitinolytic Bacterium *Vibrio furnissii*, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc., 1996
- Branda Steven S., Biofilms: the matrix revisited, Elsevier Ltd., 2004
- Donlan Rodney M.\*, Biofilms: Microbial Life on Surfaces, Emerging Infectious Diseases, 2002
- Dunne W. Michael, Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?, American Society for Microbiology, 2002
- Funch P. et al., Cycliophora is a new phylum with affinities to Entoprocta and Ectoprocta, NATURE Vol 378, 1995
- Huq Anwar et al., Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission, Elsevier Ltd., 2008
- Johnson Mark P. et al., Habitat and Ecology of *Nephrops norvegicus*, Elsevier Ltd., 2013
- Keyhani Nemat O., et al., Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria,

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects (Volume 1473, Issue 1, Pages 108–122), 1999.

- Keyhani Nemat O. and Roseman Saul, Nemat O. Keyhani‡ and Saul Roseman, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc, 1996
- Kormas K. et al., Gut bacteria associated with different diets in reared *Nephrops norvegicus*, Elsevier GmbH, 2012.
- Kormas K. et al., Comparison of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) gut bacterial communities using 16S rDNA clone libraries and pyrosequencing, Elsevier Ltd., 2013
- Lee Jin-Woo et al., Bacterial Communities in the Initial Stage of Marine Biofilm Formation on Artificial Surfaces, The Microbiological Society of Korea, 2008
- MacKenzie K. et al., Parasites as Indicators of Water Quality and the Potential Use of Helminth Transmission in Marine Pollution Studies, Academic Press Limited, 1995
- Martin Wahl, et al., The Second Skin: Ecological Role of Epibiotic Biofilms on Marine Organisms, Front Microbiol, 2012
- Meziti Alexandra et al., Gut bacteria associated with different diets in reared *Nephrops norvegicus*, Elsevier GmbH, 2012
- Mincea M. et al., PREPARATION, MODIFICATION, AND APPLICATIONS OF CHITIN NANOWHISKERS: A REVIEW, Advanced Study Center Co. Ltd., 2012
- Obst Matthias et al., The microhabitat of Symbion pandora (Cycliophora) on the mouthparts of its host *Nephrops norvegicus* (Decapoda: Nephropidae), Springer-Verlag, 2005
- Raabe D. et al., The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material, Elsevier Ltd., 2005
- Radwan S.S. et al., Bioremediation of oily sea water by bacteria immobilized in biofilms



coating macroalgae, Elsevier Science Ltd., 2002

- Ridgway I.D. et al., Journal of Invertebrate Pathology, Elsevier Inc., 2008
- Rinaudo Marguerite, Chitin and chitosan: Properties and applications, Elsevier Ltd., 2006
- Sachs C. et al., Influence of microstructure on deformation anisotropy of mineralized cuticle from the lobster *Homarus americanus*, Elsevier Inc., 2007
- Salaberria Asier Martinez, et al., Role of chitin nanocrystals and nanofibers on physical, mechanical and functional properties in thermoplastic starch films, Elsevier Ltd., 2014
- Salaberria Asier Martinez, et al., Self-bonded composite films based on cellulose nanofibers and chitin nanocrystals as antifungal materials, Elsevier Ltd., 2016
- Salta Maria et al., Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics, Environmental Microbiology, 2013
- Saralegui Ainara et al., Shape-Memory Bionanocomposites Based on Chitin Nanocrystals and Thermoplastic Polyurethane with a Highly Crystalline Soft Segment, American Chemical Society, 2013
- 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

## Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία

- <file:///G:/%CE%94%CE%B9%CE%B1%CF%84%CF%81%CE%B9%CE%B2%CE%AE%20%CE%94%CE%B7%CE%BC%CE%B7%CF%84%CF%81%CE%B9%CE%AC%CE%B4%CE%BF%CF%85%20%CE%A7%CE%A0%CE%B7%CE%B3%CE%B5%CF%82/The%20Ecology%20and%20Biology%20of%20Nephrops%20norvegicus%20-%20%CE%92%CE%B9%CE%B2%CE%BB%CE%AF%CE%B1%20Google.htm>
- <https://www.reference.com/science/list-decomposers-ocean-5411a852dfa0d650>
- (<http://sfa.univ-poitiers.fr/>)
- [slideplayer.com](http://slideplayer.com), Lobster anatomy, 2015

## 7. ABSTRACT

The present undergraduate dissertation conducted within the undergraduate curriculum of the Department of Ichthyology and Aquatic Environment, University of Thessaly.

What has been studied in this study is the increase of biofilm on the chitin shell of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) after their exposure to seawater.

At the experimental stage used as well as parts of shell in seawater filtered in 0, 2  $\mu\text{m}$  and parts of shell in seawater filtered in 0.8. The seawater was collected from Anavros, Magnesia have been implemented. Two experimental arrays of five groups each, were used overall in sterilized falcons (50 ml). The array HD<sub>b</sub> consisted of part of shell in seawater filtered in 0, 2  $\mu\text{m}$  and the array HD<sub>c</sub> consisted of part of shell in seawater filtered in 0.8  $\mu\text{m}$  pores respectively. In the beginning of the incubation of the samples in room conditions (temperature 20 °C and photoperiod 12L: 12D) the first sampling took place at T<sub>0</sub> time. All in all, seven samplings took place throughout a period of 209 days. The samples stabilized with a solution of 2, 5% glutaraldehyde in particle free seawater (4 hours at 4 °C), they were dehydrated and finally became gold plated. They were observed with the help of a scanning electron microscope.

A gradual increase in bacteria with the form of biofilm was observed all over the samplings in all arrays from the 12 days of incubation. In the HD<sub>b</sub> group there was the highest increase in the start of the experiment while the HD<sub>c</sub> group had comparatively the lowest increase. But thereafter there was a role reversal and the blank samples growth was slowed down in addition with the samples with chitin that the growth got faster. The biofilm made its appearance on the 12th day of the experiment. On the 21st day, an adjoining increase of biofilm was observed among the survey of the lobster. On the 21st and 30 days not any significant changes took place in contrast to the previous samplings. On the 56th day of the experiment the whole tip was completely covered with bacterial

biofilm in all arrays and the chitin complex presented an alteration.

The current project has shown that the increase of bacterial biofilm may be possible on the survey of Norway lobster *Nephrops norvegicus* after parts of it stay for long in seawater and the chitin complex can provide a good environment for the bacteria.

**Keywords:** bacteria, biofilm, Norway lobster, *Nephrops norvegicus*, chitin complex, scanning electron microscope, seawater